

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】平成28年2月4日(2016.2.4)

【公表番号】特表2015-500297(P2015-500297A)
 【公表日】平成27年1月5日(2015.1.5)
 【年通号数】公開・登録公報2015-001
 【出願番号】特願2014-546242(P2014-546242)
 【国際特許分類】

A 6 1 K 35/30 (2015.01)
 A 6 1 K 35/32 (2015.01)
 A 6 1 K 35/36 (2015.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/24 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 35/30
 A 6 1 K 35/32
 A 6 1 K 35/36
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/18
 A 6 1 P 25/24

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月11日(2015.12.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

欠陥のある海馬を特徴とする哺乳動物の状態の治療用医薬の製造における、海馬を再生させる、Nrp2⁺神経堤幹細胞またはその突然変異体もしくはバリエーションの使用。

【請求項2】

該Nrp2⁺神経堤幹細胞が、成体幹細胞である、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

該成体Nrp2⁺神経堤幹細胞が、歯の象牙質および毛包から単離される、請求項2に記載の使用。

【請求項4】

該状態が、脳の先天的な解剖学的異常または後天的脳傷害である、請求項1～3のいずれか1つに記載の使用。

【請求項5】

該後天的脳傷害が、頭部外傷、窒息、萎縮または発育不全が原因である、請求項4に記載の使用。

【請求項6】

該状態が、機能性ンパク質14-3-3 またはタンパク質14-3-3 /DISC1複合体形成のレベルの低下を特徴とする、請求項1～3のいずれか1つに記載の使用。

【請求項7】

該状態が、神経精神疾患状態である、請求項6に記載の使用。

【請求項 8】

該神経精神疾患状態が、統合失調症の一種以上の症状を特徴とする状態、統合失調症、統合失調症性人格障害、精神病、双極性障害、躁うつ病、感情障害、または統合失調症様障害または統合失調性感情障害、精神病性うつ病、自閉症、薬物誘発性精神病、せん妄、アルコール離脱症候群あるいは認知症性精神病を特徴とする状態である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

該哺乳動物が、ヒトである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の使用。

【請求項 10】

欠陥のある海馬を特徴とする状態を有する哺乳動物の治療に用いるための、Nrp2⁺神経堤幹細胞を含む単離された細胞集団。

【請求項 11】

該Nrp2⁺神経堤幹細胞が、成体幹細胞である、該請求項 10 に記載の単離された細胞集団。

【請求項 12】

該Nrp2⁺神経堤幹細胞が、歯の象牙質または毛包から単離される、請求項 11 に記載の単離された細胞集団。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

【図 1】14-3-3 欠損マウスは、異常な認知と行動特性を実証する。(a)オープンフィールド試験にて、14-3-3^{062-/-}マウス(白抜きパー; n=11)は、5~30週齢において、14-3-3^{062+/+}同腹子(黒塗りパー; n=11)よりも活発な探索行動をとった。(b)高架式迷路にて、14-3-3^{062-/-}マウス(白抜きパー; n=12)は、オープンアームで、14-3-3^{062+/+}マウス(黒塗りパー; n=12)よりも多い時間を費やした。(c)交差迷路逃避タスク試験にて、14-3-3^{062-/-}マウス(白丸; n=12)は、空間学習(第1~6日)および記憶(M1およびM2)の両方について、14-3-3^{062+/+}マウス(黒四角; n=12)より低い能力を有する。(d)14-3-3^{062+/+}マウス(黒塗りパー; n=11)と比較して、14-3-3^{062-/-}マウス(白抜きパー; n=11)は、70dBのベースラインならびに100ミリ秒の刺激間隔におけるプレパルス(PP)2、4、8および16 dBにより、より低いプレパルス抑性を示した。すべてのPP強度の平均も示す。雄性および雌性マウスからのデータは、すべてのグラフにプールされる。誤差は、平均±SEMである。*) p<0.05; **) p<0.01; ***) p<0.001。

【図 2】14-3-3 は、アンモンの角の錐体細胞および歯状回の顆粒ニューロンにおいて発現される。(a)(i)海馬の様々な領域を欠損している14.5 dpcのマウス胎児脳の冠状断面の略図。V、脳室; IZ、中間帯; VZ、脳室帯。(ii)P0マウス海馬の冠状断面の略図。海馬原基からのニューロンは、脳室神経上皮(ライトブルー)および海馬采に隣接する脳室神経上皮(ダークブルー)に由来する。アンモンの角およびその層(so、上昇層; sp、錐体細胞層; sl、透明層; sr、放線層)を構成するアンモン角の錐体ニューロンを含んでいる3つの部分体(CA1~3)を、歯状回(DG)中の顆粒状ニューロンの位置に関連して示す。(b)(i-ii)14.5 dpcの発生中の海馬の中間帯において、14-3-3 免疫活性を検出した。(iii-iv)P0にて、14-3-3 陽性ニューロンは、錐体細胞層に位置する。(v)錐体ニューロン(星印)のより拡大した図は、14-3-3 が、細胞質内で点状に局在していることを示す。(c)P0、P7および成体14-3-3^{062+/+}海馬における14-3-3 の内因性発現を示すX-gal染色である。高レベルの14-3-3 -lacZの発現は、錐体および顆粒ニューロンにおいて明らかである。(d)海馬ニューロンの培養。(i)EB1による14-3-3 染色(赤)。(ii)MAP2陽性海馬ニューロン(緑)。(iii)14-3-3 とMAP2の重ね合わせは、MAP2陽性神経突起における共発現を強調表示する(矢印)。(e)14-3-3 タンパク質(27 kDa)は、野生型マウスのアンモンの角および

歯状回において発現される。成体WTおよび14-3-3^{062-/-}マウスからの溶解液のウエスタンブロットを免疫ブロットし、抗体で14-3-3を探查した(EB1)。抗 β -アクチン(42 kDa)抗体をローディングコントロールとして用いた。スケールバー = 100 μ m(bi-iv; c; di-iii)、25 μ m(bv)。

【図3】14-3-3^{-/-}欠損マウスは、海馬の積層欠陥を示した。ニッスル染色は、14.5 dp cから出生後第56日(P56)までのWTおよび14-3-3^{062-/-}マウスの海馬発生を示す。海馬細胞は、14-3-3^{062-/-}マウスの錐体細胞層(sp)中に分散する(iv、vi、viii)。矢印は、放線層(sr)中の海馬錐体ニューロンの重複している層を強調表示する。星印は、上昇層(so)中に異所的に位置する錐体細胞を強調表示する。矢印は、歯状回中に漫然と配置された顆粒ニューロンを示す。(b)14-3-3⁰⁶²バックグラウンドに導入されたThy1-YFP導入遺伝子の発現は、14-3-3^{062-/-}マウスにおいて海馬錐体ニューロンの激しい無秩序を示した。青、DAPI; 緑、Thy1発現。(c)示した遺伝子型のP0(i-iv)およびP56(v-vi)マウスから得られた海馬の冠状切片である。WT海馬において、より深い錐体細胞層には、NeuN陽性錐体細胞が存在しており(黄、矢印)、CA1からCA3への均一な成熟ゾーンを形成する。14-3-3^{062-/-}海馬において、成熟ゾーンの均一性はより低く、CA3における錐体細胞層のより深いゾーン(黄の矢印)およびより表面のゾーン(白の矢印)の両方において、異所的に存在するいくつかのNeuN陽性成熟錐体細胞を有する。P56 14-3-3^{062-/-}マウスにおいて、NeuNに対する免疫染色は、重複したCA3サブフィールド中の錐体細胞を強調表示し、異所性細胞が成熟に達したことを示す(vi)。スケールバー: 100 μ m。

【図4】BrdU-パルス-チェイス分析は、14-3-3^{-/-}欠損マウスにおけるニューロン移動欠陥を示す。14.5dpc: P7(i-v)および16.5dpc: P7(vi-x)におけるBrdU-パルス-チェイス分析は、BrdU陽性細胞(黒)が、WT海馬のCA3サブフィールドの錐体細胞層(sp)内に位置することを実証する(iiおよびvii)。(v)グラフは、14.5dpc: P7における異所性海馬ニューロンのパーセンテージをまとめたものである。14-3-3^{062-/-}マウスのBrdU-標識細胞は、異所的に配置された。ニューロンは、上昇層(so)にとどめられるか、または錐体細胞層を越えて、透明層(sl)に移動した(ivおよびix)。(x)グラフは、16.5dpc: P7における異所性海馬ニューロンのパーセンテージをまとめたものである。スケールバー: 100 μ m

【図5】14-3-3^{-/-}欠損マウスにおける異常な苔状線維経路。14-3-3^{062+/+}(i, iii, vおよびvii)および14-3-3^{062-/-}(ii, iv, viおよびviii)マウスにおける錐体下(IPMF、黄矢印)および錐体上(SPMF、白矢印)苔状線維の通り道の軌道のカルピンジン免疫染色。WTコントロールと同様に、14-3-3^{062-/-}欠損神経突起は、歯状回(DG)から離れて移動(navigate)した後、最初、SPMFブランチおよびIPMFブランチへと二股に分かれる。しかしながら、14-3-3^{062-/-}マウスのIPMFブランチは、錐体細胞の細胞体(sp、白矢印)の間で異常に移動した。さらに、14-3-3^{062-/-}マウスの拡散したSPMFブランチは、CA3にある重複した錐体細胞層に侵入した。スケールバー = 100 μ m。

【図6】異所性CA3錐体細胞と経路を誤った苔状線維との間の機能的シナプス結合。(i-iv)シナプトフィジン(Syp)に対する抗体で染色したP56 14-3-3^{062+/+}マウスからの海馬切片は、IPMF(白矢印)およびSPMF(黄矢印)の両方において免疫反応性を示す。Syp染色は、CA3の錐体細胞体を取り囲んでいる上昇層(so)および透明層(sl)の両方にある。(v-viii)14-3-3^{062-/-}マウスからの海馬切片のSyp染色は、CA3の錐体細胞層内で異常に移動する苔状線維(星印、v、vii)が機能的シナプスを形成することを示す。(ix-xii)異所性成熟CA3錐体細胞(NeuNで染色; 星印で示す)は、経路を誤った苔状線維からのシナプスタンパク質(Syp、緑色)と連絡をとる。スケールバー = 100 μ m。(b)ゴルジ染色は、WTまたは14-3-3^{062-/-}成体マウス(P35)の錐体細胞の樹状樹枝状構造(dendritic arborization)を示す。経路を誤った苔状線維シナプス神経繊維末端(MFB、斜角線(bevelled line))との接触点を示す、とげのある突出物の1つのセットは、WTニューロンにおけるCA3錐体細胞の頂端近位樹状突起(apical proximal dendrites)上にある。とげのある突出物の2つのセットが、14-3-3^{062-/-}マウスの頂端樹状ツリー上において、一方は近位頂端樹状突起にあり、他方は遠位樹状ブランチ(*)にある。(c)模式図は、WT海馬と比較して、経路を誤った苔状線維の通り道および14-3-3^{062-/-}マウスの異所性CA3錐体細胞に連絡している苔状

線維神経繊維末端の異所性シナプス点を示す。

【図7】14-3-3 は、DISC1と相互作用して、神経発達をコントロールする。(a-b)P7マウス脳からの等量の溶解物を、抗DISC1抗体または抗14-3-3抗体で免疫沈降させ、DISC1(a)または14-3-3 を認識するEB1精製抗血清(b)で免疫プロットした。共免疫沈降に用いるための総細胞溶解物(インプット)の5%からのDISC1イソ型および14-3-3 の相対的発現レベルも、直接免疫プロット法によって決定した。矢印は、DISC1の主な100kDaおよび75kDaバンド(a)および14-3-3 を表す27kDaバンド(b)を示す。星印は、免疫沈降からのバックグラウンドIgGバンドを表す。(c)ニューロン移動および軸索成長における14-3-3 の役割を示す模式図である。(i)14-3-3 は、CDK5リン酸化Ndel1を結合させて、LIS1との相互作用を促進し、それによってニューロン移動を促進する。(ii)14-3-3 は、LIS1/Ndel1/DISC1複合体にも存在して、軸索成長動力学をコントロールする。

【図8】14-3-3 遺伝子の遺伝子トラップ突然変異。(a)14-3-3 ^{Gt(OST062)Lex}マウス株のためおよび(b)マウス株14-3-3 ^{Gt(OST390)Lex}のための挿入点を示す模式図である。遺伝子トラップベクターは、それによって内因性14-3-3 プロモーター下で発現される選択可能なマーカー遺伝子(0ガラクトシダーゼ/ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合遺伝子のためのBGEO)に融合したスプライスアクセプター配列(SA)を含む。14-3-3 の上流エクソンに組み込まれた場合、BGEOは、mRNA転写を妨げる融合転写物を生成する。ベクターは、PGKプロモーターに続いて、スプライスドナー(SD)シグナルの上流にブルトン型チロシンキナーゼ遺伝子(BTK)の第一エクソンも含む。BTKは、融合転写物の下流の翻訳を妨げるために、すべての読み取り枠に終止コドンを含む。遺伝子トラップベクターは、レトロウイルス体において、2つの長い末端反復(LTR)の間に示される。両方の図において、矢印は、遺伝子型決定に用いたプライマーを示す。赤ボックスは、非コーディング非翻訳配列を示し、緑ボックスは、コーディング配列を示す。

【図9】ウエスタンブロット分析は、14-3-3 発現が、突然変異マウスの全ての組織において減少することを実証する：(a)雄性および雌性の、14-3-3 ^{062-/-}および年齢をマッチさせた14-3-3 ^{062+/+}マウス、ならびに(b)雄性および雌性の、14-3-3 ^{390-/-}および年齢をマッチさせた14-3-3 ^{390+/+}マウスから組織を採集した。材料および方法において記載したように、プロテアーゼインヒビターを含むNP40溶解緩衝液中ですべてのサンプルをホモジナイズした。ピアスBCAプロテインアッセイキットを用いてタンパク質濃度を決定し、レーン毎に10 μgのタンパク質をロードした。プロットをEB-1抗体でプローブして、14-3-3 を検出し、ローディングコントロールとして抗-アクチン(1:5000)を用いた。結合した抗体を、HRP-複合二次抗体(1:20,000、Pierce-Thermo Scientific)で検出した。ECLによって免疫反応性タンパク質を視覚化した。EB1抗体が、14-3-3 以外の14-3-3イソ型を検出できることに留意。

【図10】14-3-3イソ型のmRNAレベルは、14-3-3 欠損マウス脳において一定のままである：すべての14-3-3イソ型の転写物レベルは、14-3-3 ^{062-/-}マウス由来の脳組織において、14-3-3 イソ型の欠失に応答して変化することはない。3匹の14-3-3 ^{062-/-}マウスおよび3匹の年齢をマッチさせた14-3-3 ^{062+/+}コントロールの全脳からRNAを単離した。Quantitect kit(Qiagen)を用いて、1 μgのRNAから相補的DNA(cDNA)を生成した。Sybr Green(Qiagen)およびRotor Geneマシーン(Corbett)を用いるリアルタイムPCRを用いて、14-3-3のすべてのイソ型のサンプル中のGAPDHと比較して、mRNAのレベルを決定した。

【図11】14-3-3 欠損マウスは、学習および記憶において認知機能障害を示す。クロス迷路逃避タスク試験において、14-3-3 ^{062-/-}マウス(白丸; n=12)は、空間学習(第1-6日)および記憶の両方について、14-3-3 ^{062+/+}マウス(黒四角; n=12)よりも能力が低い。14-3-3 ^{062-/-}マウスは、トレーニング期間を通して、および記憶試験期間(M1およびM2)中に、逃避プラットフォームに到達するのにより長い時間がかかる。雄性および雌性マウスからのデータをプールする。誤差バーは、平均±SEMとして現す。*、p<0.05; **、p<0.01; ***、p<0.001。

【図12】14-3-3 欠損マウスは、驚愕反射の低下を示す。14-3-3 ^{062-/-}マウスの驚愕振幅(白抜きバー; n=13)は、4つの115 dBのパルス単独ブロックを通して、14-3-3 ^{062+/+}

$2^{+}/+$ マウス(黒塗りバー ; n = 14)よりも低い。すべてのブロックからの平均驚愕(Avg)も示す。**、 < 0.05。

【図13】14-3-3 発現は、海馬ニューロンにおいて維持される。X-gal染色は、P0およびP7の14-3-3 $^{062+/-}$ 海馬および小脳における、14-3-3 の内因性発現を示す。海馬における高レベルの14-3-3 $^{-}$ -lacZ発現は、アンモンの角の錐体ニューロンおよび成熟歯状回ニューロンの両方において明らかであるが、誕生後の小脳においては明らかでない。スケールバー = 25 μ m。

【図14】、14-3-3 欠損マウスにおける海馬の層状構造の欠如。ニッスル染色は、14.5 dpcから誕生(P0)までのWT(i, iii, v)および14-3-3 $^{062-/-}$ (ii, iv, vi)マウスの海馬発生を示す。海馬細胞は、14-3-3 $^{062-/-}$ マウスの錐体細胞層(sp)において分散された。矢印は、放線層(sr)の海馬錐体ニューロン重複した層を強調表示する。星印は、上昇層(so)において異所的に配置された錐体細胞を強調表示する。スケールバー = 25 μ m。

【図15】14-3-3 欠損マウスの誤って配置されたニューロンは、成体期まで生存する。海馬原基(a-f)および成熟海馬(g-h)におけるアポトーシス細胞。14-3-3 $^{-/-}$ 海馬では、分裂したアポトーシス細胞核の増加は検出されなかった(aiiおよびbii中の緑のTUNEL陽性細胞において示される)。スケールバー = 100 μ m。

【図16】末梢神経系の発生中、Nrp1陽性神経幹細胞は、交感神経系および副腎のクロム親和細胞(c)、ニューロン(n)およびグリア(g)を形成する。対照的に、Nrp2陽性神経幹細胞は、感覚神経系のニューロンおよびグリアを形成する。我々は、Nrp1プロモーター(Nrp1 : Cre/RFP)からCreおよび赤色蛍光タンパク質を発現しているトランスジェニックマウスモデル、またはNrp2プロモーター(Nrp2 : Cre/GFP)からCreおよび緑色蛍光タンパク質を発現しているトランスジェニックマウスモデルを創り出した。これらのマウスは、各亜集団を精製するのに用いることができる、Nrp1およびNrp2陽性神経幹細胞のスペクトル分離を促進する。

【図17】Nrp2 : ベータガラクトシダーゼに対して染色したCre/GFPマウス由来のP0マウス脳の冠状切片。(A)中の枠囲み領域の拡大図である(B)は、海馬(h)のアンモン角(CA1-3)錐体ニューロンおよび歯状回(DG)顆粒ニューロンが、Nrp2発現神経幹細胞から誘導されることを実証する。Nrp2は、脳室帯(VZ)中の神経幹細胞においても発現される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

材料および方法

マウス : Geoレポーター遺伝子を含む遺伝子トラップ構築物を有する14-3-3 $^{Gt(OST062)}$ Lexおよび14-3-3 $^{Gt(OST390)}$ Lex突然変異マウスは、それぞれ、Lexicon Genetics ES細胞株であるOST062およびOST390に由来した。14-3-3 $^{Gt(OST062)}$ Lexマウス中の遺伝子トラップベクターは、14-3-3 の第一イントロンに挿入されたが、14-3-3 $^{Gt(OST390)}$ Lexマウス中の遺伝子トラップベクターは、14-3-3 の第二イントロンに挿入された。ES細胞株を増殖させ、SV129胚盤胞に注入した。得られる生殖細胞系伝達オスは、SV129バックグラウンドに維持するか、または6世代にわたってC57/Bl6およびBA1,BCバックグラウンドに戻し交配した。qRT-PCRおよび全組織サンプルからのウエスタンブロットを用いて、これらのマウス株における遺伝子の完全KOを確認した。ゲノムテールDNAのPCR増幅によって14-3-3C遺伝子型を決定した。WT対立遺伝子は、288 bp(14-3-3 $^{Gt(OST062)}$ Lex)または445 bp(14-3-3 $^{Gt(OST390)}$ Lex)のバンドを増幅させ、突然変異遺伝子トラップされた対立遺伝子は、165 bp(14-3-3 $^{Gt(OST062)}$ Lex)または203 bp(14-3-3 $^{Gt(OST390)}$ Lex)のバンドを増幅させた。マウスを、WT同腹子と表現型的に区別できないヘテロ接合つがいとして維持した。Institute of Medical and Veterinary Sciencesの動物倫理委員会およびアデレード大学のガイドラインにしたがって、動物実験を行った。