(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7665215号
(P7665215)

(45)発行日　令和7年4月21日(2025.4.21)

(24)登録日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　38/18　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	38/18	
Ａ６１Ｐ　1/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	1/00	ＺＮＡ
Ａ６１Ｐ　1/04　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ　1/10　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	1/10	
Ａ６１Ｐ　1/08　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	1/08	

ＦＩ

請求項の数　27　（全54頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-538283(P2022-538283)
(86)(22)出願日　令和2年12月18日(2020.12.18)
(65)公表番号　特表2023-515915(P2023-515915A)
(43)公表日　令和5年4月17日(2023.4.17)
(86)国際出願番号　PCT/CA2020/051746
(87)国際公開番号　WO2021/119827
(87)国際公開日　令和3年6月24日(2021.6.24)
審査請求日　令和5年12月4日(2023.12.4)
(31)優先権主張番号　62/950,781
(32)優先日　令和1年12月19日(2019.12.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　522244632
トランスフェルト・プラス・ソシエテ・アン・コマンディテ
カナダ・ケベック・Ｇ１Ｐ・４Ｐ５・ケベック・ブールヴァール・デュ・パルク－テクノロジック・１４０５
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　ロドルフ・ソレ
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｊ・２Ｎ１・モントリオール・リュ・リヴァール・４４
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　腸のニューロパチーを治療するためのグリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

腸のニューロパチーを患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域における腸の神経新生を誘発するための、組換えグリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物であって、前記組成物が、前記対象の遠位結腸への投与のためのものであり、投与される前記組換えＧＤＮＦポリペプチドの用量が、ｋｇ当り約１０ｍｇ～約１５ｍｇである、薬学的組成物。

【請求項２】

前記ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項３】

前記ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項４】

前記ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１を含む、請求項３に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項５】

前記組換えＧＤＮＦポリペプチドが、０．５ｍｇ／ｍｌ～２ｍｇ／ｍｌの濃度である、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項６】

前記薬学的に許容される担体が、生理食塩水溶液またはゲル化剤である、請求項１～５のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項７】
前記薬学的組成物が、浣腸を通じた直腸投与のためのものである、請求項１～６のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項８】
前記薬学的組成物が、遠位結腸壁への注射による投与のためのものである、請求項１～７のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項９】
前記薬学的組成物が、１日１回～最高１日４回の投与のためのものである、請求項１～８のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１０】
前記薬学的組成物が、少なくとも２日連続の投与のためのものである、請求項１～９のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１１】
前記薬学的組成物が、前記対象における前記無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の前に使用するためのものである、請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１２】
前記薬学的組成物が、前記対象における前記無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の後に使用するためのものである、請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１３】
前記無神経節域または神経節細胞僅少域の前記外科的除去が、プルスルー手術を通じたものである、請求項１１または１２に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１４】
前記腸のニューロパチーが、腸管神経節細胞僅少症である、請求項１～１３のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１５】
前記腸のニューロパチーが、ヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）である、請求項１～１４のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１６】
前記対象が、短域ＨＳＣＲを患っている、請求項１５に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１７】
前記ＨＳＣＲが、散発性ＨＳＣＲである、請求項１５または１６に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１８】
前記ＨＳＣＲが、ＲＥＴ受容体の発現または活性の低減に関連する、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１９】
前記ＨＳＣＲが、ＲＥＴ遺伝子の変異に関連する、請求項１８に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項２０】
前記腸の神経新生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア細胞の産生を含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項２１】
前記腸の神経新生が、腸のニューロンおよび腸のグリア細胞の産生を含む、請求項２０に記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項２２】

前記腸のニューロンおよび／またはグリア細胞の産生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア前駆体の増殖を含む、請求項２０または２１に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項２３】

前記薬学的組成物が、（ａ）前記無神経節域または神経節細胞僅少域の上流に位置する一酸化窒素作動性およびコリン作動性ニューロンサブタイプの不均衡を補正する、（ｂ）前記対象における遠位結腸の運動性を回復させる、ならびに／または（ｃ）前記対象の遠位結腸におけるリンパ球および／もしくは骨髄免疫細胞の割合を回復させる、請求項１～２２のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項２４】

前記ヒト対象が、５歳未満である、請求項１～２３のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項２５】

前記ヒト対象が、生後６ヶ月未満である、請求項２４に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項２６】

前記薬学的組成物が、直腸および／またはＳ字結腸への投与のためのものである、請求項１～２５のいずれか一項に記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項２７】

前記薬学的組成物が、直腸Ｓ字領域への投与のためのものである、請求項２６に記載の使用のための薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、２０１９年１２月１９日出願の米国仮出願第６２／９５０，７８１号の利益を主張する。

【０００２】

本発明は、概して、ヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）および腸管神経節細胞僅少症などの腸のニューロパチーの治療に関する。

【背景技術】

【０００３】

腸の神経系（ＥＮＳ）は、胃腸管全体に沿って延在し、感覚刺激に応答して腸の運動性、血流、および上皮活動を制御する（１）。ニューロンおよびグリアを含有する相互接続された腸の神経節は、出生前の発達の間に腸管を通って移動する神経堤由来前駆体から発達する。ＥＮＳ前駆体による遠位結腸の不完全なコロニー形成は、５０００人の新生児の１人に影響を及ぼす状態であるヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）を引き起こす（２、３）。ＨＳＣＲでは、ニューロンの神経節のない遠位結腸（すなわち、無神経節結腸）は緊張収縮したままであり、収縮を伝播せず、機能性腸管閉塞を引き起こす。ＨＳＣＲの症状としては、便および空気の滞留を伴う難治性便秘、腹部膨満、成長不全、時折の嘔吐、腸の炎症（腸炎）、ならびに敗血症および早期死亡を引き起こす血液中への細菌の移行のリスクが挙げられる（２）。

【０００４】

ＨＳＣＲは、臨床的に、短域型（Ｓ－ＨＳＣＲ）および長域型（Ｌ－ＨＳＣＲ）に細分される（４）。症例のうちの＞８０％で発生するＳ－ＨＳＣＲは、直腸およびＳ字結腸にＥＮＳが存在しないことを意味する。Ｌ－ＨＳＣＲは、遠位腸のより長い領域が無神経節であることを意味する。ＨＳＣＲの病因は、未だに完全には理解されておらず、多くの遺伝子が、ＨＳＣＲリスクに影響を与える（２）。さらに、遺伝子的にリスクのあるバリアントは、非遺伝的要因と組み合わさって、ＥＮＳ前駆体による完全な腸内コロニー形成を阻害し得る（５）。正常なＥＮＳ発達には多くのタンパク質が一緒に機能する必要がある

ので、この非メンデル遺伝が発生する。
【０００５】
１９４８年以降、ＨＳＣＲを有するほとんどの小児は、遠位無神経節腸の外科的除去によって命を救われている（１６、１７）。しかしながら、この手順は、理想とはかけ離れている。手術後の合併症は一般的であり、また長期間続く場合もあり、生存率（例えば、腸炎）および／または生活の質（例えば、便失禁または閉塞症状）に影響を与える（１８～２０）。１つの有望なアプローチは、ＥＮＳを再構築し、手術の必要性を低減する「再生医療」であろう。このアイデアは、多くのグループが細胞移植に基づくＨＳＣＲ療法を開発するきっかけとなった（２１）。しかしながら、多くの有望な結果にもかかわらず、いくつかの困難が依然として存在する（２２）。幹細胞の最適な供給源、移植前の理想的な増幅および／または分化戦略、細胞送達の方法、ならびに移植後の細胞機能および最終結果は、未だ十分に定義されていない。加えて、非自律的な細胞移植は、免疫抑制を必要とし得る。
【０００６】
腸管神経節細胞僅少症としても知られる神経節細胞僅少症は、腸管壁の神経の数の低減を引き起こす障害である。腸管神経節細胞僅少症は、ＨＳＣＲによく似ている場合があり、両方の状態を有する患者は、慢性便秘、腸管閉塞、および腸炎（腸管の炎症）を提示し得る。また、神経節細胞僅少症の患者は、フェカローマ（結腸内での便の硬化）、腸管の出血または穿孔、および結腸の膨張から生じる呼吸障害を含む、重度の合併症を患っている場合がある。神経節細胞僅少症の正確な原因は、多くの場合、分かっていない。場合によっては、出生の時点で存在する要因（先天的）に起因するが、他の場合は、後天的な状態であると考えられる。単独の神経節細胞僅少症の管理は、概して、影響を受けている腸域を除去するための手術を含む。
【０００７】
したがって、ＨＳＣＲおよび腸管神経節細胞僅少症などの腸のニューロパチーの代替治療、遠位結腸における神経新生を誘発し、とりわけ、ＨＳＣＲおよび腸管神経節細胞僅少症患者における遠位結腸の運動性を回復させることを目的とした治療に対する必要性が明らかに存在する。
【０００８】
本記載は、いくつかの文献を参照し、それらの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【発明の概要】
【０００９】
本開示は、ヒルシュスプルング病などの腸のニューロパチーの１つ以上の病理学的特徴を治療するためのＧＤＮＦの使用に関する。
【００１０】
態様および実施形態では、本開示は、以下の条項１～９０に関する：
１．腸のニューロパチーを患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域における腸の神経新生を誘発するための方法であって、方法が、有効用量の組換えグリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物を、対象の遠位結腸に投与することを含む、方法。
２．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項１に記載の方法。
３．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項２に記載の方法。
４．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項３に記載の方法。
５．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１を含む、条項４に記載の方法。
６．ヒト対象に投与される組換えＧＤＮＦポリペプチドの有効用量が、仔マウスにおけ

る約５μｇ～約２０μｇの用量に相当する、条項１～５のいずれか１つに記載の方法。
７．薬学的に許容される担体が、生理食塩水溶液またはゲル化剤を含む、条項１～６のいずれか１つに記載の方法。
８．薬学的組成物が、浣腸を通じて直腸投与される、条項１～７のいずれか１つに記載の方法。
９．薬学的組成物が、遠位結腸壁への注射によって投与される、条項１～７のいずれか１つに記載の方法。
１０．薬学的組成物が、１日１回～最高１日４回投与される、条項１～９のいずれか１つに記載の方法。
１１．薬学的組成物が、少なくとも２日連続して投与される、条項１～１０のいずれか１つに記載の方法。
１２．方法が、対象における無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の前に実施される、条項１～１１のいずれか１つに記載の方法。
１３．方法が、対象における無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の後に実施される、条項１～１１のいずれか１つに記載の方法。
１４．無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去が、プルスルー手術を通じたものである、条項１２または１３に記載の方法。
１５．腸のニューロパチーが、腸管神経節細胞僅少症である、条項１～１４のいずれか１つに記載の方法。
１６．腸のニューロパチーが、ヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）である、条項１～１４のいずれか１つに記載の方法。
１７．対象が、短域ＨＳＣＲを患っている、条項１６に記載の方法。
１８．ＨＳＣＲが、散発性ＨＳＣＲである、条項１６または１７に記載の方法。
１９．ＨＳＣＲが、ＲＥＴ受容体の発現または活性の低減に関連する、条項１６～１８のいずれか１つに記載の方法。
２０．ＨＳＣＲが、ＲＥＴ遺伝子の変異に関連する、条項１９に記載の方法。
２１．腸の神経新生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア細胞の産生を含む、条項１～２０のいずれか１つに記載の方法。
２２．神経新生が、腸のニューロンおよび腸のグリア細胞の産生を含む、条項２１に記載の方法。
２３．腸のニューロンおよび／または腸のグリア細胞の産生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア前駆体の増殖を含む、条項２１または２２に記載の方法。
２４．方法が、無神経節域または神経節細胞僅少域の上流に位置する一酸化窒素作動性およびコリン作動性ニューロンサブタイプの不均衡を補正する、条項１～２３のいずれか１つに記載の方法。
２５．方法が、対象における遠位結腸の運動性を回復させる、条項１～２４のいずれか１つに記載の方法。
２６．方法が、対象の遠位結腸におけるリンパ球および／または骨髄免疫細胞の割合を回復させる、条項１～２５のいずれか１つに記載の方法。
２７．ヒト対象が、５歳未満または１歳未満である、条項１～２６のいずれか１つに記載の方法。
２８．ヒト対象が、生後６ヶ月未満である、条項２７に記載の方法。
２９．薬学的組成物が、直腸および／またはＳ字結腸に投与される、条項１～２８のいずれか１つに記載の方法。
３０．薬学的組成物が、直腸Ｓ字領域に投与されるか、または直腸Ｓ字領域への投与のためのものである、条項２９に記載の方法。
３１．腸のニューロパチーを患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域における腸の神経新生を誘発するための、組換えグリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物であって、組成物が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、薬学的組成物。

３２．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項３１に記載の使用のための薬学的組成物。
３３．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項３２に記載の使用のための薬学的組成物。
３４．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項３３に記載の使用のための薬学的組成物。
３５．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１を含む、条項３４に記載の使用のための薬学的組成物。
３６．使用される組換えＧＤＮＦポリペプチドの用量が、仔マウスにおける約５μｇ～約２０μｇの用量に相当する、条項３１～３５のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
３７．薬学的に許容される担体が、生理食塩水溶液またはゲル化剤である、条項３１～３６のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
３８．薬学的組成物が、浣腸を通じた直腸投与のためのものである、条項３１～３７のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
３９．薬学的組成物が、遠位結腸壁への注射による投与のためのものである、条項３１～３８のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４０．薬学的組成物が、１日１回～最高１日４回の投与のためのものである、条項３１～３９のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４１．薬学的組成物が、少なくとも２日連続の投与のためのものである、条項３１～４０のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４２．薬学的組成物が、対象における無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の前に使用するためのものである、条項３１～４１のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４３．薬学的組成物が、対象における無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の後に使用するためのものである、条項３１～４１のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４４．無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去が、プルスルー手術を通じたものである、条項４２または４３に記載の使用のための薬学的組成物。
４５．腸のニューロパチーが、腸管神経節細胞僅少症である、条項３１～４４のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４６．腸のニューロパチーが、ヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）である、条項３１～４４のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
４７．対象が、短域ＨＳＣＲを患っている、条項４６に記載の使用のための薬学的組成物。
４８．ＨＳＣＲが、散発性ＨＳＣＲである、条項４６または４７に記載の使用のための薬学的組成物。
４９．ＨＳＣＲが、ＲＥＴ受容体の発現または活性の低減に関連する、条項４６～４８のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
５０．ＨＳＣＲが、ＲＥＴ遺伝子の変異に関連する、条項４９に記載の使用のための薬学的組成物。
５１．腸の神経新生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア細胞の産生を含む、条項３１～５０のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
５２．腸の神経新生が、腸のニューロンおよび腸のグリア細胞の産生を含む、条項５１に記載の使用のための薬学的組成物。
５３．腸のニューロンおよび／またはグリア細胞の産生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア前駆体の増殖を含む、条項５１または５２に記載の使用のための薬学的組成物。
５４．薬学的組成物が、無神経節域または神経節細胞僅少域の上流に位置する一酸化窒素作動性およびコリン作動性ニューロンサブタイプの不均衡を補正する、条項３１～５３

のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
５５．薬学的組成物が、対象における遠位結腸の運動性を回復させる、条項３１～５４のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
５６．薬学的組成物が、対象の遠位結腸におけるリンパ球および／または骨髄免疫細胞の割合を回復させる、条項３１～５５のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
５７．ヒト対象が、５歳未満または１歳未満である、条項３１～５６のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
５８．ヒト対象が、生後６ヶ月未満である、条項５７に記載の使用のための薬学的組成物。
５９．薬学的組成物が、直腸および／またはＳ字結腸への投与のためのものである、条項３１～５８のいずれか１つに記載の使用のための薬学的組成物。
６０．薬学的組成物が、直腸Ｓ字領域への投与のためのものである、条項５９に記載の使用のための薬学的組成物。
６１．腸のニューロパチーを患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域における腸の神経新生を誘発するための医薬品を製造するための、組換えグリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物の使用であって、医薬品が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、薬学的組成物の使用。
６２．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも７０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項６１に記載の使用。
６３．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項６２に記載の使用。
６４．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１と少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、条項６３に記載の使用。
６５．ＧＤＮＦポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸７８～２１１を含む、条項６４に記載の使用。
６６．使用される組換えＧＤＮＦポリペプチドの用量が、仔マウスにおける約５μｇ～約２０μｇの用量に相当する、条項６１～６５のいずれか１つに記載の使用。
６７．薬学的に許容される担体が、生理食塩水溶液またはゲル化剤である、条項６１～６６のいずれか１つに記載の使用。
６８．薬学的組成物が、浣腸を通じた直腸投与のためのものである、条項６１～６７のいずれか１つに記載の使用。
６９．薬学的組成物が、遠位結腸壁への注射による投与のためのものである、条項６１～６７のいずれか１つに記載の使用。
７０．薬学的組成物が、１日１回～最高１日４回の投与のためのものである、条項６１～６９のいずれか１つに記載の使用。
７１．薬学的組成物が、少なくとも２日連続の投与のためのものである、条項６１～７０のいずれか１つに記載の使用。
７２．薬学的組成物が、対象における無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の前に使用される、条項６１～７１のいずれか１つに記載の使用。
７３．薬学的組成物が、対象における無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去の後に使用される、条項６１～７２のいずれか１つに記載の使用。
７４．無神経節域または神経節細胞僅少域の外科的除去が、プルスルー手術を通じたものである、条項７２または７３に記載の使用。
７５．腸のニューロパチーが、腸管神経節細胞僅少症である、条項６１～７４のいずれか１つに記載の使用。
７６．腸のニューロパチーが、ヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）である、条項６１～７５のいずれか１つに記載の使用。
７７．対象が、短域ＨＳＣＲを患っている、条項７６に記載の使用。
７８．ＨＳＣＲが、散発性ＨＳＣＲである、条項７６または７７に記載の使用。

７９．ＨＳＣＲが、ＲＥＴ受容体の発現または活性の低減に関連する、条項７６～７８のいずれか１つに記載の使用。
８０．ＨＳＣＲが、ＲＥＴ遺伝子の変異に関連する、条項７９に記載の使用。
８１．腸の神経新生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア細胞の産生を含む、条項６１～８０のいずれか１つに記載の使用。
８２．腸の神経新生が、腸のニューロンおよび腸のグリア細胞の産生を含む、条項８１に記載の使用。
８３．腸のニューロンおよび／またはグリア細胞の産生が、腸のニューロンおよび／または腸のグリア前駆体の増殖を含む、条項８１または８２に記載の使用。
８４．方法が、無神経節域または神経節細胞僅少域の上流に位置する一酸化窒素作動性およびコリン作動性ニューロンサブタイプの不均衡を補正する、条項６１～８３のいずれか１つに記載の使用。
８５．医薬品が、対象における遠位結腸の運動性を回復させる、条項６１～８４のいずれか１つに記載の使用。
８６．医薬品が、対象の遠位結腸におけるリンパ球および／または骨髄免疫細胞の割合を回復させる、条項６１～８５のいずれか１つに記載の使用。
８７．ヒト対象が、５歳未満または１歳未満である、条項６１～８６のいずれか１つに記載の使用。
８８．ヒト対象が、生後６ヶ月未満である、条項８７に記載の使用。
８９．医薬品が、直腸および／またはＳ字結腸への投与のためのものである、条項６１～８８のいずれか１つに記載の使用。
９０．医薬品が、直腸Ｓ字領域への投与のためのものである、条項８９に記載の使用。

【００１１】

本発明の他の目的、利点、および特徴は、添付の図面を参照してのみ例として与えられる、以下の特定の実施形態の非限定的な記載の閲読の際に、より明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

添付図面において、

【図１】図１Ａ～Ｈは、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスにおけるＧＤＮＦ療法パラメータの設定を示す。（図１Ａ～Ｂ）Ｐ４（図１Ａ）およびＰ８（図１Ｂ）のＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}仔の結腸における１０μｌのメチレンブルー浣腸の分布。（図１Ｃ）Ｐ４～Ｐ８間に１日１回１０μｌの浣腸を受けたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}仔の生存率に対するＧＤＮＦ濃度の影響。示される量は、各日に投与されたＧＤＮＦの総量に相当する。（図１Ｄ）治療時間枠（Ｐ４～Ｐ８対Ｐ８～Ｐ１２）、持続時間（１ｄ、５ｄ、または１０ｄ；Ｐ４で開始）、および頻度（１日１または２回、５日間）が、ＧＤＮＦ浣腸で治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}仔の生存率に与える影響（単回の浣腸当たりに投与したＧＤＮＦの量は、１０μｌ中１０μｇで一定に維持した）。（図１Ｅ）Ｐ４～Ｐ８間に１日１回、示された神経栄養分子（ノギン、エンドセリン－３、またはセロトニン受容体アゴニストＲＳ６７５０６；すべて１μｇ／μｌの最終濃度で）を含有する１０μｌの浣腸を投与したＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}仔の生存率。（図１Ｆ）Ｐ４～Ｐ８間に毎日ＧＤＮＦ浣腸（１０μｌ中１０μｇ）を受けたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}仔の生存率に対する食物の一貫性（通常の餌対ゲル食）の影響。（図１Ｇ）Ｐ４～Ｐ８間に１日１回、ＧＤＮＦ浣腸（１０μｌ中１０μｇ）を受けたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}仔の生存率に対する、アスコルビン酸（Ｖｉｔ．Ｃ；１００μＭ最終濃度）、セロトニン（５－ＨＴ；１μｇ／μｌ最終濃度）、およびエンドセリン－３（ＥＴ３；１μｇ／μｌ最終濃度）の同時投与の影響。（図１Ｈ）Ｐ４～Ｐ８間に毎日ＧＤＮＦ浣腸（１０μｌ中１０μｇ）を受けたＰ２０Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの結腸におけるニューロン密度（表面積の％で表される）および関連する健康状態。

【図２】図２Ａ～Ｅは、ＨＳＣＲマウスモデルにおいて、ＧＤＮＦ浣腸が無神経節巨大結腸症を救済することを示す。（図２Ａ～Ｃ）、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}（図２Ａ）、Ｅｄｎｒｂ^{S}－ｌ／ｓ－ｌ（図２Ｂ）、およびＴａｓｈＴ^{Tg}／^{Tg}（図２Ｃ）マウスへのＧＤＮＦ浣腸の

Ｐ４～Ｐ８間の毎日の投与は、巨大結腸症状（すなわち、結腸における遠位閉塞および糞物質の蓄積、成長の遅れ、倦怠感、ならびに猫背）および生存率（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ統計検定、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}およびＥｄｎｒｂ$^{Ｓ－ｌ}$／$^{ｓ－ｌ}$の場合におけるＧＤＮＦ治療群と非治療群との比較、またはＴａｓｈＴ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}の場合におけるＧＤＮＦ治療群とＰＢＳ治療群との比較）の両方に正の影響を与える。（図２Ｄ）Ｐ２０マウスからの結腸筋肉ストリップのホールマウント免疫蛍光染色は、５日間のＧＤＮＦ治療が、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスの他の無神経節領域において、ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$ニューロンおよびＳｏｘ１０$^{+}$グリアを含有する腸筋層間神経節を誘発することを示す。破線の輪郭は、外因性神経線維が占める領域を示す。各代表的な画像の下は、結腸の長さに沿った各結腸部分領域（円柱によって表される）の平均ニューロン密度の概略図である。ニューロン密度を、単一の共焦点スライスにおける、腸壁内の腸筋層間神経叢のレベルでのＨｕＣ／Ｄ$^{+}$細胞が占める面積のパーセンテージとして表す（ｎ＝群当たり６マウス；部分領域当たり３つの視野）。各遠位結腸部分領域のニューロン密度もまた、数値として示す。（図２Ｅ）５日間のＧＤＮＦ治療中にＥｄＵの腹腔内注射を受けたＰ２０マウスからの遠位結腸筋板の免疫蛍光分析は、誘発された腸筋層間ニューロン（矢じり）およびグリア（矢印）のサブセットが、治療期間中に分裂前駆体から生成されたことを示す。破線の輪郭は、単一の神経節が占める領域を示す。（図２Ｆ）遠位結腸における腸筋層間ニューロンおよびグリアのＥｄＵ組み込みの定量化。結果を、ｍｍ^{2}当たりのＥｄＵ$^{+}$細胞の数として表す（ｎ＝３匹のＷＴおよび３匹のＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス；動物当たり２～７つの視野；＊＊＊Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。示されるすべての画像は、腸筋層間神経叢のレベルでのｚスタックプロジェクションを表す。スケールバー、１００μｍ（図２Ｄ）および５０μｍ（図２Ｅ）。

【図３】図３は、Ｐ２０でのＷＴ、未治療のＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}、またはＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスの遠位結腸における、腸筋層間神経叢および粘膜下神経叢の概要を示す。腸筋層間（上部パネル）および粘膜下（下部パネル）神経叢におけるＴｕＪ１$^{+}$ニューロン構造の免疫蛍光分析。矢印は、ニューロン本体を含有するＧＤＮＦによって誘発された神経節を指す。挿入図は、破線枠内のＧＤＮＦによって誘発された神経節の拡大図である。ＧＤＮＦで治療されたマウスは、Ｐ４～Ｐ８から１日１回、１０μＬの浣腸中１０μｇのＧＤＮＦを受けた。すべての画像は、３匹のマウスから得た観察を表すｚスタックプロジェクションを示す。スケールバー、１００μｍ（大パネル）および５０μｍ（挿入図）。

【図４】図４Ａ～Ｃは、Ｐ４～Ｐ８間にＧＤＮＦで治療されたかまたはされなかったＰ２０Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}およびＴａｓｈＴ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスの結腸における、腸筋層間神経節サイズおよびニューロン密度の分析を示す。（図４Ａ）Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスにおける腸筋層間神経節サイズの分析。（図４Ｂ）ＴａｓｈＴ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスにおけるニューロン密度の分析。各結腸部分領域（円柱によって表される）についての平均ニューロン密度を、結腸の長さに沿って示す。ニューロン密度を、単一焦点面における、腸壁内の腸筋層間神経叢のレベルでのＨｕＣ／Ｄ$^{+}$細胞が占める面積のパーセンテージとして表す（ｎ＝群当たり６マウス；部分領域当たり３つの視野）。各遠位結腸部分領域のニューロン密度もまた、数値として示す。（図５Ｃ）ＴａｓｈＴ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスにおける腸筋層間神経節サイズの分析。

【図５】図５Ａ～Ｃは、Ｐ４～Ｐ８間にＥｄＵを投与したＰ２０ＷＴおよびＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスからの結腸における、腸筋層間および粘膜下神経節のＥｄＵ組み込みの分析を示す。（図５Ａ）遠位結腸における粘膜下ニューロン（矢じり）およびグリア（矢印）のｚスタックプロジェクションでのＥｄＵ組み込みの例。破線の輪郭は、単一の神経節が占める領域を示す。スケールバー、５０μｍ。（図５Ｂ）中央および遠位結腸における粘膜下の、ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ＋）およびグリア（ＳＯＸ１０$^{+}$）のＥｄＵ組み込みの定量分析。結果を、ｍｍ^{2}当たりのＥｄＵ$^{+}$細胞の数として表す（ｎ＝３匹のＷＴおよび３匹のＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス；動物当たり２～７つの視野；＊Ｐ＜０．０５；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。（図５Ｃ）

遠位結腸における腸筋層間（左パネル）および粘膜下（右パネル）の、ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$）およびグリア（ＳＯＸ１０$^{+}$）のＥｄＵ組み込みの定量分析。結果を、神経節当たりのＥｄＵ$^{+}$細胞のパーセンテージで表す（ｎ＝３匹のＷＴおよび３匹のＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウス；動物当たり２～７つの視野；＊＊＊Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。ＧＤＮＦで治療されたマウスは、Ｐ４～Ｐ８から１日１回、１０μＬの浣腸中１０μｇのＧＤＮＦを受けた。

【図６】図６Ａ～Ｋは、Ｐ２０Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスにおけるＧＤＮＦによって誘発されたＥＮＳの表現型および機能的特徴付けを示す。（図６Ａ～Ｂ）Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの遠位結腸からのＧＤＮＦによって誘発された腸筋層間神経節の免疫蛍光に基づく定量分析は、ＷＴ様ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$）対グリア（Ｓｏｘ１０$^{+}$）比（図６Ａ）、ならびに一酸化窒素作動性（ｎＮＯＳ$^{+}$ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$）およびコリン作動性（ＣｈＡＴ$^{+}$ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$）ニューロンの割合（図６Ｂ）を示す（ｎ＝群当たり６匹のマウス；動物当たり３つの視野）。（図６Ｃ）ＧＤＮＦによって誘発された腸筋層間神経節の分析は、一酸化窒素作動性およびコリン作動性ニューロンの存在を示すだけでなく、チロシンヒドロキシラーゼ（ＴＨ）、物質Ｐ（ＳｕｂＰ）、カルレチニン（ＣａｌＲ）、または血管活性腸管ペプチド（ＶＩＰ）のいずれかを発現する他のニューロンサブタイプの存在も示す。すべての画像は、サブタイプマーカー当たり３匹のマウスから得た観察を表す単一焦点面であり、矢印は、示されるニューロンサブタイプの例を指す。スケールバー、２０μｍ。（図６Ｄ）インビボビーズ潜時試験は、ＧＤＮＦで治療された一部のＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスにおける結腸の運動性の部分的な回復を示す（ｎ＝群当たり８～９匹のマウス、＊Ｐ＜０．０５；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。統計的有意性に影響を与えることなく分析を簡略化するために、直腸挿入後にガラスビーズを排出するまでの時間を３０分の上限に制限したことに留意されたい。（図６Ｅ）フォーストランスデューサを備えた臓器浴での縦走平滑筋の収縮－弛緩の電界刺激パターンおよび薬物変調パターンのエクスビボ分析。収縮強度（ｇ／秒で表される）は、電界刺激後に得た曲線下面積（ＡＵＣ）値のベースラインからの差から計算する。Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}＋ＧＤＮＦ群の平均ΔＡＵＣ値を、収縮性応答に応じて２つのサブグループに分割する。ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスからの結腸筋肉ストリップのうちの約半分（７つのうちの４つ）は、（それぞれＬ－ＮＡＭＥおよびアトロピンを使用した）一酸化窒素作動性およびコリン作動性シグナル伝達の一連の阻害に対するＷＴ様応答パターンを示した一方で、残りの半分（７つのうちの３つ）は、未治療のＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスからの筋肉ストリップと同様の低い応答性のままであった（ｎ＝６匹のＷＴおよびＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}、ｎ＝７匹のＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}＋ＧＤＮＦ；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１；事後Ｔｕｋｅｙ検定を用いた二元配置分散分析）。（図６Ｆ）ＵｓｓｉｎｇチャンバでのＦＩＴＣ標識４ｋＤａデキストラン（ＦＤ４）に対する遠位結腸粘膜透過性のエクスビボ測定は、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}結腸における透過性の増加を示し、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの３分の２（６匹のうちの４匹）が回復に向かっていることを示す（ｎ＝群当たり６匹のマウス；＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。（図６Ｇ～Ｉ）遠位結腸の横断面のＨ＆Ｅ染色は、ＧＤＮＦ治療が、平滑筋の厚さの増加（図６Ｇの括弧、および図６Ｈの定量化を参照されたい）、および粘膜下における好中球の数の増加（図６Ｇのアスタリスク、および図６Ｉの定量化を参照されたい）の両方を救済することを示す（ｎ＝群当たり６匹のマウス；スケールバー、１５０μｍ；＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。（図６Ｊ～Ｋ）マイクロバイオームプロファイリングは、ＧＤＮＦ治療が、未治療のＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウス（ｎ＝群当たり５匹のマウス）で通常観察される微生物叢の不均衡を少なくとも部分的に救済することを示す。バーヒストグラム（図６Ｊ）は、属レベルでの１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子配列の平均的な相対存在量を示す（＊Ｐ＜０．０５；事後Ｔｕｋｅｙ検定を用いた一元配置分散分析）。９５％の信頼区間楕円でのベータ多様性比較（図６Ｋ）は、試料間の操作的分類単位の相対存在量のＢｒａｙ－Ｃｕｒｔｉｓ非類似度の非計

量的多次元尺度構成法（ＮＭＤＳ）に基づく（Ｐ＜０．００１；ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ）。
【図７】図７Ａ～Ｂは、Ｐ２０でのＷＴ、未治療のＨｏｌ$^{Tg/Tg}$、またはＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの近位および中央結腸における、一酸化窒素作動性およびコリン作動性腸筋層間ニューロンの割合を示す。（図７Ａ）一酸化窒素作動性（左パネル）およびコリン作動性（右パネル）ニューロンの割合の定性分析。スケールバー、５０μｍ。（図７Ｂ）一酸化窒素作動性（左パネル）およびコリン作動性（右パネル）ニューロンの割合の定量分析（ｎ＝３匹のＷＴおよび３匹のＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウス；動物当たり３つの視野；＊Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。ＧＤＮＦで治療されたマウスは、Ｐ４～Ｐ８から１日１回、１０μＬの浣腸中１０μｇのＧＤＮＦを受けた。
【図８】図８Ａ～Ｂは、Ｐ２０でのＷＴ、未治療のＨｏｌ$^{Tg/Tg}$、またはＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの遠位結腸における、運動性のインビボおよびエクスビボ分析を裏付ける情報を示す。（図８Ａ）Ｐ２０での遠位結腸におけるニューロン密度と、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスにおけるビーズ排出時間との間の相関（図６Ｄを裏付ける）。（図８Ｂ）フォーストランスデューサを備えた臓器浴での縦走平滑筋の収縮－弛緩の電界刺激パターンおよび薬物変調パターンの例（図６Ｅを裏付ける）。応答性の組織では、電界刺激（ＥＦＳ）は、結腸筋肉の収縮を引き起こし、収縮は、一酸化窒素作動性シグナル伝達のＬ－ＮＡＭＥによって媒介される阻害によってわずかに増加され得、コリン作動性シグナル伝達のアトロピンによって媒介される阻害によって堅牢に打ち消され得る。ＧＤＮＦで治療されたマウスは、Ｐ４～Ｐ８から１日１回、１０μＬの浣腸中１０μｇのＧＤＮＦを受けた。
【図９】図９Ａ～Ｂは、Ｐ２０でのＷＴ、未治療のＨｏｌ$^{Tg/Tg}$、またはＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの遠位結腸における、平滑筋の厚さの分析を示す。（図９Ａ）異なる結腸域の代表的なＨ＆Ｅ染色断面、平滑筋の厚さは赤い括弧によって示される。スケールバー、１５０μｍ。（図９Ｂ）各結腸域の平均的な筋肉の厚さ（ｎ＝群当たり６匹のマウス；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；事後Ｔｕｋｅｙ検定を用いた一元配置分散分析）。ＧＤＮＦで治療されたマウスは、Ｐ４～Ｐ８から１日１回、１０μＬの浣腸中１０μｇのＧＤＮＦを受けた。
【図１０】図１０Ａ～Ｉは、外因性シュワン細胞前駆体（ＳＣＰ）が、無神経節結腸におけるＧＤＮＦによって誘発されたニューロンおよびグリアの供給源であることを示す。（図１０Ａ）Ｐ８でのＷＴ、Ｈｏｌ$^{Tg/Tg}$、およびＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスからのＧＩ管の異なる部分領域における、ＧＤＮＦ分布のウエスタンブロット分析。内因性ＧＤＮＦ（ｅＧＤＮＦ）は、通常、すべてのマウスにおいて回腸に限定される一方で、組換えＧＤＮＦ（ｒＧＤＮＦ）は、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの遠位結腸に独占的に検出される。ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$では、ｅＧＤＮＦは、結腸のすべての部分領域で発現する。示される抗ＧＤＮＦブロットは、群当たり３匹のマウスから得た観察を表す。（図１０Ｂ～Ｃ）Ｐ４～Ｐ８間のＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの浣腸治療に使用したＧＤＮＦ（$_{His}$ＧＤＮＦ）の６ｘＨｉｓタグ付きバージョンの分布の時間経過分析。２日間隔での遠位結腸の抗Ｈｉｓおよび抗ＲＥＴ二重染色は、治療中に$_{His}$ＧＤＮＦおよびＲＥＴの両方が粘膜下に蓄積することを示す（図１０Ｂ）。両方とも、Ｐ８で、外因性神経線維の近くで誘発された腸筋層間ニューロンで検出される（図１０Ｃ）。すべての画像は、３匹のマウスから得た観察を表すｚスタックプロジェクションを示す。スケールバー、２０μｍ。（図１０Ｄ）Ｈｏｌ$^{Tg/Tg}$からの無神経節結腸組織の１０時間の長いタイムラプス記録からの代表的な画像；ＳＣＰ様細胞が外因性神経繊維上で分裂（矢印）および移行（矢じり）していることを示すＧ４－ＲＦＰマウス。Ｐ４遠位結腸から外植片を調製し、ＧＤＮＦを用いて７２時間予め培養した後、ＧＤＮＦの継続的な存在下で、共焦点顕微鏡で生体撮像した。画像は、３つの外植片から得た観察を表す５０μｍ厚のｚスタックプロジェクションである。スケールバー、１００μｍ。（図１０Ｅ～Ｆ）抗ＳＯＸ１０および抗Ｋｉ６７二重標識は、９６時間のＧＤＮＦへの曝露が、Ｐ４

ＨｏｌTg／Tgマウスから調製した遠位結腸の外植片において、ＳＣＰ増殖率を顕著に増加させることを示す。図１０Ｅの画像は、３つの外植片から得た観察を表す単一焦点面である。スケールバー、５０μｍ。図１０Ｆの各値は、外植片当たり最低３つの視野から計算したＫｉ６７＋ＳＣＰの平均パーセンテージ（すなわち、（Ｋｉ６７＋ＳＯＸ１０＋／ＳＯＸ１０＋）×１００）に相当する（＊＊Ｐ＜０．０１；両側スチューデントｔ検定）。（図１０Ｇ～Ｈ）Ｐ４～Ｐ８間に腹腔内注射を介してＧＤＮＦ浣腸およびＥｄＵを投与されたＰ２０ＨｏｌTg／Tg；Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋マウスの遠位結腸における、腸筋層間神経節の免疫蛍光分析。誘発されたニューロンの、以下の４つのカテゴリーが検出される：１）ＳＣＰ由来（Ｄｈｈ＋系統）およびＥｄＵ陽性（塗りつぶした灰色の矢じり）、２）ＳＣＰ由来およびＥｄＵ陰性（空の灰色の矢じり）、３）起源不明およびＥｄＵ陽性（塗りつぶした白色の矢じり）、４）起源不明およびＥｄＵ陰性（空の白色の矢じり）。図１０Ｇの画像は、３匹のマウスから得た観察を表す単一焦点面である。スケールバー、５０μｍ。図１０Ｈにプロットした神経節当たりの誘発されたニューロンの４つのカテゴリーの相対的な割合は、マウス当たり最低３つの視野から計算した平均に相当する。破線の輪郭は、外因性神経繊維（図１０Ｅ）、または外因性神経繊維および隣接する単一の神経節（図１０ＣおよびＧ）のいずれかが占める領域を示す。図１０Ｉ：ＨｏｌTg／Tgマウスの無神経節遠位結腸のシュワン細胞は、ニューロン細胞接着分子（ＮＣＡＭ）を発現するが、ＲＥＴを発現しない。Ｐ２０での未治療のＨｏｌTg／TgマウスのＳ遠位結腸からの外因性神経線維（破線で描写される）における、ＮＣＡＭおよびＲＥＴ発現の免疫蛍光分析。ＲＥＴではなくＮＣＡＭは、ＳＯＸ１０＋シュワン細胞および推定される腸のグリア／ＥＮＳ前駆体（矢印）で発現する。ＤＡＰＩ、４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール。示される画像は、３匹のマウスから得た観察を表す単一焦点面である。スケールバー、５０μｍ。

【図１１】図１１は、Ｐ２０でのＧＤＮＦで治療されたＨｏｌTg／TgマウスのＳ複数の組織における、ＧＤＮＦ分布の分析を示す。Ｐ４～Ｐ８から１日１回、１０μＬの浣腸中１０μｇのＧＤＮＦを受けたＰ２０ＨｏｌTg／TgマウスのＳ異なる組織において、内因性ＧＤＮＦ（ｅＧＤＮＦ）および組換えＧＤＮＦ（ｒＧＤＮＦ）のαチューブリンが正常化されたレベルである、ウェスタンボルト分析。示されるブロットは、３匹のマウスから得た観察を表す。

【図１２】図１２は、ＨｉｓＧＤＮＦで治療されたＰ４～Ｐ８ＨｏｌTg／TgマウスのＳ結腸平滑筋における、ＨｉｓＧＤＮＦ分布およびＲＥＴ発現の時間経過分析を示す。ＨｉｓＧＤＮＦで治療されたＨｏｌTg／TgマウスのＳ遠位結腸筋板における、ＨｉｓＧＤＮＦ分布およびＲＥＴ発現の免疫蛍光分析。白い矢じりは、ＨｉｓＧＤＮＦにも陽性に染色されるＲＥＴ＋ニューロンを指す。すべての画像は、３匹のマウスから得た観察を表す単一焦点面を示す。スケールバー、２０μｍ。

【図１３】図１３Ａ～Ｄは、Ｐ２０でのＤｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋、およびＨｏｌTg／Tg；Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋マウスの腸筋層間および粘膜下神経節における、ＳＣＰ由来神経新生の分析を示す。（図１３Ａ）Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋（対照）およびＨｏｌTg／Tg；Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋（ＨｏｌTg／Tg）マウスの近位結腸における、腸筋層間ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ＋）およびＹＦＰ発現の分析。黄色い矢じりは、ＳＣＰ由来ニューロンを指す。（図１３Ｂ）Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋（対照）およびＨｏｌTg／Tg；Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋（ＨｏｌTg／Tg）マウスの近位および中央結腸における、腸筋層間ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ＋）およびＹＦＰ発現の定量分析（ｎ＝３匹の対照および３匹のＨｏｌTg／Tgマウス；動物当たり３つの視野；＊Ｐ＜０．０５；事後シダック検定を用いた一元配置分散分析）。（図１３Ｃ）Ｐ４～Ｐ８間にＧＤＮＦで治療されたＨｏｌTg／Tg；Ｄｈｈ－ＣｒｅTg／＋；Ｒ２６ＹＦＰ／＋（ＨｏｌTg／Tg）マウスの遠位結腸における、粘膜下ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ＋）およびＹＦＰ発現の分析。ＳＣＰ（灰色の矢じり）または不明（白色のじり）起源のいずれかのニューロンが検出される。（図１３Ｄ）Ｐ４～Ｐ８間にＧＤＮＦで治療されたＨｏｌTg／Tg；Ｄｈｈ－Ｃｒ

ｅ$^{Tg/+}$；Ｒ２６$^{YFP/+}$（ＨｏｌＴｇ／Ｔｇ）マウスの遠位結腸における、ＲＥＴ発現腸筋層間ニューロン（ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$）およびＹＦＰ発現の分析。ＲＥＴは、ＳＣＰ（ＲＥＴ＋、塗りつぶした灰色の矢じり；ＲＥＴ－、空の灰色の矢じり）または非ＳＣＰ（白色の矢じり）起源に関係なく、ニューロンのサブセットで発現する。示されるすべての画像は、３匹のマウスから得た観察を表すｚスタックプロジェクションである。スケールバー、５０μｍ。破線の輪郭は、単一の神経節が占める領域を示す。

【図１４】図１４Ａ～Ｈは、ＨｏｌＴｇ／ＴｇマウスおよびヒトヒトＨＳＣＲ患者からの無神経節結腸の外植片に対するＧＤＮＦ療法のエクスビボ前臨床試験を示す。（図１４Ａ～Ｃ）Ｐ４ＨｏｌＴｇ／Ｔｇマウスの遠位結腸から調製し、ＧＤＮＦおよびＥｄＵ（＋ＧＤＮＦ）またはＥｄＵ単独（対照）の存在下で９６時間培養した外植片の免疫蛍光に基づく分析。新しいＨｕＣ／Ｄ$^{+}$ニューロンは、これらのエクスビボ培養条件下でＧＤＮＦによって誘発され得るが、外植片当たりのニューロンの総数は変動的であり（図１４Ａ）、これらのニューロンは、存在する場合、非常に小さな神経節のみを形成し（図１４Ｂ）、それらは、ＥｄＵ組み込みを示す可能性がＳＣＰよりも低かった（図１４Ｂの矢じりおよび図１４Ｃの定量化を参照されたい）（ｎ＝条件当たり７つの外植片；Ｐ＜０．０５；＊＊Ｐ＜０．０１；＊＊＊Ｐ＜０．００１；両側マンホイットニーＵ検定）。（図１４Ｄ～Ｇ）ヒトＨＳＣＲ患者から切除した無神経節結腸の試料から調製し、ＧＤＮＦおよびＥｄＵ（＋ＧＤＮＦ）またはＥｄＵ単独（対照）の存在下で９６時間培養した外植片の免疫蛍光に基づく分析。これらの条件下で培養されたすべてのヒト外植片では、ＧＤＮＦ治療は、ＳＯＸ１０$^{+}$ＳＣＰにＥｄＵの堅牢な組み込みをもたらすが、ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$ニューロンにはもたらされない（図１４Ｄ～Ｅ）。有意な数のＨｕＣ／Ｄ$^{+}$ニューロンはすべて、手術時（図１４Ｇ）に生後３ヶ月未満の患者に由来する外植片のサブセットにおいてＧＤＮＦによって誘発され得る（図１４Ｆ）（ｎ＝条件当たり１２個の外植片；＊Ｐ＜０．０５；両側マンホイットニーＵ検定）。（図１４Ｈ）合計７日間、ＧＤＮＦの存在下で延長された培養によって、手術時に生後≧３ヶ月の患者からのヒト外植片において、ＥｄＵを組み込んだいくつかのニューロン（矢じり）を含む、ニューロンが検出された。示されるすべての画像は、腸筋層間神経叢のレベルでのｚスタックプロジェクションを表す。スケールバー、５０μｍ（図１４ＢおよびＨ）、および１００μｍ（図１４ＤおよびＦ）。破線の輪郭は、外因性神経線維が占める領域を示す。

【図１５】図１５Ａ～Ｂは、Ｐ４ＨｏｌＴｇ／Ｔｇマウスから調製し、ＧＤＮＦの存在下または不在下で９６時間培養した遠位結腸外植片における、神経新生およびＳＣＰ増殖の分析を示す。ＧＤＮＦおよびＥｄＵ（＋ＧＤＮＦ）またはＥｄＵ単独（対照）の存在下で培養したＨｏｌＴｇ／Ｔｇマウスからの遠位結腸の外植片において、ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$ニューロン（図１５Ａ）、およびＥｄＵ$^{+}$ＳＯＸ１０$^{+}$が増殖しているＳＣＰ（図１５Ｂの矢印）の代表的な画像。示される画像は、７匹のマウスから得た観察を表す単一焦点面である。スケールバー、５０μｍ。破線の輪郭は、外因性神経線維が占める領域を示す。

【図１６】図１６は、ＨＳＣＲ患者から調製し、ＧＤＮＦの存在下で９６時間培養したＳ字結腸外植片における、ＧＤＮＦによって誘発されたニューロンのマーカー分析を示す。ヒトＧＤＮＦによって誘発されたニューロンが、外因性神経と密接に関連し、βＩＩＩ－チューブリン（ＴｕＪ１）、ＲＥＴ、ＰＧＰ９．５、およびＰＨＯＸ２Ｂを発現することを示す免疫蛍光分析（図１４Ｆを裏付ける）。矢じりは、ＰＧＰ９．５$^{+}$ニューロンの丸い／卵形の核を指す。示される画像は、３つのヒト試料から得た観察を表す単一焦点面である。スケールバー、１００μｍ（上部パネル）、５０μｍ（中央パネル）、および２５μｍ（下部パネル）。

【図１７】図１７Ａは、ヒトＧＤＮＦアイソフォーム１のアミノ酸配列（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ受託番号Ｐ３９９０５、配列番号１）を示し、シグナルペプチドに対応する配列（残基１～１９）は下線が引かれ、プロペプチドに対応する配列（残基２０～７５）はイタリック体で、成熟ポリペプチドに対応する配列（残基７８～２１１）は太字で示す。　図１７Ｂ～Ｃは、ヒトＧＤＮＦアイソフォーム１をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列（ＲｅｆＳｅｑ受託番号ＮＭ＿０００５１４．４、配列番号２）を示し、シグナルペプチド

をコードする配列（ヌクレオチド５６２～６１８）は下線が引かれ、プロペプチドをコードする配列（ヌクレオチド６１９～７８６）はイタリック体で、成熟ポリペプチドをコードする配列（ヌクレオチド７９３～１１９４）は太字で示す。

【００１３】

発明の開示

技術を説明する文脈において（特に、以下の特許請求の範囲の文脈において）、「ａ」および「ａｎ」および「ｔｈｅ」という用語、ならびに同様の指示対象の使用は、本明細書において別段示されないか、または文脈に明らか矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を網羅するように解釈されるものである。

【００１４】

「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、および「含有する」という用語は、別段注釈が付かない限り、オープンエンド用語（すなわち、「限定されないが含む」を意味する）として解釈されるものである。

【００１５】

本明細書に記載のすべての方法は、本明細書において別段示されない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施され得る。

【００１６】

本明細書に提供される任意のおよびすべての実施例、または例示的な言語（「例えば」、「など」）の使用は、単に特許請求される技術の実施形態をより良好に例示することを意図しており、別段特許請求されない限り、範囲の限定を提起するものではない。

【００１７】

本明細書におけるいかなる言語も、任意の特許請求されていない要素を特許請求される技術の実施形態の実施に不可欠であることを示すものとして解釈されるべきではない。

【００１８】

本明細書では、「約」という用語は、その通常の意味を有する。「約」という用語は、値が、値を決定するために用いられるデバイスもしくは方法の誤差についての固有の変動を含むか、または列挙された値に近い値、例えば、列挙された値（または値の範囲）の１０％以内の値を包含することを示すために使用される。

【００１９】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において別段示されない限り、単に、範囲内に含まれる各個別の値を個々に参照する簡略方法として機能することを意図しており、各個別の値は、本明細書に個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。範囲内の値のすべてのサブセットもまた、本明細書に個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。

【００２０】

開示の特徴または態様が、マーカッシュ群または代替物の一覧の観点から説明される場合、当業者は、開示がまた、それによってマーカッシュ群または代替物の一覧の任意の個々の構成要素または構成要素の部分群の観点からも説明されることを認識するであろう。

【００２１】

別段具体的に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味（例えば、幹細胞生物学、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、および生化学における）と同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【００２２】

別段示されない限り、本開示において利用される組換えタンパク質、細胞培養、および免疫学的技法は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技術は、Ｊ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９８４），Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８

９），Ｔ．Ａ．Ｂｒｏｗｎ（ｅｄｉｔｏｒ），Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９１），Ｄ．Ｍ．Ｇｌｏｖｅｒ ａｎｄ Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ（ｅｄｉｔｏｒｓ），ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １－４，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９５ ａｎｄ １９９６）、およびＦ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｉｔｏｒｓ），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８，現在に至るまでのすべての改訂版を含む）、Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（ｅｄｉｔｏｒｓ）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（１９８８）、およびＪ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｉｔｏｒｓ）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（現在に至るまでのすべての改訂版を含む）などの情報源における文献全体を通じて記載および説明されている。

【００２３】

本明細書に記載の研究において、本発明者らは、ＨＳＣＲマウスモデルにおいて、直腸浣腸を介した遠位結腸における組換えＧＤＮＦの適切な投薬量の投与が、新しく機能する腸のニューロンおよびグリアの永続的な形成、ならびに結腸の運動性の回復を無神経節結腸に誘発することができることを示す。遺伝子系統追跡は、外因性神経線維に位置するＳＣＰが、これらの新しく新生された腸のニューロンおよびグリアの１つの供給源であることを示す。ＧＤＮＦは、ヒトＨＳＣＲ患者からの無神経節結腸の培養された外植片において、神経新生を刺激し得ることがさらに示されている。したがって、ＲＥＴに非依存的であるがＧＦＲα１に依存的な様式で、とりわけ、その代替的な受容体ニューロン細胞接着分子（ＮＣＡＭ）を通じて、シュワン細胞の移動および増殖を刺激する能力を理由として、ＧＤＮＦは、無神経節部におけるＥＮＳ前駆体の生後の再活性化のための一次候補と思われた。これらの結果は、結腸（例えば、遠位結腸）に投与される組換えＧＤＮＦの投与が、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲなどのＥＮＳ欠損）の治療、すなわち、ヒト患者における腸のニューロパチーの病理学的特徴のうちの１つ以上の改善のために使用することができる証拠を提供する。

【００２４】

したがって、第１の態様では、本開示は、腸のニューロパチー（例えば、ヒルシュスプルング病（ＨＳＣＲ）または腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域における腸の神経新生を誘発するための方法であって、方法が、有効用量のグリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物を、対象の遠位結腸に投与することを含む、方法を提供する。

【００２５】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象における遠位結腸の運動性および／または上皮バリアを回復させるための方法であって、方法が、有効用量のＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物を、対象の遠位結腸に投与することを含む、方法を提供する。

【００２６】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域において腸の神経新生を誘発するための、ヒトＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物の使用であって、組成物が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、使用を提供する。

【００２７】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）

を患っているヒト対象における遠位結腸の運動性を回復させるための、ヒトＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物の使用であって、組成物が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、使用を提供する。

【００２８】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域において腸の神経新生を誘発するための医薬品を製造するための、ヒトＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物の使用であって、医薬品が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、使用を提供する。

【００２９】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象における遠位結腸の運動性を回復させるための医薬品を製造するための、ヒトＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物の使用であって、医薬品が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、使用を提供する。

【００３０】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象の遠位結腸の無神経節域または神経節細胞僅少域において腸の神経新生を誘発するための薬学的組成物であって、組成物が、ヒトＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含み、薬学的組成物が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、薬学的組成物を提供する。

【００３１】

本開示はまた、腸のニューロパチー（例えば、ＨＳＣＲまたは腸管神経節細胞僅少症）を患っているヒト対象における遠位結腸の運動性を回復させるための薬学的組成物であって、組成物が、ヒトＧＤＮＦポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含み、薬学的組成物が、対象の遠位結腸への投与のためのものである、薬学的組成物を提供する。

【００３２】

本明細書で使用される「遠位結腸」という用語は、結腸の最後の３つの部分、すなわち、下行結腸、Ｓ字結腸、および直腸を指す。一実施形態では、薬学的組成物は、直腸および／またはＳ字結腸に投与されるか、または直腸および／またはＳ字結腸への投与のためのものである。一実施形態では、薬学的組成物は、Ｓ字結腸の最後の部分および直腸の始まりを含む直腸Ｓ字領域に投与されるか、または直腸Ｓ字領域への投与のためのものである。当業者は、薬学的組成物が、遠位結腸に直接投与され得るか、または遠位結腸から離れた部位であるが、薬学的組成物（およびより具体的には、ヒトＧＤＮＦポリペプチド）の遠位結腸への送達を提供する好適な手段を使用して投与され得ることを理解するであろう。例えば、薬学的組成物は、遠位結腸の条件（例えば、ｐＨ、酵素環境、細菌環境など）下で特異的に分解されるコーティングを含み得、したがって、薬学的組成物は、胃－腸管系の別の領域に投与され得るが、薬学的組成物が結腸、より具体的には遠位結腸に達した場合にのみ、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは放出されるであろう。結腸特異的薬物送達のためのアプローチは、当該技術分野で周知であり（例えば、Ｐｈｉｌｉｐ ｅｔ ａｌ．，Ｏｍａｎ Ｍｅｄ Ｊ．２０１０ Ａｐｒ；２５（２）：７９－８７、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ．２０２０ Ｊａｎ；１２（１）：６８を参照されたい）、ｐＨ依存性の系（例えば、ｐＨ依存性ポリマーを使用する）、受容体によって媒介される系、磁気駆動系、遅延または時間依存性の系、微生物が引き起こす薬物送達系（例えば、グルコロニダーゼ（ｇｌｕｃｏｒｏｎｉｄａｓｅ）、キシロシダーゼ、アラビノシダーゼ、ガラクトシダーゼなどの結腸微生物叢によって産生される酵素によって分解され得る糖に基づくポリマーを含む）、圧力制御結腸送達カプセル（結腸で遭遇するより高い圧力によって誘発される薬物放出）、浸透圧制御薬物送達、ならびにこれらのアプローチの任意の組み合わせ（例えば、ｐＨ依存性および微生物が引き起こす薬物送達を組み合わせたアプローチを使用する、結腸標的送達系（ＣＯＤＥＳＴＭ））が挙げられる。

【００３３】

本明細書で使用される「腸のニューロパチー」という用語は、ＥＮＳの異常発達、例えば、ニューロンの数の異常（神経節細胞僅少症、無神経節症）、および／またはニューロンの分化異常を含む、ＥＮＳにおける異常に関連する疾患を指す。腸のニューロパチーの例としては、ＨＳＣＲおよび腸管神経節細胞僅少症などの腸の神経節細胞異常が挙げられる。一実施形態では、腸のニューロパチーは、ＨＳＣＲである。別の実施形態では、腸のニューロパチーは、腸管神経節細胞僅少症である。

【００３４】

本明細書で使用される「腸の神経新生を誘発する」という表現は、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物での治療前と比較した、腸のニューロンおよび／または腸のグリア細胞の産生の増加を指す。腸の神経系は、腸の一次求心性ニューロン（ｅｎｔｅｒｉｃ ｐｒｉｍａｒｙ ａｆｆｅｒｅｎｔ ｎｅｕｒｏｎ）（ＥＰＡＮ）、興奮性輪走筋運動ニューロン、阻害性輪走筋運動ニューロン、縦走筋運動ニューロン、上行性介在ニューロン、下行性介在ニューロン、分泌運動および血管運動ニューロン、ならびに腸管遠心性（ｉｎｔｅｓｔｉｎｏｆｕｇａｌ）ニューロンを含む様々なタイプのニューロン、ならびにニューロンに構造的支持を提供し、ニューロンの維持、生存、および機能に寄与する腸のグリア細胞（ＥＧＣ）を含む（Ｃｏｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｕｔ ２０００；（Ｓｕｐｐｌ ＩＶ）４７：ｉｖ１５－ｉｖ１９、Ｄｅ Ｇｉｏｒｇｉｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ－Ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ａｎｄ Ｌｉｖｅｒ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．３０３，Ｎｏ．８：Ｇ８８７－Ｇ８９３，２０１２）。

【００３５】

これらの細胞タイプのうちの１つ以上の産生は、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物の投与／使用によって誘発され得る。一実施形態では、ＥＧＣ、好ましくはＳｏｘ１０発現ＥＧＣの産生は、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物の投与／使用によって誘発される。一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物の投与／使用は、患者の結腸（例えば、遠位結腸）における腸のニューロン／グリア細胞比を回復させる。さらなる実施形態では、患者の結腸（例えば、遠位結腸）における腸のニューロン／グリア細胞比は、少なくとも０．５、例えば、０．５～１．５である。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物の投与／使用は、患者の結腸（例えば、遠位結腸）における一酸化窒素作動性（ｎＮＯＳ$^{+}$）およびコリン作動性（ＣｈＡＴ$^{+}$）ニューロンの割合を回復させる。

【００３６】

別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物の投与／使用は、結腸（例えば、遠位結腸）における炎症細胞または免疫細胞（例えば、好中球）の浸潤を低減する。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物の投与／使用は、結腸（例えば、遠位結腸）における免疫細胞の割合を（部分的にまたは完全に）回復させる。

【００３７】

本明細書で使用される「ヒトＧＤＮＦポリペプチド」という用語は、天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質、または天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質の生物学的活性、例えば、ＧＤＮＦ受容体（特に、「トランスフェクション中に再配列した」（ＲＥＴ）プロトがん遺伝子および／またはニューロン細胞接着分子（ＮＣＡＭ）受容体）に結合し、ＧＤＮＦ受容体（例えば、ＲＥＴおよび／もしくはＮＣＡＭ）を発現する細胞においてシグナルを引き起こす能力を保持する、機能的バリアントもしくはその断片を指す。天然ヒトＧＤＮＦタンパク質のアミノ酸配列（アイソフォーム１、カノニカル配列）は、図１７Ａ（配列番号１）に示され、成熟タンパク質（残基７８～２１１）に対応する配列は太字で強調表示されている。ＧＤＮＦ前駆体タンパク質は、ホモ二量体として存在する成熟分泌型へと処理される。各ＧＤＮＦモノマーは、鎖間ジスルフィド架橋に使用されるＣｙｓ－１０１、およびシステイン－ノット構成として知られる分子間環形成に関与する他のものを含む、７つの保存的システイン残基を含有する。

【００３８】

一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、組換えヒトＧＤＮＦポリペプチドである。タンパク質またはポリペプチドに言及する場合、「組換え」という用語は、天然源（例えば、生物学的試料）から単離されていない、例えば、分子生物学的技法の手段によって作製される組換え核酸構築物から発現する、タンパク質またはポリペプチド分子を指す。したがって、核酸構築物を「組換え」と称することは、核酸分子が遺伝子工学を使用して、すなわちヒト介入によって操作されていることを示す。組換え核酸構築物は、例えば、形質転換（例えば、形質導入またはトランスフェクション）によって宿主細胞に導入され得る。

【００３９】

天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質の機能的バリアントまたは断片は、天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質と比較して１つ以上のアミノ酸置換、欠失、および／または付加を含み得、天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質のものよりも低いか、同等であるか、または高い生物学的活性を有し得る。一実施形態では、機能的バリアントまたは断片は、天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質のものと同等である（例えば、９０％～１１０％）か、またはより高い（例えば、１１０％超）の活性を有する。一実施形態では、バリアントは、１つ以上の保存的置換を含む。保存的アミノ酸置換は、当該技術分野において既知であり、ある特定の物理的および／または化学的特性を有する１つのアミノ酸が、同じ化学的または物理的特性を有する別のアミノ酸と交換される、アミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、別の酸性アミノ酸に置換された酸性アミノ酸（例えば、Ａｓｐ－Ｇｌｕまたはその逆）、非極性側鎖を有する別のアミノ酸に置換された非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｔｒｐ、Ｖａｌなど）、別の塩基性アミノ酸に置換された塩基性アミノ酸（Ｌｙｓ、Ａｒｇなど）、極性側鎖を有する別のアミノ酸に置換された極性側鎖を有するアミノ酸（Ａｓｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒなど）であり得る。別の実施形態では、バリアントは、少なくとも１つの非保存的アミノ酸置換を有する、天然ＧＤＮＦタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、非保存的アミノ酸置換は、天然成熟ヒトＧＤＮＦタンパク質のものと比較して、バリアントの活性を向上する。一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、ＲＥＴ受容体に結合する能力を有する。一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、ＮＣＡＭ受容体に結合する能力を有する。

【００４０】

一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、成熟ヒト天然ＧＤＮＦタンパク質からの少なくとも１０、１５、または２０個のアミノ酸（例えば、連続アミノ酸）を含む。一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、配列番号１の残基１５３～１６７に対応し、ＮＣＡＭ受容体へのヒトＧＤＮＦの推定される結合ドメインである、配列ＥＴＴＹＤＫＩＬＫＮＬＳＲＮＲ（グリアフィン（ｇｌｉａｆｉｎ）、配列番号３）を含む（Ｎｉｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２００９　Ｓｅｐ　９；２９（３６）：１１３６０－１１３７６を参照されたい）。他の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、成熟ヒト天然ＧＤＮＦタンパク質からの少なくとも２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、または１００個のアミノ酸（例えば、連続アミノ酸）を含む。

【００４１】

一実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７８Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少なくとも５０％、６０％、または７０％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少なくとも８０％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少なくとも８５％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少

なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少なくとも９８％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１と少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、図１７Ａに示される配列（配列番号１）の残基７８～２１１を含むか、またはそれらからなる。「同一性」は、２つのポリペプチド間の配列同一性を指す。同一性は、整列させた配列における各位置を比較することによって決定することができる。同一性パーセントを決定する方法は、当該技術分野において既知であり、アミノ酸配列を整列させ、ＥＭＢＯＳＳ Ｎｅｅｄｌｅ、ＣｌｕｓｔａｌＷ、ＳＩＭ、ＤＩＡＬＩＧＮなどを含む同一性のパーセントを決定するためのいくつかのツールおよびプログラムが利用可能である。本明細書で使用される場合、特定の対象配列またはその特定の部分に関する同一性の所与のパーセンテージは、Ｓｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム（Ｓｍｉｔｈ＆Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１４７：１９５－７（１９８１））によって、類似性測定値としてＢＬＯＳＵＭ置換マトリックス（Ｈｅｎｉｋｏｆｆ＆Ｈｅｎｉｋｏｆｆ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０９１５－９（１９９２））を使用して生成される最大パーセンテージ配列同一性を達成するために必要であれば、配列を整列させ、ギャップを導入した後、対象配列（またはその特定の部分）におけるアミノ酸と同一の候補誘発体配列におけるアミノ酸のパーセンテージとして定義され得る。「同一性値％」は、一致する同一のアミノ酸の数を、同一性パーセントが報告される配列長によって除算することによって決定される。

【００４２】

ヒトＧＤＮＦポリペプチドの共有結合修飾は、本開示の範囲内に含まれる。例えば、ヒトＧＤＮＦポリペプチドの天然グリコシル化パターンは、修飾され得（Ｂｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：４８２－５０１，２００８、Ｗａｌｓｈ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ １５：７７３－７８０，２０１０）、米国特許第４，６４０，８３５号、同第４，４９６，６８９号、同第４，３０１，１４４号、同第４，６７０，４１７号、同第４，７９１，１９２号、または同第４，１７９，３３７号に記載の様式で、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを、多様な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのうちの１つに連結し得る。ヒトＧＤＮＦポリペプチドは、プロテアーゼ耐性、血漿タンパク質結合、血漿半減期の増加、組織もしくは細胞内への透過などの、ポリペプチドに追加の生物学的特性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。そのような修飾としては、例えば、脂肪酸（例えばC_6－C_{18}）などのポリペプチドへの分子／部分の共有結合、アルブミンなどのタンパク質の結合（例えば、米国特許第７，２６８，１１３号を参照されたい）、糖／多糖（グリコシル化）、ビオチン化またはＰＥＧ化（例えば、米国特許第７，２５６，２５８号および同第６，５２８，４８５号を参照されたい）が挙げられる。ヒトＧＤＮＦポリペプチドはまた、例えば、ヒトＧＤＮＦポリペプチドをオリゴマー化ドメインまたはオリゴマー化され得る分子（例えば、ストレプトアビジン上の４つの結合部位に結合し得るビオチン）に融合することによって、その多量体化またはオリゴマー化（例えば、四量体化）を誘発するための部分にコンジュゲートされ得る。ヒトＧＤＮＦポリペプチドはまた、例えば、遠位結腸からの細胞上に存在するマーカーに結合する抗体、抗体断片、またはリガンドを使用して、ＧＤＮＦポリペプチドを遠位結腸または遠位結腸の特定の細胞（例えば、シュワン細胞および／またはその前駆体）に標的化するであろう部分にコンジュゲートされ得る。

【００４３】

ヒトＧＤＮＦポリペプチドはまた、１つ以上の治療剤または活性剤（例えば、薬物、または融合ポリペプチドを形成するための別のポリペプチド）にコンジュゲートされ得る。Ｈｕｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９６２）Ｎａｔｕｒｅ，１４４：９４５、Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．（１９７４）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：１０１４、Ｐａｉｎ ｅｔ ａ

ｌ．（１９８１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，４０：２１９、Ｎｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，３０：４０７（１９８２）、およびＨｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９６，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏによって記載されているそれらの方法を含む、ヒトＧＤＮＦポリペプチドを別の部分（例えば、活性剤）にコンジュゲートするための当該技術分野で既知の任意の方法が用いられ得る。

【００４４】

一実施形態では、ヒト対象に投与されるか、またはヒト対象に投与するための組換えＧＤＮＦポリペプチドの有効用量は、仔マウスにおける約５μｇ～約２０μｇの用量に相当し、これは、本明細書に記載の研究において有効であることが示される範囲である。組換えＧＤＮＦ溶液を含む１０μｌの浣腸を、仔マウスに投与した。１０μｌは、仔の遠位結腸および直腸を満たすのに必要な体積に相当すると推定される。したがって、マウス（仔）における５μｇのＧＤＮＦの投与は、０．５μｇ／μｌのＧＤＮＦ溶液を１０μｌ投与することによって達成され、マウス（仔）における２０μｇのＧＤＮＦの投与は、２．０μｇ／μｌのＧＤＮＦ溶液を１０μｌ投与することによって達成される。ヒト乳児の遠位結腸および直腸を満たすために必要な体積は、以下の式を使用して推定することができる：１０ｍｌ×乳児の体重（ｋｇ）。したがって、マウスにおける５μｇのＧＤＮＦの用量は、ヒト乳児におけるｋｇ当たり約５ｍｇに相当し、マウスにおける２０μｇのＧＤＮＦの用量は、ヒト乳児におけるｋｇ当たり約２０ｍｇに相当する。したがって、一実施形態では、ヒト対象に投与されるか、またはヒト対象に投与するための組換えＧＤＮＦポリペプチドの有効用量は、ｋｇ当たり約５ｍｇ～約２０ｍｇ、好ましくはｋｇ当たり約１０ｍｇ～約１５ｍｇである。一実施形態では、組換えＧＤＮＦポリペプチドは、０．５ｍｇ／ｍｌ～２ｍｇ／ｍｌの組成物（溶液またはゲル）を通じて投与されるか、またはそのような投与のためのものである。

【００４５】

直腸／遠位結腸投与のための製剤は、坐剤として提示されてもよく、坐剤は、対象組成物を、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックス、またはサリチル酸塩を含む１つ以上の好適な非刺激性担体と混合することによって調製され得、非刺激性担体は、室温では固体であるが、体温では液体であり、したがって、適切な体腔内で融解し、ＧＤＮＦを含む組成物を放出するであろう。より近年では、液体坐薬が開発されている。液体坐剤は、典型的には、ポロキサマー、Ｃａｒｂｏｐｏｌ（登録商標）（架橋ポリアクリル酸ポリマー）、アルギン酸ナトリウム、ポリカルボフィル、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、ヒドロキシエチルセルロース、およびメチルセルロースなどの感熱性および／または粘膜付着性ポリマーを含有する。

【００４６】

直腸／遠位結腸投与のための製剤はまた、直腸および遠位結腸に注入される浣腸、液体薬物溶液、懸濁液、または乳剤として提示され得る。ＧＤＮＦポリペプチドが希釈される液体は、例えば、水または生理食塩水溶液であり得る。

【００４７】

直腸／遠位結腸投与のための製剤はまた、直腸泡沫またはゲルの形態であり得る。直腸ゲルは、粘性の一貫性を作り出すためにポリマーネットワーク内に捕捉された溶媒を含有する半固体製剤である。ゲルの粘度は、共溶媒（例えば、グリセリンおよびプロピレングリコール）および電解質の添加によって変更することができる。泡沫は、全体を通じて分布する、発泡剤を含有する親水性液体連続相および気体分散相を含む。直腸投与に続いて、それらは、粘膜表面上で泡沫状態から液体または半固体状態に移行する。発泡剤は、典型的には、泡沫の生成および安定化に重要な両親媒性物質である。分子は、水相に可溶性である親水性構成成分と、ミセルを形成して水相との接触を最小限に抑える疎水性構成成分とを含有する。

【００４８】

直腸／遠位結腸への投与は、医薬品または液体の直腸投与または遠位結腸壁への注入の

ために設計された現在利用可能な内視鏡または専用カテーテルを使用して実施され得、繰り返し使用するために直腸内に安全に配置され、快適に保持され得る。

【００４９】

ＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物は、任意の好適な投薬レジメンに従って、例えば、１日４回、１日２回、１日１回、週２回、週１回など投与され得る。治療は、所望の効果を達成するために、任意の好適な期間、例えば、１週間、２週間、３週間以上の間実施され得る。

【００５０】

一実施形態では、上述の治療は、１つを超える活性剤／治療剤（すなわち組み合わせ）の使用／投与を含み、そのうちの１つは、ＧＤＮＦポリペプチドを含む上述の薬学的組成物である。治療剤の組み合わせおよび／または組成物は、任意の従来の剤形で投与され得るか、または（例えば、連続的に、異なる時間に同時に）同時投与され得る。本開示の文脈における同時投与は、改善された臨床転帰を達成するように調整された治療の過程における、１つを超える療法の使用を指す。本明細書に記載のＧＤＮＦポリペプチドを含む薬学的組成物は、他の療法または薬物、例えば、鎮痛剤または抗炎症剤と組み合わせて使用され得る。本明細書に記載のＧＤＮＦポリペプチドを含む薬学的組成物はまた、神経栄養分子などの、ＥＮＳ前駆体増殖を刺激する薬剤と組み合わせて使用され得る。

【００５１】

一実施形態では、ＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物での上述の治療は、手術（例えば、Ｓｗｅｎｓｏｎ、Ｓｏａｖｅ、またはＤｕｈａｍｅｌタイプのプルスルー手術）と組み合わせて実施され得る。特にＨＳＣＲを有する新生児の場合、臨床医は、多くの場合、手術前に毎日の浣腸治療の試験を試みることを推奨する。組換えＧＤＮＦを浣腸に添加することによって、ＨＳＣＲを有する小児が手術前の浣腸療法に良好に応答する可能性が増加し得る。したがって、一実施形態では、ＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物での上述の治療は、プルスルー手術前に実施される。生理食塩水浣腸はまた、一般的に、プルスルー手術後のＨＳＣＲを有する小児に使用される。ＨＳＣＲ患者の手術後の問題は、遠位腸、いわゆる「通過部」に残留する神経節細胞僅少症に少なくとも部分的に起因すると考えられる。したがって、組換えＧＤＮＦを浣腸に添加することは、手術後に残留する遠位腸における神経節細胞僅少症を補正するのに有用であり得る。したがって、別の実施形態では、ＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物での上述の治療は、プルスルー手術後に実施される。

【００５２】

一実施形態では、ＧＤＮＦポリペプチドを含む組成物での上述の治療は、ＨＳＣＲの治療のために検討されているＥＮＳ幹細胞に基づく療法と組み合わせて実施される。ＧＤＮＦは、生着を促進するためのこれらの療法の有用な補佐役となり得る。

【００５３】

ＨＳＣＲは、臨床的に、短域型（Ｓ－ＨＳＣＲ）および長域型（Ｌ－ＨＳＣＲ）に細分される。症例のうちの＞８０％で発生するＳ－ＨＳＣＲは、直腸およびＳ字結腸にＥＮＳが存在しないことを意味する。Ｌ－ＨＳＣＲは、遠位腸のより長い領域が無神経節であることを意味する。本明細書に記載の方法／使用は、Ｓ－ＨＳＣＲまたはＬ－ＨＳＣＲを患っているヒト患者の治療のためのものである。一実施形態では、本明細書に記載の方法／使用は、Ｓ－ＨＳＣＲを患っているヒト患者の治療のためのものである。一実施形態では、本明細書に記載の方法／使用は、Ｌ－ＨＳＣＲを患っているヒト患者の治療のためのものである。

【００５４】

ＨＳＣＲ患者は、成人患者または小児患者であり得る。一実施形態では、ＨＳＣＲ患者は、小児患者、好ましくは、５、４、３、または２歳未満の患者、より好ましくは、１歳未満または生後６ヶ月未満の患者である。別の実施形態では、患者は、男性である。

【００５５】

ＨＳＣＲは、ＲＥＴ、ＥＤＮＲＢ、ＳＯＸ１０、ＰＨＯＸ２Ｂ、およびＺＦＨＸ１Ｂの変異、ならびにダウン症候群または２１トリソミー（コラーゲンＶＩ関連ＨＳＣＲ）に関

連する。また、５対１ほどの高さの男女比で、有意な性差が存在する。一実施形態では、ＨＳＣＲは、コラーゲンＶＩ関連ＨＳＣＲである。別の実施形態では、ＨＳＣＲは、ＥＤＮＲＢ変異関連ＨＳＣＲである。一実施形態では、ＨＳＣＲは、男性に偏在するＨＳＣＲである。一実施形態では、ＨＳＣＲは、ＲＥＴ変異関連ＨＳＣＲ、例えば、遠位結腸からの細胞におけるＲＥＴ発現および／または活性を低減する変異に関連するＨＳＣＲである。変異は、ＲＥＴまたはＲＥＴシグナル伝達に関与するタンパク質における変異であり得る。一実施形態では、変異は、ＲＥＴタンパク質における変異である。染色体１０ｑ１１．２上のＲＥＴ遺伝子の変異は、ＨＳＣＲの家族性症例のうちの５０％および散発性症例のうちの１５～２０％を占めることが示されており、そのほとんど（約７５％）は、Ｌ－ＨＳＣＲに関連していた。

【００５６】

別の実施形態では、ＨＳＣＲは、ＲＥＴ変異関連ＨＳＣＲではない。

【００５７】

発明を実行するためのモード

本発明は、以下の非限定的な例によってさらに詳細に例示される。

【００５８】

実施例１：材料および方法

マウス。ホルスタイン（Ｔｇ［Ｓｏｘ３－ＧＦＰ，Ｔｙｒ］ＨｏｌＮｐｌｎ）、ＴａｓｈＴ（Ｔｇ［ＳＲＹ－ＹＦＰ，Ｔｙｒ］ＴａｓｈＴＮｐｌｎ）、およびＧ４－ＲＦＰ（Ｇａｔａ４ｐ［５ｋｂ］－ＲＦＰ）株は、以前記載したとおり（すべてＦＶＢ／Ｎ遺伝バックグラウンドで維持）（３９、４０、５４）であった一方で、Ｐｉｅｂａｌｄ－ｌｅｔｈａｌ（Ｅｄｎｒｂ$^{s-l}$；ＪＡＸストック＃０００３０８；Ｃ３Ｈ／ＨｅＪ－Ｃ５７ＢＬ／６混合バックグラウンド）およびＤｈｈ－Ｃｒｅ（Ｔｇ［Ｄｈｈ－ｃｒｅ］１Ｍｅｊｒ；ＪＡＸストック＃０１２９２９；ＦＶＢ／Ｎバックグラウンド）は、Ｔｈｅ Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから得た。使用した他のマウス株は、Ｒ２６$^{[Floxed\ Stop]YFP}$（Ｇｔ［ＲＯＳＡ］２６Ｓｏｒ$^{tm1(EYFP)Cos}$；Ｆ．Ｃｏｓｔａｎｔｉｎｉ（Ｃｏｌｕｍｂｉａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＵＳＡ）によって提供され、ＦＶＢ／Ｎバックグラウンドで維持）（８０）であった。

【００５９】

すべての浣腸治療について、変異仔マウスを、色素沈着に基づく遺伝子型決定を介して、Ｐ３で同定した。別段指定されない限り（図１を参照されたい）、ＰＢＳ中に希釈した組換えヒト成熟ＧＤＮＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈカタログ＃４５０－１０）の１μｇ／μｌ溶液からなる１０μｌの浣腸をＰ４～Ｐ８の間、毎日投与した。いくつかの実験に使用した臨床グレードＧＤＮＦ（Ｍｅｄｇｅｎｅｓｉｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｘ Ｉｎｃ．、Ｃａｎａｄａ）および以前記載した６ＸＨｉｓタグ付きバージョン（５３）は、同様の効率を有した。他の試験した分子（１０μｌの浣腸中１μｇ／μｌ溶液）は、セロトニン受容体（５－ＨＴ４Ｒ）アゴニストＲＳ６７５０６（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ＃０９９０）、ノギン（Ｓｉｇｍａ、カタログ＃ＳＲＰ４６７５）、エンドセリン－３（Ｓｉｇｍａ、カタログ＃Ｅ９１３７）、セロトニン（Ｓｉｇｍａ、カタログ＃Ｈ９５２３）、およびＬ－アスコルビン酸（Ｓｉｇｍａ、カタログ＃Ａ４４０３）を含んでいた。マイクロピペットに取り付けた２４ゲージの強制飼養ニードル（Ｆｉｎｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｔｏｏｌｓ、Ｃａｎａｄａ）を使用して、浣腸を投与した。強制飼養ニードルの頭部を、（Ｖａｓｅｌｉｎｅ（商標）で予め潤滑させた）肛門のすぐ向こうの直腸に導入し、数秒かけて浣腸を注入した。次いで、仔を母親の元へ戻し、組織分析のためにＰ２０で犠牲にしたか、または生存率を追跡するために毎日チェックした。

【００６０】

ＥｄＵ組み込みアッセイのために、仔マウスに、１０ｍＭのＥｄＵ溶液（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ＃Ｃ１０３３７）の１０μｌの腹腔内注射を５日間（Ｐ４～Ｐ８）、ＧＤＮＦ浣腸治療中に１日１回与えた。

【００６１】

組織処理。標識されるすべての腸組織を、腸間膜に沿って縦方向に切断し、ＰＢＳで洗浄し、Ｓｙｌｇａｒｄでコーティングしたペトリ皿上にピン留めし、４％のＰＦＡで一晩、４℃で固定し、最後に顕微解剖して、（粘膜下のニューロンの神経節を含有する）粘膜下層／粘膜層から（腸筋層間のニューロンの神経節を含有する）縦走筋／輪走筋を分離した。生体組織のエクスビボ分析を伴う実験のために、縦走筋／輪走筋および粘膜下層／粘膜層を、同様に顕微解剖したが、固定しなかった。代わりに、この手順を、氷冷した酸素処理したＫｒｅｂ溶液（０．１８７ｇ／ＬのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$－２Ｈ$_2$Ｏ、６．８４ｇ／ＬのＮａＣｌ、０．３５ｇ／ＬのＫＣｌ、２．１０ｇ／ＬのＮａＨＣＯ$_3$、１．９８ｇ／Ｌのグルコース、０．３６８ｇ／ＬのＣａＣｌ$_2$－２Ｈ$_2$Ｏ、０．２４４ｇ／ＬのＭｇＣｌ$_2$－６Ｈ$_2$Ｏ）中で実施した。組織学的分析のために、ＰＦＡで固定した腸組織を上記のように調製したが、さらなる顕微解剖を行わず、次いで固定した完全な厚さの腸域をパラフィンに埋め込み、１０μｍで横断方向に切断した。

【００６２】

組織標識化および撮像。免疫蛍光染色のために、顕微解剖した組織全体を、遮断溶液（ＰＢＳ中１０％のＦＢＳおよび１％のＴｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００）中で２時間透過させ、その後、いずれもすべてのステップ間で組織を洗浄するためにも使用した遮断溶液中に希釈した、特定の一次抗体（４℃で一晩）および関連する二次抗体（室温で２時間）とともに順次インキュベートした。すべての抗体および希釈倍率を表１に列挙する。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｌｉｃｋ－ｉＴ　ＥｄＵ撮像キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ＃Ｃ１０３３７）を製造業者の指示に従って使用して、ＥｄＵを検出した。組織学的分析のために、完全な厚さの腸組織の断面を、以前に記載したように、ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した（８３）。

【表１】

表１：免疫蛍光に使用した一次抗体および希釈倍率の一覧

抗体	供給源	カタログ番号	RRID 参照	希釈
6X His	R&D systems	MAB050	AB_357353	1:500
CalR	Swant	CG1	AB_10000342	1:500
ChAT	Millipore	AB144P	AB_2079751	1:100
GFP	Abcam	Ab290	AB_303395	1:500
HuC/D	分子プローブ	A-21271	AB_221448	1:500
HuC/D (ANNA-1)	Vanda Lennon から寄贈	---	AB_2313944	1:2000
Ki67	Abcam	ab15580	AB_443209	1:500
NCAM	Abcam	ab5032	AB_2291692	1:500
NOS1	Santa Cruz Biotechnology	sc-648	AB_630935	1:200
RET	R&D systems	MAB718	AB_2232594	1:500
SOX10	Santa Cruz Biotechnology	sc-17342	AB_2195374	1:200
SubP	Abcam	ab67006	AB_1143173	1:500
TH	Abcam	ab137869	---	1:500
TUJ1	Covance	MRB-435P	AB_663339	1:1000
VIP	Abcam	ab8556	AB_306628	1:500

【００６３】

Ｈ＆Ｅで染色した切片を除いて、すべての免疫蛍光画像は、共焦点顕微鏡（ＮｉｋｏｎＡ１ＲまたはＺｅｉｓｓ７１０のいずれか）に２０倍または６０倍の対物レンズのいずれかを用いて取得したが、Ｈ＆Ｅで染色した切片は、Ｌｅｉｃａ　ＤＭ２０００顕微鏡（Ｌｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｃａｎａｄａ）に取り付けたＩｎｆｉｎｉｔｙ－２カメラ（Ｌｕｍｅｎｅｒａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を使用して１０倍の対物レンズを

用いて撮像した。細胞計数については「マルチポイント」機能、表面積の計算については「多角形選択」機能を使用して、画像分析をＩｍａｇｅＪで実施した。

【００６４】

結腸の運動性のインビボおよびエクスビボ分析。Ｐ２０マウスにおける遠位結腸の運動性のインビボ分析は、ビーズ潜時試験を使用して実施した。マウスに、２％のイソフルランで麻酔をかけ、２mmのガラスビーズ（Ｓｉｇｍａ、カタログ＃１．０４０１４）を、プローブを用いて肛門から０．５ｃｍの距離にわたって遠位結腸に挿入した。次いで、各マウスを、食物および水を与えずにマウスのケージ内に単離し、ガラスビーズを排出するのに必要な時間を監視し、これを遠位結腸通過についての代理物とした。ビーズを排出する最大時間を３０分とした。

【００６５】

結腸の運動性のエクスビボ分析のために、Ｐ２０マウスの最遠位結腸（肛門から１ｃｍ）からの生体筋肉のストリップを上記のように調製し、酸素処理したＫｒｅｂ溶液を充填したＳｃｈｕｌｅｒ臓器浴（Ｈａｒｖａｒｄ　ａｐｐａｒａｔｕｓ）に縦方向で付着させた。最初に、６０分間２ｇの張力の負荷を事前にかけて筋肉ストリップを延伸させ、次いで、ＢＩＯＰＡＣ　ｓｔｕｄｅｎｔ　Ｌａｂ　４．０．２ソフトウェア（ＢＩＯＰＡＣ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）を備えたコンピュータに取り付けたミオグラフ（Ｎａｒｃｏ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．、モデルＦ－６０）を用いて、縦走筋の収縮／弛緩を連続的に記録した。電極に接続した電圧刺激装置（ＢＩＯＰＡＣ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．、モデルＢＳＬ　ＭＰ３６／３５）を用いて、筋肉を直接活性化することなく腸のニューロンを活性化するパラメータ（１２Ｖ、２０Ｈｚ、１０秒の連続持続時間、および３００μｓの刺激パルス持続時間）を使用して、電界刺激（ＥＦＳ）を適用した。この手順を３回繰り返し、刺激の間に１０分間のウォッシュアウト期間を設けた。ＥＦＳによって誘発された収縮性応答の一酸化窒素作動性およびコリン作動性構成成分を特徴評価するために、Ｎ－ニトロ－Ｌ－アルギニンメチルエステル（Ｌ－ＮＡＭＥ；Ｓｉｇｍａ、カタログ＃Ｎ５７５１）およびアトロピン（Ｓｉｇｍａ、カタログ＃Ａ０１１３２）を、それぞれ０．５μＭおよび１μＭの最終濃度でＫｒｅｂｓ溶液に添加した。各ＥＦＳによって誘発された応答中の曲線下面積（ＡＵＣ）を測定し、データをΔＡＵＣ（刺激後に２０秒間測定したＡＵＣと刺激前に２０秒間測定したＡＵＣとの間の差に相当する）で表した。

【００６６】

傍細胞透過性のエクスビボ分析。Ｐ２０マウスの最遠位結腸（肛門から１ｃｍ）からの生体粘膜域を上記のように調製し、０．５cm^2の露出表面積でＵｓｓｉｎｇチャンバ（Ｗａｒｎｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｍｏｄｅｌ　Ｕ－９９２６）に取り付けた。各チャンバは、５ｍｌのＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Ｗｉｓｅｎｔ、カタログ＃３１９－０８５－ＣＬ）を含有し、これを３７℃で維持し、連続的に酸素処理した（９５％のO_2／５％のCO_2）。３０分間の平衡期間の後、２００μｌの上部培地を、２００μｌのフルオレセインイソチオシアネートコンジュゲートデキストラン４ｋＤａの１ｍｇ／ｍｌ溶液（ＦＤ４；Ｓｉｇｍａ、カタログ＃６０８４２－４６－８）に置き換えた。次いで、管腔表面からの傍細胞輸送を反映する、１５０μｌの側底アリコートの蛍光強度を、蛍光計（ＴＥＣＡＮ、Ｍｏｄｅｌ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｍ１０００）を使用して３時間の期間にわたって３０分ごとに測定した。蛍光強度は、標準曲線と比較することによって、最終的にＦＤ４の量に変換し、３時間の期間の平均値を使用して、傍細胞透過性を計算し、これを、分当たりの粘膜表面積当たりのｎｇでのＦＤ４（ｎｇ／cm^2／分）で表した。

【００６７】

マイクロバイオーム分析。便単離、マイクロバイオーム配列決定、およびデータ分析を、以前記載したように実施した（３８）。簡単に述べると、Ｐ２０でマウスを犠牲にし、それらの糞を結腸から直接収集した（マウス当たり３個の糞）。次いで、細菌ＤＮＡを、ＱＩＡａｍｐ（登録商標）Ｆａｓｔ　ＤＮＡ　Ｓｔｏｏｌ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ、カタログ＃５１６０４）を使用して抽出し、１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子のＶ５－Ｖ６領域を、以前記載したバーコード化プライマーの集合体でＰＣＲ増幅させた（８４）。Ｉｌ

ｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑシーケンサーを用いて生成した未修正の配列を対合させ、ＭＯＴＨＵＲパイプライン（８５）を使用して処理し、その後ＢＩＯＭパッケージ（８６）を使用して、相対的な分類群の存在量およびベータ多様性のグラフを生成するために、Ｒ（８７）にバイオムファイルを転写した。

【００６８】

ウエスタンブロット分析。Ｐ８またはＰ２０マウスからの臓器を計量し、１００ｍｇの組織ごとに１ｍＬを使用して、ＲＩＰＡ緩衝液（２５ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣＬ［ｐＨ７．６］、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、１％のＮｏｎｉｄｅｔ－Ｐ－４０、１％のデオキシコール酸ナトリウム、０，１％のドデシル硫酸ナトリウム、１倍のＲｏｃｈｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤を含有）に溶解させた。次いで、試料を氷上で超音波処理し、４℃、１４，０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、ウエスタンブロット分析のために上清を保存した。等体積の試料を、１８％のドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）中での電気泳動によって分離し、Ｉｍｍｕｎ－ｂｌｏｔ（登録商標）ＰＶＤＦ膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ（１６２０１７７）に移した。その後、膜を遮断溶液（ＴＢＳ中５％の脱脂乳および０．１％のＴｗｅｅｎ（登録商標）２０）中でインキュベートし、続いて、すべて遮断溶液中に希釈した、マウス抗ＧＤＮＦ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ＃ｓｃ－１３１４７、１：５００希釈倍率）またはウサギ抗αチューブリン（Ａｂｃａｍ、カタログ＃ａｂ１７６５６０、１：７０，０００希釈倍率）一次抗体のいずれか、次いで関連するホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体とともにインキュベートした。各インキュベーションを室温で６０分間行い、各回に遮断溶液で３回洗浄することによって散在させた。最終的に、Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎウエスタン化学発光ＨＲＰ基質（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｓｉｇｍａ、カタログ＃ＷＢＫＬＳ００５０）およびＦｕｓｉｏｎ ＦＸ撮像システム（Ｖｉｌｂｅｒ）を使用して、タンパク質を可視化した。

【００６９】

エクスビボタイムラプス撮像およびマウス無神経節結腸組織の培養。タイムラプス撮像のために、Ｐ４Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}；Ｇ４－ＲＦＰ二重トランスジェニック仔からの遠位結腸の最後の１ｃｍからの生体筋肉のストリップを上記のように調製し、Ｓｙｌｇａｒｄでコーティングした３５ｍｍのｉｂｉｄｉ μ皿（ｉｂｉｄｉ、カタログ（８１１５６）にピン留めした。筋肉ストリップを、標準培養条件（３７℃、５％のCO_2）下の５μｇ／ｍｌのＧＤＮＦを含むかまたは含まない、１０％のＦＢＳおよび１００ＩＵ／ｍｌの抗生物質－抗真菌剤を補充した、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Ｗｉｓｅｎｔ、カタログ＃３１９－０８５－ＣＬ）中に懸濁させて培養した。培養の７２時間後、各ペトリ皿を、同じ培養条件下で１０時間、顕微鏡インキュベーションチャンバ（Ｏｋｏｌａｂ）に配置し、以前記載したようにＮｉｋｏｎ Ａ１Ｒ共焦点ユニットで２０倍の対物レンズを使用して、１０分ごとにＲＦＰで標識した外因性神経およびＳＣＰの画像スタック（２５０μｍ厚）を取得した（３９）。

【００７０】

神経新生のエクスビボでの誘発のために、Ｐ４Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}仔からの遠位結腸の最後の１ｃｍからの生体筋肉のストリップを上記のように調製し、培養し、顕著な例外は、０．５μＭのＥｄＵの存在下で、より長期間培養を行ったことである。９６時間の培養の後、組織をＰＦＡで固定し、免疫蛍光およびＥｄＵ標識化のために処理した。

【００７１】

ヒト無神経節結腸組織の培養。Ｓ字結腸のヒト試料は、組織病理学的分析によって確認して、無神経節部のＳｗｅｎｓｏｎタイプの外科的切除を受けた１２人のＨＳＣＲ患者から得た。９人の患者（７人の男児および２人の女児、手術時に生後２８～１６３８日）を、Ｃｅｎｔｒｅ Ｈｏｓｐｉｔａｌｉｅｒ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔａｉｒｅ Ｓａｉｎｔｅ－Ｊｕｓｔｉｎｅ（Ｍｏｎｔｒｅａｌ，Ｃａｎａｄａ）で採用し、３人の患者（２人の男児および１人の女児、手術時に生後３００～１１７７日）を、Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｈｏｓｐｉｔａｌ ｏｆ Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａで採用した。手術の後、氷冷したＫｒｅｂｓ

溶液またはＢｅｌｚｅｒ ＵＷ Ｃｏｌｄ Ｓｔｏｒａｇｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｒｉｄｇｅ ｔｏ Ｌｉｆｅ Ｌｔｄ．）に完全な厚さの結腸組織を配置し、直ちに関連する研究室に搬送した。次いで、生体筋肉のストリップを、上記のように調製し、０．５ｃｍ×０．５ｃｍのより小さな切片に切断した。これらの小片のうちの少なくとも１つを、直ちに固定し、免疫蛍光を介した無神経節症の検証のために一旦保持し、他のものは、マウス組織における神経新生を誘発するために、上記のように９６時間培養した。２人の患者（手術時に生後８６～１６３８日）からの試料を、同じ条件下で７日間さらに培養した。培養期間の終わりに、すべての組織をＰＦＡで固定し、免疫蛍光およびＥｄＵ標識化のために処理した。

【００７２】

Ｐ２０結腸における免疫細胞集団のプロファイリング。ホルスタインマウスを、浣腸によってＧＤＮＦで治療（１０μｇのＧＤＮＦ（１μｇ／μｌを１０μｌ）を、Ｐ４～Ｐ８の間５日連続の毎日の投与）したか、またはしなかった。Ｐ２０に、ＧＤＮＦで治療されたホルスタインおよび対照（未治療ホルスタインおよびＷＴ）マウスの結腸を顕微解剖し、冷たいＲＰＭＩ培地中で洗浄して便を除去し、小片に切断し、機械的に分離し、濾過した（４０μｍ）。次いで、分離した細胞を遠心分離によって回収し、２％のＦＢＳを含む１ｍｌの氷冷ＲＰＭＩに再懸濁させ、血球計で計数した。すべての実験群および対照群について、1×10^{6}の分離した細胞を、リンパ球または骨髄系細胞集団のいずれかに特異的な１４個の蛍光標識した抗体のカクテルとともに、氷上で１時間インキュベートした。その後、ＬＳＲ Ｆｏｒｔｅｓｓａサイトメータ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）およびＦｌｏｗＪｏソフトウェア（ＦｌｏｗＪｏ ＬＬＣ）を使用して定量プロファイリングを実施した。

【００７３】

統計。最低３つの生物学的複製で、すべての実験を実施した。関連する場合、独立した複製の正確な数（ｎ）およびＰ値を計算するために使用した統計検定は、図および／または凡例に含まれる。Ｐ値は、Ｒソフトウェア（Ｔｈｅ Ｒ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ、Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ）で分析したマイクロバイオームデータを除いて、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ６を使用して決定した。

【００７４】

実施例２：短域ＨＳＣＲの３つのマウスモデルにおいて、ＧＤＮＦ浣腸は、無神経節症を救済する

短域ＨＳＣＲの３つのマウスモデルを使用して、若いマウスにおけるＧＤＮＦ浣腸が、腸のニューロン数を向上し、遠位無神経節の腸における機能を回復させることができるかどうかをまず試験した。選択した株は、Ｈｏｌｓｔｅｉｎ（Ｈｏｌ$^{Tg/Tg}$；Ｔｒｉｓｏｍｙ２１［コラーゲンＶＩ］関連ＨＳＣＲのモデル）（３９）、ＴａｓｈＴ（ＴａｓｈＴ$^{Tg/Tg}$；男性に偏在するＨＳＣＲのモデル）（４０）、およびＰｉｅｂａｌｄ－ｌｅｔｈａｌ（Ｅｄｎｒｂ$^{s-l/s-l}$；ＥＤＮＲＢ変異関連ＨＳＣＲのモデル）（４１）であった。まず、結腸全体を満たすために必要な浣腸体積、ＧＤＮＦホモ二量体の濃度（３０ｋＤａ）、治療時間枠、ならびに療法の持続時間および頻度を、Ｈｏｌ$^{Tg/Tg}$仔で決定した（図１Ａ～Ｄ）。１００μｇのＧＤＮＦの投与によって、生理食塩水対照と比較して生存率が低減することが観察され（図１Ｃ）、そのような用量が毒性であるか、または疾患を悪化させることが示唆された。１μｇまたは２５μｇのＧＤＮＦ投与は、生存率に有意な影響を有さず、１０または１５μｇが、生存率の改善に最適であることが示された。注目すべきことに、選択した治療（すなわち、ＰＢＳ中１０μｇのＧＤＮＦを１０μｌの浣腸として、生後日数［Ｐ］４～Ｐ８の間に５日連続の毎日の投与）は、対照Ｈｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの最大生存年齢であるＰ２８で、約半数のＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスにおいて、巨大結腸症による死亡を防止した（図２Ａ）。Ｐ２８まで生存したほとんどの動物は、ＧＤＮＦ治療後に成人年齢に達し、評価したマウスは、繁殖することができた（２つの試験した繁殖対は、繁殖力があった）。Ｐ５６（成人参照年齢）を超えて生存することが可

能であった数匹のオスは、最終的には、Ｐ６８、Ｐ９７、Ｐ１０１、およびＰ１８０で巨大結腸症によって死亡し、メスは、Ｐ６３で巨大結腸症によって、またはＰ１３８およびＰ２５０で難産によってのいずれかで最終的に死亡した。重要なことに、同じＧＤＮＦ浣腸治療はまた、Ｅｄｎｒｂ$^{s-l}$／／$^{s-l}$マウス（図２Ｂ）のうちの６０％超、およびすべてのオスＴａｓｈＴ^{Tg}／^{Tg}仔（図２Ｃ）の早期死亡を防止した。ＧＤＮＦで治療された９匹のオスＴａｓｈＴ^{Tg}／^{Tg}マウスは、１年以上にわたって飼育され、腫瘍または他の有害作用の兆候がなく健康に見えた。生理食塩水浣腸は、ＨＳＣＲを有する小児における腸炎を低減するので、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}、Ｅｄｎｒｂ$^{s-l}$／$^{s-l}$、およびＴａｓｈＴ^{Tg}／^{Tg}マウスの個別の群を、浣腸を介してＰＢＳで治療したが、ＰＢＳ単独は生存率を向上しなかった（図２Ａ～Ｃ）。ＰＢＳ中の、ノギンホモ二量体（４６ｋＤａ）、エンドセリン－３モノマー（２６ｋＤａ）、またはセロトニン受容体（５－ＨＴ４Ｒ）アゴニストＲＳ６７５０６（４５４．４１ｇ／ｍｏｌ）（１０μｌのＰＢＳ中各々１０μｇ）を使用したＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの浣腸治療も、平均寿命を増加させることができなかった（図１Ｅ）。集約すると、ＧＤＮＦ浣腸は、ホルスタイン、ＴａｓｈＴ、またはＰｉｅｂａｌｄ－ｌｅｔｈａｌ変異に起因するＨＳＣＲ様の遠位腸の無神経節症を有するマウスに有益であり得ることを、これらのデータは示唆している。

【００７５】

明らかにＧＤＮＦ応答性である変異マウス株において、ＧＤＮＦ浣腸に応答する変動性が観察された（図２Ａ～Ｃ）。標準的な餌をゲル食に置き換える（図１Ｆ）こと、またはＧＤＮＦを、ビタミンＣ（４４）、セロトニン（４５）、もしくはエンドセリン－３（４６）などのＥＮＳ前駆体増殖を刺激することが示されている他の分子と組み合わせることのいずれかによって、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}動物の全体的な生存率を増加させる試みは、成功しなかった（図１Ｇ）。ゲル食は、対照Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの平均寿命を平均５日間延長したが、ＧＤＮＦ浣腸群における生存率をさらに増加させなかった（図１Ｆ）。ＧＤＮＦ浣腸応答性は、ＧＤＮＦ治療を行わなかったＨＳＣＲマウスモデルにおいて平均寿命をも低減する腸の損傷または炎症にある程度依存する可能性がある（４７）。

【００７６】

ＧＤＮＦ浣腸がＨＳＣＲマウスモデルの生存率をどのように向上するのかを決定するために、遠位結腸無神経節症における生後の腸の神経新生によって生存率の向上が引き起こされたという仮説を試験した。Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスは、概して、浣腸治療を行わずともＰ２０の段階に達するので、Ｐ２０動物を分析した（図２Ａ）。ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$腸筋層間のニューロンは、ＷＴ遠位結腸に豊富であり、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}結腸の最後の１ｃｍには存在しなかった（図２Ｄ）。ＳＯＸ１０$^{+}$腸のグリアもまた、ＷＴ腸筋層間神経節内に豊富であった。対照的に、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}遠位結腸では、主に、ＳＯＸ１０$^{+}$ＳＣＰが存在する厚い外因性神経線維（図２Ｄ）内でＳＯＸ１０$^{+}$細胞が見出された（２９）。注目すべきことに、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}動物からの遠位結腸は、輪走平滑筋と縦走平滑筋との間の神経節に組織化された多数のＨｕＣ／Ｄ$^{+}$ニューロンおよびＳＯＸ１０$^{+}$グリアを有した（図２Ｄ）。これらの腸筋層間神経節は、主に、ＳＯＸ１０$^{+}$細胞を有する外因性神経線維に隣接していた。ＧＤＮＦによって誘発されたニューロンの神経節が、腸筋層間および粘膜下神経叢の両方で相互接続したネットワークを形成していることが、Ｔｕｊ１標識化によってさらに明らかになった（図３）。Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}およびオスＴａｓｈＴ^{Tg}／^{Tg}マウスの結腸全体における腸筋層間ニューロン密度の定量化は、ＧＤＮＦ効果が遠位結腸（すなわち、最終３ｃｍ）において最も顕著であり、近位結腸において効果が軽微であることを示した（図２Ｄおよび５Ａ～Ｃ）。ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの中央結腸におけるニューロン密度の増加（図２Ｄ）は、大神経節（すなわち、＞５０ニューロン）のより高い割合によって証明されるように、主に既存の腸筋層間神経節の拡大に起因していた（図４Ａ）。未治療のＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスには通常腸のニューロンがまったく無い場所である最遠位結腸において、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスは、ＷＴマウスのものの４０％である平均ニューロン密度を有した（５．２

±２．２％対１３．１±３．６％）（図２Ｄ）。さらに、すべてのＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスは、分離時に遠位結腸にニューロンを有していたが、一部のマウスは、遠位結腸に非常に低いニューロン密度（２．３％以下）を有し、これらのマウスは、多くの場合巨大結腸症を有していた（図１Ｈ）。注目すべきことに、ＧＤＮＦで治療されたＴａｓｈＴ^{Tg}／^{Tg}オスでは、最遠位結腸におけるニューロン密度は、ＷＴレベルの３６％（４．７±３．８％対１３．１±３．６％のニューロン密度）から１０８％（１４．２±４．３％対１３．１±３．６％のニューロン密度）に増加し（図４Ｂ～Ｃ）、いくつかのモデルでは、ＧＤＮＦ浣腸によって正常な腸のニューロン数を完全に回復させることが可能であることを示唆している。

【００７７】

重要なことに、Ｐ４～Ｐ８の５日間の治療中にＧＤＮＦがニューロンおよびグリア前駆体の増殖を誘発したことが、ＥｄＵ標識化によって確認された。ＧＤＮＦ治療期間中に毎日ＥｄＵ注射を受けたマウスからのＰ２０Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}結腸の免疫蛍光染色によって、腸筋層間および粘膜下神経節の両方において、多くのＥｄＵ$^{+}$ＨｕＣ／Ｄ$^{+}$（推定ニューロン）およびＥｄＵ$^{+}$ＳＯＸ１０$^{+}$（推定グリアまたはニューロン／グリア前駆体）が明らかになった（図２Ｅ～Ｆおよび５Ａ～Ｃ）。ＥｄＵ$^{+}$細胞のパーセンテージは、神経節から神経節までかなり変動した（図５Ｃ）。ＥｄＵ$^{+}$ニューロンによるわずかのみの神経節が完全に存在し、そのような神経節は、常に非常に小さかった（すなわち、３つのニューロンで構成されていた）。集約すると、これらの結果は、ＧＤＮＦ浣腸が、遠位結腸における前駆体の増殖を誘発し、ニューロンおよびグリアマーカーを発現している新しい神経節に分裂細胞の一部がクラスター化することを示唆している。

【００７８】

実施例３：ＧＤＮＦによって誘発されたＥＮＳは、ＷＴと形態学的および機能的に同様である

Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}モデルに焦点を当て、次に、遠位結腸におけるＧＤＮＦによって誘発されたＥＮＳが、Ｐ２０でＷＴにどの程度類似するかを決定した。ＧＤＮＦによって誘発された腸筋層間神経節（内の平均ニューロン対グリア比０．７７±０．０９ニューロン／グリア）は、ＷＴ（０．９６±０．０６ニューロン／グリア、Ｐ＝０．１６）と統計的に同様であった（図６Ａ）。ＣｈＡＴ$^{+}$（コリンアセチルトランスフェラーゼ）およびｎＮＯＳ$^{+}$（ニューロン一酸化窒素合成酵素）ニューロンを含む、主要な腸筋層間ニューロンサブタイプの相対的な割合もまた、ＷＴと非常に同様であった（図６Ｂ～Ｃ）。さらに、ＴＨ$^{+}$（チロシンヒドロキシラーゼ）ドーパミン作動性ニューロン、ＣａｌＲ$^{+}$（カルレチニン）興奮性運動ニューロン、ＶＩＰ$^{+}$（血管活性腸管ペプチド）阻害性運動ニューロン、およびＳｕｂＰ$^{+}$（物質Ｐ）興奮性運動ニューロンを含む、多くの他のニューロンのサブタイプが検出された（図６Ｃ）。興味深いことに、Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスの近位および中央結腸（図７Ａ～Ｂ）において、ＧＤＮＦ治療はまた、ＨＳＣＲマウスモデルおよびヒト患者の両方において無神経節域の上流で観察される一酸化窒素作動性（増加）およびコリン作動性（減少）ニューロンサブタイプの不均衡を補正した（３８、４８～５１）。

【００７９】

Ｐ２０のＧＤＮＦによって誘発された腸筋層間神経節の機能を評価するために、ビーズ潜時試験を使用して、インビボで結腸の運動性を分析した。対照Ｈｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスは、３０分間の観察期間中、直腸に挿入されたガラスビーズを排出しなかったが、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}のサブセットは、ＷＴマウス（２～８分の範囲）よりも少し遅い１０～２１分でビーズを排出した（図６Ｄ）。これらのＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Tg}／^{Tg}マウスにおけるニューロン密度の分析によって、遠位結腸におけるビーズを排出するまでの時間とニューロン密度との間の堅牢な逆相関が明らかになった（図８Ａ）。また、臓器浴のフォーストランスデューサに取り付けたＰ２０動物からの遠位結腸外筋板のストリップを使用して、エクスビボで結腸の運動性を評価した。このシステムは、電界刺激によって誘発されるＷＴ結腸筋肉の収縮を、Ｌ－ＮＡＭＥ（ニトロ－Ｌ－アルギニンメチルエステル）による一酸化窒素合成酵素の阻害によってわずかに増加させ、次いで、ア

トロピン（ムスカリン受容体アンタゴニスト）によるコリン作動性シグナル伝達の阻害によって堅牢に打ち消すことを可能にする。インビボデータと同様に、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスからの結腸筋肉のストリップは、２つの異なる応答パターンのうちの１つを示した。ＧＤＮＦで治療された一部のＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}結腸応答は、ＷＴ（４／７マウス）と同様であったが、他は、未治療のＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}（３／７マウス）と同様の応答であった（図６Ｅおよび８Ｂ）。２つの異なる群が存在するように思われるので、ＧＤＮＦ応答性およびＧＤＮＦ非応答性Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスについて、収縮性応答の平均曲線下面積（ΔＡＵＣ）を個別にグラフ化した（図６Ｅ）。Ｐ２０のＧＤＮＦによって誘発された粘膜下神経節の機能を間接的に試験するために、小さな蛍光標識したデキストラン分子（ＦＤ４）に対する上皮透過性をＵｓｓｉｎｇチャンバで分析した。再び、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスからの結腸組織は、粘膜片が、ＷＴ組織のようにＦＤ４に対して不透過性であるか、またはＧＤＮＦで治療されていないマウスからの対照Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}組織のようにＦＤ４に対して透過性であるかのいずれかの、２つの異なる応答タイプを示した（図６Ｆ）。

【００８０】

ＥＮＳ分析を補完するために、他のＨＳＣＲに関連する腸の変則性を評価した。Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス結腸は、ＷＴマウスよりも太い平滑筋およびより多くの好中球を有したが、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス結腸は、ＷＴと同様であった（図６Ｇ～Ｉおよび９Ａ～Ｂ）。同様に、便マイクロバイオームプロファイリングは、Ｐ２０Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス結腸では腸内毒素症を示したが、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス結腸のいくつかの細菌属（例えば、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ、Ｈｅｌｉｃｏｂａｔｅｒ、Ｍｕｃｉｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｏｓｃｉｌｌｏｓｐｉｒａ、Ｐａｒａｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ、およびＳｕｔｔｅｒｅｌｌａ）の平均存在量は、ＧＤＮＦ治療後にはＷＴと見分けがつかなかった（図６Ｊ）。顕著な例外は、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓの存在量であり、これは、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスにおいて低く、ＧＤＮＦ治療後に低いままであった。したがって、ベータ多様性分析は、微生物群集構造が、ＷＴ、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}、およびＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウス間で異なることを示唆している（図６Ｋ）。

【００８１】

実施例４：外因性神経内のＳＣＰは、無神経節結腸におけるＧＤＮＦの標的である

ＧＤＮＦが腸の神経新生をどのように誘発するかを明らかにするために、腸内のＧＤＮＦ分布を、まずウエスタンブロットを介して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル中の組換え（１５ｋＤａ）と内因性（２０ｋＤａ、グリコシル化）ＧＤＮＦタンパク質との間のサイズ差を利用して評価した。Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスの遠位結腸における上皮透過性の増加（図６Ｆ）と一致して、組換えＧＤＮＦタンパク質は、Ｐ８にＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}遠位結腸において検出されたが、近位結腸では検出されなかった（図１０Ａ）。驚くべきことに、内因性ＧＤＮＦは通常、回腸でのみ検出されるが、組換えＧＤＮＦ浣腸は、結腸全体を通じて内因性ＧＤＮＦの堅牢な増加を引き起こした（図１０Ａ）。ＧＤＮＦの短い半減期（３４～９２時間）（５２）と一致して、組換えＧＤＮＦは、Ｐ２０では結腸および他のいずれの組織においてももはや検出されず、投与されたＧＤＮＦが治療期間中に主に作用しているという考えを裏付けている（図１１）。可能性のあるＧＤＮＦの自己調節ループについて試験し、治療中の組換えＧＤＮＦの正確な位置を評価するために、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスのＧＤＮＦ治療を繰り返したが、今回はＧＤＮＦ（ＨｉｓＧＤＮＦ）の６×Ｈｉｓタグ付きバージョン（５３）であった。Ｐ４、Ｐ６、およびＰ８におけるＧＤＮＦ治療の２時間後の遠位結腸の時間経過分析によって、Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスの結腸粘膜下（図１０Ｂ）、平滑筋、および腸のニューロンのサブセット（図１０Ｃおよび１２）において組換えＧＤＮＦが経時的に蓄積されたことが明らかになった。興味深いことに、主なＧＤＮＦ受容体であるＲＥＴのレベルも増加し（図１０Ｂおよび１２）、ＧＤＮＦ－ＲＥＴ自己調節ループが、ＧＤＮＦで治療された結腸で活性化され、（例えば、ＲＥＴレベルおよび／または活性を低減する変異を有する患者において）初期のＲＥＴレベルが低か

ったとしてもＲＥＴシグナル伝達を向上し得るという仮説を裏付けている。注目すべきことに、$_{Hi}$ＧＤＮＦおよびＲＥＴの両方が、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウス（図１０Ｃ）およびＥｄｎｒｂ$^{s-l/s-l}$マウスの外因性神経の近くで誘発されたニューロンにおいて検出された。

【００８２】

次に、神経に関連するシュワン細胞が、ＧＤＮＦを標的とするＥＮＳ前駆体であり得るかどうかを評価した。この仮説を試験するために、まず、Ｐ４Ｈｏｌ$^{Tg/Tg}$；Ｇ４－ＲＦＰ二重トランスジェニック仔からの遠位結腸外筋板の生きた外植片を使用して、ＧＤＮＦに対する外因性神経線維中のシュワン細胞の応答を評価した。これらのマウスにおいて、ＳＣＰを含む神経堤誘発体を、ＲＦＰ蛍光によってマークする（５４）。ＧＤＮＦ（５μｇ／ｍｌ）の存在下または不在下での７２時間の培養後の外植片のタイムラプス撮像は、ＧＤＮＦが、外因性神経に沿ったＳＣＰの移動および増殖の両方を刺激することを示唆した（図１０Ｄ）。これらのＳＣＰの増殖に対するＧＤＮＦの影響を、９６時間のエクスビボ培養の後、免疫蛍光を介して確認した。外因性神経内のＫｉ６７$^{+}$ＳＯＸ１０$^{+}$二重陽性細胞は、ＧＤＮＦへの曝露時に３倍になった（ＧＤＮＦなし５．５±０．４％対ＧＤＮＦあり１５．２±２．１％）（図１０Ｅ、Ｆ）。ＲＥＴを発現するＧＤＮＦによって誘発されたニューロンのうちのいくつかは、シュワン細胞に由来するが、シュワン細胞におけるＧＤＮＦシグナル伝達は代わりにＮＣＡＭによって媒介されるので、ＲＥＴは、これらの前駆体を無神経節の腸で活性化するのに必要ではない可能性がある（３５）。これに合わせて、図１０Ｉで報告されたデータは、無神経節マウス結腸における外因性神経のシュワン細胞におけるＮＣＡＭの発現を示すが、ＲＥＴの発現は示さない。これらの結果は、ＧＤＮＦ療法が、ＲＥＴレベルおよび／または活性が低減している患者、例えば、ＲＥＴまたはＲＥＴシグナル伝達経路に変異を有する患者においてさえ使用することができることを示唆している。

【００８３】

ＳＣＰが、ＧＤＮＦによって誘発されたニューロンおよびグリアの供給源であることをさらに示すために、シュワン系統に特異的なＣｒｅドライバー導入遺伝子Ｄｈｈ－ＣｒｅおよびＲｏｓａ２６Ｃｒｅレポーター対立遺伝子Ｒ２６［Ｆｌｏｘｅｄ Ｓｔｏｐ］ＹＦＰをホルスタイン［ＦＶＢ／Ｎ］変異体バックグラウンドで用いた、インビボ遺伝子細胞系統追跡を使用した。興味深いことに、未治療のＤｈｈ－Ｃｒｅ$^{Tg/+}$；Ｒ２６$^{YFP/+}$およびＨｏｌ$^{Tg/Tg}$；Ｄｈｈ－Ｃｒｅ$^{Tg/+}$；Ｒ２６$^{YFP/+}$動物は、近位および中央結腸におけるＹＦＰ$^{+}$ＳＣＰに由来するニューロンおよびグリアが予想数よりも低かった。生後１ヶ月の混合Ｃ５７ＢＬ／６－１２９Ｓｖ遺伝子バックグラウンドにおいて、ＳＣＰは、結腸のニューロンのうちの２０％に寄与することが以前に報告されていた（２９）が、Ｐ２０の純粋なＦＶＢ／Ｎ遺伝子バックグラウンドにおいて、腸筋層間ニューロンのうちの５～７％にのみ寄与することが見出され、この寄与は、ホモ接合型ホルスタイン変異の存在下では、１０～１１％まで増加した（図１３Ａ、Ｂ）。注目すべきことに、ＳＣＰに由来する（ＹＦＰ$^{+}$）細胞は、ＧＤＮＦで治療されたＨｏｌ$^{Tg/Tg}$；Ｄｈｈ－Ｃｒｅ$^{Tg/+}$；Ｒ２６$^{YFP/+}$動物における遠位結腸のニューロンのうちの３４％を構成していた（図１０Ｇ、Ｈ）。細胞起源（ＹＦＰ蛍光）および／またはＥｄＵ組み込みに基づいて、Ｐ４～Ｐ８のＧＤＮＦ治療中のＥｄＵの毎日の投与によって誘発された腸筋層間ニューロンの４つのサブグループを同定した（図１０Ｇ、Ｈ、および１４Ｃ）。この研究は、Ｄｈｈ$^{+}$ＳＣＰが腸筋層間（図１０Ｇ、Ｈ）および粘膜下（図１３Ｃ）神経叢の両方におけるＧＤＮＦによって誘発されたニューロンおよびグリアの供給源であることを確認したが、誘発されたニューロンの大部分（６６％）が、非ＳＣＰ起源（即ち、非Ｄｈｈ発現細胞型）を示唆するＹＦＰ陰性であることも明らかにしている。さらに、誘発されたニューロンの大部分（６２％）は、細胞起源にかかわらず、ＥｄＵを組み込まず（図１０Ｇ、Ｈ）、神経新生が、前駆細胞の増殖を必要とする代わりに、トランス分化（すなわち、別のタイプの特殊細胞への分裂後細胞の直接分化）から生じ得る可能性を提起している。

【００８４】

実施例５：ＧＤＮＦは、ヒト無神経節結腸においてエクスビボで新しいニューロンを誘発し得る

ＧＤＮＦがヒト組織において新しい腸のニューロンを誘発することができるかどうかを試験するために、エクスビボモデルが必要であった。９６時間のエクスビボでのＧＤＮＦ治療は、すべてのＨｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}遠位結腸無神経節組織においてニューロンを誘発したが、神経新生は、インビボよりもはるかに低い効率であったことが発見された。これらの１ｃｍ長の外植片には、３～６７個のみのニューロンが見られた（図１４Ａおよび１５Ａ）。さらに、誘発されたニューロンは、神経節にクラスター化することはほとんどなく、そのような神経節は、常に非常に小さかった（図１４Ｂ）。ＳＣＰへの広範なＥｄＵ組み込み（図１４Ｃおよび１５）とは顕著に対照的に、誘発されたニューロンへのＥｄＵ組み込みも最小であった（外植片培養物中２０％未満のＨｕＣ／Ｄ$^{＋}$細胞）（図１４Ｂ、Ｃ）。ＧＤＮＦを用いずに培養したＰ４Ｈｏｌ^{Ｔｇ}／^{Ｔｇ}マウスからの対照無神経節組織は、ニューロンがまったく無いままであり（図１４Ａ、Ｃ、および１５）、ＧＤＮＦが、無神経節遠位結腸においてエクスビボで神経新生を誘発することができるが、インビボでのＧＤＮＦ浣腸で発生したものよりも低い効率であったという考えを裏付けている。

【００８５】

最後に、ＧＤＮＦが、無神経節遠位腸を切除するためにＳｗｅｎｓｏｎプルスルー手術を受けた小児からの無神経節ヒト結腸筋肉における神経新生を誘発することができるかどうかを試験した。コホートは、１２人の小児からなった。疫学的特徴は、ＨＳＣＲの典型的なもの（すなわち、ほとんどが散発性、男性に偏在し、短域）であった（表２）。Ｓｏａｖｅ手術を受けた患者は、このアプローチでは最遠位結腸から外筋板が切除されないので、登録しなかった。各対象について、手術日に切除した完全な厚さの無神経節結腸を収集し、直ちに顕微解剖して粘膜層および粘膜下層を除去した。残った外筋板を小片に切断し、ＧＤＮＦとともにまたは伴わずに培養した。９６時間のＧＤＮＦへの曝露によって、ＥｄＵを培地に添加した９／９のヒト組織において、ＥｄＵ$^{＋}$ＳＣＰの割合が顕著に増加した（図１４Ｄ、Ｅ）。最も重要なことに、ＨｕＣ／Ｄ、βＩＩＩ－チューブリン（Ｔｕｊ１）、ＲＥＴ、ＰＧＰ９．５、およびＰＨＯＸ２Ｂを発現する新しいニューロンも、３つのＨＳＣＲ外植片で検出された（図１４Ｆ、Ｇ、および１６）。これらの３つの外植片は、我々のコホートの最年少（生後２８～４４日）の小児からのものであった（図１４Ｇおよび表２）。これらの小児のうち２人は、不明な遺伝的原因を有する散発性ＨＳＣＲを有した。３番目の小児は、ＭＥＮ２Ａ症候群に関連するＲＥＴ変異を有した（表２）。もう少し大きい小児について、より長期のＧＤＮＦ治療が有益であり得るかどうかを試験した。非常に興味深いことに、もう少し大きい小児からの遠位結腸を７日間培養すること（ｎ＝２；手術時に生後８６日および１６３８日）によって、外因性神経線維に関連してＥｄＵを組み込んだニューロンが同定された（図１４Ｈ）。集約すると、このデータは、マウスから得た観察をヒトに拡張することができるという説得力のある証拠を提供する。

【表２】

表２．ＧＤＮＦ療法のエクスビボ前臨床試験に使用したＨＳＣＲ結腸試料の概要。

手術時の年齢(日)	遺伝的状態	性別	臨床分類	無神経節症の程度(cm)	ニューロン数	$EdU^{+}SCP(\%)$
28	散発性、変異不明	M	短域疾患	5	31	38
36	散発性、変異不明	M	短域疾患	25	27	33
44	MEN2a 症候群、RET 変異	M	短域疾患	6	15	44
80	散発性、変異不明	M	短域疾患	7	3	34
85	散発性、変異不明	M	短域疾患	6	1	32
86	散発性、変異不明	M	短域疾患	7	0	46
249	Mowat-Wilson 症候群、ZFHX1B 変異	F	短域疾患	30	0	32
300	データ入手不可	M	データ入手不可	データ入手不可	0	定量化されず
344	散発性、変異不明	M	短域疾患	26	0	定量化されず
349	散発性、変異不明	M	短域疾患	9	0	43
1177	Bardet-Biedl 症候群、BBS1 変異	F	長域疾患	40	0	定量化されず
1638	散発性、変異不明	F	短域疾患	8	0	50

【００８６】

実施例６：ホルスタインマウスの結腸における免疫細胞集団に対するＧＤＮＦの効果

多色フローサイトメトリー分析は、未治療のＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスの結腸で観察された免疫細胞の異常な割合が、ＧＤＮＦ治療時に、概してＷＴ免疫細胞の割合にまで正常化されることを示している。マーカーの大部分について、密度プロットは、完全な救済（Ｂ細胞、$CD73^{+}$Ｔ細胞、$CD44^{+}CD62L^{+}$Ｔ細胞、$ROR\gamma^{+}$Ｔ細胞、$CX3CR1^{+}$$MHC-II^{+}$マクロファージ）、または少なくとも部分的な救済（$CD4^{+}$Ｔ細胞、$CD39^{+}$Ｔ細胞、$CD25^{+}$Ｔ細胞、$Ly-6C^{+}CD64^{+}$単球、$F4-80^{+}MHC-II^{+}$マクロファージ、$CD11b^{+}CD103^{-}$マクロファージ）のいずれかを示す。結果を、表３に要約する。

【表３】

表３．ＷＴマウスおよびＧＤＮＦで治療されたかまたはされなかったＨｏｌ$^{Tg/Tg}$マウスにおける免疫細胞の割合

細胞種	WTにおける%	Hol$^{Tg/Tg}$マウスにおける% (-GDNF)	Hol$^{Tg/Tg}$マウスにおける% (+GDNF)
CD4^{+}T細胞	83.7	34.5	65.4
CD8^{+}T細胞	8.47	18	15.6
B細胞(CD19^{+})	84.6	6.98	84.6
CD39^{+}T細胞	0.19	6.47	1.66
CD73^{+}T細胞	31.1	56.7	30.4
CD44^{+}CD62L^{+}T細胞	17.6	5.30	15.9
RORγ^{+}Th17細胞	0.18	0.26	0.18
CD25^{+}T$_{reg}$細胞	2.67	21	7.74
F4-80^{+}MHC-II^{+}マクロファージ	0.43	3.72	2
Ly-6C^{+}CD64^{+}単球	17	78.3	38
CD11b^{+}CD103^{-}マクロファージ	0.67	34.1	5.16
CX3CR1^{+}MHC II^{-}マクロファージ	0.34	0.53	0.31

【００８７】

本発明は、本明細書に上記の特定の実施形態によって説明されてきたが、添付の特許請求の範囲で定義される主題発明の趣旨および性質から逸脱することなく、変更され得る。特許請求の範囲では、「含む」という単語は、「限定されないが、含む」という語句と実質的に等価である、オープンエンド用語として使用される。「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」という単数形は、別段文脈が明らかに指示しない限り、対応する複数の対象物を含む。

【００８８】

参考文献：

１．Ｊ．Ｂ．Ｆｕｒｎｅｓｓ，Ｔｈｅ ｅｎｔｅｒｉｃ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ ａｎｄ ｎｅｕｒｏｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ Ｈｅｐａｔｏｌ ９，２８６－２９４（２０１２）．

２．Ｒ．Ｏ．Ｈｅｕｃｋｅｒｏｔｈ，Ｈｉｒｓｃｈｓｐｒｕｎｇ ｄｉｓｅａｓｅ－ｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ ｂａｓｉｃ ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｍｅｄｉｃｉｎｅ ｔｏ ｉｍｐｒｏｖｅ ｏｕｔｃｏｍｅｓ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ Ｈｅｐａｔｏｌ １５，１５２－１６７（２０１８）．

３．Ｍ．Ｒａｏ，Ｍ．Ｄ．Ｇｅｒｓｈｏｎ，Ｅｎｔｅｒｉｃ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ：ｗｈａｔ ｃｏｕｌｄ ｐｏｓｓｉｂｌｙ ｇｏ ｗｒｏｎｇ？ Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ １９，５５２－５６５（２０１８）．

４．Ｊ．Ａｍｉｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｈｉｒｓｃｈｓｐｒｕｎｇ ｄｉｓｅａｓｅ，ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｓｙｎｄｒｏｍｅｓ ａｎｄ ｇｅｎｅｔｉｃｓ：ａ ｒｅｖｉｅｗ．Ｊ Ｍｅｄ Ｇｅｎｅｔ ４５，１－１４（２００８）．

５．Ｒ．Ｏ．Ｈｅｕｃｋｅｒｏｔｈ，Ｋ．Ｈ．Ｓｃｈａｆｅｒ，Ｇｅｎｅ－ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｔｈｅ ｅｎｔｅｒｉｃ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ：Ｎｅｕｒａｌ ｐｌａｓｔｉｃｉｔｙ ａｎｄ Ｈｉｒｓｃｈｓｐｒｕｎｇ ｄｉｓｅａｓｅ ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ．Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ ４１７，１８８－１９７（２０１６）．

６．Ｏ．Ｍｗｉｚｅｒｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｄｎｆ ｉｓ ｍｉｔｏｇｅｎｉｃ，ｎｅｕｒｏｔｒｏｐｈｉｃ，ａｎｄ ｃｈｅｍｏａｔｔｒａｃｔｉｖｅ ｔｏ ｅｎｔｅｒｉｃ ｎｅｕｒａｌ ｃｒｅｓｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｔｈｅ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｃｏｌｏｎ．

Dev Dyn 240, 1402-1411 (2011).
7. D. Natarajan, C. Marcos-Gutierrez, V. Pachnis, E. de Graaff, Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. Development 129, 5151-5160 (2002).
8. H. M. Young et al., GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. Dev Biol 229, 503-516 (2001).
9. C. S. Tang et al., Identification of Genes Associated With Hirschsprung Disease, Based on Whole-Genome Sequence Analysis, and Potential Effects on Enteric Nervous System Development. Gastroenterology 155, 1908-1922 e1905 (2018).
10. E. S. Emison et al., Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. Am J Hum Genet 87, 60-74 (2010).
11. J. M. Tilghman et al., Molecular Genetic Anatomy and Risk Profile of Hirschsprung's Disease. N Engl J Med 380, 1421-1432 (2019).
12. H. Gui et al., Whole exome sequencing coupled with unbiased functional analysis reveals new Hirschsprung disease genes. Genome Biol 18, 48 (2017).
13. N. Nagy, A. M. Goldstein, Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. Semin Cell Dev Biol 66, 94-106 (2017).
14. C. S. Tang et al., Uncovering the genetic lesions underlying the most severe form of Hirschsprung disease by whole-genome sequencing. Eur J Hum Genet 26, 818-826 (2018).
15. F. Friedmacher, P. Puri, Hirschsprung's disease associated with Down syndrome: a meta-analysis of incidence, functional outcomes and mortality. Pediatric surgery international 29, 937-946 (2013).
16. O. Swenson, H. F. Rheinlander, I. Diamond, Hirschsprung's disease; a new concept of the etiology; operative results in 34 patients. N Engl J Med 241, 551-556 (1949).
17. O. Swenson, A. H. Bill, Jr., Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesions producing megacolon; an experimental study. Surgery 24, 212-220 (1948).

18. P. K. Tam, Hirschsprung's disease: A bridge for science and surgery. J Pediatr Surg 51, 18-22 (2016).
19. A. Coe et al., Reoperation for Hirschsprung disease: pathology of the resected problematic distal pull-through. Pediatr Dev Pathol 15, 30-38 (2012).
20. A. Pini Prato et al., Hirschsprung disease: do risk factors of poor surgical outcome exist? J Pediatr Surg 43, 612-619 (2008).
21. A. J. Burns et al., White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. Dev Biol 417, 229-251 (2016).
22. C. J. McCann, O. Borrelli, N. Thapar, Stem cell therapy in severe pediatric motility disorders. Current opinion in pharmacology 43, 145-149 (2018).
23. K. F. Bergeron, D. W. Silversides, N. Pilon, The developmental genetics of Hirschsprung's disease. Clin Genet 83, 15-22 (2013).
24. F. Obermayr, R. Hotta, H. Enomoto, H. M. Young, Development and developmental disorders of the enteric nervous system. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 10, 43-57 (2013).
25. C. L. Yntema, W. S. Hammond, The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. J Comp Neurol 101, 515-541 (1954).
26. N. R. Chevalier et al., How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. Scientific reports 6, 20927 (2016).
27. R. Hotta, R. B. Anderson, K. Kobayashi, D. F. Newgreen, H. M. Young, Effects of tissue age, presence of neurones and endothelin-3 on the ability of enteric neurone precursors to colonize recipient gut: implications for cell-based therapies. Neurogastroenterol Motil 22, 331-e386 (2010).
28. N. M. Le Douarin, M. A. Teillet, The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. Journal of embryology and experimental morphology 30, 31-48 (1973).
29. T. Uesaka, M. Nagashimada, H. Enomoto, Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. J Neurosci 35, 9879-9888 (2015).

30. Y. Watanabe et al., Morphological investigation of the enteric nervous system in Hirschsprung's disease and hypoganglionosis using whole-mount colon preparation. J Pediatr Surg 34, 445-449 (1999).
31. T. Uesaka, M. Nagashimada, H. Enomoto, GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. J Neurosci 33, 16372-16382 (2013).
32. S. Gianino, J. R. Grider, J. Cresswell, H. Enomoto, R. O. Heuckeroth, GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. Development 130, 2187-2198 (2003).
33. H. Wang et al., The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. J Neurosci 30, 1523-1538 (2010).
34. A. Hoke et al., Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. J Neurosci 23, 561-567 (2003).
35. G. Paratcha, F. Ledda, C. F. Ibanez, The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. Cell 113, 867-879 (2003).
36. D. Sjostrand, C. F. Ibanez, Insights into GFRalpha1 regulation of neural cell adhesion molecule (NCAM) function from structure-function analysis of the NCAM/GFRalpha1 receptor complex. J Biol Chem 283, 13792-13798 (2008).
37. E. Suply, P. de Vries, R. Soret, F. Cossais, M. Neunlist, Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 302, G1373-1380 (2012).
38. A. M. Toure, M. Landry, O. Souchkova, S. W. Kembel, N. Pilon, Gut microbiota-mediated Gene-Environment interaction in the TashT mouse model of Hirschsprung disease. Scientific reports 9, 492 (2019).
39. R. Soret et al., A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. J Clin Invest 125, 4483-4496 (2015).

40. K. F. Bergeron et al., Male-Biased Aganglionic Megacolon in the TashT Mouse Line Due to Perturbation of Silencer Elements in a Large Gene Desert of Chromosome 10. PLoS Genet 11, e1005093 (2015).
41. K. Hosoda et al., Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. Cell 79, 1267-1276 (1994).
42. J. I. Lake, O. A. Tusheva, B. L. Graham, R. O. Heuckeroth, Hirschsprung-like disease is exacerbated by reduced de novo GMP synthesis. J Clin Invest 123, 4875-4887 (2013).
43. A. Schuchardt, V. D'Agati, L. Larsson-Blomberg, F. Costantini, V. Pachnis, Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. Nature 367, 380-383 (1994).
44. F. Fattahi et al., Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. Nature, (2016).
45. Z. Li et al., Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. J Neurosci 31, 8998-9009 (2011).
46. N. Bondurand, D. Natarajan, A. Barlow, N. Thapar, V. Pachnis, Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. Development 133, 2075-2086 (2006).
47. Z. Cheng et al., Murine model of Hirschsprung-associated enterocolitis. I: phenotypic characterization with development of a histopathologic grading system. J Pediatr Surg 45, 475-482 (2010).
48. L. S. Cheng, D. M. Schwartz, R. Hotta, H. K. Graham, A. M. Goldstein, Bowel dysfunction following pullthrough surgery is associated with an overabundance of nitrergic neurons in Hirschsprung disease. J Pediatr Surg 51, 1834-1838 (2016).
49. D. Coyle, A. M. O'Donnell, J. Gillick, P. Puri, Altered neurotransmitter expression profile in the ganglionic bowel in Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 51, 762-769 (2016).
50. A. M. Toure, B. Charrier, N. Pilon, Male-specific colon motility dysfunction in the T

ashT mouse line. Neurogastroenterol Motil 28, 1494-1507 (2016).
51. I. Zaitoun et al., Altered neuronal density and neurotransmitter expression in the ganglionated region of Ednrb null mice: implications for Hirschsprung's disease. Neurogastroenterol Motil 25, e233-244 (2013).
52. M. Luz, E. Mohr, H. C. Fibiger, GDNF-induced cerebellar toxicity: A brief review. Neurotoxicology 52, 46-56 (2016).
53. D. J. Creedon et al., Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 7018-7023 (1997).
54. N. Pilon, D. Raiwet, R. S. Viger, D. W. Silversides, Novel pre-and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. Dev Dyn 237, 1133-1143 (2008).
55. T. Shimotake, S. Go, K. Inoue, H. Tomiyama, N. Iwai, A homozygous missense mutation in the tyrosine E kinase domain of the RET proto-oncogene in an infant with total intestinal aganglionosis. Am J Gastroenterol 96, 1286-1291 (2001).
56. S. Ro, S. J. Hwang, M. Muto, W. K. Jewett, N. J. Spencer, Anatomic modifications in the enteric nervous system of piebald mice and physiological consequences to colonic motor activity. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 290, G710-718 (2006).
57. N. M. Joseph et al., Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. J Clin Invest 121, 3398-3411 (2011).
58. G. M. Kruger et al., Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. Neuron 35, 657-669 (2002).
59. C. Laranjeira et al., Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. J Clin Invest 121, 3412-3424 (2011).
60. M. Metzger, C. Caldwell, A. J. Barlow, A. J. Burns, N. Thapar, Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorder

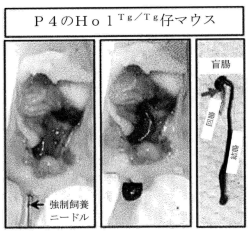
s. Gastroenterology 136, 2214-2225 e2211-2213 (2009).
61. M. T. Liu, Y. H. Kuan, J. Wang, R. Hen, M. D. Gershon, 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. J Neurosci 29, 9683-9699 (2009).
62. K. Badizadegan et al., Presence of intramucosal neuroglial cells in normal and aganglionic human colon. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 307, G1002-1012 (2014).
63. D. J. Wilkinson, G. S. Bethell, R. Shukla, S. E. Kenny, D. H. Edgar, Isolation of Enteric Nervous System Progenitor Cells from the Aganglionic Gut of Patients with Hirschsprung's Disease. PLoS One 10, e0125724 (2015).
64. S. Almond, R. M. Lindley, S. E. Kenny, M. G. Connell, D. H. Edgar, Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. Gut 56, 489-496 (2007).
65. S. Hetz et al., In vivo transplantation of neurosphere-like bodies derived from the human postnatal and adult enteric nervous system: a pilot study. PLoS One 9, e93605 (2014).
66. R. Hotta et al., Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. J Clin Invest 123, 1182-1191 (2013).
67. J. E. Cooper et al., In Vivo Transplantation of Enteric Neural Crest Cells into Mouse Gut; Engraftment, Functional Integration and Long-Term Safety. PLoS One 11, e0147989 (2016).
68. J. E. Cooper et al., In vivo transplantation of fetal human gut-derived enteric neural crest cells. Neurogastroenterol Motil 29, (2017).
69. R. Hotta et al., Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. Neurogastroenterol Motil 28, 498-512 (2016).
70. L. A. Stamp et al., Optogenetic Demonstration of Functional Innervation of Mouse Colon by Neurons Derived From Transplanted Neural Cells. Gastroenterology 152, 1407-1418 (2017).
71. C. J. McCann et al., Transplantation of

enteric nervous system stem cells rescues nitric oxide synthase deficient mouse colon. Nature communications 8, 15937 (2017).
72. J. Belkind-Gerson et al., Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+enteric cells. Scientific reports 7, 2525 (2017).
73. J. Belkind-Gerson et al., Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT4-dependent mechanism. Inflamm Bowel Dis 21, 870-878 (2015).
74. M. Meir et al., Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. J Clin Invest 129, 2824-2840 (2019).
75. D. K. Zhang et al., Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. J Pathol 222, 213-222 (2010).
76. A. J. Burns, D. Champeval, N. M. Le Douarin, Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. Dev Biol 219, 30-43 (2000).
77. Y. Watanabe et al., Extrinsic nerve strands in the aganglionic segment of Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 33, 1233-1237 (1998).
78. H. Nakamura, T. Lim, P. Puri, Inflammatory bowel disease in patients with Hirschsprung's disease: a systematic review and meta-analysis. Pediatric surgery international 34, 149-154 (2018).
79. S. J. McKeown, M. Mohsenipour, A. J. Bergner, H. M. Young, L. A. Stamp, Exposure to GDNF Enhances the Ability of Enteric Neural Progenitors to Generate an Enteric Nervous System. Stem Cell Reports 8, 476-488 (2017).
80. S. Srinivas et al., Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. BMC Dev Biol 1, 4 (2001).
81. H. Enomoto et al., RET signaling is essential for migration, axonal growth and axon guidance of developing sympathetic neurons. Development 128, 3963-3974 (2001).
82. S. Jain et al., Mice expressing a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a dire

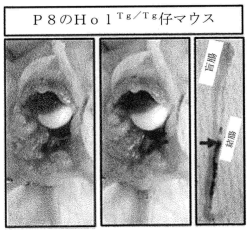
ct role of Ret in spermatogenesis. Development 131, 5503－5513（2004）.
83. A. Boulende Sab et al., An Ebox element in the proximal Gata4 promoter is required for Gata4 expression in vivo. PLoS ONE 6, e29038（2011）.
84. I. Laforest－Lapointe, A. Paquette, C. Messier, S. W. Kembel, Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. Nature 546, 145－147（2017）.
85. P. D. Schloss et al., Introducing mothur：open－source, platform－independent, community－supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 75, 7537－7541（2009）.
86. D. McDonald et al., The Biological Observation Matrix（BIOM） format or：how I learned to stop worrying and love the ome－ome. Gigascience 1, 7（2012）.
87. R. C. Team, R：A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.（2014）.

【図面】

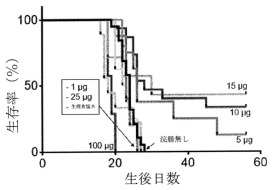
【図１Ａ】



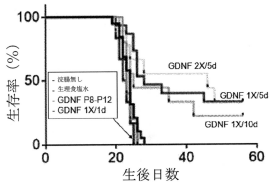
【図１Ｂ】



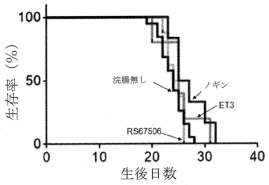
【図１Ｃ】



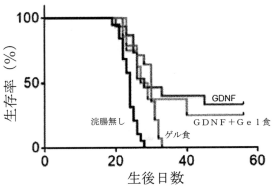
【図１Ｄ】



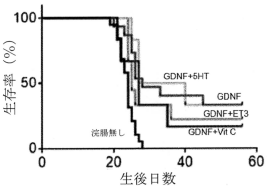
【図１Ｅ】



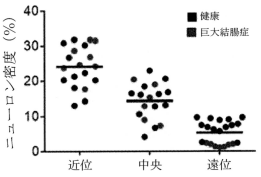
【図１Ｆ】



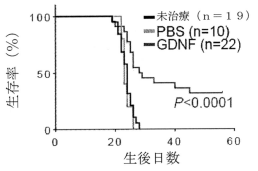
【図１Ｇ】



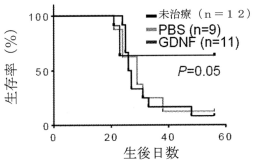
【図１Ｈ】



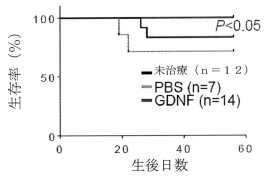
【図２Ａ】



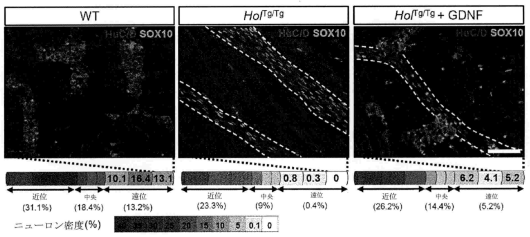
【図２Ｂ】



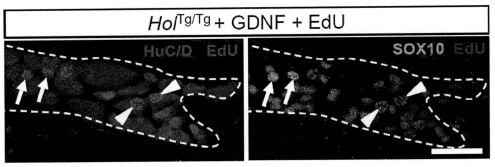
【図２Ｃ】



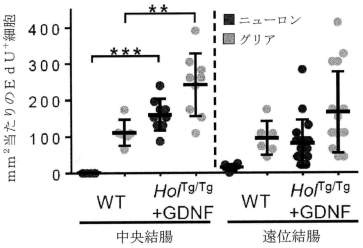
【図２Ｄ】



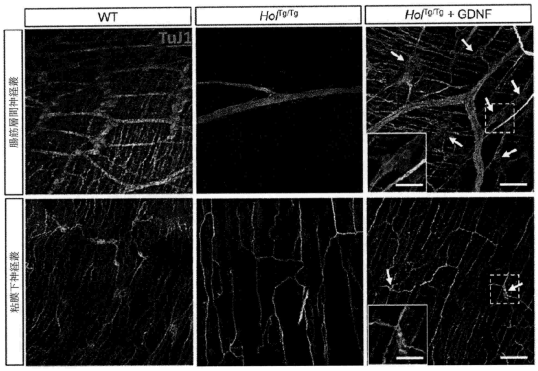
【図２Ｅ】



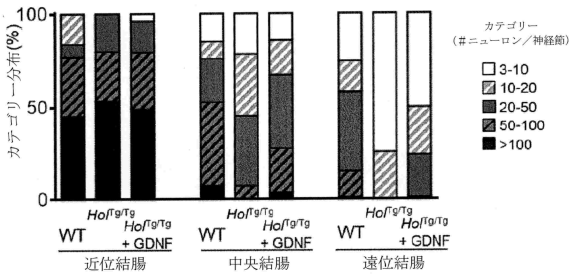
【図２Ｆ】



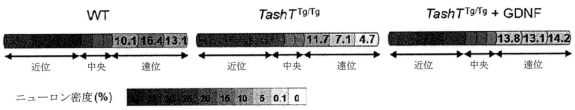
【図３】



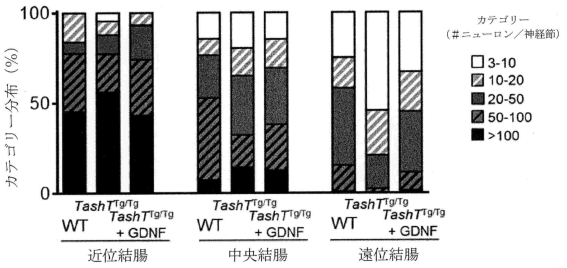
【図４Ａ】



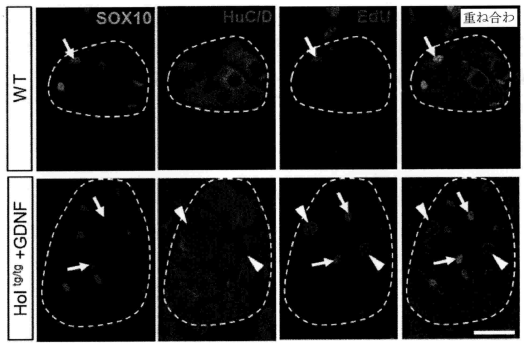
【図４Ｂ】



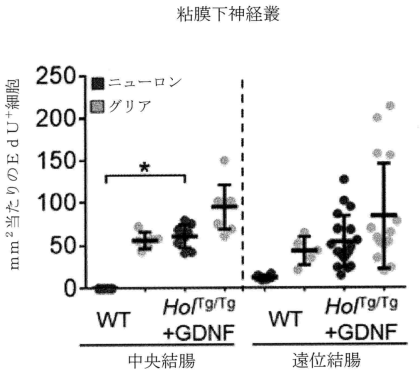
【図４Ｃ】



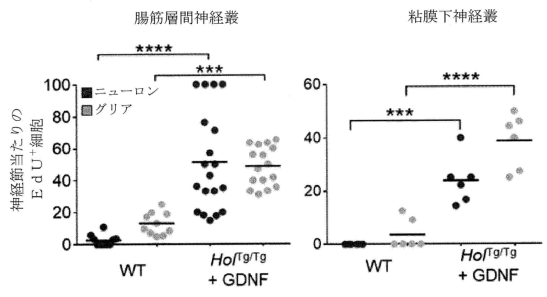
【図５Ａ】



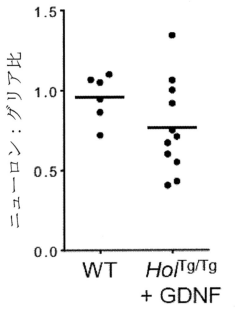
【図５Ｂ】



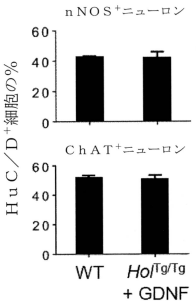
【図５Ｃ】



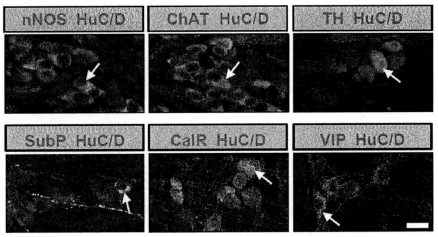
【図６Ａ】



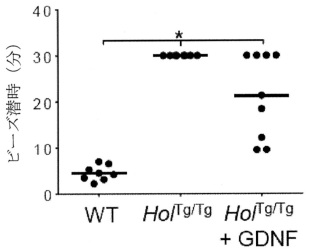
【図６Ｂ】



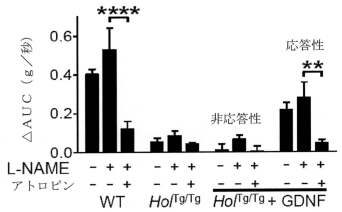
【図６Ｃ】



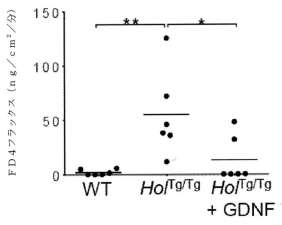
【図６Ｄ】



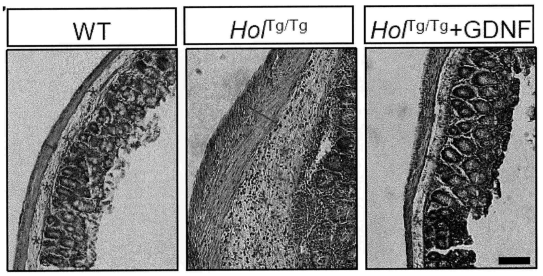
【図６Ｅ】



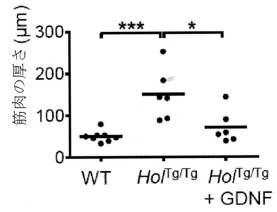
【図６Ｆ】



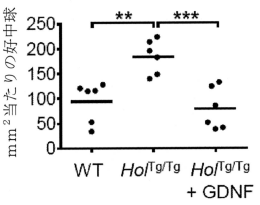
【図６Ｇ】



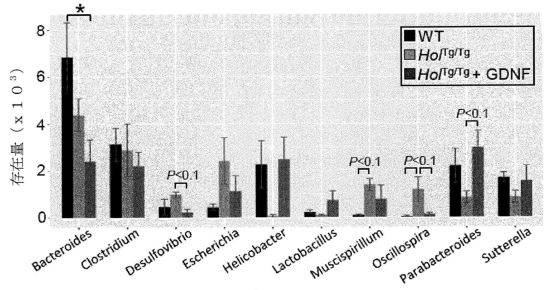
【図６Ｈ】



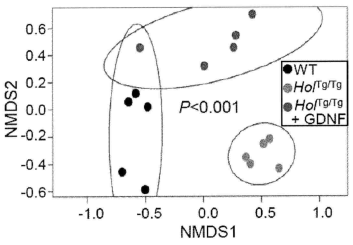
【図６Ｉ】



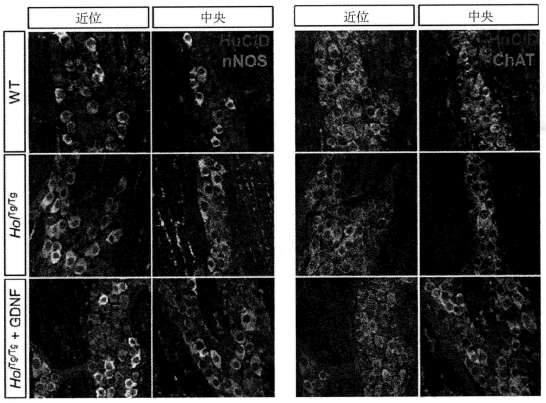
【図６Ｊ】



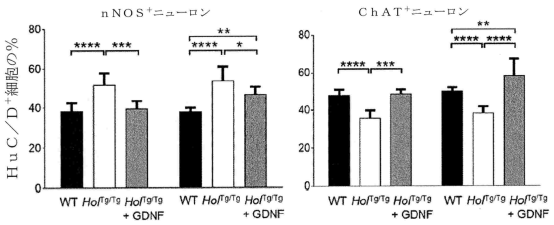
【図６Ｋ】



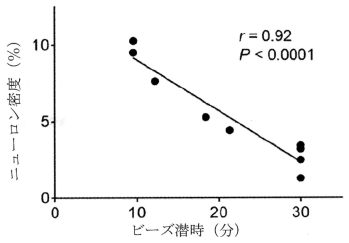
【図７Ａ】



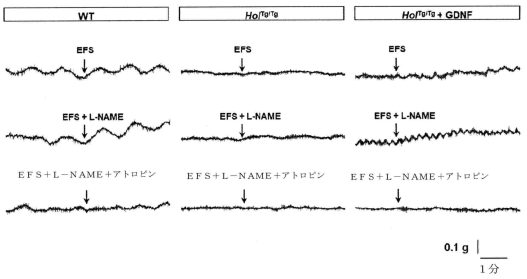
【図７Ｂ】



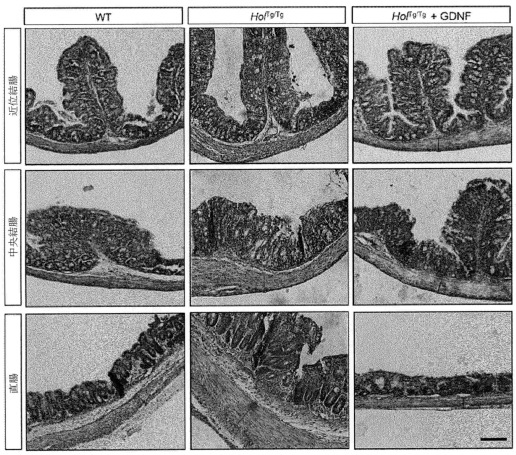
【図８Ａ】



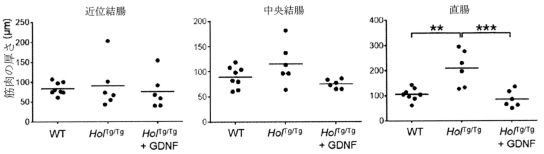
【図８Ｂ】



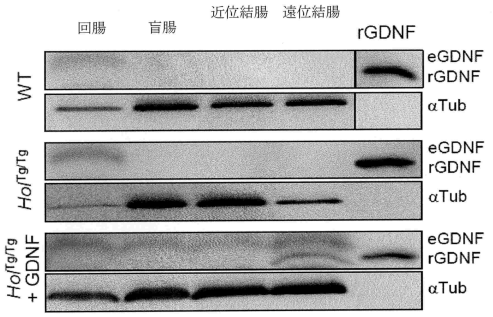
【図９Ａ】



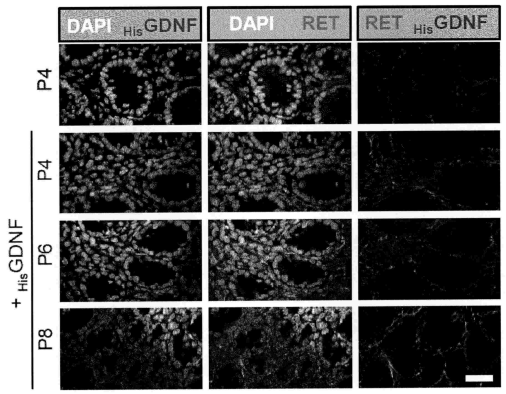
【図９Ｂ】



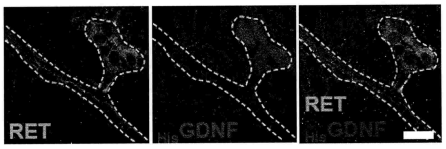
【図１０Ａ】



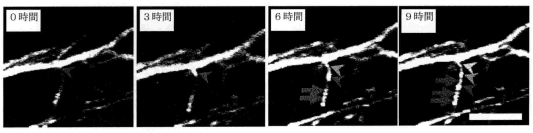
【図１０Ｂ】



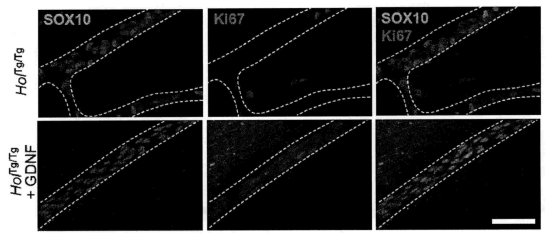
【図１０Ｃ】



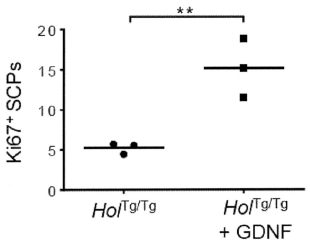
【図１０Ｄ】



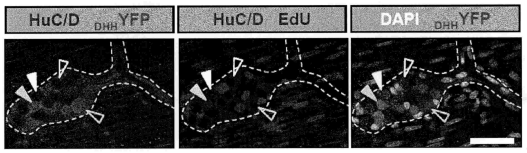
【図１０Ｅ】



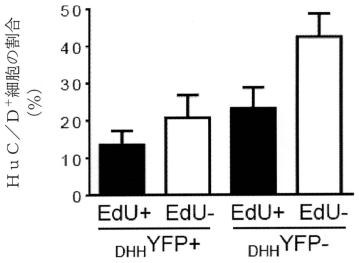
【図１０Ｆ】



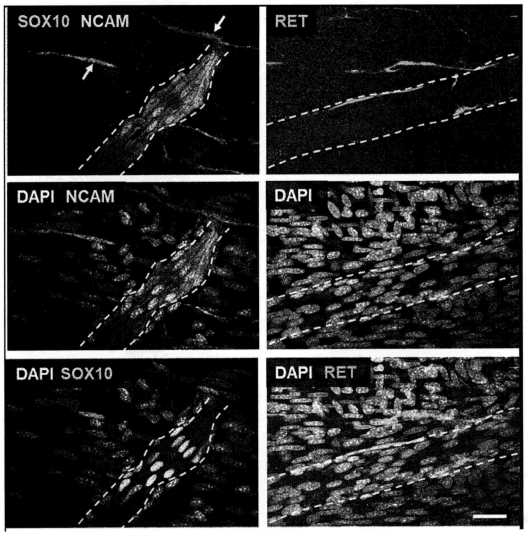
【図１０Ｇ】



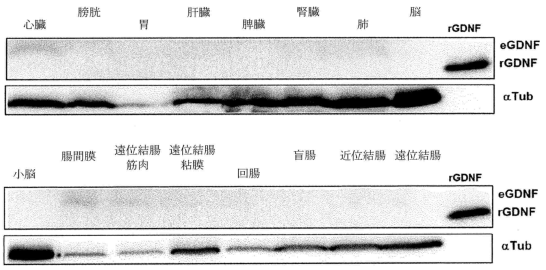
【図１０Ｈ】



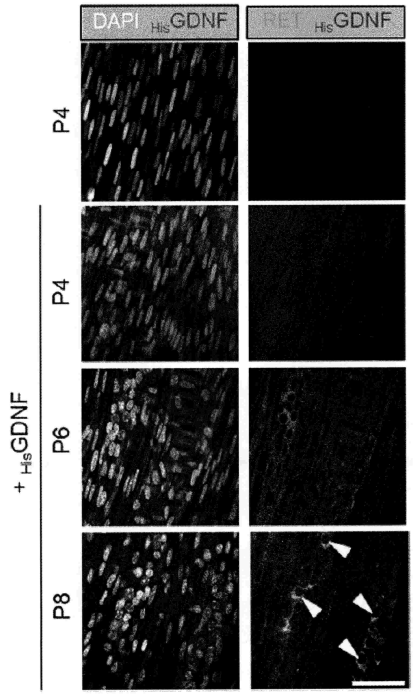
【図１０Ｉ】



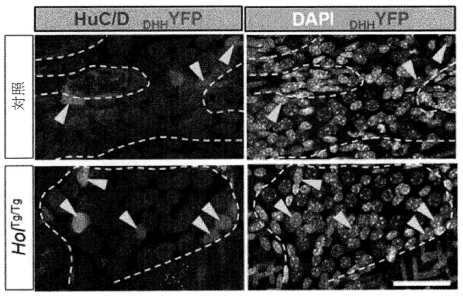
【図１１】



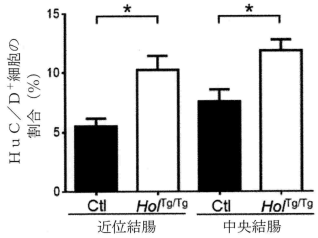
【図１２】



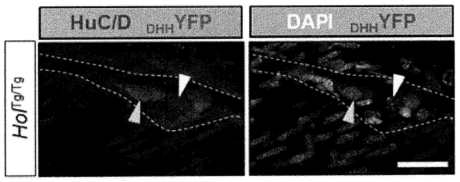
【図１３Ａ】



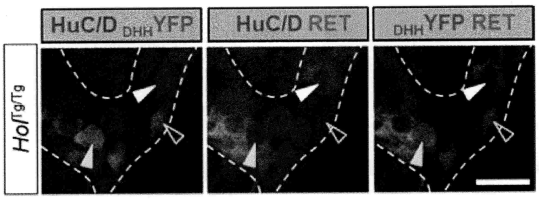
【図１３Ｂ】



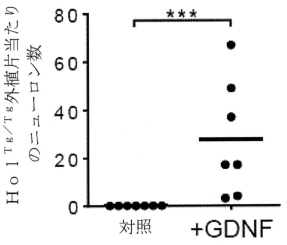
【図１３Ｃ】



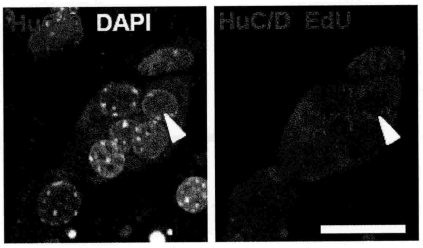
【図１３Ｄ】



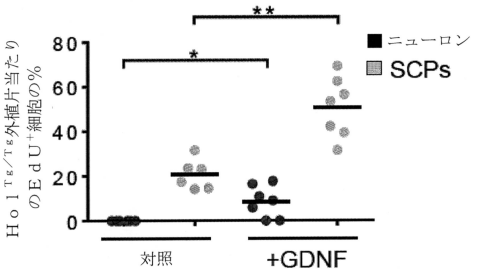
【図１４Ａ】



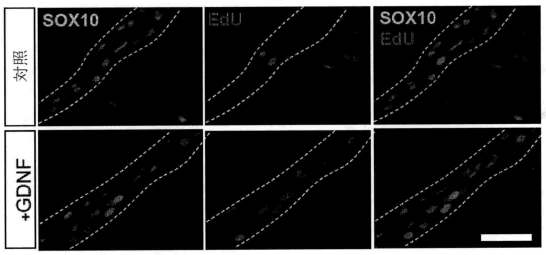
【図１４Ｂ】



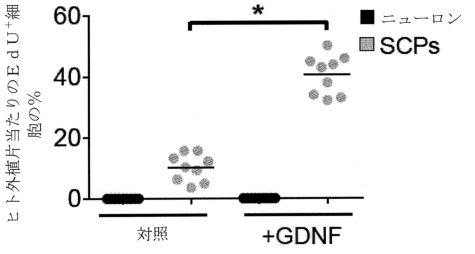
【図１４Ｃ】



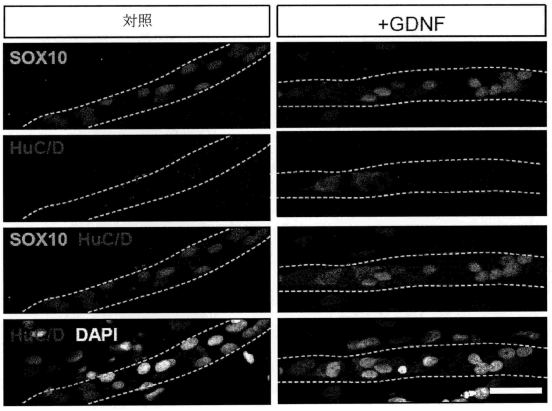
【図１４Ｄ】



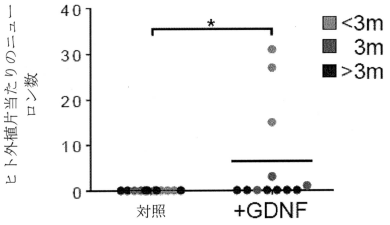
【図１４Ｅ】



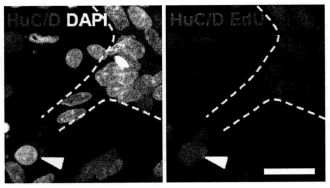
【図１４Ｆ】



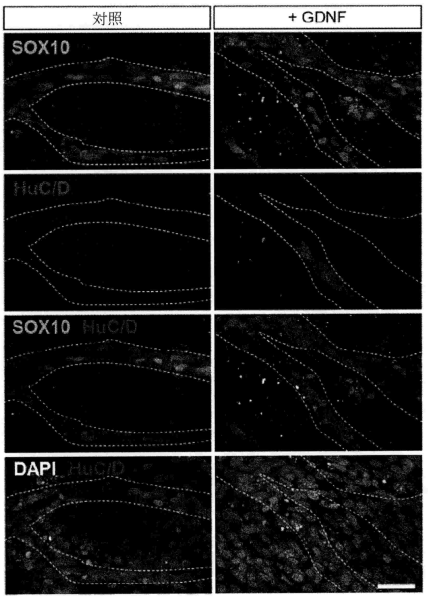
【図１４Ｇ】



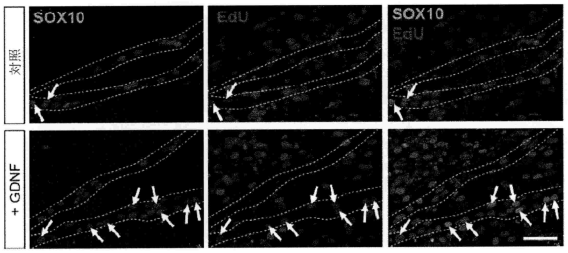
【図１４Ｈ】



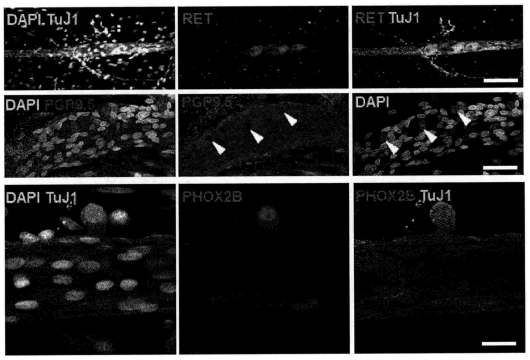
【図１５Ａ】



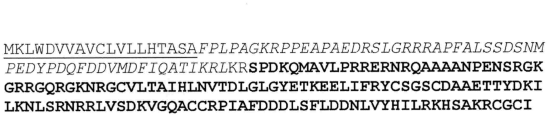
【図１５Ｂ】



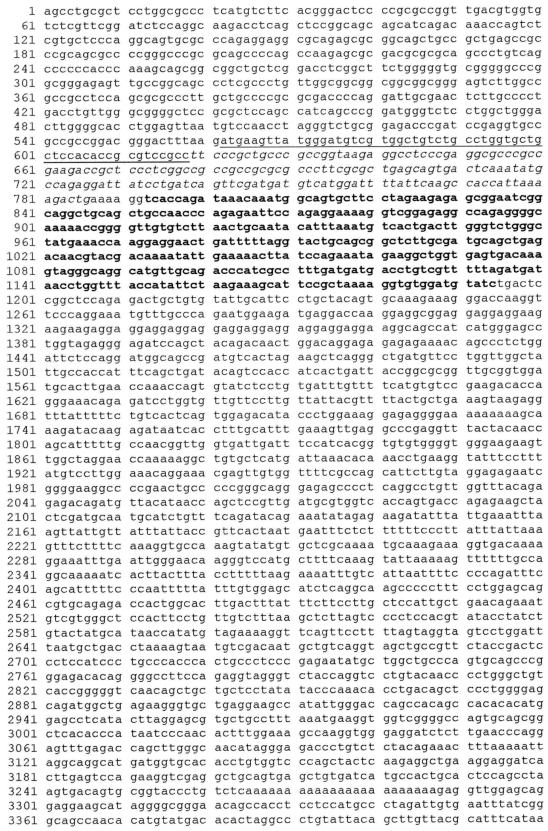
【図１６】



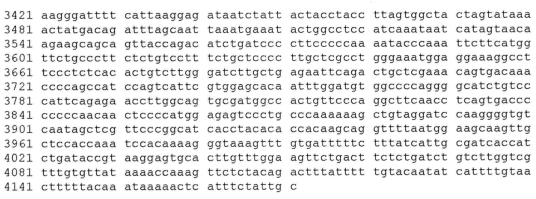
【図１７Ａ】



【図１７Ｂ】



【図１７Ｃ】



【配列表】

0007665215000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　FI

A61P 25/02 (2006.01)		A61P	25/02
C07K 14/475 (2006.01)		C07K	14/475
C12N 15/16 (2006.01)		C12N	15/16

２１

(72)発明者　ニコラ・ピロン
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｊ・１Ｒ９・モントリオール・リュ・ジルフォール・１４５８

審査官　渡邉 潤也
(56)参考文献　Neurogastroenterology and Motility，2019年08月，31(Supplement 4)，p.128, Abstract 251
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）