(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年1月4日(04.01.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/005124 A1

(51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/44 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07D 211/58 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/024127

(22) 国際出願日： 2023年6月29日(29.06.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-106308 2022年6月30日(30.06.2022) JP
特願 2022-211994 2022年12月28日(28.12.2022) JP
特願 2023-041345 2023年3月15日(15.03.2023) JP

(71) 出願人: アステラス製薬株式会社(**ASTELLAS PHARMA INC.**) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中原 聡一郎(**NAKAHARA Soichiro**); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 前田 雅志(**MAEDA Masashi**); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目５番１号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).

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

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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.

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

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

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING NON-HUMAN PRIMATE MODEL OF CEREBRAL INFARCTION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING CEREBRAL INFARCTION

(54) 発明の名称： 脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法及び脳梗塞治療用医薬組成物

(57) **Abstract:** The present invention relates to: a method for producing a non-human primate model of cerebral infarction, said method including administering an endothelin to the cerebral basal ganglia and thalamic area of a non-human primate and thus inducing cerebral basal ganglia damage, thalamic damage and internal capsule damage; and a pharmaceutical composition for treating subacute to chronic cerebral infarction, perforating branch infarction, or cerebral infarction with brain damage in the perforating branch dominant area, said pharmaceutical composition containing NeuroD1 protein or a polynucleotide encoding NeuroD1 protein.

(57) 要約：本発明は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法、並びに、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用の医薬組成物に関する。

WO 2024/005124 A1

明　細　書

発明の名称 ：

脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法及び脳梗塞治療用医薬組成物

技術分野

[0001] 脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル及びその作製方法、前記動物モデルを用いる脳梗塞治療剤のスクリーニング方法、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療方法、及び穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 脳主幹動脈とは、脳に酸素や栄養を送っている複数の太い血管の総称であり、大脳に血液を送っている内頸動脈、中大脳動脈や前大脳動脈、及び小脳や脳幹に血液を送っている椎骨動脈や脳底動脈がこれに含まれる。脳主幹動脈を構成する中大脳動脈から分岐した細い動脈である穿通枝は、脳の深部にある大脳基底核、視床及び内包に酸素や栄養を送り届けている。大脳基底核及び視床は、神経細胞の細胞体が集まる灰白質であるが、内包は、神経細胞の細胞体に乏しく主に神経線維が集積し走行している白質である。大脳半球の表面は大脳皮質という層に覆われており、大脳皮質は大脳基底核及び視床と同様に神経細胞の細胞体が集まる灰白質である。

[0003] 脳梗塞とは脳の血管が詰まり、血液が運ばれなくなった部分の神経細胞死が起きた状態である。脳卒中治療ガイドラインでは、前兆症状の時点又は脳梗塞発作を起こしてから４．５時間以内であれば、脳へのダメージを最小限に抑えるための脳梗塞治療剤による処置を行うことが推奨されている。このように急性期の脳梗塞に対する治療方法は存在する一方で、亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する治療方法は存在していない。

[0004] げっ歯類脳梗塞モデルとして、ラットを開頭し、中大脳動脈の表面に、強い血管収縮作用のあるエンドセリンを投与することにより虚血を誘発するモデルが知られている（非特許文献１）。過去の多くの急性期脳梗塞治療剤の

研究においては、非特許文献１に記載のげっ歯類脳梗塞モデルをはじめとする複数のげっ歯類脳梗塞モデルが使用されてきた。これらのげっ歯類脳梗塞モデルでの有効性を基に急性期脳梗塞治療剤の臨床試験が実施されてきたが、臨床試験において治療剤としての有効性が証明されたものは殆どない（非特許文献２～３）。げっ歯類脳梗塞モデルを用いた非臨床試験における有効性と臨床試験における有効性との乖離の原因として、げっ歯類では脳血管及び脳構造における微小循環、及び大脳に占める白質の大きさ等がヒトと相違していることが挙げられる。そのため、国際脳卒中学会のガイドラインでは、脳梗塞治療剤の開発において、非臨床と臨床の間の結果の乖離を少なくする目的で、脳血管及び組織構造がよりヒトに近い霊長類での評価が推奨されている。

[0005] 非ヒト霊長類脳梗塞モデルとしては、ヒトでの血管閉塞の好発部位である中大脳動脈を人為的に閉塞するモデルであるｍｉｄｄｌｅ ｃｅｒｅｂｒａｌ ａｒｔｅｒｙ ｏｃｃｌｕｓｉｏｎ（ＭＣＡＯ）モデルが一般的に使用されている。ＭＣＡＯモデルは、大脳皮質、内包、及び大脳基底核に広範な障害を惹起することが知られており、それらはヒトの脳梗塞における障害部位と近似している（非特許文献４）。ＭＣＡＯモデルは、ヒトの脳卒中神経学的重症度の評価スケールであるＮａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｔｒｏｋｅ Ｓｃａｌｅ（ＮＩＨＳＳ）を非ヒト霊長類モデルに適合させた改変評価スケールであるＮｏｎ－Ｈｕｍａｎ Ｐｒｉｍａｔｅ Ｓｔｒｏｋｅ Ｓｃａｌｅ（ＮＨＰＳＳ）を用いた評価において、高プラトー（ｐｌａｔｅａｕ ｈｉｇｈ）に梗塞誘導後３～５日で到達し、低プラトー（ｐｌａｔｅａｕ ｌｏｗ）に梗塞誘導後２８～３０日で到達すると報告されている（非特許文献４）。上記結果は、非ヒト霊長類ＭＣＡＯモデルは、徐々に自然回復するモデルであることを示しており、よって、本モデルは慢性期の脳梗塞の薬剤評価には適していないと考えられる。

[0006] エンドセリン等の血管障害誘導剤を用いて脳の内包領域に限局して血管障害を引き起こすことによる非ヒト霊長類の脳卒中モデルの作製方法が知られ

ている（特許文献１）。この脳卒中モデルにおいて、内包領域の血管障害に起因する障害が自然治癒力により時間経過とともに回復するため、多くの個体で歩行や前後肢の動きなどの障害が損傷後２週間程度で損傷前と同程度にまで回復したことが示されている（特許文献１）。また、特許文献１では、当該脳卒中モデルについてＮＨＰＳＳ等の運動機能障害スコアリングは行われていないが、その実施例は、当該脳卒中モデルにおいて重症度の高い運動機能障害が長期に維持されないことを示している。

[0007] 非ヒト霊長類を用いた白質梗塞モデルの作製を目的として、光感受性色素ローズベンガル及び緑色光照射を用いて脳の内包後脚に血栓を生じさせる方法が報告されている（非特許文献５）。この脳梗塞モデルにおいては、手の運動神経を完全に障害させると持続的な手の運動障害と歩行障害をもたらすことができることが示されているものの、障害部位が内包後脚のターゲット部位からわずかに逸脱すると持続的な運動障害を誘導することができないことも報告されている（非特許文献５）。このことは、当該モデルの作製方法は血栓を生じさせる部位の制御が難しく、再現性高く持続的な運動障害を誘導することが困難であることを示している。

[0008] これまでに、再現性高く作製可能な、重症度の高い運動機能障害が長期に維持される脳梗塞モデル、及び当該モデルを用いた脳梗塞発症の７２時間後以降の亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤の有効性評価に関する報告はなされていない。また、穿通枝に支配される大脳基底核や視床に血管障害誘導剤を投与し、穿通枝に支配される領域特異的に障害を誘導する脳梗塞モデルの報告もなされていない。

[0009] 亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療分野において、神経再生を可能にする薬剤は長年望まれてきた。これまでに、細胞移植や内在性幹細胞の賦活化による神経再生アプローチが追求されてきたが、臨床試験で成功した例は無い。それらの２種類の神経再生アプローチとは一線を画するアプローチとして、ｉｎ ｖｉｖｏダイレクトリプログラミング（Ｄｉｒｅｃｔ ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ；ＤＲ）を利用した方法がある。ＤＲとは、ｉＰＳ細胞等の

多能性幹細胞を介さずに体細胞から目的とする細胞に分化誘導させることを意味する。

[0010] 脳内でアストロサイトを神経細胞に変換することができるＤＲを達成する因子の１つとして、転写因子のＮｅｕｒｏＤ１が知られている。マウスにおいて、脳内のアストロサイトにおいてＮｅｕｒｏＤ１を強制発現させることにより、アストロサイトから神経細胞へのＤＲが生じたことが報告された（特許文献２、非特許文献６）。また、マウスにおいて、ＮｅｕｒｏＤ１がミクログリアを神経細胞に変換させること、神経幹細胞や神経前駆細胞を神経細胞へと成熟させることも報告されている（非特許文献７～９）。

[0011] げっ歯類大脳皮質梗塞モデルにおいて、脳損傷の７～９日後の亜急性期に脳内のアストロサイトにＮｅｕｒｏＤ１を強制発現させ、ＤＲにより神経細胞を補充することによって、エサ取り行動等の細かい運動技能（ｆｉｎｅ ｍｏｔｏｒ ｓｋｉｌｌｓ）の障害が回復すること、並びに、一過性の中大脳動脈閉塞モデルマウスにおいて、脳損傷の１週間後にＮｅｕｒｏＤ１を強制発現させたところ、ミクログリア／マクロファージが神経細胞に変換されたこと及び細かい運動技能の障害が回復したことが報告されている（非特許文献１０～１３）。さらに、霊長類の大脳皮質においても、脳損傷の１０～３０日後にＮｅｕｒｏＤ１を強制発現させたところ、アストロサイトがＤＲにより神経細胞に変換されたことが報告されている（非特許文献１４）。このように、ＮｅｕｒｏＤ１による神経変換の事例は複数報告されているものの、ＮｅｕｒｏＤ１による機能回復の報告事例としては、げっ歯類の脳梗塞モデルにおいて、急性期～亜急性期にＮｅｕｒｏＤ１を発現させたことにより細かい運動技能が回復したことのみに留まっており、（１）ＮｅｕｒｏＤ１による歩行や前後肢の動き等の総合的運動技能（ｇｒｏｓｓ ｍｏｔｏｒ ｓｋｉｌｌｓ）の回復の事例、（２）ＮｅｕｒｏＤ１を慢性期に投与した場合の機能回復の事例、及び（３）ＮｅｕｒｏＤ１による非ヒト霊長類での機能回復の事例は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特開２０１５－２３１３３８号公報

特許文献2：国際公開ＷＯ２０１４／０１５２６１

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Ｓｈａｒｋｅｙ Ｊ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｒｅｂ．Ｂｌｏｏｄ Ｆｌｏｗ Ｍｅｔａｂ．，ｖｏｌ．１３，ｐｐ．８６５－８７１，１９９３

非特許文献2：Ｃｌａｒｋ ＷＭ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．５７，ｐｐ．１５９５－１６０２，２００１

非特許文献3：Ｄｉｅｎｅｒ ＨＣ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｏｋｅ，ｖｏｌ．３１，ｐｐ．２５４３－２５５１，２０００

非特許文献4：Ｒａｍｉｒｅｚ－Ｇａｒｃｉａ Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，ｖｏｌ．３９７，ｐｐ．４１－５５，２０１９

非特許文献5：Ｈｙｕｎｇ－Ｓｕｎ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．３０，ｐｐ．３５６－３６４，２０２１

非特許文献6：Ｇｕｏ Ｚ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，ｖｏｌ．１４，ｐｐ．１８８－２０２，２０１４

非特許文献7：Ｔａｉｔｏ Ｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，ｖｏｌ．１０１，ｐｐ．４７２－４８５，２０１９

非特許文献8：Ｋｅｖｉｎ Ｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒａｉｎ，ｖｏｌ．１３８，ｐｐ．４４０－４５５，２０１５

非特許文献9：Ｚｈｅｎｇｌｉａｎｇ Ｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，Ｖｏｌ．１２，ｐｐ．１０９０－１０９２，２００９

非特許文献10：Ｃｈｅｎ ＹＣ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，ｖｏｌ．２８，ｐｐ．２１７－２３４，２０２０

非特許文献11：Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎ Ｊ ｅｔ ａｌ．，ｂｉｏＲｘｉｖ，２０２０，ｄｏｉ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／２０２０．０２．０２．９２９０９１

非特許文献12：Ｊｉａｎｇ ＭＱ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ａｇｉｎｇ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，ｖｏｌ．１３，６１２８５６，２０２１
非特許文献13：Ｉｒｉｅ Ｔ ｅｔ ａｌ．，ｂｉｏＲｘｉｖ，２０２１，ｄｏｉ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／２０２１．０９．２６．４６１８３１
非特許文献14：Ｇｅ ＬＪ ｅｔ ａｌ．Ｆｒｏｎｔ．Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．５，５９０００８，２０２０

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明の一つの課題は、脳梗塞治療剤、特に、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療剤のスクリーニング又は評価に使用可能な脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル、及び該動物モデルの作製方法を提供することである。本発明の別の課題は、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療剤又は治療方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、大脳基底核障害及び視床障害に加えて内包障害を誘導することができること、得られる大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する非ヒト霊長類が脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルになり得ること、その脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルとして特に有用であることを見出した（実施例１）。また、当該非ヒト霊長類動物モデルを用いて、ＮｅｕｒｏＤ１が、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療剤として有効であることを見出した（実施例２～実施例５、実施例１１及び実施例１２）。本発明はこのような知見を基にして完成されたものである。

[0016] 即ち、本発明は以下の態様を提供する。

[0017] ［１］非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法。

［２］大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される１又は２以上の神経核にエンドセリンを投与する、上記［１］に記載の方法。

［３］大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも３つの神経核にエンドセリンを投与する、上記［１］又は［２］に記載の方法。

［４］大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも４つの神経核にエンドセリンを投与する、上記［１］～［３］のいずれかに記載の方法。

［５］大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の５つ全ての神経核にエンドセリンを投与する、上記［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］脳梗塞が亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、上記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］脳梗塞が穿通枝梗塞である、上記［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

［９］脳梗塞が穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、上記［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

［１０］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記［８］又は［９］に記載の方法。

［１１］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［８］又は［９］に記載の方法。

［１２］前記神経核を標的とするように投与部位を定め、当該投与部位にエ

ンドセリンを投与することを含む、上記［２］～［１１］のいずれかに記載の方法。

［１３］非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも４つの神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

［１４］非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の５つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

［１５］前記投与部位が少なくとも３か所である、［１３］又は［１４］に記載の方法。

［１６］非ヒト霊長類がカニクイザルである、上記［１］～［１５］のいずれかに記載の方法。

［１７］投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも１０μｇ、好ましくは少なくとも２０μｇである、上記［１］～［１６］に記載の方法。

［１８］エンドセリンがエンドセリン－１である、上記［１］～［１７］のいずれかに記載の方法。

［１９］上記［１］～［１８］のいずれかに記載の方法で作製された、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル。

［２０］亜急性期～慢性期の脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法で

あって、カニクイザルにエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含み、エンドセリンの投与部位が下記を含む方法：

ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１２ｍｍ、Ｌ：４～１３ｍｍ、Ｄ：１２～２０ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

［２１］エンドセリンの投与部位が下記（１）～（３）のいずれか１つを含む、上記［２０］に記載の方法：

（１）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ、Ｌ：４～６ｍｍ、Ｄ：１２～１４ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：８～１０ｍｍ、Ｌ：１１～１３ｍｍ、Ｄ：１４～１６ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、

（２）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、及び

（３）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：１０～１２ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

［２２］エンドセリンの投与部位が下記（１）～（３）のいずれか１つを含む、上記［２０］又は［２１］に記載の方法：

（１）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、

（２）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、及び

（３）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：１１ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

［２３］エンドセリンの投与部位が下記の投与部位を含む、上記［２０］～［２２］のいずれかに記載の方法：

ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

［２４］エンドセリンの投与部位が下記の投与部位である、上記［２０］～［２３］のいずれかに記載の方法：

ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

［２５］脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、上記［２０］～［２４］のいずれかに記載の方法。

［２６］脳梗塞が穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、上記［２０］～［２５］に記載の方法。

［２７］投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも１０μｇ、好ましくは少なくとも２０μｇである、上記［２０］～［２６］に記載の方法。

［２８］エンドセリンがエンドセリン－１である、上記［２０］～［２７］のいずれかに記載の方法。

［２９］上記［２０］～［２８］のいずれかに記載の方法で作製された、亜

急性期～慢性期の脳梗塞カニクイザルモデル。

［３０］上記［１９］又は［２９］に記載の非ヒト霊長類動物モデルに、被験物質を投与する工程、及び該非ヒト霊長類動物モデルにおける脳梗塞に対する該被験物質の効果を判定する工程を含む、脳梗塞治療剤のスクリーニング方法。

［３１］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物。

［３２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物。

［３３］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記［３１］又は［３２］に記載の医薬組成物。

［３４］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［３１］～［３３］のいずれかに記載の医薬組成物。

［３５］亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［３１］に記載の医薬組成物。

［３６］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［３１］～［３５］のいずれかに記載の医薬組成物。

［３７］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記［３１］～［３６］のいずれかに記載の医薬組成物。

［３８］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［３１］

～［３７］のいずれかに記載の医薬組成物。

［３９］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドがＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、上記［３１］～［３８］のいずれかに記載の医薬組成物。

［４０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、上記［３９］に記載の医薬組成物。

［４１］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、上記［３９］又は［４０］に記載の医薬組成物。

［４２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、上記［３９］～［４１］のいずれかに記載の医薬組成物。

［４３］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、上記［３９］～［４２］のいずれかに記載の医薬組成物。

［４４］ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、上記［４３］に記載の医薬組成物。

［４５］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、上記［３９］～［４４］のいずれかに記載の医薬組成物。

［４６］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである、上記［３９］～［４５］のいずれかに記載の医薬組成物。

［４７］修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、上記［４６］に記載の医薬組成物。

［４８］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記［４７］に記載の医薬組成物。

［４９］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システ

ム（ＤＤＳ）中に内封されている、上記［３９］～［４８］のいずれかに記載の医薬組成物。

［５０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記［３９］～［４９］のいずれかに記載の医薬組成物。

［５１］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、上記［３１］～［３８］のいずれかに記載の医薬組成物。

［５２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、上記［３１］～［３８］及び［５１］のいずれかに記載の医薬組成物。

［５３］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターのいずれかである、上記［５２］に記載の医薬組成物。

［５４］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記［５３］に記載の医薬組成物。

［５５］上記［３１］～［５４］のいずれかに記載の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療方法。

［５６］上記［３１］～［５４］のいずれかに記載の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療方法。

［５７］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記［５５］又は［５６］に記載の方法。

［５８］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［５５］～［５７］のいずれかに記載の方法。

［５９］亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［５５］に記載の方法。

［６０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［５５］～［５９］のいずれかに記載の方法。

［６１］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記［５５］～［６０］のいずれかに記載の方法。

［６２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［５５］～［６１］のいずれかに記載の方法。

［６３］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、上記［５５］～［６２］のいずれかに記載の方法。

［６４］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、上記［６３］に記載の方法。

［６５］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、上記［６３］又は［６４］に記載の方法。

［６６］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、上記［６３］～［６５］のいずれかに記載の方法。

［６７］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、上記［６３］～［６６］のいずれかに記載の方法。

［６８］ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、上記［６７］に記載の方法。

［６９］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、上記［６３］～［６８］のいずれかに記載の方法。

［７０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである、上記［６３］～［６９］のいずれかに記載の方法。

［７１］修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、上記［７０］に記載の方法。

［７２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記［７１］に記載の方法。

［７３］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、上記［６３］～［７２］のいずれかに記載の方法。

［７４］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記［６３］～［７３］のいずれかに記載の方法。

［７５］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、上記［５５］～［６２］のいずれかに記載の方法。

［７６］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを対象に投与する工程を含む、上記［５５］～［６２］及び［７５］のいずれかに記載の方法。

［７７］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、上記［７６］に記載の方法。

［７８］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記［７７］に記載の方法。

［７９］穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療に使用するための、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポ

リヌクレオチド。

［８０］穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療に使用するための、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

［８１］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、［７９］又は［８０］に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

［８２］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［７９］～［８１］のいずれかに記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

［８３］亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［７９］に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

［８４］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［７９］～［８３］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［８５］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記［７９］～［８４］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［８６］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［７９］～［８５］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［８７］前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、上記［７９］～［８６］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［８８］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タ

ンパク質をコードする塩基配列を含む、上記［８７］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［８９］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、上記［８７］又は［８８］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、上記［８７］～［８９］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９１］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、上記［８７］～［９０］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９２］ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、上記［９１］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９３］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、上記［８７］～［９２］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９４］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むポリヌクレオチドである、上記［８７］～［９３］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９５］修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、上記［９４］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９６］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記［９５］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９７］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、上記［８７］～［９６］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９８］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記［８７］～［９７］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［９９］前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、上記［７９］～［８６］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１００］前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、上記［７９］～［８６］及び［９９］のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１０１］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、上記［１００］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１０２］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記［１０１］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１０３］穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

［１０４］穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

［１０５］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記［１０３］又は［１０４］のいずれかに記載の使用。

［１０６］穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［１０３］～［１０５］のいずれかに記載の使用。

［１０７］亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記［１０３］に記載の使用。

［１０８］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む

ポリヌクレオチドである、上記［１０３］～［１０７］のいずれかに記載の使用。

［１０９］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記［１０３］～［１０８］のいずれかに記載の使用。

［１１０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記［１０３］～［１０９］のいずれかに記載の使用。

［１１１］前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、上記［１０３］～［１１０］のいずれかに記載の使用。

［１１２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、上記［１１１］に記載の使用。

［１１３］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、上記［１１１］又は［１１２］に記載の使用。

［１１４］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、上記［１１１］～［１１３］のいずれかに記載の使用。

［１１５］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、上記［１１１］～［１１４］のいずれかに記載の使用。

［１１６］ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、上記［１１５］に記載の使用。

［１１７］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、上記［１１１］～［１１６］のいずれかに記載の使用。

［１１８］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである、上記［１１１］～［１１７］のいずれかに記載

の使用。

［１１９］修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、上記［１１８］に記載の使用。

［１２０］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記［１１９］に記載の使用。

［１２１］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、上記［１１１］～［１２０］のいずれかに記載の使用。

［１２２］ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記［１１１］～［１２１］のいずれかに記載の使用。

［１２３］前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、上記［１０３］～［１１０］のいずれかに記載の使用。

［１２４］前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、上記［１０３］～［１１０］及び［１２３］のいずれかに記載の使用。

［１２５］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、上記［１２４］に記載の使用。

［１２６］発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記［１２５］に記載の使用。

［１２７］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）又はその塩を含む、上記［５０］に記載の医薬組成物。

［１２８］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）

アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）又はその塩を含む、上記［５０］に記載の医薬組成物。

［１２９］脂質ナノ粒子がさらにＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００を含む、上記［１２７］又は［１２８］に記載の医薬組成物。

［１３０］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）又はその塩を含む、上記［７４］に記載の方法。

［１３１］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）又はその塩を含む、上記［７４］に記載の方法。

［１３２］脂質ナノ粒子がさらにＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００を含む、上記［１３０］又は［１３１］に記載の方法。

［１３３］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）又はその塩を含む、上記［９８］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１３４］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）又はその塩を含む、上記［９８］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１３５］脂質ナノ粒子がさらにＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００を含む、上記［１３３］又は［１３４］に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

［１３６］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）又はその塩を含む、上記［１２２］に記載

の使用。

［１３７］脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）又はその塩を含む、上記［１２２］に記載の使用。

［１３８］脂質ナノ粒子がさらにＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００を含む、上記［１３６］又は［１３７］に記載の使用。

[0018] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号２０２２－１０６３０８号、２０２２－２１１９９４、及び２０２３－０４１３４５号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルを作製することができる。この脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルとして特に有用である。また、本発明では、穿通枝梗塞若しくは穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療に特に有用な治療剤、治療用医薬組成物、又は治療方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図１（Ａ～Ｃ）は、実施例１の検討実験５でエンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の脳の冠状断面のＴＴＣ染色の結果を示す写真である。Ａは尾状核、被殻及び淡蒼球、Ｂは被殻、淡蒼球及び内包、Ｃは視床外側腹側核及び視床後腹側核、並びに内包における障害巣を示している。円形枠は障害巣を示す。

[図2]図２（Ａ～Ｃ）は、実施例１の検討実験６でエンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の脳の冠状断面のＴＴＣ染色の結果を示す写真である。Ａは尾状核、被殻及び内包、Ｂは内包及び視床外側腹側核、Ｃは視床外側腹側核及び視床後腹側核における障害巣を示している。円形枠は障害巣を示す

。

[図3]図３は、実施例１の検討実験６でエンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の経時的なｍＲＳ評価結果を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸はｍＲＳの値（最大値６）を示す。

[図4]図４は、実施例１の検討実験６でエンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の経時的なＮＨＰＳＳの運動系スコアリングの評価結果を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸はＮＨＰＳＳ（運動系スコア）の値（最大値３２）を示す。

[図5]図５は、実施例５のＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群（ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１）及びコントロール群（ＡＡＶ－Ｃｏｎｔｒｏｌ）のエンドセリン－１処置後の運動機能障害の経時的変化をｍＲＳで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸はｍＲＳの値（最大値６）を示す。白丸、黒丸はそれぞれ、ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群、コントロール群の各評価時点におけるｍＲＳの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。エンドセリン－１注入後２１日目にＡＡＶベクターを投与した。

[図6]図６は、実施例５のＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群（ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１）及びコントロール群（ＡＡＶ－Ｃｏｎｔｒｏｌ）のエンドセリン－１処置後の運動機能障害の経時的変化をＮＨＰＳＳの運動系スコアリングで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸はＮＨＰＳＳ（運動系スコア）の値（最大値３２）を示す。白丸、黒丸はそれぞれＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群、コントロール群の各評価時点におけるＮＨＰＳＳ（運動系スコア）の平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。エンドセリン－１注入後２１日目にＡＡＶベクターを投与した。

[図7]図７は、実施例５のＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群（ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１）及びコントロール群（ＡＡＶ－Ｃｏｎｔｒｏｌ）の体重の推移を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸は体重を示す。白丸、黒丸はそれぞれＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群、コントロール群の各評価時点における体重の平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。

[図8]図８は、実施例５のＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群（ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１）及びコントロール群（ＡＡＶ－Ｃｏｎｔｒｏｌ）の摂餌行動の推移を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の週数を、縦軸は摂餌スコアを示す。白丸、黒丸はそれぞれＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群、コントロール群の各評価時点における摂餌スコアの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。

[図9A]図９は、実施例６で得られた、エンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の経日的な脳の画像を示す。図９Ａは実施例６（ａ）の水平断Ｔ２強調画像を示す。図９Ａ中の（ａ）～（ｅ）は、それぞれエンドセリン－１注入後１日目、７日目、２１日目、４１日目、６９日目の結果を示す。Ｌは左脳、Ｒは右脳を表す。エンドセリン－１は左脳に注入した。図中の（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）は、実施例２に記載のエンドセリン－１注入部位（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を示す。

[図9B]図９は、実施例６で得られた、エンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の経日的な脳の画像を示す。図９Ｂは実施例６（ａ）の水平断フレアー画像を示す。図９Ｂ中の（ａ）～（ｅ）は、それぞれエンドセリン－１注入後１日目、７日目、２１日目、４１日目、６９日目の結果を示す。Ｌは左脳、Ｒは右脳を表す。エンドセリン－１は左脳に注入した。図中の（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）は、実施例２に記載のエンドセリン－１注入部位（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を示す。

[図9C]図９は、実施例６で得られた、エンドセリン－１処置されたカニクイザル個体の経日的な脳の画像を示す。図９Ｃは実施例６（ｂ）の水平断灌流画像を示す。図９Ｃ中の（ａ）～（ｅ）は、それぞれエンドセリン－１注入後１日目、７日目、２１日目、４１日目、６９日目の結果を示す。Ｌは左脳、Ｒは右脳を表す。エンドセリン－１は左脳に注入した。図中の（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）は、実施例２に記載のエンドセリン－１注入部位（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を示す。

[図9D]図９は、実施例６で得られた、エンドセリン－１処置されたカニクイ

ザル個体の経日的な脳の画像を示す。図９Ｄは実施例６（ｃ）の冠状断ＤＴＩを示す。図９Ｄ中の（ａ）～（ｅ）は、それぞれエンドセリン－１注入後１日目、７日目、２１日目、４１日目、６９日目の結果を示す。Ｌは左脳、Ｒは右脳を表す。エンドセリン－１は左脳に注入した。

[図10]図１０は、実施例１２（ａ）のＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群（ＮＤ１　ｍＲＮＡ）及びコントロール群（Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１処置後の運動機能障害の経日的変化をｍＲＳで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸はｍＲＳの値（最大値６）を示す。白丸は、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群の各評価時点におけるｍＲＳの平均値を示す。なお、エンドセリン－１注入後２８日目以降は２週間毎にｍＲＳを評価したが、５６日目の結果は５７、５８又は５９日目にそれぞれの個体を評価した結果の平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。黒丸はコントロール群１個体の各評価時点におけるｍＲＳを示す。なお、５６日目の結果は、５８日目に評価した結果を示す。エンドセリン－１注入後２１日目にｍＲＮＡ－ＬＮＰを投与した。

[図11]図１１は、実施例１２（ｂ）のＤＴＩによる解析の結果を示す。Ａ及びＢは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したカニクイザル個体の脳のＤＴＩ画像をもとにテンソル解析を行い取得した拡散テンソルトラクトグラフィ（Ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ　Ｔｅｎｓｏｒ　Ｔｒａｃｔｏｇｒａｐｈｙ；ＤＴＴ）を示す。図中のＲは右脳（非障害側。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与無し）、Ｌは左脳（障害側。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与有り）を示す。画像中に、計測したＦＡ値を描出した。Ａは、コントロール群（Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１注入後１１４日目の結果を示し、ＢはＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群（ＮＤ１　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１注入後１１４～１１５日目にＦＡ値の解析を行った３個体中の代表的な結果を示す。ＣはＤＴＩによるＦＡ値の定量結果を示す。Ｃのグラフの縦軸は障害側のＦＡ値を非障害側のＦＡ値で除した値（相対値）を示す。白丸は、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群の相対値の個々値を示し、バーでそれらの平均値を示す。エラーバ

ーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。黒丸はコントロール群１個体の相対値を示す。

[図12]図１２は、実施例１２（ｃ）の側脳室の容積の解析結果を示す。Ａ及びＢは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したカニクイザル個体の脳のＴ２強調画像を示す。図中のＲは右脳（非障害側。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与無し）、Ｌは左脳（障害側。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与有り）を示す。Ａは、コントロール群（Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１注入後１１４日目の結果を示し、ＢはＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群（ＮＤ１　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１注入後１１４～１１５日目に解析を行った３個体中の代表的な結果を示す。Ｃは側脳室の容積の定量結果を示す。Ｃのグラフの縦軸は障害側の側脳室の容積を非障害側の側脳室の容積で除した値（相対値）を示す。白丸は、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群の相対値の個々値を示し、バーでそれらの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。黒丸はコントロール群１個体の相対値を示す。

[図13]図１３は実施例１２（ｄ）のドパミントランスポーターの発現解析の結果を示す。Ａ及びＢは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したカニクイザル個体の脳の冠状断切片のドパミントランスポーターの免疫染色の結果を示す写真である。図中のＲは右脳（非障害側。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与無し）、Ｌは左脳（障害側。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与有り）を示す。矢印は線条体を示す。Ａは、コントロール群（Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１処置（脳虚血誘導）後１１８目の結果を示し、ＢはＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群（ＮＤ１　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１注入後１１９～１２２日目にドパミントランスポーターの免疫染色を行った３個体中の代表的な結果を示す。Ｃはドパミントランスポーターの発現強度を解析した結果を示す。Ｃのグラフの縦軸は障害側の蛍光染色強度を非障害側の蛍光染色強度で除した値（相対値）を示す。白丸は、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群の相対値の個々値を示し、バーでそれらの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（ＳＥＭ）を示す。黒丸はコントロール群１個体の相対値を示す。

[図14]図１４は実施例１４のＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）群（ＮＤ１　ｍＲＮＡ）及びコントロール群（Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍＲＮＡ）のエンドセリン－１処置後の運動機能障害の経日的変化をｍＲＳで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン－１注入後の日数を、縦軸はｍＲＳの値（最大値６）を示す。白丸は、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群の各評価時点におけるｍＲＳの平均値を示す。なお、エンドセリン－１注入後２８日目以降は２週間毎にｍＲＳを評価した。黒丸はコントロール群の各評価時点におけるｍＲＳの平均値を示す。なお、７０日目の結果は、６９又は７０日目に評価した結果の平均値を示す。エンドセリン－１注入後２１日目にｍＲＮＡ－ＬＮＰを投与した。

発明を実施するための形態

[0021]　以下、本発明を詳細に説明する。

[0022] １．非ヒト霊長類動物モデルの作製

本発明は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法（以下、「本発明の動物モデル作製方法」とも称する）を提供する。

[0023] ａ）非ヒト霊長類

本明細書において、「非ヒト霊長類」とは、ヒトを除く任意の霊長類（霊長目）の動物を指す。本発明において用いる非ヒト霊長類（サル）は、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害をはじめとする脳機能障害に関して、ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｒａｎｋｉｎ　Ｓｃａｌｅ（ｍＲＳ、後述の表１参照）やＮｏｎ－Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｉｍａｔｅ　Ｓｔｒｏｋｅ　Ｓｃａｌｅ（ＮＨＰＳＳ（Ｂｅｎ　Ｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｌ．Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．２５（１），ｐｐ．６８－７８，２００３）、後述の表２参照）等を用いた運動機能障害スコアリングで評価を行うことが可能な非ヒト霊長類であることが好ましい。本発明に従ってエンドセリンを投与する非ヒト霊長類としては、例えば、類人猿、オナガザル科に属するサル、オマキザル科に属するサ

ルを挙げることができる。「類人猿」とは霊長目（霊長類）ヒト上科に属するサルを指す。類人猿としては、例えば、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、ボノボ、テナガザル等を挙げることができる。オナガザル科に属するサルとしては、以下に限定されないが、例えば、マカク属に属するニホンザル、アカゲザル、カニクイザル、タイワンザル、ブタオザル、ボンネットモンキー等のサル（マカクザル）、ヒヒ属に属するマントヒヒ、ゲラダヒヒ等のサル（ヒヒ）、マンドリル属に属するマンドリル、ドリル等のサルを挙げることができる。オマキザル科に属するサルとしては、以下に限定されないが、例えば、オマキザル属に属するフサオマキザル等のサル（オマキザル）、リスザル属に属するコモンリスザル等のサル（リスザル）、マーモセット属に属するコモンマーモセット等のサル（マーモセット）を挙げることができる。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、カニクイザルである。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、３歳以上のカニクイザルである。本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、雄又は雌であってよいが、一実施形態では、雄であることが好ましい。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、雄のカニクイザルである。

[0024] 「カニクイザル」（Ｍａｃａｃａ　ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）は哺乳綱霊長目オナガザル科マカク属に分類される霊長類である。カニクイザルは、ヒトと同じように二足歩行を行う。そのため、内頸動脈が大きく彎曲するなど、血管走行がヒトと極めて類似している。また、脳高次機能を持ち、運動機能だけではなく、ヒトに対する警戒心等の意識レベル及び認知機能を観察することが可能である。

[0025] ｂ）エンドセリン

「エンドセリン」（成熟型）は、２１アミノ酸残基からなり、分子内に２個のジスルフィド結合を有するペプチドである。エンドセリンは、２０３アミノ酸残基からなる前駆体がプロセッシングを受けて生成する。エンドセリ

ンには、異なる遺伝子にコードされるエンドセリン－１、エンドセリン－２、及びエンドセリン－３というアミノ酸配列及び構造のよく似た３種類のペプチドアイソフォームが存在する。ほとんどの哺乳類がこれら３種のエンドセリンを有しており、これら３種のエンドセリンの機能は生物種間で保存されている。さらに、エンドセリン－１は、そのアミノ酸配列が生物種間で高度に保存されていることも知られている。３種のエンドセリンは一過性の血管拡張作用と、それに引き続く持続的な血管収縮作用を有する。ラットを開頭し中大脳動脈の表面にエンドセリンを投与することにより虚血を誘発できることが知られている（非特許文献１）。本発明において用いられるエンドセリンは、例えば、エンドセリン－１又はエンドセリン－２である。一実施形態において、非ヒト霊長類に投与されるエンドセリンは、ヒトエンドセリン－１又はヒトエンドセリン－２である。本発明において用いられるエンドセリンは、エンドセリン活性（血管収縮作用）を有する限りにおいて配列は限定されないが、例えば、エンドセリン－１は、例えば、配列番号９に示すアミノ酸配列に対して９０％以上、好ましくは９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、より好ましくは配列番号９に示すアミノ酸配列を含むペプチドであってよい。

[0026] ｃ）非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与と脳障害の誘導

本明細書において「大脳基底核・視床領域」は、大脳基底核と視床からなる領域を指す。大脳基底核は、線条体、淡蒼球、視床下核、及び黒質から構成される神経核集合体である。大脳基底核は、小脳と共に大脳皮質とループ回路を形成し、大脳皮質、特に前頭葉の活動を制御している。線条体は、尾状核と被殻からなり、それらの間に内包が存在している。淡蒼球は外節と内節に分けられる。黒質は網様部と緻密部からなる。被殻と淡蒼球を合わせると凸レンズ状に見えることから、これをレンズ核と呼ぶ。大脳基底核は内包により尾状核とレンズ核（被殻及び淡蒼球）に分けられており、基底核よりも内側には視床が存在する。大脳基底核は日常生活や習慣に関与する。視床

は大脳半球の中心部の、中脳の上部に位置する左右対称の２つの構造体であり、多数の神経核から構成されている。左右それぞれの視床は外側部と内側部に分けることができ、外側部は、視床後腹側核、視床外側腹側核、視床前腹側核、視床背側外側核、視床後外側核、視床枕及び視床外側膝状体核からなり、内側部は、視床前核群、視床内側核群及び視床内側膝状体核からなる。視床は、視覚、聴覚、体性感覚等の感覚入力を大脳皮質へ中継する役割を担い、また、運動の調節に関する情報も小脳や大脳基底核から視床を経由して運動に関連する領域に伝えられる。

[0027] 本発明の動物モデル作製方法においては、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導する。エンドセリンは、強力な血管収縮作用を有し、エンドセリンを投与することにより投与部位周辺の血管を収縮させ虚血を誘発し、梗塞巣（障害巣）を誘導することができる。本発明において「障害を誘導する」とは、エンドセリンの投与により投与部位周辺の虚血が誘発され、神経細胞の壊死が起こり、壊死した部位の機能が損傷されることを意味する。一実施形態では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導する。本発明において「大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与」とは、大脳基底核・視床領域を標的として（すなわち、大脳基底核・視床領域にエンドセリンが到達するように）エンドセリンを投与することを意味する。本発明において、例えば、神経核に「エンドセリンを投与」するという記載も、同様に、その神経核を標的として（すなわち、その神経核にエンドセリンが到達するように）エンドセリンを投与することを意味する。

[0028] 本明細書において「投与部位」とは、エンドセリンを大脳基底核・視床領域に投与（好ましくは、注入）する際の頭蓋骨表面上（頭蓋上）の位置及び頭蓋上のその投与位置の直下の硬膜からの深さからなる三次元座標で特定される場所をいう。

[0029] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、大脳基底核・視床

領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される神経核に、エンドセリンを投与することを含む。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ又は５つ全て（被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核）の神経核にエンドセリンを投与することを含む。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域内を標的とする少なくとも１か所、少なくとも２か所、少なくとも３か所、少なくとも４か所、又は少なくとも５か所の投与部位（典型的には、注入部位）にエンドセリンを投与することを含む。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核、及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、又は５つ全ての神経核を標的とする、合計で少なくとも１か所、少なくとも２か所、少なくとも３か所、少なくとも４か所、又は少なくとも５か所の投与部位（典型的には、注入部位）にエンドセリンを投与することを含む。一実施形態では、非ヒト霊長類の大脳基底核、視床外側腹側核及び視床後腹側核にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導してもよい。一実施形態では、非ヒト霊長類の被殻、淡蒼球、及び視床（例えば、視床外側腹側核及び視床後腹側核）にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導してもよい。一実施形態では、非ヒト霊長類の被殻、尾状核、淡蒼球、及び視床（例えば、視床外側腹側核及び視床後腹側核）にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導してもよい。

[0030] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域、例えば、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ又は５つ全ての神経核を標的とするように

投与部位を定め、当該投与部位にエンドセリンを投与することを含む。

[0031] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の５つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定め、当該投与部位にエンドセリンを投与することを含む。

[0032] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも４つの神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法、

であってもよい。

[0033] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の５つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法、

であってもよい。

[0034] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及

び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも４つ又は５つ全ての神経核を標的とするように、少なくとも３か所又は４か所の投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法、

であってもよい。

[0035] エンドセリンの投与部位（典型的には、注入部位）は、当業者であれば、公知の情報や、コンピューター断層撮影（ＣＴ）、若しくは核磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）により得られた脳内の画像、又は本明細書に記載のブレグマを基点とする方法等を用いて適宜定めることができる。

[0036] 一実施形態では、大脳基底核・視床領域、例えば、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核等の神経核に対する、エンドセリンの投与部位（典型的には、注入部位）の位置は、頭蓋骨表面の前方にある矢状縫合と冠状縫合との交差点であるブレグマ（Ｂｒｅｇｍａ）を基点（Ｂ：０ｍｍ、ＭＬ座標：０ｍｍ（正中））として定めることができる。より具体的には、投与部位（典型的には、注入部位）の位置は、頭蓋上の投与位置（投与のための頭蓋骨の穴に相当）を指定する、ブレグマを基点とした仮想水平面上の前後軸方向の距離Ｂ及び左右軸方向の距離Ｌ（左）又はＲ（右）と、その頭蓋上の投与位置の直下の硬膜からの深さ（垂直距離）Ｄとで表される座標で定めることができる。前後軸方向の距離Ｂは、前方の距離をプラスの数値で、後方の距離をマイナスの数値で表す。本発明では、典型的には、前後左右軸方向の距離で指定される頭蓋上の投与位置（頭蓋骨の穴の位置）から、鉛直下向き方向（すなわち、重力方向）に向かって針を挿入し、その針を通じてエンドセリンを脳内に投与することができる。したがって、本発明において投与部位を規定する深さＤは、頭蓋上の投与位置の直下の硬膜から鉛直下向き方向（すなわち、重力方向）への脳内での深さを指す。本発明では、ブレグマを投与部位（典型的には、注入部位）の基点として用いることにより、個体間のブレを低減し、所定の神経核における投与部位をより安定した位置に定めることを可能にすることができる。本発明において、投与部位

の位置は、非ヒト霊長類の頭部が固定された状態で定められる。非ヒト霊長類の頭部の固定には、例えば脳定位固定装置を用いることができる。具体的には、非ヒト霊長類の両耳に脳定位固定装置のイヤーバーを挿入し、頭部が左右に動かないように固定した後、上顎用のバー及び眼窩用のバーを用いて頭部が上下に動かないように固定する。イヤーバーを挿入して頭部を固定することにより、非ヒト霊長類の頭部を再現良く定位固定することが可能である。それにより、非ヒト霊長類の頭部は、投与の際、頭頂部が上側になり、両耳を結ぶ直線が水平となり、顔が正面を向くように固定される。

[0037] ブレグマを基点として定められる所定の位置の投与部位（典型的には、注入部位）が、脳内のどの領域、例えば、どの神経核に対してエンドセリンを投与するものであるか（すなわち、どの領域又はどの神経核を投与の標的とするか）について、予め確認してもよい。所定の位置の投与部位について投与の標的となる領域や神経核は、例えば、染色液を投与部位に注入し、注入直後の脳において染色された領域を調べることにより、決定することができる。使用する染色液としては、以下に限定されないが、例えば、エバンスブルー（ＣＡＳ番号：３１４－１３－６）が挙げられる。目的の領域又は神経核を投与の標的とすることが確認された投与部位に、エンドセリンを投与してもよい。

[0038] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：０～４ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１５～２１ｍｍ、及び（ｉｉ）Ｂ：４～１４ｍｍ、Ｌ：３～１４ｍｍ、Ｄ：１２～２３ｍｍに位置する少なくとも合計３か所（例えば、３か所、４か所、又は５か所）の投与部位を含むものであってよい。これらの投与部位は、マカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。各投与部位へのエンドセリンの投与は、同時に行ってもよいし、逐次的に行ってもよいし、複数回に分けて行ってもよい。１つの投与部位へのエンドセリンの投与は、１回のみ行ってもよいし、複数回行ってもよい。例えば、ある投与部位にエンドセリンを投与した後、時間を空

けて他の投与部位及び／又は同じ投与部位にエンドセリンを投与してもよい。一実施形態では、ある投与部位にエンドセリンを投与した後、その翌日又はそれよりも後に、他の投与部位及び／又は同じ投与部位にさらにエンドセリンを投与してもよい。

[0039] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、カニクイザルに、ブレグマを基点とした本明細書に記載のエンドセリンの投与部位にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む方法である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、カニクイザルの頭蓋上に投与位置を指定し、当該投与位置の直下の投与部位にエンドセリンを投与することを含み、そのエンドセリンの投与部位が本明細書に記載の、ブレグマを基点とした投与部位を含む、方法である。これらの実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、亜急性期～慢性期、例えば慢性期の脳梗塞（例えば、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞）の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法でありうる。

[0040] カニクイザルを例にとって説明すると、ブレグマを基点として、Ｂ：０～４ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１５～２１ｍｍに位置する投与部位は、視床を標的としている。同様に、ブレグマを基点として、Ｂ：４～１４ｍｍ、Ｌ：３～１４ｍｍ、Ｄ：１２～２３ｍｍに位置する投与部位は、大脳基底核（特には、線条体及び淡蒼球）を標的としている。

[0041] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１２ｍｍ（例えば、９ｍｍ、又は１１ｍｍ）、Ｌ：４～１３ｍｍ（例えば、５ｍｍ、８ｍｍ、１２ｍｍ又は１３ｍｍ）、Ｄ：１２～２０ｍｍ（例えば、１３ｍｍ、１５ｍｍ、又は１９ｍｍ）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計３か所、例えば、３か所、４か所、又は５か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0042] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１２ｍｍ（例えば、９ｍｍ、又は１１ｍｍ）、Ｌ：７～１４ｍｍ（例えば、８ｍｍ、又は１３ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計３か所、例えば、３か所又は４か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0043] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｄ：１２～１４ｍｍ（例えば、１３ｍｍ）、及び（ｉｖ）Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：１１～１３ｍｍ（例えば、１２ｍｍ）、Ｄ：１４～１６ｍｍ（例えば、１５ｍｍ）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計４か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0044] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計３か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0045] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ

）Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、及び（ｉｉｉ）Ｂ：１０～１２ｍｍ（例えば、１１ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計３か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0046] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計４か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0047] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍにそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計３か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0048] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：１１ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍにそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計３か所の投与部位）を含むものであってよい。

[0049] さらに好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計４か所の投与部位）であってよい。

[0050] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｄ：１２～１４ｍｍ（例えば、１３ｍｍ）、（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：１２～１４ｍｍ（例えば、１３ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、（ｉｖ）Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）、及び（ｖ）Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計５か所の投与部位）を含むものであってよい。一実施形態では、一個体において、（ｉ）、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）の投与部位にエンドセリンを投与した後、その翌日に（ｉｖ）及び（ｖ）の投与部位にさらにエンドセリンを投与してもよい。

[0051] カニクイザルを例にとって説明すると、ブレグマを基点として、Ｂ：１～３ｍｍ（例えば、２ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）に位置する投与部位は、視床外側腹側核及び視床後腹側核を標的としている。同様に、ブレグマを基点として、Ｂ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）に位置する投与部位は、淡蒼球を標的としている。ブレグマを基点として、Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：４～６ｍｍ（例えば、５ｍｍ）、Ｄ：１２～１４ｍｍ（例えば、１３ｍｍ）に位置する投与部位は、尾状核を標的としている。そして、ブレグマを基点として、Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：１１～１３ｍｍ（例えば、１２ｍｍ）、Ｄ：１４～１６ｍｍ（例えば、１５ｍｍ）に位置する投与部位は、被殻を標的としている。同様に、ブレグマを基点として、Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：１２～１４ｍｍ（例えば、１３ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）に位置する投与部位は、被殻

を標的としている。また、ブレグマを基点として、Ｂ：８～１０ｍｍ（例えば、９ｍｍ）、Ｌ：７～９ｍｍ（例えば、８ｍｍ）、Ｄ：１８～２０ｍｍ（例えば、１９ｍｍ）に位置する投与部位は、被殻（特には、被殻の深部）を標的としている。これらの投与部位は内包に隣接しているため、これらの投与部位へのエンドセリンの投与は、内包においても障害をもたらし得る。

[0052] 上記の投与部位は、好ましくはマカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。これらの投与部位へのエンドセリンの投与は、同時に行ってもよいし、逐次的に行ってもよいし、複数回に分けて行ってもよい。

[0053] 本発明の動物モデル作製方法では、右半身に運動機能障害を惹起するために左脳にのみエンドセリンを投与してもよく、左半身に運動機能障害を惹起するために右脳にのみエンドセリンを投与してもよい。上述の、ブレグマを基点としたエンドセリンの投与部位は、左脳にエンドセリンを投与する例を示しているが、左右対称な右脳の該当部位（すなわち、上記の左脳内のエンドセリンの投与部位に対し、前後軸方向の距離Ｂ及び深さＤは同じであるが、左右軸方向は同じ距離をＬ（左）の代わりにＲ（右）方向で定めた座標を有する投与部位）にエンドセリンを投与する方法も、本発明に含まれる。また、左半身及び右半身に運動機能障害を惹起するために、エンドセリンの投与量等を適宜調節し、左脳及び右脳の両方にエンドセリンを投与する方法も、本発明に含まれ得る。

[0054] 本発明の動物モデル作製方法では、投与部位（典型的には、注入部位）あたりのエンドセリンの投与量（典型的には、注入量）は、例えば、少なくとも０．１μｇ、少なくとも１μｇ、少なくとも４μｇ、又は少なくとも１０μｇであってよく、少なくとも２０μｇ、少なくとも３０μｇ、少なくとも５０μｇ、少なくとも５５μｇ、又は少なくとも６０μｇであることが好ましく、かつ、２００μｇ以下、１５０μｇ以下、１００μｇ以下、９０μｇ以下、又は７０μｇ以下であることが好ましい。一実施形態では、投与部位（典型的には、注入部位）あたりのエンドセリンの投与量は、０．１μｇ～

２００μｇ、１０μｇ～２００μｇ、２０μｇ～２００μｇ、３０μｇ～２００μｇ、０．１μｇ～１５０μｇ、１０μｇ～１５０μｇ、２０μｇ～１５０μｇ、３０μｇ～１５０μｇ、１０μｇ～１００μｇ、２０μｇ～１００μｇ、３０μｇ～１００μｇ、２０μｇ～９０μｇ、３０μｇ～９０μｇ、５０μｇ～９０μｇ、６０μｇ～９０μｇ、２０μｇ～７０μｇ、３０μｇ～７０μｇ、５０μｇ～７０μｇ、６０μｇ～７０μｇ、２０μｇ～６０μｇ、３０μｇ～６０μｇ、又は５０μｇ～６０μｇであってもよく、例えば、６０μｇであってもよい。一実施形態では、好ましくは、投与部位（典型的には、注入部位）あたりのエンドセリンの投与量は２０μｇ～７０μｇ、２０μｇ～６０μｇ、又は３０μｇ～６０μｇであり、さらに好ましくは５０μｇ～６０μｇである。

[0055] これらの投与部位（典型的には、注入部位）あたりのエンドセリンの投与量（典型的には、注入量）は、好ましくはマカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。投与又は注入するエンドセリンの投与量（典型的には、注入量）は、使用する生物種に応じて（例えば、生物種の体重に応じて）、当業者が適切に定めることができる。

[0056] 本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンは水性媒体（水、生理食塩水、緩衝液、生理学的に許容可能な有機溶媒等）中の溶液（例えば、水溶液）の形態で投与してもよい。一実施形態では、エンドセリンは、酢酸水溶液（例えば、０．０５～５％酢酸、好ましくは０．１～１％酢酸）で希釈したエンドセリンの溶液として投与してもよい。エンドセリンを溶液の状態で投与する場合、投与は注入により行うことができるが、それに限定されない。注入は、以下に限定されないが、マイクロシリンジ等の注射器、投与用カニューレ、及び／又はマイクロインジェクションチューブ等の任意の脳内注入手段を用いて行うことができる。

[0057] 投与又は注入するエンドセリン溶液の量（体積）は、以下に限定するものではないが、投与部位あたり、２μＬ以上であってよく、４μＬ以上である

ことが好ましく、１０μＬ以上、１２μＬ以上、２０μＬ以上、又は３０μＬ以上であることがより好ましい。投与又は注入するエンドセリン溶液の量はまた、投与部位あたり、１００μＬ以下、５０μＬ以下、４０μＬ以下、又は３０μＬ以下であってよい。一実施形態では、投与又は注入するエンドセリン溶液の量は、投与部位あたり、２μＬ～１００μＬ、４μＬ～５０μＬ、１０μＬ～１００μＬ、１２μＬ～４０μＬ、１２μＬ～３０μＬ、２０μＬ～４０μＬ、２０μＬ～５０μＬ、２５μＬ～５０μＬ、３０μＬ～５０μＬ、又は３０μＬ～１００μＬであってよく、例えば、３０μＬであってもよい。一実施形態において、投与部位（典型的には、注入部位）あたり少なくとも２０μｇのエンドセリンを投与する場合、投与又は注入するエンドセリン溶液の量は、投与部位あたり、１０μＬ以上、又は１２μＬ以上、例えば１０μＬ～５０μＬであってよい。一実施形態において、投与部位（典型的には、注入部位）あたり少なくとも５０μｇのエンドセリンを投与する場合、投与又は注入するエンドセリン溶液の量は、投与部位あたり、２０μＬ以上、又は３０μＬ以上、例えば２０μＬ～５０μＬであってよい。

[0058] 上記の投与又は注入するエンドセリン溶液の量（体積）は、好ましくはマカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。投与又は注入するエンドセリン溶液の量（体積）は、使用する生物種に応じて、当業者が適切に定めることができる。

[0059] 投与又は注入する溶液中のエンドセリンの濃度は、以下に限定されないが、少なくとも０．１μｇ／μＬであってよく、少なくとも０．５μｇ／μＬ、又は少なくとも１μｇ／μＬが好ましく、かつ、１０μｇ／μＬ以下、５μｇ／μＬ以下、又は３μｇ／μＬ以下が好ましい。一実施形態では、当該エンドセリン濃度は、例えば、０．１μｇ／μＬ～１０μｇ／μＬであってよく、０．５μｇ／μＬ～５μｇ／μＬが好ましく、０．５μｇ／μＬ～３μｇ／μＬがより好ましく、１μｇ／μＬ～３μｇ／μＬがさらに好ましく、例えば２μｇ／μＬであってよい。

[0060] 一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位（典型的には、注入部位）に、濃度０．５～３μｇ／μＬ、好ましくは濃度１～３μｇ／μＬ、例えば、濃度２μｇ／μＬのエンドセリン溶液を、投与部位あたり１０μＬ以上、好ましくは１０μＬ～５０μＬ投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度０．５～３μｇ／μＬ、好ましくは濃度１～３μｇ／μＬ、例えば、濃度２μｇ／μＬのエンドセリン溶液を、投与部位あたり１２μＬ以上、好ましくは１２μＬ～４０μＬ投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度０．５～３μｇ／μＬ、好ましくは濃度１～３μｇ／μＬ、例えば、濃度２μｇ／μＬのエンドセリン溶液を、投与部位あたり２０μＬ以上、好ましくは２０μＬ～５０μＬ投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度０．５～３μｇ／μＬ、好ましくは濃度１～３μｇ／μＬ、例えば、濃度２μｇ／μＬのエンドセリン溶液を、投与部位あたり３０μＬ以上、好ましくは３０μＬ～５０μＬ、又は３０μＬ～１００μＬ投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度０．５～３μｇ／μＬ、好ましくは濃度１～３μｇ／μＬ、例えば、濃度２μｇ／μＬのエンドセリン溶液を、投与部位あたり２０μＬ～４０μＬ、好ましくは２５μＬ～３５μＬ、例えば３０μＬ投与することを含み得る。これらは、使用する生物種に応じて、当業者が適切に定めることができる。

[0061] エンドセリンの濃度及び投与量（典型的には、注入量）を適切に選択することにより、エンドセリンによる効果が、投与部位から、隣接した脳領域（例えば、内包、視床下核等）まで拡がることを容易にすることができる。

[0062] 本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域に、上記のようにしてエンドセリンを投与することにより、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することができる。一実施形態では、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び／又は視床後腹側核に、上記のようにしてエンドセリンを投与することにより、大脳基底核障害、視床障害及び内

包障害を誘導することができる。

[0063] 本発明では、大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与により、脳虚血が誘導され、投与部位周辺において壊死が生じ、障害が誘導される。

[0064] 本発明に関して「大脳基底核障害」とは、大脳基底核に生じた障害を指す。大脳基底核に障害を生じると、パーキンソン病等にみられるように、意図する運動だけでなく、日常的な自然な動作や行動も困難となる。

[0065] 大脳基底核を構成する被殻は、尾状核と共に背側線条体を形成しており、また、レンズ核の最外部を形成している。被殻は強化学習における役割を持っていると考えられる。大脳基底核を構成する尾状核は、脳の中心付近で視床の両側に存在する。尾状核は学習と記憶、特にフィードバック処理に強く関わっていることが証明されている。大脳基底核を構成する淡蒼球は、外節と内節とに区別されるが、どちらも共にＧＡＢＡ作動性の大型投射ニューロンを含んでいる。これらの神経核の障害は大脳基底核障害を引き起こす。

[0066] 本発明に関して「視床障害」とは、脳の視床に生じた障害を指す。大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与が、視床（例えば、視床外側腹側核及び／又は視床後腹側核）への投与を含む場合、当該投与は視床障害を誘導することができる。一実施形態では、大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与は、それが大脳基底核のみに対する投与である場合も、視床障害を誘導することができる。視床は大脳半球の中心部、中脳の上部に左右２つあり、それぞれの視床を外側部と内側部に分けることができる。「視床外側腹側核」は、視床の外側部の領域の１つであり、淡蒼球、黒質からのＧＡＢＡ入力を受け、主に大脳皮質の運動野へと投射する。「視床後腹側核」は、視床の内側部の領域の１つであり、主に上行性知覚路からの感覚情報を受け、これを中継して大脳皮質の感覚野に投射する。

[0067] 本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、エンドセリン投与部位の障害に加えて、内包障害を誘導することができる。

[0068] 本発明に関して「内包障害」とは、脳の内包に生じた障害を指す。内包は

、核（神経細胞体）ではなく、神経線維の集合体である。内包は前脚と後脚に分けられる。内包前脚には視床と前頭葉を結ぶ神経線維、内包後脚には側頭葉、頭頂葉、及び後頭葉と脳幹とを結ぶ神経線維が走行している。内包障害が起こると障害部位の反対側の片麻痺（半身不随）が特徴的に生じる。内包障害が生じた場合の急性期には、まず筋肉の部分的痙攣が起こり、上下肢の運動麻痺が現れる。内包後脚の障害では、躯幹、四肢、頭部の知覚減弱又は消失が加わる。

[0069] 一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、さらに、視床下核障害を誘導することができる。視床下核は、大脳基底核を構成する神経核の１つであり、淡蒼球外節から抑制性の出力を受けると共に、淡蒼球外節及び淡蒼球内節・黒質網様部へ興奮性の入力を行う。

[0070] 本発明の動物モデル作製方法において、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与により、大脳基底核障害や視床障害に加えて内包障害も誘導されるのは、大脳基底核・視床領域に投与されたエンドセリンの効果が内包にまで及ぶことによる。エンドセリンの効果が内包にまで及ぶ場合としては、例えば、大脳基底核・視床領域を標的として投与されたエンドセリンが内包にも直接投与されていてもよく、大脳基底核・視床領域に投与されたエンドセリンが内包にまで拡散していてもよく、大脳基底核・視床領域に投与されたエンドセリンにより生じた壊死が内包にまで広がっていてもよい。本発明の動物モデル作製方法においては、エンドセリンの効果が直接的又は間接的に内包まで及ぶことにより、内包障害が誘導されていればよい。同様に、大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与により、視床下核等の投与部位以外の周囲領域の障害が誘導されるのも、投与されたエンドセリンの効果が当該領域まで及ぶことによる。

[0071] 大脳基底核及びそれを構成する各神経核、視床、内包等が障害されていることは、２，３，５－トリフェニルテトラゾリウムクロライド（ＴＴＣ；ＣＡＳ番号：２９８－９６－４）染色によって確認できる。ＴＴＣはミトコン

ドリアで発生する水素により還元されることで水に不溶な赤色を呈するトリフェニルホルマザン（ＴＰＦ）を生成するため、障害を受けていない組織は赤く染まるのに対して、障害を受けた組織は染色されない。

[0072] 本発明は、上記の本発明の動物モデル作製方法で作製された、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル（以下、「本発明の非ヒト霊長類動物モデル」とも称する）も提供する。

[0073] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、本発明の動物モデル作製方法において誘導（作製）された大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有し、脳梗塞のモデル（動物モデル）として有用である。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、急性期の脳梗塞モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、比較的長期（例えば、２週間～３か月又はそれ以上）にわたり障害を維持することができ、そのため、亜急性期～慢性期の脳梗塞のモデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞のモデルとして有用である。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞のモデルとして特に有用である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、急性期～慢性期の脳梗塞を誘導することができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期の脳梗塞を誘導することができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、慢性期の脳梗塞を誘導することができる。

[0074] カニクイザルをはじめとする非ヒト霊長類において、急性期は脳梗塞の発症直後から７２時間未満までの、症状が悪化する可能性のある時期を指す。亜急性期は脳梗塞発症後７２時間から２週間未満まで、慢性期は脳梗塞発症の２週間後以降の期間を指す。本発明において、非ヒト霊長類動物モデルの

脳梗塞の評価又は非ヒト霊長類の治療等を行う亜急性期～慢性期は、脳梗塞発症の７２時間後以降、例えば脳梗塞発症の２週間後以降の期間であってもよく、また、脳梗塞発症の３週間後以降又は１か月後以降、例えば脳梗塞発症の３週間後～６か月後若しくは１か月後～６か月後、又は脳梗塞発症の３週間後～３か月後若しくは１か月後～３か月後の期間であってもよい。本明細書において、カニクイザルをはじめとする非ヒト霊長類の脳梗塞における「亜急性期～慢性期」とは脳梗塞発症の７２時間後以降の期間をいい、「慢性期」とは脳梗塞発症の２週間後以降の期間をいう。本明細書において「１週間後」は７日後を、「２週間後」は１４日後を、「３週間後」は２１日後を意味する。

[0075] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、穿通枝梗塞の動物モデルとしても有用である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、穿通枝梗塞を誘導することができる。穿通枝梗塞は、特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞であってもよく、例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞が挙げられる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の動物モデルとしても用いることができる。なお、特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞には、当該特定の領域のみに脳障害を有する穿通枝梗塞だけでなく、当該特定の領域以外にも脳障害を有する穿通枝梗塞も含まれる。

[0076] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態にお

いて、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞であって、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞）を誘導することができる。

[0077] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の穿通枝梗塞の動物モデルとして特に有用である。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の穿通枝梗塞であって、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞）を誘導することができる。

[0078] 脳の血管が詰まったり、破れたりすることによって脳が障害を受ける病気を脳卒中という。その中で、脳を養う血管が詰まって起こる病気が脳梗塞である。脳梗塞（ｃｅｒｅｂｒａｌ　ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ）は虚血性脳卒中（ｉｓｃｈｅｍｉｃ　ｓｔｒｏｋｅ）と呼ばれることもある。脳梗塞は、心

原性脳塞栓症、アテローム血栓性脳梗塞、ラクナ梗塞、及びそれらに分類されないもの（分類不能）を含めた４タイプに大きく分類される。「穿通枝」とは脳主幹動脈を構成する中大脳動脈から分岐した細い動脈であり、大脳基底核・視床領域及び内包を支配している。なお脳内領域が血管により「支配される」とは、その血管によって当該脳内領域に血液が供給されていることを意味し、当該脳内領域はその血管の血管支配領域（ｖａｓｃｕｌａｒ　ｔｅｒｒｉｔｏｒｙ）内にある。「穿通枝梗塞」とは、穿通枝に支配される視床、尾状核、被殻、淡蒼球及び/又は内包に梗塞が起こり、梗塞が起きた部位の機能が損傷されている疾患である。穿通枝梗塞で梗塞が起こりやすい神経核としては、被殻及び尾状核が知られている。穿通枝梗塞として、単一の深部穿通枝の閉塞による脳梗塞である、ラクナ梗塞が広く知られてきた。一方、近年、大径穿通枝の母動脈からの分岐部近傍のアテロームプラークを基盤とした血栓により穿通枝全域に及ぶ梗塞がｂｒａｎｃｈ　ａｔｈｅｒｏｍａｔｏｕｓ　ｄｉｓｅａｓｅ（ＢＡＤ）という穿通枝梗塞の一病型として提起されている。穿通枝梗塞としては、他にも、線条体内包梗塞、内包梗塞、前脈絡叢動脈梗塞、視床梗塞等が知られている。穿通枝梗塞は、穿通枝に支配される領域（穿通枝支配領域）に梗塞が起こる脳梗塞としても知られている。「穿通枝支配領域」とは、穿通枝に支配される領域であり、大脳基底核・視床領域及び内包を意味する。

[0079] ラクナ梗塞は一般的な脳梗塞と同様、半身の脱力（運動麻痺）、半身のしびれ（感覚障害）、しゃべりにくさ（構音障害）が主な症状となるが、穿通枝が詰まったときに壊死に陥る範囲は一般的に１５ｍｍ未満とされる。

[0080] ＢＡＤは上記の分類不能タイプの梗塞の１つである。アテローム血栓性脳梗塞は太い血管が動脈硬化で詰まることが原因の脳梗塞である。ＢＡＤはラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞のちょうど中間のタイプであり、太い血管は狭窄を起こしていないが、そこから分岐する穿通枝が根元で詰まることでラクナ梗塞に比べて広い範囲で脳梗塞を生じる。ＢＡＤの症状は脳梗塞の生じた場所により様々であるが、ラクナ梗塞と同じように運動麻痺、感覚障

害、構音障害が主な症状である。症状の経過はアテローム血栓性脳梗塞と似ており、発症後数日かけて徐々に脳梗塞の範囲が広がり、進行することが多い。

[0081] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤの動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤを誘導することができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤの動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤを誘導することができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤの動物モデルとして特に有用である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤを誘導することができる。

[0082] ラクナ梗塞又はＢＡＤは、特定の領域に脳障害を有するラクナ梗塞又はＢＡＤであってもよく、例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはＢＡＤ、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはＢＡＤ、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはＢＡＤ、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはＢＡＤが挙げられる。特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞は、特定の領域に脳障害を有するラクナ梗塞及びＢＡＤであってもよい。

[0083] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。本明細書において「穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞」とは、梗塞により生じた脳障害（ｂｒａ

ｉｎ　ｄａｍａｇｅ）が主に穿通枝支配領域に生じている脳梗塞をいう。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞には、穿通枝支配領域に生じた梗塞によって穿通枝支配領域に脳障害が生じた脳梗塞だけでなく、例えば、穿通枝支配領域周辺に生じた梗塞によって引き起こされた細胞の壊死が穿通枝支配領域に広がることでその部位の機能が損傷された場合のように、二次的に穿通枝支配領域に脳障害が生じた脳梗塞も含まれる。本明細書において脳障害とは、梗塞により生じた細胞壊死による脳の機能障害（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｄａｍａｇｅ）を意味する。脳障害は、通常、当該脳障害を有する領域における細胞壊死を有する。「穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞」は、穿通枝支配領域に細胞壊死を有する脳梗塞であってよい。

[0084] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞としては、例えば穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞、ＢＡＤ、又は特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞）が挙げられる。

[0085] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞としては、穿通枝支配領域の一部又は全部が障害された脳梗塞が含まれ、例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞が挙げられる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害を含む脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しく

は視床の脳障害を含む脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害を含む脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害を含む脳障害である脳梗塞）を誘導することができる。

[0086] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）を誘導することができる。

[0087] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエン

ドセリンを投与することにより、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）を誘導することができる。

[0088] 穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞においては、大脳基底核に加えて内包にも障害が生じていることがよく認められる。大脳基底核及び視床は、神経細胞の細胞体が集まる灰白質であるが、内包は、神経細胞の細胞体に乏しく主に神経線維が集積し走行している白質である。内包を形成する神経線維の束の一つとして、皮質脊髄路が挙げられる。皮質脊髄路は大脳皮質の運動野から脊髄を経て下位運動ニューロンに至る軸索（神経線維）の束のことであり、皮質脊髄路を構成するのは、ほとんどが上位運動ニューロンの軸索である。

[0089] 穿通枝支配領域の内包が障害されると、皮質脊髄路が損傷される。皮質脊髄路が損傷されていることは、例えば、核磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を用いた拡散テンソル画像（ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ ｔｅｎｓｏｒ ｉｍａｇｅ；ＤＴＩ）解析により評価することができる。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、皮質脊髄路の損傷を伴う。

[0090] 穿通枝支配領域の大脳基底核が障害されると、主に線条体のドパミントランスポーターの発現低下が認められる。ドパミントランスポーターは、脳内の黒質から線条体に向かう神経（ドパミン神経）の線条体の終末部に存在し、線条体に放出されたドパミンを再取り込みする働きを有する。大脳基底核やドパミン作動系の異常により、随意運動や姿勢筋緊張、及び歩行の異常等、大脳基底核障害に特有の運動機能障害が出現する。ドパミントランスポーターの発現が低下していることは、例えば、抗ドパミントランスポーター抗体を用いた免疫染色により評価可能である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、ドパミントランスポーターの発現低下を伴う。

[0091] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、局所的な脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。局所的な脳障害を有する脳梗塞には、例えば中大脳動脈に梗塞が生じることにより大脳皮質、内包、大脳基底核等に障害が生じた脳梗塞のように、脳障害が脳の広範囲に渡って生じている脳梗塞は含まれない。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、局所的な脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞であって、局所的な脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。

[0092] 脳梗塞において、慢性期に重い後遺症が残る原因としては、哺乳類の中枢神経では損傷部の周囲でアストロサイトが反応してグリア瘢痕と呼ばれるかさぶたのような組織を形成し、神経の再生を妨げることが挙げられる。グリア瘢痕が形成される慢性期の脳梗塞モデルは、慢性期の脳梗塞治療剤の開発のために非常に有用である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、脳梗塞の慢性期において神経細胞の脱落とアストロサイトの集積を示す。

[0093] ｄ）脳梗塞の確認方法及び評価方法

本発明の非ヒト霊長類動物モデルが、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルであること及び／又は穿通枝梗塞の非ヒト霊長類動物モデルであることは、例えば、ＴＴＣ染色やヘマトキシリン・エオジン（ＨＥ）染色のような組織学的な手法、又は、ヒトの脳梗塞、例えば穿通枝梗塞の診断方法と同様に、当該非ヒト霊長類動物モデルの梗塞巣（障害巣）をコンピューター断層撮影（ＣＴ）、又はＭＲＩを用いて判断することができる。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルであることも、同様の手法により判断することができる。亜急性期～慢性期の脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルであることは、上記の方法に加えて、障害の持続性に基づいて確認することができる。例えば、運動機能障害が、脳梗塞発症から少なくとも４週間にわたって持続する場合、当該脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の

脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルとして有用であると判断してもよいが、障害の持続性の確認方法はこれのみに限定されず、評価方法に応じて変更することができる。

[0094] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の状態（症状、重症度、障害の持続性等）を評価する際に用いる指標としては、当該動物の運動機能障害の状態を評価できるものであれば特には限定されず、例えばＮＨＰＳＳ及び／又は本明細書に記載のｍＲＳ（サル用）を用いて評価することができる。本発明の非ヒト霊長類動物モデルに誘導される運動機能障害は、総合的運動技能（ｇｒｏｓｓ　ｍｏｔｏｒ　ｓｋｉｌｌｓ）の障害であってよい。

[0095] ｍＲＳを用いた評価は、後述の表１に基づくスコアリングにより実施することができる。表１に記載のｍＲＳ（ヒト臨床用）は、脳卒中診療において身体障害の指標として広く使われている指標であり、当該指標をサル用に修正した表１に記載のｍＲＳ（サル用）は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の状態（症状、重症度、障害の持続性等）の評価に用いることができる。ＮＨＰＳＳを用いた評価は、後述の表２の基準に従ったスコアリングにより実施することができる。ＮＨＰＳＳを用いた評価は、運動系、意識障害、筋制御系、及び知覚系のうち１～４つの項目のスコアリングに基づいて行うことができるが、好ましくは、当該項目は少なくとも運動系を含む。知覚系は個体間の反応性のばらつきが生じやすいため、スコアリングを行わなくてもよい。亜急性期や慢性期は、主に運動機能障害が観察されることから、それらの時期におけるＮＨＰＳＳを用いた評価は運動系スコアリングのみに基づいて行ってもよい。

[0096] 運動機能障害の重症度の判断にｍＲＳを用いる場合、例えば、ｍＲＳが３以上であれば、中等度～重度の運動機能障害を有していると判断してもよい。重症度の判断にはＮＨＰＳＳを用いることも可能であり、例えば、ＮＨＰＳＳの運動系スコア（下記表２の項目Ａの合計スコア；以下同様）において、障害側のスコアが１２以上であれば中等度～重度の運動機能障害を有していると判断してもよい。本明細書において、重症度が高い運動機能障害とは

、中等度～重度の運動機能障害を意味する。

[0097] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、例えばｍＲＳが２以上であり、ｍＲＳが３～５であることが好ましい。

[0098] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、例えばＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが４以上であり、障害側のスコアが１２以上であることが好ましいく、１４以上であることがより好ましく、１６であることが特に好ましい。

[0099] 一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、ｍＲＳが２以上である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、ｍＲＳが３～５である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、ＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが４以上である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、ＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが１２以上である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、ｍＲＳが３～５及びＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが１２以上である。

[0100] 一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、ｍＲＳが２以上である。一実施形態では、本発明の作製方法で得られる動物モデルの運動機能障害の重症度は、ｍＲＳが３～５である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、ＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが４以上である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、ＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが１２以上である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、ｍＲＳが３～５及びＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが１

２以上である。

[0101] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルでは、ｍＲＳのスコアは脳梗塞発症後２週間以降において比較的安定する。よって、運動機能障害の持続性の判断にｍＲＳを用いる場合、例えば、脳梗塞発症２週間後以降で任意に定めた期間にわたるｍＲＳのスコアに基づいて運動機能障害の持続性を判断してもよい。同様に、運動機能障害の持続性の判断にＮＨＰＳＳの運動系スコアを用いる場合、例えば、脳梗塞発症２週間後以降で任意に定めた期間にわたるＮＨＰＳＳの運動系スコアに基づいて運動機能障害の持続性を判断してもよい。

[0102] [表1]

スコア	ｍＲＳ（ヒト臨床用）	ｍＲＳ（サル用）
0	まったく症候がない	まったく症候がない
1	症候はあっても明らかな障害はない： 日常の勤めや活動は行える	障害側の前肢又は後肢の軽度麻痺[1]
2	軽度の障害： 発症以前の活動がすべて行えるわけではないが、自分の身の回りのことは介助なしに行える	軽度自発運動低下[3]、又は障害側の前後肢（前肢及び後肢の両方）の軽度麻痺
3	中等度の障害： 何らかの介助を必要とするが、歩行は介助なしに行える	(i)自発運動低下[4]、又は(ii)座位姿勢（起立不全含む）、又は(iii)障害側の前後肢の麻痺[2]。意識レベル[5]の低下なし
4	中等度から重度の障害： 歩行や身体的要求には介助が必要である	(i)自発運動低下及び(ii)座位姿勢／横臥位姿勢[6]（起立不全含む）、並びに(iii)障害側の前後肢の麻痺若しくは意識レベルの軽度低下[7]
5	重度の障害： 寝たきり、失禁状態、常に介護と見守りを必要とする	横臥位姿勢（起立不全含む）、及び障害側の前後肢の麻痺、及び意識レベルの低下[8]
6	死亡	死亡

[1]軽度麻痺：明らかな麻痺は認められないが、麻痺の症候がわずかに認められる場合。
[2]麻痺：明らかな麻痺が認められる場合。
[3]軽度自発運動低下：明らかな自発運動の低下は認められないが、自発運動低下の症候がわずかに認められる場合。
[4]自発運動低下：明らかな自発運動の低下が認められる場合。
[5]意識レベル（サル）：ヒトに対する反応性レベルに基づいて判断。
[6]座位姿勢／横臥位姿勢：座位姿勢又は横臥位姿勢の少なくとも一方。
[7]意識レベルの軽度低下：明らかな意識レベルの低下は認められないが、意識レベルの低下の症候がわずかに認められる場合。
[8]意識レベルの低下：明らかな意識レベルの低下が認められる場合。

[0103] [表2]

＜ＮＨＰＳＳ＞

Ａ．運動系（Ｍｏｔｏｒ　ｓｙｓｔｅｍ）
障害側及び非障害側のそれぞれの肢について、該当するスコア（括弧内）を選択し、１～４の合計スコアを算出する。
１．手（握れる／動く、障害側／非障害側） ・正常（０／０） ・握る力の低下／動作の不調和（２／２） ・麻痺、握ることができない（４／４）
２．脚（握れる／動く、障害側／非障害側） ・正常（０／０） ・膝を曲げて持ち上げる（２／２） ・動かすことはできるが、持ち上げられない（４／４） ・麻痺、動かすことができない（６／６）
３．上腕の筋緊張（障害側／非障害側） ・正常（０／０） ・明らかな筋の弛緩（痙攣性）（３／３）
４．下肢の筋緊張（障害側／非障害側） ・正常（０／０） ・明らかな筋の弛緩（痙攣性）（３／３）
合計スコア（Ａ）
Ｂ．意識障害（Ｃｏｎｓｃｉｏｕｓｎｅｓｓ）
該当するスコア（括弧内）を１つ選択する。
・正常動物と同様、活発に行動（０） ・覚醒状態、攻撃的（４） ・覚醒状態、逃避可能（６） ・覚醒状態であるが反応が鈍い（８） ・傾眠（軽度）、刺激に対して反応（１０） ・傾眠（重度）、強い刺激により開眼（１６） ・知覚消失、持続的な刺激により反応（２０） ・昏睡（軽度）、反射運動のみ（２４） ・昏睡（重度）、動かない（２８）
合計スコア（Ｂ）
Ｃ．筋制御系（Ｍｕｓｃｕｌｏｓｋｅｌｅｔａｌ　ｃｏｏｒｄｉｎａｔｉｏｎ）
該当するスコア（括弧内）を１つ選択する。
・正常、歩行可能（０） ・運動失調（軽度）、歩行障害有り（４） ・運動失調、止まり木に登ることができない（６） ・自発的に立つことが可能、歩行困難（１０） ・床で座位、刺激により回転運動をする（１２） ・床で横臥位（１６） ・動かない（１８）
合計スコア（Ｃ）

Ｄ．知覚系（Ｓｅｎｓｏｒｙ　ｓｙｓｔｅｍ）
障害側及び非障害側のそれぞれについて、該当するスコア（括弧内）を選択し、１～３の合計スコアを算出する。
１．顔面の感覚（障害側／非障害側） ・顔面への刺激に対して正常に反応（０／０） ・顔面への刺激に対して正常に反応しない（３／３）
２．耳介の反応（障害側／非障害側） ・耳を引っ張ると反応する（０／０） ・耳を引っ張っても反応しない（３／３）
３．痛覚反射（下肢、障害側／非障害側） ・足指をつかむとすばやく引っ込める（０／０） ・足指をつかむとゆっくりと引っ込める（３／３） ・足指をつかんでも引っ込めない（５／５）
合計スコア（Ｄ）
合計スコア　（評価した項目Ａ～Ｄのスコアの合計）

[0104] ２．脳梗塞治療剤のスクリーニング方法

本発明は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルを用いた、脳梗塞治療剤のスクリーニング方法（以下、「本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法」とも称する）も提供する。より具体的には、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルに、被験物質を投与する工程、及び該非ヒト霊長類動物モデルにおける脳梗塞に対する該被験物質の効果を判定する工程を含む。

[0105] 一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、脳梗塞、好ましくは、亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、穿通枝梗塞（例えば、大脳基底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、若しくは大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障

害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）又は亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の、穿通枝梗塞及び穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞以外の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。本発明のスクリーニング方法は、後述する本発明の治療方法等を適用する対象と同じ対象における脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法であってよい。

[0106] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ヒトの亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）又はヒトの亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核

・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）に対する脳梗塞治療剤の評価やスクリーニングに特に有用である。同様に、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ヒトの亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の、穿通枝梗塞以外の脳梗塞（即ち、心原性脳塞栓症、及びアテローム血栓性脳梗塞）に対する脳梗塞治療剤の評価やスクリーニングにも有用である。

[0107] 脳梗塞は、その発症部位によって、大脳皮質梗塞、脳幹梗塞、皮質下梗塞（例えば、穿通枝梗塞）、及び小脳梗塞に分類することができる。本明細書において、脳梗塞とは、大脳皮質梗塞、脳幹梗塞、皮質下梗塞（例えば、穿通枝梗塞）及び／又は小脳梗塞であってもよい。

[0108] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、重症度が高い脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニングにも用いることができる。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ｍＲＳが２以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ｍＲＳが３～５の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが４以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが１２以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ｍＲＳが３～５及びＮＨＰＳＳの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが１２以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。

[0109] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニングにも用いることができる。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一

実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、亜急性期～慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。

[0110] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与する被験物質は、核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍｅｓｓｅｎｇｅｒ　ＲＮＡ；ｍＲＮＡ）、ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ　ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド等））であってよい。核酸は、天然核酸又は人工核酸（例えば、天然の核酸塩基及び／又は人工の核酸塩基を含む核酸）であってもよい。さらに、被験物質は、ペプチド、タンパク質、細胞、低分子化合物、中分子化合物をはじめとする任意の物質であってよく、例えば、神経再生活性のある物質、各種転写因子、各種神経栄養因子、神経細胞成長因子、神経細胞成長促進物質、ダイレクトリプログラミング因子、神経幹細胞、神経細胞、間葉系幹細胞等が挙げられる。本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法において、被験物質を投与する手段としては、以下に限定されないが、例えば、被験物質の経口投与、注射（静脈内注射、皮下注射、筋肉注射等）、脳障害部位（例えば、障害巣）への直接投与、移植等が挙げられる。被験物質は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルに対し、任意の時期に投与することができるが、亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤をスクリーニングする目的では、亜急性期～慢性期（例えば、脳梗塞発症の３週間後）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに被験物質を投与することが好ましい。同様に、慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤をスクリーニングする目的では、慢性期（例えば、脳梗塞発症の２週間後又は３週間後）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに被験物質を投与することが好ましい。

[0111] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、本発明の非ヒト霊長類動

物モデルに投与された被験物質の効果を判定する工程を含む。本発明の非ヒト霊長類動物モデルの脳梗塞に対する、投与された被験物質の効果の判定は、例えば、動物モデル個体における移動能力、回転運動能力、座位の保持、起立行動、跳躍運動能力、ものを取ろうとする能力、餌を取る能力、ものを握る能力等の運動機能の観察、ＣＴ、若しくはＭＲＩによる診断、筋電図、又はＮＨＰＳＳ及び／若しくはｍＲＳに基づく評価等を行い、被験物質の投与前と比較した改善の有無を決定することにより、実施することができる。被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質を、脳梗塞治療剤として同定することができる。また、亜急性期～慢性期の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤として同定することができる。穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）の脳梗塞治療剤として同定することができる。亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）の脳梗塞治療剤として同定することができる。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤として同定することができる。

[0112] ３．医薬組成物及び治療方法等

本発明は、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法により同定された脳梗塞治療剤、又は、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞、若しくは亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤を含む、脳梗塞治療用の医薬組成物（脳梗塞の治療に用いるための医薬組成物）を提供する

。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞治療用、又は慢性期の穿通枝梗塞治療用）の医薬組成物、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用（例えば、慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、局所的な脳障害を有する脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、ｍＲＳが２以上の脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、ＮＩＨＳＳが５以上の脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物も提供する。後段で詳細に記述するが、本明細書において、「ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド」とは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを意味する。本明細書において「ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列」とは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質へと翻訳可能な塩基配列を意味する。なお「ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列」は、例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするＣＤＳ（Ｃｏｒｄｉｎｇ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ；開始コドンから終止コドンまでの配列（開始コドンと終止コドンを含む））であってよい。典型的な実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードする。本発明において「発現可能な状態でコードする」とは、ｍＲＮＡへの転写又はｍＲＮＡの翻訳を可能にする又は促進する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、コザック配列、転写応答配列、ターミネーター、ポリＡ配列付加シグナル、ｍＲＮＡの５’末端のキャップ構造、ｍＲＮＡの３’末端のポリＡ配列等）の制御下にＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列が機能可能な状態で（例えば、イン・フレームで）配置されていることを意味する。本明細書において、例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ

１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む穿通枝梗塞治療用、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用、局所的な脳障害を有する脳梗塞治療用、ｍＲＳが２以上の脳梗塞治療用又はＮＩＨＳＳが５以上の脳梗塞治療用の医薬組成物を、「本発明の医薬組成物」とも称する。さらに、本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて医薬組成物を製造することを含む、穿通枝梗塞治療用の医薬組成物、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用の医薬組成物、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用の医薬組成物、局所的な脳障害を有する脳梗塞治療用の医薬組成物、ｍＲＳが２以上の脳梗塞治療用の医薬組成物及び／又はＮＩＨＳＳが５以上の脳梗塞治療用の医薬組成物の製造方法を提供する。

[0113] 「ＮｅｕｒｏＤ１」（Ｎｅｕｒｏｎａｌ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ １）は、ＮｅｕｒｏＤファミリーに属する塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス（ｂａｓｉｃ ｈｅｌｉｘ－ｌｏｏｐ－ｈｅｌｉｘ；ｂＨＬＨ）転写因子である。ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質はＥ－ｂｏｘとして知られる特異的なＤＮＡ配列を含む遺伝子の転写を活性化する。すなわちＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は転写因子活性を有する。ＮｅｕｒｏＤ１は神経幹細胞から神経細胞への分化を誘導する中心的な機能をもつ。アストロサイトやＮＧ２細胞等のグリア細胞においてＮｅｕｒｏＤ１を異所発現することで、グリア細胞を神経に変換できることが知られている（特許文献２）。グリア細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、ミクログリアの４種類の細胞に分類される。

[0114] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、以下の（ｉ）又は（ｉｉ）のタンパク質であってよい：

（ｉ）配列番号６又は８に示すアミノ酸配列、又は配列番号６又は８に示すアミノ酸配列に対して９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上、例えば、９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質、

（ｉｉ）配列番号６又は８に示すアミノ酸配列において１～５０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、１～７個、１～１０個、又は１～３５個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0115] 本発明の医薬組成物に用いられるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、好ましくは転写因子活性を有する。なお、配列番号６又は８はそれぞれマウスＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はヒトＮｅｕｒｏＤ１タンパク質のアミノ酸配列であり、それぞれマウスＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳ又はヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳによってコードされるポリペプチド配列である。

[0116] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１はヒトＮｅｕｒｏＤ１である。ヒトＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、以下の（ｉ）又は（ｉｉ）のタンパク質である：

（ｉ）配列番号８に示すアミノ酸配列、又は配列番号８に示すアミノ酸配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質、

（ｉｉ）配列番号８に示すアミノ酸配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質。

[0117] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１はマウスＮｅｕｒｏＤ１である。マウスＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、以下の（ｉ）又は（ｉｉ）のタンパク質である：

（ｉ）配列番号６に示すアミノ酸配列、又は配列番号６に示すアミノ酸配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質、

（ｉｉ）配列番号６に示すアミノ酸配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換

、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質。

[0118] あるタンパク質が転写因子活性を有するか否かは、当業者であれば、例えば、任意のプロモーターを有するベクターに、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを組み込んだ組換えベクターを作製し、該ベクターを細胞に導入し、当該タンパク質を発現させて、当該タンパク質が転写因子として機能することによって発現（転写）が調節される遺伝子（本明細書において、制御下遺伝子とも称する）の発現量を測定し、当該ベクターを導入しない細胞と比較して当該制御下遺伝子遺伝子の発現量が変化（増大又は減少）しているか否かを評価することによって容易に判断し得る。例えば、ＮｅｕｒｏＤ１をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを導入した細胞において、ＮｅｕｒｏＤ１が転写因子として機能することによって発現が亢進することが知られている制御下遺伝子の発現量が増大している場合、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は転写因子活性を有すると判断できる。

[0119] 本発明の医薬組成物に含まれるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、目的とする細胞にタンパク質を送達される限りは、どのような薬物送達システム（ＤＤＳ）に内封されていてもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を含み、かつ、該タンパク質がＤＤＳ中に内封されている。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を含み、且つ、該タンパク質が薬物送達キャリア中に封入されたものであってよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を含み、且つ、該タンパク質が脂質ナノ粒子、エクソソームなどのナノ粒子に封入されたものであってよいが、それに限定されない。

[0120] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の（ｉ）～（ｉｖ）からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

（ｉ）配列番号６若しくは８に示すアミノ酸配列、又は配列番号６若しくは８に示すアミノ酸配列に対して９０％以上、好ましくは９５％以上、より好

ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上、例えば、９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉ）配列番号６又は８に示すアミノ酸配列において１～５０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、１～７個、１～１０個、又は１～３５個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉｉ）配列番号５、７若しくは１０に示す塩基配列を含むか、又は配列番号５、７若しくは１０に示す塩基配列に対して９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上、例えば、９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

（ｉｖ）配列番号５、７又は１０に示す塩基配列において１～５０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、１～７個、１～１０個、又は１～３５個）の塩基の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0121] これらのポリヌクレオチドによってコードされるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、好ましくは転写因子活性を有する。なお、配列番号５に示す塩基配列は、マウスＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳであり、配列番号７又は１０に示す塩基配列は、ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳである。配列番号１０に示す塩基配列は、配列番号７に示す塩基配列と終止コドンのみが異なる塩基配列である。

[0122] 一実施形態では、ヒトＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の（ｉ）～（ｉｖ）からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

（ｉ）配列番号８に示すアミノ酸配列、又は配列番号８に示すアミノ酸配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転

写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉ）配列番号８に示すアミノ酸配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉｉ）配列番号７若しくは１０に示す塩基配列を含むか、又は配列番号７若しくは１０に示す塩基配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

（ｉｖ）配列番号７又は１０に示す塩基配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）の塩基の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0123] 一実施形態では、マウスＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の（ｉ）～（ｉｖ）からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

（ｉ）配列番号６に示すアミノ酸配列、又は配列番号６に示すアミノ酸配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉ）配列番号６に示すアミノ酸配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉｉ）配列番号５に示す塩基配列を含むか、又は配列番号５に示す塩基

配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

（ｉｖ）配列番号５に示す塩基配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）の塩基の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0124] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。コドン最適化は、当該分野で公知の方法を使用することができる。

[0125] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

（ｉ）配列番号１０に示す塩基配列に対して６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上又は９５％以上の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉ）配列番号７に示す塩基配列に対して６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上又は９５％以上の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号５に示す塩基配列に対して６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上又は９５％以上の配列同一性を有し、かつ配列番号６に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0126] 本明細書において、「配列同一性」とは、基準とする生物学的配列（塩基配列又はアミノ酸配列等）と目的の生物学的配列とをアラインメントしたと

きに、配列間で一致する残基の割合（％）（通常は、目的の配列の全長に対する一致する残基の割合％）を意味する。「配列同一性」は、例えば、ＥＭＢＯＳＳ Ｎｅｅｄｌｅ（Ｗｅｉｚｈｏｎｇ Ｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．４３，ｐｐ．Ｗ５８０－Ｗ５８４，２０１５）を用いて、デフォルトで用意されているパラメータによって得られた同一性（Ｉｄｅｎｔｉｔｙ）の値として算出できる。前記のパラメータは以下のとおりである。

Ｇａｐ Ｏｐｅｎ Ｐｅｎａｌｔｙ ＝ １０

Ｇａｐ Ｅｘｔｅｎｄ Ｐｅｎａｌｔｙ ＝ ０．５

Ｍａｔｒｉｘ ＝ ＥＢＬＯＳＵＭ６２

Ｅｎｄ Ｇａｐ Ｐｅｎａｌｔｙ ＝ ｆａｌｓｅ

[0127] 本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、本発明の医薬組成物は以下の（ｉ）～（ｘｉｉｉ）からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む：

（ｉ）配列番号６若しくは８に示すアミノ酸配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉ）配列番号６若しくは８に示すアミノ酸配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｉｉ）配列番号６又は８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｖ）配列番号５、７若しくは１０に示す塩基配列を含むか、又は配列番号５、７若しくは１０に示す塩基配列に対して９８％以上、好ましくは９９％以上、より好ましくは９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を

有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

（ｖ）配列番号５，７又は１０に示す塩基配列において１～１０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、又は１～７個）の塩基の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

（ｖｉ）配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｖｉｉ）配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｖｉｉｉ）配列番号７に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｉｘ）配列番号１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｘ）配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｘｉ）配列番号７に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド、

（ｘｉｉ）配列番号１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

（ｘｉｉｉ）配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位の塩基配列、４４位～１１２０位の塩基配列、若しくは１位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、好ましくは配列番号８に示すアミノ酸配列に対して９０％以上（例えば、９５％以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質（好ましくは、転写因子活性を有するタンパク質）をコードするポリヌクレオチド。

[0128] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドは、以下に限定するものではないが、ＤＮＡ、若しくはｍＲＮＡ等のＲＮＡであってよいし、又はそれらの組み合わせ（キメラ核酸）であってもよい。また、ポリヌクレオチドは、天然核酸又は人工核酸（例えば、天然の核酸塩基及び／又は人工の核酸塩基を含む核酸）であってもよい。

[0129] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターに含まれていてもよい。本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、ｍＲＮＡへの転写又はｍＲＮＡの翻訳を可能にする又は促進する配列の制御下にＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）を機能可能な状態で含んでおり、すなわち、当該発現ベクターはＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドを含んでいる。本発明において、ｍＲＮＡへの転写又はｍＲＮＡの翻訳を可能にする又は促進する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、コザック配列、転写応答配列、ターミネーター、ポリＡ配列付加シグナル、ｍＲＮＡの５’末端のキャップ構造、ｍＲＮＡの３’末端のポリＡ配列等）は、治療対象の生体内で機能可能なものであれば特に限定されない。プロモーターは、使用目的に合わせて、構成的プロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、一過性プロモーター、又は誘導性プロモーター等の任意のプロモーターであってよい。例えば、ヒト生体内で機能し得るプロモーターとして、ヒトＧＦＡＰプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＥＦ－１αプロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＭＳＣＶプロモーター等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ヒトＧＦＡＰプロモーターは配列番号１４に示す塩基配列を含むものであってよい。アストロサイトへのＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達のためには、ＧＦＡＰプロモーターを用いることが特に好ましい。

[0130] 本発明において、発現ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター等の任意のベクターであってよい。本発明において用いる発現ベクターは、以下に限定するものではないが、アデノ随伴ウイルス（Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｖｉｒｕｓ；ＡＡＶ）ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターであってよく、ＡＡＶベクターであることが特に好ましい。発現ベクターがウイルスベクターである場合、発現ベクターは、ｍＲＮＡの転写又は翻訳を可能にする又は促進する配列（プロモーター等）の制御下にＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、ウイルス粒子にパッケージングされた核酸ベクターとして含むものであってよい。

[0131] 本発明では、宿主細胞においてＮｅｕｒｏＤ１が発現され得る限り、ＡＡＶベクターの血清型は特に限定されず、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０等を使用することができる。一実施形態では、ＡＡＶの血清型はＡＡＶ９であってよい。

[0132] 発現ベクターは、当該分野で公知の方法を使用して製造することができる。ＡＡＶベクターの製造方法の一例としては、市販のベクタープラスミド（例えば、ｐＡＡＶ－ＣＭＶ　Ｖｅｃｔｏｒ（タカラバイオ社））に、任意のプロモーター配列（例えば、ヒトＧＦＡＰプロモーター配列）及び任意の核酸分子配列（例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列）を挿入したＡＡＶベクタープラスミドを作製する。また、ＡＡＶヘルパー機能を補完するＡＡＶのＲｅｐ遺伝子及びＣａｐ遺伝子を含むプラスミド、及び、ＡＡＶの複製を促進するヘルパーウイルス付属遺伝子（例えば、領域ＶＡ、Ｅ２Ａ、Ｅ４）を含むプラスミドを準備する。これらの３つのプラスミドをパッケージング細胞にコトランスフェクトすることで該細胞内に組換えＡＡＶ（即ち、ＡＡＶベクター）が産生される。その後、パッケージング細胞を培養して、ＡＡＶベクターを生成し、当該分野において公知の標準的技術

を使用して、ＡＡＶベクターを精製する。使用されるパッケージング細胞の例としては、哺乳動物細胞、具体的には、２９３Ｔ細胞、Ａ５４９細胞、ＨｅＬａ細胞、ＨＥＫ２９３細胞が挙げられるが、これらに限定されない。精製方法としては、塩化セシウム密度勾配遠心分離法、ベンゾナーゼを用いたＤＮＡ及びＲＮＡの消化、ショ糖勾配遠心分離法、イオジキサノール（Ｉｏｄｉｘａｎｏｌ）密度勾配遠心分離法、限外ろ過法、ダイアフィルトレーション法、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ポリエチレングリコール沈殿法や硫酸アンモニウム沈殿法等を用いることができる。

[0133] 一実施形態において、本発明の医薬組成物はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むＡＡＶベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターを含む。一実施形態において、本発明の医薬組成物はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むＡＡＶベクターを含む。一実施形態において、本発明の医薬組成物はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むＡＡＶ９ベクターを含む。

[0134] 「ｍＲＮＡ」は、（少なくとも１つの）ポリペプチド（例えば、天然に存在するポリペプチド、天然に存在するポリペプチドに対してアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチド、又は天然には存在しないポリペプチド）をコードする塩基配列を、ｍＲＮＡの翻訳を可能にする又は促進する配列（例えば、コザック配列、開始コドン、ｍＲＮＡの５’末端のキャップ構造、５’非翻訳領域（ｕｎｔｒａｎｓｌａｔｅｄ ｒｅｇｉｏｎ；ＵＴＲ）、３’ＵＴＲ、ｍＲＮＡの３’末端のポリＡ配列等）の制御下に含むＲＮＡを指す。ｍＲＮＡは、翻訳されて、コードされたポリペプチドを、例えば、インビトロで、又はインビボで産生し得る。一実施形態では、ｍＲＮＡはインビボで翻訳されて、コードされたポリペプチドを産生し得る。

[0135] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチ

ドは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡであってもよい。本発明において、「ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡ」は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、ｍＲＮＡの翻訳を可能にする又は促進する配列の制御下に含むＲＮＡを意味する。本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、典型的には、ｍＲＮＡの翻訳を可能にする又は促進する配列の制御下にＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを機能可能な状態で含み、すなわち、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドを含んでいる。一実施形態では、本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現させるための機能性配列（例えばＣＤＳ、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、５’キャップ構造、及びポリＡ配列が含まれるがこれに限らない）を含むＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

[0136] 本明細書に記載のポリヌクレオチドは、代表的なＤＮＡ配列として「Ｔ」を含む塩基配列で特定されたポリヌクレオチドで記載されることがあるが、当該ポリヌクレオチドがＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）である場合、「Ｔ」は、「Ｕ」で置き換えられる。したがって、例えば、特定の配列番号によって特定される塩基配列を含むＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）において、当該特定の配列番号によって特定される塩基配列がＤＮＡ配列を表している場合は、当該塩基配列は、ＤＮＡ配列の各「Ｔ」を「Ｕ」で置き換えたＲＮＡ配列として理解される。塩基配列（例えば、配列番号１～３、５、７、１０～１４に示す塩基配列）を構成する塩基「アデニン（Ａ）」、「チミン（Ｔ）」、「グアニン（Ｇ）」、「シトシン（Ｃ）」、及び「ウラシル（Ｕ）」、並びにそれらを含むヌクレオシド及びヌクレオチドは、配列表において特に記載がない場合、個々の塩基、ヌクレオシド及びヌクレオチド毎に、天然型又はそれに対応する修飾型であってよく、及び／又は他の修飾（メチル化など）を有していてもよい。

[0137] ｍＲＮＡには、ＣＤＳ、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、５’キャップ構造、及びポリＡ配列が含まれ得る。ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡに含まれるＣＤＳは、コドン最適化されていてもよい。ＣＤＳの３’末端に位置する終止コドンは、ｍＲＮＡからＮｅｕｒｏＤ１タンパク質への翻訳を停止できる限り特に限定されず、ＴＡＡ、ＴＧＡ、ＴＡＧのいずれの終止コドンを用いてもよい。また、ＣＤＳに含まれる終止コドンに連続して、さらに複数の終止コドンを用いてもよい（例えば、ＣＤＳに含まれる終止コドンＴＡＡに連続してＴＧＡＴＡＧを用いてもよい）。ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡに含まれるＵＴＲは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質が発現可能な限りにおいて、特には限定されないが、例えば、ＮｅｕｒｏＤ１遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲであってもよく、異種遺伝子（例えば、ヒトαグロビン遺伝子やヒトβグロビン遺伝子等）由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲであってもよい。５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲは、同一の異種遺伝子由来であってもよく、それぞれが異なる異種遺伝子由来であってもよい。ＵＴＲは、天然型であってもよいし、天然型ＵＴＲに対して１個又は数個（例えば、２、３、４、５、又は６個）のヌクレオチドの挿入、欠失、置換、及び／又は付加によって配列が変更された改変型であってもよい。本明細書における「遺伝子由来のＵＴＲ」には、天然型ＵＴＲだけでなく、このような改変型ＵＴＲも含まれる。５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲは、複数のＵＴＲが直接又はスペーサー配列をはさんで連なっていてもよい。５’ＵＴＲは、コザック配列の一部（例えば、コザック配列中の開始コドンより５’側の配列）を含んでもよい。５’キャップ構造としては、例えば、Ｃａｐ－０、Ｃａｐ－１、Ｃａｐ－２等が挙げられる（Ａｎａｎｄ Ｒ ｅｔ ａｌ．， Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，ｖｏｌ．４４（１６），ｐｐ．７５１１－７５２６，２０１６）。Ｃａｐ－０は、ｍＲＮＡの５’末端に三リン酸結合を介してグアノシンが結合（５’－５’結合）し、かつグアノシンのグアニン塩基の７位がメチル化された構造であり、７－メチルグアニル酸キャップとも呼ばれる。Ｃａｐ－１は、Ｃａｐ－０に

加えて、ｍＲＮＡの５’末端の１番目のヌクレオチド（Ｃａｐ－０のグアノシンが５’－５’結合したヌクレオチド）のリボースの２位がメチル化されている構造であり、Ｃａｐ－２は、Ｃａｐ－０に加えて、ｍＲＮＡの５’末端から１番目及び２番目のヌクレオチドのリボースの２位がメチル化されている構造である。ポリＡ配列の長さは、ｍＲＮＡの安定化、核外輸送、翻訳等への機能を有する限りにおいて、特には限定されないが、例えば２０～１０００ヌクレオチド（例えば、３０～５００、５０～２００、６０～１５０、７０～１３０、７０～１２０、７０～９０、７０～８５、７０～８０、７５～８５、少なくとも７０、少なくとも７５、又は７９ヌクレオチド）であってもよい。ポリＡ配列は、複数のポリＡがＡ以外のヌクレオチドからなるスペーサー配列をはさんで連なっていてもよい（国際公開ＷＯ２０１６／００５００４等）。

[0138] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、以下の（ｉ）又は（ｉｉ）のｍＲＮＡである：

（ｉ）配列番号６若しくは８に示すアミノ酸配列、又は配列番号６若しくは８に示すアミノ酸配列に対して９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上、例えば、９９．４％以上又は９９．５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡ；又は

（ｉｉ）配列番号６又は８に示すアミノ酸配列において１～５０個（例えば、１～２個、１～３個、１～５個、１～７個、１～１０個、又は１～３５個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡ。当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質（ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質）は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。

[0139] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードす

るｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して９０％以上（例えば、９５％以上、９８％以上、９９％以上、９９．４％以上、又は９９．５％以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。当該ｍＲＮＡによりコードされるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。

[0140] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して９０％以上（例えば、９５％以上、９８％以上、９９％以上、９９．４％以上、又は９９．５％以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１０に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１０に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して９０％以上（例えば、９５％以上、９８％以上、９９％以上、９９．４％以上、又は９９．５％以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１０に示す塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号７に示す塩基配列に対して７

０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号７に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して９０％以上（例えば、９５％以上、９８％以上、９９％以上、９９．４％以上、又は９９．５％以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号７に示す塩基配列を含むｍＲＮＡである。当該ｍＲＮＡによりコードされるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。

[0141] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して９０％以上（例えば、９５％以上、９８％以上、９９％以上、９９．４％以上、又は９９．５％以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。当該タンパク質は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含むｍＲＮＡである。配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位の塩基配列は、ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳであり、配

列番号１１又は１３の４４位～１１２０位の塩基配列は、ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳ及び複数の終止コドンを含む。

[0142] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、異種遺伝子（例えば、ヒトαグロビン遺伝子やヒトβグロビン遺伝子等）由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～４３位の塩基配列からなる５’ＵＴＲ及び／又は配列番号１１又は１３の１１２１位～１２３１位の塩基配列からなる３’ＵＴＲを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０

％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡである。

[0143] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリＡ配列を含む。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５０～２００ヌクレオチドからなるポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、７０～９０ヌクレオチドからなるポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、７５～８５ヌクレオチドからなるポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、１２０ヌクレオチドからなるポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、７９ヌクレオチドからなるポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。

[0144] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリＡ配列の長さが、３０～５００ヌクレオチド（例えば、４０～２００、５０～２００、５０～１５０、５０～１００、５０～９０、６０～１５０、６０～１００、６０～９０、７０～１３０、７０～１２０、７０～１００、７０～９０、７０～８５、７０～８０、７５～１３０、７５～１２０、７５～１００、７５～９０、好ましくは７４～８４、７５～８５、７５～８３、又は７６～８２ヌクレオチド）である。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリＡ配列の長さが、７４～８４ヌクレオチドである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリＡ配列の長さが、７５～８５ヌクレオチドである。

[0145] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含む。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号

１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡである。

[0146] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～４３位の塩基配列からなる５’ＵＴＲ及び／又は配列番号１１又は１３の１１２１位～１２３１位の塩基配列からなる３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍ

ＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。

[0147] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、配列番号１１又は１３の４位～４３位の塩基配列からなる５’ＵＴＲ及び／又は配列番号１１又は１３の１１２１位～１２３１位の塩基配列からなる３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。

[0148] ｍＲＮＡは、当該分野で公知の方法を使用して製造することができる。ｍＲＮＡの製造方法の一例としては、市販のプラスミド（例えば、大腸菌用のｈｉｇｈ ｃｏｐｙプラスミド（例えば、ｐＵＣ１８やｐＣＵ１８等））に、任意のＵＴＲ（例えば、ヒトαグロビンの５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲ）及び任意の核酸分子の塩基配列（例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列）を挿入したプラスミドを作製する。作製したプラスミドは、例えば、大腸菌を用いて増幅させ、当該分野で公知の方法を用いて精製され得る。精製したプラスミドは、例えば、制限酵素及び緩衝液を用いた方法等であるが、これらに限定されない当該分野で公知の方法を用いて線形化され得る。線形化反応物は、例えば、ＰｕｒｅＬｉｎｋ（登録商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いた方法により精製され得る。精製方法は、線形化反応物の大きさに応じて変更され得る。精製した

線形反応物はそのままＤＮＡ鋳型としてもよく、又は線形反応物にポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に供することによってＤＮＡ鋳型を生成してもよい。生成されたＤＮＡ鋳型は、インビトロ転写（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ；ＩＶＴ）系を用いて転写され得る。この系は、典型的には、転写緩衝液、ヌクレオシド三リン酸（ＮＴＰ）、ＲＮａｓｅ阻害剤、及びポリメラーゼ（例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ）を含む。本発明において、ＮＴＰは、天然型であっても非天然型（修飾型）であってもよい。ＤＮＡ鋳型は、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ　Ｉ）での処理等であってよいが、これに限定されない当技術分野で公知の方法を用いて除去され得る。転写されたＲＮＡの精製には、例えばシリカカラム等を用いてもよい。ＲＮＡがポリＡ配列を含む場合は、例えば、Ｏｌｉｇｏ　ｄＴカラムを用いて精製してもよい。ｍＲＮＡは、キャッピング反応及び／又はポリＡ付加反応を経て作製してもよい。キャッピング反応は、ＩＶＴによって転写された配列の５’末端に５’キャップ構造を付加する又はＩＶＴの際に５’末端に５’キャップ構造を付加する当技術分野で既知の方法を用いて行われ得る。キャッピングのための方法には、ワクシニアキャッピング酵素及び２’Ｏ－メチルトランスフェラーゼを用いた方法やＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）（ＴｒｉＬｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いた方法等であってよいが、これらに限定されない当該分野で公知の方法を用いて行われ得る。ＩＶＴによって転写された配列がポリＡ配列を含まない場合、ポリＡ付加反応を行ってもよい。構築されたｍＲＮＡは、当該分野で公知の方法を用いて精製され得る。

[0149]　一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、キャップ構造を有してもよく、キャッピングの方法に適した５’末端配列を含んでもよい。例えば、ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）Ｒｅａｇｅｎｔ　ＡＧ（ＴｒｉＬｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いたキャッピングの方法を用いる場合、５’末端に塩基配列ＡＧＧを含んでもよい。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側か

ら、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、５’ＵＴＲ、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、５’ＵＴＲ、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、５’ＵＴＲ、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列、３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。

[0150] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、ヒトαグロビン遺伝子由来の３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、ヒトαグロビン遺伝子由来の３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩

基配列、ヒトαグロビン遺伝子由来の３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、配列番号１１又は１３の４位～４３位の塩基配列からなる５’ＵＴＲ、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列、配列番号１１又は１３の１１２１位～１２３１位の塩基配列からなる３’ＵＴＲ、及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’側から、配列番号１１又は１３の１位～３位の塩基配列（ＡＧＧ）、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡである。

[0151] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３に示す塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるｍＲＮＡである。

[0152] 本発明において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、修飾されたｍＲＮＡであってもよい。例えば、ｍＲＮＡの製造に修飾型ＮＴＰを用いることで、修飾されたｍＲＮＡを製造することができる。修飾されたｍＲＮＡは、ヌクレオチドの核酸塩基上、糖部分上、及び／又はリン酸上に位置する修飾（例えば、化学修飾）を有し得る。修飾されたｍＲＮＡは、例えば、修飾ヌクレオシドを含む。「修飾ヌクレオシド」とは、修飾されたヌクレオシドである。例えばメチル化、原子交換、二重結合の飽和、脱アミノ化、又は酸素原子等が硫黄原子に置換されるなどの修飾を受けたヌクレオシドである。修飾ヌクレオシドは、シュードウリジン、Ｎ１－メチルシュードウリジン（１－メチルシュードウリジンとも称される）、５-メチルシチジン

、７－メチルグアノシン、Ｎ６－メチルアデノシン、１－メチルアデノシン、ジヒドロウリジン、イノシン、４－チオウリジン等であってよいがこれらに限定されない。「一部又は全ての」特定の種類のヌクレオシドが修飾ヌクレオシドに置換されたポリヌクレオチドは、元のポリヌクレオチド配列（具体的には、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡ）中に含まれる当該種類のヌクレオシドのうちの一部が修飾ヌクレオシドに置換されており他は修飾ヌクレオシドに置換されていないポリヌクレオチド、及び、元のポリヌクレオチド配列中に含まれる当該種類のヌクレオシドの全てが修飾ヌクレオシドに置換されたポリヌクレオチドを包含する。修飾ヌクレオシドを含むポリヌクレオチドの配列において特定の種類のヌクレオシドが修飾ヌクレオシドに置換されている割合に関する「一部」は、１個又はそれ以上のヌクレオシドを包含し、特定の種類のヌクレオシドの全残基数に対する置換割合として、例えば、６０～９９％、７０～９９％、８０～９９％、９０～９９％、９５～９９％、６０～９９．９％、７０～９９．９％、８０～９９．９％、９０～９９．９％、又は９５～９９．９％であってよいが、これらに限定されない。一実施形態において、本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、修飾ヌクレオシドを含んでもよい。一実施形態において、本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含んでもよい。一実施形態において、本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡにおいては、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されていてもよい。一実施形態において、本発明における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されていてもよい。

[0153] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパ

ク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。

[0154] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。

[0155] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡ

は、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。

[0156] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。

[0157] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含

み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。

[0158] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３

’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。

[0159] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。

[0160] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする

塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。

[0161] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。

[0162] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポ

リＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の塩基配列を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。

[0163] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、例えば、配列番号１３に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドであってよい。

[0164] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンであるｍＲＮＡである。

[0165] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’キャップ構造（例えば、Ｃａｐ－０、Ｃａｐ－１、又はＣａｐ－２）を有する。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡに含まれる５’キャップ構造は、Ｃａｐ－１である。

[0166] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例

えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含むｍＲＮＡであって、5’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5’ＵＴＲ及び／又は3’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、5’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5’ＵＴＲ及び／又は3’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、5’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の5’ＵＴＲ及び／又は3’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、5’キャップ構造を有する

ｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、５’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。

[0167] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、５’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、５’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～

１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5’ＵＴＲ及び／又は3’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、5’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の5’ＵＴＲ及び／又は3’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、5’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列、又は、配列番号１１若しくは１３の４４位～１１１４位若しくは４４位～１１２０位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒトαグロビン遺伝子由来の5’ＵＴＲ及び／又は3’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、5’キャップ構造を有するｍＲＮＡである。

[0168] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、5’キャップ構造としてＣａｐ

－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。

[0169] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含み、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。

[0170] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチ

ド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。

[0171] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、

（ｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドの５’末端に三リン酸結合を介して７－メチルグアノシンが結合（５’－５’結合）し、

（ｉｉ）配列番号１１の１位のアデノシンが２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、及び

（ｉｉｉ）一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換された、ｍＲＮＡである。

[0172] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、

（ｉ）配列番号１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチ

ドの５’末端に三リン酸結合を介して７－メチルグアノシンが結合（５’－５’結合）し、及び

（ｉｉ）配列番号１３の１位のアデノシンが２’－Ｏ－メチルアデノシンである、ｍＲＮＡである。

[0173] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１３に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡである。

[0174] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、

（ｉ）配列番号１１に示す塩基配列の５’末端に三リン酸結合を介して７－メチルグアノシンが結合（５’－５’結合）し、

（ｉｉ）配列番号１１の１位のアデノシンが２’－Ｏ－メチルアデノシンであり、及び

（ｉｉｉ）一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換された、ｍＲＮＡである。

[0175] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１３に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、

（ｉ）配列番号１３に示す塩基配列の５’末端に三リン酸結合を介して７－メチルグアノシンが結合（５’－５’結合）し、及び

（ｉｉ）配列番号１３の１位のアデノシンが２’－Ｏ－メチルアデノシンである、ｍＲＮＡである。

[0176] 一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、５’キャップ構造を含まないｍＲＮＡであってもよい。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列からなるｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列からなるｍＲＮＡであって、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列からなるｍＲＮＡであって、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。一実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、配列番号１１に示す塩基配列からなるｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡである。全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡは、例えば、配列番号１３に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。

[0177] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含む本発明の医薬組成物は、該ｍＲＮＡがＤＤＳに内封されていてもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが「薬物送達システム」（ｄｒｕｇ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｓｙｓｔｅｍ；ＤＤＳ）中に内封されたものであってよい。

[0178] 本発明において使用され得るＤＤＳとしては、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡの体内での分布を制御し、該ｍＲＮＡの効果を高め、副作用を抑えるものであることが好ましい。一実施形態では、ＤＤＳは、薬物送達キャリアであってよい。薬物送達キャリアとしては、例えば、脂質ナノ粒子、ポリマー粒子（例えば、ポリエチレングリコールと生体適合性カチオンポリマーが連結されたブロック共重合体からなるナノミセル型キャリア）等のナノ粒子が挙げられる。一実施形態において、本発明の医薬組成物は

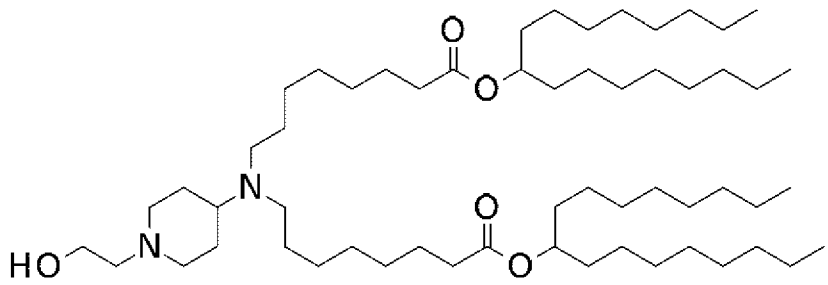
、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡは薬物送達キャリア中に封入されている。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡはナノ粒子中に封入されている。

[0179] 「脂質ナノ粒子」（ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏ ｐａｒｔｉｃｌｅ；ＬＮＰ）は、直径が１０ｎｍ～１０００ｎｍ（１０ｎｍ以上かつ１０００ｎｍ未満）の範囲内の脂質で構成されるナノ粒子であり、核酸医薬等を内封するＤＤＳとして用いられる。タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物として、例えば、ＬＮＰ封入ＲＮＡワクチン（例えば、Ｌ．Ｒ．Ｂａｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，ｖｏｌ ３８４，Ｎｏ．５，ｐｐ．４０３－４１６，２０２１、Ｆｅｒｎａｎｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，ｖｏｌ ３８３，Ｎｏ．２７，ｐｐ ２６０３－２６１５，２０２０）が知られている。脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、ＰＥＧ化脂質、ステロール、中性リン脂質等の任意の脂質を含む。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、中性リン脂質、ステロール、及びＰＥＧ化脂質を含む。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性リン脂質、ステロール、及びＰＥＧ化脂質を含む。ＰＥＧ化脂質としては、例えば、ＤＳＰＥ－ｍＰＥＧ、ＡＬＣ－０１５９、ＤＭＧ－ｍＰＥＧ、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００等が挙げられる。ステロールとしては、例えば、コレステロールが挙げられる。中性リン脂質としては、例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジオレオイル－３－ｓｎ－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）等が挙げられる。カチオン性脂質（又はイオン化（ｉｏｎｉｚａｂｌｅ）脂質）としては、例えば、ｓｉＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子に用いられるＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡが挙げられる。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、ＤＳＰ

Ｃ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００を含む。一例では、ＲＮＡを含む脂質ナノ粒子は、ＰＥＧ化脂質（例えば、ＤＳＰＥ－ｍＰＥＧ、ＡＬＣ－０１５９、ＤＭＧ－ｍＰＥＧ、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）、ステロール（例えば、コレステロール）、中性リン脂質（例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジオレオイル－３－ｓｎ－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ等））、及びカチオン性脂質（又はイオン化（ｉｏｎｉｚａｂｌｅ）脂質）（例えば、ｓｉＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子に用いられるＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）で構成される外側の脂質層と、それによって取り囲まれた、ＲＮＡを囲むカチオン性脂質のコアによって構成され得る。そのようなＲＮＡを含む脂質ナノ粒子は、典型的には、脂質を含むエタノールと、ＲＮＡを含む低ｐＨバッファーとをミキサーで急速に混合（例えば、マイクロ流体混合）し、それによってＲＮＡカプセル化を促進し、さらに、ｐＨを徐々に中性付近（例えば、ｐＨ７．４）に上げるように調整し、エタノールを除去して、脂質ナノ粒子を形成させることにより、製造することができる。脂質ナノ粒子を構成する、上記ＰＥＧ化脂質、ステロール、中性リン脂質及びカチオン性脂質は、当該分野で公知の方法を用いて製造することができる。

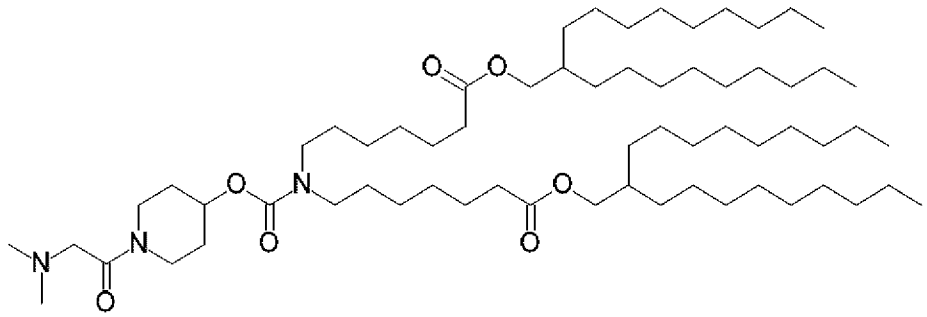
[0180] 脂質ナノ粒子に用いることができるカチオン性脂質の他の例として、例えば、式（Ｉ）で示される化合物１（Ｅｘ１）（すなわち、８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル））（実施例１５参照）若しくはその塩、又は式（ＩＩ）で示される化合物２（Ｅｘ２）（すなわち、７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル））（実施例１６参照）若しくはその塩等が挙げられる。

[化1]



（Ｉ）

[化2]



（ＩＩ）

[0181] また、本発明において化合物の塩とは、製薬学的に許容される塩であり、置換基の種類によって、酸付加塩を形成する場合がある。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩等が挙げられる。

[0182] 一実施形態において、本発明の医薬組成物はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡは脂質ナノ粒子中に封入されている。

[0183] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は以下の（ｉ）～（ｘｘ）からなる群から選択されるｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡは脂質ナノ粒子中に封入されている：

（ｉ）配列番号８に示すアミノ酸配列からなるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡ、
（ｉｉ）配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡ、
（ｉｉｉ）配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位に示す塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含むｍＲＮＡ、
（ｉｖ）配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むｍＲＮＡ、
（ｖ）配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位に示す塩基配列を含むｍＲＮＡ、
（ｖｉ）配列番号１１又は１３に示す塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるｍＲＮＡ、
（ｖｉｉ）配列番号１１に示す塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるｍＲＮＡであって、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ、
（ｖｉｉｉ）配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ、
（ｉｘ）配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ（配列番号１３に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ）、
（ｘ）上記（ｉ）～（ｖ）のいずれかのｍＲＮＡであって、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲをさらに含むｍＲＮＡ、

（ｘｉ）上記（ｉ）～（ｖ）のいずれかのｍＲＮＡであって、ポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡ、

（ｘｉｉ）上記（ｉ）～（ｖ）のいずれかのｍＲＮＡであって、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡ、

（ｘｉｉｉ）上記（ｘ）又は（ｘｉｉ）のｍＲＮＡであって、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲが、ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲであるｍＲＮＡ、

（ｘｉｖ）上記（ｉ）～（ｖ）のいずれかのｍＲＮＡであって、配列番号１１又は１３の４位～４３位の塩基配列からなる５’ＵＴＲ及び／又は配列番号１１又は１３の１１２１位～１２３１位の塩基配列からなる３’ＵＴＲ並びにポリＡ配列をさらに含むｍＲＮＡ、

（ｘｖ）配列番号１１又は１３の４位～１２３１位の塩基配列に対して７０％以上（例えば、８０％以上、９０％以上、又は９５％以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡ、

（ｘｖｉ）配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡ、

（ｘｖｉｉ）上記（ｘｉ）～（ｘｖｉ）のいずれかのｍＲＮＡであって、ポリＡ配列の長さが５０～２００ポリヌクレオチドであるｍＲＮＡ、

（ｘｖｉｉｉ）上記（ｉ）～（ｖ）又は（ｘ）～（ｘｖｉｉ）のいずれかのｍＲＮＡであって、５’キャップ構造、好ましくは、Ｃａｐ－１を有するｍＲＮＡ、及び

（ｘｉｘ）上記（ｉ）～（ｖ）又は（ｘ）～（ｘｖｉｉｉ）のいずれかのｍＲＮＡであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むｍＲＮＡ、

（ｘｘ）上記（ｉ）～（ｖ）又は（ｘ）～（ｘｉｘ）のいずれかのｍＲＮＡであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ。

[0184] 脂質ナノ粒子は、ｍＲＮＡを目的とする細胞に送達可能であれば特に限定されない。例えば、ｍＲＮＡをグリア細胞（例えば、アストロサイト、又はミクログリア）に送達する場合は、グリア細胞（例えば、アストロサイト）に送達可能な脂質ナノ粒子を選択すればよい。その脂質ナノ粒子がｍＲＮＡをグリア細胞に送達可能であるか否かは、例えば、ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）ｅＧＦＰ　ｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いて評価することができる。具体的には、前記ｍＲＮＡを評価対象である脂質ナノ粒子で封入し、グリア細胞に前記脂質ナノ粒子中に封入されたｍＲＮＡを導入する。続いて、グリア細胞内で発現したｅＧＦＰの発現強度を測定し、脂質ナノ粒子中に封入されたｍＲＮＡの代わりにＰＢＳを導入した細胞と比較してｅＧＦＰの発現強度が変化（増大又は減少）しているか否かを検討することによって判断し得る。例えば、脂質ナノ粒子中に封入されたｍＲＮＡを導入した場合にｅＧＦＰの発現強度が増大している場合、当該脂質ナノ粒子は、ｍＲＮＡをグリア細胞に送達可能であると判断できる。なお、ｅＧＦＰの発現強度を指標とする代わりに、例えば、ｅＧＦＰを発現する細胞数を指標として評価を行うことも可能である。

[0185] 一実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるｍＲＮＡは、グリア細胞に送達可能な脂質ナノ粒子中に封入されており、グリア細胞に送達されうる。一実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるｍＲＮＡは、アストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子中に封入されており、アストロサイトに送達されうる。一実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるｍＲＮＡは、ミクログリアに送達可能な脂質ナノ粒子中に封入されており、ミクログリアに送達されうる。

[0186] ｍＲＮＡを封入する脂質ナノ粒子に含まれるカチオン性脂質、例えば、ｍＲＮＡをアストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子に含まれるカチオン性脂質としては、例えば、化合物１（Ｅｘ１、実施例１５）若しくはその塩、又は、化合物２（Ｅｘ２、実施例１６）若しくはその塩等が挙げられる。一実施形態において、ｍＲＮＡをアストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子は、

カチオン性脂質を含む。一実施形態において、ｍＲＮＡをアストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質として化合物１（Ｅｘ１）若しくはその塩、及び／又は、化合物２（Ｅｘ２）若しくはその塩を含む。

[0187] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質を含む。一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子が化合物１（Ｅｘ１）若しくはその塩、及び／又は、化合物２（Ｅｘ２）若しくはその塩を含んでもよい。一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質が化合物１（Ｅｘ１）又はその塩であってもよい。一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質が化合物２（Ｅｘ２）又はその塩であってもよい。

[0188] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）若しくはその塩、及び／又は、７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）若しくはその塩を含んでもよい。

[0189] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン

酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）又はその塩を含んでもよい。

[0190] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）又はその塩を含んでもよい。

[0191] 本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物１（Ｅｘ１）若しくはその塩、及び／又は、化合物２（Ｅｘ２）若しくはその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物１（Ｅｘ１）又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物２（Ｅｘ２）又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡ及び化合物１（Ｅｘ１）又はその塩を含む医薬組成物も含む。本発明は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡ及び化合物２（Ｅｘ２）又はその塩を含む医薬組成物も含む。

[0192] 一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物１（Ｅｘ１）又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、コレステロール及びＤＳＰＣを含んでもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物１（Ｅｘ１）又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにＤＭＧ－ＰＥ

Ｇ２０００、コレステロール及びＤＳＰＣを含み、カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００が４０：１２：４６．５：１．５の割合で含まれていてもよい。

[0193] 一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物２（Ｅｘ２）又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、コレステロール及びＤＳＰＣを含んでもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み、かつ、該ｍＲＮＡが化合物２（Ｅｘ２）又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにＤＭＧ－ＰＥＧ２０００、コレステロール及びＤＳＰＣを含み、カチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ２０００が５０：１０：３８．５：１．５の割合で含まれていてもよい。

[0194] 本発明の医薬組成物は、複数種のＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含み得る。例えば、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ、５’キャップ構造を有するｍＲＮＡ、及び／又は５’キャップ構造を有しないｍＲＮＡを含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

[0195] 例えば、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有する本発明の医薬組成物には、以下の（ｉ）～（ｉｖ）のうち２以上のＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

（ｉ）配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ。

（ｉｉ）配列番号１１に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造

としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ（配列番号１３に示す塩基配列を含むｍＲＮＡであって、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ）。

（ｉｉｉ）配列番号１１に示す塩基配列からなるｍＲＮＡであって、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ。

（ｉｖ）配列番号１１に示す塩基配列からなるｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ（配列番号１３に示す塩基配列からなるｍＲＮＡ）。

[0196] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有する本発明の医薬組成物は、以下の（ｉ）～（ｉｖ）のうち２以上のＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有する医薬組成物である。

（ｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ。

（ｉｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ。

（ｉｉｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列からなるｍＲＮＡであって、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ。

（ｉｖ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列からなるｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ。

[0197] 一実施形態において、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有する本発明の医薬組成物は、以下の（ｉ）～（ｉｖ）のうち２以上のＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡであってポリＡ配列の長さが

４０～２００ポリヌクレオチド（例えば、５０～２００、５０～１５０、５０～１００、５０～９０、６０～１５０、６０～１００、６０～９０、７０～１３０、７０～１２０、７０～１００、７０～９０、７０～８５、７０～８０、７５～１３０、７５～１２０、７５～１００、７５～９０、好ましくは７４～８４、７５～８５、７５～８３、又は７６～８２ヌクレオチド）であるｍＲＮＡ、を含有する医薬組成物である。

（ｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ。

（ｉｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列を含むｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されており、５’キャップ構造としてＣａｐ－１を有するｍＲＮＡ。

（ｉｉｉ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列からなるｍＲＮＡであって、一部のウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ。

（ｉｖ）配列番号１１の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリＡ配列からなるｍＲＮＡであって、全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されているｍＲＮＡ。

[0198] 本発明の医薬組成物には、ポリＡ配列の長さが異なる複数種のＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを含む医薬組成物も含まれ得る。

[0199] 本発明の医薬組成物には、ｍＲＮＡをＤＤＳ中に内封（例えば、薬物送達キャリア中に封入）することなく製剤化した医薬組成物も含まれ得る。

[0200] 本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される補助剤、例えば、不活性な担体（固体や液体担体）、賦形剤、界面活性剤、溶解補助剤、懸濁化剤、着色剤、矯味矯臭剤、保存剤、緩衝剤、ｐＨ調整剤等を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される補助剤、例えば、通常用いられる薬剤用

賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製又は製剤化することができる。本発明でいう「医薬組成物」とは、医薬として利用可能な組成物を意味する。

[0201] 本発明の医薬組成物は、脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。

[0202] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤの治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞であって、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の脳梗塞で

あって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。

[0203] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤの治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の穿通枝梗塞であって、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。

[0204] 好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳梗塞を発症した対象、例えば、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）を発症した対象、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（

例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）及び／又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を発症した対象の運動機能を顕著に改善することができる。

[0205] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、ｍＲＳが２以上（例えば、２～５、３～５、又は３若しくは４）の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期のｍＲＳが２以上（例えば、２～５、３～５、又は３若しくは４）の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが２以上（例えば、２～５、３～５、又は３若しくは４）の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが３～５の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが３又は４の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。

[0206] ヒトの脳卒中神経学的重症度の評価スケールであるＮＩＨＳＳのスコアは０～４２であり、スコアが大きいほど重症であることを表す。脳梗塞治療剤の臨床試験において、ＮＩＨＳＳは患者をリクルートする際の指標や、薬剤の有効性を評価する際の指標にも設定されている。慢性期の脳梗塞治療剤の臨床試験では、例えば、ＮＩＨＳＳのスコアが８～３０（ｈｔｔｐｓ：／／ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／ｃｔ２／ｓｈｏｗ／ＮＣＴ０４０８８１４９）、６～２０（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／ｃｔ２／ｓｈｏｗ／ＮＣＴ０４５９０１１８）又は５～１４（ｈｔｔｐｓ：／／ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／ｃｔ２／ｓｈｏｗ／ＮＣＴ０３２０２１４７）の患者を臨床試験の対象としている。

[0207] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、ＮＩＨＳＳが５以上（例えば、８以上）の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のＮＩＨＳＳが８以上の脳梗塞の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、ｍＲＳが３～５でありＮ

ＩＨＳＳが８以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、ｍＲＳが３又は４でありＮＩＨＳＳが８以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。

[0208] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが２～５（例えば、３～５又は３若しくは４）の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のＮＩＨＳＳが５以上（例えば、８以上）の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）の治療用の医薬組成物である。

[0209] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが２～５（例えば、３～５又は３若しくは４）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のＮＩＨＳＳが５以上（例えば、８以上）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉ

ｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。

[0210] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが２～５（例えば、３～５又は３若しくは４）の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物である。

[0211] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）に伴う穿通枝支配領域の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。穿通枝支配領域の脳障害としては、ｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）に伴うｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。

[0212] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のｍＲＳが２～５（例えば、３～５又は３若しくは４）の脳梗塞に伴う穿通枝支配領域の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。

[0213] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のＮＩＨＳＳが５以上（例えば、８以上）の脳梗塞に伴う穿通枝支配領域の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。

[0214] 本発明はまた、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法（以下、「本発明の治療方法」とも称する）を提供する。一実施形態では、本発明の治療方法は、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの治療有効量を対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法で

あってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの治療有効量を対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの治療有効量を対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法であってよい。典型的な実施形態では、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を発現可能な状態でコードする。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするＤＮＡを対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするＤＮＡの治療有効量を対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの治療有効量を対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法において使用される発現ベクターは、ＡＡＶベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターであり、一実施形態では、本発明の治療方法において使用される発現ベクターは、ＡＡＶベクターである。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡを対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡの治療有効量を対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるｍＲＮＡは、ＤＤＳ中に内封されており、一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるｍＲＮＡは、薬物送達キャリア中に封入されており、一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるｍＲＮＡは、ナノ粒子中に封入されており、一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるｍＲＮＡは、脂質ナノ粒子中に封入されている。

[0215] 一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤの治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ｉ）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはＢＡＤ）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床

の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療方法であってよい。

[0216] 一実施形態では、本発明の治療方法は、局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療方法であってよい。

[0217] 一実施形態では、本発明の治療方法は、ｍＲＳが２以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、ｍＲＳが３～５の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮＩＨＳＳが５以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、ＮＩＨＳＳが８以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、ｍＲＳが３～５及びＮＩＨＳＳが８以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療方法であってよい。

[0218] 本発明の医薬組成物が用いられる又は本発明の治療の対象となる（以下、「本発明における治療の対象となる」とも称する）ｍＲＳが２以上の脳梗塞は、脳梗塞発症後のいずれかの期間に、ｍＲＳが２以上と評価された脳梗塞を含む。本発明における治療の対象となるｍＲＳが３～５の脳梗塞は、脳梗

塞発症後のいずれかの期間に、ｍＲＳが３～５と評価された脳梗塞を含む。例えば、脳梗塞発症からｍＲＳのスコアが安定するまでの期間にｍＲＳが３と評価され、その後症状が回復してｍＲＳが２に改善した場合も、本発明における治療の対象となるｍＲＳが３～５の脳梗塞に含まれる。同様に、本発明における治療の対象となるＮＩＨＳＳが５以上の脳梗塞は、脳梗塞発症後のいずれかの期間に、ＮＩＨＳＳが５以上と評価された脳梗塞を含む。本発明における治療の対象となるＮＩＨＳＳが８以上の脳梗塞は、脳梗塞発症後のいずれかの期間に、ＮＩＨＳＳが８以上と評価された脳梗塞を含む。例えば、脳梗塞発症からＮＩＨＳＳのスコアが安定するまでの期間にＮＩＨＳＳが８以上と評価され、その後症状が回復してＮＩＨＳＳのスコアが改善した場合も、本発明における治療の対象となるＮＩＨＳＳが８以上の脳梗塞に含まれる。本発明における治療の対象となる脳梗塞は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）であってもよく、例えば、亜急性期～慢性期、又は慢性期の穿通枝梗塞であってもよい。あるいは、本発明における治療の対象となる脳梗塞は、穿通枝梗塞以外の脳梗塞、例えば、亜急性期～慢性期の、穿通枝梗塞以外の脳梗塞であってもよい。

[0219] 本発明の治療方法及び医薬組成物等を適用する対象は、霊長類（ヒト及び非ヒト霊長類）、家畜（ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等）、愛玩動物（イヌ、ネコ、ウサギ等）、実験（試験）動物（マウス、ラット等）等を含む任意の哺乳類（被験体）であってよい。好ましい対象は霊長類であり、特に好ましい対象はヒトである。本発明の治療方法及び医薬組成物等を適用する対象は、その治療方法及び医薬組成物等の適用を必要とする対象であることが好ましく、例えば、脳梗塞、例えば穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）若しくは亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を有する対象であるか、又は脳梗塞、例えば穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）若しくは亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を有することが疑われる対象であってよい。穿通枝梗塞としては、ｉ）大脳基

底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の治療方法及び医薬組成物等を適用する対象はまた、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）を有する対象であるか、又はそれを有することが疑われる対象であってよい。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞としては、当該脳障害がｉ）大脳基底核・視床領域の脳障害、ｉｉ）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、ｉｉｉ）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はｉｖ）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞が挙げられるが、これらに限定されない。

[0220] ヒトにおいて、脳梗塞の発症直後から７２時間未満までの、症状が悪化する可能性のある時期を「急性期」と呼ぶ。ヒトにおいて発症後７２時間から１か月未満までを「亜急性期」（回復期ともいう）、発症の１か月後以降を「慢性期」と呼ぶ。亜急性期は、慢性期と比べ高い麻痺回復度が期待できる時期である。ヒトにおいて、脳梗塞の亜急性期～慢性期は、脳梗塞発症の７２時間後以降の時期を指し、例えば脳梗塞発症の１か月後以降の期間であってもよく、また、脳梗塞発症の３か月後以降、例えば脳梗塞発症の６か月後以降の期間であってもよい。非ヒト動物である対象における「急性期」、「亜急性期」及び「慢性期」は、ヒトの「急性期」、「亜急性期」及び「慢性期」にそれぞれ相当する時期として、当業者が適切に定めることができる。

[0221] 本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの、対象への投与量及び投与回数は、治療対象の疾患、重症度、対象の年齢、体重及び状態等に応じて適宜調節できる。投与量は、例えば、投与１回当たり、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質として０．０００１ｍｇ～１５ｍｇ／ｋｇ体重とすることができる。

[0222] 本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タ

ンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への投与方法は特に限定されず、外科的手段による局所投与、心臓カテーテル投与、超音波造影剤（マイクロバブル）を用いた投与、静脈内投与、下肢穿刺投与、局所注入投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与等が挙げられるが、対象の梗塞巣又は障害巣への外科的手段による局所投与（例えば、頭蓋内投与、脳実質内投与、脳室内投与等）が好ましい。

[0223] 一実施形態において、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、外科的手段による局所投与によって対象に投与される。一実施形態において、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、頭蓋内投与によって対象に投与される。一実施形態において、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、脳実質内投与によって対象に投与される。一実施形態において、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、脳室内投与によって対象に投与される。

[0224] 本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への投与方法は、対象の梗塞巣又は障害巣の少なくとも１か所の投与部位への本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与を含む。梗塞巣又は障害巣が複数存在する場合は、それぞれの梗塞巣又は障害巣の少なくとも１か所の投与部位に本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを投与してもよい。一実施形態において、本方法では、対象の１つ又は複数の梗塞巣又は障害巣に対し、梗塞巣又は障害巣あたり１か所の投与部位に、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを投与してもよい。

[0225] 本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タ

ンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への投与回数は特に限定されず、単回投与、複数回投与のいずれであってもよい。単回投与の時期は、脳梗塞発症後の任意の時期、例えば亜急性期～慢性期、又は慢性期であってよく、特に限定されないが、例えば、発症の１か月後、３か月後、６か月後、１年後、１年半後、２年後、３年後、５年後、７年後、１０年後等であってもよい。複数回投与の場合、例えば、初回投与は脳梗塞発症後の任意の時期、例えば亜急性期～慢性期、又は慢性期であってよく、初回投与後は一定期間毎、例えば半年ごとの投与であってもよい。

[0226] 本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への脳内投与に用いるデバイスは、目的とする部位に投与可能であれば特には限定されないが、例えば、バイオプシー／インジェクションニードルキット（ＭＩＺＵＨＯ、ＭＥＳ－ＣＧ０７－２００－０１）や穿刺針（国際公開ＷＯ２０２０／２４１８３３）等を用いてもよい。

[0227] 本発明の治療方法は、脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はＢＡＤ）を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）のラクナ梗塞及び／又はＢＡＤを効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞を効果的に治療できる。好ましい実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、特には慢性期の穿通枝梗塞）、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、特

には慢性期の脳梗塞）を発症した対象及び／又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を発症した対象の運動機能を顕著に改善することができる。本発明において脳梗塞の「治療」とは、脳梗塞の原因である血栓又はそれによる脳血流の途絶それ自体を消失又は軽減することに限定されず、脳梗塞の症状（例えば、運動機能障害）の消失、緩和、改善、又は進行の阻止若しくは遅延を含む。一実施形態では、本発明における脳梗塞の「治療」は、脳梗塞の症状（例えば、運動機能障害）の治療であってよい。

[0228] 本発明の治療方法及び医薬組成物は、好ましくは、大脳基底核・視床領域の障害と内包の障害の両方の回復をもたらすことができる。大脳基底核・視床領域の障害及びその回復は、例えば、後述の実施例に示すように、ドパミントランスポーターの発現レベルを指標として示すことができる。内包の障害及びその回復は、例えば、後述の実施例に示すように、ＤＴＩ解析等により、皮質脊髄路を示すＦＡ値を指標として示すことができる。本発明の治療方法及び医薬組成物はまた、好ましくは、脳障害に伴う側脳室の容積の増大の抑制をもたらすことができる。側脳室の容積の増大の抑制は、脳実質の萎縮の抑制又は脳実質組織の損傷の回復を示す。側脳室の容積は、任意の脳画像解析、例えば、後述の実施例に示すような、ＭＲＩ撮像で得られるＴ１強調画像及び／又はＴ２強調画像の解析により、判定することができる。本発明の治療方法及び医薬組成物は、好ましくは、運動機能障害の回復を促進することもできる。

[0229] 本発明は、脳梗塞、好ましくは、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、局所的な脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）の治療に使用するための、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明は、さらに、ｍＲＳが２以上（例えば、３～５）及び／又はＮＩ

ＨＳＳが５以上（例えば、８以上）の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療に使用するための、本発明の医薬組成物、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。

[0230] 本発明は、脳梗塞、好ましくは、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、局所的な脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用も提供する。本発明は、さらに、ｍＲＳが２以上（例えば、３～５）及び／又はＮＩＨＳＳが５以上（例えば、８以上）の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用も提供する。

[0231] 上述の通り、本発明には、本発明の治療方法、脳梗塞の治療に使用するための、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用も含まれる。これらＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの医薬用途の治療対象となる脳梗塞には、前述の「本発明の医薬組成物」に記載の脳梗塞が挙げられる。本発明のＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの医薬用途は、当業者であれば「本発明の医薬組成物」に関する記載を参照して容易に実施することが可能である。

実施例

[0232] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の

技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0233] 特に断りがない場合は、以下の実施例に記載の各工程の操作は、公知の技術を用いて実施可能であった。また、市販のキット又は試薬等を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコールに従って実験を行った。

[0234] なお、本明細書に記載した化合物の命名にＡＣＤ／Ｎａｍｅ（登録商標、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，Ｉｎｃ．）等の命名ソフトを使用している場合がある。

[0235] 便宜上、濃度の単位ｍｏｌ／ＬをＭとして表す。例えば、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液は１ｍｏｌ／Ｌの水酸化ナトリウム水溶液であることを意味する。

[0236] 脳梗塞治療剤の開発において、過去の多くの急性期脳梗塞治療剤の研究ではげっ歯類脳梗塞モデルが使用されてきた。一方、国際脳卒中学会のガイドラインでは、非臨床と臨床の間の結果の乖離を少なくする目的で、脳血管及び組織構造がヒトにより近い非ヒト霊長類での評価が推奨されている。非ヒト霊長類を用いた脳梗塞モデルでは、ＭＣＡＯモデルや内包を障害したモデル等が報告されているが、これらは重症度が高い運動機能障害が維持されるモデルではない。

[0237] 本発明者らは、げっ歯類脳梗塞モデルでは、ＮＨＰＳＳ等の運動機能障害スコアリングによる総合的な運動技能の評価をすることができず、運動機能障害を回復させる脳梗塞治療剤の研究に用いることは難しいと考えた。また、これまでに報告されているげっ歯類や非ヒト霊長類等を用いた脳梗塞モデルにおいてはＮＨＰＳＳ等による総合的な運動技能の評価が亜急性期～慢性期まで再現性高く可能な事例は報告されておらず、本発明者らは、既存の脳梗塞モデルは亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤を十分に評価できるとは言えないと考えた。そこで、非ヒト霊長類を用いて、運動機能障害スコアリングによる評価が可能であり、長期的な運動機能障害を維持できる脳梗塞モデルの構築を行うこととした。本発明者らは、大脳皮質梗塞は意識レベルの低下

が症状として表れやすいこと、一方、穿通枝梗塞の一態様であるＢＡＤでは大脳基底核での梗塞が起こりやすく、脳梗塞後の運動麻痺が持続する傾向があるという知見から、運動機能障害には大脳基底核における梗塞が重要なのではないかと考えた。さらに本発明者らのこれまでの知見から、本発明者らは長期的な運動機能障害の維持には視床障害が重要ではないかと考えた。また、本発明者らは、内包は神経線維の集合体であることから、目的とする脳梗塞モデルにおいて内包障害も重要であると考えた。これらの知見及び考察から、本発明者らは、非ヒト霊長類において穿通枝に支配される領域（大脳基底核、視床及び内包）を障害することで、長期的な運動機能障害を維持できる脳梗塞のモデル（特には穿通枝梗塞のモデル又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞のモデル）の構築が可能であると予想し、以下の検討を実施した。

[0238] なお、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製においては、非ヒト霊長類の右脳又は左脳のいずれかに脳障害を惹起したモデルを検討することとした。脳梗塞患者では、右脳又は左脳のいずれか一方に梗塞が生じている場合が多いことから、同様に右脳又は左脳のいずれか一方に脳障害を誘導した脳梗塞の動物モデルは、臨床により近い脳梗塞の動物モデルであると考えた。本実施例では、左脳にエンドセリンを注入して左脳における脳障害を誘導し、それにより右半身に運動機能障害を惹起した。

[0239] （実施例１）カニクイザルの脳梗塞モデル構築のための検討

雄性カニクイザル（３歳以上、新日本科学）を用いて運動機能障害が３か月以上持続する大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞モデル（脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル）を作製する方法を検討した。血管収縮作用のあるエンドセリン－１を大脳基底核領域及び視床領域に注入することにより注入部位での血管収縮を誘導し、局所脳虚血を生じ神経細胞死を引き起こすことができると考えた。そこで、エンドセリン－１（ヒト由来；ペプチド研究所、製品コード：４１９８－ｖ、Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｍｅｔ－Ａｓｐ－Ｌｙｓ－Ｇｌｕ－Ｃｙｓ－Ｖａｌ－

Ｔｙｒ－Ｐｈｅ－Ｃｙｓ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ａｓｐ－Ｉｌｅ－Ｉｌｅ－Ｔｒｐ　（$Ｃｙｓ^{1}$と$Ｃｙｓ^{15}$の間、及び$Ｃｙｓ^{3}$と$Ｃｙｓ^{11}$の間にジスルフィド結合を有する；配列番号９））を、以下の各種注入部位、注入量及び注入速度でカニクイザルの脳に注入し、神経細胞死に伴い、運動機能障害の症状が誘導される程度を調べた。

[0240] まず、雄性カニクイザルに対して約１０ｍｇ／ｋｇ体重となる量で筋肉注射（ｉｎｔｒａｍｕｓｃｕｌａｒ；以下、「ｉ．ｍ．」と称する）にて全身麻酔剤である塩酸ケタミン（ケタラール筋注用５００ｍｇ；第一三共プロファーマ、承認番号：２１６００ＡＭＺ００２５２；以下、「塩酸ケタミン」と称する）を導入した。麻酔下にある当該カニクイザルに気管チューブ（コヴィディエンジャパン、３０１－４０Ｇ）を気管挿管し、人工呼吸又は自発呼吸下にてイソフルラン（イソフルラン吸入麻酔液「ＶＴＲＳ」；マイラン製薬株式会社、承認番号：２２７００ＡＭＸ００１３４；以下、「イソフルラン」と称する）の吸入による維持麻酔を行った。麻酔下のカニクイザルの頭部の毛をバリカンで剃毛した後、当該カニクイザルを脳定位固定装置（ナリシゲ、ＳＮ－３Ｎ）に固定した。その後、出血に配慮しながらカニクイザルの頭部皮膚を切開した。ここまでの工程は、以下の全ての検討実験において同様の手順で行った。

[0241] 公知のカニクイザルのブレインマップ（Ｊ．Ｓｚａｂｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｍｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．，ｖｏｌ．２２２（２），ｐｐ．２６５－３００，１９８４）を参考に、エンドセリン－１の脳内への注入部位を検討することとした。カニクイザルのブレインマップは、前後軸はＡｎｔｅｒｉｏｒ－Ｐｏｓｔｅｒｉｏｒ（ＡＰ）座標を、左右軸はＭｉｄｌｉｎｅ（ＭＬ）座標を用いていることから、エンドセリン－１の脳内への注入部位の座標としては、前後軸はＡＰ座標を、左右軸はＭＬ座標を用いた。最初は、両外耳道を結ぶ線（ｉｎｔｅｒａｕｒａｌ　ｌｉｎｅ）と頭蓋の矢状縫合との交差点を注入部位の基点（ＡＰ座標：０ｍｍ、ＭＬ座標：０ｍｍ（正中））とした。注入部位は、下記のように表す。

・Ａ：ＡＰ座標の基点から前方の距離

・Ｌ：ＭＬ座標の基点から左方の距離

・Ｄ：硬膜から鉛直下向き方向への脳内での深さ

[0242] （ａ）検討実験１

エンドセリン－１の脳内への注入部位と注入量を検討した。カニクイザル２個体のうちの１個体の頭蓋骨に対し、（ｉ）Ａ：２０．０ｍｍ、Ｌ：７．０ｍｍ、（ｉｉ）Ａ：２０．０ｍｍ、Ｌ：９．０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ａ：２０．０ｍｍ、Ｌ：１１．０ｍｍの位置に、もう１個体の頭蓋骨に対しては、前述の（ｉ）～（ｉｉｉ）の位置に加えて、（ｉｖ）Ａ：１５．０ｍｍ、Ｌ：７．０ｍｍ、（ｖ）Ａ：１５．０ｍｍ、Ｌ：９．０ｍｍ、及び（ｖｉ）Ａ：１５．０ｍｍ、Ｌ：１１．０ｍｍの位置に、ドリル（室町機械工業、ＨＳＤ－１０００；以下、「ドリル」と称する）で直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計３又は６か所）。各々の穴からカニューレ（トップスパイナル針；株式会社トップ、０２０３６（２５Ｇ×８９ｍｍ）；以下、「カニューレ」と称する）とチューブ（Ｐｌａｓｔｉｃｓ　Ｏｎｅ、Ｃ３１２ＶＴ；以下、「チューブ」と称する）を挿入し、深さ（Ｄ）１９．０ｍｍにカニューレ先端が来るように留置した。留置したカニューレを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計３又は６か所に０．１％酢酸（酢酸（Ｗａｋｏ、０１７－００２５６）をＭｉｌｌｉ－Ｑ（登録商標）水で希釈して調製）で希釈したエンドセリン－１を注入した。エンドセリン－１は、２．０μｇ／μＬの濃度で、２μＬ／部位、注入速度１μＬ／ｍｉｎで注入した。３か所注入、６か所注入、それぞれＮ＝１で実施した。

[0243] 本検討実験１において上記のとおり処置されたカニクイザル２個体のうち、３か所注入処置した個体では翌日には軽度の運動機能障害が見られたが、処置後１週間では障害は消失していた。６か所注入処置した個体では、右前後肢の運動機能障害の症状が処置後２週間までは明確に認められたが、４週間後には軽度麻痺が見られる程度まで自然回復した。

[0244] （ｂ）検討実験２

検討実験１で用いた条件から、エンドセリン－１の注入部位、及び注入するエンドセリン－１の濃度を変更した。カニクイザルの頭蓋骨に対し、（ｉ）Ａ：２２．０ｍｍ、Ｌ：１１．０ｍｍ、（ｉｉ）Ａ：１９．０ｍｍ、Ｌ：１１．０ｍｍ、（ｉｉｉ）Ａ：１６．０ｍｍ、Ｌ：１１．０ｍｍ、（ｉｖ）Ａ：２２．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｖ）Ａ：１９．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、及び（ｖｉ）Ａ：１６．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍの位置に、ドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計６か所）。各々の穴からマイクロインジェクター（ナリシゲ、ＩＭＳ－２０；以下、「マイクロインジェクター」と称する）に接続したマイクロシリンジ（ＨＡＭＩＬＴＯＮ、１７０５ＲＮ；以下、「マイクロシリンジ」と称する）を挿入し、深さ（Ｄ）１９．０ｍｍに針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計６か所に０．１％酢酸で希釈したエンドセリン－１を注入した。エンドセリン－１は、４．０μｇ／μＬの濃度で、２μＬ／部位、注入速度１μＬ／ｍｉｎで注入した。Ｎ＝２で実施した。

[0245] 上記のとおり処置されたカニクイザルが示した運動機能障害の症状は、１個体では障害側（機能障害側）である右前後肢の軽度な麻痺で、他の個体は無症状であった。

[0246] 検討実験２においてエンドセリン－１溶液の残検体に析出がみられたことから、検討実験３以降においては、溶液中でエンドセリン－１が析出しないようにエンドセリン－１の濃度を２．０μｇ／μＬに下げることとした。

[0247] （ｃ）検討実験３

検討実験１及び検討実験２の結果から、両外耳道を結ぶ線をＡＰ座標の基点にした場合には、個体差のために、必ずしも目的とする領域にエンドセリン－１を注入できないことが判明した。そこで、発明者らのこれまでの知見を基に、頭蓋骨表面の前方にある矢状縫合と冠状縫合との交差点であるブレグマ（Ｂｒｅｇｍａ）を基点とすることを想到した。検討実験３以降は、ブレグマを注入部位の基点（Ｂ：０ｍｍ、ＭＬ座標：０ｍｍ（正中））とした。注入部位は下記のように表す。

・Ｂ：ブレグマを基点とした前後軸方向の距離（プラスの数値は前方の距離を表す。）

・Ｌ：ＭＬ座標の基点から左方の距離

・Ｄ：硬膜から鉛直下向き方向への脳内での深さ

[0248] ブレグマを基点とするカニクイザルのブレインマップは存在しないことから、発明者らのこれまでの知見に基づき注入部位を検討することとした。

[0249] また、検討実験３では、注入するエンドセリン－１の注入部位あたりの注入量を検討実験２の条件より増やした。検討実験３においては、カニクイザルの頭蓋骨に対し、（ｉ）Ｂ：２．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍの位置に、ドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計３か所）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、深さ（Ｄ）１９．０ｍｍに針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計３か所に０．１％酢酸で希釈したエンドセリン－１を注入した。エンドセリン－１は、２．０μｇ／μＬの濃度で、１０μＬ／部位の量を、注入速度１μＬ／ｍｉｎで注入した。Ｎ＝２で実施した。

[0250] 処置されたカニクイザルのうちの１個体では、処置翌日の評価スケールｍＲＳ（表１）は５であり、横臥位姿勢、意識レベル低下、自発運動低下、及び障害側である右前後肢の完全麻痺が認められた。当該個体は術後１週間においてもｍＲＳは４であった。同様に処置を行ったもう１匹のカニクイザル個体では、処置翌日のｍＲＳは３であり、意識レベル低下はなかったものの、自発運動低下及び障害側である右前後肢の完全麻痺が認められ、さらに、当該個体では処置後１週間においても自発運動低下及び障害側である右前後肢の完全麻痺が持続して見られた。以上の結果から、検討実験３の条件でエンドセリンを注入することにより、個体の運動機能障害を誘導でき、かつ、誘導される症状が検討実験１及び２に比べて安定的に持続することが示された。検討実験３で処置されたカニクイザル２個体は、少なくとも亜急性期ま

で運動機能障害が持続することが明らかになった。

[0251] （ｄ）検討実験４

検討実験３の条件を基に、以下の検討を行った。より確実に脳障害を誘導するため、エンドセリン－１の注入量を２．０μｇ／μＬで３０μＬ／部位に増量した。カニクイザル２個体の頭蓋骨に対し、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２．０　ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ又は１１．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍの位置にドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計３か所。（ｉｉｉ）の注入部位のみ各個体で異なる。）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、深さ（Ｄ）１９．０ｍｍ（硬膜から）に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計３か所にエンドセリン－１を注入した。エンドセリン－１は、２．０μｇ／μＬの濃度で、３０μＬ／部位の量を、注入速度１μＬ／ｍｉｎで注入した。（ｉｉｉ）の注入部位のみ異なる条件で、それぞれＮ＝１で実施した。

[0252] 処置されたカニクイザル２個体では、処置から約１か月後のｍＲＳ（表１）は４であり重度の障害が見られ、自発運動低下と、横臥位又は座位姿勢（起立不可）状態を示し、さらに、ＮＨＰＳＳの運動系スコア（表２）が１９（障害側／非障害側＝１４／５）又は１７（障害側／非障害側＝１４／３）であった。なお、スコア１６が片側の前後肢の最大スコアである。２個体はその後、軽度の自然回復を示したが、１個体の処置後９１日目又はもう１個体の処置後９２日目においても、ｍＲＳが３又は４であり、ＮＨＰＳＳの運動系スコア（表２）は１２（障害側／非障害側＝１２／０）又は１４（障害側／非障害側＝１４／０）であった。

[0253] 検討実験４の結果から、非ヒト霊長類の脳梗塞モデルとしてカニクイザルを用いる場合に、注入部位１か所あたり、濃度２．０μｇ／μＬで３０μＬ／部位（注入部位あたり６０μｇ）でエンドセリン－１を注入する条件は、障害を長期に維持するのに十分であることが確認された。また、検討実験４

で処置されたカニクイザル２個体は、ヒトの亜急性期～慢性期の脳梗塞の評価が可能なモデルであると考えられた。

[0254] （ｅ）検討実験５

検討実験５では、エンドセリンの注入による障害巣（梗塞巣）の特定を行った。カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：５．０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：１３．０ｍｍの位置にドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計３か所）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ（Ｄ）１９．０ｍｍ（上記（ｉ）及び（ｉｉｉ））又は深さ（Ｄ）１３．０ｍｍ（上記（ｉｉ））に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計３か所にエンドセリン－１を注入した。さらに、翌日に、（ｉｖ）Ｂ：５．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ及び（ｖ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍの位置にドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開け、上記（ｉｖ）及び（ｖ）の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ（Ｄ）１９．０ｍｍに針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置（上記（ｉｖ）及び（ｖ））に対応する合計２か所にエンドセリン－１を注入した。本実験において、エンドセリン－１は、２．０μｇ／μＬの濃度で、３０μＬ／部位の量を、注入速度１μＬ／ｍｉｎで注入した。Ｎ＝１で実施した。

[0255] 処置されたカニクイザル個体の脳について、初回注入処置３日後（追加注入処置２日後）の障害巣を２，３，５－トリフェニルテトラゾリウムクロライド（ナカライテスク、３５３１７－３２）の２％溶液（生理食塩水に溶解して調製）を用いた染色法（ＴＴＣ染色）で確認した。その結果、尾状核、被殻、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核に障害巣が認められ、それに加え、内包にも障害巣が及んでいた（図１）。また、（ｉ）の部位への注入により視床外側腹側核及び視床後腹側核に、（ｉｉ）の部位への注入により尾状核に、（ｉｉｉ）の部位への注入により被殻に、（ｉｖ）の部位への

注入により淡蒼球に、及び（ｖ）の部位への注入により被殻深部に、それぞれエンドセリンを注入していると考えられた。

[0256] 検討実験４の（ｉ）及び検討実験５の（ｉ）、検討実験４の（ｉｉ）及び検討実験５の（ｉｖ）、並びに検討実験４の（ｉｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ及び検討実験５の（ｖ）の注入部位は同一である。よって、今回の結果から、検討実験５の少なくとも１個体には、被殻深部、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核にエンドセリンを注入していると考えられた。

[0257] （ｆ）検討実験６

検討実験４及び５の結果を受け、尾状核、被殻、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核への投与により適した注入部位の検討を行った。

[0258] カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブレグマを基点として、（ｉ）Ｂ：２．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：５．０ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：１２．０ｍｍの位置にドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計４か所）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ（Ｄ）１９．０ｍｍ（上記（ｉ）及び（ｉｉ））、深さ（Ｄ）１３．０ｍｍ（上記（ｉｉｉ））、又は深さ（Ｄ）１５．０ｍｍ（上記（ｉｖ））に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計４か所にエンドセリン－１を注入した。エンドセリン－１は、２．０μｇ／μＬの濃度で、３０μＬ／部位の量を、注入速度１．５μＬ／ｍｉｎで注入した。Ｎ＝２で実施した。なお、各注入は、以下の神経核を標的として行った：（ｉ）視床外側腹側核及び視床後腹側核、（ｉｉ）淡蒼球、（ｉｉｉ）尾状核、又は（ｉｖ）被殻。

[0259] 処置されたカニクイザル１個体は、処置翌日にｍＲＳ（表１）が５であり重篤な障害を呈し、その後、状態悪化が起こり、呼吸停止状態で死亡した。当該個体から、速やかに脳を摘出し、脳切片標本を作製し、検討実験５と同様のＴＴＣ染色法により障害巣の観察を行った。その結果、標的の神経核に

障害巣が生じたこと、さらに内包にも障害巣が生じたことが確認された。図２は、得られた脳切片の染色像の例を示す。当該染色像には、標的である、尾状核、被殻、視床外側腹側核及び視床後腹側核における障害巣、さらに内包における障害巣が示されている。このことから、ブレグマを基点とすることにより、標的とする部位にエンドセリン溶液を成功裏に注入できること、さらにそのような注入によって内包にもエンドセリンの効果を及ぼすことができることが明らかになった。

[0260] 生存した他の処置個体も、処置翌日のｍＲＳ（表１）は５であり重篤な障害を呈し、ＮＨＰＳＳ（表２）のスコアも４９（内訳：運動系２３（障害側／非障害側＝１６／７）、意識障害１０、筋制御系１６）であって障害側の前後肢の完全麻痺及び軽度意識障害が観察された。その後、その処置個体は、ｍＲＳが３以上、及び障害側の前後肢の完全麻痺を示すＮＨＰＳＳの運動系スコアが１６の状態（「障害側の前後肢の完全麻痺」）を処置後ほぼ３か月間持続した（図３、４）。即ち、検討実験６の条件においても、少なくとも３か月続く長期運動機能障害を誘導できることが示された。また、ＮＨＰＳＳは急性期の脳梗塞の重症度の評価スケールとして用いられているものの、本検討実験の結果から、ＮＨＰＳＳの運動系スコアを指標とすることで、本モデルの運動機能障害の持続性を評価できることが明らかとなった。さらに、ｍＲＳを指標とした場合においてもＮＨＰＳＳと同様に運動機能障害の持続性が評価できていることから、本モデルの運動機能障害の持続性の評価には、ｍＲＳを用いることができることが示された。

[0261] 穿通枝に支配される神経核及び内包において障害巣が確認されていること、及び運動機能障害が４週間以上持続することが確認されたことから、検討実験６の条件で作製されたモデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞（特には、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞）の評価が可能なモデルであると考えられた。

[0262] 検討実験１～６の結果から、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与（注入）することにより、大脳基底核、視床及び内包に障害

巣が生じ、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することができること、そのようにして大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を起こした非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞（特には、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞）の評価が可能であることが明らかになった。

[0263] （実施例２）脳内へのＡＡＶ投与試験に用いるエンドセリン－１誘導大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞モデルの作製

雄性カニクイザル（３歳以上、新日本科学）６個体に対して、約１０ｍｇ／ｋｇ体重となる量の塩酸ケタミンを用いてｉ．ｍ．による導入麻酔を行った。麻酔下にあるカニクイザルに気管挿管し、人工呼吸又は自発呼吸下にて、気管からのイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。麻酔下のカニクイザルの頭部の毛をバリカンで剃毛した後、当該カニクイザルを脳定位固定装置に固定した。その後、出血に配慮しながらカニクイザルの頭部皮膚を切開し、ブレグマを確認した。

[0264] 実施例１の検討実験６に記載の方法に従い、雄性カニクイザル６個体に対してエンドセリン－１溶液を注入した。具体的には、カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブレグマを注入部位の基点として、（ｉ）Ｂ：２．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５．０ｍｍ、Ｌ：８．０ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：５．０ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９．０ｍｍ、Ｌ：１２．０ｍｍの位置にドリルで直径１ｍｍ程度の穴を開けた（合計４か所）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ（Ｄ）１９．０ｍｍ（上記（ｉ）及び（ｉｉ））、深さ（Ｄ）１３．０ｍｍ（上記（ｉｉｉ））、又は深さ（Ｄ）１５．０ｍｍ（上記（ｉｖ））に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、１個体あたり上記の各位置に対応する合計４か所にエンドセリン－１を注入した。エンドセリン－１は、２．０μｇ／μＬの濃度で、３０μＬ／部位の量を、注入速度１．５μＬ／ｍｉｎで注入した。注入終了後、液漏れを防止するために約２０分間シリンジを静置した。このようにして大脳基底核障害、視床障害及

び内包障害を有する脳梗塞モデルを作製した。

[0265] （実施例３）ＡＡＶ投与試験に用いる発現ベクターの作製

ＡＡＶ９ベクターを用いて、マウスＮｅｕｒｏＤ１及びＧＦＰを共発現する発現ベクター（ＡＡＶ－ＧＦＡＰ－Ｎｅｕｒｏｄ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰ、配列番号１、以下「ＮｅｕｒｏＤ１発現ベクター」とも称する）、及びコントロールとして、ＧＦＰ（緑色蛍光タンパク質）のみを発現する発現ベクター（ＡＡＶ－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ、配列番号２、以下「コントロールベクター」とも称する）を作製した（タカラバイオ社に委託）。配列番号１に示す発現ベクターＡＡＶ－ＧＦＡＰ－Ｎｅｕｒｏｄ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰの塩基配列中、１７１位～１８４２位の塩基配列はヒトＧＦＡＰプロモーターの塩基配列（配列番号１４）に相当し、２３５５位～３４２８位の塩基配列（配列番号５）はマウスＮｅｕｒｏＤ１遺伝子の塩基配列（ＣＤＳ）に相当しマウスＮｅｕｒｏＤ１タンパク質（配列番号６）をコードしており、４０３３位～４７５２位の塩基配列（配列番号３）はＧＦＰ遺伝子の塩基配列（ＣＤＳ）に相当しＧＦＰ（配列番号４）をコードしている。発現ベクター中のＧＦＡＰはヒトＧＦＡＰプロモーターであり、マウスＮｅｕｒｏＤ１遺伝子（配列番号５）はヒトＧＦＡＰプロモーターの制御下に配置されている。ＧＦＡＰプロモーターを用いることで、アストロサイト特異的にプロモーターの下流に位置する遺伝子を発現させることができる。

[0266] ＮｅｕｒｏＤ１発現ベクター及びコントロールベクターは具体的には以下の方法で作製した。ｐＡＡＶ－ＣＭＶベクター（タカラバイオ社、６２３０）のＣＭＶプロモーター領域にヒトＧＦＡＰプロモーターの塩基配列を挿入し、マルチクローニングサイトにマウスＮｅｕｒｏＤ１遺伝子の塩基配列、ＩＲＥＳ及びＧＦＰ遺伝子の塩基配列を挿入することにより、ｐＡＡＶプラスミド（ｐＡＡＶ－ｈＧＦＡＰ－ｍＮｅｕｒｏＤ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰ）を作製した。またｐＡＡＶ－ＣＭＶ　Ｖｅｃｔｏｒ（タカラバイオ社、６２３０）のＣＭＶプロモーター領域にヒトＧＦＡＰプロモーターの塩基配列を挿入し、マルチクローニングサイトにＧＦＰ遺伝子の塩基配列を挿入すること

により、ｐＡＡＶプラスミド（ｐＡＡＶ－ｈＧＦＡＰ－ＧＦＰ）を作製した。作製した２種のｐＡＡＶプラスミド、ｐＲＣ＿ＡＡＶ９（配列番号１２）及びｐＨｅｌｐｅｒ（タカラバイオ社、６２３０）をそれぞれ大量調製した。続いて、２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－３２１６）をハイパーフラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、１００３４）に播種し、セミコンフルエントまで培養した２９３Ｔ細胞に対して、トランスフェクション試薬ＰＥｌｐｒｏ（ＰｏｌｙＰｌｕｓ－ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ社、１１５）を用いて、ｐＲＣ＿ＡＡＶ９、ｐＨｅｌｐｅｒ及びｐＡＡＶプラスミド（ｐＡＡＶ－ｈＧＦＡＰ－ｍＮｅｕｒｏＤ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰ又はｐＡＡＶ－ｈＧＦＡＰ－ＧＦＰ）を共導入し、さらに約７２時間培養した。ＡＡＶ９ベクター産生細胞培養液にＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｍｅｒｃｋ社、１．０８６４３．１０００）を添加後、３７℃で１時間処理し、遠心後の上清を回収した。回収した上清は、ＰＯＲＯＳ　ＣａｐｔｕｒｅＳｅｌｅｃｔ　ＡＡＶ９　Ａｆｆｉｎｉｔｙ　Ｒｅｓｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ａ２７３５３）を用いたアフィニティー精製によりＡＡＶ９を吸着させ、５０ｍＭ　グリシン－ＨＣｌ（ｐＨ２．７）により溶出し、複数の画分を回収した。回収液は２Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）を用いて中和した。続いて、塩化セシウム密度勾配遠心法により、以下のように精製した。回収したＡＡＶ９ベクター溶液に塩化セシウム（ナカライテスク社、０７８０７－１１）を添加し、溶液の屈折率を１．３７１に調整後、１４８，５００×ｇ、２１℃、４２時間で超遠心を行った。遠心後、遠心管上部より順次、溶液を分取した。回収した溶液を０．２２μｍフィルターで濾過し、ＮｅｕｒｏＤ１発現ベクター又はコントロールベクターをそれぞれ得た。

[0267]（実施例４）脳内へのＮｅｕｒｏＤ１発現ベクター投与

実施例２で作製した脳梗塞モデルの６個体を、エンドセリン－１注入後２１日目に、ｍＲＳ（表１参照）及びＮＨＰＳＳ（表２参照）に関して群間で差が生じないように２群（それぞれＮ＝３）に振り分けた。それぞれの群は、ＮｅｕｒｏＤ１発現ベクターを投与するＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群と、コ

ントロールベクターを投与するコントロール群とした。

[0268] 各群の脳梗塞モデル個体に、１５～５０ｍｇ／０．３～１．０ｍＬ／ｈｅａｄの塩酸ケタミン及び１～４ｍｇ／０．０５～０．２ｍＬ／ｈｅａｄのキシラジン（セラクタール２％注射液；バイエル薬品、承認指令書番号：２７動薬第２６７９号）を用いてｉ．ｍ．による導入麻酔及び同麻酔の反復投与による維持麻酔を行った。麻酔持続下にて頭部の毛をバリカンで剃毛した後、モデル個体を脳定位固定装置に固定した。次に、術野を消毒し、出血に配慮しながら頭部皮膚を切開してブレグマを露出した。

[0269] 各群の脳梗塞モデル個体において、実施例２で脳梗塞モデル作製時にエンドセリン－１を注入した合計４か所の穴のそれぞれに、実施例２と同じ深さ（Ｄ）に針先端が来るようにマイクロシリンジを留置し、実施例３で作製したＡＡＶベクターを投与した。３個体にＮｅｕｒｏＤ１発現ベクター、３個体にコントロールベクターを投与した。ＡＡＶベクターは、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で１．０５×10^{12}ｖｇ（ｖｅｃｔｏｒ　ｇｅｎｏｍｅ）／ｍＬとなるように調製し、ＡＡＶベクター溶液を３０μＬ／部位、投与速度１．５μＬ／ｍｉｎで投与した。投与終了後、約２０分間シリンジを静置した。

[0270]（実施例５）運動機能の観察

実施例４においてＡＡＶベクターで処置したＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群及びコントロール群各個体に関して、エンドセリン－１注入処置前（０日目）、並びにエンドセリン－１注入後１、７、１４、２１、２８、４２、５６、７０及び８４日目に、ｍＲＳ（表１）及びＮＨＰＳＳの運動系スコアリング（表２）に基づく観察を実施した。

[0271] その結果、ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群及びコントロール群のいずれにおいても、ＡＡＶベクター投与後７日目は運動機能に差がなくＡＡＶベクター投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリン－１注入後８４日目（ＡＡＶベクター投与後６３日目）時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１

群ではエンドセリン－１注入後５６日目（ＡＡＶベクター投与後３５日目）以降より運動機能の回復を示し、エンドセリン－１注入後８４日目（ＡＡＶベクター投与後６３日目）時点では運動機能の顕著な回復が確認された（図５、６）。

[0272] 一方、コントロール群とＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１群の間で、体重及び摂餌状態に差は認められなかった（図７、８）。摂餌状態は、以下の基準に従って一週間単位で摂餌スコアリングを行うことにより評価した。

０： 摂餌なし

１： 給餌量の半分未満を摂取

２： 給餌量の半分以上、全量未満を摂取

３： 給餌量の全量を摂取

[0273] （実施例６）カニクイザルの脳梗塞モデルの画像解析

実施例２に記載の方法で作製した脳梗塞モデル１個体の脳を以下の方法にて解析した。なお、本実施例では麻酔前投薬としてアトロピン硫酸塩水和物（田辺三菱製薬株式会社、アトロピン硫酸塩注０．５ｍｇ「タナベ」）を０．０１ｍｇ／ｋｇ体重でｉ．ｍにより処置し、その後、１０ｍｇ／ｋｇ体重の塩酸ケタミンを用いてｉ．ｍによる導入麻酔を行った。その後はイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。

[0274] （ａ）エンドセリン－１注入領域における組織画像評価

脳梗塞モデルの脳を経日的にＭＲＩ装置（ＭＡＧＮＥＴＯＭ Ｔｒｉｏ、３Ｔ、ＳＩＥＭＥＮＳ）を用いて非侵襲的に画像化した。臨床においても広く用いられるＴ２強調画像法とフレアー（Ｆｌｕｉｄ ａｔｔｅｎｕａｔｅｄ ｉｎｖｅｒｓｉｏｎ ｒｅｃｏｖｅｒｙ；ＦＬＡＩＲ）法による撮像を行った。Ｔ２強調画像では水は白く高信号で描出され、炎症や障害巣が高信号で描出されることが知られている。フレアー法で得られる画像は脳脊髄液をはじめとした水の信号を抑制したＴ２強調画像であり、通常のＴ２強調画像よりも明瞭に障害巣を描出できる。

[0275] 経日的な脳のＴ２強調画像を図９Ａに、経日的な脳のフレアー画像を図９

Ｂに示す。脳障害惹起後１日目（エンドセリン－１注入後１日目、すなわち、エンドセリン－１注入の翌日）の脳梗塞モデルではエンドセリン－１注入領域がＴ２強調画像及びフレアー画像のいずれにおいても高信号で描出され、注入領域に障害が生じていることが示された。また脳障害惹起後７日目、２１日目、４１日目及び６９日目にも撮像したところ、Ｔ２強調画像及びフレアー画像のいずれにおいても高信号領域が検出されたが、経日的に高信号領域が縮小していることが明らかになった（図９Ａ及びＢのＬ）。一方、非障害側ではＴ２強調画像及びフレアー画像のいずれにおいても変化は認められなかった（図９Ａ及びＢのＲ）。さらに、Ｔ２強調画像において側脳室に着目し経日変化を観察したところ、エンドセリン－１注入後１日目において障害側の側脳室が非障害側に比べ縮小していることが確認された（図９Ａ（ａ））。これは臨床の脳梗塞でも観察されるように、脳障害に伴う血管性浮腫が生じ、障害側の側脳室を圧迫することで生じる変化によるものであると考えられた。またエンドセリン－１注入後７日目以降は側脳室の縮小が緩和していることから脳障害に伴う急性期の浮腫が軽減していると考えられた。一方、エンドセリン－１注入後２１日目、４１日目及び６９日目でのＴ２強調画像では障害側の側脳室は非障害側の側脳室よりも拡大していることが確認された。これは障害巣での神経細胞の脱落に伴う障害側の脳実質の萎縮を反映する変化と考えられ、臨床の脳梗塞でも生じる変化と類似していた。以上の画像解析結果より、本モデルは臨床で確認されているのと同様に、脳障害惹起後の急性期には浮腫を伴い、さらに脳梗塞部位の経日的な浮腫領域の縮小及び障害巣での神経細胞の脱落に伴う脳実質の萎縮を表現している脳梗塞モデルであると考えられた。

[0276] （ｂ）エンドセリン－１注入領域における灌流画像評価

脳梗塞モデルに対しガドリニウム造影剤（ブラッコ・エーザイ、プロハンス静注１０ｍＬ）を静脈内注入し、ＭＲＩ灌流画像法により血流を経日的に画像化した。経日的な脳の灌流画像を図９Ｃに示す。脳障害惹起後１日目の脳梗塞モデルではエンドセリン－１注入領域が低信号となり、血流が低下し

ていることが示された。また脳障害惹起後７日目、２１日目、４１日目及び６９日目に撮像したところ、低信号を示すエンドセリン－１注入領域が経日的に縮小し、低下していた血流が回復していることが示された。一方、非障害側では血流の変化は認められなかった。障害巣における急性期の及び経日的な画像解析結果から、本モデルは、臨床でも報告例があるように、脳障害惹起後の急性期には虚血を示し、さらに、脳虚血部位で低下した血流が血管新生等により亜急性期にかけて回復することを表現しているモデルであると考えられた。

[0277] （ｃ）神経白質線維の画像評価

脳梗塞モデルに対し拡散テンソル画像（ＤＴＩ）を撮像し、テンソル解析を行った。脳障害惹起後１日目に、エンドセリン－１注入領域近傍の内包を含むように、大脳脚を始点に、中心前回及び中心後回を終点にＲｅｇｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（ＲＯＩ）を設定し、異方性比率（Ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｓｏｔｒｏｐｙ；ＦＡ）を測定した。上記ＲＯＩにおけるＤＴＩ解析のＦＡ値は白質を通過する皮質脊髄路を主に反映していると考えられる。

[0278] 経日的な脳のＤＴＩを図９Ｄに示す。測定の結果、障害側ではＦＡ値が低値であったことから（図９Ｄ、矢印）、障害側では皮質脊髄路の神経線維が断裂、損傷していることが示された。ＦＡ値の低下は、脳障害惹起後１日目、７日目、２１日目、４１日目及び６９日目のいずれの撮像においても観察されていることから、神経線維の断裂は急性期から慢性期まで維持されていることが示された。一方、非障害側では皮質脊髄路が全体に描出され変化は認められなかった。これは臨床の脳梗塞でも観察されるように、脳障害領域における皮質脊髄路の断裂を示すものと考えられる。このことから、本モデルは、皮質脊髄路の損傷を伴う脳梗塞のモデルとしても有用であることが示された。

[0279] （実施例７）カニクイザルの脳梗塞モデルの脳の障害巣周囲におけるアストロサイトの集積及び神経細胞の脱落

実施例２に記載の方法で作製した脳梗塞モデル１個体をエンドセリン－１注入後２１日目に安楽死させ、脳を摘出し４％パラホルムアルデヒド（富士フィルム和光純薬社、１６３－２０１４５）を用いて固定した。その後、スクロース（ナカライテスク社、３０４０４－４５）をＰＢＳ（富士フィルム和光純薬社、０４５－２９７９５）に溶解したスクロース溶液（１０、２０及び３０％）を用いて、固定した脳組織中の水分をスクロース溶液に置換した後、１０μｍ厚の凍結脳切片を作製した。この脳切片を用いてアストロサイトのマーカーであるＧＦＡＰに対する抗ＧＦＡＰ抗体（Ａｂｃａｍ社、ａｂ５３５５４）と神経細胞マーカーであるＮｅｕＮに対する抗ＮｅｕＮ抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、ＭＡＢ３７７）を用いた免疫組織染色を行った。

[0280] その結果、ＧＦＡＰ陽性細胞が障害巣周囲に集積していること、また、障害巣では、非障害側の同じ部位と比べてＮｅｕＮ陽性細胞が減少していることを見出した。この結果は、障害巣周囲にアストロサイトが集積し、神経細胞が減少していることを示す。

[0281] （実施例８）ヒト脳梗塞患者の脳梗塞部位周囲におけるアストロサイトの集積及び神経細胞の脱落

脳梗塞発症の１０か月後の大脳基底核脳梗塞患者由来のホルマリン固定されたヒト脳サンプル（Ｌｉｆｅ　Ｎｅｔ　Ｈｅａｌｔｈ社）を、実施例７と同様に、ＰＢＳに溶解したスクロース溶液で処理して組織中の水分を置換し、１０μｍ厚の凍結脳切片を作製した。この脳切片を用いて抗ＧＦＡＰ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、１２３８９Ｓ）と抗ＮｅｕＮ抗体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、ＭＡＢ３７７）を用いた免疫組織染色を行った。

[0282] その結果、ＧＦＡＰ陽性細胞が脳梗塞部位周囲に集積していること、また、梗塞部位では、非梗塞側の同じ部位と比べてＮｅｕＮ陽性細胞が減少していることを確認した。この結果も、障害巣周囲にアストロサイトが集積し、神経細胞が減少していることを示す。

[0283] 実施例７及び実施例８の結果から、実施例２に記載の方法で作製した脳梗塞モデルは、ヒト慢性期脳梗塞と同様に神経細胞の脱落とアストロサイトの集積を表現している脳梗塞モデルであることが示された。

[0284] （実施例９）ｍＲＮＡ－ＬＮＰの調製

ヒトＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする２種のＮｅｕｒｏＤ１ ｍＲＮＡとして、（ｉ）ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社が提供する５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲ、ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳ（配列番号７）、及び１２０ヌクレオチドのポリＡ配列を含む塩基配列からなり、かつ５’キャップ構造がＣａｐ－１であるｍＲＮＡ（以下「ＮＤ１－１」と称する）と、（ｉｉ）ヒトαグロビン遺伝子由来の５’ＵＴＲ、ヒトαグロビン遺伝子由来の３’ＵＴＲ、ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳ（配列番号１０）及び７９ヌクレオチドのポリＡ配列を含む塩基配列（配列番号１１）において全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されている塩基配列（配列番号１３）からなり、かつ５’キャップ構造がＣａｐ－１であるｍＲＮＡ（以下「ＮＤ１－２」と称する）を作製した（ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社に委託）。なお配列番号１１及び１３に示す塩基配列中、ヌクレオチド１～３位がＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）Ｒｅａｇｅｎｔ ＡＧ（ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いたキャッピングの方法に適した５’末端配列、４～４３位が５’ＵＴＲ、４４～１１１４位がヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子のＣＤＳ（配列番号１０）、１１１５～１１２０位が連続する２つの終止コドン、１１２１～１２３１位が３’ＵＴＲ、１２３２～１３１０位がポリＡ配列に相当する。コントロールとして、ｅＧＦＰ ｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、Ｌ－７６０１）を用いた。

[0285] 上記（ｉ）及び（ｉｉ）のｍＲＮＡをそれぞれ表３に記載の組成の脂質ナノ粒子（Ｌ１又はＬ６）と混合し、脂質ナノ粒子中に封入されたｍＲＮＡ（以下、「ｍＲＮＡ－ＬＮＰ」と称する。）を調製した。

[0286]

[表3]

		Ｌ１	Ｌ６
脂質組成（モル%）	カチオン性脂質（化合物１(Ex1)）	50	40
	DSPC	10	12
	コレステロール	38.5	46.5
	DMG-PEG2000	1.5	1.5
緩衝液		10mM クエン酸緩衝液(pH4)	10mM クエン酸緩衝液(pH6)

DSPC：ジステアロイルホスファチジルコリン
DMG：ジミリストイルグリセロール
PEG2000：ポリエチレングリコール2000

[0287] ｍＲＮＡ－ＬＮＰの調製は、具体的には、以下の方法で実施した。カチオン性脂質である化合物１（Ｅｘ１；製造方法は実施例１５に示す）、ＤＳＰＣ（ＮＯＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社、ＣＯＡＴＳＯＭＥ（登録商標）ＭＣ－８０８０）、コレステロール（日本精化株式会社、Ｃｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ　ＨＰ）、ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００（ＮＯＦ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ社、ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）ＧＭ－０２０）をＮ／Ｐ比＝６でエタノールに溶解させ、油相を得た。上記のｍＲＮＡを含む１０ｍＭ　クエン酸緩衝液（ｐＨ４又は６）を水相とし、水相と油相の体積比が水相：油相＝３：１となるように油相を加えてマイクロ流体デバイス（ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（登録商標）、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ社）で混合し、混合液をＰＢＳで希釈してｍＲＮＡ－ＬＮＰの分散液を得た。この分散液の透析又は限外ろ過によりエタノール除去を行った。続いて限外ろ過により濃縮し、任意の濃度に調整したｍＲＮＡ－ＬＮＰを得た。なお、「Ｎ／Ｐ比」とは、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ中のカチオン性脂質のアミノ基のモル数（Ｎ）をｍＲＮＡのリン酸のモル数（Ｐ）で除した値である。

[0288] ｍＲＮＡ－ＬＮＰとして調製された、脂質ナノ粒子Ｌ１中に封入されたＮＤ１－１をＮＤ１－１－Ｌ１と称し、脂質ナノ粒子Ｌ６中に封入されたＮＤ１－２をＮＤ１－２－Ｌ６と称する。

[0289] 同様に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰとして、脂質ナノ粒子Ｌ１中に封入されたｅＧＦＰ　ｍＲＮＡを調製した。これをｅＧＦＰ　ｍＲＮＡ－Ｌ１と称する。

[0290] 上記と同様の方法で、ＮＤ１－２又はｅＧＦＰ　ｍＲＮＡを表４に記載の

組成の脂質ナノ粒子（Ｌ７）とそれぞれ混合し、ｍＲＮＡ－ＬＮＰを調製した。Ｌ７に含まれるカチオン性脂質は化合物２（Ｅｘ２；製造方法は実施例１６に示す）である。ｍＲＮＡ－ＬＮＰとして調製された、脂質ナノ粒子Ｌ７中に封入されたＮＤ１－２又はｅＧＦＰ　ｍＲＮＡを、それぞれＮＤ１－２－Ｌ７又はｅＧＦＰ　ｍＲＮＡ－Ｌ７と称する。

[0291] [表4]

		Ｌ７
脂質組成（モル%）	カチオン性脂質（化合物２(Ex2)）	50
	DSPC	10
	コレステロール	38.5
	DMG-PEG2000	1.5
緩衝液		10mM クエン酸緩衝液(pH4)

[0292] （実施例１０）インビトロにおけるＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡによるラットプライマリーアストロサイトから神経細胞への変換

１．ラットプライマリーアストロサイトへのｍＲＮＡ－ＬＮＰの添加

ラットプライマリーアストロサイトはＬｙｎｅｔｔｅ　Ｃ．Ｆｏｏ．らの論文（Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒａｔ　ａｎｄ　Ｍｏｕｓｅ　Ａｓｔｒｏｃｙｔｅｓ　ｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｐａｎｎｉｎｇ：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｖｏｌ．５，ｐｐ．４２１－４３２，２０１３）に従って取得し使用した。ただし、細胞のリカバリーは、５％CO_2下で行った。ラットはウィスターラットの新生仔（日本クレア、Ｐ１－Ｐ１０）を使用した。ポリ－Ｄ－リジンコートされた９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、３５６６４０）に、取得したラットプライマリーアストロサイトを１０，０００～４０，０００細胞／ウェルで播種し、５％CO_2下、３７℃で一晩培養した。培養には、２％　Ｂ－２７（登録商標）サプリメント（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ａ１８９５６０１）、１０％　ウシ胎児血清(ＦＢＳ)（Ｃｙｔｉｖａ社、ＳＨ３００８４．０３）及び１％　ペニシリン－ストレプトマイシン（ＰＳ）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、１５０７００６３

）を含有するＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、１１３２０－０３３）を２００μＬ／ウェルで使用した。なお実施例１０では、Ｂ－２７（登録商標）サプリメント、ＦＢＳ及びＰＳを含有するこのＤＭＥＭ／Ｆ１２培地を、下記においても、培養培地として用いた。翌日、ＰＢＳ及び培養培地で希釈したｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－１－Ｌ１又はＮＤ１－２－Ｌ６）を終濃度０．５μｇ／ｍＬとなるようにそれぞれウェルに添加し２４時間培養した。コントロールのウェルにはＰＢＳ及び培養培地を添加した。

[0293] ２．ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質の発現確認

上記のｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加の２４時間後に、培養培地を除去し、４％パラホルムアルデヒドで細胞を固定処理した。その後ＰＢＳで洗浄し、抗ＮｅｕｒｏＤ１抗体（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、ｓｃ４６６８４）を用いて免疫細胞染色を行い、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質の発現を検出した。結果、ＮＤ１－１－Ｌ１又はＮＤ１－２－Ｌ６を添加したウェルにおいて、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質陽性細胞が、ＰＢＳを添加したウェル（コントロール）に比べて顕著に増加していることが示された。この結果は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰがアストロサイトに取り込まれ、アストロサイトにてＮｅｕｒｏＤ１タンパク質に翻訳されていることを示す。

[0294] ３．神経細胞マーカーの発現確認

上記のｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加の２４時間後に、培養培地を除去し分化転換培地に変更し、２～３日ごとに培地交換した。分化転換培地は２％　Ｂ－２７（登録商標）サプリメント、１％　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）サプリメント（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、３５０５０－０６１）、１％　ＰＳ及び０．０２％　ＢＤＮＦ（ｂｒａｉｎ　ｄｅｒｉｖｅｄ　ｎｅｕｒｏｔｒｏｐｈｉｃ　ｆａｃｔｏｒ；脳由来神経栄養因子）溶液を含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２培地であり、当該培地を２００μＬ／ウェル添加した。ＢＤＮＦ溶液は、１００μｇ／ｍＬとなるようにＢＤＮＦ粉末（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ、４５０－０２）を純水で溶解することにより調製した

。ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加後６～７日目において分化転換培地を除去し、４％パラホルムアルデヒドで細胞を固定処理した。その後ＰＢＳで洗浄し、未成熟な神経細胞マーカーであるダブルコルチン（Ｄｏｕｂｌｅｃｏｒｔｉｎ；ＤＣＸ）の発現を確認するため、抗ＤＣＸ抗体（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、４６０４Ｓ）を用いて免疫細胞染色を行った。

[0295] ＮＤ１－１－Ｌ１又はＮＤ１－２－Ｌ６を添加したウェルにおいて、ＰＢＳを添加したウェル（コントロール）に比べてＤＣＸ陽性細胞が顕著に増加していることが明らかになった。この結果は、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡによりラットプライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されたことを示す。

[0296] （実施例１１）カニクイザル脳梗塞モデルの脳内へのＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与

実施例２に記載の方法で作製した脳梗塞モデルの４個体を、エンドセリン－１注入後２１日目（慢性期）に、ｍＲＳ（表１参照）に関して群間で差が生じないように２群（コントロール群：Ｎ＝１、薬剤投与群：Ｎ＝３）に振り分けた。

[0297] 各群の脳梗塞モデル個体に、約１０ｍｇ／ｋｇ体重となる量の塩酸ケタミンを用いて、ｉ．ｍ．による導入麻酔及びイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。麻酔持続下にて頭部の毛をバリカンで剃毛した後、モデル個体を脳定位固定装置に固定した。次に、術野を消毒し、出血に配慮しながら頭部皮膚を切開してブレグマを露出した。

[0298] 各群の脳梗塞モデル個体において、実施例２に記載の方法で脳梗塞モデル作製時にエンドセリン－１を注入した合計４か所の穴のそれぞれに、実施例２と同じ深さ（Ｄ）に針先端が来るようにマイクロシリンジを留置し、ｍＲＮＡ－ＬＮＰの投与に用いた。ｍＲＮＡ－ＬＮＰとして、薬剤投与群（ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群）の３個体にＮＤ１－１－Ｌ１を、コントロール群の１個体にｅＧＦＰ　ｍＲＮＡ－Ｌ１を、エンドセリン－１注入後

２１日目（慢性期）に投与した。ｍＲＮＡ－ＬＮＰは、ＰＢＳで０．３ｍｇ／ｍＬとなるように調製し、３０μＬ／部位、投与速度１．５μＬ／ｍｉｎで投与した。投与終了後、約２０分間シリンジを静置した。

[0299] （実施例１２）ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡの作用

（ａ）運動機能の観察

実施例１１においてｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン－１注入処置前（０日目）、並びにエンドセリン－１注入後１、７、１４、２１、２２、２８、４２、５６、７０及び８４日目に、ｍＲＳ（表１）に基づく観察を実施した。なお、前述のように、エンドセリン－１注入後２８日目以降は２週間毎に行動評価を実施することとしたが、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群のエンドセリン－１注入後５６日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３５日目）の行動評価としては、各個体をエンドセリン－１注入後５７、５８又は５９日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３６、３７又は３８日目）にそれぞれ評価した。コントロール群のエンドセリン－１注入後５６日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３５日目）の行動評価としては、コントロール群の１個体をエンドセリン－１注入後５８日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３７日目）に評価した。これらの結果を、本実施例においてはエンドセリン－１注入後５６日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３５日目）の結果とした。

[0300] その結果、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群及びコントロール群のいずれにおいても、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後１日目は運動機能に差がなくｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリン－１注入後８４日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後６３日目）時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群ではエンドセリン－１注入後５６日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３５日目）以降より運動機能の回復を示し、エンドセリン－１注入後８４日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後６３日目）時点では運動機能の顕著な回復が確認された（図１０）。このことから、タンパク質を持続

的に発現することが知られているＡＡＶベクターを用いてＮｅｕｒｏＤ１を投与した場合（実施例５）だけでなく、タンパク質を一過性に発現させることが知られているｍＲＮＡによりＮｅｕｒｏＤ１を投与した場合においても、脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが明らかになった。

[0301] （ｂ）ＤＴＩによるＦＡ値の解析

実施例１１においてｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン－１注入後１１４日～１１５日目においてＭＲＩによる脳の撮像を行った。ＲＯＩを実施例６（ｃ）と同様に設定し、ＤＴＩ解析を行った。またＤＴＩ解析をもとに連続的な神経線維の走行を３次元的に画像化したＤＴＴを取得した。

[0302] ＤＴＩ解析により、コントロール群では非障害側（右脳）と比較して障害側（左脳）のＦＡ値が低値であり、ＤＴＴにおいて神経線維の断裂が確認された（図１１Ａ）。一方、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群では障害側のＦＡ値が回復しており、ＤＴＴにおいて神経線維の回復が認められた（図１１Ｂ、矢印）。図１１Ｃは、コントロール群及びＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群におけるＤＴＩ解析によるＦＡ値の定量結果を、非障害側と比較した障害側のＦＡ値の比率（相対値）として示す。この結果は、損傷された皮質脊髄路が、ＮｅｕｒｏＤ１の投与により回復したことを示している。

[0303] （ｃ）側脳室の容積の解析

実施例１１においてｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン－１注入後１１４日～１１５日目にＭＲＩによる脳の撮像を行った。

[0304] Ｔ２強調画像を用いた画像評価解析により、コントロール群では非障害側（右脳）と比較して障害側（左脳）の側脳室の容積が増大していることが確認された（図１２Ａ）が、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群では障害側の側脳室の容積の増大の抑制が確認された（図１２Ｂ、矢印）。図１２Ｃは、コントロール群及びＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群における側脳室

の容積の定量結果を、Ｔ１強調画像をもとに非障害側と比較した障害側の側脳室の容積の比率（相対値）として示す。Ｔ１強調画像は側脳室を満たす脳脊髄液を低信号で検出し、Ｔ１強調画像の解析により側脳室の容積を算出することができる。側脳室の容積の増大は脳実質の萎縮を反映していると考えられる。したがって、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群において側脳室の容積の増大が抑制されていることは、ＮｅｕｒｏＤ１の投与による脳実質の萎縮の抑制又は脳実質組織の損傷の回復を示していると考えられた。

[0305] （ｄ）ドパミントランスポーターの発現解析

本脳梗塞モデルは大脳基底核障害を有していることから、線条体においてドパミントランスポーターの発現が低下していると考えられた。そこで、以下の実験を行った。

[0306] 実施例１１においてｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群及びコントロール群の各個体を、エンドセリン－１注入後１１８日～１２２日目に安楽死させ、脳を摘出し４％パラホルムアルデヒドで固定した。その後スクロースをＰＢＳに溶解したスクロース溶液（１０、２０及び３０％）で組織中の水分を置換し、１０μｍ厚の凍結脳切片を作製し、次いでドパミントランスポーターの免疫組織染色を実施した。免疫組織染色では、まず、抗原賦活のため、脳切片を１０ｍＭクエン酸緩衝液に浸し、９８℃で５分間加熱した。クエン酸緩衝液はクエン酸（ナカライテスク社、０９１０８－９５）を純水で溶解し、水酸化ナトリウム水溶液（富士フィルム和光純薬社、１９２－０２１７５）を用いてｐＨ６．２になるよう調製した。加熱後、抗ドパミントランスポーター（ＤＡＴ）抗体（Ａｂｃａｍ社、ａｂ５９９０）を用いて免疫組織染色を実施した。

[0307] その結果、コントロール群の障害側（左脳）の線条体では非障害側（右脳）に比べて明らかにドパミントランスポーターの染色強度が低下していた（図１３Ａ）が、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群の障害側の線条体ではドパミントランスポーターの染色強度はコントロール群のような明らかな低下は認められなかった（図１３Ｂ）。これは、障害によって生じたドパミン

トランスポーターの発現低下が、ＮｅｕｒｏＤ１の投与によって回復した結果を示していると考えられた。また、ドパミントランスポーターの染色強度の回復は線条体に投射するドパミン神経路の回復を反映していると考えられた。図１３Ｃは、コントロール群及びＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ群におけるドパミントランスポーターの発現強度を、非障害側と比較した障害側のドパミントランスポーター染色強度の比率（相対値）として示す。ドパミントランスポーターの発現解析の結果から、本モデルはドパミントランスポーターの発現低下を伴う脳梗塞のモデルとして有用であることが明らかとなった。

[0308] 実施例６、７及び本実施例から、本発明の方法で作製される大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞動物モデルは、（１）急性期において浮腫及び虚血を示し、（２）経日的に浮腫領域の縮小、側脳室の拡大及び血流の回復を示し、（３）慢性期において障害巣周囲においてアストロサイトの集積及び神経細胞の脱落を呈し、さらに（４）急性期～慢性期において皮質脊髄路の損傷を伴う脳梗塞動物モデルであり得ることが明らかになった。これらは、臨床で報告されている脳梗塞の病態と類似していた。したがって、本モデルは、脳梗塞（急性期、亜急性期～慢性期、特には慢性期）のモデルとして有用であることが示された。

[0309] また、上記実施例において、ＡＡＶ－ＮｅｕｒｏＤ１又はＮｅｕｒｏＤ１ｍＲＮＡを障害巣へ投与することにより、脳実質の萎縮が抑制又は回復すること、内包において皮質脊髄路の損傷が回復することが示されていること、及び線条体においてドパミン神経路の回復が示されていることから、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質に依存してアストロサイト等の障害巣周辺の細胞が神経細胞に変換されたことにより、脳の機能が回復し、その結果として脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができたと考えられる。なお、実施例１０においてＮＤ１－１－Ｌ１と同様にＮＤ１－２－Ｌ６もアストロサイトを神経細胞へ変換したことが示されたことから、ＮＤ１－２－Ｌ６を投与した場合においてもＮＤ１－１－Ｌ１と同様にＮｅｕｒｏＤ１による同様の効

果が示されることが期待される。

[0310] 以上の実施例１～１２の結果から、本発明の方法で作製した大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞動物モデルを用いることにより、脳梗塞、特に、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞、及び亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する治療効果について被験物質を評価又はスクリーニングできることが示された。さらに、ＮｅｕｒｏＤ１投与により、（１）脳梗塞（穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞）に対し治療効果を示すこと、及び（２）重症度が高い運動機能障害を呈する脳梗塞に対しても治療効果を示すことが明らかになった。

[0311] （実施例１３）インビトロにおけるＮｅｕｒｏＤ１ ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）によるラットプライマリーアストロサイトから神経細胞への変換

実施例１０におけるＮＤ１－１－Ｌ１及びＮＤ１－２－Ｌ６と同様に、ＮＤ１－２－Ｌ７によりラットプライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されるか評価した。

[0312] １．ラットプライマリーアストロサイトへのｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）の添加及び分化誘導

実施例１０の「１．ラットプライマリーアストロサイトへのｍＲＮＡ－ＬＮＰの添加」に記載の方法に従い、ラットプライマリーアストロサイトを取得し、一晩培養した。翌日、培養培地で希釈したｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）を終濃度０．５μｇ／ｍＬとなるように、培養したラットプライマリーアストロサイトを含むウェルに添加し２４時間培養した。コントロールのウェルには培養培地を添加した。なお、実施例１０の「１．ラットプライマリーアストロサイトへのｍＲＮＡ－ＬＮＰの添加」に記載のＢ－２７（登録商標）サプリメント、ＦＢＳ（Ｃｙｔｉｖａ社、ＳＨ３００７０．０３）及びＰＳを含有するＤＭＥＭ／Ｆ１２培地を、培養培地として用いた。

[0313] ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加の２４時間後に、培養培地を除去し分化転換培地に

変更し、２～３日ごとに培地交換した。分化転換培地には、実施例１０の「３．神経細胞マーカーの発現確認」に記載の分化転換培地を使用し、当該培地を２００μＬ／ウェル添加した。

[0314] ２．イムノブロット法によるＮｅｕｒｏＤ１タンパク質及びＤＣＸタンパク質の発現確認

上記のｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加前（０日目）、並びに添加後８時間、１日目、２日目、４日目、６日目に、培養培地を除去し、ＰＢＳで洗浄し、ＲＩＰＡ Ｂｕｆｆｅｒ（ＳＩＧＭＡ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、Ｒ０２７８－５０ＭＬ）を用いて細胞を溶解した。なお、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加の２４時間後の培地交換前に、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加後１日目の細胞溶解を実施した。ロウリー法によるタンパク定量後、各５μｇのタンパク質を電気泳動し、抗ＮｅｕｒｏＤ１抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、ｓｃ４６６８４）を用いたイムノブロット法によりＮｅｕｒｏＤ１タンパク質の発現を検出した。また、抗ＤＣＸ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、４６０４Ｓ）を用いたイムノブロット法によりＤＣＸタンパク質の発現を検出した。

[0315] その結果、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加後８時間において最大の発現量を示し、添加後１日目には発現が減少することが明らかになった。この結果はｍＲＮＡ－ＬＮＰがラットプライマリーアストロサイトに取り込まれ、ラットプライマリーアストロサイトにおいてＮｅｕｒｏＤ１タンパク質が一過性に発現していることを示す。また、ＤＣＸタンパク質は、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加後１日目から発現が上昇し、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ添加後６日目においても発現が上昇していることが明らかになった。これらの結果は、カチオン性脂質として化合物１（Ｅｘ１）を含むＬＮＰを用いた場合（実施例１０）だけでなく、化合物２（Ｅｘ２）を含むＬＮＰを用いた場合においても、ＮｅｕｒｏＤ１ ｍＲＮＡをラットプライマリーアストロサイトに送達することができること、そのＮｅｕｒｏＤ１ ｍＲＮＡからＮｅｕｒｏＤ１タンパク質がラットプライマリーアストロサイトにおいて発現

し、当該タンパク質が機能を発揮したことによりＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡによりラットプライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されたことを示す。

[0316] （実施例１４）カニクイザル脳梗塞モデルの脳内へのＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）投与及び運動機能の観察

実施例１１及び１２と同様に、カニクイザル脳梗塞モデルにおいて、ＮＤ１－２－Ｌ７を評価した。本実施例では、コントロール群：Ｎ＝２、薬剤投与群：Ｎ＝２とし、ｍＲＮＡ－ＬＮＰとして、薬剤投与群（ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）群）の２個体にＮＤ１－２－Ｌ７を、コントロール群の２個体にｅＧＦＰ　ｍＲＮＡ－Ｌ７を、エンドセリン－１注入後２１日目（慢性期）に投与した。

[0317] ｍＲＮＡ－ＬＮＰで処置したＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン－１注入処置前（０日目）、並びにエンドセリン－１注入後１、７、１４、２１、２２、２８、４２、５６、７０及び８４日目に、ｍＲＳ（表１）に基づく観察を実施した。なお、実施例１２と同様に、エンドセリン－１注入後２８日目以降は２週間毎に行動評価を実施することとしたが、コントロール群のエンドセリン－１注入後７０日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後４９日目）の行動評価としては、コントロール群の各個体をエンドセリン－１注入後６９又は７０日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後４８、又は４９日目）に評価した。この結果を、本実施例においてはコントロール群のエンドセリン－１注入後７０日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後４９日目）の結果とした。

[0318] その結果、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）群及びコントロール群のいずれにおいても、ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後１日目は運動機能に差がなくｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリン－１注入後８４日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後６３日目）時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ（ＮＤ１－２－Ｌ７）群

ではエンドセリン－１注入後５６日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後３５日目）以降より運動機能の回復を示し、エンドセリン－１注入後８４日目（ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与後６３日目）時点では運動機能の顕著な回復が確認された（図１４）。このことから、実施例１１及び１２で評価したＮＤ１－１－Ｌ１だけでなく、ＮＤ１－２－Ｌ７を用いても、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰ投与により脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが明らかになった。

[0319]　ＮＤ１－１－Ｌ１及びＮＤ１－２－Ｌ７に含まれるｍＲＮＡは、ＵＴＲの配列、ポリＡ配列の長さ、修飾ヌクレオシドの有無等が異なる。また、ＮＤ１－１－Ｌ１及びＮＤ１－２－Ｌ７は、異なるカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子中にｍＲＮＡがそれぞれ封入されている。実施例１１、１２及び本実施例の結果から、ｍＲＮＡの配列等及び脂質ナノ粒子の成分が異なっても、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰがヒトＮｅｕｒｏＤ１タンパク質を目的の細胞において発現させることが可能である限りにおいて、ＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ－ＬＮＰの投与により、脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが示された。

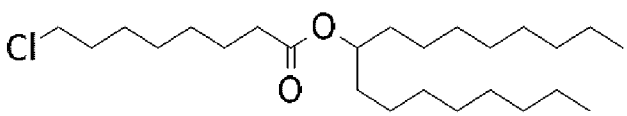
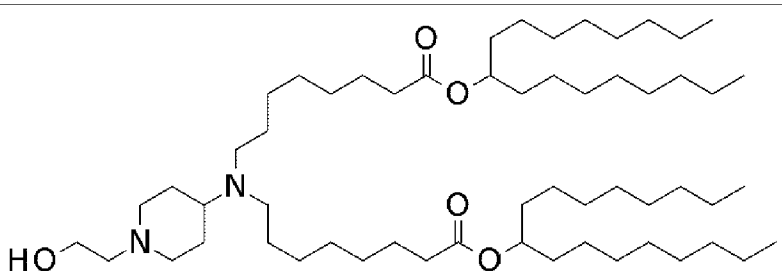
[0320]（実施例１５）カチオン性脂質　化合物１（Ｅｘ１）の製造

窒素雰囲気下にて、氷冷下、８－ブロモオクタン酸（７５．５ｇ）及び９－ヘプタデカノール（８６．８ｇ）のＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（７５５ｍＬ）の混合物に、Ｎ，Ｎ－（ジメチルアミノ）ピリジン（６１．９ｇ）、１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩（９７．２ｇ）を加えた。その後、室温で２８時間撹拌した。反応混合物を氷水に加え、トルエンで抽出した。水層をトルエンで抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。洗液をトルエン及び酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。有機層を減圧下で濃縮した後、ヘキサンを加え、再び減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製して、８－クロロオクタン酸ヘプタデカン－９－イル（８０．３ｇ；以下「

中間体１（ＰＥｘ１）」とも称する）を油状物として得た。表５に中間体１（ＰＥｘ１）の化学構造式を示す。

[0321] 窒素雰囲気下にて、２－（４－アミノ－１－ピペリジニル）エタノール二塩酸塩（６７２ｍｇ）、８－クロロオクタン酸ヘプタデカン－９－イル（３．０ｇ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（６．７ｍＬ）の混合物に、炭酸カリウム（１．７ｇ）及びヨウ化カリウム（５１ｍｇ）を加えた。内温１００℃で２４時間撹拌した後、反応混合物を室温で放冷し、不溶物を濾別し、トルエンにて洗浄した。濾液に水を加え、有機層を抽出した。水層をトルエン及び酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。水層を酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。有機層を減圧下で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール）で精製した。得られた粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（塩基性シリカゲル、ヘキサン／酢酸エチル）で精製し、８，８’－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピペリジン－４－イル］アザンジイル｝ジ（オクタン酸）ジ（ヘプタデカン－９－イル）（５４０ｍｇ；以下「化合物１（Ｅｘ１）」とも称する）を油状物として得た。表５に化合物１（Ｅｘ１）の化学構造式を示す。

[0322] [表5]

化合物名	化学構造式
中間体1 (PEx1)	
化合物1 (Ex1)	

[0323] 中間体１（ＰＥｘ１）及び化合物１（Ｅｘ１）について、プラスの高電圧をイオン化に使用してエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）を行った。得られた質量電荷比（ｍ／ｚ）は以下のとおりである。

中間体１（ＰＥｘ１）　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　４４０

化合物１（Ｅｘ１）　　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　９０６

[0324] また、化合物１（Ｅｘ１）のＮＭＲスペクトル解析を行った。その結果を以下に示す（^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルにおける代表的なシグナル値を示す。ｔ：三重線、ｑｕｉｎ：五重線、ｔｄ：三重二重線、ｍ：多重線、ｂｒｄ：ブロード二重線）。

ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ：０．８８（ｔ，Ｊ＝７．００Ｈｚ，１２Ｈ），１．２３－１．４２（ｍ，６６Ｈ），１．４５－１．７４（ｍ，１４Ｈ），２．０４（ｔｄ，Ｊ＝１１．８０，１．９８Ｈｚ，２Ｈ），２．２７（ｔ，Ｊ＝７．５７Ｈｚ，４Ｈ），２．３６－２．５２（ｍ，７Ｈ），２．９４（ｂｒｄ，Ｊ＝１１．４７Ｈｚ，２Ｈ），３．５８（ｔ，Ｊ＝５．４３Ｈｚ，２Ｈ），４．８６（ｑｕｉｎ，Ｊ＝６．２３Ｈｚ，２Ｈ）

[0325] （実施例１６）カチオン性脂質　化合物２（Ｅｘ２）の製造

７，７’－アザンジイルジ（ヘプタン酸）ジエチル（１０．７ｇ）とジクロロメタン（１０７ｍＬ）の混合物に１，１’－カルボニルジイミダゾール（７．３５ｇ）を室温で加え、室温で１６時間撹拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製し、７，７’－［（１Ｈ－イミダゾール－１－カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ジエチル（１３．５ｇ；以下「中間体２ａ（ＰＥｘ２ａ）」とも称する）を油状物として得た。表６に中間体２ａ（ＰＥｘ２ａ）の化学構造式を示す。

[0326] ７，７’－［（１Ｈ－イミダゾール－１－カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ジエチル（３ｇ）とアセトニトリル（３０ｍＬ）の混合物にヨウ化メチル（２．２ｍＬ）を室温で加え、室温で２時間撹拌した。反応混合物にヨウ化メチル（２．２ｍＬ）を室温で追加し、室温で１６時間撹拌し

た。反応混合物を減圧下で濃縮し、１－［ビス（７－エトキシ－７－オキソヘプチル）カルバモイル］－３－メチル－１Ｈ－イミダゾール－３－イウム＝ヨージド（４．２ｇ；以下「中間体２ｂ／Ｉ（ＰＥｘ２ｂ／Ｉ）」とも称する）を油状物として得た。表６に中間体２ｂ／Ｉ（ＰＥｘ２ｂ／Ｉ）の化学構造式を示す。

[0327] １－［ビス（７－エトキシ－７－オキソヘプチル）カルバモイル］－３－メチル－１Ｈ－イミダゾール－３－イウム＝ヨージド（４．２ｇ）とＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１０ｍＬ）の混合物に、２－（ジメチルアミノ）－１－（４－ヒドロキシピペリジン－１－イル）エタン－１－オン（１．４５ｇ）とテトラヒドロフラン（１０ｍＬ）の混合物を室温で加え、次いで水素化ナトリウム（６０％　ｉｎ　ｏｉｌ，　３１０ｍｇ）を室温で加え、室温で３時間撹拌した。反応混合物に１Ｍ塩酸を加えてｐＨ７程度にした。酢酸エチルで希釈後、水を加え、有機層を分離し、水層を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水／水（１／１）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。得られた残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製し、７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ジエチル（１．９３ｇ；以下「中間体２ｃ（ＰＥｘ２ｃ）」とも称する）を油状物として得た。表６に中間体２ｃ（ＰＥｘ２ｃ）の化学構造式を示す。

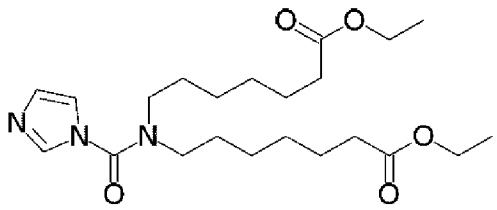
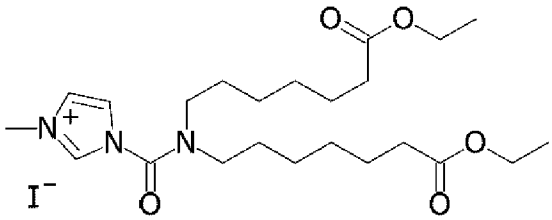
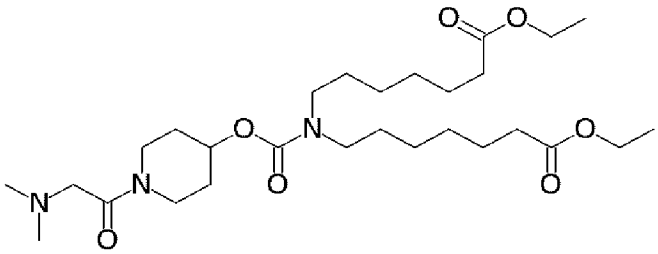
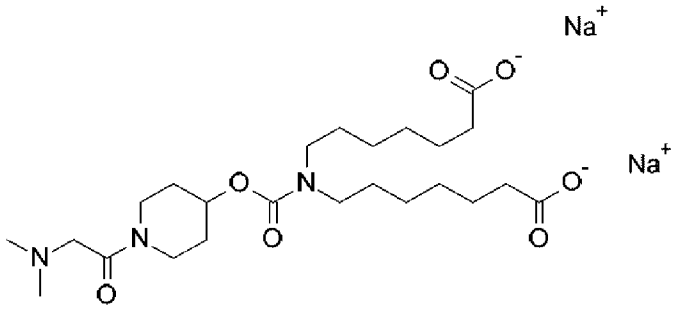
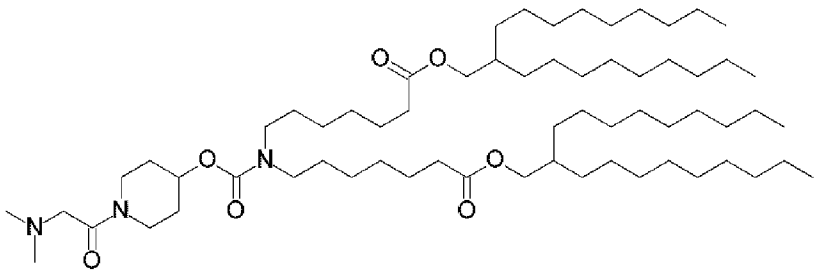
[0328] ７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ジエチル（１．１３ｇ）、テトラヒドロフラン（１７ｍＬ）及びエタノール（１７ｍＬ）の混合物に、１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液（４．１７ｍＬ）を室温で加え、室温で７２時間撹拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、エタノール（１００ｍＬ）を加えて濃縮することで、７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ナトリウム（１．２１ｇ；以下「中間体２ｄ／Ｎａ（Ｐ

Ｅｘ２ｄ／Ｎａ）」とも称する）を固体として得た。表６に中間体２ｄ／Ｎａ（ＰＥｘ２ｄ／Ｎａ）の化学構造式を示す。

[0329] ７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ナトリウム（２００ｍｇ）とジクロロメタン（３ｍＬ）の混合物に２－ノニルウンデカン－１－オール（２７０ｍｇ）、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスファート（４３０ｍｇ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（０．４ｍＬ）及びＮ，Ｎ－ジメチルアミノピリジン（１０ｍｇ）を室温で加え、室温で１６時間撹拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、室温で１０分間撹拌した。ジクロロメタンで希釈し、水を加え、フェーズセパレータを用いて抽出操作を行い、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール）で精製後、粗精製物をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製することで、７，７’－［（｛［１－（Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシル）ピペリジン－４－イル］オキシ｝カルボニル）アザンジイル］ジ（ヘプタン酸）ビス（２－ノニルウンデシル）（１９７ｍｇ；以下「化合物２（Ｅｘ２）」と称する）を油状物として得た。表６に化合物２（Ｅｘ２）の化学構造式を示す。

[0330]

[表6]

化合物名	化学構造式
中間体2a (PEx2a)	
中間体2b/I (PEx2b/I)	
中間体2c (PEx2c)	
中間体2d/Na (PEx2d/Na)	
化合物2 (Ex2)	

[0331] 中間体２ａ（ＰＥｘ２ａ）、中間体２ｂ／Ｉ（ＰＥｘ２ｂ／Ｉ）、中間体２ｃ（ＰＥｘ２ｃ）、中間体２ｄ／Ｎａ（ＰＥｘ２ｄ／Ｎａ）及び化合物２（Ｅｘ２）について、プラスの高電圧をイオン化に使用してエレクトロスプ

レーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）を行った。得られた質量電荷比（ｍ／ｚ）は以下のとおりである。

中間体２ａ（ＰＥｘ２ａ）　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　４２４．５

中間体２ｂ／Ｉ（ＰＥｘ２ｂ／Ｉ）　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　４３８．５

中間体２ｃ（ＰＥｘ２ｃ）　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　５４２．７

中間体２ｄ／Ｎａ（ＰＥｘ２ｄ／Ｎａ）　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　４８６．５

化合物２（Ｅｘ２）　ＥＳＩ＋　ｍ／ｚ：　１０４７．３

[0332] また、化合物２（Ｅｘ２）のＮＭＲスペクトル解析を行った。その結果を以下に示す（^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトルにおける代表的なシグナル値を示す。ｍ：多重線、ｄ：二重線）。

ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ：０．８６－０．９３（ｍ，１２Ｈ），１．２３－１．４１（ｍ，７２Ｈ），１．５２－１．７３（ｍ，１２Ｈ），１．８５－１．９９（ｍ，２Ｈ），２．２８－２．３５（ｍ，１０Ｈ），３．２１－３．２７（ｍ，６Ｈ），３．４７－３．５４（ｍ，２Ｈ），３．６９－３．８０（ｍ，２Ｈ），３．９９（ｄ，Ｊ＝５．５０Ｈｚ，４Ｈ），４．８５－４．９１（ｍ，１Ｈ）

産業上の利用可能性

[0333] 本発明の方法により、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞（特には、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞及び穿通枝支配領域に脳障害を有する亜急性期～慢性期の脳梗塞）などの脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルを作出することができる。本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、脳梗塞治療剤、特に、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤の探索及び開発において、有効な動物モデルとなることが期待される。また、本発明の医薬組成物又は治療方法は、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞（特には、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞及び穿通枝支配領域に脳障害を有する亜急性期～慢性期の脳梗塞）などの脳梗

塞の治療に有用であると期待される。

[0334] 配列番号１：ＮｅｕｒｏＤ１発現ベクターＡＡＶ－ＧＦＡＰ－Ｎｅｕｒｏｄ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰ

配列番号２：コントロールベクター　ＡＡＶ－ＧＦＡＰ－ＧＦＰ

配列番号３：ＧＦＰ遺伝子（ＣＤＳ）

配列番号４：ＧＦＰ

配列番号５：マウスＮｅｕｒｏＤ１遺伝子（ＣＤＳ）

配列番号６：マウスＮｅｕｒｏＤ１タンパク質

配列番号７：ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子（ＣＤＳ）

配列番号８：ヒトＮｅｕｒｏＤ１タンパク質

配列番号９：エンドセリン－１（ヒト由来）

配列番号１０：ヒトＮｅｕｒｏＤ１遺伝子（ＣＤＳ）

配列番号１１：ヒトＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ配列（ＮＤ１－２）

配列番号１２：ｐＲＣ＿ＡＡＶ９

配列番号１３：修飾ヌクレオシドを含むヒトＮｅｕｒｏＤ１　ｍＲＮＡ配列（ＮＤ１－２）

配列番号１４：ヒトＧＦＡＰプロモーター

[0335]　本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法。

[請求項2] 大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される１又は２以上の神経核にエンドセリンを投与する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも３つの神経核にエンドセリンを投与する、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも４つの神経核にエンドセリンを投与する、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の５つ全ての神経核にエンドセリンを投与する、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 脳梗塞が亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] 脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 脳梗塞が穿通枝梗塞である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 脳梗塞が、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項８又は９に記載の方法。

[請求項11] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期

の脳梗塞である、請求項８又は９に記載の方法。

[請求項12] 前記神経核を標的とするように投与部位を定め、当該投与部位にエンドセリンを投与することを含む、請求項２～１１のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] 非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも４つの神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

[請求項14] 非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（ａ）大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の５つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（ｂ）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

[請求項15] 前記投与部位が少なくとも３か所である、請求項１３又は１４に記載の方法。

[請求項16] 非ヒト霊長類がカニクイザルである、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項17] 投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも１０μｇである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項18] エンドセリンがエンドセリン－１である、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法で作製された、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル。

[請求項20] 亜急性期～慢性期の脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、カニクイザルにエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含み、エンドセリンの投与部位が下記を含む方法：

ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１２ｍｍ、Ｌ：４～１３ｍｍ、Ｄ：１２～２０ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

[請求項21] エンドセリンの投与部位が下記（１）～（３）のいずれか１つを含む、請求項２０に記載の方法：

（１）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ、Ｌ：４～６ｍｍ、Ｄ：１２～１４ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：８～１０ｍｍ、Ｌ：１１～１３ｍｍ、Ｄ：１４～１６ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、

（２）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：８～１０ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、及び

（３）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：１～３ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：４～６ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：１０～１２ｍｍ、Ｌ：７～９ｍｍ、Ｄ：１８～２０ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

[請求項22] エンドセリンの投与部位が下記（１）～（３）のいずれか１つを含む、請求項２０又は２１に記載の方法：

（１）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、

（２）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍにそれぞれ位置する投与部位、及び

（３）ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、及び（ｉｉｉ）Ｂ：１１ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

[請求項23] エンドセリンの投与部位が下記の投与部位を含む、請求項２０～２２のいずれか一項に記載の方法：

ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

[請求項24] エンドセリンの投与部位が下記の投与部位である、請求項２０～２３のいずれか一項に記載の方法：

ブレグマを基点として（ｉ）Ｂ：２ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉ）Ｂ：５ｍｍ、Ｌ：８ｍｍ、Ｄ：１９ｍｍ、（ｉｉｉ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：５ｍｍ、Ｄ：１３ｍｍ、及び（ｉｖ）Ｂ：９ｍｍ、Ｌ：１２ｍｍ、Ｄ：１５ｍｍにそれぞれ位置する投与部位。

[請求項25] 脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、請求項２０～２４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項26] 脳梗塞が穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、請求項２０～２５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項27] 投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも１０μｇである、請求項２０～２６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項28] エンドセリンがエンドセリン－１である、請求項２０～２７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項29] 請求項２０～２８のいずれか一項に記載の方法で作製された、亜急性期～慢性期の脳梗塞カニクイザルモデル。

[請求項30] 請求項１９又は２９に記載の非ヒト霊長類動物モデルに、被験物質を投与する工程、及び該非ヒト霊長類動物モデルにおける脳梗塞に対する該被験物質の効果を判定する工程を含む、脳梗塞治療剤のスクリーニング方法。

[請求項31] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物。

[請求項32] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物。

[請求項33] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項３１又は３２に記載の医薬組成物。

[請求項34] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記請求項３１～３３のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項35] 急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項３１に記載の医薬組成物。

[請求項36] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項３１～３５のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項37] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項３１～３６のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項38] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項３１～３７のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項39] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドがＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、請求項３１～３８のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項40] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項３９に記載の医薬組成物。

[請求項41] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、請求項３９又は４０に記載の医薬組成物。

[請求項42] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項43] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、請求項３９～４２のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項44] ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、請求項４３に記載の医薬組成物。

[請求項45] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが５’キャップ構造を有する、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項46] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシ

ドを含むｍＲＮＡである、請求項３９～４５のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項47] 修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、請求項４６に記載の医薬組成物。

[請求項48] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項４７に記載の医薬組成物。

[請求項49] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、請求項３９～４８のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項50] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項３９～４９のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項51] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、請求項３１～３８のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項52] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項３１～３８及び５１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項53] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターのいずれかである、請求項５２に記載の医薬組成物。

[請求項54] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項５３に記載の医薬組成物。

[請求項55] 請求項３１～５４のいずれか一項に記載の医薬組成物、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、若しくはＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療方法。

[請求項56] 請求項３１～５４のいずれか一項に記載の医薬組成物、又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質、若しくはＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療方法。

[請求項57] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項５５又は５６に記載の方法。

[請求項58] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項５５～５７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項59] 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項５５に記載の方法。

[請求項60] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項５５～５９のいずれか一項に記載の方法。

[請求項61] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項５５～６０のいずれか一項に記載の方法。

[請求項62] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項５５～６１のいずれか一項に記載の方法。

[請求項63] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、請求項５５～６２のいずれか一項に記載の方法。

[請求項64] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項６３に記載の方

法。

[請求項65] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、請求項６３又は６４に記載の方法。

[請求項66] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、請求項６３～６５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項67] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、請求項６３～６６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項68] ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、請求項６７に記載の方法。

[請求項69] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、請求項６３～６８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項70] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである、請求項６３～６９のいずれか一項に記載の方法。

[請求項71] 修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、請求項７０に記載の方法。

[請求項72] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項７１に記載の方法。

[請求項73] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、請求項６３～７２のいずれか一項に記載の方法。

[請求項74] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項６３～７３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項75] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、請求項

５５～６２のいずれか一項に記載の方法。

[請求項76] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを対象に投与する工程を含む、請求項５５～６２及び７５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項77] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、請求項７６に記載の方法。

[請求項78] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項７７に記載の方法。

[請求項79] 穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療に使用するための、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項80] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療に使用するための、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項81] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項７９又は８０に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

[請求項82] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項７９～８１のいずれか一項に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

[請求項83] 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項７９に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

[請求項84] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項７９～８３のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項85] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番

号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項７９～８４のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項86] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項７９～８５のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項87] 前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、請求項７９～８６のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項88] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項８７に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項89] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、請求項８７又は８８に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項90] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、請求項８７～８９のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項91] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、請求項８７～９０のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項92] ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、請求項９１に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項93] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、請求項８７～９２のいずれか一項に記載の、上記使用

のためのポリヌクレオチド。

[請求項94] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むポリヌクレオチドである、請求項８７～９３のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項95] 修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、請求項９４に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項96] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項９５に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項97] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、請求項８７～９６のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項98] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項８７～９７のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項99] 前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、請求項７９～８６のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項100] 前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、請求項７９～８６及び９９のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項101] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、請求項１００に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項102] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項１０１に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項103] 穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパ

ク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

[請求項104] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質又はＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

[請求項105] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項１０３又は１０４に記載の使用。

[請求項106] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項１０３～１０５のいずれか一項に記載の使用。

[請求項107] 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項１０３に記載の使用。

[請求項108] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項１０３～１０７のいずれか一項に記載の使用。

[請求項109] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項１０３～１０８のいずれかに記載の使用。

[請求項110] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項１０３～１０９のいずれか一項に記載の使用。

[請求項111] 前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡである、請求項１０３～１１０のいずれか一項に記載の使用。

[請求項112] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項１１１に記載の

使用。

[請求項113] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’ＵＴＲ及び／又は３’ＵＴＲを含む、請求項１１１又は１１２に記載の使用。

[請求項114] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むｍＲＮＡである、請求項１１１～１１３のいずれか一項に記載の使用。

[請求項115] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、ポリＡ配列を含む、請求項１１１～１１４のいずれか一項に記載の使用。

[請求項116] ポリＡ配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、請求項１１５に記載の使用。

[請求項117] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、５’キャップ構造を有する、請求項１１１～１１６のいずれか一項に記載の使用。

[請求項118] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが修飾ヌクレオシドを含むｍＲＮＡである、請求項１１１～１１７のいずれか一項に記載の使用。

[請求項119] 修飾ヌクレオシドがＮ１－メチルシュードウリジンである、請求項１１８に記載の使用。

[請求項120] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが、一部又は全てのウリジンがＮ１－メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項１１９に記載の使用。

[請求項121] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが薬物送達システム（ＤＤＳ）中に内封されている、請求項１１１～１２０のいずれか一項に記載の使用。

[請求項122] ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするｍＲＮＡが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項１１１～１２１のいずれか一項に記載の使用。

[請求項123] 前記ポリヌクレオチドがＤＮＡである、請求項１０３～１１０のい

ずれか一項に記載の使用。

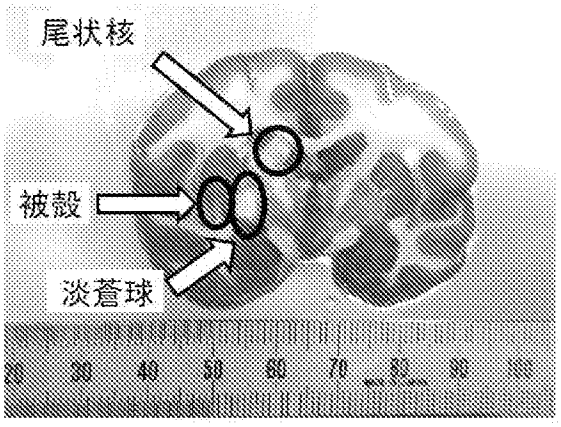
[請求項124] 前記ポリヌクレオチドが、ＮｅｕｒｏＤ１タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、請求項１０３～１１０及び１２３のいずれか一項に記載の使用。

[請求項125] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、請求項１２４に記載の使用。

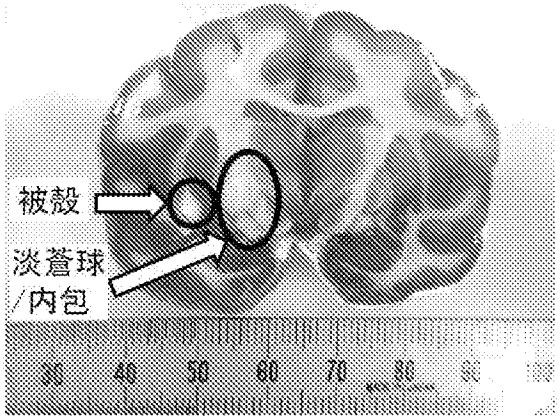
[請求項126] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項１２５に記載の使用。

[図1]

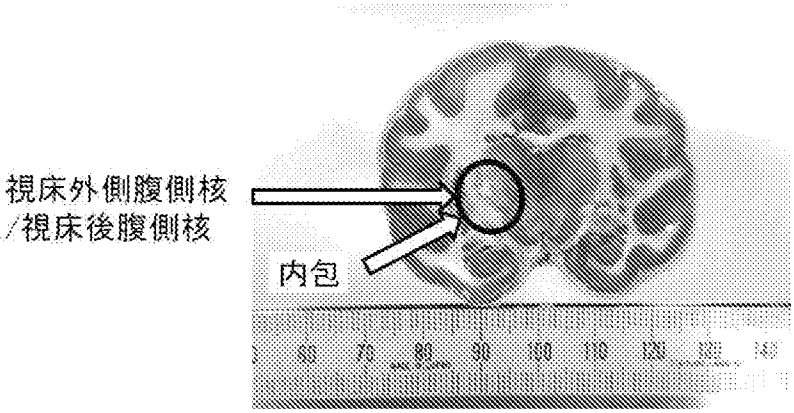
A



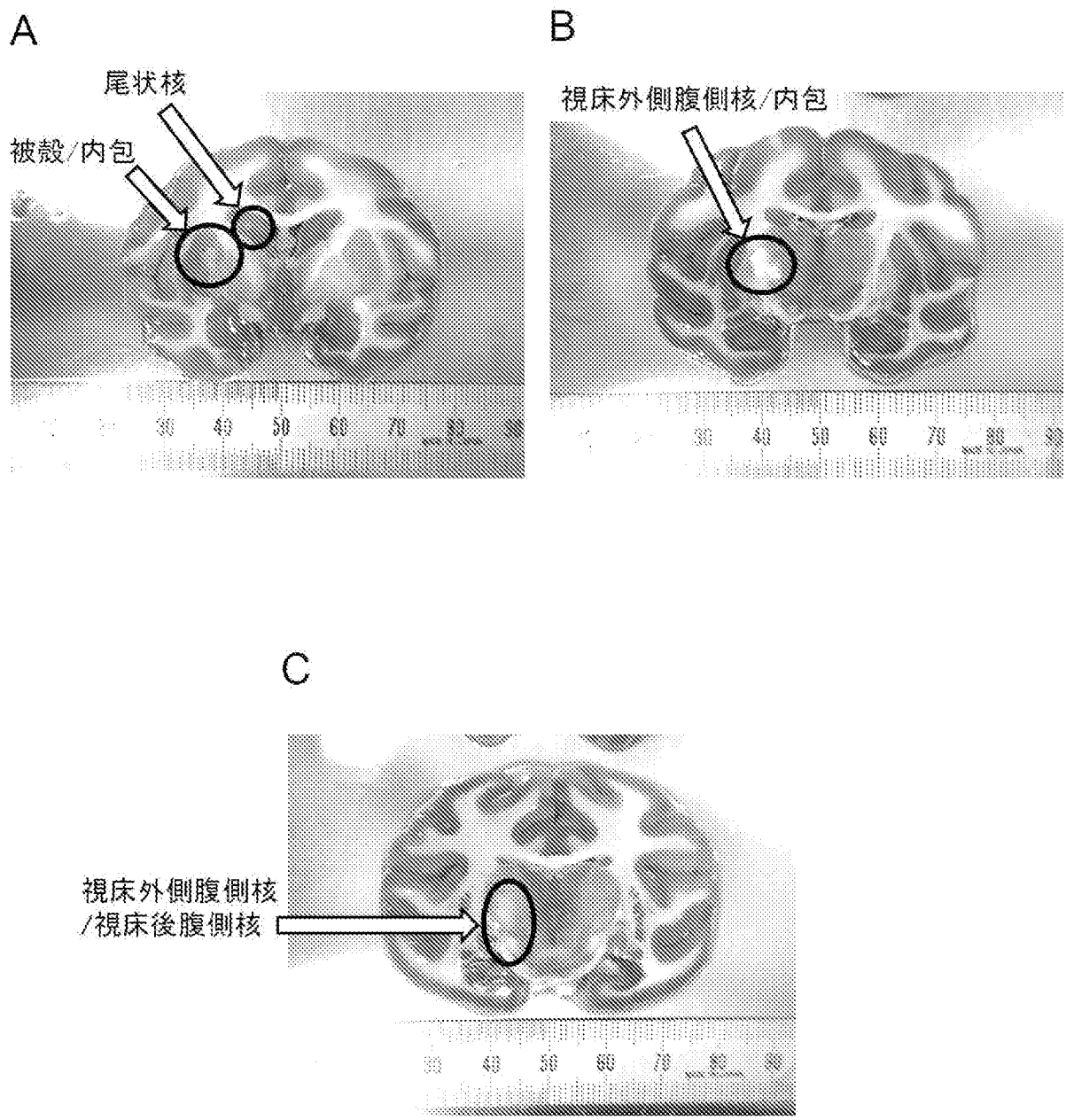
B



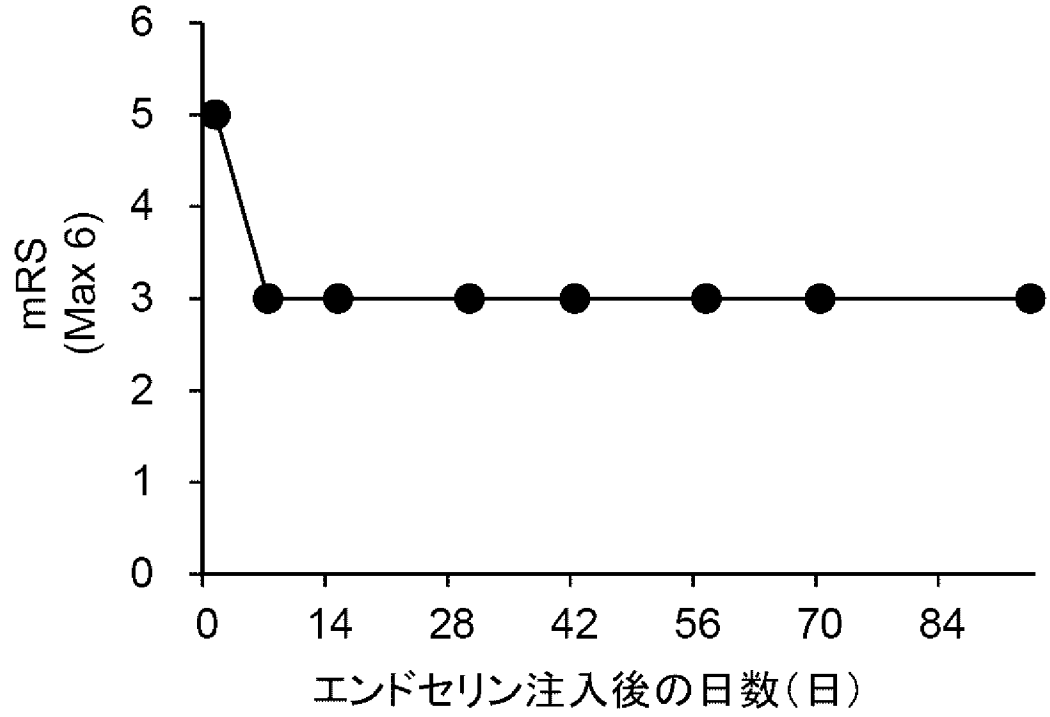
C



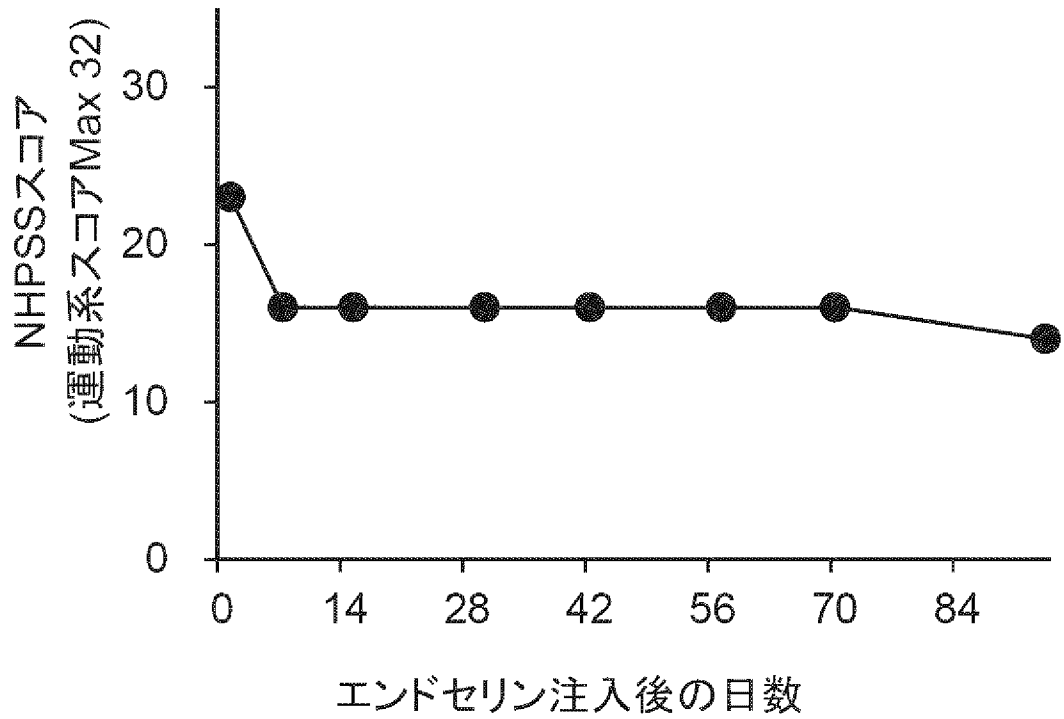
[図2]



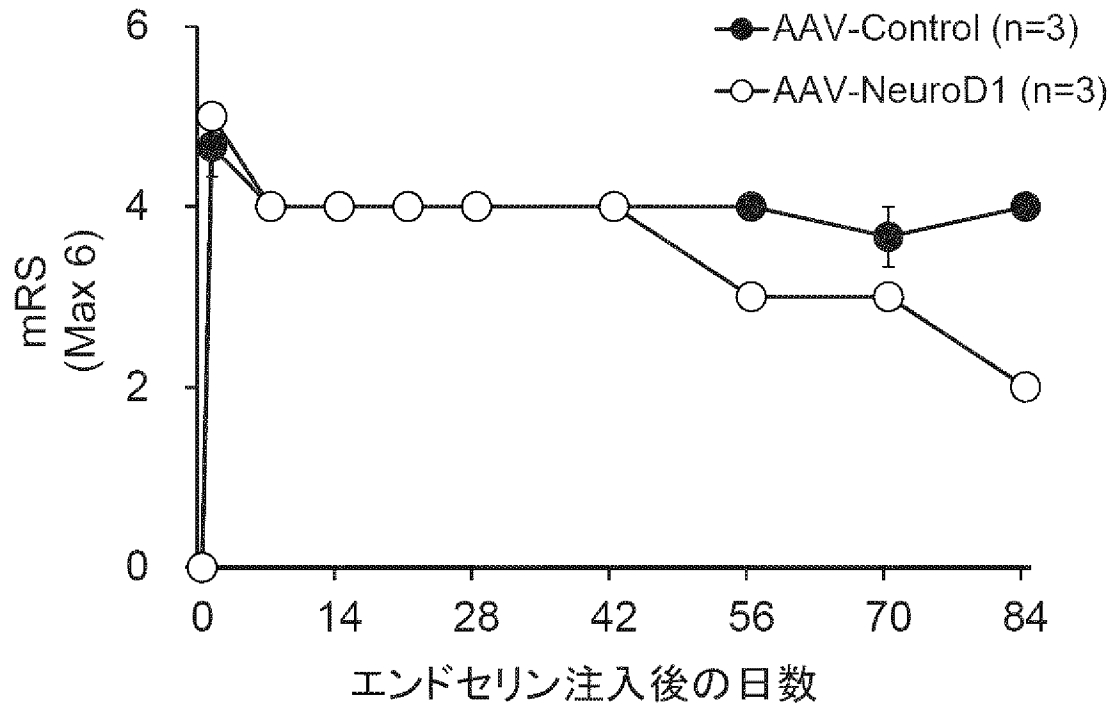
[図3]


mRS
(Max 6)
0
1
2
3
4
5
6
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数（日）

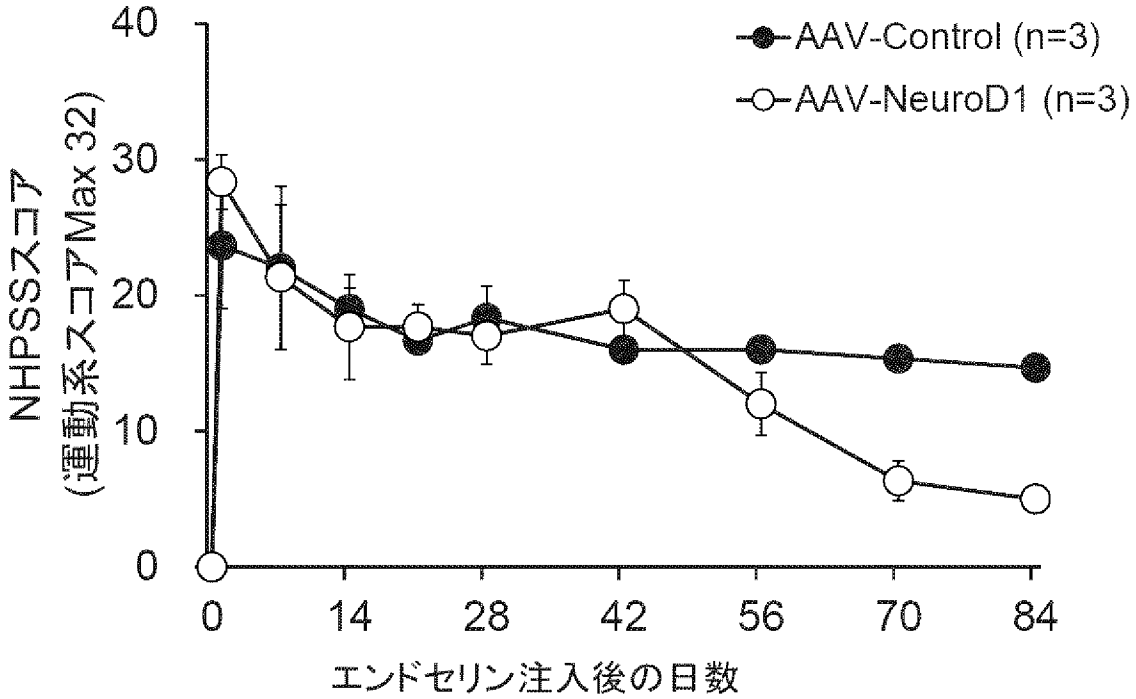
[図4]


NHPSSスコア
(運動系スコアMax 32)
0
10
20
30
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数

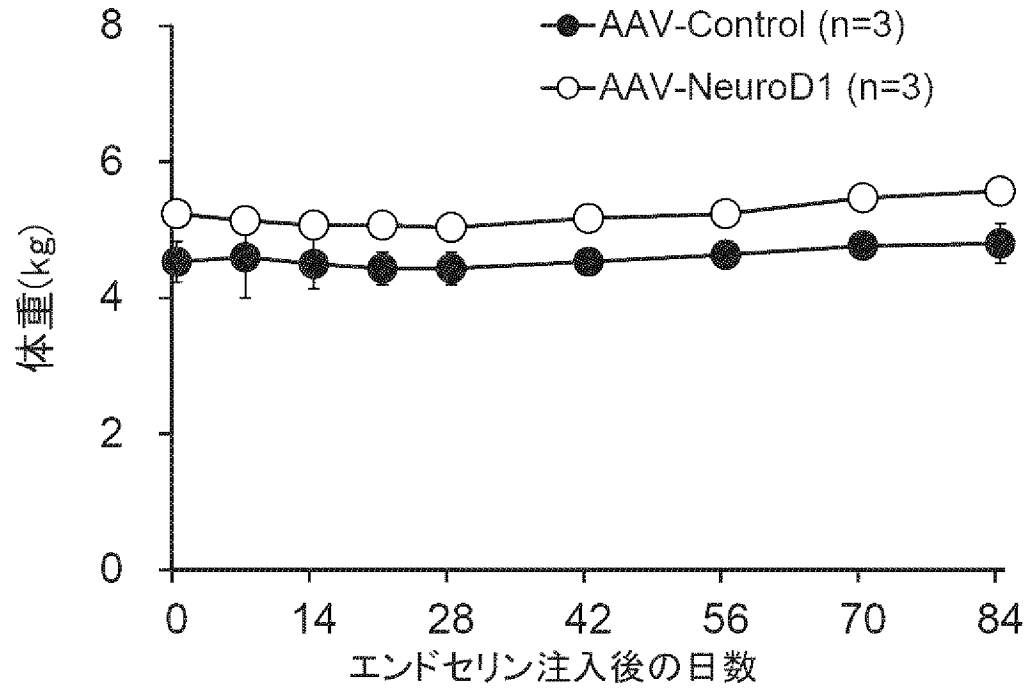
[図5]


AAV-Control (n=3)
AAV-NeuroD1 (n=3)
mRS
(Max 6)
0
2
4
6
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数

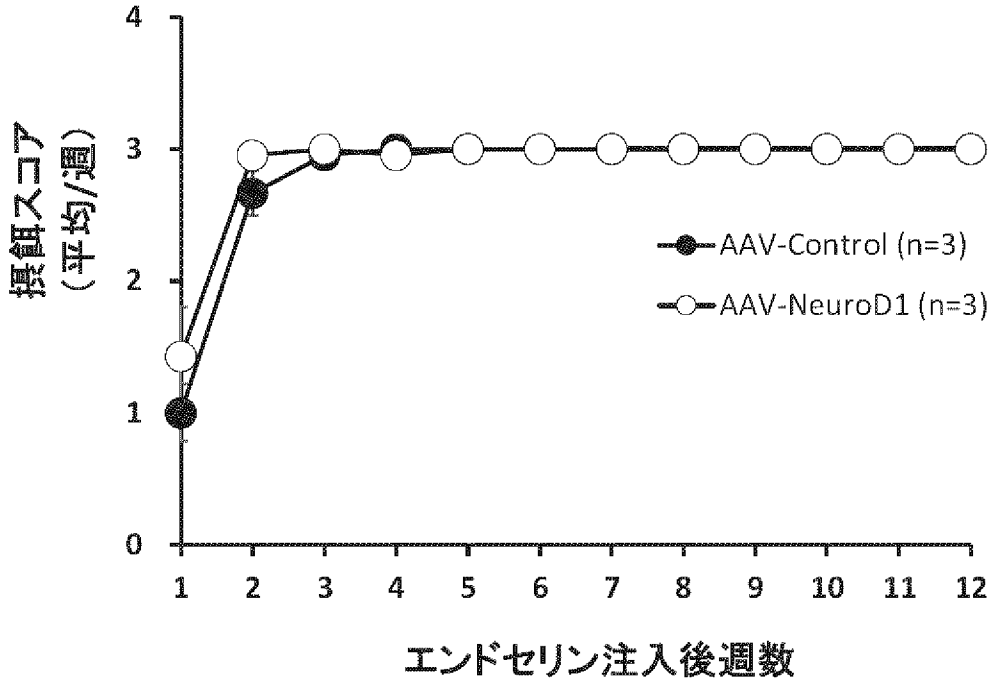
[図6]


AAV-Control (n=3)
AAV-NeuroD1 (n=3)
NHPSSスコア
(運動系スコアMax 32)
0
10
20
30
40
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数

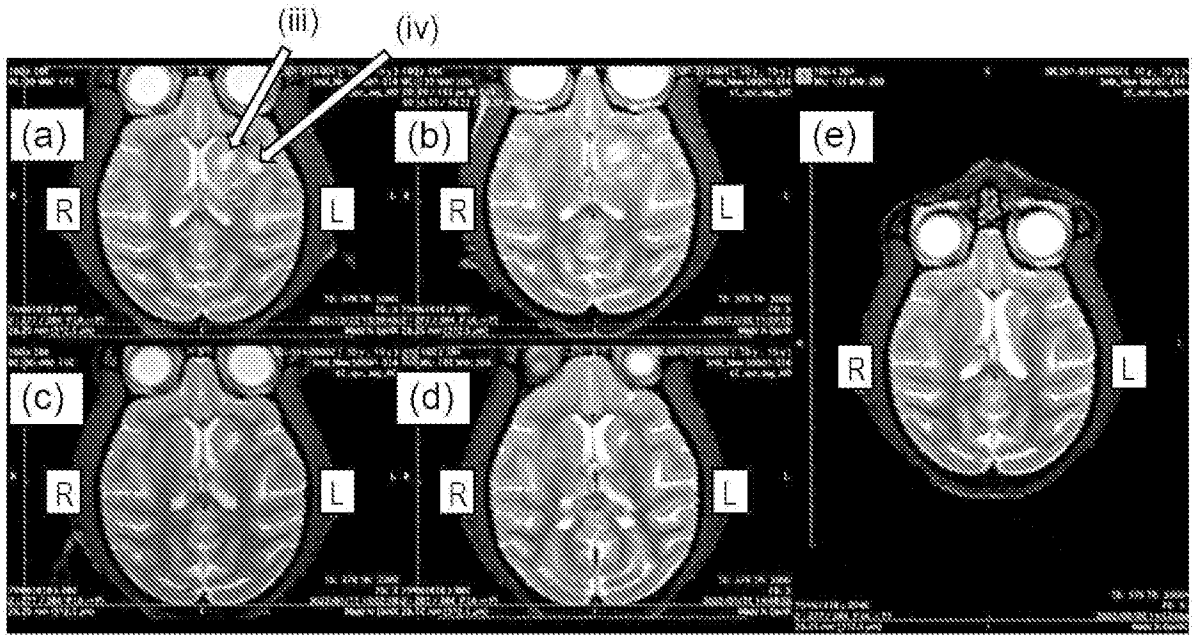
[図7]


AAV-Control (n=3)
AAV-NeuroD1 (n=3)
体重(kg)
8
6
4
2
0
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数

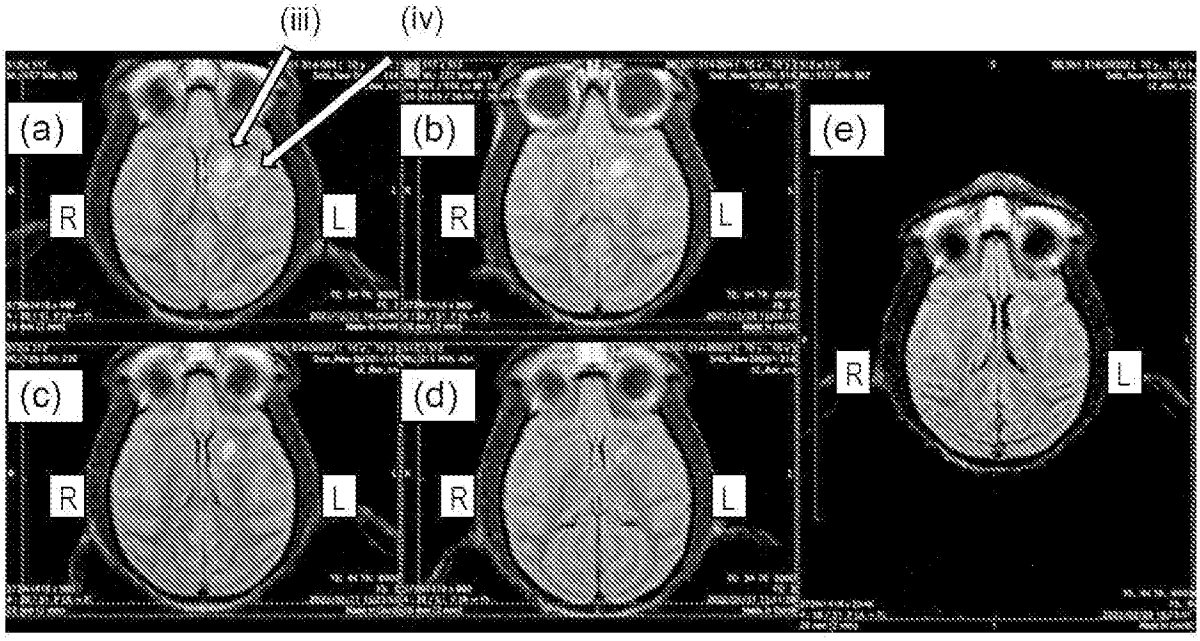
[図8]


摂餌スコア
(平均/週)
4
3
2
1
0
AAV-Control (n=3)
AAV-NeuroD1 (n=3)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
エンドセリン注入後週数

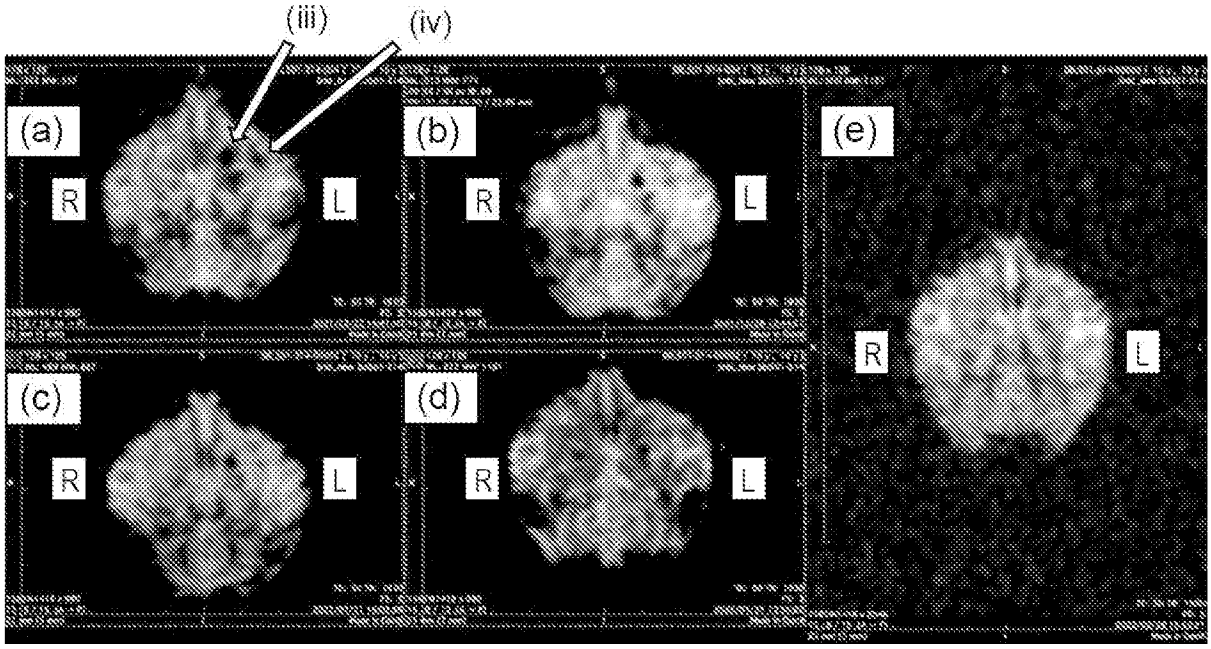
[図9A]



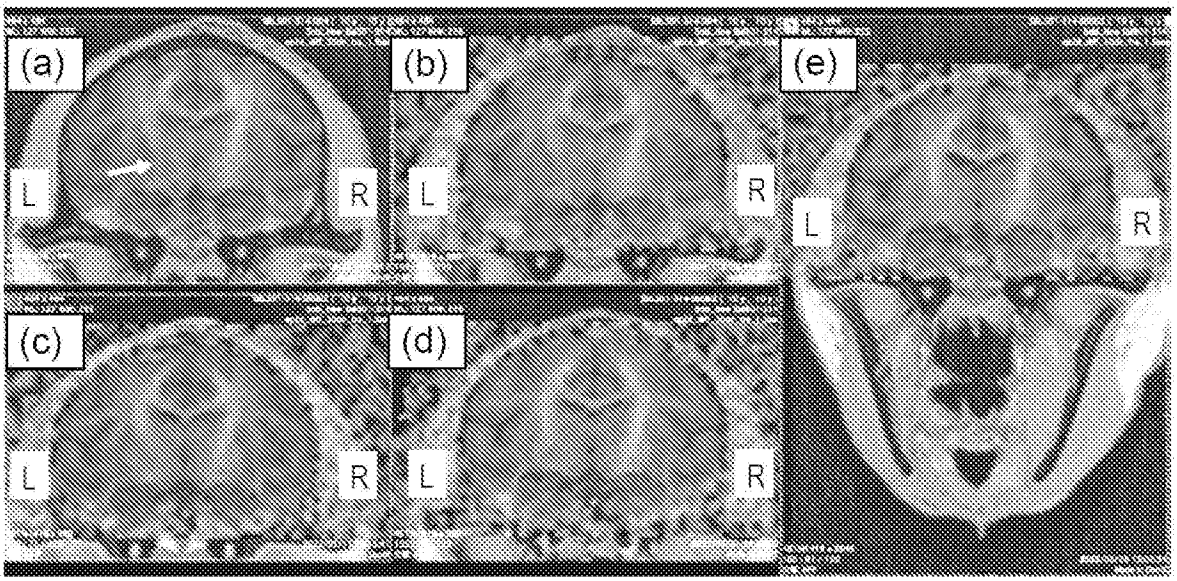
[図9B]



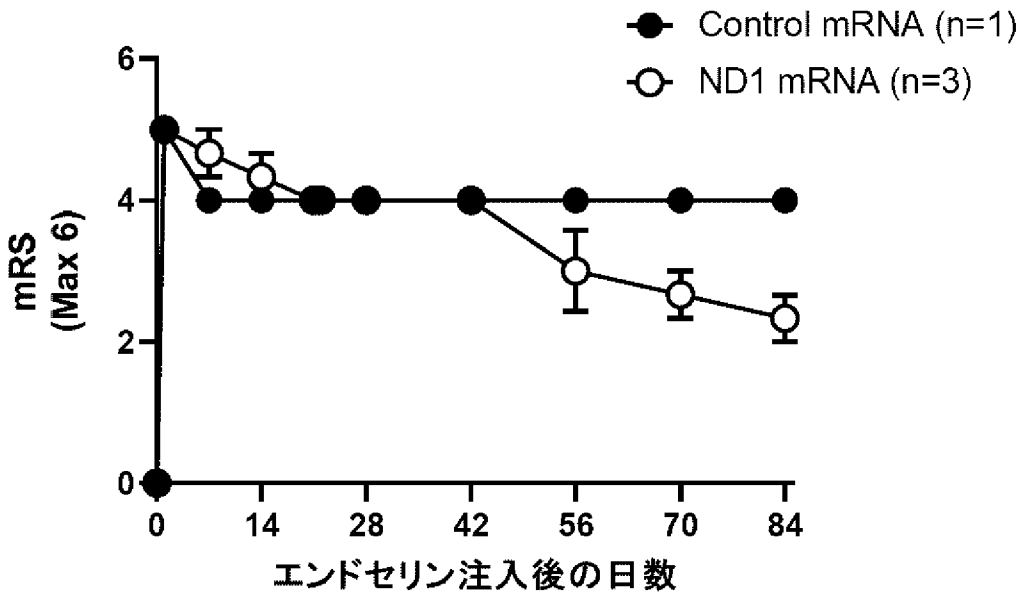
[図9C]



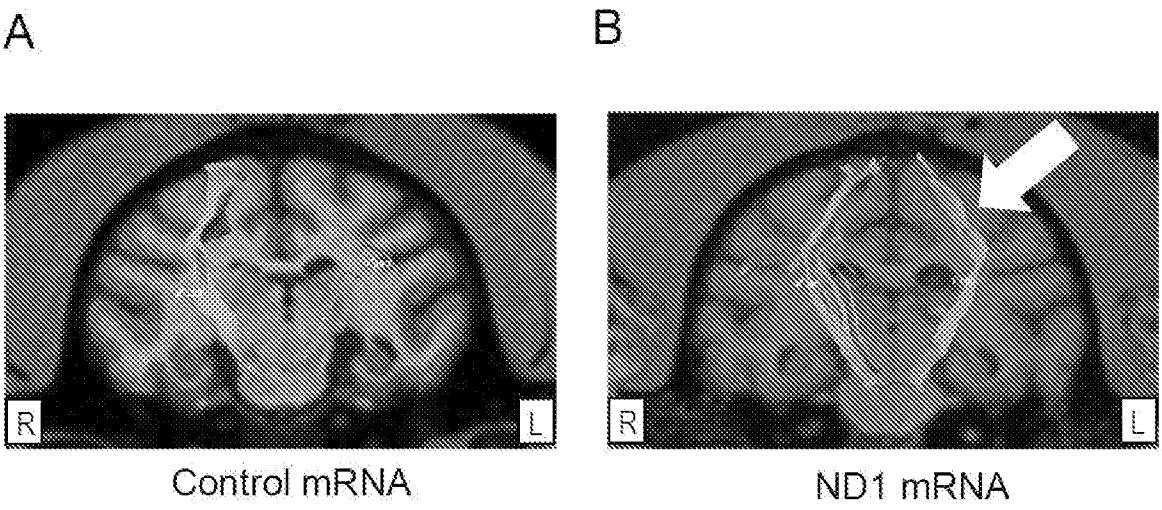
[図9D]

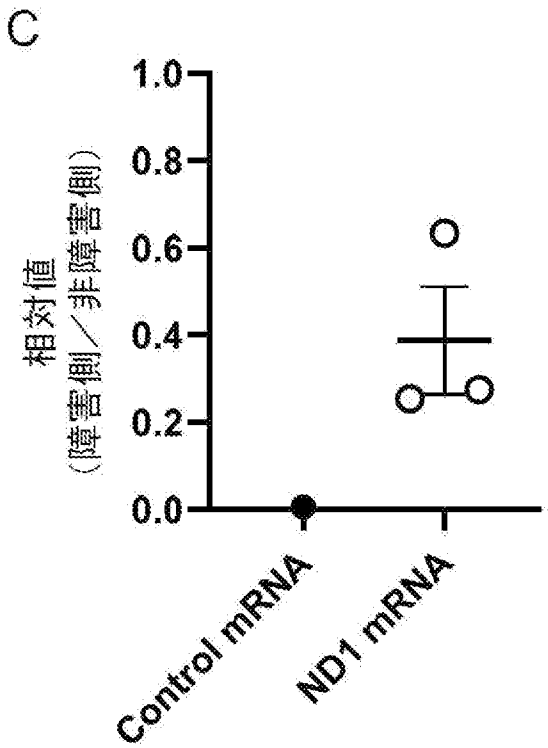


[図10]

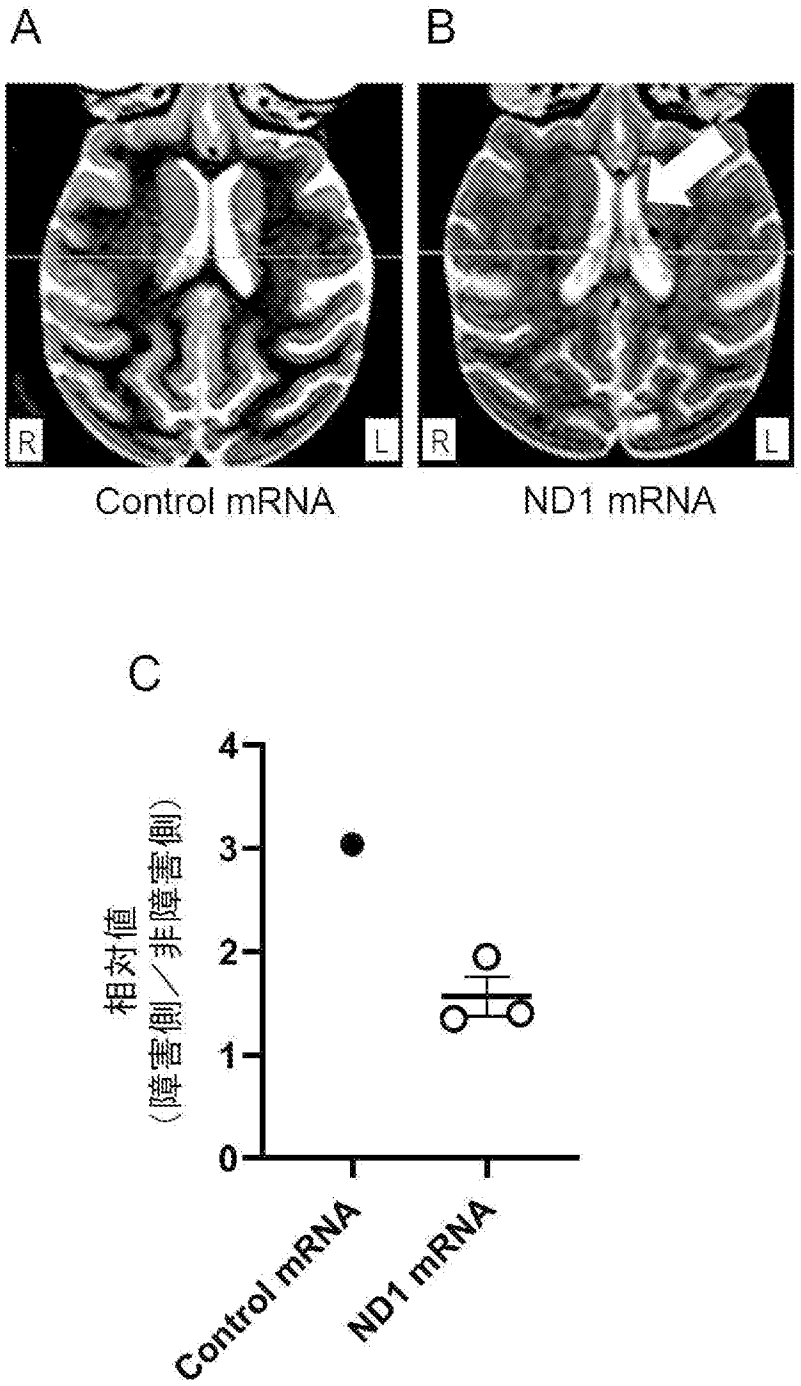

Control mRNA (n=1)
ND1 mRNA (n=3)
mRS
(Max 6)
6
4
2
0
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数

[図11]


A
B
R
L
R
L
Control mRNA
ND1 mRNA

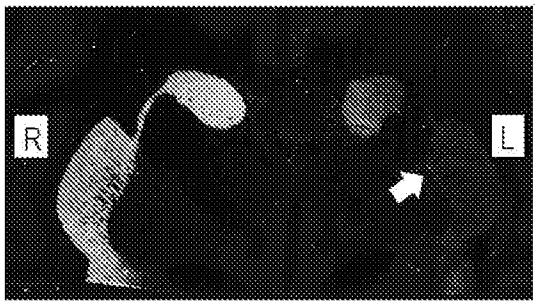

C
相対値
（障害側／非障害側）
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control mRNA
ND1 mRNA

[図12]


A
B
R
L
R
L
Control mRNA
ND1 mRNA
C
相対値
（障害側／非障害側）
4
3
2
1
0
Control mRNA
ND1 mRNA

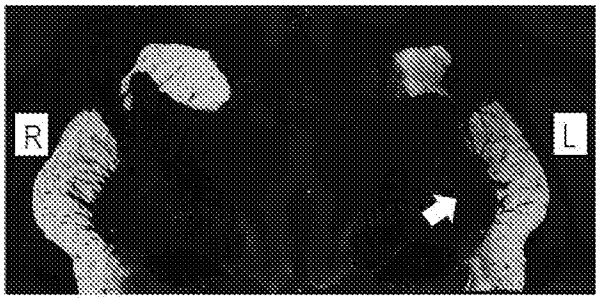
[図13]

A



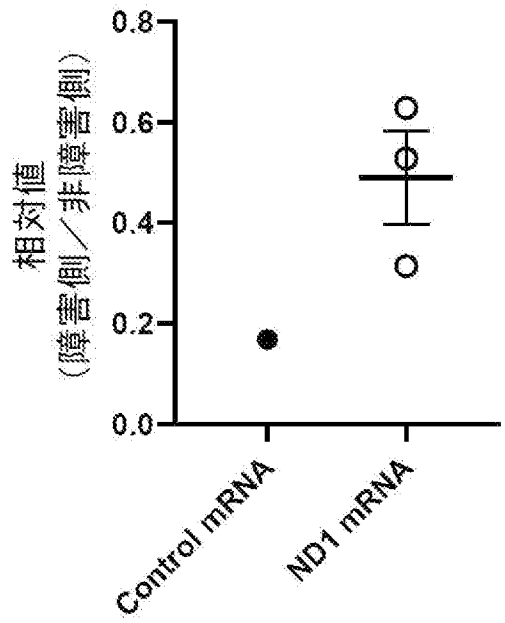
Control mRNA

B

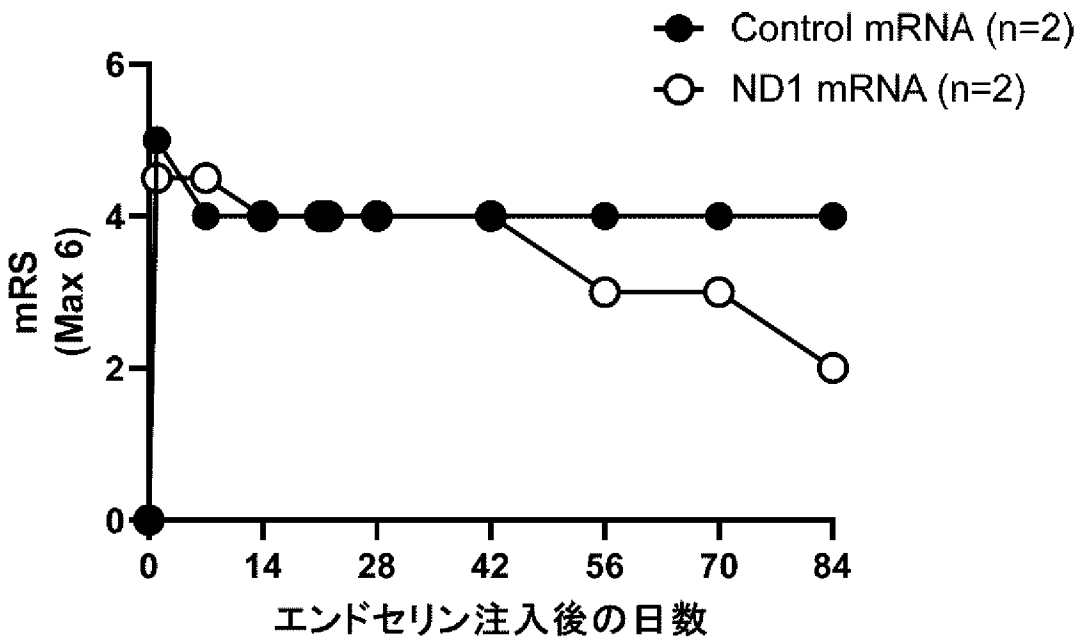


ND1 mRNA

C



[図14]


Control mRNA (n=2)
ND1 mRNA (n=2)
mRS
(Max 6)
6
4
2
0
0
14
28
42
56
70
84
エンドセリン注入後の日数

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027(2006.01)i; ***A61K 9/127***(2006.01)i; ***A61K 9/51***(2006.01)i; ***A61K 31/7088***(2006.01)i; ***A61K 35/76***(2015.01)i; ***A61K 38/17***(2006.01)i; ***A61K 47/34***(2017.01)i; ***A61K 47/44***(2017.01)i; ***A61K 48/00***(2006.01)i; ***A61P 9/00***(2006.01)i; ***A61P 9/10***(2006.01)i; ***A61P 25/00***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C07D 211/58***(2006.01)i; ***C07K 14/47***(2006.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i; ***C12N 15/864***(2006.01)i; ***C12N 15/867***(2006.01)i; ***C12Q 1/02***(2006.01)i; ***G01N 33/15***(2006.01)i; ***G01N 33/48***(2006.01)i

FI: A01K67/027 ZNA; A61K9/127; A61K9/51; A61K31/7088; A61K35/76; A61K38/17; A61K47/34; A61K47/44; A61K48/00; A61P9/00; A61P9/10; A61P25/00 ZNA; A61P43/00 105; C07D211/58 CSP; C07K14/47; C12N15/12; C12N15/864 100Z; C12N15/867 Z; C12Q1/02; G01N33/15 Z; G01N33/48 N

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)

A01K67/027; A61K9/127; A61K9/51; A61K31/7088; A61K35/76; A61K38/17; A61K47/34; A61K47/44; A61K48/00; A61P9/00; A61P9/10; A61P25/00; A61P43/00; C07D211/58; C07K14/47; C12N15/12; C12N15/864; C12N15/867; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/48

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2020-514328 A (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 21 May 2020 (2020-05-21) paragraphs [0005]-[0034], [0038]-[0049], [0183], example 1, claims	31-126
A		1-30
A	JP 2015-231338 A (THE NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 24 December 2015 (2015-12-24) entire text, all drawings	1-126

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August 2023	**12 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024127

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	室園美智博,他. 脳蘇生研究の進歩－脳虚血実験モデルを中心として－. 東京医科大学雑誌. May 2005, vol. 63, no. 3, pp. 204-211, (The Journal of Tokyo Medical University), non-official translation (MUROZONO, Michihiro et al. Progress in Brain Resuscitation Research: Focusing on Cerebral Ischemia Experimental Models.) entire text, all drawings	1-126
A	安部貴人,野川茂. 特集II 神経疾患の動物モデルをめぐって　脳梗塞の動物モデル. 神経内科. April 2014, vol. 80, no. 4, pp. 489-494, (Neurological Medicine), non-official translation (ABE, Takato, NOGAWA, Shigeru. Special Feature II: Towards Animal Models of Neurological Disorder. Animal Models of Cerebral Infarction.) entire text, all drawings	1-126

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/024127

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"Annex C/ST.25 text file format" should be read as "ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/024127

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2020-514328 A	21 May 2020	US 2020/0054711 A1 paragraphs [0005]-[0034], [0123]-[0137], [0286], example 1, claims WO 2018/160712 A1 EP 3589307 A1	
JP 2015-231338 A	24 December 2015	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024127

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A01K 67/027(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 9/51(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/44(2017.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07D 211/58(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i

FI: A01K67/027 ZNA; A61K9/127; A61K9/51; A61K31/7088; A61K35/76; A61K38/17; A61K47/34; A61K47/44; A61K48/00; A61P9/00; A61P9/10; A61P25/00 ZNA; A61P43/00 105; C07D211/58 CSP; C07K14/47; C12N15/12; C12N15/864 100Z; C12N15/867 Z; C12Q1/02; G01N33/15 Z; G01N33/48 N

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A01K67/027; A61K9/127; A61K9/51; A61K31/7088; A61K35/76; A61K38/17; A61K47/34; A61K47/44; A61K48/00; A61P9/00; A61P9/10; A61P25/00; A61P43/00; C07D211/58; C07K14/47; C12N15/12; C12N15/864; C12N15/867; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2020-514328 A (ザ　ペン　ステイト　リサーチ　ファウンデーション) 21.05.2020 (2020-05-21) [0005]-[0034], [0038]-[0049], [0183], 実施例1, 特許請求の範囲	31-126
A		1-30
A	JP 2015-231338 A (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 24.12.2015 (2015-12-24) 全文、全図	1-126

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
30.08.2023	12.09.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
太田　雄三 4N 3959
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	室園美智博，他，脳蘇生研究の進歩－脳虚血実験モデルを中心として－，東京医科大学雑誌，2005.05，Vol. 63，No. 3，pp. 204-211 全文、全図	1-126
A	安部貴人，野川茂，特集II 神経疾患の動物モデルをめぐって　脳梗塞の動物モデル，神経内科，2014.04，Vol. 80，No. 4，pp. 489-494 全文、全図	1-126

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/024127

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/024127

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2020-514328 A	21.05.2020	US 2020/0054711 A1 [0005]-[0034], [0123]-[0137], [0286], Example 1, Claims WO 2018/160712 A1 EP 3589307 A1	
JP 2015-231338 A	24.12.2015	（ファミリーなし）	