

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7555542号
(P7555542)

(45)発行日 令和6年9月25日(2024.9.25)

(24)登録日 令和6年9月13日(2024.9.13)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395 D
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	25/18 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
請求項の数 35 (全61頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-570726(P2020-570726)	(73)特許権者	507245021
(86)(22)出願日	令和1年6月18日(2019.6.18)		ユニバーシティ オブ ロチェスター
(65)公表番号	特表2021-529169(P2021-529169 A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 4 6 4
(43)公表日	令和3年10月28日(2021.10.28)		2, ロチェスター, エルムウッド ア
(86)国際出願番号	PCT/US2019/037754		ベニュー 6 0 1, ボックス ユーアー
(87)国際公開番号	WO2019/246112	(73)特許権者	520349056
(87)国際公開日	令和1年12月26日(2019.12.26)		ユニバーシティ・オブ・コペンハーゲン
審査請求日	令和4年5月11日(2022.5.11)		デンマーク王国 ディーケー-1 1 6 5
(31)優先権主張番号	62/686,346		コペンハーゲン ケイ ノレガデ 1 0
(32)優先日	平成30年6月18日(2018.6.18)	(74)代理人	100102978
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 清水 初志
前置審査		(74)代理人	100205707
			弁理士 小寺 秀紀
		(74)代理人	100160923
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 統合失調症及び他の神経精神障害の治療方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

グリア細胞によるK⁺取り込みを回復させるのに有効な条件下でグリア細胞におけるR E S T発現を阻害するかまたは低下させる、R E 1ーサイレンシング転写因子(R E S T)阻害物質を含む、K⁺取り込み障害を有するグリア細胞においてK⁺取り込みを回復させるための治療用組成物であって、
該R E S T阻害物質が、(i) R E S Tアンチセンスオリゴヌクレオチド、R E S T s h R N A、R E S T s i R N A、及びR E S T R N Aアプタマーから成る群から選択される阻害性核酸分子であるか、または(ii) 抗R E S T抗体もしくはその抗原結合断片であり、かつ
グリア細胞送達のために製剤化される、治療用組成物。

【請求項2】

前記グリア細胞がグリア前駆細胞である、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項3】

グリア前駆細胞の星状細胞分化を回復させる、請求項2に記載の治療用組成物。

【請求項4】

前記グリア細胞が星状細胞である、請求項1に記載の治療用組成物。

【請求項5】

K⁺取り込み障害を有する前記グリア細胞が、神経精神障害を有する対象のグリア細胞である、請求項1～4のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 6】

前記神経精神障害が統合失調症である、請求項 5 に記載の治療用組成物。

【請求項 7】

対象におけるグリア細胞による K^+ 取り込みを回復させるのに有効な条件下でグリア細胞における REST 発現を阻害するかまたは低下させる、REST-サイレンシング転写因子 (REST) 阻害物質を含む、グリア細胞 K^+ 取り込み障害を有する対象においてグリア細胞 K^+ 取り込みを回復させるための治療用組成物であって、
該 REST 阻害物質が、(i) REST アンチセンスオリゴヌクレオチド、REST shRNA、REST siRNA、及び REST RNA アプタマーから成る群から選択される阻害性核酸分子であるか、または(ii) 抗 REST 抗体もしくはその抗原結合断片であり、かつ
グリア細胞送達のために製剤化される、治療用組成物。

10

【請求項 8】

前記グリア細胞がグリア前駆細胞である、請求項 7 に記載の治療用組成物。

【請求項 9】

前記対象におけるグリア前駆細胞の星状細胞分化を回復させるのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 8 に記載の治療用組成物。

【請求項 10】

前記グリア細胞が星状細胞である、請求項 7 に記載の治療用組成物。

【請求項 11】

星状細胞 K^+ 恒常性を回復させるのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 10 に記載の治療用組成物。

20

【請求項 12】

前記 REST 阻害物質が送達ビヒクル中にパッケージされている、請求項 7 ～ 11 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 13】

前記送達ビヒクルがナノ粒子である、請求項 12 に記載の治療用組成物。

【請求項 14】

前記送達ビヒクルが、グリア細胞を標的とする部分を含む、請求項 12 または 13 に記載の治療用組成物。

30

【請求項 15】

前記対象が、神経精神障害を有する、または神経精神障害のリスクを有する、請求項 7 ～ 14 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 16】

前記神経精神障害が、統合失調症、自閉症スペクトラム症、及び双極性障害から成る群から選択される、請求項 15 に記載の治療用組成物。

【請求項 17】

前記神経精神障害が統合失調症である、請求項 16 に記載の治療用組成物。

【請求項 18】

前記対象においてニューロンの興奮性を減らすのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 7 ～ 17 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

40

【請求項 19】

前記対象において発作発生を減らすのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 7 ～ 18 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 20】

前記対象における認知障害を改善するのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 7 ～ 19 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 21】

脳内送達を用いた、髄腔内送達を用いた、鼻腔内送達を用いた、または脳室への直接注入を介した投与用である、請求項 7 ～ 20 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

50

【請求項 2 2】

前記対象がヒトである、請求項 7 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 2 3】

前記 R E S T 阻害物質が、グリア細胞を標的とする R E S T 阻害物質である、請求項 7 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 2 4】

グリア細胞における R E S T 発現を阻害するかまたは低下させる、R E S T 阻害物質を含む、神経精神障害を有する対象において神経精神障害を治療するまたはその発症を抑制するための治療用組成物であって、

該 R E S T 阻害物質が、(i) R E S T アンチセンスオリゴヌクレオチド、R E S T s h R N A、R E S T s i R N A、及び R E S T R N A アプタマーから成る群から選択される阻害性核酸分子であるか、または(ii) 抗 R E S T 抗体もしくはその抗原結合断片であり、かつ

グリア細胞送達のために製剤化される、治療用組成物。

【請求項 2 5】

前記 R E S T 阻害物質が送達ビヒクル中にパッケージされている、請求項 2 4 に記載の治療用組成物。

【請求項 2 6】

前記送達ビヒクルがナノ粒子である、請求項 2 5 に記載の治療用組成物。

【請求項 2 7】

前記送達ビヒクルが、グリア細胞を標的とする部分を含む、請求項 2 5 または 2 6 に記載の治療用組成物。

【請求項 2 8】

前記神経精神障害が、統合失調症、自閉症スペクトラム症、及び双極性障害から成る群から選択される、請求項 2 4 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 2 9】

前記神経精神障害が統合失調症である、請求項 2 8 に記載の治療用組成物。

【請求項 3 0】

前記対象においてニューロンの興奮性を減らすのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 2 4 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 3 1】

前記対象において発作発生を減らすのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 2 4 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 3 2】

前記対象において認知障害を改善するのに有効な条件下で投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 2 4 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 3 3】

脳内送達を用いた、髄腔内送達を用いた、鼻腔内送達を用いた、または脳室への直接注入を介した投与用である、請求項 2 4 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 3 4】

前記対象がヒトである、請求項 2 4 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 3 5】

前記 R E S T 阻害物質が、グリア細胞を標的とする R E S T 阻害物質である、請求項 2 4 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は 2 0 1 8 年 6 月 1 8 日に出席された米国仮特許出願第 6 2 / 6 8 6 , 3 4 6 号の利益を主張するものであり、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

本発明は国立衛生研究所によって授与されたR01MH099578のもとで基づく政府の支援により行われた。米国政府は本発明において特定の権利を有する。

【0003】

分野

本開示は、 K^+ 取り込み障害を有するグリア細胞においてグリア細胞カリウム (K^+) 取り込みを回復させる方法に関する。これらの方法は神経精神状態に苦しむ対象を治療するのに好適である。

【背景技術】

【0004】

背景

統合失調症は、妄想的思考、幻聴、及び認知障害を特徴とする精神障害であり、世界中の人口のおおまかに1%を冒すが、まだ十分に理解されていないままである (Allen et al., "Systematic Meta-Analyses and Field Synopsis of Genetic Association Studies in Schizophrenia: The SzGene Database," Nature Genetics, 40:827-834 (2008) (非特許文献1); Sawa及びSnyder, "Schizophrenia: Diverse Approaches to a Complex Disease," Science, 296:692-695 (2002) (非特許文献2))。過去10年間で、多数の統合失調症関連遺伝子がグリア細胞の発達と生理に関与していることが明らかになっている (Yin et al., "Synaptic Dysfunction in Schizophrenia," Adv. Exp. Med. Biol. 970:493-516 (2012) (非特許文献3))。したがって、星状細胞及び希突起膠細胞の双方の機能障害が統合失調症の病因に関係している。特に星状細胞は、神経回路網の構造発達ならびに神経回路活動の調整の双方で必須の役割を有し、後者はグリア伝達物質の放出、シナプス密度の維持、及びシナプスのカリウムと神経伝達物質のレベルの調節を介する (Christopherson et al., "Thrombospondins are Astrocyte-Secreted Proteins That Promote CNS Synaptogenesis", Cell, 120:421-433 (2005) (非特許文献4); Chung et al., "Astrocytes Mediate Synapse Elimination Through MEGF10 and MERTK Pathways", Nature, 504:394-400 (2013) (非特許文献5); 及びThrane et al., "Ammonia Triggers Neuronal Disinhibition and Seizures by Impairing Astrocyte Potassium Buffering", Nat. Med. 19:1643-1648 (2013) (非特許文献6))。しかしながら、統合失調症のような神経精神障害の発症において星状細胞の機能障害が担う役割は不明である。本開示は、当該技術分野におけるこの欠陥及び他の欠陥を克服することを目的とする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】 Allen et al., "Systematic Meta-Analyses and Field Synopsis of Genetic Association Studies in Schizophrenia: The SzGene Database," Nature Genetics, 40:827-834 (2008)

【文献】 Sawa及びSnyder, "Schizophrenia: Diverse Approaches to a Complex Disease," Science, 296:692-695 (2002)

【文献】 Yin et al., "Synaptic Dysfunction in Schizophrenia," Adv. Exp. Med. Biol. 970:493-516

10

20

30

40

50

(2012)

【文献】Christopherson et al., "Thrombospondins are Astrocyte-Secreted Proteins That Promote CNS Synaptogenesis", Cell, 120:421-433 (2005)

【文献】Chung et al., "Astrocytes Mediate Synapse Elimination Through MEGF10 and MERTK Pathways", Nature, 504:394-400 (2013)

【文献】Thrane et al., "Ammonia Triggers Neuronal Disinhibition and Seizures by Impairing Astrocyte Potassium Buffering", Nat. Med. 19:1643-1648 (2013)

【発明の概要】

【0006】

概要

本開示の第1の態様は、グリア細胞による K^+ 取り込みを回復させる方法に関するものであり、ここで、前記グリア細胞は K^+ 取り込み障害を有する。この方法は、 K^+ 取り込み障害を有するグリア細胞に、前記グリア細胞による K^+ 取り込みを回復させるのに有効な条件下でRE1サイレンシング転写因子(REST)の阻害物質を投与することを含む。

【0007】

本開示の別の態様は、対象においてグリア細胞による K^+ 取り込みを回復させる方法に関する。この方法は、グリア細胞 K^+ 取り込み障害を有する対象を選択すること、および、選択された対象に、前記グリア細胞による K^+ 取り込みを回復させるのに有効な条件下でRE1-サイレンシング転写因子(REST)の阻害物質を投与することを含む。

【0008】

本開示の別の態様は、対象における神経精神障害を治療またはその発症を抑制する方法に関する。この方法は、神経精神障害を有するまたは神経精神障害のリスクを有する対象を選択すること、および、選択された対象に、対象において神経精神障害を治療するのにまたはその発症を阻害するのに有効な条件下でREST阻害物質を投与することを含む。

【0009】

統合失調症のような神経障害及び神経精神障害におけるグリア病理の役割を調べるために、人工多能性細胞(iPSC)からグリア前駆細胞(GPC)を生成するためのプロトコルが確立された(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWang et al., "Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination", Cell Stem Cell, 12:252-264 (2013))。このモデルは、遺伝的完全性と機能的レパートリーを維持する方法で統合失調症の患者からのGPCとそれら由来の星状細胞及び希突起膠細胞との生成を可能にする。このプロトコルは、免疫不全マウスへの生着後の生体外及び生体内の双方で、統合失調症患者に由来する星状細胞の分化、遺伝子発現、及び生理学的機能を評価する手段を提供している(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWindrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21:195-208.e6 (2017))。統合失調症患者から生成されたiPSC由来のGPCが定着したそのようなヒトグリアキメラマウスは、重大な生理的及び行動的異常に関連する星状細胞の分化及び成熟構造の双方において重大な異常を示すことが注目された。重要なことに、RNA配列分析により、これらの統合失調症GPCの発生異常は分化関連遺伝子の中心となるセットの下方調節に関連しており、その転写の標的は統合失調症のグリアで同様に不完全であることがわかった多数の輸送体、チャネル、シナプスモジュール

10

20

30

40

50

ーターを含む、ことが明らかになった。

【0010】

本明細書に記載されているように、そのような統合失調症関連のグリアの病的状態が緩和される可能性のある標的とすることが可能なシグナル伝達ノードが同定された。そのため、iPSC GPCは小児期に発症した統合失調症の患者またはその正常対照（CTR）から生成され、星状細胞はこれらから生成された。統合失調症及び対照由来GPCによる遺伝子発現及び星状細胞の機能的分化の双方のパターンを比較した。K⁺恒常性の保存は星状細胞の機能的能力の重要な要素であり、RNA配列決定データは多数のカリウムチャネルの下方調節を示したので、統合失調症の星状細胞によるK⁺取り込みも評価した。統合失調症の細胞は実際にK⁺取り込みの障害を示していることがわかった。これら統合失調症のグリアによるK⁺チャネルの転写障害の根拠を調査したところ、RESTリプレッサーの異常な発現がカリウムチャネル遺伝子発現の低下とこれら統合失調症の星状細胞のK⁺取り込み障害の原因であることが発見された。統合失調症におけるグリアの病的状態の発生に焦点を当てることによって、REST依存性転写の調節不全は、疾患の病態形成にとって重要であるとして、かつ、この深刻な障害の治療のための実行可能な標的として特定されている。

10

[本発明1001]

K⁺取り込み障害を有するグリア細胞においてK⁺取り込みを回復させる方法であって、K⁺取り込み障害を有する前記グリア細胞に、前記グリア細胞によるK⁺取り込みを回復させるのに有効な条件下でREST-サイレンシング転写因子（REST）阻害物質を投与することを含む、前記方法。

20

[本発明1002]

前記グリア細胞がグリア前駆細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記投与することによって、グリア前駆細胞の星状細胞分化が回復する、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記グリア細胞が星状細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記REST阻害物質がバルプロ酸である、本発明1001の方法。

30

[本発明1006]

前記REST阻害物質がベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体である、本発明1001の方法。

[本発明1007]

前記ベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体が、2-（2-ヒドロキシフェニル）-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸アリルオキシ-アミド（X5050）、または2-チオフエン-2-イル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸（2-エチルヘキシル）-アミド（X5917）である、本発明1006の方法。

[本発明1008]

前記REST阻害物質がピラゾールプロピオンアミド誘導体である、本発明1001の方法。

40

[本発明1009]

前記ピラゾールプロピオンアミド誘導体が、3-〔1-（3-ブロモフェニル）-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル〕-1-〔4-〔5-（モルホリン-4-カルボニル）-ピリジン-2-イル〕-2-フェニル-ピペラジン-1-イル〕-プロパン-1-オン（X38210）、または3-〔1-（2,5-ジフルオロフェニル）-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル〕-1-〔4-〔5-（モルホリン-4-カルボニル）-ピリジン-2-イル〕-2-フェニル-ピペラジン-1-イル〕-プロパン-1-オン（X38207）である、本発明1008の方法。

50

[本発明1010]

前記REST阻害物質が、RESTアンチセンスオリゴヌクレオチド、REST shRNA、REST siRNA、及びREST RNAアプタマーから成る群から選択される阻害性核酸分子である、本発明1001の方法。

[本発明1011]

前記REST阻害物質が抗REST抗体またはその抗原結合断片である、本発明1001の方法。

[本発明1012]

K⁺取り込み障害を有する前記グリア細胞が、神経精神障害を有する対象のグリア細胞である、本発明1001の方法。

[本発明1013]

前記神経精神障害が統合失調症である、本発明1012の方法。

[本発明1014]

対象においてグリア細胞K⁺取り込みを回復させる方法であって、グリア細胞K⁺取り込み障害を有する対象を選択すること、および選択された前記対象に、グリア細胞K⁺取り込みを回復させるのに有効な条件下でRE1-サイレンシング転写因子（REST）阻害物質を投与することを含む、前記方法。

[本発明1015]

前記グリア細胞がグリア前駆細胞である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記投与することが、前記対象におけるグリア前駆細胞の星状細胞分化を回復させるのに有効な条件下で行われる、本発明1015の方法。

[本発明1017]

前記グリア細胞が星状細胞である、本発明1014の方法。

[本発明1018]

前記投与することが、星状細胞K⁺恒常性を回復させるのに有効な条件下で行われる、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記REST阻害物質がバルプロ酸を含む、本発明1014の方法。

[本発明1020]

前記REST阻害物質がベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体を含む、本発明1014の方法。

[本発明1021]

前記ベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体が、2-（2-ヒドロキシフェニル）-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸アリルオキシアミド（X5050）、または2-チオフエン-2-イル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸（2-エチルヘキシル）-アミド（X5917）である、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記REST阻害物質がピラゾールプロピオンアミド誘導体を含む、本発明1014の方法。

[本発明1023]

前記ピラゾールプロピオンアミド誘導体が、3-〔1-（3-ブロモフェニル）-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル〕-1-〔4-〔5-（モルホリン-4-カルボニル）-ピリジン-2-イル〕-2-フェニル-ピペラジン-1-イル〕-プロパン-1-オン（X38210）、または3-〔1-（2,5-ジフルオロフェニル）-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル〕-1-〔4-〔5-（モルホリン-4-カルボニル）-ピリジン-2-イル〕-2-フェニル-ピペラジン-1-イル〕-プロパン-1-オン（X38207）である、本発明1022の方法。

[本発明1024]

10

20

30

40

50

前記 R E S T 阻害物質が、R E S T アンチセンスオリゴヌクレオチド、R E S T s h R N A、R E S T s i R N A、及び R E S T R N A アプタマーから成る群から選択される阻害性核酸分子を含む、本発明 1014 の方法。

[本発明 1025]

前記 R E S T 阻害物質が抗 R E S T 抗体またはその抗原結合断片を含む、本発明 1014 の方法。

[本発明 1026]

前記 R E S T 阻害物質が送達ビヒクル中にパッケージされる、本発明 1014 の方法。

[本発明 1027]

前記送達ビヒクルがナノ粒子である、本発明 1026 の方法。

10

[本発明 1028]

前記送達ビヒクルが、グリア細胞を標的とする部分を含む、本発明 1026 の方法。

[本発明 1029]

前記選択された対象が、神経精神障害を有する、または神経精神障害のリスクを有する、本発明 1014 の方法。

[本発明 1030]

前記神経精神障害が、統合失調症、自閉症スペクトラム症、及び双極性障害から成る群から選択される、本発明 1029 の方法。

[本発明 1031]

前記神経精神障害が統合失調症である、本発明 1030 の方法。

20

[本発明 1032]

前記投与することが、前記対象においてニューロンの興奮性を減らすのに有効な条件下で行われる、本発明 1014 の方法。

[本発明 1033]

前記投与することが、前記対象において発作発生を減らすのに有効な条件下で行われる、本発明 1014 の方法。

[本発明 1034]

前記投与することが、前記対象における認知障害を改善するのに有効な条件下で行われる、本発明 1014 の方法。

[本発明 1035]

30

前記投与することが、脳内送達を用いて、髄腔内送達を用いて、鼻腔内送達を用いて、または脳室への直接注入を介して行われる、本発明 1014 の方法。

[本発明 1036]

前記対象がヒトである、本発明 1014 の方法。

[本発明 1037]

前記 R E S T 阻害物質が、グリア細胞を標的とする R E S T 阻害物質である、本発明 1014 の方法。

[本発明 1038]

対象において神経精神障害を治療するまたはその発症を抑制する方法であって、神経精神障害を有するまたはそのリスクを有する対象を選択すること、および選択された前記対象に、前記対象において前記神経精神障害を治療するのにまたはその発症を抑制するのに有効な条件下で R E S T 阻害物質を投与することを含む、前記方法。

40

[本発明 1039]

前記グリア細胞がグリア前駆細胞である、本発明 1038 の方法。

[本発明 1040]

前記グリア細胞が星状細胞である、本発明 1038 の方法。

[本発明 1041]

前記 R E S T 阻害物質がバルプロ酸を含む、本発明 1038 の方法。

[本発明 1042]

50

前記 R E S T 阻害物質がベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体を含む、本発明 1038 の方法。

[本発明 1043]

前記ベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体が、2-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸アシルオキシアミド (X5050)、または 2-チオフエン-2-イル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸 (2-エチルヘキシル)-アミド (X5917) である、本発明 1042 の方法。

[本発明 1044]

前記 R E S T 阻害物質がピラゾールプロピオンアミド誘導体を含む、本発明 1038 の方法。

[本発明 1045]

前記ピラゾールプロピオンアミド誘導体が、3-[1-(3-ブロモフェニル)-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル]-1-{4-[5-(モルホリン-4-カルボニル)-ピリジン-2-イル]-2-フェニル-ピペラジン-1-イル}-プロパン-1-オン (X38210)、または 3-[1-(2,5-ジフルオロフェニル)-3,5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル]-1-{4-[5-(モルホリン-4-カルボニル)-ピリジン-2-イル]-2-フェニル-ピペラジン-1-イル}-プロパン-1-オン (X38207) である、本発明 1044 の方法。

[本発明 1046]

前記 R E S T 阻害物質が、R E S T アンチセンスオリゴヌクレオチド、R E S T s h R N A、R E S T s i r N A、及び R E S T R N A アプタマーから成る群から選択される阻害性核酸分子を含む、本発明 1038 の方法。

[本発明 1047]

前記 R E S T 阻害物質が抗 R E S T 抗体またはその抗原結合断片を含む、本発明 1038 の方法。

[本発明 1048]

前記 R E S T 阻害物質が送達ビヒクル中にパッケージされる、本発明 1038 の方法。

[本発明 1049]

前記送達ビヒクルがナノ粒子である、本発明 1048 の方法。

[本発明 1050]

前記送達ビヒクルが、グリア細胞を標的とする部分を含む、本発明 1048 の方法。

[本発明 1051]

前記神経精神障害が、統合失調症、自閉症スペクトラム症、及び双極性障害から成る群から選択される、本発明 1038 の方法。

[本発明 1052]

前記神経精神障害が統合失調症である、本発明 1051 の方法。

[本発明 1053]

前記投与することが、前記対象においてニューロンの興奮性を減らすのに有効な条件下で行われる、本発明 1038 の方法。

[本発明 1054]

前記投与することが、前記対象において発作発生を減らすのに有効な条件下で行われる、本発明 1038 の方法。

[本発明 1055]

前記投与することが、前記対象において認知障害を改善するのに有効な条件下で行われる、本発明 1038 の方法。

[本発明 1056]

前記投与することが、脳内送達を用いて、髄腔内送達を用いて、鼻腔内送達を用いて、または脳室への直接注入を介して行われる、本発明 1038 の方法。

[本発明 1057]

前記対象がヒトである、本発明 1038 の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1058]

前記REST阻害物質が、グリア細胞を標的とするREST阻害物質である、本発明1038の方法。

【図面の簡単な説明】**【0011】**

【図1】図1A～1Cは、統合失調症(SCZ)のiPSCに由来するヒトグリア前駆細胞(hGPC)の効率的な生成を示す。フローサイトメトリー分析は、未分化hiPSCの>90%がSCZ(4つのSCZ細胞株、 $n \geq 3$ /各細胞株)由来及び対照(CTR)(4つのCTR細胞株、 $n \geq 3$ /各細胞株)由来のhiPSCの双方においてSSEA4を発現することを明らかにした(図1A)。神経前駆細胞(NPC)の段階では、NPCマーカーCD133の発現は、図1Bのフローサイトメトリーのデータに示されるようにSCZ由来細胞株とCTR由来細胞株との間で差異はなかった。CD140aで定義されるhGPCは同様に、SCZ由来及びCTR由来の双方のiPSCから類似して生成され、CD140a⁺細胞の相対的割合は図1Cに示されるようにSCZ及びCTRのhGPC培養物において差異はなかった。両側t検定; NS: 有意ではない; 平均値±SEM。

【図2】図2A～2Cは、星状細胞の分化がSCZ GPCにおいて損なわれていたことを示す。神経前駆細胞(NPC)の段階では、SCZ及びCTR双方(4つの別個の患者及びそれぞれの派生細胞株、 $n \geq 3$ /各細胞株)のhNPCは、図2Aの免疫細胞化学的分析によって示されるようにSOX1及びPAX6の双方を高度に発現した。同様に、PDGFR α /CD140aで定義されるhGPC生成の効率はSCZ細胞株とCTR細胞株の間で差異はなかった(それぞれ4つの異なる患者固有の各細胞株、 $n \geq 3$ /各細胞株)(図2B)。対照的に、GFAP⁺星状細胞の割合は、CTR細胞株において有意に高かった(図2Cに示すようなSCZ細胞株(4つのSCZ細胞株、 $n \geq 3$ /各細胞株、[39.9±2.0%])に対して4つのCTR細胞株、 $n \geq 3$ /各細胞株[70.1±2.4%])。スケール: 50 μ m; ***両側t検定による $p < 0.001$; NS: 有意ではない; 平均値±SEM。

【図3】図3A～3Cは、RESTがSCZ hGPCにおいてカリウムチャネル(KCN)に関連する遺伝子発現を抑制することを示す。図3Aは、SCZ由来のhGPC細胞株において差次的に発現されるカリウムチャネル遺伝子を示すヒートマップである。各SCZ由来のhGPC細胞株を、3つのプールされたCTR由来のhGPC細胞株と個別に比較した(FDR 5%、 $FC > 2.00$ [該当する場合])。示されている遺伝子は、評価された4つのSCZ由来hGPC細胞株のうち少なくとも3つで差次的に発現していることが見いだされた。qPCRにより、ATP1A2、SLC12A6、及びKCNJ9を含むカリウムチャネル関連遺伝子がすべてCTR細胞(4つのCTR細胞株、3回の反復/各細胞株)と比べてSCZ hGPC(4つのSCZ細胞株、3回の反復/各細胞株)において有意に下方調節されることが確認された(図3B)。BioBase-Transfacは、RNA配列決定データに由来するSCZ hGPCにおける下方調節されたカリウムチャネル関連遺伝子の大部分が図3Cに示すようにRESTリプレッサーの標的であることを明らかにした。***両側t検定による $p < 0.01$; 平均値±SEM。

【図4】図4A～4Eは、SCZの星状細胞におけるカリウム取り込みの低下を示す。図4Aは、星状細胞によるカリウム取り込みの調節におけるNa⁺/K⁺ATPアーゼ、Na⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体(NKCC)、及び内向きに整流するK⁺チャネル(Kir)の関与の略図である。qPCRは図4Bのグラフに示されるように、いくつかのK⁺チャネル関連遺伝子がCTR細胞と比べてSCZのCD44⁺星状細胞に偏ったGPCにおいて下方調節されることを確認した。SCZ及びCTRのCD44⁺GPCを、BMP4を含むFBSで培養して成熟したGFAP⁺星状細胞を生成し、次いでK⁺取り込みについて評価した。図4Cは、細胞数(左のグラフ)及び総タンパク質(右のグラフ)に対して基準化したSCZ及びCTRにおけるK⁺取り込みを示す。SCZの星状細胞によるK⁺取り込みはCTRの星状細胞(4つのCTR細胞株、5回の反復/各細胞株)によるK⁺取り込みに比べて有意に減少した(4つのSCZ細胞株、5回の反復/各細胞株)。星状

細胞をウアバイン、ブメタニド、及びテルチアピンで処理して、SCZの星状細胞でどのカリウムチャネルのクラスが機能的に損傷されているかを評価した（4つのSCZ細胞株、4回の反復／各細胞株）。ウアバインとブメタニドの双方がCTRの星状細胞による K^+ 取り込みを効率的に減少させた（4つのCTR細胞株、4回の反復／各細胞株）（図4D及び4E、左のグラフ）のに対して、SCZの星状細胞による K^+ 取り込みにはどちらも影響を与えなかった（図4D及び4E、右のグラフ）。B及びCについて、両側t検定による $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ ；Dについて、一元配置分散分析による $***P<0.001$ ；NS：有意ではない；平均値±SEM。

【図5】図5A～5Cは、SCZのCD44+星状細胞に偏った前駆細胞からの星状細胞の生成を示す。SCZ由来及びCTR由来のCD44+星状細胞前駆細胞の双方が星状細胞に分化するように誘導された。GFAPの免疫染色は、星状細胞生成の効率がSCZ由来の細胞株（図5A、右の画像；4つのSCZ細胞株、5回の反復／各細胞株）とCTR由来の細胞株（図5A、左の画像；4つのCTR細胞株、5回の反復／各細胞株）の間で有意な差異はないことを実証した（図5Bのグラフも参照）。qPCRは、図5Cに示されるように、SCZ由来及びCTR由来のCD44+星状細胞前駆細胞の間でGFAPのmRNA発現に差異がないことを明らかにした。スケール：50 μ m。BとCの間での両側t検定；NS：有意ではない；平均値±SEM。

【図6】図6A～6Eは、RESTがSCZの星状細胞によるカリウム取り込みを調節することを示す。qPCRは、RESTがそれらの対照と比べてCD140aで選別されたSCZ hGPC（図6A、左のグラフ）及びCTR細胞と比べてCD44で選別されたSCZの星状細胞前駆細胞（図6A、右のグラフ）の双方で上方調節されることを確認した。ATP1A2（図6B、左のグラフ）、SLC12A6（図6B、中央のグラフ）、及びKCNJ9（図6B、右のグラフ）を含むいくつかの K^+ チャネル関連遺伝子の発現は、CTRグリアで有意に抑制され、RESTはレンチウイルス－REST形質導入を介して過剰発現された（4つのCTR細胞株、3回の反復／各細胞株）。対照的に、それらの発現は、レンチウイルスREST shRNA iを介してRESTがノックダウンされたSCZの細胞株（4つのSCZ細胞株、3回の反復／各細胞株）で強く上方調節された（図6Bの左、中央、及び右のグラフ）。 K^+ 取り込みがRESTノックダウンに供されたSCZの細胞株（図C、右と左のグラフ、2番目と4番目の棒を比べて）において救済されたのに対し、RESTを形質導入したCTRの星状細胞による K^+ 取り込みはそのSCZのグリアを模倣して、低下した（図6C、右と左のグラフ、1番目と3番目の棒を比べて）。ウアバイン及びブメタニドの双方が、RESTノックダウンを伴うSCZのグリアによる K^+ 取り込みを有意に減少させた（図6D及び6E、右のグラフ；4つのSCZ細胞株、3回の反復／各細胞株）。同様の条件に曝露された対照細胞における K^+ 取り込みは図6D及び6Eの左側のグラフに示す。 $**A$ についての両側t検定によって $P<0.01$ ；B、C、及びDについての一元配置分散分析による $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ ；NS：有意ではない；平均値±SEM。

【図7】図7A～7Bは、対照（図7A）及びSCZの星状膠細胞（図7B）におけるREST過剰発現及びノックダウンの検証を示す。PCRはCTRの星状膠細胞のレンチウイルス－REST形質導入（4つのCTR細胞株、3回の反復／各細胞株）が、形質導入されていない細胞と比べてREST発現の有意な上方調節をもたらすことを確認した（図7A）。対照的に、CD44で定義されるSCZの星状膠細胞（4つのSCZ細胞株、3回の反復／各細胞株）のレンチウイルス－REST－shRNA iの形質導入はREST発現を実質的に抑制した（図7B）。 $***$ 一元配置分散分析による $p<0.001$ ；平均値±SEM。

【発明を実施するための形態】

【0012】

詳細な説明

本開示の第1の態様は、グリア細胞による K^+ 取り込みを回復させる方法に関するものであり、ここで、前記グリア細胞は K^+ 取り込み障害を有する。この方法は、 K^+ 取り込

み障害を有するグリア細胞に、前記グリア細胞による K^+ 取り込みを回復させるのに有効な条件下でRE1サイレンシング転写因子（REST）の阻害物質を投与することを含む。

【0013】

本開示の別の態様は、対象においてグリア細胞による K^+ 取り込みを回復させる方法に関する。この方法は、グリア細胞 K^+ 取り込み障害を有する対象を選択すること、および、選択された対象に、前記グリア細胞による K^+ 取り込みを回復させるのに有効な条件下でRE1サイレンシング転写因子（REST）の阻害物質を投与することを含む。いくつかの実施形態では、REST阻害物質は本明細書に記載されているようなグリア細胞を標的とするREST阻害物質である。

【0014】

本明細書で言及されるように、「グリア細胞」は、グリア前駆細胞、希突起膠細胞に偏った前駆細胞、星状細胞に偏った前駆細胞、希突起膠細胞、及び星状細胞を包含する。グリア前駆細胞は、希突起膠細胞及び星状細胞の双方に分化することができる脳の二能性前駆細胞である。グリア前駆細胞は、A2B5抗体によって認識されるガングリオシド及びPDGFR α （CD140a）のような特定のステージに特異的な表面抗原、と同様にOLIG2、NKX2.2、及びSOX10のようなステージ特異的な転写因子の発現によって同定することができる。希突起膠細胞に偏った及び星状細胞に偏った前駆細胞は、例えば、希突起膠細胞に偏った前駆細胞についてのCD9やO4抗体によって認識される脂質スルファチド、及び星状細胞に偏った前駆細胞についてのCD44を含むステージ選択的な表面抗原の獲得された発現によって同定される。成熟希突起膠細胞はミエリン塩基性タンパク質の発現によって同定され、成熟星状細胞はグリア細胞線維性酸性タンパク質（GFAP）の発現によって最も一般的に同定される。本明細書に記載されている方法の一実施形態では、 K^+ 取り込みはグリア前駆細胞において回復させる。別の実施形態では、 K^+ 取り込みは星状細胞に偏った前駆細胞において回復させる。別の実施形態では、 K^+ 取り込みは星状細胞で回復させる。

【0015】

本開示のこれらの態様によれば、 K^+ 取り込み障害を有する細胞は、グリア細胞、特にグリア前駆細胞、星状細胞に偏った前駆細胞、及び星状細胞であり、正常で健康なグリア細胞と比べて K^+ 取り込みが減少している。一実施形態では、 K^+ 取り込みが低下しているグリア細胞は、1つ以上のカリウムチャネルをコードする遺伝子が下方調節され、対応するカリウムチャネルタンパク質の発現の低下を引き起こすグリア細胞である。特に、KCNJ9、KCNH8、KCNA3、KCNK9、KCNC1、KCNC3、KCNB1、KCNF1、KCNA6、SCN3A、SCN2A、SCNN1D、SCN8A、SCN3B、SLC12A6、SLC6A1、SLC8A3、ATP1A2、ATP1A3、ATP2B2から選択される1つ以上のカリウムチャネルをコードする遺伝子の発現における下方調節はグリア細胞 K^+ 取り込みの低下につながり得る。本明細書に記載されているように、前述の遺伝子の下方調節は、RE1サイレンシング転写因子（REST）としても知られるニューロン制限サイレンシング因子（NRSF）の発現及び活性の上方調節によって引き起こされる。RESTは強力な転写抑制因子であり、通常、非神経細胞の神経遺伝子の抑制に関与する。

【0016】

したがって、一実施形態では、グリア細胞 K^+ 取り込み障害を有する対象を選択することは、対象のグリア細胞によるカリウム取り込みを評価すること、前記グリア細胞によるカリウム取り込みのレベルを対照の健康なグリア細胞の集団によるカリウム取り込みのレベルと比較すること、および、グリア細胞 K^+ 取り込みが減少している対象を選択することを含む。別の実施形態では、グリア細胞 K^+ 取り込み障害を有する対象を選択することは、KCNJ9、KCNH8、KCNA3、KCNK9、KCNC1、KCNC3、KCNB1、KCNF1、KCNA6、SCN3A、SCN2A、SCNN1D、SCN8A、SCN3B、SLC12A6、SLC6A1、SLC8A3、ATP1A2、ATP1A3、ATP2B2から成る群から選択される1つ以上のカリウムチャネルをコードする

遺伝子のグリア細胞発現レベルを評価すること、および、1つ以上のカリウムチャネルをコードする遺伝子の発現に下方調節が存在する場合は対象を選択することを含む。別の実施形態では、 K^+ 取り込み障害を有する対象を選択することは、GIRK-3 (KCNJ9によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーHメンバー8 (KCNH8によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーAメンバー3 (KCNA3によってコードされる)、カリウムチャネルサブファミリーKメンバー9 (KCNK9によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーCメンバー1 (KCNK1によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーCメンバー3 (KCNK3によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーBメンバー1 (KCNB1によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーFメンバー1 (KCNF1によってコードされる)、カリウム電位依存性チャネルサブファミリーAメンバー6 (KCNA6によってコードされる)、ナトリウムチャネルタンパク質3型サブユニットアルファ (SCN3Aによってコードされる)、ナトリウムチャネルタンパク質2型サブユニットアルファ (SCN2Aによってコードされる)、アミロリド感受性ナトリウムチャネルサブユニットデルタ (SCNN1Dによってコードされる)、ナトリウムチャネルタンパク質8型サブユニットアルファ (SCN8Aによってコードされる)、ナトリウムチャネルサブユニットベータ-3 (SCN3Bによってコードされる)、溶質担体ファミリー12メンバー6 (すなわち、 K^+/Cl^- 共輸送体3) (SLC12A6によってコードされる)、ナトリウム-及び塩化物依存性GABA輸送体1 (すなわち、GAT-1) (SLC6A1によってコードされる)、 Na^+/Ca^{+2} 交換体3 (SLC8A3によってコードされる)、 Na^+/K^+ 輸送ATPアーゼサブユニットアルファ-2 (ATP1A2によってコードされる)、 Na^+/K^+ 輸送ATPアーゼサブユニットアルファ-2 (ATP1A3によってコードされる)、細胞膜カルシウム-輸送ATPアーゼ2 (すなわち、PMCA2) (ATP2B2によってコードされる)を含む1つ以上のカリウムチャネルのグリア細胞タンパク質の発現を評価することを含む。1つ以上のカリウムチャネルタンパク質のレベルが低下している場合、対象は本明細書に記載されているような方法を使用する治療のために選択される。別の実施形態では、グリア K^+ 取り込み障害を有する対象を選択することは、グリア細胞のREST発現を評価すること、ならびに、RESTの遺伝子及び／またはタンパク質の発現が増加する場合に対象を選択することを含む。

【0017】

カリウム取り込み、カリウムチャネル遺伝子の発現、カリウムチャネルタンパク質の発現、及びREST遺伝子の発現はそれぞれ、本明細書に記載され、且つ当業者に周知の方法を用いて評価することができる。これらのパラメーターは対象から採取したグリア細胞試料で評価することができる。あるいは、これらのパラメーターの1つ以上は、対象に由来する人工多能性幹細胞 (iPSC) に由来するグリア細胞試料で評価することができる。iPSCは、例えば、かつ、以下に限定されることなく、皮膚試料または生検によって得られる皮膚線維芽細胞のような線維芽細胞、滑膜組織由来の滑膜細胞、角化細胞、成熟B細胞、成熟T細胞、脾臓β細胞、メラニン細胞、肝細胞、包皮細胞、頬細胞、または肺線維芽細胞、末梢血細胞、骨髓細胞などを含む、対象の実質的に任意の体細胞から得ることができる。iPSCは、組込みウイルスベクター (例えば、レンチウイルスベクター、誘導性レンチウイルスベクター、及びレトロウイルスベクター)、切除可能なベクター (例えば、トランスポゾン及びloxPに挟まれたレンチウイルスベクター)、及び非組込みベクター (例えば、アデノウイルス及びプラスミドベクター) の使用を含む当該技術分野で知られている方法によって導出されて、細胞の再プログラミングを促進する前述の遺伝子を送達してもよい (例えば、Takahashi及びYamanaka, Cell, 126:663-676 (2006); Okita et al., Nature, 448:313-317 (2007); Nakagawa et al., Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2007); Takahashi et al., Cell, 131:1-12 (2007); Meissner et al. Nat. Bi

otech. 25:1177-1181 (2007); Yu et al. Science, 318:1917-1920 (2007); Park et al. Nature, 451:141-146 (2008); ならびに米国特許出願公開第2008/0233610号を参照のこと、これらは、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。IPSC細胞を生成するための他の方法には、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWO2007/069666、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852、WO2008/118820、Ikeda et al. の米国特許出願公開第2011/0200568号、Egusa et al. の同第2010/0156778号、Musickの同第2012/0276070号及びNakagawaの同第2012/0276636号、Shi et al., Cell Stem Cell, 3(5):568-574 (2008), Kim et al., Nature, 454:646-650 (2008), Kim et al., Cell, 136(3):411-419 (2009), Huangfu et al., Nature Biotechnology, 26:1269-1275 (2008), Zhao et al., Cell Stem Cell, 3:475-479 (2008), Feng et al., Nature Cell Biology, 11:197-203 (2009), ならびにHanna et al., Cell, 133(2):250-264 (2008)において開示されたものが挙げられる。グリア前駆細胞(GPC)の運命に向かってそして星状細胞の運命に向かってiPSCを駆動する方法は、本明細書に記載され、当該技術分野で知られている。例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWang et al., "Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination", Cell Stem Cell, 12:252-264 (2013)を参照のこと。

【0018】

別の実施形態では、 K^+ 取り込み障害を有するグリア細胞は神経精神障害を有する対象のグリア細胞である。本明細書で言及されるような「神経精神障害」には、認知症、健忘症候群、及び人格・行動の変化を含むがこれらに限定されない精神症状を伴う任意の脳障害が含まれる。本明細書に記載されている方法を使用する治療に好適であるグリア細胞における K^+ チャネル機能障害及び K^+ 取り込み障害を含む例示的な神経精神障害には、以下に限定されることなく、統合失調症、自閉症スペクトラム症、及び双極性障害が挙げられる。

【0019】

したがって、本開示の別の態様は、対象における神経精神障害を治療するまたはその発症を抑制する方法に関する。この方法は、神経精神障害を有するまたは神経精神障害のリスクを有する対象を選択すること、および、選択された対象に、対象における神経精神障害を治療するのにまたはその発症を抑制するのに有効な条件下で阻害物質を投与することを含む。いくつかの実施形態では、REST阻害物質はグリア細胞を標的とするREST阻害物質である。

【0020】

一実施形態では、本明細書に記載されている方法は統合失調症を有する対象を治療するために用いられる。統合失調症は、個体がどのように考え、感じ、そして行動するのかに影響を及ぼす慢性及び重度の精神障害である。現在までに、この障害のいくつかの病期分類モデルが提案されている(Agius et al., "The Staging Model in Schizophrenia, and its Clinical Implications", Psychiatr. Danub. 22(2):211-220 (2010); McGorry et al., "Clinical Staging: a Heuristic Model and Practical Strategy for New Research and Better Health and Social O

utcomes for Psychotic and Related Disorders”, Can. J. Psychiatry, 55 (8) : 486–497 (2010) ; Fava及びKellner, ”Staging: a Neglected Dimension in Psychiatric Classification”, Acta. Psychiatr. Scand. 87: 225–230 (1993), これらは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。しかしながら一般的に、統合失調症は少なくとも3つのステージ：前駆期、初期症状、及び慢性期で進展する。障害のステージすべてで個体の不均一性もあり、一部の個体は、サイコースス発症の超高リスク、臨床的高リスク、またはリスクがあると見なされる (Fusar-Poli et al., ”The Psychosis High-Risk State: a Comprehensive State-of-the-Art Review”, JAMA Psychiatry, 70: 107–120 (2013)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0021】

本明細書に記載されている方法は、ステージのすべてがグリア細胞K⁺取り込み障害を伴うので、統合失調症の任意のステージにおいて、及びサイコーススの任意のリスクレベルで、対象を治療するのに好適である。例えば、一実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って治療される対象は、統合失調症を発症するリスクを有する対象である。そのような対象はABCA13、ATK1、C4A、COMT、DGCR2、DGCR8、DRD2、MIR137、NOS1AP、NRXN1、OLIG2、RTN4R、SYN2、TOP3B、YWHAЕ、ZDHHC8から選択される1つ以上の遺伝子において、または統合失調症の発症に関連している第22染色体(22q11)において1つ以上の遺伝子変異を有してもよく、且つその疾患の症状を示してもよい、または示さなくてもよい。別の実施形態では、対象は、疾患の前駆期にあり、例えば、不安、鬱病、睡眠障害、及び／または短時間の断続的な精神病症候群のような統合失調症の1つ以上の初期症状を示してもよい。別の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って治療されている対象は、統合失調症の精神病症状、例えば、幻覚、偏執性妄想を経験している。

【0022】

別の実施形態では、本明細書に記載されている方法を用いて自閉症または関連する障害を有する対象を治療する。関連する障害には、以下に限定されることなく、アスペルガー障害、特定不能の広汎性発達障害、小児期崩壊性障害、及びレット障害が挙げられ、これらは、社会的相互作用、コミュニケーションの困難、異常な行動を含む症状の重症度が異なる (McPartland et al., ”Autism and Related Disorders”, Handb. Clin. Neurol. 106: 407–418 (2012)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。本明細書に記載されている方法はこれらの状態のそれぞれの1つの、及び状態の任意のステージでの治療に好適である。一実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って治療されている対象は自閉症または関連する状態の症状を示さない。別の実施形態では、治療されている対象は自閉症または関連する状態の1つ以上の初期症状を示す。さらに別の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って治療されている対象は自閉症または関連する状態の多数の症状を示す。

【0023】

別の実施形態では、本明細書に記載されている方法を用いて双極性障害を有する対象を治療する。双極性障害は気分の慢性的な不安定性、概日リズムの乱れ、及びエネルギーレベル、感情、睡眠、及び自己や他者の見方の変動を特徴とする一群の状態である。双極性障害には、以下に限定されることなく、双極性障害I型、双極性障害II型、気分循環性障害、及び他に特定されていない双極性障害が挙げられる。

【0024】

一般に、双極性障害は、少なくとも3つのステージ：前駆期、症候性期、及び残遺期で進展する進行性の病気である (Kapczinski et al., ”Clinical

10

20

30

40

50

Implications of a Staging Model for Bipolar Disorders”, Expert Rev. Neurother. 9:957-966 (2009), 及び McNamara et al., ”Preventative Strategies for Early-Onset Bipolar Disorder: Towards a Clinical Staging Model”, CNS Drugs, 24:983-996 (2010); これらは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。本明細書に記載されている方法は、前述の双極性障害のいずれかを有する対象及び特定の双極性障害の任意のステージにある対象を治療するのに好適である。例えば、一実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って治療される対象は、気分のむら／揺れ、鬱病、観念奔放、怒り、過敏性、身体的興奮、及び不安の症状を示す前駆期初期の対象である。別の実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って治療される対象は、症候期または残遺期にある対象である。

10

【0025】

本明細書で使用されるとき、「対象」及び「患者」という用語はヒト及び非ヒト哺乳動物の対象を明白に含む。本明細書で使用されるとき「非ヒト哺乳動物」という用語は、家庭用ペット及び家畜に拡張されるが、これらに限定されない。そのような動物の非限定例には、霊長類、ウシ、ヒツジ、フェレット、マウス、ラット、ブタ、ラクダ、ウマ、家禽、魚、ウサギ、ヤギ、イヌ及びネコが挙げられる。

【0026】

本開示によれば、RESTの阻害物質は、チャネルの発現及び／または機能の障害の結果であってもよい、 K^+ 取り込み障害を有するグリア細胞に投与される。別の実施形態では、REST阻害物質は、グリア細胞 K^+ 取り込み障害を有する対象に投与される。RESTは、標的遺伝子に位置するリプレッサーエレメント-1 (RE1) と呼ばれる21ヌクレオチドのDNA配列に結合すると、標的遺伝子の活性を抑制するKruppel型亜鉛フィンガー転写因子である。RESTはSIN3A、SIN3B、及びRCOR1の他のコア因子、ならびにヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ(EHMT2)、及びヒストン脱メチル化酵素(KDM1A)のようなエピジェネティックな調節因子を含む核複合体の重要な構成成分である。

20

【0027】

選択的スプライシングの結果として、ヒトRESTの少なくとも4つのアイソフォームが存在する。ヒトRESTアイソフォーム1 (UniProt識別子Q13127-1) のアミノ酸配列は、以下のSEQ ID NO: 1として以下に提供されている。

30

40

50

Met Ala Thr Gln Val Met Gly Gln Ser Ser Gly Gly Gly Gly Leu Phe
1 5 10 15

Thr Ser Ser Gly Asn Ile Gly Met Ala Leu Pro Asn Asp Met Tyr Asp
20 25 30

Leu His Asp Leu Ser Lys Ala Glu Leu Ala Ala Pro Gln Leu Ile Met
35 40 45

10

Leu Ala Asn Val Ala Leu Thr Gly Glu Val Asn Gly Ser Cys Cys Asp
50 55 60

Tyr Leu Val Gly Glu Glu Arg Gln Met Ala Glu Leu Met Pro Val Gly
65 70 75 80

Asp Asn Asn Phe Ser Asp Ser Glu Glu Gly Glu Gly Leu Glu Glu Ser
85 90 95

20

Ala Asp Ile Lys Gly Glu Pro His Gly Leu Glu Asn Met Glu Leu Arg
100 105 110

Ser Leu Glu Leu Ser Val Val Glu Pro Gln Pro Val Phe Glu Ala Ser
115 120 125

Gly Ala Pro Asp Ile Tyr Ser Ser Asn Lys Asp Leu Pro Pro Glu Thr
130 135 140

Pro Gly Ala Glu Asp Lys Gly Lys Ser Ser Lys Thr Lys Pro Phe Arg
145 150 155 160

30

40

50

Cys Lys Pro Cys Gln Tyr Glu Ala Glu Ser Glu Glu Gln Phe Val His
165 170 175

His Ile Arg Val His Ser Ala Lys Lys Phe Phe Val Glu Glu Ser Ala
180 185 190

Glu Lys Gln Ala Lys Ala Arg Glu Ser Gly Ser Ser Thr Ala Glu Glu
195 200 205

Gly Asp Phe Ser Lys Gly Pro Ile Arg Cys Asp Arg Cys Gly Tyr Asn
210 215 220

Thr Asn Arg Tyr Asp His Tyr Thr Ala His Leu Lys His His Thr Arg
225 230 235 240

Ala Gly Asp Asn Glu Arg Val Tyr Lys Cys Ile Ile Cys Thr Tyr Thr
245 250 255

Thr Val Ser Glu Tyr His Trp Arg Lys His Leu Arg Asn His Phe Pro
260 265 270

Arg Lys Val Tyr Thr Cys Gly Lys Cys Asn Tyr Phe Ser Asp Arg Lys
275 280 285

Asn Asn Tyr Val Gln His Val Arg Thr His Thr Gly Glu Arg Pro Tyr
290 295 300

Lys Cys Glu Leu Cys Pro Tyr Ser Ser Ser Gln Lys Thr His Leu Thr
305 310 315 320

Arg His Met Arg Thr His Ser Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Asp Gln
325 330 335

Cys Ser Tyr Val Ala Ser Asn Gln His Glu Val Thr Arg His Ala Arg
340 345 350

Gln Val His Asn Gly Pro Lys Pro Leu Asn Cys Pro His Cys Asp Tyr
355 360 365

Lys Thr Ala Asp Arg Ser Asn Phe Lys Lys His Val Glu Leu His Val
370 375 380

Asn Pro Arg Gln Phe Asn Cys Pro Val Cys Asp Tyr Ala Ala Ser Lys
385 390 395 400

Lys Cys Asn Leu Gln Tyr His Phe Lys Ser Lys His Pro Thr Cys Pro
405 410 415

10

20

30

40

50

Asn Lys Thr Met Asp Val Ser Lys Val Lys Leu Lys Lys Thr Lys Lys
420 425 430

Arg Glu Ala Asp Leu Pro Asp Asn Ile Thr Asn Glu Lys Thr Glu Ile
435 440 445

Glu Gln Thr Lys Ile Lys Gly Asp Val Ala Gly Lys Lys Asn Glu Lys
450 455 460

Ser Val Lys Ala Glu Lys Arg Asp Val Ser Lys Glu Lys Lys Pro Ser
465 470 475 480

Asn Asn Val Ser Val Ile Gln Val Thr Thr Arg Thr Arg Lys Ser Val
485 490 495

Thr Glu Val Lys Glu Met Asp Val His Thr Gly Ser Asn Ser Glu Lys
500 505 510

Phe Ser Lys Thr Lys Lys Ser Lys Arg Lys Leu Glu Val Asp Ser His
515 520 525

Ser Leu His Gly Pro Val Asn Asp Glu Glu Ser Ser Thr Lys Lys Lys
530 535 540

Lys Lys Val Glu Ser Lys Ser Lys Asn Asn Ser Gln Glu Val Pro Lys
545 550 555 560

Gly Asp Ser Lys Val Glu Glu Asn Lys Lys Gln Asn Thr Cys Met Lys
565 570 575

Lys Ser Thr Lys Lys Lys Thr Leu Lys Asn Lys Ser Ser Lys Lys Ser
580 585 590

Ser Lys Pro Pro Gln Lys Glu Pro Val Glu Lys Gly Ser Ala Gln Met
595 600 605

Asp Pro Pro Gln Met Gly Pro Ala Pro Thr Glu Ala Val Gln Lys Gly
610 615 620

Pro Val Gln Val Glu Pro Pro Pro Pro Met Glu His Ala Gln Met Glu
625 630 635 640

Gly Ala Gln Ile Arg Pro Ala Pro Asp Glu Pro Val Gln Met Glu Val
645 650 655

10

20

30

40

50

Val Gln Glu Gly Pro Ala Gln Lys Glu Leu Leu Pro Pro Val Glu Pro
660 665 670

Ala Gln Met Val Gly Ala Gln Ile Val Leu Ala His Met Glu Leu Pro
675 680 685

Pro Pro Met Glu Thr Ala Gln Thr Glu Val Ala Gln Met Gly Pro Ala
690 695 700

Pro Met Glu Pro Ala Gln Met Glu Val Ala Gln Val Glu Ser Ala Pro
705 710 715 720

10

Met Gln Val Val Gln Lys Glu Pro Val Gln Met Glu Leu Ser Pro Pro
725 730 735

Met Glu Val Val Gln Lys Glu Pro Val Gln Ile Glu Leu Ser Pro Pro
740 745 750

Met Glu Val Val Gln Lys Glu Pro Val Lys Ile Glu Leu Ser Pro Pro
755 760 765

Ile Glu Val Val Gln Lys Glu Pro Val Gln Met Glu Leu Ser Pro Pro
770 775 780

20

Met Gly Val Val Gln Lys Glu Pro Ala Gln Arg Glu Pro Pro Pro Pro
785 790 795 800

Arg Glu Pro Pro Leu His Met Glu Pro Ile Ser Lys Lys Pro Pro Leu
805 810 815

Arg Lys Asp Lys Lys Glu Lys Ser Asn Met Gln Ser Glu Arg Ala Arg
820 825 830

Lys Glu Gln Val Leu Ile Glu Val Gly Leu Val Pro Val Lys Asp Ser
835 840 845

30

Trp Leu Leu Lys Glu Ser Val Ser Thr Glu Asp Leu Ser Pro Pro Ser
850 855 860

Pro Pro Leu Pro Lys Glu Asn Leu Arg Glu Glu Ala Ser Gly Asp Gln
865 870 875 880

Lys Leu Leu Asn Thr Gly Glu Gly Asn Lys Glu Ala Pro Leu Gln Lys
885 890 895

Val Gly Ala Glu Glu Ala Asp Glu Ser Leu Pro Gly Leu Ala Ala Asn
900 905 910

40

Ile Asn Glu Ser Thr His Ile Ser Ser Ser Gly Gln Asn Leu Asn Thr
915 920 925

Pro Glu Gly Glu Thr Leu Asn Gly Lys His Gln Thr Asp Ser Ile Val
930 935 940

Cys Glu Met Lys Met Asp Thr Asp Gln Asn Thr Arg Glu Asn Leu Thr
945 950 955 960

Gly Ile Asn Ser Thr Val Glu Glu Pro Val Ser Pro Met Leu Pro Pro
965 970 975

Ser Ala Val Glu Glu Arg Glu Ala Val Ser Lys Thr Ala Leu Ala Ser
980 985 990

Pro Pro Ala Thr Met Ala Ala Asn Glu Ser Gln Glu Ile Asp Glu Asp
995 1000 1005

Glu Gly Ile His Ser His Glu Gly Ser Asp Leu Ser Asp Asn Met
1010 1015 1020

Ser Glu Gly Ser Asp Asp Ser Gly Leu His Gly Ala Arg Pro Val
1025 1030 1035

Pro Gln Glu Ser Ser Arg Lys Asn Ala Lys Glu Ala Leu Ala Val
1040 1045 1050

Lys Ala Ala Lys Gly Asp Phe Val Cys Ile Phe Cys Asp Arg Ser
1055 1060 1065

Phe Arg Lys Gly Lys Asp Tyr Ser Lys His Leu Asn Arg His Leu
1070 1075 1080

Val Asn Val Tyr Tyr Leu Glu Glu Ala Ala Gln Gly Gln Glu
1085 1090 1095

【 0 0 2 8 】

ヒト R E S T アイソフォーム - 1 をコードするヌクレオチド配列は S E Q I D N O :
2 (N C B I 参照配列識別子 N M _ 0 0 5 6 1 2 . 4) として以下に提供されている。

ggcggcggcgc gcggcgcgga ctgggtgcgc ggcgcagcgt cctgtgttg aatgtgcggc 60
tgccgcgagc tcgcggcgca gcagcggagc gagcgccgcc gagggccggg gcccagacc 120
ctggcgggcg ctgccgcagc cgagacggca gggcgaggcc cggaggcctg agcaccctct 180
gcagcccccac tcctgggcct tcttgggtcca cgacggcccc agcacccaac ttaccaccc 240
tccccacct ctcccccgaa actccagcaa caaagaaaag tagtcggaga aggagcggcg 300

10

20

30

40

50

actcaggggc gcccgcccct cctcaccgag gaaggccgaa tacagttatg gccacccagg 360
 taatggggca gtcttctgga ggaggagggc tgtttaccag cagtggcaac attggaatgg 420
 ccctgcctaa cgacatgtat gacttgcatg acctttccaa agctgaactg gccgcacctc 480
 agcttattat gctggcaaat gtggccttaa ctggggaagt aaatggcagc tgctgtgatt 540
 acctggctcg tgaagaaaga cagatggcag aactgatgcc ggttggggat aacaactttt 600
 cagatagtga agaaggagaa ggacttgaag agtctgctga tataaaaggc gaacctcatg 660
 gactggaaaa catggaactg agaagtttg aactcagcgt cgtagaacct cagcctgtat 720
 ttgaggcatc aggtgctcca gatatttaca gttcaataa agatcttccc cctgaaacac 780
 ctggagcgga ggacaaaggc aagagctcga agaccaaacc ctttcgctgt aagccatgcc 840
 aatatgaagc agaatctgaa gaacagtttg tgcatacat cagagttcac agtgctaaga 900
 aattttttgt ggaagagagt gcagagaagc aggcaaaagc cagggaatct ggctcttcca 960
 ctgcagaaga gggagatttc tccaagggcc ccattcgctg tgaccgctgc ggctacaata 1020
 ctaatcgata tgatcactat acagcacacc tgaacacca caccagagct ggggataatg 1080
 agcagagtcta caagtgtatc atttgacat acacaacagt gagcgagtat cactggagga 1140
 aacatttaag aaacctttt ccaaggaaag tatacacatg tggaaaaagc aactattttt 1200
 cagacagaaa aaacaattat gttcagcatg ttagaactca tacaggagaa cgcccatata 1260
 aatgtgaact ttgtccttac tcaagttctc agaagactca tctaactaga catatgcgta 1320
 ctcatcagtg tgagaagcca tttaaagtgt atcagtgtag ttatgtggcc tctaataaac 1380
 atgaagtaac ccgccatgca agacagggtc acaatgggcc taaacctctt aattgcccac 1440
 actgtgatta caaacagca gatagaagca acttcaaaaa acatgtagag ctacatgtga 1500
 acccacggca gttcaattgc cctgtatgtg actatgcagc ttccaagaag tgtaatctac 1560
 agtatcactt caaatctaag catcctactt gtcctaataa aacaatggat gtctcaaaag 1620
 tgaaactaaa gaaaacccaa aaacgagagg ctgacttgcc tgataatatt accaatgaaa 1680
 aaacagaaat agaacaaaca aaaataaaag gggatgtggc tggaaagaaa aatgaaaagt 1740
 ccgtcaaagc agagaaaaga gatgtctcaa aagagaaaaa gccttctaata aatgtgtcag 1800
 tgatccaggt gactaccaga actcgaataa cagtaacaga ggtgaaagag atggatgtgc 1860
 atacaggaag caattcagaa aaattcagta aaactaagaa aagcaaaagg aagctggaag 1920
 ttgacagcca ttctttacat ggtcctgtga atgatgagga atcttcaaca aaaaagaaaa 1980
 agaaggtaga aagcaaatcc aaaaataata gtcaggaagt gccaaagggt gacagcaaag 2040
 tggaggagaa taaaaagcaa aatacttgca tgaaaaaaag tacaagaag aaaactctga 2100
 aaaataaatc aagtaagaaa agcagtaagc ctctcagaa ggaacctgtt gagaagggat 2160

10

20

30

40

50

ctgctcagat ggaccctcct cagatggggc ctgctccac agaggcggtt cagaaggggc 2220
 ccgttcaggt ggagccgcca cctcccatgg agcatgctca gatggagggt gccagatac 2280
 ggctgtctcc tgacgagcct gttcagatgg aggtggttca ggaggggcct gctcagaagg 2340
 agctgctgcc tcccgtagg cctgctcaga tggtaggtgc ccaaattgta cttgctcaca 2400
 tggagctgcc tcctcccatg gagactgctc agacggaggt tgcccaaatg gggcctgctc 2460
 ccatggaacc tgctcagatg gaggttggcc aggtagaatc tgctcccatg cagggtggtcc 2520
 agaaggagcc tgttcagatg gagctgtctc ctcccatgga ggtggtccag aaggagcctg 2580
 ttcagataga gctgtctcct cccatggagg tggtagcaga ggaacctgtt aagatagagc 2640
 tgtctcctcc catagagggt gtccagaagg agcctgttca gatggagttg tctcctccca 2700
 tgggggtggt tcagaaggag cctgctcaga gggagccacc tcctcccata gagcctcccc 2760
 ttcacatgga gccaatcttc aaaaagcctc ctctccgaaa agataaaaag gaaaagtcta 2820
 acatgcagag tgaaagggca cggaaggagc aagtccttat tgaagttggc ttagtgctg 2880
 ttaaagatag ctggcttcta aaggaaagtg taagcacaga ggatctctca ccaccatcac 2940
 caccactgcc aaaggaaaat ttaagagaag aggcacagag agacaaaaa ttactcaaca 3000
 caggtagaag aaataaagaa gcccctcttc agaaagtagg agcagaagag gcagatgaga 3060
 gcctacctgg tcttgctgct aatatcaacg aatctacca tatttcatcc tctggacaaa 3120
 acttgaatac gccagagggt gaaacttta atggtaaaca tcagactgac agtatagttt 3180
 gtgaaatgaa aatggacact gatcagaaca caagagagaa tctcactggt ataaattcaa 3240
 cagttgaaga accagtttca ccaatgcttc ccccttcagc agtagaagaa cgtgaagcag 3300
 tgtccaaaac tgcactggca tcacctcctg ctacaatggc agcaaatgag tctcaggaaa 3360
 ttgatgaaga tgaaggcatc cacagccatg aaggaaagta cctaagtga aacatgtcag 3420
 aggttagtga tgattctgga ttgcatggg ctcggccagt tccacaagaa tctagcagaa 3480
 aaaatgcaaa ggaagccttg gcagtcaaag cggctaagg agattttgtt tgtatcttct 3540
 gtgatcggtc tttcagaaaag ggaagagatt acagcaaca cctcaatgc catttggtta 3600
 atgtgtacta tcttgaagaa gcagctcaag ggcaggagta atgaaacttt gaacaagggt 3660
 tcagttctta gtttgaagg tatattacat tttatattca tttatgatag cagacaacct 3720
 tttgaagatt ctttaattag tatctgatgt tgatttttaa gtggcattct tttccttagg 3780
 actttttatg tatacctggt gattgttgtg taaatttttag taaatctaag agagtgtact 3840
 aaaccagcag gtatctgtta gcttatgtgt ttaattgaaa ttagaaggct aagatggtat 3900
 aacagcattt tattgctttg tccagctaca acttgtcatt ttttctcca tgtcttatct 3960
 tcctgtttca ctttagttta ttcttcgttt tttattgaga tctataaaaa attggcttac 4020

10

20

30

40

50

ttaatagcaa attacttgaa gaatttgcct gctttatata aagtttagcac tttaagat	4080
tttttttttag agatgagaag acattttaa	4140
ctatcagtc aagtatttac ttcttgagtt ttgatcaata ttttttattt gtgtatgtta	4200
atcgctcataa aaacagtgat tttggtgtgt tttttatttt ggtgctttaa tggcttaaga	4260
tgttgacacat tttttttttc ttttggtttc tgtttatgtt tttttgccta tgcagttaaa	4320
tttttcctag aaatagcatt tgtgttgaac agtaacactt tatacatata tatatgcatg	4380
tttattttgt ttggcgtctt tggagggatg ctttttagact tgtttgcaaa agggcagttt	4440
tctttttctt tgctgcagtt gtctattttg cagaataata gtgtgtgcaa gtttgtgagc	4500
aatgaaata tgcaggttca atctattgat tttgattttt acatcttata tctatgccag	4560
aatctgtatt tcatataact tattttatttc gaatggatgt agtaaattca cagctatcag	4620
ttttgatttt gcaataaata aaccactagg ttgcatgtcg aacaaatttt tatctcaaat	4680
accaaccatc agtttttttt ttcatgtgtt ttggtacagc taattcctaa ttgtagagtg	4740
ttaaagtgtt gaggagaacc ttttctcata gatggttggg gttcatatgg ctactttaca	4800
ataaagagaa ctgtaagtga tatttggaac ctacaaacct ggaattagga gatataatta	4860
ttccttcaag ttttatagaa tatcacttgg gagattccaa agccatagct attacgcggc	4920
aaacctagga taagaaagg	4980
gtgaaaaagg ctggtgaaac aagtacagtc cagatttttt aaaatcatac tttctcaggg	5040
atctccacaa actggtgggt gtcttggtg tctgtgtgat agcctctttc tataggtgag	5100
gcctcaaag aattgcagct atcctggtgt tcctatgagg gcactttgta tgaaaaagg	5160
catgtactcc aaaacatttt tgtaggttct ttggccagtt gccaaagagt gtgaaagaat	5220
ccaatagagg atttttctta ctgatagcag tcattcattg cagtaaaata aaatatgatc	5280
ccattagga atcttgaatt ctgacctccc atactccgtt ttgaaataac cactttatat	5340
ttcatttttt aaaaatctga tgatctcttt gaggcagggt tcagatttgg cagtacaaca	5400
tgaaagatta ggaaaagcat taataacgtg tgggtggaaa gcttgttaaa aatctgagag	5460
tgaagtttga gttaaaagtt gtttgaacat ggcattgact gggaggccaa agattttaaag	5520
aagcggaaga ttcttctctt aagacatgag gagtaagttg tgtgataatg gtatgtgttt	5580
tgtgtgcatg aatggacatt gtaaatgttg aattctaggc tccgacaatc attgtcaaca	5640
gaagatcaag ctgcaaatat ttatgtttta aaacttaa	5700
tctaatagact agttttaatg ttcatgggta cattttacct aagttaccgt ttacattgta	5760
tagaaaaaga tacatcttaa gcacagattg gttattagga attagtttgg ggaagagggt	5820
tttttggtga ttctttcata ctgcaaagaa aaaccatttg ctttttggg aattgagcta	5880

10

20

30

40

50

acttctaatac tagtcttaag actagaatgc taaaaacaaa aacatgaagg aaattaaaaac	5940	
cccttattat taaattgatt tgtaaaaaca ttgttactgg aaattttattg gacttgaggc	6000	
cttcctccag aaaataagga cttgattgtc aggcctatat taggttctga accttaatgc	6060	
catgtatttg tacttactaa aaattgtttc aatgaaaagt acattagcag tatgaacttc	6120	
tggtccagtt ggaagttttt ccatttgaaa aatgtgatgt ttgcatggaa ctgtttgaaa	6180	
cttttttatt ttctagtccc cctccccac actggataga atttagccta gaattttccc	6240	10
tttgataaa agaacaaaaa ttgaacatgt tatttgtaaa ttgatgttta gtaattagt	6300	
ataaacttga aatactagca tatattataa gccttaatct taggtagtct tatgaaaatg	6360	
aatctcttaa ctatcttttg aacctgtatt cacattgggtt ttcaagatat ttaagttat	6420	
attttttctt cttttcagag ctgcttctta ttctggggct actttttttt ttagttgtgt	6480	
aattcacaaa gggctgcatt tttttttttt tttaataagg cttataacta tggctggatc	6540	
ttttgctcta gtcttctaag aagggccatt ttatttttta gagtcacttc taaagtcag	6600	
tggtaatata ctttgagagac tgttttgctg atgagtgtgt atacaaatta aaaccaagt	6660	20
agacctcatt gcatgtcacc ctatgaatgt tgacaatgga aggaatacct tgcctgtagt	6720	
atactgtcac ttctggattg ataagctgag gaagaaagt aagttttctt tttacataag	6780	
tcagaaaaac ttacagctgg tgttcctagt ttctgggtg acctcagcag atgaagtga	6840	
cagatagtgt taattcagat tgaagaaatt atctgaatct tggtttgtgt agatttaca	6900	
tctacatgca atattaacta aatcagatag cttttacagt ttcacatgtg tacatagggt	6960	
ccctcccggt cccttccata tccattagtt attgaacttt ctaaactggc attgaaacat	7020	30
tacaacaatg ttttggtgca ccaattttat aaacttaagc agtgcaatac gtgttacttt	7080	
tctgaggcaa accaaaggta aattttctca ggttcttgct gccttcttta gcagcatttg	7140	
atggaagatc ttttatacat ttgtaataga taaaaataaa ccagattgca aatccttttt	7200	
taaaatccta aacctgtac caagtttttg gtccaaatta tgtaggataa gttaaaacta	7260	
aattgcattc tattaaccaa tatgagtgt tttctgtaag catagttatg ttgaaataaa	7320	
gtttttaaaaa cca	7333	40

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、好適な R E S T 阻害物質は、作用物質の非存在下で生じる R E S T 発現のレベルと比べてグリア細胞において R E S T 発現のレベルを低下させることができる、任意の作用物質または化合物である。一実施形態では、グリア細胞における R E S T 発現のレベルを阻害するのにまたは低下させるのに好適である治療剤には、以下に限定されることなく、例えば、R E S T アンチセンスオリゴヌクレオチド、R E S T s h R N A、R E S T s i R N A、及び R E S T R N A アプタマーのような阻害性核酸分子が挙げられる。

【 0 0 3 0 】

遺伝子の生体内翻訳及びその後のタンパク質発現を阻害するためのアンチセンス法の使

用は当該技術分野で周知である（例えば、Dobie et al. の米国特許第 7, 425, 544 号；Karras et al. の米国特許第 7, 307, 069 号；Bennett et al. の米国特許第 7, 288, 530 号；Cowser et al. の米国特許第 7, 179, 796 号、これらは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）。本開示によれば、好適なアンチセンス核酸は、REST をコードする特定の核酸分子の少なくとも一部と相補性であるまたはハイブリッド形成する、核酸分子（例えば、DNA ヌクレオチド、RNA ヌクレオチド、もしくは修飾（例えば、2'-O-アルキル（例えば、メチル）置換されたヌクレオチドの安定性を高める修飾）、またはそれらの組み合わせを含む分子）である（例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Weintraub, H. M., "Antisense DNA and RNA", Scientific Am. 262: 40-46 (1990) を参照のこと）。上記の SEQ ID NO: 2 は REST をコードする例示的な核酸分子である。REST をコードする変異体核酸分子も当該技術分野で知られている。例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれ、阻害性核酸アンチセンス分子の設計での使用に好適である NCBI Ref. Seq. NM_001363453 及び NM_001193508. 1 を参照のこと。本明細書に記載されている方法で使用するのに好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 核酸塩基長であるか、または最長で 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 核酸塩基長までであり、標的 REST 核酸またはその特定された一部と比べて 6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下、2 個以下、または 1 個以下の非相補性核酸塩基を含む。アンチセンス核酸分子は、その対応する標的 REST 核酸分子とハイブリッド形成して二本鎖分子を形成し、それは、細胞が二本鎖 mRNA を翻訳しないので、mRNA の翻訳を妨害する。

【0031】

REST アンチセンス核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして細胞に導入することができるか、または、例えば、遺伝子治療法を用いて、アンチセンス核酸をコードする核酸が導入されている細胞において生成することができる。本明細書に記載されている方法に従って使用するのに好適な抗 REST アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Sedaghat et al. の WO 2011031998 で開示されており、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0032】

REST siRNA は約 20~25 ヌクレオチド長の二本鎖合成 RNA 分子であり、両端に 2~3 ヌクレオチドの短い 3' オーバーハングを伴う。二本鎖 siRNA 分子は、標的 mRNA 分子の一部のセンス鎖及びアンチセンス鎖、この場合、REST ヌクレオチド配列の一部、すなわち、REST アイソフォーム 1 をコードする SEQ ID NO: 2 または別の REST アイソフォームのヌクレオチド配列の一部を表す（すなわち、NCBI Ref. Seq. No. NM_001363453 及び同 NM_001193508. 1、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）。siRNA 分子は通常、開始コドンから約 50~100 ヌクレオチド下流の REST mRNA 標的の領域を標的とするように設計される。細胞に導入されると、siRNA 複合体は内在性 RNA 干渉 (RNAi) 経路を始動させ、標的 REST mRNA 分子の切断と分解を生じる。本明細書に記載されている方法で用いることができる REST 及び REST 転写複合体の他のメンバーを標的とする siRNA 分子は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Maes の WO 2009027349 に開示されている。安定性、特異性、及び有効性を高めるための siRNA 分子の一方または双方の鎖への修飾ヌクレオシドまたはモチーフの組み込みのような siRNA 組成物の種々の改善が記載されており、本開示のこの態様に従って使用するのに好適である（例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Giese らの WO 2004/015107、McSwiggan らの WO 2003/070918、Imanishi らの WO 1998/39352、Jesper らの米国特許

出願公開第2002/0068708号、Kanekoらの米国特許出願公開第2002/0147332号；Bhatらの米国特許出願公開第2008/0119427号を参照のこと）。

【0033】

短いまたは小型のヘアピンRNA分子は、機能的にはsiRNA分子に類似するが、ヘアピンターンをきつくるさらに長いRNA配列を含む。shRNAは細胞機構によってsiRNAに切断され、遺伝子発現は細胞RNA干渉経路を介して抑制される。本明細書に記載されているように、REST発現を効果的に妨害するshRNA分子は、開発されており、以下の核酸配列を含む：

5'-GCAGTGGCAACATTGGAATGG-3' (SEQ ID NO: 4)

10

のRESTヌクレオチド配列を標的とする、

5'-CCAUUCCAAUGUUGCCACUGC-3' (SEQ ID NO: 3)

、及び、

5'-CGGCTACAATACTAATCGA-3' (SEQ ID NO: 6)

のRESTヌクレオチド配列を標的とする、

5'-UCGAUUAGUAUUGUAGCCG-3' (SEQ ID NO: 5)

20

。

【0034】

RESTに特異的に結合する核酸アプタマーも本明細書に記載されている方法での使用に好適である。核酸アプタマーは、一本鎖、部分的に一本鎖、部分的に二本鎖、または二本鎖のヌクレオチド配列であり、ワトソン・クリック塩基対合または三重らせん形成以外のメカニズムによって、タンパク質または核酸分子のいずれかである選択された標的分子を特異的に認識することができる。アプタマーには、以下に限定されることなく、ヌクレオチド、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、ならびに骨格修飾、分岐点、及び非ヌクレオチドの残基、基、または架橋を含むヌクレオチドを含む、定義された配列セグメント及び配列が挙げられる。本明細書に記載されている方法に従って使用するのに好適である、RESTを阻害することが知られている例示的なRNAアプタマーは、ニューロン限定サイレンサーエレメント(NRSE)またはRE1として知られる21塩基対DNAエレメントに対応する配列を含有する、以下に示すような二本鎖RNA分子を含む(Kuwabara et al., "A Small Modulatory dsRNA Specifies the Fate of Adult Neural Stem Cells", Cell, 116:779-793 (2004)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。

30

例示的なRNA RESTアプタマー

5'-UUCAGCACACGGACAGCGCC-3' (SEQ ID NO: 7)

3'-AAGUCGUGGUGCCUGUCGCGG-5' (SEQ ID NO: 8)

40

【0035】

本明細書に記載されている阻害性核酸分子、すなわち、RESTのアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、PNA、アプタマーへの修飾は、ヌクレオシド間結合、糖部分、または核酸塩基への置換または変化を包含する。修飾された阻害性核酸分子は、例えば、強化された細胞取り込み、核酸標的に対する強化された親和性、ヌクレアーゼの存在下での上昇した安定性、または増加した阻害活性のような望ましい特性のゆえに、ネイティブ型より好ましいことが多い。例えば、化学的に修飾されたヌクレオシドは、短縮型または切詰型のアンチセンスオリゴヌクレオチドの、その標的核酸に対する結

50

合親和性を高めるために採用されてもよい。結果として、そのような化学的に修飾されたヌクレオシドを有する短いアンチセンス化合物で匹敵する結果を得ることができることが多い。

【0036】

RESTを標的とする阻害性核酸分子は任意で、糖基が修飾されている1個以上のヌクレオシドを含有することができる。そのような糖修飾されたヌクレオシドは、強化されたヌクレアーゼ安定性、上昇した結合親和性、または他の何らかの有益な生物学的特性を核酸分子に付与してもよい。特定の実施形態では、ヌクレオシドは化学的に修飾されたりボフラノース環部分を含む。化学的に修飾されたりボフラノース環の例には、以下に限定されることなく、5'置換基及び2'置換基を含む置換基の付加、二環式核酸(BNA)を形成するための非ジェミナル環原子の架橋、S、N(R)、またはC(R1)(R2)によるリボシル環酸素原子の置換及びそれらの組み合わせが挙げられ、ここで、RはH、C₁~C₁₂アルキルまたは保護基である。化学的に修飾された糖の例には、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド、2'位のさらなる置換を伴うSによるリボシル環酸素原子の置換が挙げられる。

【0037】

特定の実施形態では、ヌクレオシドは、例えば、モルホリノ環、シクロヘキセニル環、シクロヘキシル環、またはテトラヒドロピラニル環のような糖代替物(DNA類似体と呼ばれることもある)でリボシル環を置き換えることによって修飾される。

【0038】

核酸塩基(または塩基)の修飾または置換は、天然に存在するまたは合成で修飾されていない核酸塩基と構造的に区別可能であるが、さらに機能的に交換可能である。天然の及び修飾された核酸塩基は双方とも水素結合に関与することができる。そのような核酸塩基の修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、または他の有益な生物学的特性をREST阻害物質核酸分子に付与してもよい。修飾核酸塩基には、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)のような合成及び天然の核酸塩基が挙げられる。5-メチル-シトシン置換を含む特定の核酸塩基置換は、標的核酸に対する核酸分子の結合親和性を高めるのに特に有用である。追加の修飾された核酸塩基には、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル誘導体及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル誘導体及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、ピリミジン塩基の5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル及びシトシン及び他のアルキニルの誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換のアデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが挙げられる。

【0039】

RNA及びDNAの天然に存在するヌクレオシド間結合は、3'から5'へのホスホジエステル結合である。修飾されたヌクレオシド間結合を有する阻害性核酸分子には、リン原子を保持するヌクレオシド間結合、と同様にリン原子を有さないヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、及びホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定されない。リン含有結合及び非リン含有結合を調製する方法は周知である。特定の実施形態では、REST核酸を標的とする阻害性核酸分子は1つ以上の修飾されたヌクレオシド間結合を含む。

【0040】

本明細書に記載されている阻害性核酸分子は、結果として生じる阻害性核酸分子の活性

、細胞分布、または細胞取り込みを増強する1つ以上の部分または抱合体に共有結合されてもよい。典型的な抱合基にはコレステロール部分及び脂質部分が挙げられる。追加の抱合基には、炭水化物、ポリマー、ペプチド、無機ナノ構造物質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び色素が挙げられる。

【0041】

本明細書に記載されている阻害性核酸分子はまた、阻害性核酸分子の一方または双方の末端に一般に連結して、例えば、ヌクレアーゼ安定性のような特性を増強する1つ以上の安定化基、例えば、キャップ構造を有するように修飾することができる。これらの末端修飾は、阻害性核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内での送達及び／または局在化に役立つことができる。キャップ構造は5'末端(5'キャップ)または3'末端(3'キャップ)に存在することができ、または双方の末端に存在することができる。キャップ構造は当該技術分野で周知であり、例えば、逆デオキシ脱塩基キャップが含まれる。ヌクレアーゼ安定性を付与するために阻害性核酸分子の一方または双方の末端をキャップするのに使用することができるさらなる3'-及び5'-安定化基には、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるManoharanのWO03/004602で開示されているものが挙げられる。

10

【0042】

別の実施形態では、好適なREST阻害物質は、作用物質の非存在下で生じるREST核移行のレベルと比べてグリア細胞におけるREST核移行のレベルを減らすまたは防止することができる任意の作用物質または化合物である。

20

【0043】

別の実施形態では、好適なREST阻害物質は、作用物質の非存在下で生じるRESTサプレッサー活性のレベルと比べてグリア細胞におけるRESTサプレッサー活性に拮抗するまたはそれを減らすことができる任意の作用物質または化合物である。この方法でREST阻害を達成するのに好適な作用物質には、RESTのDNA結合ドメインをコードするが、タンパク質の2つのリプレッサードメインを欠く核酸分子が挙げられる。これらの作用物質は優性阻害REST作用物質として作用し、RESTと標的遺伝子におけるそのRE1配列との相互作用を遮断する。本明細書に記載されている方法で用いることができる好適なREST優性阻害核酸分子は、Chen et al., "NRSF/REST is Required in vivo for Repression of Multiple Neuronal Target Genes During Embryogenesis", Nat. Genet. 20:136-42 (1998) 及びRoopra et al., "Transcriptional Repression by Neuron-restrictive Silencer Factor is Mediated via the Sin3-histone Deacetylase Complex", Mol. Cell Biol. 20:2147-57 (2000) において開示されており、これらは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0044】

別の実施形態では、グリア細胞においてRESTサプレッサー活性を低下させることができる作用物質は、ベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体である(Charbord et al., High Throughput Screening for Inhibitors of REST in Neural Derivatives of Human Embryonic Stem Cells Reveals a Chemical Compound that Promotes Expression of Neuronal Genes", Stem Cells, 31:1816-1828 (2013)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。特に好適なベンゾイミダゾール-5-カルボキサミド誘導体には、以下に限定されることなく、2-(2-ヒドロキシフェニル)-1H-ベンゾイミダゾール-5-カルボン酸アリルオキシアミド(X5050)及び2-チオフエン-2-イル-1H-ベンゾイミダゾール-5-カル

40

50

ボン酸（２－エチル－ヘキシル）－アミド（X 5 9 1 7）が挙げられる。

【0045】

別の実施形態では、グリア細胞においてRESTサプレッサー活性を低下させることができる作用物質は、ピラゾールプロピオンアミド誘導体である（Charbord et al., High Throughput Screening for Inhibitors of REST in Neural Derivatives of Human Embryonic Stem Cells Reveals a Chemical Compound that Promotes Expression of Neuronal Genes”, Stem Cells, 31:1816-1828 (2013)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）。特に好適なピラゾールプロピオンアミド誘導体には、以下に限定されることなく、3-[1-(3-ブromoフェニル)-3, 5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル]-1-{4-[5-(モルホリン-4-カルボニル)-ピリジン-2-イル]-2-フェニル-ピペラジン-1-イル}-プロパン-1-オン(X 3 8 2 1 0)、及び3-[1-(2, 5-ジフルオロフェニル)-3, 5-ジメチル-1H-ピラゾール-4-イル]-1-{4-[5-(モルホリン-4-カルボニル)-ピリジン-2-イル]-2-フェニル-ピペラジン-1-イル}-プロパン-1-オン(X 3 8 2 0 7)が挙げられる。

10

【0046】

別の実施形態では、グリア細胞においてRESTサプレッサー活性を低下させることができる作用物質は、RESTに直接結合してその活性を遮断する、または転写リプレッサー複合体のタンパク質のいずれかに結合してグリア細胞におけるREST転写複合体の形成を阻害する、抗体または抗体断片である。RESTに結合することができる抗体及びそれを作製する方法は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるAnders及びSchoenherの米国特許第6, 824, 774号で開示されている。REST転写複合体の形成を阻害し、それによってREST抑制の活性を阻害するのに好適なモノクローナル抗体には、BRG-1関連因子(BAF)57、BRG1、及びBAF170に対する抗体が挙げられる(Battaglioli et al., "REST Repression of Neuronal Gene Requires Components of the hSWI. SNF Complex", J. Biol. Chem. 277(43):41038-45 (2002)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。抗体結合を介して阻害することができる他のREST複合体成分には、以下に限定されることなく、MeCP2、mSin3a、AOF2、RCOR1、及びJARID1Cが挙げられる。

20

30

【0047】

別の実施形態では、好適なREST阻害物質は、グリア細胞においてREST転写複合体の形成を阻害する任意の作用物質または化合物である。REST媒介性遺伝子抑制は、2つの別個のコリプレッサー複合体、すなわち、N末端及びC末端のコリプレッサー複合体の動員によって達成される（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるOoi et al., "Chromatin Crosstalk in Development and Disease: Lessons from REST", Nat. Rev. Genet. 8:544-54 (2007)を参照のこと）。したがって、これらのコリプレッサー複合体の成分の活性を阻害する作用物質または化合物はRESTの活性を阻害するのに好適である。例えば、ヒストン脱アセチル化酵素であるHDAC1及びHDAC2はN末端及びC末端双方のコリプレッサー複合体に必要である。したがって、これらのHDACの活性を阻害してREST活性を阻害する作用物質は本明細書に記載されている方法での使用に好適である。好適なHDAC阻害物質には、以下に限定されることなく、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA(TSA)、スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、N-ヒドロキシ-4-(メチル{[5-(2-ピリジニル)-2-チエニル]スルホニル}アミノ)ベンズアミド、4-ジメチルアミノ-N-(6ヒドロキシカルバモイエチル)ベンズアミド-N-ヒドロキシ-7-(4-ジメチルアミノベンゾイル)ア

40

50

ミノヘプタンアミド、7-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-N-ヒドロキシ-4,6-ジメチル-7-オキソ-2,4-ヘプタジエンアミド、ドコサノール、(5)-[5-アセチルアミノ-1-(2-オキソ-4-トリフルオロメチル-2H-クロメン-7-イルカルバモイル)ペンチルカルバミン酸tert-ブチエステル(BATCP)、ベンジル((S)-[1-(4-メチル-2-オキソ-2H-クロメン-7-イルカルバモイル)-5-プロピオニルアミノペンチルジカルバメート(MOCPAC)、及び4-(ジメチルアミノ)-N-[7-(ヒドロキシアミノ)-7-オキソヘプチル]-ベンズアミド(M344)が挙げられる。REST活性を阻害するために本明細書に記載されている方法で用いることができる他の好適なHDAC阻害物質はMaes et al.のWO2009/027349に開示されており、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0048】

別の実施形態では、REST複合体は、MeCP2、mSin3a、AOF2、RCOR1、JARID1C、BAF57、BAF170、及びBRG1を含む、抑制複合体の他のメンバーの機能を阻害する作用物質を用いて阻害される。そのような作用物質は、転写抑制複合体が遺伝子プロモーターに結合するのを防ぐことによって作用するか、または複合体のメンバーが互いに相互作用するのを防ぐことによって作用する。好適な作用物質には、阻害性核酸分子、例えば、上記に記載されているようなアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、アプタマー；抗体；及び小分子阻害物質が挙げられる。

20

【0049】

一実施形態では、本明細書に記載されている方法に従って使用されるREST阻害物質は、対象のグリア細胞への阻害物質の送達、すなわち、グリア細胞を標的とするREST阻害物質を達成するためにナノ粒子送達ビヒクル中にパッケージされる。血液脳関門を横切って及び／またはグリア細胞にREST阻害物質を送達するのに適切なナノ粒子送達ビヒクルには、以下に限定されることなく、リポソーム、タンパク質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、及びデンドリマーが挙げられる。

【0050】

リポソームは、サイズが約80~300nmであるリン脂質とステロイド（例えば、コレステロール）の二重層で構成される球状小胞である。リポソームは生分解性で免疫原性が低い。本明細書に記載されているようなREST阻害物質は封入プロセスを用いてリポソームに組み込むことができる。リポソームは、吸着、融合、エンドサイトーシス、または脂質転移により標的細胞によって取り込まれる。リポソームからのREST阻害物質の放出は、リポソームの組成、pH、浸透圧勾配、及び周囲の環境に依存する。リポソームは、細胞小器官に特異的な方法でREST阻害物質を放出して、例えば、REST阻害物質の核送達を達成するように設計することができる。

30

【0051】

本明細書に記載されているREST阻害物質をグリア細胞に送達するのに用いることができるリポソームの方法及び種類は当該技術分野で既知であり、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLiu et al., "Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting", Biomaterials, 35:4835-4847 (2014); Gao et al., "Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes", Biomaterials, 34:5628-5639 (2013); Zong et al., "Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals", Mol. Pharm. 11:2346-2357 (2014); Yemisci et al., "Systemically administered bra

40

50

in-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection”, J. Cerebr. Blood F. Met. 35:469-475 (2015) を参照のこと。

【0052】

別の実施形態では、本明細書に記載されている R E S T 阻害物質はポリマー送達ビヒクル中にパッケージされる。ポリマー送達ビヒクルは通常、直径が約 10 ~ 100 nm の構造である。本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質を封入するのに好適なポリマーナノ粒子は、例えば、ポリ-ε-カプロラクトン、ポリアクリルアミン、及びポリアクリレートのような合成ポリマー、または例えば、アルブミン、ゼラチン、もしくはキトサンのような天然ポリマーから作製することができる。本明細書で使用されるポリマーナノ粒子は、生分解性である、例えば、ポリ(L-ラクチド)(PLA)、ポリグリコリド(PGA)、ポリ(乳酸-α-グリコール酸)(PLGA)であることができるか、または、非生分解性である、例えば、ポリウレタンであることができる。本明細書で使用されるポリマーナノ粒子はまた、送達を増強する1つ以上の表面修飾を含有することもできる。例えば、一実施形態では、ポリマーナノ粒子は免疫学的相互作用と同様に分子間相互作用を低減するために非イオン性界面活性剤でコーティングされる。ポリマーナノ粒子の表面はまた、以下に記載されているような1つ以上の標的指向性部分の結合または固定化のために、例えば、グリア細胞取り込み(すなわち、グリア前駆細胞または星状細胞の取り込み)のためにナノ粒子を導いて血液脳関門を横切らせるかつ／またはグリア細胞に向かわせる抗体または他の結合ポリペプチドまたはリガンドの結合または固定化のために、官能基付加されることもできる。

【0053】

本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質をグリア細胞に送達するのに用いることができる方法及びポリマーナノ粒子の種類は、当該技術分野で既知であり、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Koffie et al. "Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108:18837-18842 (2011); Zhao et al., "The permeability of puerarin loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 on the blood-brain barrier and its protective effect against cerebral ischemia/reperfusion injury", Biol. Pharm. Bull. 36:1263-1270 (2013); Yemisci et al., "Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection", J. Cerebr. Blood F. Met. 35:469-475 (2015) を参照のこと。

【0054】

別の実施形態では、本開示の組成物はデンドリマーナノ担体送達ビヒクル中にパッケージされる。デンドリマーは明確に定義されたサイズと構造を持つ独特のポリマーである。本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質の送達ビヒクルとしての使用に好適である樹枝状構造を有する例示的なナノメートル分子には、以下に限定されることなく、グリコーゲン、アミロペクチン、及びプロテオグリカンが挙げられる。本明細書に記載されている組成物のような治療用組成物をデンドリマーの内部構造に封入する方法は当該技術分野で既知であり、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる D'Emmanuele et al., "Dendrimer-drug interactions",

Adv. Drug Deliv. Rev. 57:2147-2162 (2005) を参照のこと。デンドリマーの表面は、血液脳関門を横切って及び／またはグリア細胞にデンドリマーを標的にすることができる、本明細書に記載されているような抗体または他の結合タンパク質及び／またはリガンドのような1つ以上の標的指向性部分の結合に好適である。
【0055】

それを必要とする対象への投与及び送達のためのREST阻害物質の封入のための例示的なデンドリマーはポリ（アミドアミド）（PAMAM）である。PAMAMは対象とする細胞を標的とするタンパク質及び核酸双方の治療薬の送達に用いられてきた。PAMAM中に治療剤を封入する方法及び中枢神経系に治療剤を送達するためのPAMAMの使用の方法もまた当該技術分野で既知であり、本明細書で用いることができる、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるCerqueira et al., "Multifunctionalized CMChT/PAMAM dendrimer nanoparticles modulate the cellular uptake by astrocytes and oligodendrocytes in primary cultures of glial cells", Macromol. Biosci. 12:591-597 (2012); Nance et al., "Systemic dendrimer-drug treatment of ischemia-induced neonatal white matter injury", J. Control Release, 214:112-120 (2015); Natali et al., "Dendrimers as drug carriers: dynamics of PEGylated and methotrexate-loaded dendrimers in aqueous solution", Macromolecules, 43:3011-3017 (2010); Han et al., "Peptide conjugated PAMAM for targeted doxorubicin delivery to transferrin receptor overexpressed tumors", Mol. Pharm. 7:2156-2165 (2010); Kannan et al., "Dendrimer-based Postnatal Therapy for Neuroinflammation and Cerebral Palsy in a Rabbit Model", Sci. Transl. Med. 4:130 (2012); 及びSingh et al., "Folate and Folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice", Bioconjugate Chem. 19, 2239-2252 (2008) を参照のこと。

【0056】

別の実施形態では、本明細書で開示されているようなREST阻害物質は銀ナノ粒子または酸化鉄ナノ粒子中にパッケージされる。本明細書に記載されているREST阻害物質をグリア細胞に送達するのに用いることができる方法及び用いることができる銀ナノ粒子及び酸化鉄ナノ粒子の調製は、当該技術分野で既知であり、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるHohnholt et al., "Handling of iron oxide and silver nanoparticles by astrocytes", Neurochem. Res. 38:227-239 (2013) を参照のこと。

【0057】

別の実施形態では、本明細書に記載されているようなREST阻害物質は金ナノ粒子中にパッケージされる。金ナノ粒子はエンドサイトーシス経路を介して細胞に入る小さな粒子（<50 nm）である。一実施形態では、金ナノ粒子は、血液脳関門を横切ったナノ粒子の移動と、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるGromnicova et al., "Glucose-coated Gold Nanoparticles Tr

ansfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In vitro”, PLoS ONE 8 (12) : e81043 (2013) によって記載されているようなGLUT-1受容体を介した星状細胞によるナノ粒子の取り込みとを容易にするためにグルコースでコーティングされる。
【0058】

別の実施形態では、本開示の組成物はシリカナノ粒子中にパッケージされる。シリカナノ粒子は、生体適合性であり、多孔性が高く、官能基付加が容易である。シリカナノ粒子は形状が不定形で、10~300nmのサイズ範囲を有する。グリア細胞取り込みのためにREST阻害物質のような治療用組成物をCNSに送達するのに好適であるシリカナノ粒子は当該技術分野で既知であり、例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるSong et al., ”In vitro Study of Receptor-mediated Silica Nanoparticles Delivery Across Blood Brain Barrier”, ACS Appl. Mater. Interfaces, 9 (24) : 20410-20416 (2017) ; Tamba et al., ”Tailored Surface Silica Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Penetration: Preparation and In vivo Investigation”, Arabian J. Chem. doi.org/10.1016/j.arabjch.2018.03.019 (2018) を参照のこと。

【0059】

別の実施形態では、REST阻害物質はタンパク質ナノ粒子送達ビヒクル中にパッケージされる。タンパク質ナノ粒子は生分解性、代謝性であり、治療用の分子または組成物の捕捉及び所望であれば標的指向性分子の結合を可能にするための修飾に容易に受け入れる。当該技術分野で知られており、治療用組成物を中枢神経系に送達するのに用いられてきた好適なタンパク質ナノ粒子送達ビヒクルには、以下に限定されることなく、アルブミン粒子（例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLin et al., ”Blood-brain Barrier Penetrating Albumin Nanoparticles for Biomimetic Drug Delivery via Albumin-Binding Protein Pathway for Antiglioma Therapy”, ACS Nano, 10 (11) : 9999-10012 (2016), 及びRuan et al., ”Substance P-modified Human Serum Albumin Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Targeted Therapy of Glioma”, Acta Pharmaceutica Sinica B, 8 (1) : 85-96 (2018) を参照のこと）、ゼラチンナノ粒子（例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるZhao et al., ”Using Gelatin Nanoparticle Mediated Intranasal Delivery of Neuropeptide Substance P to Enhance Neuro-Recovery in Hemiparkinsonian Rats”, PLoS One 11 (2) : e0148848 (2016) を参照のこと）、及びラクトフェリンナノ粒子（例えば、参照によってその全体が本明細書に組み込まれるKumari et al., ”Overcoming Blood Brain Barrier with Dual Purpose Temozolomide Loaded Lactoferrin Nanoparticles for Combating Glioma (SERP-17-12433)”, Scientific Reports, 7:6602 (2017) を参照のこと）が挙げられる。

【0060】

治療用組成物のナノ粒子媒介性送達は、受動的に（すなわち、体内のリポソームまたはナノ粒子の正規分布パターンに基づいて）、または送達を能動的に標的とすることによって達成することができる。能動的に標的とされた送達は、標的指向性部分をリポソームの

10

20

30

40

50

外面に結合させることによる送達ビヒクルの自然な分布パターンの改変を含む。一実施形態では、本明細書に記載されているような送達ビヒクルは、1つ以上の標的指向性部分、すなわち、血液脳関門を横切るリポソームまたはナノ粒子の送達を促進する標的指向性部分及び／またはグリア細胞取り込み（すなわち、グリア前駆細胞の取り込み及び／または星状細胞の取り込み）を促進する標的指向性部分を含むように修飾される。一実施形態では、本明細書に記載されているような送達ビヒクルは、血液脳関門の貫通を達成するのに好適な標的指向性部分を発現するように表面修飾される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような送達ビヒクルは、グリア細胞取り込みに好適な標的指向性部分を発現するように表面修飾される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような送達ビヒクルは、二重標的指向性部分を発現するように表面修飾される。

10

【0061】

血液脳関門を横切るリポソームまたはナノ粒子の送達を促進する標的指向性部分は、バリアを横切る、受容体媒介性の、輸送体媒介性の、または吸着媒介性の輸送を用いる。血液脳関門の通過を達成するのに好適な標的指向性部分には、内皮細胞表面のタンパク質及び受容体に結合する抗体及びリガンドが挙げられる。例示的な標的指向性部分には、以下に限定されることなく、環状RGDペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLiu et al., "Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting", *Biomaterials*, 35:4835-4847 (2014)）、VEGFR2及びニューロピリン-1に結合する環状A7Rペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれる、Ying et al., "A Stabilized Peptide Ligand for Multifunctional Glioma Targeted Drug Delivery", *J. Contr. Rel.* 243:86-98 (2016)）、トランスフェリン受容体に結合することができるトランスフェリンタンパク質、ペプチド、または抗体（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるZong et al., "Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals", *Mol. Pharm.* 11:2346-2357 (2014)；Yemisci et al., "Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection", *J. Cerebr. Blood F. Met.* 35:469-475 (2015)；及びWei et al., "Brain Tumor-targeted Therapy by Systemic Delivery of siRNA with Transferrin Receptor-Mediated Core-Shell Nanoparticles", *Inter. J. Pharm.* 510 (1):394-405), Nie woehner et al., "Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Shuttle", *Neuron*, 81:49-60 (2014)）、葉酸受容体を結合する葉酸タンパク質またはペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるGao et al., "Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes", *Biomaterials*, 34:5628-5639 (2013)）、ラクトフェリン受容体を結合するラクトフェリンタンパク質またはペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるSong et al., "In vitro Study of Receptor-mediated Silica Nanoparticles Delivery Across Blood Brain Barrier", *ACS A*

20

30

40

50

ppl. Mater. Interfaces, 9 (24) : 20410–20416 (2017))、ApoB及びApoEのような低密度リポタンパク質受容体リガンド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWagner et al., "Uptake Mechanisms of ApoE-modified Nanoparticles on Brain Capillary Endothelial Cells as a Blood-brain Barrier Model", PLoS One 7:e32568 (2012))、サブスタンスPペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるRuan et al., "Substance P-modified Human Serum Albumin Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Targeted Therapy of Glioma", Acta Pharmaceutica Sinica B 8, (1) : 85–96 (2018))、及びアングリオペップ-2 (An2) ペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるDemeule et al., "Conjugation of a brain-penetrant peptide with neurotensin provides antinociceptive properties", J. Clin. Invest. 124:1199–1213 (2014))が挙げられる。他の好適な標的指向性部分には、アミノ酸輸送体のリガンド、例えば、グルタチオン輸送体を介した輸送のためのグルタチオン（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるRip et al., "Glutathione PEGylated Liposomes: Pharmacokinetics and Delivery of Cargo Across the Blood-Brain Barrier in Rats", J. Drug Target, 22:460–67 (2014))、及びコリン輸送体を介した送達のためのコリン誘導体（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLi et al., "Choline-derivative-modified Nanoparticles for Brain-targeting Gene Delivery", Adv. Mater. 23:4516–20 (2011))が挙げられる。

【0062】

第2の標的指向性部分はグリア細胞の送達及び取り込みを促進するものである。星状細胞取り込みを達成するための好適な標的指向性部分には、以下に限定されることなく、星状細胞上の低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体及び酸化型LDL受容体を結合することができるLDL受容体リガンドまたはそのペプチド（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLucarelli et al., "The Expression of Native and Oxidized LDL Receptors in Brain Microvessels is Specifically Enhanced by Astrocyte-derived Soluble Factor(s)", FEBS Letters, 522 (1–3) : 19–23 (2002))、星状細胞上のGLUT-1受容体を結合することができるグルコースまたは他のグリカン（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるGromnicova et al., "Glucose-coated Gold Nanoparticles Transfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In vitro", PLoS ONE 8 (12) : e81043 (2013))、及びグリア前駆細胞のPDGFR α を結合することができる血小板由来成長因子またはそのペプチドが挙げられる。

【0063】

本明細書に記載されているような、阻害性核酸分子、例えば、RESTアンチセンスオリゴヌクレオチド、REST siRNA、REST shRNAのグリア細胞送達は、そのような核酸分子をウイルスベクター中にパッケージすることによっても達成することができる。いくつかのウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクター（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるColin et al., "Engineered Lentiviral Vector Targeting Astrocytes In

vivo”, *Glia*, 57:667–679 (2009), 及び Cannon et al., “Pseudotype-dependent Lentiviral Transduction of Astrocytes or Neurons in the Rat Substantia Nigra”, *Exp. Neurol.* 228:41–52 (2011)) 及びアデノ随伴ウイルスベクター (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Furman et al., “Targeting Astrocytes Ameliorates Neurologic Changes in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease”, *J. Neurosci.* 32:16129–40 (2012)) は生体内で星状細胞を本質的に標的とすることが知られているので本明細書に記載されている方法に従って核酸 REST 阻害性分子の送達を達成するのに好適である。

10

【0064】

本明細書で使用されるとき、「治療すること」または「治療」には、グリア細胞におけるカリウムチャネル遺伝子の発現を部分的または全体的に回復させるまたは抑制解除するための、グリア細胞におけるカリウムチャネル取り込み活性を部分的または全体的に回復させるための、ならびにグリア細胞及び周辺組織におけるカリウム恒常性を部分的または全体的に回復させるための REST 阻害物質の投与が含まれる。神経精神状態を有する対象の治療に関して、「治療すること」には、症状の軽減、寛解、減少 (例えば、神経興奮性の低下)、または状態を患者にとってより耐えられる状態 (例えば、発作発生) にすること; 状態の進行を遅らせること; 状態を消耗させないようにすること; または対象の身体的もしくは精神的な健康を改善することのような客観的または主観的パラメーターを含む、状態の改善における成功の兆候が含まれる。症状の治療または改善は、身体検査、神経学的検査、及び/または精神鑑定の結果を含む、客観的なまたは主観的なパラメーターに基づくことができる。

20

【0065】

本明細書で言及されるとき、「有効な条件下で」は、対象にとって所望の治療効果を達成するのに役割を担う有効な用量、投与経路、投与の頻度、REST 阻害物質の製剤化などを指す。対象においてグリア細胞による K^+ 取り込みを回復させる及び/または対象において神経精神障害を治療するまたはその発症を抑制するための REST 阻害物質の有効用量は、カリウムチャネル遺伝子発現を部分的または全体的に抑制解除するのに有効であり、次にカリウムチャネル取り込み機能を (部分的または全体的に) 回復させ、脳のカリウム恒常性の回復を可能にする REST 阻害物質の用量である。統合失調症のような神経精神障害を有する対象に REST 阻害物質を投与する場合、有効用量は、カリウムの細胞外レベルを低下させるのに、ニューロンの興奮性を低下させるのに、かつ/または発作発生を減らすのに十分なレベルに脳のカリウム恒常性を回復させる用量である。神経精神障害を有する対象を治療するのに有効な投与量は、対象において認知障害を改善するのに有効な投与量である。特定の対象に対する有効量は、例えば、治療される個体の健康状態及び身体状態、個体の精神的及び感情的な能力、障害のステージ、REST 阻害物質の種類、投与の経路、製剤化、主治医による医学的状況の評価、及びその他の関連要因に応じて変化する。

30

40

【0066】

一実施形態では、 K^+ 取り込み障害を有するグリア細胞はグリア前駆細胞である。本明細書の実施例に示されるように、グリア前駆細胞における REST 上方調節は K^+ チャネル遺伝子発現を抑制し、続いてグリア前駆細胞による K^+ 取り込みを抑制する。 K^+ 取り込みの減少は終末グリア前駆細胞の分化を阻害する。したがって一実施形態では、REST 阻害物質の有効用量は、グリア前駆細胞による星状膠細胞への成熟を増強する用量であり、神経精神疾患の発症、神経精神疾患の症状、または疾患の副作用を低減、排除、または抑制する用量である。

【0067】

別の実施形態では、 K^+ 取り込み障害を有するグリア細胞は星状細胞である。星状細胞

50

における R E S T 阻害は、影響を受けた星状細胞において K^+ 取り込みとそれに続く K^+ の恒常性を回復させる。神経精神疾患（カリウムチャネルの発現と機能が変化する）を有する対象の星状細胞における R E S T 阻害は、ニューロンの興奮性を低下させ、発作発生を減らし、かつ認知障害を改善する。したがって、有効量の R E S T 阻害物質による治療は、統合失調症、自閉症スペクトラム症、双極性障害、またはその他の神経精神障害に関連する症状または状態の進展を減らすか、緩和するか、阻止するか、または抑制する。治療は、疾患、状態、もしくは障害の発症もしくは悪化を予防するもしくは遅延させるために、またはそれらの臨床的な症状もしくは無症候性の症状の発現を予防するために予防的であってもよい。あるいは、治療は、疾患、状態、または障害の発現後の症状を抑制及び／または緩和するために治療的であってもよい。

10

【0068】

対象、例えば神経精神状態を有する対象におけるグリア細胞 K^+ 取り込みを回復させるのに有用な R E S T 阻害物質は、脳内送達、髄腔内送達、鼻腔内送達、または脳室への直接注入を介して非経口で投与されてもよい。

【0069】

一実施形態では、非経口投与は輸液によるものである。注入される R E S T 阻害物質はポンプで送達されてもよい。特定の実施形態では、注入された R E S T 阻害物質の広範な分布は、頭蓋内投与、髄腔内投与、または脳室内投与による脳脊髄液への送達によって達成される。

【0070】

特定の実施形態では、注入された R E S T 阻害物質は組織に直接送達される。そのような組織の例には線条体組織、脳室内組織、及び尾状組織が挙げられる。R E S T 阻害物質の特異的な局在化は標的組織への直接注入によって達成されてもよい。

20

【0071】

いくつかの実施形態では、非経口投与は注射によるものである。注入物は注射器またはポンプで送達されてもよい。特定の実施形態では、注射は組織に直接ボーラス投与される。そのような組織の例には線条体組織、脳室内組織、及び尾状組織が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む薬剤の特異的な局在化は標的組織への注射を介して達成することができる。

【0072】

いくつかの実施形態では、標的組織への R E S T アンチセンスオリゴヌクレオチドのような R E S T 阻害物質の特異的な局在化は、阻害物質の広範な拡散と比べて阻害物質の薬物動態プロファイルを改善する。R E S T 阻害物質の特異的な局在化は、阻害物質の広範な拡散と比べて効力を改善し、さらに少ない阻害物質の投与を必要として同様の薬効薬理を達成する。「類似の薬効薬理」は、標的 R E S T mRNA 及び／または標的 R E S T タンパク質が下方調節される／阻害される時間の量を指す（例えば、作用の持続時間）。特定の実施形態では、ボーラス注射によるような R E S T 阻害物質を特異的に局在化させる方法は、阻害物質の中央値有効濃度（ EC_{50} ）を約 20 分の 1 に低下させる。

30

【0073】

別の実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質は 1 つ以上の他の薬剤と同時投与される。本開示のこの実施形態によれば、そのような 1 つ以上の他の薬剤は本明細書に記載されている R E S T 阻害物質と同じ疾患、障害、または状態、またはそれに関連する 1 つ以上の症状を治療するように設計される。一実施形態では、1 つ以上の他の薬剤は本開示の 1 つ以上の薬学的組成物の望ましくない副作用を治療するように設計される。一実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質は望ましくない効果を治療するために別の薬剤と同時投与される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質は組み合わせ効果を生み出すために別の薬剤と同時投与される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質は相乗効果を生み出すために別の薬剤と同時投与される。

40

【0074】

50

一実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質及び別の薬剤は同時に投与される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質及び別の薬剤は異なる時間に投与される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質及び別の薬剤は単一の製剤と一緒に調製される。別の実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質及び別の薬剤は別々に調製される。
【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているような R E S T 阻害物質と同時に投与されてもよい薬剤には、例えば、ハロペリドール、クロルプロマジン、クロザピン、クエチアピン、及びオランザピンのような統合失調症治療薬；例えば、フルオキセチン、塩酸セルトラリン、ベンラファキシン及びノルトリプチリンのような抗うつ剤；例えば、ベンゾジアゼピン、クロナゼパム、パロキセチン、ベンラファキシン、及びベータ遮断薬のような精神安定剤；ならびに、例えば、リチウム、バルプロ酸、ラモトリジン、及びカルバマゼピンのような気分安定剤が挙げられる。

10

【0076】

本発明の所与の態様、特徴、実施形態、またはパラメーターの選好及び選択肢は、文脈が別段の指示をしない限り、本発明の他のすべての態様、特徴、実施形態、及びパラメーターの選好及び選択肢すべてと組み合わせて開示されていると見なされるべきである。

【実施例】

【0077】

材料及び方法

20

患者の識別、保護、及び試料採取。人工多能性幹細胞 (i P S C) 由来のグリア前駆細胞 (G P C) が由来する患者は、青年期初期に発症する統合失調症の重度障害の程度と診断された。すべての患者とその保護者は小児青年精神科医に同意し／承諾し、大学病院症例医療センターの施設内審査委員会の承認されたプロトコールの下でその後の方針の指定について盲検化された。治験責任医師は患者 I D へのアクセスを有さなかった。

【0078】

細胞供給源及び細胞株。統合失調症由来の i P S C 細胞株は、小児期に発症した統合失調症の対象から作製し、対照細胞株は、年齢及び性別が適した対照対象から作製した。i P S C 細胞株はすべて、以前に報告されたように導き出した (Windrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21:195-208. e6 (2017)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。追加の制御細胞株 (C27) は Lorenz Studer 博士 (Memorial Sloan-Kettering) によって気前よく提供された。対照に由来する細胞株には CWRU-22、-17、-37、-208、及び C27 が含まれ；SCZ 由来の細胞株には、CWRU-8、-51、-52、-193、-164、-29、-30、及び -31 が含まれた (表1)。CWRU-51/52 及び CWRU-29/30/31 は同じ患者からの異なる細胞株で構成され、単一の患者からの細胞株間変動を推定するために評価された。i P S C はすべて、Cre 切除可能な山中因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc) のレトロウイルス発現によって線維芽細胞から生成し (Takahashi et al., "Induction of Pluripotent Stem Cells From Adult Human Fibroblasts by Defined Factors", Cell, 131:861-872 (2007)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)、記載されているように多能性及び核型安定性の検証を行った (Windrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21:195-208. e6 (2017)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。

30

40

【0079】

50

(表 1) 本試験で使用された患者由来の i P S C 細胞株

対象 番号	hiPSC 細胞株	対象の 年齢	性別	民族	GPCのRNA 配列決定	星状細胞の 分化	カリウム 取り込み
対照対象							
CTR 1	22	26	M	C	√	√	√
CTR 2	37	32	F	AA	√	√	√
CTR 3	208	25	M	C	√	√	√
CTR 4	C27	NA	NA	NA	√	√	√
統合失調症の対象							
SCZ 1	51	16	M	C	√	√	√
SCZ 2	29, 30, 31	12	M	C	√	√	√
SCZ 3	193	15	F	NA		√	√
SCZ 4	164	14	F	AA	√	√	√
SCZ 5	8	10	F	C	√		

本試験で使用された細胞株は、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Windrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21:195-208. e6 (2017) において以前記載され、公開された 2017。本試験で追加された追加の操作、つまり、星状細胞の分化、及び結果として生じる分化した星状細胞による K⁺ 取り込みの評価は、最も右側の 2 つの縦列に言及されている。

【0080】

hiPSC の培養及び継代。hiPSC は、10 ng/ml の bFGF (Invitrogen、13256-029) で補完した hES 培地 (下記参照) 中の 100 万～120 万個の細胞/ウェルで 0.1%ゼラチンをコーティングした 6 ウェルプレート中の、照射されたマウス胚性線維芽細胞 (MEF) 上で培養した。培地交換は毎日行い、細胞は培養の 4～7 日後に 80% の集密度で継代した。hiPSC 継代については、細胞を先ず 1 ml のコラゲナーゼ (Invitrogen、17104-019) とともに 37℃ で 3～5 分間インキュベートし、次に細胞を 15 ml に試験管に移して 3 分間遠心分離した。bFGF を含む ES 培地にペレットを再浮遊させ、1:3～1:4 で新しく照射した MEF 上に載せた。

【0081】

hiPSC からの GPC 及び星状細胞の生成。hiPSC が 80% の集密度に達したら、それらを 1 ml のディスパーゼ (Invitrogen、17105-041) とともにインキュベートして胚様体 (EB) の生成を可能にし、bFGF を含まない ES 培地でこれらを 5 日間培養した。DIV 6 で、EB をポリオルニチン (Sigma、P4957) 及びラミニン (VWR、47743) でコーティングしたディッシュに入れ、20 ng/ml の bFGF、2 µg/ml のヘパリン及び 10 µg/ml のラミニンで補完した神経誘導培地 (NIM; 以下を参照) (Wang et al., "Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination", Cell Stem Cell, 12:252-264 (2013)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる) 中で 10 日間培養した。

【0082】

DIV 25 において、EB を 2 ml のガラスピペットで静かにこすり取り、次いで 1 µM のプルモルファミン (Calbiochem、80603-730) 及び 0.1 µM の RA (Sigma、R2625) を加えた NIM 中で培養した。DIV 33 で、NPC が出現し、1 µM プルモルファミンと 10 ng/ml の bFGF を含む NIM に 7 日間順次

切り替え、その後続いて1 μ M プルモルファミンを含むグリア誘導培地（GIM）（Wang et al., "Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination", Cell Stem Cell, 12:252-264 (2013)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）でさらに15日間培養した。DIV 56において、得られたグリア球を解剖顕微鏡下にて顕微手術用ブレードで機械的に切断し、10 ng/mlのPDGF、10 ng/mlのIGF、及び10 ng/mlのNT3を伴ったGIMに切り替え、2日ごとに培地を交換した。DIV 150~180において、GPCをマウス抗CD44マイクロビーズ（1:50）とともにインキュベートし、次にウサギ抗マウスIgG2a+bマイクロビーズ（1:100）とともにインキュベートし、さらに磁気スタンドカラムを伴った磁気細胞選別（MACS）によって選別した。次に、CD44⁺細胞を10% FBSと20 ng/mlのBMP4で補完したM41中で星状細胞に3週間誘導した。

【0083】

培地レシピは、表2（塩基、hESC、及び神経培地）及び表3（グリア及び星状細胞の誘導培地）に列記されている。

【0084】

（表2）培地配合：塩基、hESC、及び神経培地

MEF 培地			
構成成分	濃度	供給業者	カタログ
ダルベッコの改変イーグル培地	1X	Invitrogen	11965-092
ウシ胎仔血清	10%	Invitrogen	16000-044
非必須アミノ酸	1X	Invitrogen	11140-050

hES 培地			
構成成分	濃度	供給業者	カタログ
ダルベッコの改変イーグル培地/栄養素混合物F-12	1X	Invitrogen	11330-032
ノックアウト血清交換	20%	Invitrogen	10828-028
L-グルタミン	1mM	Invitrogen	25030-081
2-メルカプトエタノール	0.1mM	Sigma	M7522
非必須アミノ酸	1X	Invitrogen	11140-050

神経誘導培地			
構成成分	濃度	供給業者	カタログ
ダルベッコの改変イーグル培地/栄養素混合物F-12	1X	Invitrogen	11330-032
非必須アミノ酸	1X	Invitrogen	11140-050
N2サプリメント	1X	Invitrogen	17502-048
組換えヒトFGF-2タンパク質	20 ng/ml	Sigma	F0291
ヘパリン溶液	2 μ g/ml	Fisher Scientific	NC0668440
ラミニン	10 μ g/ml	Fisher Scientific	CB-40232

【0085】

（表3）培地配合：グリア及び星状細胞の誘導培地

10

20

30

40

50

グリア培地			
構成成分	濃度	供給業者	カタログ
ダルベッコの改変イーグル培地／F12	1X	Invitrogen	11330-032
B27サプリメント	1X	Invitrogen	12587-010
N1サプリメント	1X	Sigma	N6530
非必須アミノ酸	1X	Invitrogen	11140-050
トリヨード-L-チロニン(T3)	60ng/ml	Sigma	T5516-1mg
N6, 2-O-ジブチリル環状AMP	1μM	Sigma	D0260
ビオチン	100ng/ml	Sigma	B4639
組換えヒトPDGF-AA	10ng/ml	R&D	221-AA-50
組換えヒトIGF-1タンパク質	10ng/ml	R&D	291-G1-050
組換えヒトNT3タンパク質	10ng/ml	R&D	267-N3-025
抗生剤／抗真菌剤	0.5X	Invitrogen	15240-096

10

星状細胞培地			
構成成分	濃度	供給業者	カタログ
ダルベッコの改変イーグル培地／栄養素混合物F-12	1X	Invitrogen	11330-032
N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸	1X	Invitrogen	15630-080
N1サプリメント	1X	Sigma	N6530
非必須アミノ酸	1X	Invitrogen	11140-050
D-グルコース	46.4mM	Sigma	G8769
ピルビン酸ナトリウム	1.5mM	Invitrogen	11360-070
L-グルタミン	6.35mM	Invitrogen	25030-081
ペニシリン・ストレプトマイシン	40U/ml	Invitrogen	15140-122
亜セレン酸塩	0.065μg/ml	Sigma	S9133
プロゲステロン	0.057μg/ml	Sigma	P6149

20

30

【0086】

FACS／MACS選別。細胞をアクターゼとともに37℃で5分間インキュベートして単一細胞浮遊液を得た後、200RCFで10分間遠沈した。これらのGPCを、一次抗体（FACSについてはフィコエリスリン（PE）結合マウス抗CD140a、1：50、MACSについてはマウス抗CD140a、1：100）とともに冷Miltenyi洗浄緩衝液に再浮遊させ、10分ごとに穏やかにかけ回して氷上で30分間インキュベートした。一次抗体のインキュベートの後、これらの細胞を洗浄し、二次抗体（ウサギ抗マウスIgG2a+bマイクロビーズ、1：100）とインキュベートした後、MACSの磁気スタンドカラムで選別したか、またはFACS Aria IIIu（Becton-Dickinson）においてFACSで直接選別した。選別した細胞を数え、さらなる実験のために、ポリオルニチン及びラミニンでコーティングした24ウェルプレートに入れた。一次抗体及び二次抗体を表4中にリストにする。

40

【0087】

（表4）FACS／MACS選別に使用された抗体

50

抗原	名称	希釈	会社
SSEA4	マウス抗SSEA4 FITC コンジュゲート	1:20	Life Technologies
CD133	マウス抗CD133 APC コンジュゲート	1:50	Miltenyi Biotech
CD140a	マウス抗CD140a PE コンジュゲート	1:50	BD
CD44	マウス抗CD44 マイクロビーズ	1:50	Miltenyi Biotech
CD140a	マウス抗CD140a	1:100	BD
二次抗体	ウサギ抗マウス IgG2a+b マイクロビーズ	1:100	Miltenyi Biotech

10

【0088】

RT-PCR。miRNeasyミニキット（Qiagen、217004）によって細胞株から全RNAを抽出し、次いでTaqman逆転写キット（N808-0234）によってcDNAに逆転写した。mRNAの相対的発現をBio-RAD S6048によって測定し、18SmRNAの発現に対してさらに基準化した。プライマー配列を表5でリストにする。

【0089】

（表5）RT-PCRプライマー

20

標的	順方向プライマー	逆方向プライマー
18S	CTGGATACCGCAGCTAGGAA (SEQ ID NO: 9)	CCCTCTTAATCATGGCCTCA (SEQ ID NO: 10)
GFAP	TGCGGCCGATTGTGAAC (SEQ ID NO: 11)	CCTCTTTTCTCTGCGGAACGT (SEQ ID NO: 12)
KCNJ9	GTTATCCTCGAGGGCATGGT (SEQ ID NO: 13)	CGTCCTCCAGAGTCAGCACT (SEQ ID NO: 14)
SLC12A6	AACTGTTAGACGACGGACATAG (SEQ ID NO: 15)	CTTCGGTCTGGTGTCCATTT (SEQ ID NO: 16)
ATP1A2	TGAACCATCCAACGACAATCTA (SEQ ID NO: 17)	CTTGCTGAGGTACCATGTTCT (SEQ ID NO: 18)
REST	ATGCGTACTCATTGAGGTGAGA (SEQ ID NO: 19)	TGTGAACCTGTCTTGCATGG (SEQ ID NO: 20)

30

【0090】

生体外免疫細胞化学。細胞をまず室温にて5分間4%パラホルムアルデヒドで固定した。チメロサルを含むPBSで3回洗浄した後、細胞に0.1%サポニンと1%のヤギ血清またはロバ血清を室温で15分間浸透させた。RTで15分間、5%のヤギ血清またはロバ血清と0.05%のサポニンでさらに細胞をブロックした。4℃で一晩一次抗体とインキュベートした後、これらの細胞を室温で30分間二次抗体とともにインキュベートした。一次抗体及び二次抗体を表6でリストにする。

40

【0091】

（表6）免疫細胞化学に使用された抗体

50

抗原	名称	希釈	会社
Nanog	ウサギ抗 Nanog	1:200	Millipore
TRA1-60	マウス抗 TRA1-60	1:200	Millipore
PAX6	ウサギ抗 PAX6	1:400	Covance
SOX1	ヤギ抗 SOX1	1:200	R&D
hGFAP	マウス抗ヒト(特異的) GFAP	1:500	Covance
PDGFRa	ウサギ抗 PDGFRa, クローンD13C6	1:300	Cell Signaling
二次抗体	AlexaFluor 594 ロバ抗マウス IgG (H+L)	1:400	Invitrogen
	AlexaFluor 488 ロバ抗マウス IgG (H+L)	1:400	Invitrogen
	AlexaFluor 594 ロバ抗ウサギ IgG (H+L)	1:400	Invitrogen
	AlexaFluor 488 ロバ抗ウサギ IgG (H+L)	1:400	Invitrogen
	AlexaFluor 594 ロバ抗ヤギ IgG (H+L)	1:400	Invitrogen

10

【0092】

分子クローニング。ヒトRESTのshRNA（標的配列：GCAGTGGCAACATTGGAATGG (SEQ ID NO: 4) or CGGCTACAATACTAATCGA (SEQ ID NO: 6)

20

）を、ピューロマイシンのすぐ下流のベクターpTANK-EF1a-CoGFP-Puro-WPREにクローニングした。RESTのヒトcDNA（Stephen Ell edgeからの贈与，Addgeneプラスミド41903）（参照によってその全体が本明細書組み込まれるWestbrook et al., "SCFbeta-TRCP Controls Oncogenic Transformation and Neural Differentiation Through REST Degradation", Nature, 452:370-374 (2008)）は、ベクターpTANK-EF1a-IRES-mCherry-WPRE（参照によってその全体が本明細書組み込まれるBenraiss et al., "Human Glia Can Both Induce and Rescue Aspects of Disease Phenotype in Huntington Disease", Nat. Commun. 7:11758 (2016)）のEF1aプロモーターの直後にクローニングした。レンチウイルスベクターは、レポーターmCherryと連動してRESTの発現を可能にした。

30

【0093】

最終的な構築物を配列決定によって正しい挿入について検証した。プラスミドは、レンチウイルス生成のためにX-tremeGENE (Roche, 06366236001) を介してpLP-VSV (Invitrogen, K497500) 及びpsPAX2 (Didier Tronoからの贈与, Addgeneプラスミド12260) とともに293FT細胞 (Fisher Scientific, R70007) に同時形質移入した。293T細胞の上清を回収し、76000RCFで3時間遠沈してウイルスを濃縮した (Beckman, L8-70, 超遠心分離機)。ウイルスの10倍連続希釈液を調製し、293T細胞に形質導入し、ウイルス滴定の測定のために蛍光コロニーを数えた。MACSで選別したCD44+細胞にLenti-RESTまたは対照ウイルスによってそれぞれ1MOI（感染多重度）において4時間形質導入した。

40

【0094】

カリウム取り込み。ポリオルニチン及びラミニンでコーティングした24ウェルプレートに30,000個の細胞/ウェルで星状細胞を入れた。カリウム取り込みアッセイにつ

50

いては、星状細胞を ^{86}Rb (1.0~3.3 $\mu\text{Ci}/\text{ウェル}$) とともに15分間インキュベートした後、氷冷した人工脳脊髄液 (aCSF、500 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) で3回洗浄した。細胞溶解については、0.5NのNaOH (200 $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) を各ウェルに入れ、それを5mlのカクテル液 (Ultima Gold、Fisher Scientific、509050575) に入れ、シンチレーションカウンター (Beckman Coulter、LS6500) で測定し、結果を総タンパク質 (BCA Protein Assay Kit、Fisher Scientific、23227) と細胞数 (Hemocytometer、Fisher Scientific、02-671-54) の双方に対して基準化した。aCSF溶液は (mMで) 124のNaCl、2.5のKCl、1.75の NaH_2PO_4 、2の MgCl_2 、2の CaCl_2 、0.04のVit. C、10のグルコース及び26の NaHCO_3 、pH7.4を含有した。

【0095】

実施例1 — 星状細胞の分化はSCZ GPCにおいて損なわれていた

iPSCは、以前記載された (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Windrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21:195-208. e6 (2017)) ように、小児期に発症した統合失調症の患者から、ならびに既知の精神疾患のない健康な若年成人対照から得られた皮膚試料から作製した。年齢、性別、人種、診断及び投薬歴が細胞株識別子を伴っていたが、患者識別子は治療する精神科医以外の治験責任医師には用いることができなかった。手短に言えば、線維芽細胞を各試料から単離した。これらから、8つのhiPSC細胞株が患者試料と正常対照 (5人の若年発症統合失調症患者及び3人の健康な性別が一致し年齢が類似した対照 (表1)) から導出された。iPSCは、Oct4、Sox2、Klf4及びc-Myc (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Takahashi et al., "Induction of Pluripotent Stem Cells From Adult Human Fibroblasts by Defined Factors", Cell, 131:861-872 (2007); Welstead et al., "Generating iPSC Cells From MEFS Through Forced Expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4", J. Vis. Exp. (14):734 (2008)) をコードする切除可能なloxPに挟まれたポリシストロン性hSTEMCCAレンチウイルス (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Somers et al., "Generation of Transgene-Free Lung Disease-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette", Stem Cells, 28:1728-1740 (2010); Zou et al., "Establishment of Transgene-Free Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed From Human Stem Cells of Apical Papilla for Neural Differentiation", Stem Cell Res. Ther. 3:43 (2012)) を用いて生成した。細胞株はすべて、多能性遺伝子発現を評価するためにRNA配列決定及び免疫標識を用いて多能性として検証された。短縦列反復 (STR) に基づくDNAフィンガープリントを用いて、各iPSC細胞株の独自性が親ドナー線維芽細胞と一致することを確認し、ゲノムの完全性を確認するために各細胞株を核型分析した。4番目のhiPSC対照細胞株であるC27 (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Chambers et al., "Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and iPSC Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling", Nature Biotechnology, 27:275-280 (2009)) も用いてゲノムデータ及び表現型データ

10

20

30

40

50

のすべてが以前の研究（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWang et al., "Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination", Cell Stem Cell, 12:252-264 (2013)）と一致していることを確認した。

【0096】

SCZ患者と対照対象（4人の異なる患者からのn=4細胞株、それぞれが3回以上の反復／患者、それぞれ対合する対照に対して）に由来する細胞のグリア分化効率を、以前記載された（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWang et al., "Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination", Cell Stem Cell, 12:252-264 (2013)）ようにこれらのiPSC細胞をGPCに運命づけ、時間の関数として成熟のステージ特異的マーカーの発現を評価することによって比較した。調べたすべてのiPSCは、典型的なコロニーを呈し、フローサイトメトリーによってSSEA4を含む多能性のマーカーを発現することが見いだされた（図1A）。神経前駆細胞（NPC）の段階では、ICC及びフローサイトメトリーの双方は、段階選択マーカーであるペアードボックスタンパク質pax-6（PAX6）、性別決定領域Yボックス1（SOX1）、及び細胞表面マーカーであるプロミニン-1／CD133の発現レベルはCTR由来とSCZ由来の細胞株間で差異がないことを明らかにした（図1B及び図2A）。GPCの段階では、GPC選択的血小板由来成長因子受容体アルファ（PDGFRA／CD140a）の発現について細胞を同様に評価した（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるSim et al., "CD140a Identifies a Population of Highly Myelogenic, Migration-Competent and Efficiently Engrafting Human Oligodendrocyte Progenitor Cells", Nature Biotechnology, 29:934-941 (2011)）が、それはGPC生成の効率がSCZ由来のNPCとCTR由来のNPC間で有意差がないことを明らかにした（図1C及び図2B）。したがって、SCZのiPSCとCTRのiPSCの分化における差異はGPC段階の間では指摘されなかった。

【0097】

その時点で、これらのSCZ由来及びCTR由来のGPCは、20ng/mlのBMP4を含むM41培地で3週間インキュベートした後、さらに星状細胞に分化した。免疫標識により、GFAP⁺星状細胞の割合は、SCZの細胞株（4つのSCZの細胞株、n≥3／各細胞株、4つのSCZ細胞株の平均／39.9%±2.0%；両側t検定によるP<0.001）よりも対照細胞株（4つのCTRの細胞株、n≥3／各細胞株、4つのCTRの細胞株の平均／70.1%±2.4%）で有意に高いことが明らかになった（図2C）。星状細胞分化のこの欠陥は、CTR GPCと比べてSCZ GPCすべてで一貫して観察され、生体内で以前に記載された星状膠細胞の分化欠陥との生体外での相関を含んだ（Windrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21:195-208.e6 (2017)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0098】

実施例2 — SCZ星状細胞はカリウム取り込みの減少を示す

SCZ GPCの星状細胞分化の欠陥に対する分子付随物を同定するために、生体外にて154日から242日に及ぶ時点で3つの異なるCTR由来細胞株及び4つのSCZ由来細胞株からFACSによって選別したCD140a+GPCでRNA配列決定を実施した（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWindrem et al., "H

uman iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia”, *Cell Stem Cell*, 21:195–208. e6 (2017)). Illumina HiSeq 2500プラットフォームでのRNA配列決定用のポリA選択によって、1試料あたり約4,500万の1×100bpの読み取りについてこれらの細胞からmRNAを単離した。元のカウントを分析して、5% FDR及びlog₂変化倍率>1での疾患調節不全遺伝子を決定した。それによって、対照iPSC hGPCと比べてCD140aで選別したSCZ hGPCによって一貫して有意に差次的に発現された118個のmRNAが同定されていた(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWindrem et al., ”Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia”, *Cell Stem Cell*, 21:195–208. e6 (2017))。これらの中で、グリア系列の進行に関与する多数の遺伝子が正常な対照と比べてSCZ hGPCで下方調節されたということは、SCZ由来のグリア前駆細胞の固有の欠陥のせいで、星状膠細胞の分化がSCZでは細胞自律的に損なわれていたことを示唆している。

【0099】

SCZ GPCの星状細胞分化の障害とともに、RNA配列決定のデータは、上手く分化している星状細胞がそれにもかかわらず機能的に損傷する可能性があることを示唆していた。特に、RNA配列決定は、そのすべてが星状細胞によるカリウム取り込みに重要な役割を担う(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLarsen et al., ”Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to Hippocampal K⁺ Clearance and Volume Responses”, *Glia*, 62:608–622 (2014); Macaulay及びZeuthen, ”Glial K⁺ Clearance and Cell Swelling: Key Roles for Cotransporters and Pumps”, *Res. Neurochem.* 37:2299–2309 (2012)) (図4A) Na⁺-K⁺ATPアーゼ、Na⁺-K⁺/2Cl⁻共輸送体(NKCC)及びカリウムチャネルを内向きに整流するKirファミリーを含む幅広いセットのカリウムチャネル(KCN)をコードする遺伝子のSCZ GPCにおける下方調節された転写を明らかにした(図3A)(参照によってその全体が本明細に組み込まれるWindrem et al., ”Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia”, *Cell Stem Cell*, 21:195–208. e6 (2017))。これらの調節不全KCN遺伝子の間で、それぞれのNa⁺/K⁺-ATPアーゼ、Na⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体、及びKir3.3電位依存性K⁺チャネルをコードするATP1A2、SLC12A6、及びKCNJ9(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるBottger et al., ”Glutamate-System Defects Behind Psychiatric Manifestations in a Familial Hemiplegic Migraine Type 2 Disease-Mutation Mouse Model”, *Sci. Rep.* 6:22047 (2016); Gamba及びFriedman, ”Thick Ascending Limb: The Na⁺:K⁺:2Cl⁻ Cotransporter, NKCC2, and the Calcium-Sensing Receptor, CaSR”, *Pflugers Arch.* 458:61–76 (2009); Lesage et al., ”Molecular Properties of Neuronal G-Protein-Activated Inwardly Rectifying K⁺ Channels”, *J. Biol. Chem.* 270:28660–28667 (1995))は4つの対照細胞株と比べて評価された4つのSCZの細胞株すべてにおいて一貫して実質的に下方調節された。これらの知見は、SCZのグリアによるK⁺取り込みの広範な障害を示唆した。

10

20

30

40

50

【0100】

これらのゲノムデータに基づいて、 K^+ 取り込みがSCZの星状細胞で実際に損なわれているかどうかを評価した。この仮説に対処するために、qPCRを用いて、これらの K^+ チャネル関連遺伝子がSCZのグリアで調節不全であるかどうかを確認した。それらは実際に有意に下方調節されていたのでRNA配列決定分析を実証した（図3B及び図4B）。次に、機能的な K^+ 取り込みを培養したSCZ由来及びCTR由来の星状細胞で直接評価した。成熟したSCZ及びCTRの星状細胞培養物を得るために、CD44で選別した星状細胞に偏った前駆細胞を10%ウシ胎児血清（FBS）及び20 ng/mlのBMP4で補完した基本培地で3週間培養し、成熟したグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）を発現する線維を持つ星状細胞の分化を促進した（図5A～5C）。これらの高度に星状膠細胞形成性の培養条件下で、初期の星状細胞マーカーCD44についてすでに選別した細胞を用いて、星状細胞の成熟はSCZ由来及びCTR由来の星状膠細胞前駆細胞の双方によって達成された（図5A～5C）。4つの異なるSCZの細胞株及び4つの異なるCTRの細胞株に由来する星状細胞を、その後⁸⁶Rb、 K^+ 取り込みのための代替一価イオン（参照によってその全体が本明細書に組み込まれるLarsen et al., "Contributions of the Na^+ / K^+ -ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to Hippocampal K^+ Clearance and Volume Responses", *Glia*, 62:608-622 (2014)）とともにインキュベートし、細胞数と総タンパク質双方の関数としてルビジウム取り込みを測定した。SCZのグリア（4つのSCZの細胞株、5回の反復/各細胞株）における K^+ 取り込みは、CTRのグリア（4つのCTRの細胞株、5回の反復/各細胞株）と比べて急激に減少し、細胞数と総タンパク質の双方によって基準化した（図4C；両側t検定による $P < 0.001$ ）。

【0101】

Na^+ / K^+ -ATPアーゼ、 Na^+ / K^+ / $2Cl^-$ 共輸送体、及び内向き整流する K^+ チャネルに参与するいくつかの遺伝子はSCZのグリアにおいて調節不全になったので、薬物、ウアバイン、ブメタニド、及びテルチアピンを用いてこれら3つのカリウム取り込みメカニズムをそれぞれ遮断した。星状細胞に対するこれら薬物の作用は以前に評価されていなかったもので、先ずそれぞれの異なる濃度を調べて星状膠細胞の K^+ 取り込みを調節するための最適な用量範囲を決定した。それぞれ Na^+ / K^+ -ATPアーゼ及び Na^+ / K^+ / $2Cl^-$ 共輸送体を標的とするウアバイン及びブメタニドはCTRのグリアにおいて K^+ 取り込みを有意に阻害した一方で、Kirチャネルを標的とするテルチアピンは阻害しなかった（図4D～4E、左のグラフ）。著しく対照的に、ウアバインもブメタニドもSCZの星状細胞による K^+ 取り込みに影響を与えなかった（図4D～4E、右のグラフ）。SCZ由来の星状細胞による K^+ 取り込みにおける機能低下は下方調節された Na^+ / K^+ -ATPアーゼ及び Na^+ / K^+ / $2Cl^-$ 共輸送体の機能に主に起因する可能性があり、ウアバイン及びブメタニドの処理に対してこれらの細胞を不応性にする。

【0102】

実施例3 — RESTはSCZ星状細胞によるカリウム取り込みを調節する

多数のカリウムチャネルをコードする遺伝子がSCZのグリアで調節不全になっているので、個々のカリウムチャネルのみを標的とする遺伝的手段を介してグリアの K^+ 取り込みを調節することは困難である。この問題に対処するために、BioBase-Transfac分析が使用された。この分析は、共有する上流調節因子を明らかにする手段として、さまざまな遺伝子に共通の調節領域を同定するために開発された（Hu et al., "Genome-Wide Identification of Transcription Factors and Transcription-Factor Binding Sites in Oleaginous Microalgae *Nannochloropsis*", *Sci. Rep.* 4:5454 (2014)、これは参照によってその全体が本明細に組み込まれる）。これによって、SCZ関連グリア遺伝子の転写開始部位（TSS）から1 kb以内の共有調節エレメントがデータセットで同定された。そ

10

20

30

40

50

の意図は、これらの遺伝子を群として調節できる上流の転写因子を同定することだった。13ヌクレオチドのコンセンサス配列 (CCNNGGTGCTGAA; SEQ ID NO: 21) を用いて、すべての下方調節されたカリウムチャンネル遺伝子のうちの大部分が、非神経細胞に作用して神経系遺伝子の発現を抑制する強力な転写リプレッサーであるニューロン制限サイレンシング因子 (NRSF) REST (図3C) の標的であることが決定された (Hirabayashi 及び Gotoh, "Epigenetic Control of Neural Precursor Cell Fate During Development", Nat. Rev. Neurosci. 11: 377-388 (2010)、これは参照によってその全体が本明細に組み込まれる)。その上で、RNA配列決定データが照会され、それはCTR GPCと比べてSCZ GPCでRESTが実際に一貫して有意に上方調節されていることを明らかにした (Windrem et al., "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia", Cell Stem Cell, 21: 195-208. e6 (2017)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。qPCRを用いて、SCZのグリアによるREST発現の上方調節が一連の患者すべてで一貫していることを確認した (図6A)。その上で、統合失調症由来グリアにおけるRESTの上方調節、及びそれらに付随するエピジェネティックな修飾は、カリウムチャンネル関連遺伝子の発現を抑制するのに十分である可能性があると仮定された。

【0103】

この仮定を調べるために、レンチウイルスを用いてCTRのグリア細胞でRESTを過剰発現させ、形質導入された細胞による K^+ 取り込みを評価した。並行して、SCZのグリア細胞におけるREST発現はレンチウイルスshRNAiの形質導入を介してノックダウンされ、同様にこれらの細胞における K^+ 取り込みが評価された。qPCRによる検証は、RESTがそれぞれ、CTR及びSCZのグリア細胞の双方において意図されたように有意に調節されることを確認した (図7)。これにより、SLC12A6、KCNJ9、及びATP1A2を含むいくつかの K^+ チャンネル関連遺伝子の発現が、REST過剰発現に供されたCTRのグリア細胞において有意に抑制されていることが見いだされた (図6B)。対照的に、これらのカリウムチャンネル遺伝子の発現は、RESTノックダウンに供されたSCZの細胞株で強く上方調節された (図6B)。

【0104】

重要なことに、RESTを過剰発現するCTRの星状細胞は、非形質導入CTRのグリアと比べて K^+ 取り込みが有意に減少したという点で、SCZグリアの機能的なカリウム調節不全を模倣した (図6C)。ウアバインもブメタニドもこれらの細胞による K^+ 取り込みをさらに減少させなかったということは、それらの標的チャンネルが機能的に無関係な点まで下方調節されたことを示唆している (図6D~6E)。逆に、RESTノックダウンに供されたSCZの星状細胞による K^+ 取り込みは、CTRの星状細胞のレベルと変わらないレベルまで強く増強された (図6C)。次に、ウアバイン及びブメタニドの双方が、これらのREST shRNAiを形質導入したSCZの星状細胞による K^+ 取り込みを有意に低下させることができた (図6D~6E)。総合して、これらのデータは、 Na^+/K^+-ATP アーゼ及び $Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送体双方のそれらの転写を救済することによってSCZグリアにおけるRESTノックダウンがこれらの細胞による正常な K^+ 取り込みの回復を促進し、それによって、星状膠細胞のカリウム恒常性の顕著な特徴を回復させることを示唆している。

【0105】

本明細書のデータは、小児期発症の統合失調症に由来するGPCで星状細胞の分化が損なわれていること、及び、この成熟欠陥はRESTノックダウンを介したグリア分化関連の転写の抑制解除によって救済される可能性があることを示している。重要なことに、統合失調症患者の皮質領域と皮質下領域の双方で星状細胞の枯渇が最近認められており、これは白質で特に顕著である場合がある (Rajkowska et al., "Layer

10

20

30

40

50

Specific Reductions in GFAP-Reactive Astroglia in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia”, *Schizophr. Res.* 57:127-138 (2002); Steffek et al., “Cortical Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and Glutamine Synthetase is Decreased in Schizophrenia”, *Schizophr. Res.* 103:71-82 (2008); Williams et al., “Astrocyte Decrease in the Subgenual Cingulate and Callosal Genu in Schizophrenia”, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 263:41-52 (2013)、これらは参照によってその全体が本明細に組み込まれる)。星状細胞は神経回路の形成及び安定性に重要な貢献を担う (Christopherson et al., “Thrombospondins are Astrocyte-Secreted Proteins That Promote CNS Synaptogenesis”, *Cell*, 120:421-433 (2005); Clarke及びBarres, “Emerging Roles of Astrocytes in Neural Circuit Development”, *Nature Reviews Neuroscience*, 14:311-321 (2013)、これらは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。したがって、SCZ GPCにおける星状細胞分化のそのような発達上の欠陥は、神経回路の初期形成または安定性に深刻な欠陥をもたらす可能性があり、統合失調症の特徴の1つである欠陥である (Penzes et al., “Dendritic Spine Pathology in Neuropsychiatric Disorders”, *Nat. Neurosci.* 14:285-293 (2011)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0106】

グリアの成熟は、ヒトの脳の発達において正確に調節されている (Goldman & Kuypers, “How to Make an Oligodendrocyte”, *Development*, 142:3983-3995 (2015); Molofsky et al., “Astrocytes and Disease: A Neurodevelopmental Perspective”, *Genes & Development*, 26:891-907 (2012)、これらは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。星状細胞はCNSにおいて、ニューロンと希突起膠細胞の双方へのエネルギー支援、カリウム緩衝化、神経伝達物質のリサイクル、及びシナプスの形成と成熟を含む多数の役割を有する (Blanco-Suarez et al., “Role of Astrocyte-Synapse Interactions in CNS Disorders”, *J. Physiol.* 595:1903-1916 (2017); Clarke及びBarres, “Emerging Roles of Astrocytes in Neural Circuit Development”, *Nature Reviews Neuroscience*, 14:311-321 (2013); Verkhratsky et al., “Why are Astrocytes Important?”, *Neurochemical Research*, 40:389-401 (2015)、これらは参照によってその全体が本明細に組み込まれる)。このように、星状細胞は神経回路の形成及び維持において重要な役割を担う。星状細胞はまた脳脊髄液の流れの調節を介してリンパ系にも寄与する (Xie et al., “Sleep Drives Metabolite Clearance From the Adult Brain”, *Science*, 342:373-377 (2013)、これは参照によってその全体が本明細に組み込まれる)。したがって、SCZ星状細胞の分化の遅延は神経回路網の形成、組織化、成熟した機能に同様に重大な影響を有する可能性がある。

【0107】

多数のカリウムチャネルはSCZのグリアにおいて下方調節された。興味深いことに、以前のゲノム規模での関連研究はカリウムチャネル遺伝子の統合失調症との関連を同定している。例えば、KCNN3を含有する染色体の1q21-q22遺伝子座は家族性統合失調症と有意な連鎖を有する(Brzustowicz et al., "Location of a Major Susceptibility Locus for Familial Schizophrenia on Chromosome 1q21-q22", Science, 288:678-682 (2000)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。KCNN3は、ヒトの脳において広く発現され、モノアミン作動性ニューロンにおいて神経細胞の興奮性及び神経伝達物質の放出を選択的に調節する(O'Donovan及びOwen, "Candidate-Gene Association Studies of Schizophrenia", Am. J. Hum. Genet. 65:587-592 (1999)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。KCNN3に加えて、KCNQ2やKCNA1を含む多数の他のカリウムチャネル遺伝子が統合失調症に関連している(Lee et al., "Pathway Analysis of a Genome-Wide Association Study in Schizophrenia", Gene, 525:107-115 (2013)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。さらに最近では、ナトリウム・カリウムポンプのサブユニットであるATP1A3の新規デノボ変異が、特に小児期発症統合失調症と関連している(Smedemark-Margulies et al., "A Novel De Novo Mutation in ATP1A3 and Childhood-Onset Schizophrenia", Cold Spring Harb. Mol. Case Stud 2:a001008 (2016)、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0108】

GPC及びそれらに由来する星状細胞におけるこれらのカリウムチャネル遺伝子の下方調節または機能不全は、統合失調症の疾患表現型に大きく寄与する可能性がある。カリウムチャネル遺伝子はGPC(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるCoppi et al., "UDP-Glucose Enhances Outward K(+) Currents Necessary for Cell Differentiation and Stimulates Cell Migration by Activating the GPR17 Receptor in Oligodendrocyte Precursors", Glia, 61:1155-1171 (2013); Maldonado et al., "Oligodendrocyte Precursor Cells are Accurate Sensors of Local K+ in Mature Gray Matter", J. Neurosci. 33:2432-2442 (2013))及び星状細胞(全体として参照によって本明細書に組み込まれるLarsen et al., "Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to Hippocampal K(+) Clearance and Volume Responses", Glia, 62:608-622 (2014); Zhang及びBarres, "Astrocyte Heterogeneity: An Underappreciated Topic in Neurobiology", Current Opinion in Neurobiology, 20:588-594 (2010))の双方で広く発現され、それらは増殖、移動、及び分化だけでなく、グリアのニューロンとの関係(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるCoppi et al., "UDP-Glucose Enhances Outward K(+) Currents Necessary for Cell Differentiation and Stimulates Cell Migration by Activating the GPR17 Receptor in Oligodendrocyte Precursors", Glia, 61:1155-1171 (2013); Maldonado et al., "Oligodendrocyte

yte Precursor Cells are Accurate Sensors of Local K^+ in Mature Gray Matter”, *J. Neurosci.* 33:2432–2442 (2013)) も調節する。後者に関しては、星状細胞は $Na^+/K^+-ATPase$ 、 $NKCC$ 、及び内向きに整流する K_{ir} チャネルを介したシナプスの K^+ 取り込みも調節し (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる *Larsen et al.*, “Contributions of the $Na^+/K^+-ATPase$, $NKCC1$, and $K_{ir}4.1$ to Hippocampal K^+ Clearance and Volume Responses”, *Glia*, 62:608–622 (2014); Zhang 及び Barres, “Astrocyte Heterogeneity: An Underappreciated Topic in Neurobiology”, *Current Opinion in Neurobiology*, 20:588–594 (2010))、それによって、広い領域分野にわたってニューロン発射閾値を確立する。加えて、調節不全のカリウムチャネル遺伝子は多種多様な神経疾患及び精神疾患に関連している。 $K_{ir}4.1$ を含むいくつかの K_{ir} 遺伝子は、星状細胞のカリウム緩衝化及びグルタミン酸取り込みに関与しており、これらの遺伝子の欠失は、ハンチントン病及び多発性硬化症の双方で認められている (参照によってその全体が本明細書に組み込まれる *Seifert et al.*, “Astrocyte Dysfunction in Neurological Disorders: A Molecular Perspective”, *Nat. Rev. Neurosci.* 7:194–206 (2006); Tong et al., “Astrocyte $K_{ir}4.1$ Ion Channel Deficits Contribute to Neuronal Dysfunction in Huntington’s Disease Model Mice”, *Nat. Neurosci.* 17:694–703 (2014))。加えて、ナトリウム・カリウムポンプの $\alpha 2$ アイソフォームである星状細胞 $ATP1A2$ の変異は、家族性片麻痺性片頭痛と因果関係がある可能性がある (参照によってその全体が本明細に組み込まれる *Bottger et al.*, “Glutamate-System Defects Behind Psychiatric Manifestations in a Familial Hemiplegic Migraine Type 2 Disease-Mutation Mouse Model”, *Sci. Rep.* 6:22047 (2016); Swarts et al., “Familial Hemiplegic Migraine Mutations Affect $Na^+/K^+-ATPase$ Domain Interactions”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1832:2173–2179 (2013))。これらの例すべてにおいて、 SCZ のグリアと全く同様にグリアの K^+ 取り込みが損なわれており、すべてが表現型での過剰興奮性の要素に関連する。実際、細胞外 K^+ の上昇は、統合失調症のマウスモデルにおいてニューロンの興奮性及び神経回路の安定性を変化させることが示されている (参照によってその全体が本明細に組み込まれる *Crabtree et al.*, “Alteration of Neuronal Excitability and Short-Term Synaptic Plasticity in the Prefrontal Cortex of a Mouse Model of Mental Illness”, *J. Neurosci.* 37 (15):4158–4180 (2017))。したがって、 SCZ グリアの K^+ 取り込みの減少は、特に、破壊されたカリウム恒常性の状況で増強されることになる過興奮及び発作障害に関連する統合失調症の表現型に関して統合失調症の病態形成への重要な寄与因子である可能性がある。

[0109]

SCZ のグリアにおける上方調節された $REST$ は、カリウムチャネル遺伝子の発現及びカリウム取り込みの双方の抑制に必要なかつ十分であると考えられる。転写抑制因子としての $REST$ は、ニューロン及びグリアの双方で神経遺伝子の発現を調節する (参照によってその全体が本明細に組み込まれる *Bruce et al.*, “Genome-Wide Analysis of Repressor Element 1 Silencing

10

20

30

40

50

g Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencing Factor (REST/NRSF) Target Genes", Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 101:10458-10463 (2004); Dewald et al., "The RE1 Binding Protein REST Regulates Oligodendrocyte Differentiation", J. Neurosci. 31:3470-3483 (2011))。大まかに、RESTはCoREST及びmSIN3aの動員を介して神経遺伝子を抑制し、その複合体はさらにHDAC1/2とメチルトランスフェラーゼG9aを動員して、ヒストンの脱アセチル化及びメチル化を同時に促進し、それらは一緒に転写を阻止するのに役立つ(参照によってその全体が本明細に組み込まれるHirabayashi及びGotoh, "Epigenetic Control of Neural Precursor Cell Fate During Development", Nat. Rev. Neurosci. 11:377-388 (2010))。このように、RESTの誤った方向の上方調節はカリウムチャネル遺伝子の発現を阻害し、それによって、調節不全のカリウム恒常性及びそれに付随するニューロンの過剰興奮性に関連するこれらの障害の疾患表現型に寄与する。例えば、末梢感覚ニューロンにおける上方調節されたRESTはKCNQ2の下方調節を誘導し、それが次に感覚ニューロンの過興奮を増強し、したがって神経因性疼痛の維持を増強する(参照によってその全体が本明細に組み込まれるRose et al., "Transcriptional Repression of the M Channel Subunit Kv7.2 in Chronic Nerve Injury", Pain, 152:742-754 (2011))。RESTは同様KCNQ3遺伝子の発現を抑制し、RESTによるKCNQ3の下方調節は、特定の新生児てんかんにおける神経過剰興奮を引き起こす(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるMucha et al., "Transcriptional Control of KCNQ Channel Genes and the Regulation of Neuronal Excitability", J. Neurosci. 30:13235-13245 (2010))。

【0110】

さらに、RESTは、CACNA1C、TCF4、及びANK3を含む複数の統合失調症関連遺伝子を調節する(参照によってその全体が本明細に組み込まれるKwon et al., "Validation of Schizophrenia-Associated Genes CSMD1, C10orf26, CACNA1C and TCF4 as miR-137 Targets", Mol. Psychiatry, 18:11-12 (2013); 参照によってその全体が本明細に組み込まれるSchizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, "Genome-Wide Association Study Identifies Five New Schizophrenia Loci", Nat. Genet. 43:969-976 (2011)) miR137の調節を介して統合失調症に関与する(参照によってその全体が本明細書に組み込まれるWarburton et al., "Characterization of a REST-Regulated Internal Promoter in the Schizophrenia Genome-Wide Associated Gene MIR137", Schizophr. Bull. 41:698-707 (2015))。他の治験責任医師は、RESTがカリウムチャネル関連遺伝子の発現を抑制することができること(参照によってその全体が本明細に組み込まれるBruce et al., "Genome-Wide Analysis of Repressor Element 1 Silencing Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencing Factor (REST/NRSF) Target Genes", Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 101:10458-10463 (2004)、及びグリア系列内での希突起膠細胞の分化を抑制する

10

20

30

40

50

ことができること（参照によってその全体が本明細に組み込まれる Dewald et al., "The RE1 Binding Protein REST Regulates Oligodendrocyte Differentiation", J. Neurosci. 31:3470-3483 (2011)）を報告している。したがって、病理学的に高いレベルのRESTは、統合失調症由来のグリアにおいてK⁺チャネル関連遺伝子の発現を抑制し、それによってK⁺取り込みを減少させる可能性があるとの仮説が立てられた。これは、高い間質性K⁺につながると予想されるので、相対的なニューロンの過興奮及び回路網の非同期化につながると予想される。とは言え、グリア細胞のカリウム恒常性の乱れにおけるRESTの役割はこれまで報告されたことはなかった。本明細書のデータは、統合失調症患者の一部が、グリアのカリウム取り込みの減少の機能として高い間質性K⁺レベルを経験するかもしれない可能性を示唆している。これは、グリアのカリウムチャネル機能障害を特徴とする別の障害であるハンチントン病で報告されているように、ニューロンの過興奮をもたらすと予想される（参照によってその全体が本明細に組み込まれる Benraiss et al., "Human Glia Can Both Induce and Rescue Aspects of Disease Phenotype in Huntington Disease", Nat. Commun. 7:11758 (2016)）。したがって、SCZ由来グリアによるK⁺取り込みのREST依存性障害の観察は、RESTが統合失調症の治療について効果的な標的であることを示している。【0111】

その点で、バルプロ酸及びX5050を含むいくつかのREST標的薬がてんかん及びハンチントン病のために開発されている（参照によってその全体が本明細に組み込まれる Charbord et al., "High Throughput Screening for Inhibitors of REST in Neural Derivatives of Human Embryonic Stem Cells Reveals a Chemical Compound That Promotes Expression of Neuronal Genes", Stem Cells, 31:1816-1828 (2013) ; Graff及びTsai, "The Potential of HDAC Inhibitors as Cognitive Enhancers", Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 53:311-330 (2013)）。本明細書のデータは、これらの作用物質が同様に統合失調症においても治療的有用性を有する可能性があることを示している。その点で、ウアバイン及びブメタニドは、CTRの星状細胞及びRESTノックダウン後のSCZの星状細胞の双方によるK⁺取り込みを有意に阻害したが、RESTを過剰発現するように形質導入した星状細胞によるK⁺の取り込みには影響を及ぼさなかった。これらのデータは、RESTによるSCZグリアのK⁺取り込みの抑制がカリウムチャネル遺伝子発現の抑制を介していることを示唆している。その観察の当然の結果は、K⁺取り込みのモジュレーターが統合失調症の治療に真の価値を有する可能性があるということである（参照によってその全体が本明細書に組み込まれる Calcaterra et al., "Schizophrenia-Associated hERG Channel Kv11.1-3.1 Exhibits a Unique Trafficking Deficit that is Rescued Through Proteasome Inhibition for High Throughput Screening", Sci. Rep. 6:19976 (2016) ; He et al., "Current Pharmacogenomic Studies on hERG Potassium Channels", Trends Mol. Med. 19:227-238 (2013) ; Rahmanzadeh et al., "Lack of the Effect of Bumetanide, a Selective NKCC1 Inhibitor, in Patients With Schizophrenia: A Double-Blind Randomized Trial", Psychiatry Clin. Neurosci. 71:72-73 (2017)）。したがって、本明細書のデータは、SCZ GPCによる星状細胞の分化の欠陥、カリウ

10

20

30

40

50

ムチャンネル遺伝子の R E S T 依存性抑制、及びその結果としての S C Z の星状細胞による K^+ の取り込みの欠陥を明らかにしている。シナプスのカリウム恒常性における結果として生じる欠陥は回路網の非同期化を際立たせる一方で、ニューロン発射の閾値を有意に低下させることが予想されてもよい（参照によってその全体が本明細に組み込まれる Ben raiss et al., "Human Glia Can Both Induce and Rescue Aspects of Disease Phenotype in Huntington Disease", Nat. Commun. 7:11758 (2016)）。このように、これらの知見は、S C Z の神経機能障害に対する星状細胞の病的状態の因果的寄与を特定し、そうすることによって、その治療のための一連の扱いやすい分子標的を示唆している。

10

【0112】

本明細書では好ましい実施形態を示し、詳細に説明してきたが、本開示の精神から逸脱することなく種々の修正、追加、置換などを行うことができ、したがってこれらが後に続く特許請求の範囲で定義されているような本開示の精神の範囲内にあると見なされることは当業者に明らかであろう。

20

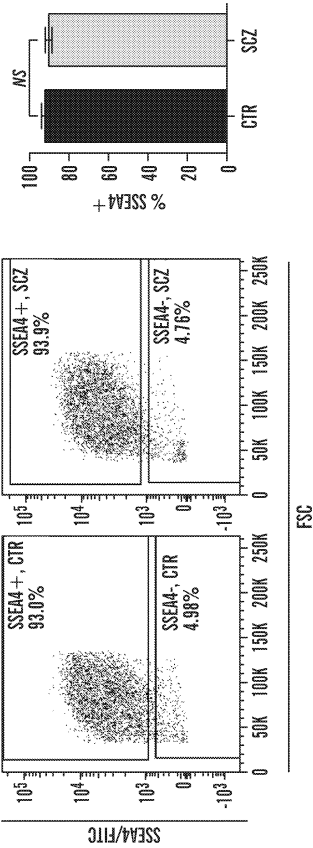
30

40

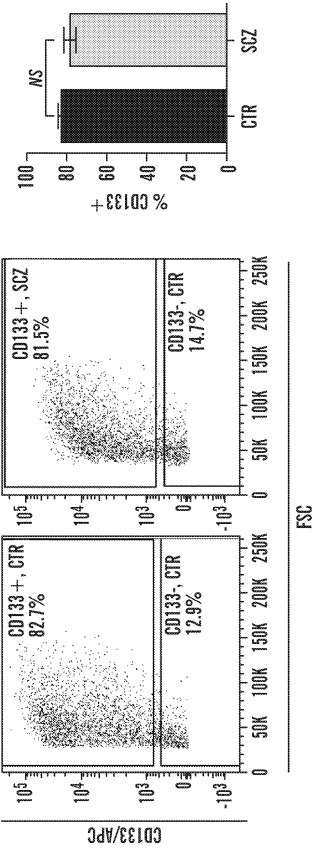
50

【図面】

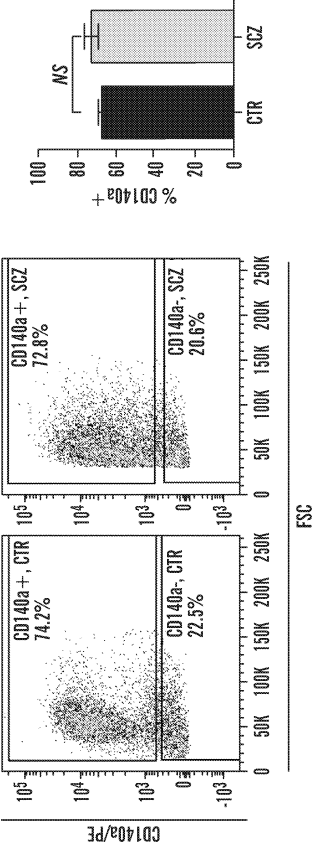
【図 1 A】



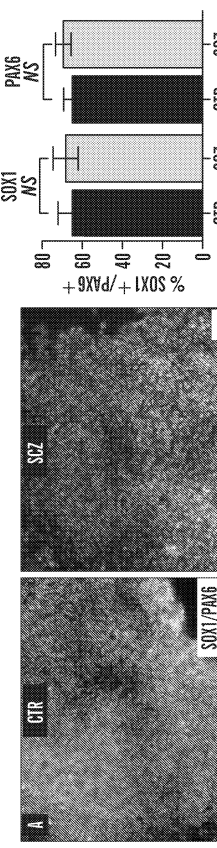
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A】



10

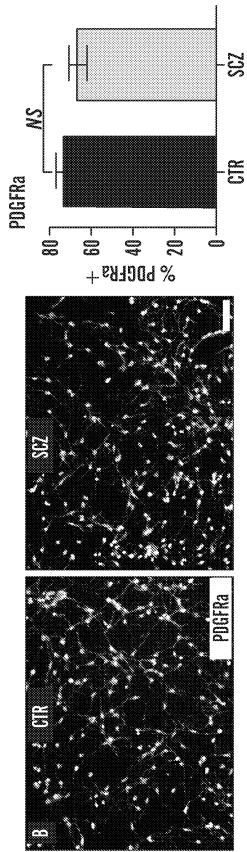
20

30

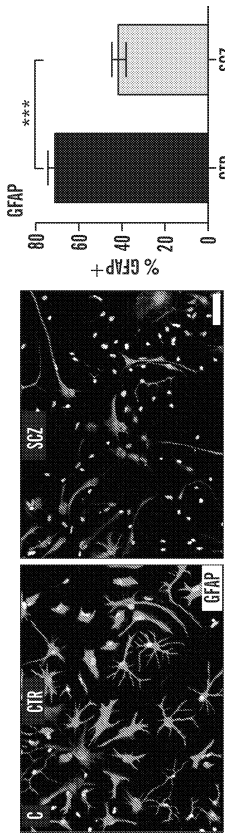
40

50

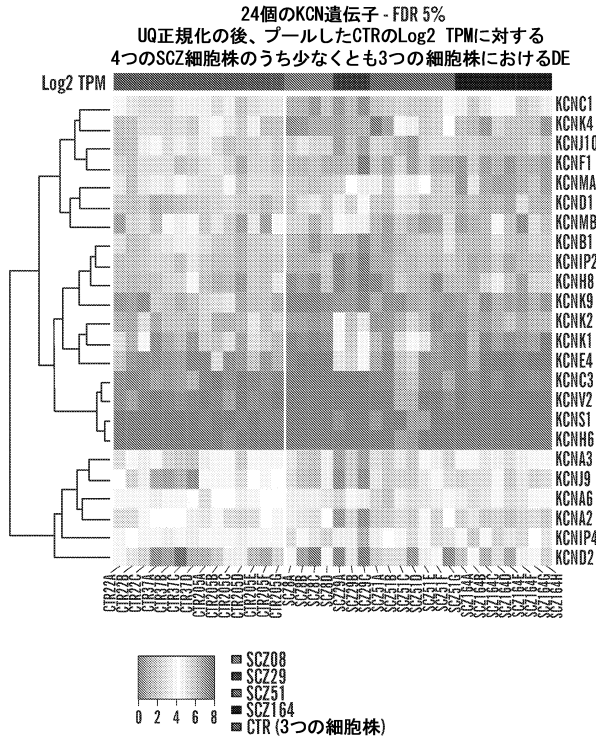
【図 2 B】



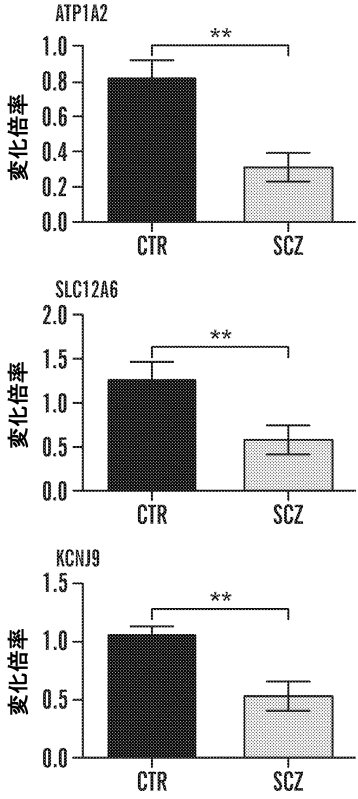
【図 2 C】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

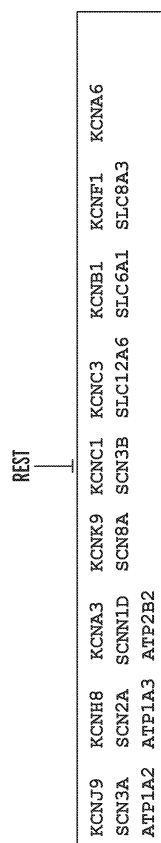
20

30

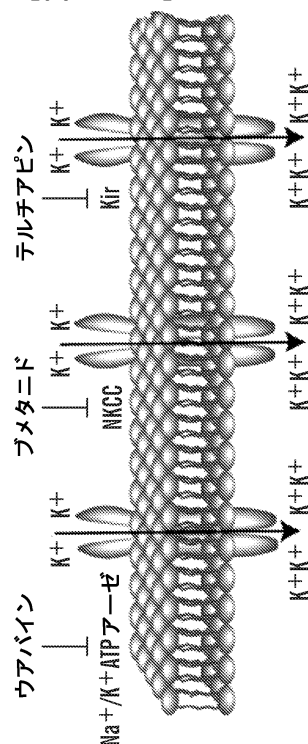
40

50

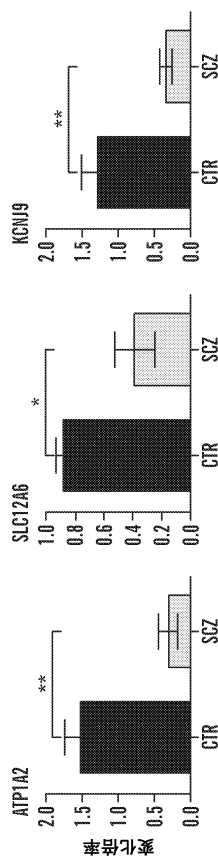
【図 3 C】



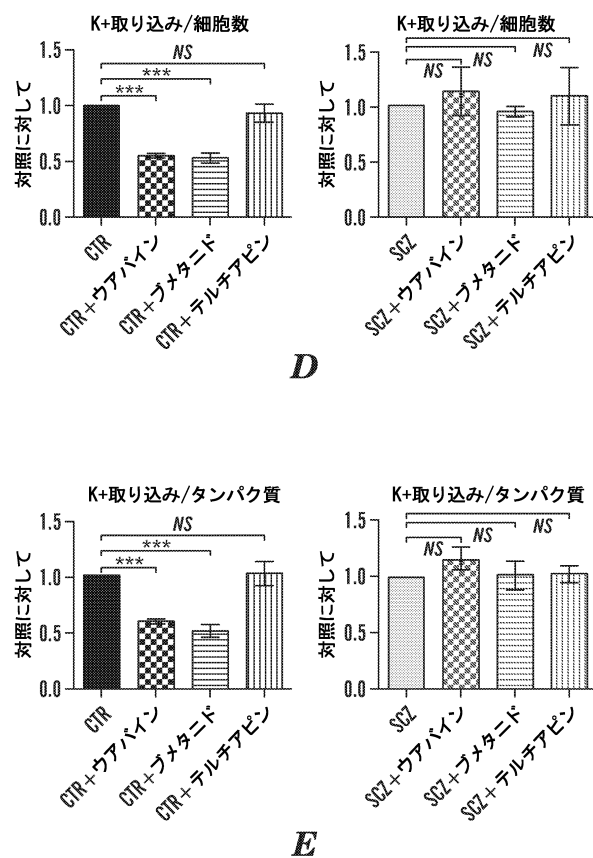
【圖 4 - 1】



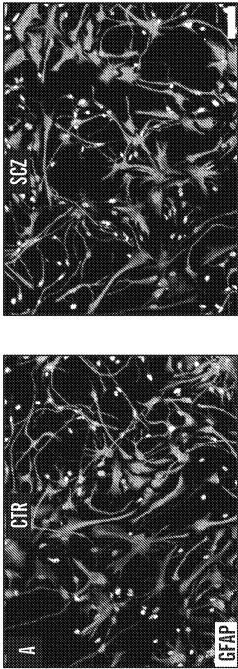
【圖 4-2】



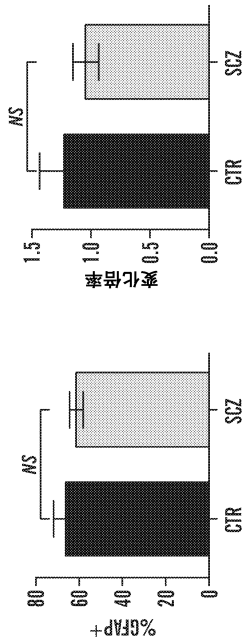
【圖 4-3】



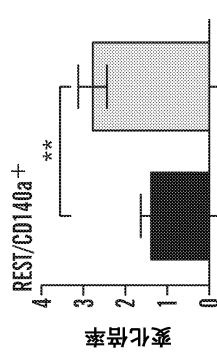
【図 5】



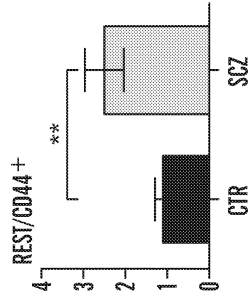
A



B

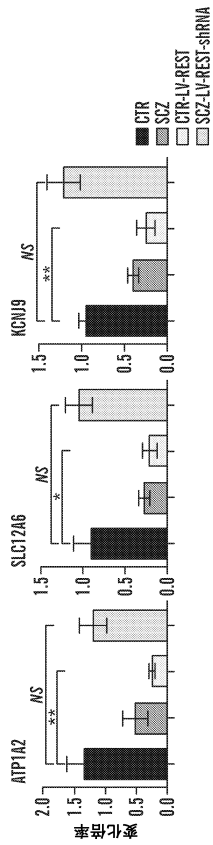


C



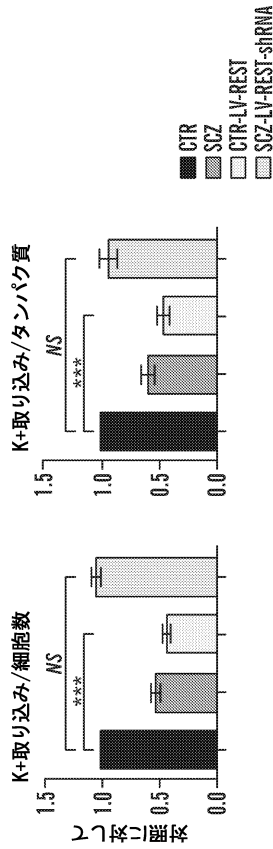
【図 6 - 1】

【図 6 - 2】



B

【図 6 - 3】



C

10

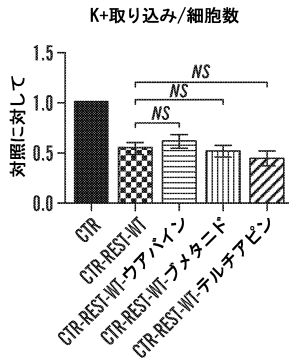
20

30

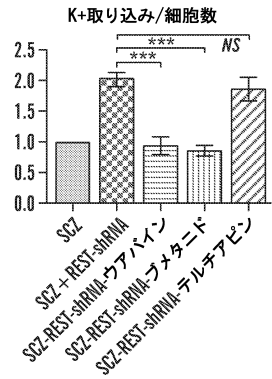
40

50

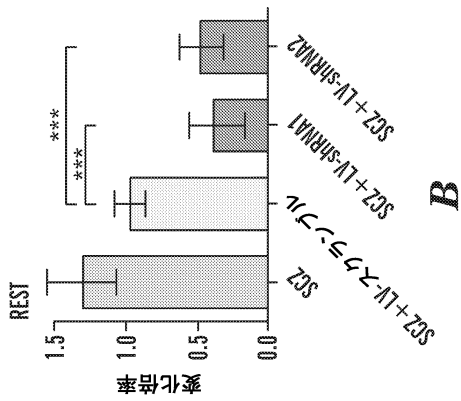
【図 6 - 4】



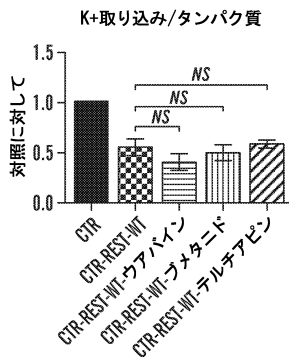
D



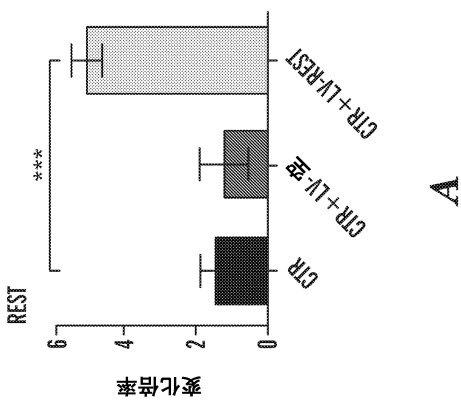
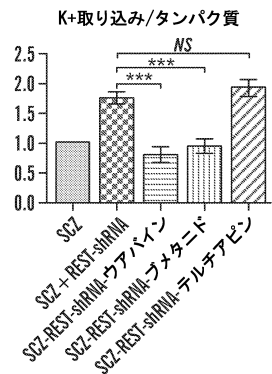
【図 7】



B



E



A

【配列表】

0007555542000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 25/28 (2006.01)
A 6 1 K 9/14 (2006.01)
A 6 1 K 9/51 (2006.01)

F I

A 6 1 P 25/18
A 6 1 P 25/28
A 6 1 K 9/14
A 6 1 K 9/51

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ゴールドマン スティーブン エー.

アメリカ合衆国 1 4 5 8 0 ニューヨーク州 ウェブスター サンセット トレイル 1 0 3 4

(72)発明者 リュー チェンシャン

アメリカ合衆国 1 4 6 2 0 ニューヨーク州 ロチェスター ユニバーシティ パーク 7 3 5

(72)発明者 オシポーヴィチ ミハイル

デンマーク王国 2 0 0 0 フレズレクスベア ゴトホプスバイ 4 1 3 ティーエイチ

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 Pharmacol. Rev., 2013年, Vol.65, pp.105-142, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.111.005512>

Mol. Neurobiol., 2017年, Vol.54, pp.541-550, DOI 10.1007/s12035-015-9658-4

STEM CELLS, 2013年, Vol.31, pp.1816-1828

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)