

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509366

(P2015-509366A)

(43) 公表日 平成27年3月30日(2015.3.30)

| | | |
|-------------------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 5/0797 (2010.01) | C 1 2 N 5/00 2 0 2 T | 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 N 5/0793 (2010.01) | C 1 2 N 5/00 2 0 2 S | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 1 0 2 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 K 35/12 (2015.01) | A 6 1 K 35/12 | 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01) | A 6 1 P 25/28 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2014-558252 (P2014-558252) | (71) 出願人 | 512132479 |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年2月21日 (2013.2.21) | | ブレインシステム バイオテック リミテッ ド |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成26年10月21日 (2014.10.21) | | イスラエル, 6 4 2 3 9 テルーアヴィ ヴ, ウェイズマン ストリート 1 4 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/IB2013/051429 | (71) 出願人 | 508227189 |
| (87) 国際公開番号 | W02013/124816 | | ヘンリー フォード ヘルス システム |
| (87) 国際公開日 | 平成25年8月29日 (2013.8.29) | | HENRY FORD HEALTH S YSTEM |
| (31) 優先権主張番号 | 61/601, 596 | | アメリカ合衆国、4 8 2 0 2 ミシガン州 、デトロイト、ワン・フォード・プレイス |
| (32) 優先日 | 平成24年2月22日 (2012.2.22) | (74) 代理人 | 100103816 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 風早 信昭 |
| | | (74) 代理人 | 100120927 |
| | | | 弁理士 浅野 典子 |
| | | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 神経幹細胞および運動ニューロンの生成

(57) 【要約】

神経幹細胞または運動ニューロンを作製する方法が開示され、この方法は、m i R N A をハイブリダイゼーションする薬剤を使用して少なくとも1つの外因性m i R N A の前記間葉系幹細胞 (M S C) におけるレベルをアップレギュレーションおよび/またはダウンレギュレーションすることまたはRelated to testis - specific, vespid and pathogenesisタンパク質1 (R T V P - 1) をダウンレギュレーションすることを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

間葉系幹細胞の神経幹細胞への分化を促す方法であって、mi R - 1 2 7 5、mi R - 8 9 1 a、mi R - 1 5 4、mi R - 1 2 0 2、mi R - 5 7 2、mi R - 9 3 5 a、mi R 3 0 2 b、mi R - 3 7 1、mi R - 1 3 4、mi R - 2 1 9、mi R - 1 5 5、mi R - 3 2、mi R - 3 3、mi R - 1 2 6、mi R - 1 2 7、mi R - 1 3 2、let - 7 c、mi R - 6 6 5、mi R - 4 2 5 8、mi R - 3 6 1 - 3 p、mi R - 3 7 4 a - star、mi R - 8 9 2 b、mi R - 3 6 1 - 5 p、mi R - 1 8 1 a、mi R - 1 6、mi R - 6 3 6、mi R - 4 2 8 4、mi R - 1 2 0 8、mi R - 1 2 7 4 b、mi R - 3 0 c - 2 - star、mi R - 5 0 1 - 3 p、hsa - mi R - 9 2 a、mi R - 3 7 8 b、mi R - 1 2 8 7、mi R - 4 2 5 - star、mi R - 3 2 4 - 5 p、mi R - 3 1 7 8、mi R - 2 1 9 - 1 - 3 p、mi R - 1 9 7、mi R - 1 8 1 b、mi R - 5 0 0 - star、mi R - 1 0 6 b、mi R - 5 0 2 - 3 p、mi R - 3 0 c、mi R - 1 2 7 5、mi R - 4 2 2 a、mi R - 9 3、mi R - 1 8 1 d、mi R - 1 3 0 7、mi R - 1 3 0 1、mi R - 9 9 a、mi R - 5 0 5 - star、mi R - 1 2 0 2、mi R - 1 2、mi R - 5 3 2 - 5 p、mi R - 1 9 5、mi R - 5 3 2 - 3 p、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 7、mi R - 1 2 7 1、mi R - 7 6 9 - 3 p、mi R - 1 5 b、mi R - 3 2 4 - 3 p、mi R - 2 0 a、mi R - 5 0 1 - 5 p、mi R - 3 3 0 - 3 p、mi R - 8 7 4、mi R - 5 0 0、mi R - 2 5、mi R - 7 6 9 - 5 p、mi R - 1 2 5 b - 2 - star、mi R - 1 3 0 b、mi R - 5 0 4、mi R - 1 8 1 a - 2 - star、mi R - 8 8 5 - 3 p、mi R - 1 2 4 6、mi R - 9 2 b、mi R - 3 6 2 - 5 p、mi R - 5 7 2、mi R - 4 2 7 0、mi R - 3 7 8 c、mi R - 9 3 - star、mi R - 1 4 9、mi R - 3 6 3、mi R - 9、mi R - 1 8 a、mi R - 3 4 6、mi R - 4 9 7、mi R - 3 7 8、mi R - 1 2 3 1、mi R - 1 3 9 - 5 p、mi R - 3 1 8 0 - 3 p、mi R - 9 3 5 および mi R - 2 0 b からなる群から選択される少なくとも 1 つの外因性 mi RNA の前記間葉系幹細胞 (MSC) におけるレベルをアップレギュレーションし、それにより、前記 MSC の前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの外因性 mi RNA は、mi R - 1 2 7 5、mi R - 8 9 1 a、mi R - 1 5 4、mi R - 1 2 0 2、mi R - 5 7 2 および mi R - 9 3 5 a からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの外因性 mi RNA は、mi R - 2 0 b、mi R - 9 2 5、mi R - 8 9 1 および mi R - 3 7 8 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

MSC の神経幹細胞への分化を促す方法であって、mi R - 4 3 1 7、mi R - 1 5 3、mi R - 4 2 8 8、mi R - 4 0 9 - 5 p、mi R - 1 9 3 a - 5 p、mi R - 1 0 b、mi R - 1 4 2 - 3 p、mi R - 1 3 1 a、mi R - 1 2 5 b、mi R - 1 8 1 a、mi R - 1 4 5、mi R - 1 4 3、mi R - 2 1 4、mi R - 1 9 9 a - 3 p、mi R - 1 9 9 a - 5 p、mi R - 1 9 9 b - 3 p、mi R - 1 3 8、mi R - 3 1、mi R - 2 1、mi R - 1 9 3 a - 5 p、mi R - 2 2 4 - star、mi R - 1 9 6 a、mi R - 4 8 7 b、mi R - 4 0 9 - 5 p、mi R - 1 9 3 b - star、mi R - 3 7 9、mi R - 2 1 - star、mi R - 2 7 a - star、mi R - 2 7 a、mi R - 4 3 1 7、mi R - 1 9 3 b、mi R - 2 7 b、mi R - 2 2、5 7 4 - 3 p、mi R - 4 2 8 8、mi R - 2 3 a、mi R - 2 2 1 - star、mi R - 2 1 1 3、let - 7 i、mi R - 2 4、mi R - 2 3 b、mi R - 2 9 9 - 3 p、mi R - 5 1 8 c - star、mi R - 2 2 1、mi R - 4 3 1 - star、mi R - 5 2 3、mi R - 4 3 1 3、mi R - 5 5 9、mi R - 6 1 4、mi R - 6 5 3、mi R - 2 2 7 8、mi R - 7 6 8 - 5 p、mi R - 1 5 4 - star、mi R - 3 0 2 a - star、mi R - 3 1 9 9 および mi R -

3 1 3 7 からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの前記間葉系幹細胞における発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因のレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、前記MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法。

【請求項5】

前記少なくとも1つのmiRNAは、miR-4317、miR-153、miR-4288、miR-409-5pおよびmiR-193a-5pからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記少なくとも1つのmiRNAは、miR-138、miR-214、miR-199aおよびmiR-199bからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記少なくとも1つのmiRNAはmiR-138であり、上記方法はさらに、
(i) miR-891の発現を、miR-891にハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因を使用してダウンレギュレーションすること；

(ii) 外因性miR20bのレベルをアップレギュレーションすること；または

(iii) 外因性miR378のレベルをアップレギュレーションすること

を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

MSCの神経幹細胞への分化を促す方法であって、外因性miR-124の前記間葉系幹細胞(MSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、かつ、miR-let-7の前記MSCにおけるレベルをダウンレギュレーションし、それにより、前記MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法。

【請求項9】

MSCの神経幹細胞への分化を促す方法であって、前記間葉系幹細胞(MSC)を、Related to testis-specific, vespid and pathogenesisタンパク質1(RTVP-1)の量および/または活性をダウンレギュレーションする作用因と接触させ、それにより、MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法。

【請求項10】

神経幹細胞の運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR-368、miR-302b、miR-365-3p、miR-365-5p、miR-Let-7a、miR-Let-7b、miR-218、miR-134、miR-124、miR-125a、miR-9、miR-154、miR-20aおよびmiR-130aからなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの神経幹細胞(NSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、それによりNSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法。

【請求項11】

MSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR-648、miR-368、miR-365、miR-500、miR-491、miR-218、miR-155、miR-192、let-7b、miR-16、miR-210、miR-197、miR-21、miR-373、miR-27a、miR-122、miR-17、miR-494、miR-449、miR-503、miR-30a、miR-196a、miR-122、miR-7、miR-151-5p、miR-16、miR-22、miR-31、miR-424、miR-1、miR-29c、miR-942、miR-100、miR-520、miR-663a、miR-562、miR-449a、miR-449b-5p、miR-520b、miR-451、miR-532-59、miR-605、miR-504、miR-503、miR-155、miR-34a、m

10

20

30

40

50

miR - 16, miR - 7b, miR - 103, miR - 124, miR - 1385p, miR - 16, miR - 330, miR - 520, miR - 608, miR - 708, miR - 107, miR - 137, miR - 132, miR - 145, miR - 204, miR - 125b, miR - 224, miR - 30a, miR - 375, miR - 101, miR - 106b, miR - 128, miR - 129 - 5p, miR - 153, miR - 203, miR - 214, miR - 338 - 3p, miR - 346, miR - 98, miR - 107, miR - 141, miR - 217, miR - 424, miR - 449, miR - 7, miR - 9, miR - 93, miR - 99a, miR - 100, miR - 1228, miR - 183, miR - 185, miR - 190, miR - 522, miR - 650, miR - 675, miR - 342 - 3p および miR - 31 からなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの前記間葉系幹細胞(MSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、それにより、MSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法。

10

【請求項12】

前記miRNAは、miR - 648、miR - 368、miR - 365、miR - 500 および miR - 491 からなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

NSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR - 372、miR - 373、miR - 141、miR - 199a、miR - 32、miR - 33、miR - 221 および miR - 223 からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因の前記NSCにおけるレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、NSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法。

20

【請求項14】

MSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR - 372、miR - 373、miR - 942、miR - 2113、miR - 199a - 3p、miR - 199a - 5p、miR - 372、miR - 373、miR - 942、miR - 2113、miR - 301a - 3p、miR - 302c、miR - 30b - 5p、miR - 30c、miR - 326、miR - 328、miR - 331 - 3p、miR - 340、miR - 345、miR - 361 - 5p、miR - 363、miR - 365a - 3p、miR - 371a - 3p、miR - 373 - 3p、miR - 374a、miR - 423 - 3p、miR - 449b - 5p、miR - 451a、miR - 494、miR - 504、miR - 515 - 3p、miR - 516a - 3p、miR - 519e、miR - 520a - 3p、miR - 520c - 3p、miR - 520g、miR - 532 - 5p、miR - 559、miR - 562、miR - 572、miR - 590 - 5p、miR - 605、miR - 608、miR - 626、miR - 639、miR - 654 - 3p、miR - 657、miR - 661、miR - 708 - 5p、miR - 942、miR - 96、miR - 99a rno および miR - 194 からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する前記少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因の前記MSCにおけるレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、MSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法。

30

40

【請求項15】

前記miRNAは、miR - 372、miR - 373、miR - 942、miR - 2113、miR - 199a - 3p および miR - 199a - 5p からなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも1つのmiRNAは、miR - Let - 7a、miR - 124、miR - 368 および miR - 154 のそれぞれを含む、請求項10に記載の方法。

50

【請求項 17】

前記少なくとも1つのmiRNAは、miR-125a、miR-9およびmiR-130aのそれぞれを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも1つのmiRNAは、miR-218、miR-134およびmiR-20aのそれぞれを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 19】

miR-141、miR-32、miR-33、miR-221、miR-223およびmiR-373のそれぞれをダウンレギュレーションすることをさらに含む、請求項16、17、または18に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記NSCは、MSCをエクスピボ分化させることによって作製される、請求項10または13に記載の方法。

【請求項 21】

前記エクスピボ分化させることが、請求項1～9のいずれかに記載される方法のいずれかに従って実行される、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記MSCが、骨髄、脂肪組織、胎盤、臍帯血および臍帯からなる群から選択される組織から単離される、請求項1、4、8、9、および20のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 23】

前記MSCは前記対象に対して自己である、請求項1、4、8、9、および20のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

前記MSCは前記対象に対して非自己である、請求項1、4、8、9、および20のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記MSCは前記対象に対して半同種である、請求項1、4、8、9、および20のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記アップレギュレーションすることは、前記MSCに前記少なくとも1つのmiRNAを導入することを含む、請求項1、8、および10のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 27】

前記アップレギュレーションすることが、前記MSCを、前記少なくとも1つのmiRNAのプレ-miRNAをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターによりトランスフェクションすることによって実行される、請求項1、8、および10のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

前記アップレギュレーションすることが、前記MSCを、前記少なくとも1つのmiRNAをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターによりトランスフェクションすることによって実行される、請求項1、8、および10のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 29】

ネスチンおよびSox2からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの発現を前記作製することの後に分析することをさらに含む、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

islet1、HB9、ならびに、ニューロンマーカーのニューロフィラメントおよび3チューブリンからなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの発現を前記作製することの後に分析することをさらに含む、請求項10または13に記載の方法。

【請求項 31】

インビボで実行される、請求項1、4、8～10、13、および19のいずれかに記載

50

の方法。

【請求項 3 2】

エキスピボで実行される、請求項 1, 4, 8 ~ 10, 13、および 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 3】

miR302b、miR-371、miR-134、miR-219、miR-154、miR-155、miR-32、miR-33、miR-126、miR-127、miR-132 および miR-137 からなる群から選択される少なくとも 1 つの外因性 miRNA を含み、および / または、miR-10b、miR-142-3p、miR-131a、miR-125b、miR-153 および miR-181a からなる群から選択される少なくとも 1 つの miRNA にハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が神経幹細胞の表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団。

10

【請求項 3 4】

前記細胞集団の少なくとも 50 % が、ネスチンおよび Sox2 からなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する、請求項 3 3 に記載の単離された細胞集団。

【請求項 3 5】

miR-368、miR-302b、miR-365-3p、miR-365-5p、miR-Let-7a、miR-Let-7b、miR-218、miR-134、miR-124、miR-125a、miR-9、miR-154、miR-20a、miR-130a からなる群から選択される少なくとも 1 つの外因性 miRNA を含み、および / または、miR-372、miR-373、miR-141、miR-199a、miR-32、miR-33、miR-221 および miR-223 からなる群から選択される少なくとも 1 つの miRNA にハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が運動ニューロンの表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団。

20

【請求項 3 6】

前記細胞集団の少なくとも 50 % が、islet1、HB9、ならびに、ニューロンマーカーのニューロフィラメントおよび 3 チューブリンからなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する、請求項 3 5 に記載の単離された細胞集団。

30

【請求項 3 7】

脳疾患または脳障害を処置することにおいて使用するためのものである、請求項 3 3 に記載の単離された細胞集団。

【請求項 3 8】

前記脳疾患または脳障害が神経変性障害である、請求項 3 7 に記載の単離された細胞集団。

【請求項 3 9】

前記神経変性障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、てんかん、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、卒中、レット症候群、自己免疫性脳脊髄炎、脊髄傷害、脳性麻痺、卒中、アルツハイマー病およびハンチントン病からなる群から選択される、請求項 3 8 に記載の単離された細胞集団。

40

【請求項 4 0】

運動ニューロン疾患を処置することにおいて使用するためのものである、請求項 3 5 に記載の単離された細胞集団。

【請求項 4 1】

前記運動ニューロン疾患は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、原発性側索硬化症 (PLS)、偽性球麻痺および進行性球麻痺からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の単離された細胞集団。

50

【請求項 4 2】

脳疾患または脳障害をその必要性のある対象において処置する方法であって、請求項 3 に記載される単離された細胞集団の治療効果的な量を前記対象に投与し、それにより、前記脳疾患または脳障害を処置することを含む方法。

【請求項 4 3】

前記神経疾患または神経障害は神経変性障害である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記神経変性障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、てんかん、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、卒中、レット症候群、自己免疫性脳脊髄炎、脊髄傷害、脳性麻痺、卒中、アルツハイマー病およびハンチントン病からなる群から選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

10

【請求項 4 5】

運動ニューロン疾患をその必要性のある対象において処置する方法であって、請求項 3 に記載される単離された細胞集団の治療効果的な量を前記対象に投与し、それにより、前記運動ニューロン疾患を処置することを含む方法。

【請求項 4 6】

請求項 3 3 に記載される単離された細胞集団と、医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 4 7】

請求項 3 5 に記載される単離された細胞集団と、医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物。

20

【請求項 4 8】

運動ニューロン疾患の処置のために調節され得る miRNA を選択する方法であって、
(a) 神経幹細胞の集団を運動ニューロン表現型に向かって分化させること；および
(b) MSC の前記集団における miRNA の発現における変化を、前記 MSC を運動ニューロン表現型に向かって前記分化させる前および前記分化させた後において分析すること、ただし、所定のレベルを越えるか、または下回る miRNA の発現の変化により、前記 miRNA が前記運動ニューロン疾患の処置のために調節され得ることが示される、を含む方法。

【請求項 4 9】

miR-1275、miR-891a、miR-154、miR-1202、miR-572 および miR-935a からなる群から選択される少なくとも 1 つの外因性 miRNA を含み、および / または、miR-4317、miR-153、miR-4288、miR-409-5p、miR-193a-5p からなる群から選択される少なくとも 1 つの miRNA にハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が神経幹細胞の表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団。

30

【請求項 5 0】

miR-648、miR-368、miR-365、miR-500 および miR-491 からなる群から選択される少なくとも 1 つの外因性 miRNA を含み、および / または、miR-372、miR-373、miR-942、miR-2113、miR-199a-3p および miR-199a-5p からなる群から選択される少なくとも 1 つの miRNA にハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも 1 つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が運動ニューロンの表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本願は、2012 年 2 月 22 日に出願した米国特許仮出願第 61/601596 号 (参照として本明細書中にそれらの全体が援用される) の優先権の利益を主張する。

50

【0002】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、間葉系幹細胞を、ミクロRNA (miRNA) を使用して神経幹細胞および運動ニューロンに向かってエクスピボ分化させる方法に関連する。

【背景技術】

【0003】

間葉系幹細胞 (MSC) は、骨髄、脂肪、臍帯、胎盤および血管周囲の組織を含むほとんどの結合組織に存在する、多数の種から単離することができる間質細胞の不均一な集団である。MSC はまた、胎盤および臍帯ワルトンゼリーからも単離することができる。

【0004】

骨髄および脂肪組織を含むすべての組織におけるMSCの濃度は非常に低い、MSCの数をインビトロで拡大させることができる。典型的には、15回までの継代培養を使用するMSCの拡大では、遺伝的安定性を示す変異が生じていない。MSCは間葉系譜の細胞 (例えば、骨、軟骨および脂肪など) に分化することができ、しかし、ある種の条件のもとでは、内胚系譜および神経外胚系譜の細胞の表現型を獲得することが報告されており、このことは「分化転換」のための何らかの潜在的能力を示唆している。

【0005】

骨髄区画内において、これらの細胞はしっかりと混じり合い、造血および造血幹細胞の生存を黙従的状态において支援する (7)。加えて、培養における拡大の後において、MSCは、自然免疫および適応免疫を調節するその能力を保持する (8)。さらに、MSCは炎症部位に能動的に遊走し、CNSを含む損傷を受けた組織を保護する。これらは、自己免疫障害を含む炎症性疾患および免疫媒介疾患を処置するための、免疫抑制性の、正確に言えば、免疫調節性または抗炎症性の新しい作用因としてのその使用を裏付けた性質である (9)。MSCのこれらの特徴は、同種骨髄移植の後における命を脅かす移植片対宿主病 (GVHD) を抑制するためのその使用、したがって、同種骨髄移植の非常に重篤な合併症の1つを抑制し、これにより、多臓器傷害を伴う移植関連の毒性および死亡を低下させることを助けるに値した (10)。

【0006】

いくつかの研究では、種々の因子にインビトロでさらされた後のMSCがその表現型を変化させ、ニューロンおよびグリアのマーカーを明らかにすることが示されている [Kopen, G. C. 他, Proc Natl Acad USA. 96 (19): 10711-6, 1999; Sanchez-Ramos 他 Exp Neurol. 164 (2): 247-56, 2000; Woodbury, D., J Neurosci Res. 61 (4): 364-70, 2000; Woodbury, D. 他, J Neurosci Res. 69 (6): 908-17, 2002; Black, I. B., Woodbury, D. Blood Cells Mol Dis. 27 (3): 632-6, 2001; Kohyama, J. 他 Differentiation. 68 (4-5): 235-44, 2001; Levy, Y. S. J Mol Neurosci. 21 (2): 121-32, 2003]。

【0007】

したがって、MSC (エクスピボ分化MSCおよび非分化の両方) が、多発性硬化症、パーキンソン病、ALS、アルツハイマー病、脊髄傷害および卒中を含む様々な神経学的障害を処置するための細胞置換療法のための候補物として提案されている。

【0008】

脊髄における運動ニューロンは骨格筋を神経支配し、発達途中の脊髄 (神経管) の限られた領域における神経上皮細胞に起源を有する。胚発達の期間中に、運動ニューロンは、脊髄に隣接する骨格筋を神経支配するために周囲にその突起 (神経) を伸ばす。しかしながら、成人の身体では、運動ニューロンの軸索が脊髄内の細胞体からかなり遠く突き出て、その標的筋肉に達する。このため、運動ニューロンは、より小型のニューロンと比較してより大きい代謝速度を有しており、このことが、運動ニューロンを、遺伝的变化、後成

10

20

30

40

50

的变化および環境変化に対してより感受性にしている。運動ニューロンは自身を再生することができず、したがって、その喪失または変性が一般に、麻痺および様々な障害（例えば、小児の脊髄性筋萎縮症（SMA）および成人発症の筋萎縮性側索硬化症（ALS）など）を含む致死的な神経学的状態に伴う。

【0009】

Roy 他, 2005 [Exp Neurol. 2005; 196: 224 - 234]; Zhang 他, 2006 [Stem Cells. 2006; 24: 434 - 442]; Bohl 他, 2008 [Stem Cells. 2008; 26: 2564 - 2575]; and Dimos 他, 2008 [Science. 2008; 321: 1218 - 1221]。これらの内容は参考として組み入れられ、運動ニューロンへの分化を誘導する様々な幹細胞の遺伝子改変を教示する。

10

【発明の概要】

【0010】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、間葉系幹細胞の神経幹細胞への分化を促す方法であって、miR-1275、miR-891a、miR-154、miR-1202、miR-572、miR-935a、miR302b、miR-371、miR-134、miR-219、miR-155、miR-32、miR-33、miR-126、miR-127、miR-132、let-7c、miR-665、miR-4258、miR-361-3p、miR-374a-star、miR-892b、miR-361-5p、miR-181a、miR-16、miR-636、miR-4284、miR-1208、miR-1274b、miR-30c-2-star、miR-501-3p、hsa-miR-92a、miR-378b、miR-1287、miR-425-star、miR-324-5p、miR-3178、miR-219-1-3p、miR-197、miR-181b、miR-500-star、miR-106b、miR-502-3p、miR-30c、miR-1275、miR-422a、miR-93、miR-181d、miR-1307、miR-1301、miR-99a、miR-505-star、miR-1202、miR-12、miR-532-5p、miR-195、miR-532-3p、miR-106a、miR-17、miR-1271、miR-769-3p、miR-15b、miR-324-3p、miR-20a、miR-501-5p、miR-330-3p、miR-874、miR-500、miR-25、miR-769-5p、miR-125b-2-star、miR-130b、miR-504、miR-181a-2-star、miR-885-3p、miR-1246、miR-92b、miR-362-5p、miR-572、miR-4270、miR-378c、miR-93-star、miR-149、miR-363、miR-9、miR-18a、miR-346、miR-497、miR-378、miR-1231、miR-139-5p、miR-3180-3p、miR-935およびmiR-20bからなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの前記間葉系幹細胞（MSC）におけるレベルをアップレギュレーションし、それにより、前記MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法が提供される。

20

30

【0011】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCの神経幹細胞への分化を促す方法であって、miR-4317、miR-153、miR-4288、miR-409-5p、miR-193a-5p、miR-10b、miR-142-3p、miR-131a、miR-125b、miR-181a、miR-145、miR-143、miR-214、miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p、miR-138、miR-31、miR-21、miR-193a-5p、miR-224-star、miR-196a、miR-487b、miR-409-5p、miR-193b-star、miR-379、miR-21-star、miR-27a-star、miR-27a、miR-4317、miR-193b、miR-27b、miR-22、574-3p、miR-4288、miR-23a、miR-221-s

40

50

tar, miR - 2113, let - 7i, miR - 24, miR - 23b, miR - 299 - 3p, miR - 518c - star, miR - 221, miR - 431 - star, miR - 523, miR - 4313, miR - 559, miR - 614, miR - 653, miR - 2278, miR - 768 - 5p, miR - 154 - star, miR - 302a - star, miR - 3199 および miR - 3137 からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの前記間葉系幹細胞における発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因のレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、前記MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法が提供される。

10

【0012】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCの神経幹細胞への分化を促す方法であって、外因性miR - 124の前記間葉系幹細胞(MSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、かつ、miR - let - 7の前記MSCにおけるレベルをダウンレギュレーションし、それにより、前記MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法が提供される。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCの神経幹細胞への分化を促す方法であって、前記間葉系幹細胞(MSC)を、Related to testis - specific, vespid and pathogenesis タンパク質1 (RTVP - 1)の量および/または活性をダウンレギュレーションする作用因と接触させ、それにより、MSCの前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法が提供される。

20

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、神経幹細胞の運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR - 368、miR - 302b、miR - 365 - 3p、miR - 365 - 5p、miR - Let - 7a、miR - Let - 7b、miR - 218、miR - 134、miR - 124、miR - 125a、miR - 9、miR - 154、miR - 20a および miR - 130a からなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの神経幹細胞(NSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、それによりNSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法が提供される。

30

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR - 648、miR - 368、miR - 365、miR - 500、miR - 491、miR - 218、miR - 155、miR - 192、let - 7b、miR - 16、miR - 210、miR - 197、miR - 21、miR - 373、miR - 27a、miR - 122、miR - 17、miR - 494、miR - 449、miR - 503、miR - 30a、miR - 196a、miR - 122、miR - 7、miR - 151 - 5p、miR - 16、miR - 22、miR - 31、miR - 424、miR - 1、miR - 29c、miR - 942、miR - 100、miR - 520、miR - 663a、miR - 562、miR - 449a、miR - 449b - 5p、miR - 520b、miR - 451、miR - 532 - 59、miR - 605、miR - 504、miR - 503、miR - 155、miR - 34a、miR - 16、miR - 7b、miR - 103、miR - 124、miR - 1385p、miR - 16、miR - 330、miR - 520、miR - 608、miR - 708、miR - 107、miR - 137、miR - 132、miR - 145、miR - 204、miR - 125b、miR - 224、miR - 30a、miR - 375、miR - 101、miR - 106b、miR - 128、miR - 129 - 5p、miR - 153、miR - 203、miR - 214、miR - 338 - 3p、miR - 346、miR - 98、miR - 107、miR - 141、miR - 217、miR - 424、miR - 449、miR - 7、miR - 9、miR - 93、miR - 99a、miR - 100、miR - 1228、miR - 183、miR - 185

40

50

, miR - 190, miR - 522, miR - 650, miR - 675, miR - 342 - 3p, miR - 31 からなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの前記間葉系幹細胞(MSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、それにより、MSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法が提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、NSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR - 372、miR - 373、miR - 141、miR - 199a、miR - 32、miR - 33、miR - 221およびmiR - 223からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因の前記NSCにおけるレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、NSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法が提供される。

10

【0017】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、MSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR - 372、miR - 373, miR - 942, miR - 2113, miR - 199a - 3p, miR - 199a - 5p, miR - 372, miR - 373, miR - 942, miR - 2113, miR - 301a - 3p, miR - 302c, miR - 30b - 5p, miR - 30c, miR - 326, miR - 328, miR - 331 - 3p, miR - 340, miR - 345, miR - 361 - 5p, miR - 363, miR - 365a - 3p, miR - 371a - 3p, miR - 373 - 3p, miR - 374a, miR - 423 - 3p, miR - 449b - 5p, miR - 451a, miR - 494, miR - 504, miR - 515 - 3p, miR - 516a - 3p, miR - 519e, miR - 520a - 3p, miR - 520c - 3p, miR - 520g, miR - 532 - 5p, miR - 559, miR - 562, miR - 572, miR - 590 - 5p, miR - 605, miR - 608, miR - 626, miR - 639, miR - 654 - 3p, miR - 657, miR - 661, miR - 708 - 5p, miR - 942, miR - 96, miR - 99a r n o およびmiR - 194 からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因の前記MSCにおけるレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、MSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法が提供される。

20

30

【0018】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR302b、miR - 371、miR - 134、miR - 219、miR - 154、miR - 155、miR - 32、miR - 33、miR - 126、miR - 127、miR - 132およびmiR - 137 からなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAを含み、および/または、miR - 10b、miR - 142 - 3p、miR - 131a、miR - 125b、miR - 153およびmiR - 181a からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が神経幹細胞の表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団が提供される。

40

【0019】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR - 368、miR - 302b、miR - 365 - 3p、miR - 365 - 5p、miR - Let - 7a、miR - Let - 7b、miR - 218、miR - 134、miR - 124、miR - 125a、miR - 9、miR - 154、miR - 20a、miR - 130a からなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAを含み、および/または、miR - 372、miR - 373、miR - 141、miR - 199a、miR - 32、miR - 33、miR -

50

221およびmiR-223からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が運動ニューロンの表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団が提供される。

【0020】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、脳疾患または脳障害をその必要性のある対象において処置する方法であって、請求項33に記載される単離された細胞集団の治療効果的な量を前記対象に投与し、それにより、前記脳疾患または脳障害を処置することを含む方法が提供される。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、本明細書中に記載される単離された細胞集団と、医薬的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。

【0022】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、運動ニューロン疾患の処置のために調節され得るmiRNAを選択する方法であって、

(a) 神経幹細胞の集団を運動ニューロン表現型に向かって分化させること；および

(b) MSCの集団におけるmiRNAの発現における変化を、前記MSCを運動ニューロン表現型に向かって分化させる前および分化させた後において分析すること（ただし、所定のレベルを越えるか、または下回るmiRNAの発現の変化により、前記miRNAが前記運動ニューロン疾患の処置のために調節され得ることが示される）

を含む方法が提供される。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、運動ニューロン疾患をその必要性のある対象において処置する方法であって、請求項35に記載される単離された細胞集団の治療効果的な量を前記対象に投与し、それにより、前記運動ニューロン疾患を処置することを含む方法が提供される。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-1275、miR-891a、miR-154、miR-1202、miR-572およびmiR-935aからなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAを含み、および/または、miR-4317、miR-153、miR-4288、miR-409-5p、miR-193a-5pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が神経幹細胞の表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団が提供される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、miR-648、miR-368、miR-365、miR-500およびmiR-491からなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAを含み、および/または、miR-372、miR-373、miR-942、miR-2113、miR-199a-3pおよびmiR-199a-5pからなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因を含む、細胞の遺伝子改変され単離された集団であって、前記細胞が運動ニューロンの表現型を有する、遺伝子改変され単離された細胞集団が提供される。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つの外因性miRNAは、miR-1275、miR-891a、miR-154、miR-1202、miR-572およびmiR-935aからなる群から選択される。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つの外因性miRNAは、m

10

20

30

40

50

i R - 2 0 b、m i R - 9 2 5、m i R - 8 9 1 および m i R - 3 7 8 からなる群から選択される。

【 0 0 2 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つのm i R N Aは、m i R - 4 3 1 7、m i R - 1 5 3、m i R - 4 2 8 8、m i R - 4 0 9 - 5 p および m i R - 1 9 3 a - 5 p からなる群から選択される。

【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つのm i R N Aは、m i R - 1 3 8、m i R - 2 1 4、m i R - 1 9 9 a および m i R - 1 9 9 b からなる群から選択される。

10

【 0 0 3 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つのm i R N Aはm i R - 1 3 8 であり、上記方法はさらに、

(i) m i R - 8 9 1 の発現を、m i R - 8 9 1 にハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因を使用してダウンレギュレーションすること；

(i i) 外因性m i R 2 0 b のレベルをアップレギュレーションすること；または

(i i i) 外因性m i R 3 7 8 のレベルをアップレギュレーションすること

を含む。

【 0 0 3 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記m i R N Aは、m i R - 6 4 8、m i R - 3 6 8、m i R - 3 6 5、m i R - 5 0 0 および m i R - 4 9 1 からなる群から選択される。

20

【 0 0 3 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記m i R N Aは、m i R - 3 7 2、m i R - 3 7 3、m i R - 9 4 2、m i R - 2 1 1 3、m i R - 1 9 9 a - 3 p および m i R - 1 9 9 a - 5 p からなる群から選択される。

【 0 0 3 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つのm i R N Aは、m i R L e t - 7 a、m i R - 1 2 4、m i R - 3 6 8 および m i R - 1 5 4 のそれぞれを含む。

30

【 0 0 3 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つのm i R N Aは、m i R - 1 2 5 a、m i R - 9 および m i R - 1 3 0 a のそれぞれを含む。

【 0 0 3 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記少なくとも1つのm i R N Aは、m i R - 2 1 8、m i R - 1 3 4 および m i R - 2 0 a のそれぞれを含む。

【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、m i R - 1 4 1、m i R - 3 2、m i R - 3 3、m i R - 2 2 1、m i R - 2 2 3 および m i R - 3 7 3 のそれぞれをダウンレギュレーションすることを含む。

40

【 0 0 3 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記N S Cは、M S Cをエキスピボ分化させることによって作製される。

【 0 0 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記エキスピボ分化させることが、本明細書中に記載される方法のいずれかに従って実行される。

【 0 0 3 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記M S Cが、骨髓、脂肪組織、胎盤、臍帯血および臍帯からなる群から選択される組織から単離される。

50

【 0 0 4 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 M S C は上記対象に対して自己である。

【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 M S C は上記対象に対して非自己である。

【 0 0 4 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記 M S C は上記対象に対して半同種である。

【 0 0 4 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記アップレギュレーションすることは、上記 M S C に上記少なくとも 1 つの m i R N A を導入することを含む。

【 0 0 4 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記アップレギュレーションすることが、上記 M S C を、上記少なくとも 1 つの m i R N A のプレ - m i R N A をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターによりトランスフェクションすることによって実行される。

10

【 0 0 4 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記アップレギュレーションすることが、上記 M S C を、上記少なくとも 1 つの m i R N A をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターによりトランスフェクションすることによって実行される。

【 0 0 4 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、ネスチンおよび S o x 2 からなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーの発現を上記作製することの後にいて分析することを含む。

20

【 0 0 4 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、 i s l e t 1、H B 9、ならびに、ニューロンマーカーのニューロフィラメントおよび 3 チューブリンからなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーの発現を上記作製することの後にいて分析することを含む。

【 0 0 4 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はインビボで実行される。

【 0 0 4 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はエクスビボで実行される。

30

【 0 0 5 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞集団の少なくとも 5 0 % が、ネスチンおよび S o x 2 からなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する。

【 0 0 5 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞集団の少なくとも 5 0 % が、 i s l e t 1、H B 9、ならびに、ニューロンマーカーのニューロフィラメントおよび 3 チューブリンからなる群から選択される少なくとも 1 つのマーカーを発現する。

【 0 0 5 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記単離された細胞集団は、脳疾患または脳障害を処置することにおいて使用するためのものである。

40

【 0 0 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記単離された細胞集団は、神経変性障害である脳疾患または脳障害のためのものである。

【 0 0 5 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経変性障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、てんかん、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、卒中、レット症候群、自己免疫性脳脊髄炎、脊髄傷害、脳性麻痺、卒中、アルツハイマー病およびハンチントン病からなる群から選択される。

【 0 0 5 5 】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記単離された細胞集団は、運動ニューロン疾患を処置することにおいて使用するためのものである。

【0056】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記運動ニューロン疾患は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、原発性側索硬化症（PLS）、偽性球麻痺および進行性球麻痺からなる群から選択される。

【0057】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経疾患または神経障害は神経変性障害である。

【0058】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記神経変性障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、てんかん、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、卒中、レット症候群、自己免疫性脳脊髄炎、脊髄傷害、脳性麻痺、卒中、アルツハイマー病およびハンチントン病からなる群から選択される。

【0059】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的用語および／または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および／または材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【図面の簡単な説明】

【0060】

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し添付の図面および画像を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面について行う説明によって、本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

【0061】

【図1A - 1B】図1A - 1Bは、間葉系幹細胞（MSC）が、神経幹細胞（NSC）様細胞に分化し、かつ、NSCマーカーを発現するように誘導されることがあることを例示する写真およびグラフである。MSCを、方法において記載されるように細菌用ディッシュにおいてニューロスフェア培地に置床した。MSC由来の球状体を免疫蛍光（図1A）およびリアルタイムPCR（図1B）によって特徴づけた。

【0062】

【図2】図2は、NSC分化期間中にアップレギュレーションされた、幹細胞シグナチャーおよび自己再生に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【0063】

【図3】図3は、NSC分化期間中にアップレギュレーションされた、造血に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【0064】

【図4A】図4Aは、NSC分化期間中にアップレギュレーションされた、ニューロンシグナチャーおよび自己再生に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【図4B - 4D】図4B - 4Dは、NSC分化期間中にアップレギュレーション（図4B、4C）またはダウンレギュレーション（図4D）された、ニューロンシグナチャーおよび自己再生に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【0065】

【図4E - 4F】図4E - 4Fは、ネスチンプロモーターレポーターアッセイを使用してantagomiR-138およびmiR-891によりトランスフェクションされる骨髄MSCを例示する写真である。

10

20

30

40

50

【0066】

【図5A - 5D】図5A - 5Dは、RTVP - 1がMSCのNSCへの分化において役割を果たすことを例示するグラフおよび写真である。RTVP - 1がBM - MSCにおいて高レベルで発現され、これは、ウエスタンブロット分析によって明らかにされるように、このタンパク質の非常に高いレベルを発現した細胞であると思われるいくつかの神経膠腫細胞と類似している(A)。MSCの間葉系譜分化を示す略図(B)。siRNA二重鎖を使用するBM - MSCにおけるRTVP - 1のサイレンシングはこれらの細胞の骨形成分化を低下させる(C)。BM - MSCにおけるRTVP - 1のサイレンシングは種々の間葉系マーカーの発現を低下させる(D)。

【0067】

【図5E - 5F】図5Eは、MSC、および、NSCに分化させられるMSCにおけるRTVP - 1の発現を例示する棒グラフである。図5Fは、MSCにおけるネスチン発現に対するRTVP - 1のサイレンシングの影響を例示する棒グラフである。

【0068】

【図6A - 6D】図6A - 6Dは、胎盤由来のMSCに対するOlig2および分化培地のトランスフェクションの影響を例示する写真およびグラフである。培養での12日の後、細胞を、リアルタイムPCRを使用して運動ニューロン始原体マーカーの発現(図6C)および運動ニューロンマーカーの発現(図6D)について分析した。図6Aは未分化MSCを例示する。図6Bは分化MSCを例示する。

【0069】

【図7A】図7Aは、NSCが、運動ニューロン細胞に分化するように誘導されることがあることを例示する写真である。ヒト神経始原体細胞(Lonza)を球状体として成長させ、その後、ラミニン上に置床し、方法において記載されるような種々の因子により処理した。12日~14日後、細胞を形態学的外観について分析し、また、リアルタイムPCRを使用して種々のマーカーについて分析した。

【図7B】図7Bは、NSCが、運動ニューロン細胞に分化するように誘導されることがあることを例示するグラフである。ヒト神経始原体細胞(Lonza)を球状体として成長させ、その後、ラミニン上に置床し、方法において記載されるような種々の因子により処理した。12日~14日後、細胞を形態学的外観について分析し、また、リアルタイムPCRを使用して種々のマーカーについて分析した。

【0070】

【図8】図8は、運動ニューロン分化期間中にアップレギュレーションされた、幹細胞シグナチャーおよび自己再生に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【0071】

【図9】図9は、運動ニューロン分化期間中にアップレギュレーションされた、造血に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【0072】

【図10】図10は、運動ニューロン分化期間中にアップレギュレーションされた、ニューロンシグナチャーおよび自己再生に関連する例示的miRNAを例示する棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0073】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、間葉系幹細胞を、マイクロRNAを使用して神経始原体細胞および運動ニューロンに向かってエキスビポ分化させる方法に関連する。

【0074】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示される細部、または、実施例によって例示される細部に必ずしも限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、あるいは、様々な方法で実施、または、実行される。

10

20

30

40

50

【0075】

神経幹細胞 (NSC) が哺乳動物およびヒトの胚および胎児の脳から単離され、様々な培養系においてインビトロで増やされている (Doetsch 他、1999、Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain、Cell、97:703~16; Johansson 他、1999、Cell、96:25~34; Svendsen 他、1998、J Neurosci Methods、85:141~52)。ヒト神経幹細胞 (hNSC) を、ヒト bFGF およびヒト EGF を含有する血清非含有培地において増殖させるための系もまた報告されている (Kim 他、2002、Proc Natl Acad Sci USA、99:4020~4025; Qu 他、2001、NeuroReport、12:1127~1132)。さらに、hNSC の実験動物への移植が記載されている (Qu 他、2001、同上; Qu 他、2005、35th Annual Meeting in Washington, D.C.、2005 年 11 月)。

10

【0076】

しかしながら、様々な課題が、胚/胎児組織供給源に由来する幹細胞を使用する幹細胞治療の技術分野では存在した。胚性供給源を使用する幹細胞治療は、倫理的問題、細胞単離における技術的困難さ、および、移植レシピエントに長期の免疫抑制剤投与が必要であることなどの課題に直面する; 胎児組織供給源を使用することの制限が上記で示されている。これらの課題により、ヒト使用のための hNSC の適用性が妨げられている。

20

【0077】

骨髄 (BM) は、造血においてだけでなく、様々な非造血系組織を生じさせるためにも関与する幹細胞を含有する。骨髄における間質細胞の 1 つのサブセット、すなわち、間葉系幹細胞 (MSC) は自己再生することができ、かつ、骨、軟骨、脂肪、腱および他の結合組織を含む多数の間葉系細胞系譜を生じさせることができる (Majumdar 他、1998、J Cell Physiol、176:57~66; Pereira 他、1995、Proc Natl Acad Sci USA、92:4857~61; Pittenger 他、1999、Science、284:143~7)。骨髄の間葉系幹細胞は通常、分化において神経系譜に決定されていない。成体幹細胞はある程度の多分化能を有し続けるにもかかわらず、成体幹細胞から生じる細胞タイプはそれらの組織特異的特性によって限定されると考えられている。この障壁を克服するためには、これらの成体幹細胞の細胞系譜を変化させることが必要である。

30

【0078】

本発明を実施に移している間に、本発明者らは、膨大な数の潜在的なマイクロ RNA (miRNA) の中から、特定の miRNA のみが、間葉系幹細胞 (MSC) の神経幹細胞分化を誘導するために調節されることがあることを見出しており、そのような分化 MSC は、脳の疾患または障害を有する患者を処置するために使用され得ることを提案する。

【0079】

さらに、本発明者らは、ネスチンおよび SOX-2 の発現によって測定されるように、調節により、NSC に向かう分化が相乗的に増大することが見出された miRNA の特定の組合せを特定した。

40

【0080】

さらに本発明を実施に移している間に、本発明者らは、NSC の miRNA 発現を操作したとき、運動ニューロンマーカーを発現する細胞が生じることがあることを発見した。

【0081】

したがって、本発明者らは、神経幹細胞 (NSC) における miR-368、miR-302b、miR-365-3p、miR-365-5p、miR-Let-7a、miR-Let-7b、miR-218、miR-134、miR-124、miR-125a、miR-9、miR-154、miR-20a、miR-130a のうちの少なくとも 1 つのアップレギュレーションが運動ニューロンの表現型を誘導し、一方で、NSC に

50

におけるmiR-372、miR-373、miR-141、miR-199a、miR-32、miR-33、miR-221およびmiR-223のうちの少なくとも1つのダウンレギュレーションもまた、運動ニューロンの表現型を誘導したことを示した。

【0082】

さらに、本発明者らは、islet 1、HB9、ならびに、ニューロンマーカーのニューロフィラメントおよび3チューブリンを含む運動ニューロンマーカーの発現によって測定されるように、調節により、運動ニューロンに向かう分化が相乗的に増大することが見出されたmiRNAの特定の組合せを特定した。

【0083】

したがって、本発明の1つの局面によれば、間葉系幹細胞の神経幹細胞への分化を促す方法であって、miR302b、miR-371、miR-134、miR-219、miR-154、miR-155、miR-32、miR-33、miR-126、miR-127、miR-132、miR-137、miR-572、miR-935a、miR-891a、miR-1202、miR-1275、let-7c、miR-665、miR-4258、miR-361-3p、miR-374a-star、miR-892b、miR-361-5p、miR-181a、miR-16、miR-636、miR-4284、miR-1208、miR-1274b、miR-30c-2-star、miR-501-3p、hsa-miR-92a、miR-378b、miR-1287、miR-425-star、miR-324-5p、miR-3178、miR-219-1-3p、miR-197、miR-181b、miR-500-star、miR-106b、miR-502-3p、miR-30c、miR-1275、miR-422a、miR-93、miR-181d、miR-1307、miR-1301、miR-99a、miR-505-star、miR-1202、miR-12、miR-532-5p、miR-195、miR-532-3p、miR-106a、miR-17、miR-1271、miR-769-3p、miR-15b、miR-324-3p、miR-20a、miR-501-5p、miR-330-3p、miR-874、miR-500、miR-25、miR-769-5p、miR-125b-2-star、miR-130b、miR-504、miR-181a-2-star、miR-885-3p、miR-1246、miR-92b、miR-362-5p、miR-572、miR-4270、miR-378c、miR-93-star、miR-149、miR-363、miR-9、miR-18a、miR-891a、miR-346、miR-124、miR-497、miR-378、miR-1231、miR-139-5p、miR-3180-3p、miR-9-star、miR-935およびmiR-20bからなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの前記間葉系幹細胞(MSC)におけるレベルをアップレギュレーションし、それにより、前記間葉系幹細胞の前記神経幹細胞への分化を促すことを含む方法が提供される。

【0084】

本明細書中で使用される場合、表現「MSCの神経幹細胞(NSC)への分化を促す」は、MSCを、NSC系譜に沿って分化させることを示す。生じた細胞はNSCに完全に分化させられる場合があり、または、NSCに部分的に分化させられる場合がある。

【0085】

表現「少なくとも1つ」は、本明細書において使用される場合、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上のmiRNAを示す。miRNAの特定の組合せの様々な例が本明細書中下記に提供される。

【0086】

間葉系幹細胞は、生物活性因子(例えば、サイトカインなど)からの様々な影響に依存して、1種以上の間葉系組織(例えば、脂肪組織、骨組織、軟骨組織、弾性結合組織および繊維性結合組織、筋芽細胞)および胚の中胚葉に起源を有する組織とは異なる組織(例えば、神経系細胞)を生じさせる。そのような細胞は、胚卵黄嚢、胎盤、臍帯、胎児および思春期の皮膚、血液および他の組織から単離することができるにもかかわらず、容易に

10

20

30

40

50

利用可能な脂肪組織およびBMにおけるそれらの存在量は他の組織におけるそれらの存在量をはるかに超えており、したがって、BMおよび脂肪組織からの単離が現時点では好ましい。

【0087】

間葉系幹細胞(MSC)を単離し、精製し、拡大する様々な方法が当技術分野では知られており、これらには、例えば、CaplanおよびHaynesworthによって米国特許第5486359号に開示される方法、ならびに、Jones E. A. 他、2002、Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells、Arthritis Rheum、46(12):3349~60に開示される方法が含まれる。

10

【0088】

間葉系幹細胞は、骨髓、末梢血、血液、絨毛膜および羊膜の胎盤(例えば胎盤の胎児側)、臍帯血、臍帯、羊水、胎盤(これらに限定されない)を含む様々な組織、および脂肪組織から単離される場合がある。

【0089】

間葉系幹細胞を末梢血から単離する方法が、Kassiss他[Bone Marrow Transplant、2006 May; 37(10):967~76]によって記載される。間葉系幹細胞を胎盤組織から単離する方法が、Zhang他[Chinese Medical Journal、2004、117(6):882~887]によって記載される。脂肪組織、胎盤および臍帯血の間葉系幹細胞を単離し、培養する方法が、Kern他[Stem Cells、2006; 24:1294~1301]によって記載される。

20

【0090】

本発明のこの局面の好ましい実施形態によれば、間葉系幹細胞はヒト由来である。

【0091】

本発明のこの局面の別の実施形態によれば、間葉系幹細胞はヒトの新生児の胎盤および臍帯から単離される。

【0092】

骨髓を吸引によって個体の腸骨稜から単離することができる。低密度BM単核細胞(BMMNC)が、FICOLL-PAQUE密度勾配によって、またはHetastarch(ヒドロキシエチルデンプン)を使用する赤血球の除去によって分離される場合がある。好ましくは、間葉系幹細胞の培養物が、BM吸引物(通常的には20ml)を等体積のハンクス平衡塩類溶液(HBSS; GIBCO Laboratories、Grand Island、NY、米国)により希釈し、希釈された細胞を約10mlのFicollカラム(Ficoll-Paque; Pharmacia、Piscataway、NJ、米国)の上に重層することによって作製される。2500×gでの遠心分離を30分間行った後、単核細胞層が境界から取り出され、HBSSに懸濁される。その後、細胞が1500×gで15分間遠心分離され、完全培地(MEM、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含まない培地; GIBCO)、MSCの迅速成長のために選択されたロットに由来する20%のウシ胎児血清(FCS)(Atlanta Biologicals、Norcross、GA)、100ユニット/mlのペニシリン(GIBCO)、100μg/mlのストレプトマイシン(GIBCO)、および2mMのL-グルタミン(GIBCO)に再懸濁される。再懸濁された細胞が10cmの培養ディッシュ(Corning Glass Works、Corning、NY)において約25mlの培地に置床され、5%の加湿CO₂とともに37℃でインキュベーションされる。培養で24時間の後、非接着性細胞が捨てられ、接着性細胞がリン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)により2回徹底的に洗浄される。培地が、3日毎または4日毎に約14日間、新鮮な完全培地により取り換えられる。その後、接着性細胞が、0.25%のトリプシンおよび1mMのEDTA(トリプシン/EDTA、GIBCO)を37℃で5分間用いて

30

40

50

集められ、6 cmのプレートに再置床され、さらに14日間培養される。その後、細胞がトリプシン処理され、細胞計数デバイス、例えば、血球計 (Hausser Scientific、Horsham、PA) などを使用して計数される。培養細胞が遠心分離によって回収され、5 % DMSOおよび30 % FCSとともに、1 mlあたり $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の濃度で再懸濁される。それぞれが約1 mlのアリコートが緩速凍結され、液体窒素において貯蔵される。

【0093】

脂肪組織由来のMSCを脂肪吸引によって得ることができ、また、単核細胞を、脂肪および脂肪細胞を除くことによって手作業で、またはCelution System (Cytori Therapeutics) をMSCの調製のために上記で記載されるのと同じ手順に従って使用して単離することができる。

10

【0094】

1つの実施形態によれば、集団が(例えば、フラスコにおいて)ポリスチレンプラスチック表面に置床され、間葉系幹細胞が、非接着性細胞を除くことによって単離される。代替では、間葉系幹細胞が、間葉系幹細胞のマーカーを使用してFACSによって単離される場合がある。

【0095】

好ましくは、MSCは少なくとも50 %精製され、より好ましくは少なくとも75 %精製され、一層より好ましくは少なくとも90 %精製される。

【0096】

間葉系幹細胞画分を拡大するために、凍結された細胞が37 °Cで解凍され、完全培地により希釈され、DMSOを除くために遠心分離によって回収される。細胞が完全培地に再懸濁され、約5000細胞/cm²の濃度で置床される。培養で24時間の後、非接着性細胞が除かれ、接着性細胞が、トリプシン/EDTAを使用して集められ、狭くしたパスツールピペットに通すことによって解離させられ、好ましくは、約1.5 ~ 約3.0細胞/cm²の密度で再置床される。これらの条件のもとで、MSC培養物は約50回の集団倍加にわたって成長することができ、約2000倍にわたって拡大させることができる [Colter DC他、Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow、Proc Natl Acad Sci USA、97:3213~3218、2000]。

20

30

【0097】

本発明のいくつかの実施形態によって利用されるMSC培養物には好ましくは、それらの形態学的特徴によって定義される3つの群の細胞、すなわち、小さい無顆粒細胞(これらは本明細書中下記ではRS-1として示される)、小さい顆粒細胞(これらは本明細書中下記ではRS-2として示される)、および大きい適度な顆粒細胞(これらは本明細書中下記では成熟MSCとして示される)が含まれる。培養におけるそのような細胞の存在および濃度を、例えば、免疫蛍光、インサイチューハイブリダイゼーションおよび活性アッセイを使用することにより、様々な細胞表面マーカーの存在の有無を特定することによってアッセイすることができる。

40

【0098】

MSCが本発明のいくつかの実施形態の培養条件のもとで培養されるとき、MSCは、造血幹細胞マーカーであるCD34、CD11B、CD43およびCD45については陰性の染色を示す。小さい割合の細胞(10 %未満)がCD31および/またはCD38のマーカーについてかすかに陽性である。加えて、成熟MSCは、造血幹細胞マーカーであるCD117(c-Kit)についてかすかに陽性であり、骨形成MSCのマーカーであるStro-1について中程度に陽性であり [Simmons, P. J. & Torok-Storb, B. (1991)、Blood、78、5562]、かつ、胸腺細胞および末梢Tリンパ球のマーカーであるCD90(Thy-1)について陽性である。他方で、RS-1細胞はCD117およびStro1のマーカーについて陰性であり、かつ、CD

50

90のマーカ-についてかすかに陽性であり、RS-2細胞はこれらのマーカ-のすべてについて陰性である。

【0099】

本発明の間葉系幹細胞は、本明細書中下記でさらに記載されるように、自己、同系または同種の血縁者の供給源（一致した兄弟姉妹またはハプロタイプ一致の家族の一員）あるいは非血縁者の全く一致していない供給源のものである場合がある。

【0100】

間葉系幹細胞の培養を、米国特許第6,528,245号およびSanchez-Ramos他(2000);Woodburr y他(2000);Woodburr y他(J.Neurisci.Res.96:908-917,2001);BlackおよびWoodbury(Blood Cells Mol.Dis.27:632-635,2001);Deng他(2001),Kohyama他(2001),ReyesおよびVerfatile(Ann.N.Y.Acad.Sci.938:231-235,2001)およびJiang他(Nature 418:47-49,2002)に記載されたもののような神経幹細胞分化を支援する（または、神経幹細胞分化を少なくとも妨げない）任意の培地において行うことができる。

【0101】

分化用培地は、G5、神経基礎培地、DMEMまたはDMEM/F12、OptiMEM（商標）、あるいは、ニューロンの成長を支援する任意の他の培地である場合がある。

【0102】

述べられたように、間葉系幹細胞は、神経幹細胞への分化を誘導するために下記のmiRNAの少なくとも1つと（エキスピボまたはインピボのどちらかで）接触させられる：miR302b,miR-371,miR-134,miR-219,miR-154,miR-155,miR-32,miR-33,miR-126,miR-127,miR-132,miR-137,miR-572,miR-935a,miR-891a,miR-1202,miR-1275,let-7c,miR-665,miR-4258,miR-361-3p,miR-374a-star,miR-892b,miR-361-5p,miR-181a,miR-16,miR-636,miR-4284,miR-1208,miR-1274b,miR-30c-2-star,miR-501-3p,hsa-miR-92a,miR-378b,miR-1287,miR-425-star,miR-324-5p,miR-3178,miR-219-1-3p,miR-197,miR-181b,miR-500-star,miR-106b,miR-502-3p,miR-30c,miR-1275,miR-422a,miR-93,miR-181d,miR-1307,miR-1301,miR-99a,miR-505-star,miR-1202,miR-12,miR-532-5p,miR-195,miR-532-3p,miR-106a,miR-17,miR-1271,miR-769-3p,miR-15b,miR-324-3p,miR-20a,miR-501-5p,miR-330-3p,miR-874,miR-500miR-25,miR-769-5p,miR-125b-2-star,miR-130b,miR-504,miR-181a-2-star,miR-885-3p,miR-1246,miR-92b,miR-362-5p,miR-572,miR-4270,miR-378c,miR-93-star,miR-149,miR-363,miR-18a,miR-891a,miR-346,miR-497,miR-378,miR-1231,miR-139-5p,miR-3180-3p,miR-935およびmiR-20b。

【0103】

特定の実施形態によれば、上記miRNAは、miR302b,miR-371,miR-134,miR-219,miR-154,miR-155,miR-32,miR-33,miR-126,miR-127,miR-132からなる群から選択される。

【0104】

10

20

30

40

50

別の実施形態によれば、上記miRNAは、miR-20b、miR-925、miR-891およびmiR-378からなる群から選択される。

【0105】

本発明ではまた、特定のmiRNA、すなわち、miR-10b、miR-142-3p、miR-131a、miR-125b、miR-153およびmiR-181aのダウンレギュレーションによって間葉系幹細胞を神経幹細胞表現型に向けて分化させることが意図される。

【0106】

本発明者らは、MSCを神経幹細胞表現型に向けて分化させるためのさらなるmiRNAのダウンレギュレーションを意図する。これらのmiRNAは、miR-409-5p、miR-193a-5p、miR-4317、miR-4288、miR-145、miR-143、miR-214、miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p、miR-138、miR-31、miR-21、miR-193a-5p、miR-224-star、miR-196a、miR-487b、miR-409-5p、miR-193b-star、miR-379、miR-21-star、miR-27a-star、miR-27a、miR-4317、miR-193b、miR-27b、miR-22、574-3p、miR-4288、miR-23a、miR-221-star、miR-2113、let-7i、miR-24、miR-23b、miR-299-3p、miR-518c-star、miR-221、miR-431-star、miR-523、miR-4313、miR-559、miR-614、miR-653、miR-2278、miR-768-5p、miR-154-star、miR-302a-star、miR-3199およびmiR-3137を含む。

【0107】

特定の実施形態によれば、ダウンレギュレーションされることとなるmiRNAが、miR-138、miR-214、miR-199aおよびmiR-199bからなる群から選択される。

【0108】

そのようなmiRNAをダウンレギュレーションすることを、当該miRNAに対して生理学的条件下での細胞においてハイブリダイゼーション可能であるポリヌクレオチドを使用して実行させることができる。

【0109】

特定の実施形態によれば、細胞集団が、miR-124の間葉系幹細胞(MSC)における発現をアップレギュレーションし、一方で、同時に、miR-let-7のMSCの当該集団における発現をダウンレギュレーションすることによって作製される。

【0110】

特定の実施形態によれば、細胞集団が、miR-891の間葉系幹細胞(MSC)における発現をダウンレギュレーションし、一方で、同時に、miR-138のMSCの当該集団における発現をダウンレギュレーションすることによって作製される。

【0111】

特定の実施形態によれば、細胞集団が、miR-20bの間葉系幹細胞(MSC)における発現をアップレギュレーションし、一方で、同時に、miR-138のMSCの当該集団における発現をダウンレギュレーションすることによって作製される。

【0112】

特定の実施形態によれば、細胞集団が、miR-378の間葉系幹細胞(MSC)における発現をアップレギュレーションし、一方で、同時に、miR-138のMSCの当該集団における発現をダウンレギュレーションすることによって作製される。

【0113】

本明細書中で使用される場合、用語「ハイブリダイゼーション可能(な)」は、ハイブリダイゼーションすることができること、すなわち、二本鎖分子(例えば、RNA:RNA、RNA:DNAおよび/またはDNA:DNA分子など)を形成できることを示す。

10

20

30

40

50

「生理学的条件」は、細胞、組織あるいは完全な生物体または細胞体に存在する条件を示す。好ましくは、本発明によって使用される生理学的条件には、34 ~ 40 の間の温度、より好ましくは35 ~ 38 の間の温度、より好ましくは36 ~ 37.5 の間の温度、最も好ましくは37 ~ 37.5 の間の温度；0.8% ~ 1%の間、より好ましくは約0.9%の塩濃度（例えば、塩化ナトリウムNaCl）；および/または、6.5 ~ 8の範囲でのpH値、より好ましくは6.5 ~ 7.5、最も好ましくは7 ~ 7.5の範囲でのpH値が含まれる。

【0114】

述べられたように、本発明者らはまた、特定のmiRNAを神経幹細胞において操作したとき、運動ニューロンマーカーを発現する細胞が生じることがあることを発見している。

10

【0115】

したがって、本発明の別の局面によれば、神経幹細胞の運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR-368、miR-302b、miR-365-3p、miR-365-5p、miR-Let-7a、miR-Let-7b、miR-218、miR-134、miR-124、miR-125a、miR-9、miR-154、miR-20aおよびmiR-130aからなる群から選択される少なくとも1つの外因性miRNAの神経幹細胞（NSC）におけるレベルをアップレギュレーションすることを含む方法が提供される。

【0116】

本発明のこの局面の神経幹細胞は、神経細胞のいずれの特定のタイプ（例えば、限定されずにニューロン細胞タイプおよびグリア細胞タイプ）にも決定されていない非拘束の神経幹細胞である場合がある。好ましくは、これらの細胞は、神経系の運命を受け入れる潜在的能力を有する。代替において、神経幹細胞は特定の神経細胞タイプ（例えば、運動ニューロンなど）に決定されている場合があり、しかし、最終分化のマーカーを発現/分泌せず、例えば、神経伝達物質を分泌しない。

20

【0117】

特定の実施形態によれば、神経幹細胞はネスチンおよび/またはSOX-2の少なくとも1つを発現する。さらなるマーカーには、SOX1、SOX3、PSA-NCAMおよびMUSASHI-1が含まれる。マーカーの発現を確認する様々な方法が本明細書中下記で提供される。「神経ロゼット」の形成が神経幹細胞形成のもう1つの形態学的マーカーである。

30

【0118】

1つの実施形態によれば、神経幹細胞が、間葉系幹細胞または胚性幹細胞（もしくは誘導された胚性幹細胞）のエキスピボ分化によって作製されている。

【0119】

間葉系幹細胞が本明細書中上記で記載されている。数多くの方法が、MSCを神経幹細胞の運命に向かって分化させるために当技術分野で公知であり、これらには、遺伝子改変、および/または、そのような運命に向かう分化を促進させる培地で培養することが含まれる。培地は典型的には、上皮増殖因子（EGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）（これらに限定されない）を含めて様々な増殖因子および/またはサイトカインを含む。典型的には、分化が血清非含有培地または血清代替物において実行される。

40

【0120】

特定の実施形態によれば、NSCが、本明細書中上記で記載されるように、外因性miRNAを発現するようにMSCを遺伝子改変することによって作製される。

【0121】

表現「胚性幹細胞」は、胚の3つすべての胚葉（すなわち、内胚葉、外胚葉および中胚葉）の細胞に分化することができるか、または、未分化状態に留まることができる胚性細胞を示す。表現「胚性幹細胞」は、妊娠後に形成される胚組織（例えば、胚盤胞）で、胚が着床する前の胚組織（すなわち、着床前胚盤胞）から得られる細胞、着床後/原腸形成

50

前の段階の胚盤胞から得られる拡大胚盤胞細胞（EBC）（国際公開WO2006/040763を参照のこと）、および、妊娠期間中の任意の時期に、好ましくは妊娠10週目前に胎児の生殖組織から得られる胚性生殖（EG）細胞を含む場合がある。

【0122】

誘導多能性幹細胞（iPS；胚性様幹細胞）は、多能性が付与される（すなわち、胚の3つの胚細胞層、すなわち、内胚葉、外胚葉および中胚葉に分化することができる）、成体体細胞の脱分化によって得られる細胞である。本発明のいくつかの実施形態によれば、そのような細胞が、分化した組織（例えば、皮膚などの体細胞組織）から得られ、胚性幹細胞の特徴を獲得するために細胞を初期化する遺伝子操作による脱分化を受ける。本発明のいくつかの実施形態によれば、誘導多能性幹細胞が、Oct-4、Sox2、Kf14およびc-My cの発現を体性幹細胞において誘導することによって形成される。

10

【0123】

本発明のいくつかの実施形態の胚性幹細胞は、周知の細胞培養法を使用して得ることができる。例えば、ヒト胚性幹細胞をヒトの胚盤胞から単離することができる。ヒトの胚盤胞が典型的には、ヒトの体内の着床前の胚から、または、体外受精（IVF）の胚から得られる。代替では、単細胞のヒト胚を胚盤胞段階に拡大することができる。ヒトES細胞の単離のために、透明帯が胚盤胞から除かれ、内部細胞塊（ICM）が、栄養外胚葉細胞が溶解され、穏やかなピペッティングによって無傷のICMから除かれる免疫手術によって単離される。その後、ICMが、その伸長成長を可能にする適切な培地を含有する組織培養フラスコに置床される。9日～15日後、ICM由来の伸長成長物が機械的解離または酵素的解離のどちらかによって凝集塊に解離され、その後、細胞が、新鮮な組織培養培地に再置床される。未分化の形態学を明らかにするコロニーがマイクロピペットによって個々に選択され、機械的に凝集塊に解離され、再置床される。その後、生じたES細胞が4日毎～7日毎に常法により分割される。ヒトES細胞を調製する方法に関するさらなる詳細については、下記を参照のこと：Thomson他[米国特許第5843780号；Science、282：1145、1998；Curr. Top. Dev. Biol.、38：133、1998；Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92：7844、1995]、Bongs o他[Hum Reprod、4：706、1989]、および、Gardner他[Fertil. Steril.、69：84、1998]。

20

30

【0124】

市販されている幹細胞もまた、本発明のいくつかの実施形態のこの局面とともに使用され得ることが理解されるであろう。ヒトES細胞をNIHヒト胚性幹細胞登録所（www.escr.nih.gov）から購入することができる。市販されている胚性幹細胞株の限定されない例には、BG01、BG02、BG03、BG04、CY12、CY30、CY92、CY10、TE03およびTE32がある。

【0125】

加えて、ES細胞は、マウス（Mills and Bradley, 2001）、ゴールドンハムスター[Doetschman他, 1988, Dev Biol. 127：224-7]、ラット[Iannaccone他, 1994, Dev Biol. 163：288-92]、ウサギ[Giles他, 1993, Mol Reprod Dev. 36：130-8；Graves & Moreadith, 1993, Mol Reprod Dev. 1993, 36：424-33]、幾つかの家畜種[Notarian ni他, 1991, J Reprod Fertil Suppl. 43：255-60；Wheeler 1994, Reprod Fertil Dev. 6：563-8；Mitalipova他, 2001, Cloning. 3：59-67]および非ヒト霊長類の種（赤毛猿およびマーモセット）[Thomson他, 1995, Proc Natl Acad Sci U S A. 92：7844-8；Thomson他, 1996, Biol Reprod. 55：254-9]を含む他の種から同様に得られることができる。

40

50

【0126】

誘導多能性幹細胞 (iPS) (胚性様幹細胞) を、体細胞の遺伝子操作によって、例えば、体細胞 (例えば、線維芽細胞、肝細胞、胃上皮細胞など) の転写因子 (例えば、Oct-3/4、Sox-2、c-Myc および KLF4 など) によるレトロウイルス形質導入によって体細胞から作製することができる [Yamanaka S、Cell Stem Cell、2007、1(1):39~49; Aoi T 他、Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells、Science、2008 Feb 14 (印刷に先立つ Epub); IH Park、Zhao R、West JA 他、Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors、Nature、2008、451:141~146; K Takahashi、Tanabe K、Ohnuki M 他、Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors、Cell、2007、131:861~872]。他の胚性様幹細胞を、レシピエント細胞が有糸分裂で停止させられるならば、卵母細胞への核移入、胚性幹細胞との融合、または、接合体への核移入によって作製することができる。

10

【0127】

神経幹細胞を ESC または iPS 細胞から作製する様々な方法が当技術分野で公知であり、これらには、例えば、胚様体を介して分化を誘導する方法、および、接着性培養を介して分化を誘導する方法が含まれる。ESC をニューロンの運命に向かって分化させるための特定のプロトコルが、Dhara 他、Journal of Cellular Biochemistry、105:633~640 (2008) に総説される (その内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。多くの他の方法が、ESC、iPSC および MSC をニューロン幹細胞に向かって分化させることが公知であり、本出願では、これらすべての方法の使用が意図されることが理解されるであろう。

20

【0128】

本発明のニューロン幹細胞は、自己、同系または同種の血縁者供給源 (一致した兄弟姉妹またはハプロタイプ一致の家族の一員) あるいは非血縁者の全く一致していない供給源のものである場合がある。

30

【0129】

ニューロン幹細胞の培養を、神経幹細胞分化を支援する任意の培地において行うことができる (そのような培地の例が本明細書中上記で記載される)。

【0130】

述べられたように、神経幹細胞は、運動ニューロン細胞系への分化を誘導するために下記の miRNA の少なくとも1つと (エキスピボまたはインピボのどちらかで) 接触させられる: miR-368, miR-302b, miR-365-3p, miR-365-5p, miR-Let-7a, miR-Let-7b, miR-218, miR-134, miR-124, miR-125a, miR-9, miR-154, miR-20a および miR-130a。

40

【0131】

本発明ではまた、特定の miRNA (すなわち、miR-372, miR-373, miR-141, miR-199a, miR-32, miR-33, miR-221 および miR-223) のダウンレギュレーションによって神経幹細胞の運動ニューロン表現型への分化が意図される。

【0132】

そのような miRNA をダウンレギュレーションすることを、当該 miRNA 分子に対して生理学的条件下での細胞においてハイブリダイゼーション可能であるポリヌクレオチドを使用して実行させることができる。

50

【 0 1 3 3 】

特定の実施形態によれば、細胞集団が、mi R - L e t - 7 a、mi R - 1 2 4、mi R - 3 6 8 および mi R - 1 5 4 のそれぞれの発現を神経幹細胞においてアップレギュレーションすることによって作製される。

【 0 1 3 4 】

特定の実施形態によれば、細胞集団が、mi R - 1 2 5 a、mi R - 9 および mi R - 1 3 0 a のそれぞれの発現を神経幹細胞においてアップレギュレーションすることによって作製される。

【 0 1 3 5 】

さらに別の実施形態によれば、細胞集団が、mi R - 2 1 8 , mi R - 1 3 4 および mi R - 2 0 a のそれぞれの発現をアップレギュレーションすることによって作製される。

【 0 1 3 6 】

本発明者らはさらに、運動ニューロン表現型に向かう分化を強化するために、本明細書中上記で記載される方法のいずれかに加えて、mi R - 1 4 1、mi R - 3 2、mi R - 3 3、mi R - 2 2 1、mi R - 2 2 3 および mi R - 3 7 3 のそれぞれをダウンレギュレーションすることを意図する。

【 0 1 3 7 】

間葉系幹細胞を、O l i g 2 および H B 9 を過剰発現させることによって運動ニューロンに分化させた。本発明者らは、分化細胞および非分化細胞に対するmi RNA アレイ分析を行い、(3 倍を超える) 統計学的に有意な様式で過剰発現された多数のmi RNA、および、(3 倍を超える) 統計学的に有意な様式でダウンレギュレーションされた多数のmi RNA を見出した。本発明者らは、発現が分化細胞において増大したmi RNA が、運動ニューロンをMSCから作製するための過剰発現の候補であり得ることを意図する。本発明者らは、発現が分化細胞において低下したmi RNA が、運動ニューロンをMSCから作製するためのダウンレギュレーションの候補であることを意図する。

【 0 1 3 8 】

したがって、本発明のさらに別の局面によれば、MSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、mi R - 3 6 8 , mi R - 3 6 5 , mi R - 5 0 0 , mi R - 6 4 8 , mi R - 4 9 1 , mi R - 2 1 8 , mi R - 1 5 5 , mi R - 1 9 2 , l e t - 7 b , mi R - 1 6 , mi R - 2 1 0 , mi R - 1 9 7 , mi R - 2 1 , mi R - 3 7 3 , mi R - 2 7 a , mi R - 1 2 2 , mi R - 1 7 , mi R - 4 9 4 , mi R - 4 4 9 , mi R - 5 0 3 , mi R - 3 0 a , mi R - 1 9 6 a , mi R - 1 2 2 , mi R - 7 , mi R - 1 5 1 - 5 p , mi R - 1 6 , mi R - 2 2 , mi R - 3 1 , mi R - 4 2 4 , mi R - 1 , mi R - 2 9 c , mi R - 9 4 2 , mi R - 1 0 0 , mi R - 5 2 0 , mi R - 6 6 3 a , mi R - 5 6 2 , mi R - 4 4 9 a , mi R - 4 4 9 b - 5 p , mi R - 5 2 0 b , mi R - 4 5 1 , mi R - 5 3 2 - 5 9 , mi R - 6 0 5 , mi R - 5 0 4 , mi R - 5 0 3 , mi R - 1 5 5 , mi R - 3 4 a , mi R - 1 6 , mi R - 7 b , mi R - 1 0 3 , mi R - 1 2 4 , mi R - 1 3 8 5 p , mi R - 1 6 , mi R - 3 3 0 , mi R - 5 2 0 , mi R - 6 0 8 , mi R - 7 0 8 , mi R - 1 0 7 , mi R - 1 3 7 , mi R - 1 3 2 , mi R - 1 4 5 , mi R - 2 0 4 , mi R - 1 2 5 b , mi R - 2 2 4 , mi R - 3 0 a , mi R - 3 7 5 , mi R - 1 0 1 , mi R - 1 0 6 b , mi R - 1 2 8 , mi R - 1 2 9 - 5 p , mi R - 1 5 3 , mi R - 2 0 3 , mi R - 2 1 4 , mi R - 3 3 8 - 3 p , mi R - 3 4 6 , mi R - 9 8 , mi R - 1 0 7 , mi R - 1 4 1 , mi R - 2 1 7 , mi R - 4 2 4 , mi R - 4 4 9 , mi R - 7 , mi R - 9 , mi R - 9 3 , mi R - 9 9 a , mi R - 1 0 0 , mi R - 1 2 2 8 , mi R - 1 8 3 , mi R - 1 8 5 , mi R - 1 9 0 , mi R - 5 2 2 , mi R - 6 5 0 , mi R - 6 7 5 , mi R - 3 4 2 - 3 p , mi R - 3 1 からなる群から選択される少なくとも1つの外因性mi RNA の前記間葉系幹細胞 (M S C) におけるレベルをアップレギュレーションすることを含む方法が提供される。

【 0 1 3 9 】

本発明のさらに別の局面によれば、MSCの運動ニューロンへの分化を促す方法であって、miR-199a, miR-372, miR-373, miR-942, miR-2113, miR-301a-3p, miR-302c, miR-30b-5p, miR-30c, miR-326, miR-328, miR-331-3p, miR-340, miR-345, miR-361-5p, miR-363, miR-365a-3p, miR-371a-3p, miR-373-3p, miR-374a, miR-423-3p, miR-449b-5p, miR-451a, miR-494, miR-504, miR-515-3p, miR-516a-3p, miR-519e, miR-520a-3p, miR-520c-3p, miR-520g, miR-532-5p, miR-559, miR-562, miR-572, miR-590-5p, miR-605, miR-608, miR-626, miR-639, miR-654-3p, miR-657, miR-661, miR-708-5p, miR-942, miR-96, miR-99a r n o および miR-194 からなる群から選択される少なくとも1つのmiRNAの発現を、前記少なくとも1つのmiRNAにハイブリダイゼーションし、かつ、その機能を阻害する少なくとも1つのポリヌクレオチド作用因の前記MSCにおけるレベルをアップレギュレーションすることによってダウンレギュレーションし、それにより、MSCの前記運動ニューロンへの分化を促すことを含む方法が提供される。

10

【0140】

用語「マイクロRNA」、用語「miRNA」および用語「miR」は同義的であり、遺伝子発現を調節する、長さが約19~28ヌクレオチドである非コードの一本鎖RNA分子の集まりを示す。様々なmiRNAが広範囲の生物において見出され、発達、恒常性および疾患原因において役割を果たすことが示されている。

20

【0141】

下記はmiRNA活性の機構の簡単な記載である。

【0142】

miRNAをコードする遺伝子が転写され、これにより、プリ-miRNAとして公知のmiRNA前駆体の産生がもたらされる。プリ-miRNAは典型的には、多数のプリ-miRNAを含む多シストロン性RNAの一部である。プリ-miRNAは、ステム/ループを有するヘアピンを形成する場合がある。ステムはミスマッチの塩基を含む場合がある。

30

【0143】

プリ-miRNAのヘアピン構造が、RNase III エンドヌクレアーゼであるDroshaによって認識される。Droshaは典型的には、プリ-miRNAにおける末端のループを認識し、およそ2回のらせん状ターンをステムに切断して、プレ-miRNAとして公知の60~70 ntの前駆体を生じさせる。Droshaは、RNase III エンドヌクレアーゼに典型的な互い違いの切れ目を伴ってプリ-miRNAを切断し、これにより、5'ホスファートおよび約2ヌクレオチドの3'突出を有するプレ-miRNAのステム・ループをもたらす。ステムのおよそ1回のらせん状ターン(約10ヌクレオチド)がDrosha切断部位を越えて伸びることが、効率的なプロセシングのために必須であることが推定されている。その後、プレ-miRNAが、Ran-GTPおよび輸出受容体エクスポートン-5によって核から細胞質に能動輸送される。

40

【0144】

その後、プレ-miRNAの二本鎖ステムがDicerによって認識される(Dicerもまた、RNase III エンドヌクレアーゼである)。Dicerはまた、ステム・ループの塩基において5'ホスファートおよび3'突出を認識する場合がある。その場合、Dicerは末端ループをステム・ループの塩基から2回のらせん状ターン離れて切断し、これにより、さらなる5'ホスファートおよび約2ヌクレオチドの3'突出を残す。生じたsiRNA様二重鎖はミスマッチを含む場合があり、成熟miRNAと、miRNA*として公知の類似サイズの断片とを含む。miRNAおよびmiRNA*が、プリ-miRNAおよびプレ-miRNAの相対するアームに由来する場合がある。miRNA

50

* 配列が、典型的にはmiRNAよりも低い頻度ではあるが、クローン化されたmiRNAのライブラリーにおいて見出される場合がある。

【0145】

最初はmiRNA*との二本鎖の種として存在するにもかかわらず、miRNAは最終的には、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)として公知のリボ核タンパク質複合体の中に一本鎖RNAとして取り込まれる。様々なタンパク質がRISCを形成することができ、このことは、miRNA/miRNA*二重鎖に対する特異性、標的遺伝子の結合部位、miRNAの活性(抑制するか、または活性化する)、およびmiRNA/miRNA*二重鎖のどの鎖がRISCに入るかにおける変動性をもたらすことができる。

【0146】

miRNA:miRNA*二重鎖のmiRNA鎖がRISCに入るとき、miRNA*は除かれ、分解される。RISCに入るmiRNA:miRNA*二重鎖の鎖は、5'末端がそれほど強固に対形成しない方の鎖である。miRNA:miRNA*の両末端がほぼ同等な5'対形成を有する場合には、miRNAおよびmiRNA*の両方が遺伝子サイレンシング活性を有する場合がある。

【0147】

RISCは、標的核酸を、miRNAとmRNAとの間における大きいレベルの相補性に基づいて、とりわけ、miRNAの2~7番目のヌクレオチドによる相補性に基づいて特定する。

【0148】

数多くの研究が、翻訳の効率的な阻害を達成するための、miRNAとそのmRNA標的との間における塩基対形成要件を調べている(これらがBartel(2004、Cell 116-281)によって総説される)。哺乳動物細胞では、miRNAの最初の8ヌクレオチドが重要であり得る(Doench&Sharp、2004、Genes Dev、2004-504)。しかしながら、マイクロRNAの他の部分もまた、mRNA結合に関与する場合がある。そのうえ、3'における十分な塩基対形成は5'における不十分な対形成を補うことができる(Brennecke他、2005、PLoS、3-e85)。コンピューター計算研究では、ゲノム全体に対するmiRNA結合が分析された場合、標的結合におけるmiRNAの5'での2~7番目の塩基に特異的な役割が示唆されており、しかし、通常では「A」であることが見出される最初のヌクレオチドの役割もまた認められた(Lewis他、2005、Cell、120-15)。同様に、1~7番目のヌクレオチドまたは2~8番目のヌクレオチドが、Krek他(2005、Nat Genet、37-495)によって、標的を特定し、検証するために使用された。

【0149】

mRNAにおける標的部位が、5'UTR、3'UTRまたはコード領域に存在する場合がある。興味深いことに、多数のmiRNAが、同じ部位または多数の部位を認識することによって同じmRNA標的を調節する場合がある。多数のmiRNA結合部位がほとんどの遺伝子的に特定された標的に存在することは、多数のRISCの協同作用により、最も効率的な翻訳阻害をもたらされることを示し得る。

【0150】

miRNAが、RISCに、遺伝子発現を2つの機構、すなわち、mRNA切断または翻訳抑制のどちらかによってダウンレギュレーションさせる場合がある。mRNAが、ある特定の程度の相補性をmiRNAに対して有するならば、miRNAにより、mRNAの切断が規定される場合がある。miRNAが切断を導くとき、切れ目は典型的には、miRNAの10番目および11番目の残基に対するヌクレオチド対形成の間である。代替では、miRNAが、必要な程度の相補性をmiRNAに対して有していないならば、miRNAにより、翻訳が抑制される場合がある。翻訳抑制が動物においてより多く見られる場合がある。これは、動物は、より低い程度の相補性をmiRNAと結合部位との間に有する場合があるからである。

【0151】

どのmiRNAおよびmiRNA*の対の5'末端および3'末端にも、変動性が存在し得ることに留意しなければならない。この変動性は、切断部位に関するDroshaおよびDicerの酵素プロセッシングにおける変動性に起因する場合がある。miRNAおよびmiRNA*の5'末端および3'末端における変動性はまた、プリ-miRNAおよびプレ-miRNAのステム構造におけるミスマッチに起因する場合がある。ステム鎖のミスマッチにより、異なるヘアピン構造の集団がもたらされる場合がある。ステム構造における変動性はまた、DroshaおよびDicerによる切断の生成物における変動性をもたらす場合がある。

【0152】

用語「マイクロRNA模倣体」は、RNAi経路に入り、遺伝子発現を調節することができる合成された非コードRNAを示す。miRNA模倣体は内因性マイクロRNA(miRNA)の機能を模倣しており、成熟型二本鎖分子または模倣体前駆体(例えば、またはプレ-miRNA)として設計することができる。miRNA模倣体は、修飾された、または修飾されていないRNA、DNA、RNA-DNAハイブリッドまたは代替となり得る核酸化学(例えば、LNAまたは2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸(ENA))から構成され得る。他の修飾体が本明細書中下記に記載される。成熟型二本鎖miRNA模倣体については、二重鎖領域の長さが、13~33ヌクレオチドの間、1824ヌクレオチドの間、または21~23ヌクレオチドの間で変化し得る。miRNAはまた、合計で少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個のヌクレオチドを含む場合がある。miRNAの配列はプレ-miRNAの最初の13~33ヌクレオチドである場合がある。miRNAの配列はまた、プレ-miRNAの最後の13ヌクレオチド~33ヌクレオチドである場合がある。miRNAの配列は本明細書中に記載された配列のいずれか、またはその変化体を含む場合がある。

【0153】

間葉系幹細胞を接触することが下記のいくつかの方法で実行される場合があることが、本明細書中に提供される説明から理解されるであろう：

1. 間葉系幹細胞を成熟型miRNA(または本明細書中下記に記載されるように改変形態)により一過性にトランスフェクションすること。本発明の教示に従って設計されるmiRNAは、酵素的合成および固相合成の両方を含めて、当技術分野で公知の任意のオリゴヌクレオチド合成法に従って作製することができる。固相合成を実行するための様々な設備および試薬が、例えば、Applied Biosystemsから市販されている。そのような合成のための任意の他の手段もまた用いることができる；オリゴヌクレオチドの実際の合成は十分に当業者の能力の範囲内であり、固相化学(例えば、シアノエチルホスホルアミダイト)、その後、脱保護、脱塩および精製(例えば、自動トリチル・オン法またはHPLCによる精製)を利用して、例えば、下記において詳しく記載されるような確立された方法論により達成することができる：Sambrook, J. および Russell, D. W. (2001)、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. 他編(1994、1989)、"Current Protocols in Molecular Biology"、第I巻~第III巻、John Wiley & Sons、Baltimore、Maryland; Perbal, B. (1988)、"A Practical Guide to Molecular Cloning"、John Wiley & Sons、New York; および Gait, M. J. 編(1984)、"Oligonucleotide Synthesis"。

2. 間葉系幹細胞を、成熟型miRNAをコードする発現ベクターにより、またはmiRNA模倣体により安定的または一過性にトランスフェクションすること。

3. 間葉系幹細胞を、プレ-miRNAをコードする発現ベクターにより安定的または一過性にトランスフェクションすること。プレ-miRNA配列は、45~90ヌクレオ

チド、60～80ヌクレオチド、または60～70ヌクレオチドを含む場合がある。プレ-miRNAの配列は、本明細書中に示されるようなmiRNAおよびmiRNA*を含む場合がある。プレ-miRNAの配列はまた、プリ-miRNAの5'末端および3'末端から0～160個のヌクレオチドを除外するプリ-miRNAの配列である場合がある。プレ-miRNAの配列はmiRNAの配列、またはその変化体を含む場合がある。

4. 間葉系幹細胞を、プリ-miRNAをコードする発現ベクターにより安定的または一過性にトランスフェクションすること。プリ-miRNA配列は、45～30000ヌクレオチド、50～25000ヌクレオチド、100～20000ヌクレオチド、1000～1500ヌクレオチド、または80～100ヌクレオチドを含む場合がある。プリ-miRNAの配列は、本明細書中に示されるようにプレ-miRNA、miRNAおよびmiRNA*、ならびに、それらの変化体を含む場合がある。miRNA模倣体の調製を化学的合成法によって、または、組換え法によって行うことができる。

【0154】

miRNAアンタゴニストが、siRNAまたは発現ベクター（例えば、Antagomirなど）のどちらかを使用する当技術分野で公知のトランスフェクションプロトコルを使用して細胞に導入される場合がある。

【0155】

本明細書中上記で述べられたように、本明細書中に記載されるmiRNAをダウンレギュレーションするポリヌクレオチドが、当技術分野で公知の様々な方法を使用して、修飾ポリヌクレオチドとして提供される場合がある。

【0156】

例えば、本発明のオリゴヌクレオチド（例えば、miRNA）またはポリヌクレオチドは、3'から5'へのホスホジエステル連結で結合する、プリン塩基およびピリミジン塩基からなる複素環式ヌクレオシドを含む場合がある。

【0157】

好ましく使用されるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、本明細書中下記で幅広く記載されるように、骨格、ヌクレオシド間連結または塩基のいずれにおいても改変されるものである。

【0158】

本発明のこの局面に従って有用である好ましいオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの具体的な例には、修飾された骨格または非天然型のヌクレオシド間連結を含有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが含まれる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドには、米国特許第4,469,863号；米国特許第4,476,301号；米国特許第5,023,243号；米国特許第5,177,196号；米国特許第5,188,897号；米国特許第5,264,423号；米国特許第5,276,019号；米国特許第5,278,302号；米国特許第5,286,717号；米国特許第5,321,131号；米国特許第5,399,676号；米国特許第5,405,939号；米国特許第5,453,496号；米国特許第5,455,233号；米国特許第5,466,677号；米国特許第5,476,925号；米国特許第5,519,126号；米国特許第5,536,821号；米国特許第5,541,306号；米国特許第5,550,111号；米国特許第5,563,253号；米国特許第5,571,799号；米国特許第5,587,361号；および米国特許第5,625,050号に開示されるように、リン原子を骨格に保持するものが含まれる。

【0159】

好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格または修飾ポリヌクレオチド骨格には、例えば、ホスホロチオアート；キラルなホスホロチオアート；ホスホロジチオアート；ホスホトリエステル；アミノアルキルホスホトリエステル；メチルホスホナートおよび他のアルキルホスホナート（3'-アルキレンホスホナートおよびキラルなホスホナートを含む）；ホスフィナート；ホスホルアミダート（3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含む）；チオノホスホルアミダート；チオノアルキルホスホナ

10

20

30

40

50

ート；チオノアルキルホスホトリエステル；ならびに、通常の3' - 5' 連結を有するボ
ラノホスファート、これらの2' - 5' 連結アナログ、および、逆の極性を有するもの（
この場合、ヌクレオシドユニットの隣接する対が、3' - 5' から5' - 3' に、または
、2' - 5' から5' - 2' に連結される）が含まれる。上記修飾体の様々な塩、混合塩
および遊離酸形態もまた使用することができる。

【0160】

代替において、リン原子を骨格に含まない修飾オリゴヌクレオチド骨格または修飾ポリ
ヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルのヌクレオシド間連結、ヘテロ
原子およびアルキルまたはシクロアルキルの混合型ヌクレオシド間連結、あるいは、1つ
または複数の短鎖ヘテロ原子ヌクレオシド間連結または複素環ヌクレオシド間連結によっ
て形成される骨格を有する。これらには、米国特許第5, 034, 506号；米国特許第
5, 166, 315号；米国特許第5, 185, 444号；米国特許第5, 214, 13
4号；米国特許第5, 216, 141号；米国特許第5, 235, 033号；米国特許第
5, 264, 562号；米国特許第5, 264, 564号；米国特許第5, 405, 93
8号；米国特許第5, 434, 257号；米国特許第5, 466, 677号；米国特許第
5, 470, 967号；米国特許第5, 489, 677号；米国特許第5, 541, 30
7号；米国特許第5, 561, 225号；米国特許第5, 596, 086号；米国特許第
5, 602, 240号；米国特許第5, 610, 289号；米国特許第5, 602, 24
0号；米国特許第5, 608, 046号；米国特許第5, 610, 289号；米国特許第
5, 618, 704号；米国特許第5, 623, 070号；米国特許第5, 663, 31
2号；米国特許第5, 633, 360号；米国特許第5, 677, 437号；および米国
特許第5, 677, 439号に開示されるように、（部分的にはヌクレオシドの糖部分か
ら形成される）モルホリノ連結；シロキサン骨格；スルフィド骨格、スルホキシド骨格お
よびスルホン骨格；ホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルム
アセチル骨格およびメチレンチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファマー
ト骨格；メチレンイミノ骨格およびメチレンヒドラジノ骨格；スルホナート骨格およびス
ルホンアミド骨格；アミド骨格を有するもの；ならびに、N、O、SおよびCH₂の混合
成分部分を有する他のものが含まれる。

【0161】

本発明に従って使用されることがある他のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド
が、糖およびヌクレオシド間連結の両方において修飾されるものであり、すなわち、ヌク
レオチドユニットの骨格が新規な基により置き換えられる。塩基ユニットは、適切なポリ
ヌクレオチド標的との相補のために維持される。そのようなオリゴヌクレオチド模倣体の
一例には、ペプチド核酸（PNA）が含まれる。PNAオリゴヌクレオチドは、糖 - 骨格
がアミド含有骨格（特に、アミノエチルグリシン骨格）により置き換えられるオリゴヌク
レオチドを示す。塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接
的に結合する。PNA化合物の調製を教示する米国特許には、米国特許第5539082
号、同第5714331号および同第5719262号が含まれるが、これらに限定され
ない（これらのそれぞれが参照によって本明細書中に組み込まれる）。本発明において使
用されることがある他の骨格修飾が米国特許第6303374号に開示される。

【0162】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはまた、塩基修飾または塩基置換
を含む場合がある。本明細書中で使用される場合、「非修飾」塩基または「天然型」塩基
には、プリン塩基のアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびに、ピリミジン塩基の
チミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）が含まれる。「修飾（された）」塩
基には、他の合成塩基および天然型塩基、例えば、下記の塩基が含まれるが、それらに
限定されない：5 - メチルシトシン（5 - me - C）；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；アデニンおよびグアニンの6 - メチル
誘導体および他のアルキル誘導体；アデニンおよびグアニンの2 - プロピル誘導体および
他のアルキル誘導体；2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン；5 -

ハロウラシルおよびシトシン；5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシン；6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシンおよび6 - アゾチミン；5 - ウラシル（プセウドウラシル）；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 - ヒドロキシルおよび他の8 - 置換されたアデニンおよびグアニン；5 - ハロ、特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換されたウラシルおよびシトシン；7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン；8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン；7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニン；ならびに3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニン。さらなる修飾塩基には、下記において開示される修飾塩基が含まれる：米国特許第3687808号；Kroschwitz, J. I. 他（1990）、“The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering”、858頁～859頁、John Wiley & Sons；Englisch 他（1991）、“Angewandte Chemie”、International Edition、30、613；および、Sanghvi, Y. S.、 “Antisense Research and Applications”、第15章、289頁～302頁、S. T. Crooke および B. L. Bleu 編、CRC Press、1993。そのような修飾塩基は、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。これらには、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン類、ならびに、N - 2 - 置換プリン、N - 6 - 置換プリンおよびO - 6 - 置換プリン（2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを含む）が含まれる。5 - メチルシトシン置換体は、核酸二重鎖の安定性を0.6 ～ 1.2 増大させることが示されており（Sanghvi, Y. S. 他（1993）、“Antisense Research and Applications”、276頁～278頁、CRC Press、Boca Raton）、現時点では好ましい塩基置換体であり、一層より具体的には、2' - O - メトキシエチルによる糖修飾と組み合わせられるときには好ましい塩基置換体である。

10

20

30

40

50

【0163】

miRNAまたはmiRNAを調節するポリヌクレオチド作用因を間葉系幹細胞または神経幹細胞において発現させるために、miRNA（またはプレ-miRNA、またはプリ-miRNA、または、miRNAをダウンレギュレーションするポリヌクレオチド）をコードするポリヌクレオチド配列が好ましくは、間葉系幹細胞（または神経幹細胞）での発現のために好適である核酸構築物に連結される。そのような核酸構築物は、細胞におけるポリヌクレオチド配列の転写を構成的様式または誘導可能な様式で行わせるためのプロモーター配列を含む。

【0164】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物ではまた、所望される活性（例えば、運動ニューロン分化能または神経幹細胞分化能など）を示すmiRNAホモログが利用され得ることが理解されるであろう。そのようなホモログは、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して求められる場合（ただし、この場合、ギャップ重みが50に等しく、長さ重みが3に等しく、平均マッチが10に等しく、平均ミスマッチが-9に等しい）、例えば、本明細書中上記で記載される配列のいずれかに対する同一性が少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%であることが可能である。

【0165】

加えて、ホモログは、SmithおよびWatermanのアルゴリズムを利用するWisconsin配列分析パッケージのBestFitソフトウェアを使用して求められる場合（ただし、この場合、ギャップ重みが50に等しく、長さ重みが3に等しく、平均

マッチが10に等しく、平均ミスマッチが-9に等しい)、例えば、本明細書中上記で記載される配列に対する同一性が少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%であることが可能である。

10

【0166】

本発明のいくつかの実施形態との使用のために好適である構成的プロモーターが、ほとんどの環境条件およびほとんどのタイプの細胞のもとで活性であるプロモーター配列であり、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)およびラウス肉腫ウイルス(RSV)などである。本発明のいくつかの実施形態との使用のために好適である誘導可能なプロモーターには、例えば、テトラサイクリン誘導プロモーター(Zabala M他、Cancer Res、2004、64(8):2799~804)が含まれる。

【0167】

真核生物プロモーターは典型的には、2つのタイプの認識配列、すなわち、TATAボックスおよび上流プロモーターエレメントを含有する。TATAボックスは、転写開始部位から25塩基対~30塩基対上流に位置しており、RNAポリメラーゼにRNA合成を開始させることに関与すると考えられている。もう一方の上流プロモーターエレメントにより、転写が開始される速度が決定される。

20

【0168】

好ましくは、本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物によって利用されるプロモーターは、形質転換された特定の細胞集団において、すなわち、間葉系幹細胞または神経幹細胞において活性である。

【0169】

エンハンサーエレメントは、連結されている同種または異種プロモーターから転写を1000倍にまで刺激することができる。エンハンサーは、転写開始部位の下流側または上流側に置かれたときに活性である。ウイルスに由来する多くのエンハンサーエレメントは幅広い宿主範囲を有しており、様々な組織において活性である。例えば、SV40の初期遺伝子エンハンサーが多くの細胞タイプのために好適である。本発明のいくつかの実施形態のために好適である他のエンハンサー/プロモーター組合せには、ポリオーマウイルス、ヒトまたはマウスのサイトメガロウイルス(CMV)、様々なレトロウイルス(例えば、マウス白血病ウイルス、マウス肉腫ウイルスまたはラウス肉腫ウイルス、およびHIVなど)から得られる長末端反復に由来する組合せが含まれる。Enhancers and Eukaryotic Expression(Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1983)を参照のこと(これは参照によって本明細書中に組み込まれる)。

30

40

【0170】

発現ベクターの構築において、プロモーターは好ましくは、異種の転写開始部位からの距離がその天然の環境における転写開始部位からの距離とおよそ同じで配置される。しかしながら、当技術分野では公知のように、この距離におけるいくらかの変動が、プロモーター機能を失うことなく受け入れられ得る。

【0171】

既に記載されたエレメントに加えて、本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターは典型的には、クローン化された核酸の発現レベルを増大させるために、または組換えDNAを有する細胞の特定を容易にするために意図される他の特化したエレメントを含有する場

50

合がある。例えば、いくつかの動物ウイルスは、許容細胞タイプにおけるウイルスゲノムの染色体外での複製を促進させるDNA配列を含有する。これらのウイルスレプリコンを有するプラスミドは、適切な因子が、プラスミドで運ばれる遺伝子または宿主細胞のゲノムとともに運ばれる遺伝子のどちらかによって提供される限り、エピソームとして複製される。

【0172】

ベクターは真核生物レプリコンを含む場合があり、または含まない場合がある。真核生物レプリコンが存在するならば、ベクターは、適切な選択マーカーを使用して真核生物細胞において増幅可能である。ベクターが真核生物レプリコンを含まないならば、エピソーム増幅を行うことができない。代わりに、組換えDNAが、操作された細胞のゲノムに一体化し、この場合、その細胞において、プロモーターにより、所望される核酸の発現が導かれる。

10

【0173】

哺乳動物発現ベクターの例には、p cDNA3、p cDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81(これらはInvitrogenから入手可能である)、pCI(これはPromegaから入手可能である)、pMbacc、pPbacc、pBK-RSVおよびpBK-CMV(これらはStratageneから入手可能である)、pTRES(これはClontechから入手可能である)、

20

【0174】

真核生物ウイルス(例えば、レトロウイルスなど)から得られる調節エレメントを含有する発現ベクターもまた使用することができる。SV40系ベクターには、pSVT7およびpMT2が含まれる。ウシパピローマウイルスに由来するベクターには、pBV-1MTHAが含まれ、エプスタイン・パールウイルスに由来するベクターには、pHEBOおよびp205が含まれる。他の例示的なベクターには、pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、および任意の、真核生物細胞における発現のために効果的であることが示されるSV-40初期プロモーター、SV-40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳ガンウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーターまたは他のプロモーターの指示のもとでのタンパク質の発現を可能にする他のベクターが含まれる。

30

【0175】

上記で記載されるように、ウイルスは、多くの場合には宿主の防御機構を逃れるために進化してきた非常に特殊化された感染性作用因である。典型的には、ウイルスは特定の細胞タイプにおいて感染し、伝播する。ウイルスベクターの標的化特異性では、その天然の特異性が、所定の細胞タイプを特異的に標的とし、かつ、それにより、組換え遺伝子を感染細胞に導入するために利用される。したがって、本発明のいくつかの実施形態によって使用されるベクターのタイプは、形質転換された細胞タイプに依存するであろう。好適なベクターを形質転換された細胞タイプに従って選択できることは、十分に当業者の能力の範囲内であり、そのようなものとして、選択での考慮の一般的記載は本明細書中には提供されない。例えば、骨髄細胞を、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)を使用して標的化することができ、また、腎臓細胞が、Liang CY他(2004)(Arch Virol、149:51~60)に記載されるようなバキュロウイルスのオートグラフィア・カリフォルニカ(Autographa californica)核多角体病ウイルス(AcMNPV)に存在する異種プロモーターを使用して標的化される場合がある。

40

【0176】

50

1つの実施形態によれば、レンチウイルスベクターが、間葉系幹細胞または神経幹細胞をトランスフェクションするために使用される。

【0177】

様々な方法を、本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターを間葉系幹細胞に導入するために使用することができる。そのような方法が、Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Springs Harbor Laboratory、New York (1989、1992)、Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、Baltimore、Md. (1989)、Chang他、Somatic Gene Therapy、CRC Press、Ann Arbor、Mich. (1995)、Vega他、Gene Targeting、CRC Press、Ann Arbor、Mich. (1995)、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses、Butterworths、Boston Mass. (1988)、およびGilboa他[Biotechniques、4(6):504~512、1986]において一般的に記載されており、また、そのような方法には、例えば、組換えウイルスベクターを用いた安定的または一過性のトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび感染が含まれる。加えて、陽性-陰性の選抜方法については米国特許第5464764号および同第5487992号を参照のこと。

10

20

【0178】

ウイルス感染による核酸の導入は、より大きいトランスフェクション効率をウイルスの感染性のために得ることができるので、他の方法(例えば、リポフェクションおよびエレクトロポレーションなど)を上回るいくつかの利点を提供する。

【0179】

非ウイルス性である他のベクター、例えば、カチオン性脂質、ポリリシンおよびデンドリマーなどを使用することができる。

【0180】

miRNA、miRNA模倣体およびプレ-miRは、ナノ粒子(例えば、金ナノ粒子など)を使用して、または、酸化第二鉄磁性NPによってもまた、細胞にトランスフェクションすることができる。例えば、Ghosh他、Biomaterials、2013(Jan)、34(3):807~16; Crew E他、Anal Chem、2012(Jan)、3、84(1):26~9を参照のこと。

30

【0181】

組込みを伴わないトランスフェクションの他の様式には、小環状DNAベクターの使用、またはゲノムから後で除くことができる遺伝子のトランスフェクションを可能にするPiggyBackトランスポゾンの使用が含まれる。

【0182】

本明細書中上記で述べられたように、様々な原核生物細胞または真核生物細胞を、本発明のいくつかの実施形態のmiRNAまたは当該miRNAをダウンレギュレーションすることができるポリヌクレオチド作用因を発現させるための宿主発現系として使用することができる。これらには、微生物、例えば、コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、組換えプラスミドDNA発現ベクターまたは組換えコスミドDNA発現ベクターにより形質転換される細菌、コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターにより形質転換される酵母;コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)が感染させられる植物細胞系、または、コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミドなど)により形質転換される植物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物発現系もまた、本発明のいくつかの実施形態のmiRNAを発現させるために使用することができる。

40

50

【0183】

細菌用構築物の例には、E. coli 発現ベクターのpETシリーズが含まれる[Studier他(1990)、Methods in Enzymol、185:60~89]。

【0184】

酵母においては、米国特許第5932447号に開示されるように、構成的または誘導可能なプロモーターを含有する数多くのベクターを使用することができる。代替では、外来DNA配列の酵母染色体への組み込みを促進するベクターを使用することができる。

【0185】

間葉系幹細胞または神経幹細胞を接触させるために使用される条件が、miRNA（またはその阻害剤）がその分化を誘導することを可能にする期間/細胞濃度/miRNA濃度/細胞とmiRNAとの間の比率について選択される。本発明者らはさらに、運動ニューロン系譜または神経幹細胞系譜に向かう分化を促進させる分化因子との幹細胞のインキュベーションを意図する。そのような分化因子とのインキュベーションが、miRNAと接触させることの前に、miRNAと接触させることと同時に、または、miRNAと接触させることの後で実行される場合がある。そのような作用因の様々な例が本明細書中下記の実施例の節において提供される。

【0186】

代替において、または、加えて、間葉系幹細胞は、発現構築物を使用して、例えば、本明細書中上記で記載される発現構築物などを使用して、そのような分化因子を発現するように遺伝子改変される場合がある。

【0187】

分化工程の期間中またはその後において、幹細胞はそれらの分化状態についてモニターされる場合がある。細胞分化を、分化を示すことが公知の細胞特異的マーカーまたは組織特異的マーカーを調べたときに明らかにすることができる。

【0188】

例えば、神経幹細胞は、ネスチンおよびSOX-2の少なくとも1つを発現する場合がある。さらなるマーカーには、SOX1、SOX3、PSA-NCAMおよびMUSASHI-1が含まれる。

【0189】

下記は、運動ニューロンへの分化を確認するために使用され得るマーカーの列挙である：ChAT（コリンアセチルトランスフェラーゼ）、Chox10、En1、Even-skipped（Eve）、転写因子、Evx1/2、線維芽細胞増殖因子-1（FGF1または酸性FGF）、HB9、Isl1（Isl1et-1）、Isl2、Isl1et1/2、Lim3、p75（NTR）（p75ニューロトロフィン受容体）、REG2、Sim1、SMI32（SMI-32）およびZfh1。

【0190】

組織/細胞特異的なマーカーを、当技術分野で周知の免疫学的技術を使用して検出することができる[Thomson JA他(1998)、Science、282:1145~7]。例には、膜結合マーカーのためのフローサイトメトリー、細胞外および細胞内マーカーのための免疫組織化学、ならびに、分泌された分子マーカーのための酵素免疫アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【0191】

本明細書中に記載される方法に従って得られる細胞は、特定の細胞タイプについて、例えば、始原体細胞タイプまたは成熟型細胞タイプについて富化されることがあることが理解されるであろう。したがって、例えば、分化時間が、より初期の始原体タイプ（例えば、下記のマーカー、すなわち、ネスチン、olig2およびSox2の少なくとも1つを発現するもの）またはより後期の成熟型細胞タイプ（例えば、下記のマーカー、すなわち、ChAT、Isl1et1、HB9および3チューブリンの少なくとも1つを発現するもの）を得るために選択される場合がある。

【0192】

特定の細胞タイプのさらなる富化が、細胞分取技術（例えば、FACSおよび磁気分取など）を使用して実行される場合がある。

【0193】

加えて、細胞分化の後には、GFPまたはRFPによりタグ化され、増大した蛍光を分化時に示す特異的レポーターを伴うことができる。

【0194】

アップレギュレーションのために提案される本発明のmiRNAの標的を決定することによって、本発明の範囲が、miRNAと接触させること以外の手段による当該標的のダウンレギュレーションを包含するために拡大され得ることが理解されるであろう。それに対応して、ダウンレギュレーションのために提案される本発明のmiRNAの標的を決定することによって、本発明の範囲が、当該標的のアップレギュレーションを包含するために拡大され得ることが理解されるであろう。

10

【0195】

例えば、本発明者らは、miR-137の標的の1つが、Related to testis-specific, vespid and pathogenesisタンパク質1(RTVP-1)であることを示している。したがって、本発明では、神経幹細胞系譜に向かう分化がこのタンパク質のダウンレギュレーションによって実行させられることがあることが意図される。

【0196】

20

したがって、本発明の別の局面によれば、神経幹細胞を作製する方法であって、間葉系幹細胞(MSC)を、Related to testis-specific, vespid and pathogenesisタンパク質1(RTVP-1)の量および/または活性をダウンレギュレーションする作用因と接触させ、それにより、前記神経幹細胞を作製することを含む方法が提供される。

【0197】

Related to testis-specific, vespid and pathogenesisタンパク質1(RTVP-1)が、2つのグループによってヒトGBM細胞株からクローン化され、神経腫瘍病理発生関連タンパク質、すなわち、GLI PR1またはRTVP-1と名づけられた[Rich T他、Gene、1996、180:125~30]（これは参照によって本明細書中に組み込まれる）。RTVP-1は、TPX-1、毒液アレルゲン抗原5、および、植物病理発生関連タンパク質のグループ1(PR-1)を含む他のRTVP-1ホモログにもまた見出される未だに不明の機能とともに、推定されるシグナルペプチド、膜貫通ドメインおよびSCPドメインを含有する。

30

【0198】

RTVP-1（または本発明の他のmiRNA標的のいずれか）のダウンレギュレーションを、転写および/または翻訳を妨げる様々な分子（例えば、RNAサイレンシング作用因、リボザイム、DNAザイムおよびアンチセンス）を使用してゲノムレベルおよび/または転写物レベルで、あるいは、例えば、アンタゴニスト、および、当該ポリペプチドを切断する酵素などを使用してタンパク質レベルで得ることができる。

40

【0199】

下記は、RTVP-1の発現レベルおよび/または活性をダウンレギュレーションすることができる作用因の列挙である。

【0200】

RTVP-1をダウンレギュレーションすることができる作用因の一例が、それに特異的に結合することができる抗体または抗体フラグメントである。好ましくは、抗体は、細胞によって内部に取り入れられ、核に進入することができる。

【0201】

本発明で使用される用語「抗体」は、無傷の分子、並びにその機能的なフラグメント、

50

0

20

30

40

50

50

50

50

細胞における長い dsRNA の存在により、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼ I 酵素の活性が刺激される。ダイサーは、短い干渉性 RNA (siRNA) として公知の dsRNA の小片への dsRNA のプロセッシングに関与する。ダイサー活性に由来する短い干渉性 RNA は、長さが典型的には約 21 ~ 約 23 ヌクレオチドであり、約 19 塩基対の二重鎖を含む。RNAi 応答はまた、 siRNA 二重鎖のアンチセンス鎖に対して相補

的な配列を有する一般鎖RNAの切断を媒介するエンドヌクレアーゼ複合体（これは一般にはRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）と呼ばれる）を特徴とする。標的RNAの切断が、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央において生じる。

【0206】

したがって、本発明では、mRNAからのタンパク質発現をダウンレギュレーションするためのdsRNAの使用が意図される。

【0207】

1つの実施形態によれば、dsRNAは30bp超である。長いdsRNA（すなわち、30bp超のdsRNA）の使用は、二本鎖RNAのこれらのより長い領域がインターフェロン応答およびPKR応答の誘導を生じさせるであろうという考えのために非常に限定されている。しかしながら、長いdsRNAの使用は下記の点で数多くの利点をもたらすことができる：細胞は、数多くのsiRNAを試験しなければならないことを緩和する最適なサイレンシング配列を選択することができる；長いdsRNAは、サイレンシングライブラリーが、siRNAのために必要であろうと思われるよりも少ない複雑性を有することを可能にするであろう；および、おそらくは最も重要であるが、長いdsRNAは、治療剤として使用されたときにはウイルスの回避変異を防止し得ると思われる。

【0208】

様々な研究により、長いdsRNAが、ストレス応答を誘導したり著しい標的外影響を引き起こすことなく、遺伝子発現を沈黙させるために使用され得ることが明らかにされる。例えば、[Strat他, Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 13 3803-3810; Bhargava 他 Brain Res. Protoc. 2004; 13: 115-125; Diallo M. 他, Oligonucleotides. 2003; 13: 381-392; Paddison P. J. 他, Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002; 99: 1443-1448; Tran N. 他, FEBS Lett. 2004; 573: 127-134]を参照のこと。

【0209】

特に、本発明ではまた、インターフェロン経路が活性化されない細胞（例えば、胚性細胞および卵母細胞）における遺伝子サイレンシングのための長いdsRNA（30塩基を超える転写物）の導入が意図される。例えば、Billy 他, PNAS 2001, Vol 98, pages 14428-14433. and Diallo 他, Oligonucleotides, October 1, 2003, 13(5): 381-392. doi: 10.1089/154545703322617069を参照のこと。

【0210】

本発明ではまた、遺伝子発現をダウンレギュレーションするための、インターフェロン経路およびPKR経路を誘導しないために特に設計される長いdsRNAの導入が意図される。例えば、ShinagawaおよびIshii [Genes & Dev. 17(11): 1340~1345, 2003]は、長い二本鎖RNAをRNAポリメラーゼII（Pol II）プロモーターから発現するために、pDECAPと名づけられるベクターを開発している。pDECAPからの転写物は、細胞質へのdsRNA輸出を促進させる5'キャップ構造および3'ポリ(A)テールの両方を欠くので、pDECAPからの長いdsRNAはインターフェロン応答を誘導しない。

【0211】

インターフェロン経路およびPKR経路を哺乳動物系において避ける別の方法が、小さい阻害性RNA（siRNA）を、トランスフェクションまたは内因性発現のどちらかを介して導入することによるものである。

【0212】

用語「siRNA」は、RNA干渉（RNAi）経路を誘導する小さい阻害性RNA二重鎖（一般には18~30塩基対の間）を示す。典型的には、siRNAは、中央の19bpの二重鎖領域および両末端における対称的な2塩基の3'突出部を有する21マー

10

20

30

40

50

として化学合成されており、だが、25～30塩基の長さの化学合成されたRNA二重鎖が、同じ場所において21マー体と比較して、効力において100倍もの増大を有し得ることが近年には記載されている。RNAiの誘発において長いRNAを使用するほど得られる効力が増大していたのが観測されたが、これは、ダイサーに生成物(21マー体)の代わりに基質(27マー体)を提供すること、また、このことにより、siRNA二重鎖がRISCに進入する速度または効率が改善されることから生じるためと理論化される。

【0213】

3'突出の位置がsiRNAの効力に影響すること、および、3'突出をアンチセンス鎖に有する非対称的な二重鎖が、3'突出をセンス鎖に有するものよりも一般に強力であることが見出されている(Rose他、2005)。このことは、逆の効力パターンが、アンチセンス転写物を標的とするときに認められるので、非対称的な鎖がRISCに入ることに起因すると考えられ得る。

【0214】

二本鎖の干渉性RNA(例えば、siRNA)の鎖が、ヘアピン構造またはステム-ループ構造(例えば、shRNA)を形成するためにつながれる場合がある。したがって、述べられたように、本発明のRNAサイレンシング作用因はまた、短いヘアピンRNA(shRNA)である場合がある。

【0215】

用語「shRNA」は、本明細書中で使用される場合、相補的配列の第1および第2の領域を含む、ステム-ループ構造を有するRNA作用因を示し、ただし、この場合、これらの領域の相補性の程度および配向が、塩基対形成がこれらの領域の間で生じるように十分であり、第1の領域および第2の領域がループ領域によってつなぐられ、ループが、ループ領域内のヌクレオチド(またはヌクレオチドアナログ)の間での塩基対形成がないことから生じる。ループにおけるヌクレオチドの数は、3～23の間の数(3および23を含む)、または、5～15の間の数(5および15を含む)、または、7～13の間の数(7および13を含む)、または、4～9の間の数(4および9を含む)、または、9～11の間の数(9および11を含む)である。ループにおけるヌクレオチドのいくつかは、ループにおける他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に参与することができる。ループを形成させるために使用することができるオリゴヌクレオチド配列の例には、5'-UUC AAGAGA-3'(Brummelkamp, T. R. 他(2002)、Science、296:550)および5'-UUUGUGUAG-3'(Castanotto, D. 他(2002)、RNA、8:1454)が含まれる。生じた一本鎖オリゴヌクレオチドは、RNAi装置と相互作用することができる二本鎖領域を含むステム-ループ構造またはヘアピン構造を形成することが当業者によって認識されるであろう。

【0216】

別の実施形態によれば、RNAサイレンシング作用因は、本明細書中上記でさらに記載されるように、miRNAである場合がある。

【0217】

本発明との使用のために好適であるRNAサイレンシング作用因の合成が下記のように実行され得る。最初に、miRNA標的のmRNA配列(例えば、CTGF配列)がAAジヌクレオチド配列についてAUG開始コドンから下流に走査される。それぞれのAAおよびその3'側の隣接する19ヌクレオチドの存在が、可能性のあるsiRNA標的部位として記録される。好ましくは、siRNA標的部位がオープンリーディングフレームから選択される。これは、非翻訳領域(UTR)には調節タンパク質結合部位がより多いからである。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体がsiRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨げる場合がある[Tuschl、ChemBiochem、2:239～245]。だが、非翻訳領域に向けられるsiRNAもまた、5'UTRに向けられるsiRNAがGAPDHの細胞mRNAにおける約90%の低下を媒介し、かつ、タンパク質レベルを完全になくしたGAPDHについて明らかにされるように(www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)、効果的で

ある場合があることが理解されるであろう。

【0218】

次に、可能性のある標的部位が、任意の配列アライメントソフトウェア（例えば、NCBIサーバー（www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）から入手可能なBLASTソフトウェアなど）を使用して適切なゲノムデータベース（例えば、ヒト、マウス、ラットなど）に対して比較される。他のコード配列に対する有意な相同性を示す推定される標的部位が取り出される。

【0219】

条件を満たす標的配列が、siRNA合成のためのテンプレートとして選択される。好ましい配列が、低いG/C含有量を含む配列である。これらは、G/C含有量が55%より大きい配列と比較して、遺伝子サイレンシングを媒介することにおいてより効果的であることが判明しているからである。いくつかの標的部位が好ましくは、評価のために標的遺伝子の長さに沿って選択される。選択されたsiRNAのより良い評価のために、陰性対照が好ましくは、併せて使用される。陰性対照siRNAは好ましくは、siRNAと同じヌクレオチド組成を含み、しかし、ゲノムに対する有意な相同性を有していない。したがって、任意の他の遺伝子に対しても有意な相同性を何ら示さないならば、siRNAのスクランブル型ヌクレオチド配列が好ましくは使用される。

【0220】

本発明のRNAサイレンシング作用因は、少なくとも1つの異なる連結（例えば、ホスホルアミダート連結、ホスホロチオアート連結、ホスホロジチオアート連結またはO-メチルホスホロアミダイト連結ならびにペプチド核酸の骨格および連結）を有することがある核酸アナログを含む場合がある。他のアナログ核酸には、米国特許第5235033号および同第5034506号（これらは参照によって組み込まれる）に記載されるものを含む、正荷電骨格を有するもの、非イオン性骨格を有するもの、および、非リボース骨格を有するものが含まれる。天然に存在しない、または修飾された1つまたは複数のヌクレオチドを含有する核酸もまた、核酸の1つの定義に含まれる。修飾されたヌクレオチドアナログが、例えば、核酸分子の5'末端および/または3'末端に位置する場合がある。ヌクレオチドアナログの代表的な例が、糖修飾または骨格修飾のリボヌクレオチドから選択される場合がある。しかしながら、また、核酸塩基修飾のリボヌクレオチド、すなわち、天然に存在しない核酸塩基を天然に存在する核酸塩基の代わりに含有するリボヌクレオチド、例えば、5位で修飾されるウリジン化合物またはシチジン化合物（例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-プロモウリジン）、8位で修飾されるアデノシン化合物およびグアノシン化合物（例えば、8-プロモグアノシン）、デアザヌクレオチド（例えば、7-デアザ-アデノシン）、O-アルキル化ヌクレオチドおよびN-アルキル化ヌクレオチド（例えば、N6-メチルアデノシン）などが好適であることには留意しなければならない。2'-OH基が、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂またはCNから選択される基によって置換される場合があり、ただし、この場合、RはC₁~C₆のアルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、ハロは、F、Cl、BrまたはIである。修飾されたヌクレオチドにはまた、例えば、Kruetzfeldt他、Nature、438:685~689(2005)、Soulschek他、Nature、432:173~178(2004)、および、米国特許出願公開第20050107325号（これらは参照によって本明細書中に組み込まれる）に記載されるようなヒドロキシプロリノール連結を介してコレステロールとコンジュゲートされるヌクレオチドが含まれる。さらなる修飾されたヌクレオチドおよび核酸が米国特許出願公開第20050182005号（これは参照によって本明細書中に組み込まれる）に記載される。リボース-リン酸骨格の修飾が、様々な理由のために、例えば、そのような分子の生理学的環境における安定性および半減期を増大させるために、細胞膜を横断する拡散を高めるために、または、バイオチップ上のプローブとして行われる場合がある。骨格の修飾はまた、分解に対する抵抗性を、例えば、細胞の過酷なエンドサイトーシス環境などにおいて高める場合がある。骨格の修飾はまた、例えば、肝臓および腎臓などにおける肝細胞による核

10

20

30

40

50

酸クリアランスを低下させる場合がある。天然に存在する核酸およびアナログの混合物が作製される場合がある；代替では、種々の核酸アナログの混合物、ならびに、天然に存在する核酸およびアナログの混合物が作製される場合がある。

【0221】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供されるRNAサイレンシング作用因は、細胞透過性ペプチドと機能的に関連することができる。本明細書中で使用される場合、「細胞透過性ペプチド」は、細胞の形質膜および/または核膜を横断する膜透過性複合体の輸送を伴うエネルギー非依存的（すなわち、非エンドサイトーシス的）転位置性を与える短い（約12～30残基の）アミノ酸配列または機能的モチーフを含むペプチドである。本発明の膜透過性複合体において使用される細胞透過性ペプチドは好ましくは、少なくとも1つの非機能的なシステイン残基を含み、この場合、この非機能的システイン残基はフリーであるか、または、そのような連結のために改変されている二本鎖リボ核酸とのジスルフィド連結を形成するために誘導体化されるかのどちらかである。そのような性質を与える代表的なアミノ酸モチーフが米国特許第6348185号に列挙される（その内容は明示的に、参照によって本明細書中に組み込まれる）。本発明の細胞透過性ペプチドには好ましくは、ペネトラチン、トランスポータン、pIs1、TAT（48-60）、pVEC、MTSおよびMAPが含まれるが、これらに限定されない。

【0222】

RTVP-1をダウンレギュレーションすることができる別の作用因が、CTGFのmRNA転写物またはDNA配列を特異的に切断することができるDNAザイム分子である。DNAザイムは、一本鎖標的配列および二本鎖標的配列の両方を切断することができる一本鎖のポリヌクレオチドである（Breaker, R. R. および Joyce, G.、Chemistry and Biology、1995、2：655；Santoro, S. W. & Joyce, G. F.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1997、943：4262）。DNAザイムのための一般的なモデル（“10-23”モデル）が提案されている。“10-23”DNAザイムは、15個のデオキシリボヌクレオチドの触媒作用ドメインを有しており、この触媒作用ドメインには、それぞれが7個～9個のデオキシリボヌクレオチドである2つの基質認識ドメインが隣接している。このタイプのDNAザイムはその基質RNAをプリン：ピリミジン接合部において効果的に切断することができる（Santoro, S. W. & Joyce, G. F.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1999；DNAザイムの総説については、Khachigian, L M [Curr Opin Mol Ther、4：119～21（2002）を参照のこと]。

【0223】

一本鎖標的切断部位および二本鎖標的切断部位を認識する合成される操作されたDNAザイムの構築および増幅の様々な例が米国特許第6326174号（Joyce他）に開示されている。

【0224】

RTVP-1のダウンレギュレーションはまた、RTVP-1をコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイゼーションすることができるアンチセンスポリヌクレオチドを使用することによって得ることができる。

【0225】

RTVP-1を効率的にダウンレギュレーションするために使用することができるアンチセンス分子の設計は、アンチセンス取り組みにとって重要である2つの側面を考慮に入れなければならない。第1の側面が、適切な細胞の細胞質へのオリゴヌクレオチドの送達であり、一方、第2の側面が、設計されたmRNAと、その翻訳を阻害する様式で細胞内で特異的に結合するオリゴヌクレオチドの設計である。

【0226】

先行技術は、オリゴヌクレオチドを広範囲の様々な細胞タイプに効率的に送達するために使用することができる数多くの送達戦略を教示する[例えばLufth J Mol M

10

20

30

40

50

ed 76:75-6 (1998); Kronenwett 他 Blood 91:852-62 (1998); Rajur 他 Bioconj Chem 8:935-40 (1997); Lavigne 他 Biochem Biophys Res Commun 237:566-71 (1997) and Aoki 他 (1997) Biochem Biophys Res Commun 231:540-5 (1997) を参照のこと】。

【0227】

加えて、最大の予測された結合親和性をそれらの標的 mRNA について有するそのような配列を、標的 mRNA およびオリゴヌクレオチドの両方における構造変化のエネルギー論を説明する熱力学的サイクルに基づいて特定するためのアルゴリズムもまた利用可能である [例えば、Walton 他、Biotechnol Bioeng、65:1~9 (1999) を参照のこと]。

10

【0228】

そのようなアルゴリズムが、細胞におけるアンチセンス取り組みを実行するために首尾よく使用されている。例えば、Walton 他によって開発されたアルゴリズムは、科学者がウサギベータ-グロビン (RBG) およびマウス腫瘍壊死因子-アルファ (TNFアルファ) の転写物のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを首尾よく設計することを可能にした。同じ研究グループはより近年には、合理的に選択されたオリゴヌクレオチドの、細胞培養物における3つのモデル標的 mRNA (ヒト乳酸デヒドロゲナーゼ A および B ならびにラット gp130) に対するアンチセンス活性が、動的 PCR 技術によって評価された場合、ホスホジエステルオリゴヌクレオチド化学およびホスホロチオアートオリゴヌクレオチド化学を用いた2つの細胞タイプにおける3つの異なる標的に対する試験を含む、ほとんどすべての場合において効果的であることが判明したことを報告している。

20

【0229】

加えて、特異的なオリゴヌクレオチドを設計し、その効率を、インビトロ系を使用して予測するためのいくつかの取り組みもまた発表された (Matveeva 他、Nature Biotechnology、16:1374~1375 (1998)) 。

【0230】

RTVP-1 をダウンレギュレーションすることができる別の作用因が、RTVP-1 をコードする mRNA 転写物を特異的に切断することができるリボザイム分子である。様々なリボザイムが、目的とするタンパク質をコードする mRNA の切断による遺伝子発現の配列特異的な阻害のためにますます使用されている [Welch 他、Curr Opin Biotechnol、9:486~96 (1998)]。リボザイムを、任意の特異的な標的 RNA を切断するために設計することができることにより、リボザイムは基礎的研究および治療的応用の両方において有益なツールになっている。

30

【0231】

RTVP-1 遺伝子の発現を細胞において調節するさらなる方法が、三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) を介するものである。近年の研究では、二本鎖のらせん状 DNA におけるポリプリン/ポリピリミジン領域を配列特異的様式で認識し、かつ、当該領域に結合することができる TFO が設計され得ることが示されている。これらの認識規則が、Maher III, L. J. 他、Science、1989、245:725~730; Moser, H. E. 他、Science、1987、238:645~630; Beal, P. A. 他、Science、1992、251:1360~1363; Cooney, M. 他、Science、1988、241:456~459; および Hogan, M. E. 他、欧州特許公開第 375408 号によって概略される。そのようなオリゴヌクレオチドの改変、例えば、インターカレーターおよび骨格置換の導入など、ならびに、結合条件 (pH およびカチオン濃度) の最適化は、TFO 活性に対する固有的障害 (例えば、電荷反発および不安定性など) を克服することを助けており、また、近年には、合成オリゴヌクレオチドが特異的配列に対して標的化され得ることが示された (近年の総説については、Seidman および Glazer、J Clin Invest、2003

40

50

、 1 1 2 : 4 8 7 ~ 9 4 を参照のこと)。

【 0 2 3 2 】

一般には、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは下記の配列対応を有する：

| | | | | |
|-----|-----------|---|---|---|
| オリゴ | 3 ' - - A | G | G | T |
| 二重鎖 | 5 ' - - A | G | C | T |
| 三重鎖 | 3 ' - - T | C | G | A |

【 0 2 3 3 】

しかしながら、A - A T 三重鎖および G - G C 三重鎖が最大の三重らせん安定性を有することが示されている (R e i t h e r および J e l t s c h 、 B M C B i o c h e m 、 2 0 0 2 、 S e p t 1 2 、 E p u b) 。同じ著者らは、A - A T および G - G C の規則に従って設計される T F O は非特異的な三重鎖を形成しないことを明らかにしており、このことは、三重鎖形成が実際に配列特異的であることを示している。

【 0 2 3 4 】

三重鎖形成オリゴヌクレオチドは好ましくは、長さが少なくとも 1 5 、より好ましくは 2 5 、さらにより好ましくは 3 0 ヌクレオチド以上であり、最大でも 5 0 b p または 1 0 0 b p である。

【 0 2 3 5 】

T F O による (例えば、カチオン性リボソームを介した) 細胞のトランスフェクションおよび標的 D N A との三重らせん構造の形成は、立体的および機能的な変化を誘導し、これにより、転写の開始および伸長を阻止し、内因性 D N A における所望される配列変化の導入を可能にし、遺伝子発現の特異的なダウンレギュレーションを生じさせる。T F O により処置される細胞における遺伝子発現のそのような抑制の例には、哺乳動物細胞におけるエピソームの s u p F G 1 遺伝子および内因性の H P R T 遺伝子のノックアウト (V a s q u e z 他、N u c l A c i d s R e s 、 1 9 9 9 、 2 7 : 1 1 7 6 ~ 8 1 、および、P u r i 他、J B i o l C h e m 、 2 0 0 1 、 2 7 6 : 2 8 9 9 1 ~ 9 8) 、ならびに、E t s 2 転写因子 (これは前立腺ガンの病因において重要である) (C a r b o n e 他、N u c l A c i d R e s 、 2 0 0 3 、 3 1 : 8 3 3 ~ 4 3) および前炎症性 I C A M - 1 遺伝子 (B e s c h 他、J B i o l C h e m 、 2 0 0 2 、 2 7 7 : 3 2 4 7 3 ~ 7 9) の発現の配列特異的かつ標的特異的なダウンレギュレーションが含まれる。加えて、V u y i s i c h および B e a l は近年、配列特異的な T F O は d s R N A に結合することができ、これにより、d s R N A 依存性酵素 (例えば、R N A 依存性キナーゼなど) の活性を阻害することができることを示している (V u y i s i c h および B e a l 、N u c l A c i d s R e s 、 2 0 0 0 、 2 8 : 2 3 6 9 ~ 7 4) 。

【 0 2 3 6 】

加えて、上記原則に従って設計される T F O は、D N A 修復を実行することができる定方向突然変異誘発を誘導することができ、したがって、内因性遺伝子の発現のダウンレギュレーションおよびアップレギュレーションの両方をもたらすことができる (S e i d m a n および G l a z e r 、 J C l i n I n v e s t 、 2 0 0 3 、 1 1 2 : 4 8 7 ~ 9 4) 。効果的な T F O の設計、合成および投与の詳細な記載を、米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 1 7 0 6 8 号および同第 2 0 0 3 0 0 9 6 9 8 0 (F r o e h l e r 他) 、米国特許出願公開第 2 0 0 2 0 1 2 8 2 1 8 号および同第 2 0 0 2 0 1 2 3 4 7 6 号 (E m a n u e l e 他) 、ならびに、米国特許第 5 7 2 1 1 3 8 号 (L a w n) において見出すことができる。

【 0 2 3 7 】

間葉系幹細胞を接触させるために使用される条件が、R T V P - 1 ダウンレギュレーション作用因がその分化を誘導することを可能にする期間 / 細胞濃度 / R T V P - 1 ダウンレギュレーション作用因の濃度 / 細胞と R T V P - 1 ダウンレギュレーション作用因との間の比率について選択される。

【 0 2 3 8 】

本明細書中に記載される方法に従って得られる単離された細胞集団は典型的には不均一

10

20

30

40

50

であり、だが、均一な細胞集団もまた意図される。

【0239】

特定の実施形態によれば、細胞集団は、外因性miRNAまたは当該miRNAをダウンレギュレーションすることができるポリヌクレオチド作用因を発現するように遺伝子改変される。

【0240】

用語「単離された」は、本明細書中で使用される場合、その生体内場所（例えば、骨髄、神経組織）から取り出されている細胞の集団を示す。好ましくは、単離された細胞集団は、その生体内場所に存在する他の物質（例えば、他の細胞）を実質的に含んでいない。

【0241】

細胞集団は、細胞の約50%超（代替では、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、または、それどころか、約95%超）が、運動ニューロンについてのマーカーの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つを発現するか、または、神経幹細胞についてのマーカーの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つを発現するように選択される場合がある。

【0242】

細胞の特定の亜集団の単離が、細胞の蛍光活性化細胞分取および/または磁気分離を含む当技術分野で公知の技術を使用して実行される場合がある。

【0243】

本発明のこの局面の集団の細胞は、細胞サイズ、細胞形状、オルガネラサイズおよびオルガネラ数を含む構造的な運動ニューロン表現型または神経幹細胞表現型を含む場合がある。これらの構造的表現型が、顕微鏡技術（例えば、走査型電子顕微鏡法）を使用して分析される場合がある。抗体または色素が、分析を助けるための識別特徴を強調するために使用される場合がある。

【0244】

本発明の細胞および細胞集団は様々な治療目的のために有用でありうる。本明細書で記載される細胞で有益に治療しうるCNS疾患またはCNS障害の代表的な例には、疼痛性障害、運動障害、解離性障害、気分障害、情動障害、神経変性疾患または神経変性障害、精神疾患および痙攣性障害が含まれるが、これらに限定されない。

【0245】

そのような状態のより具体的な例には、パーキンソン病、ALS、多発性硬化症、ハンチントン病、自己免疫性脳脊髄炎、脊髄損傷、脳性まひ、糖尿病性神経障害、緑内障性（glaucomatous）神経障害、黄斑変性、動作時振戦および遅発性ジスキネジー、パニック、不安、うつ病、アルコール依存症、不眠症、躁病的行動、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、躁うつ疾患、アルツハイマー病ならびにてんかんが含まれるが、これらに限定されない。

【0246】

分化MSCの使用はまた、脊髄傷害を含む神経系の外傷性病変を処置するために、また、出血または血栓症または塞栓症によって引き起こされる卒中を処置するためにも適応される場合がある。これは、神経形成を誘導し、かつ、損傷ニューロンに対する傷害を最小限に抑えるための生存因子を提供することが必要であるからである。

【0247】

本発明の運動ニューロン様細胞は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、原発性側索硬化症（PLS）、偽性球麻痺および進行性球麻痺（これらに限定されない）を含めて様々な運動ニューロン疾患のために有用である場合がある。

【0248】

本明細書中に記載される方法のどれにおいても、細胞が、自己、半同種または非自己（すなわち、同種または異種）のヒトのドナーまたは胚または臍帯/胎盤から得られる場合がある。例えば、細胞がヒト死体またはドナー対象から単離される場合がある。

10

20

30

40

50

【0249】

半同種の用語は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）のクラスIまたはクラスIIの遺伝子座においてレシピエント細胞に対して部分的に一致していないドナー細胞を示す。

【0250】

本発明の細胞は、埋め込み部位にその性質が依存する様々な移植取り組みを使用して、処置された個体に投与することができる。

【0251】

「移植」、「細胞置換」または「移植する」の用語または表現は本明細書中では交換可能に使用され、本発明の細胞を標的組織に導入することを示す。上述のように、細胞はレシピエントに、あるいは、同種ドナー、半同種ドナーまたは異種ドナーに由来することができる。

10

【0252】

細胞は全身的には循環に注入するか、クモ膜下腔内に投与するかまたは中枢神経系、脊髄もしくは脳室腔の中に移植するか、あるいは、硬膜下において宿主の脳の表面に移植することができる。成功する移植のための条件には、(i)埋め込み物の生存性、(ii)移植部位における移植片の保持、および(iii)移植部位における最少量の病理学的反応が含まれる。様々な神経組織（例えば、胚性脳組織）を宿主の脳に移植するための様々な方法が、“Neural grafting in the mammalian CNS”、BjorklundおよびStenevi編（1985）；Freed他（2001）；Olanow他（2003）に記載されている。これらの手順には、実質内移植、すなわち、組織を移植時に脳の実質に注入するか、または置くことによって達成される、（脳外または実質外移植と比較されるような）宿主の脳の内部における実質内移植が含まれる。

20

【0253】

実質内移植を、2つの取り組みを使用して行うことができる：(i)細胞を宿主の脳の実質に注入すること、または(ii)宿主の脳の実質を露出させるために外科的手段によって腔を準備し、その後、移植片をこの腔の中に置くこと。両方の方法が、移植片と宿主脳組織との間における実質での設置を移植時にもたらし、また、ともに、移植片と宿主脳組織との間における解剖学的一体化を容易にする。移植片が宿主の脳の不可欠な部分となり、かつ、宿主の生涯にわたって生存することが要求されるならば、このことは重要である。

30

【0254】

代替では、移植片が、室（例えば、脳室）に、あるいは、硬膜下に、すなわち、介在する軟膜またはクモ膜および軟膜によって宿主の脳の実質から隔てられる宿主の脳の表面に置かれる場合がある。脳室に移植することが、ドナー細胞の注入によって、または細胞を基体（例えば、3%コラーゲンなど）において成長させて、その後、移植片のずれを防止するために脳室内に埋め込まれることがある充実組織のプラグを形成することによって達成される場合がある。硬膜下移植のために、細胞が、隙間を硬膜に作製した後で脳の表面の周りに注入される場合がある。宿主の脳の選択された領域への注入が、ドリルで穴を開け、硬膜を突き通して、マイクロシリンジの針が挿入されることを可能にすることによって行われる場合がある。マイクロシリンジは好ましくは、定位フレームに取り付けられ、三次元定位座標が、針を脳または脊髄の所望される場所に設置するために選択される。細胞はまた、脳の被殻、基底核、海馬皮質、線条体、黒質または尾状領域に、同様にまた、脊髄に導入される場合がある。

40

【0255】

細胞はまた、組織の健康な領域に移植される場合がある。場合により、損傷した組織区域の正確な場所が不明である場合があり、細胞が、健康な領域に気付かずに移植される場合がある。他の場合には、細胞を健康な領域に投与して、それにより、その領域に対する何らかのさらなる損傷を回避することが好ましい場合がある。どのような場合であれ、移植後、細胞は好ましくは、損傷区域に遊走する。

50

【0256】

移植のために、細胞懸濁物がシリンジに引き入れられ、麻酔された移植レシピエントに投与される。複数の注入が、この手順を使用して行われる場合がある。

【0257】

細胞を、脳または脊髄における任意の所定の部位に移植することをこのように可能にする細胞懸濁物手順は、比較的非外傷性であり、複数の移植を、同じ細胞懸濁物を使用していくつかの異なる部位または同じ部位において同時に可能にし、また、異なる解剖学的領域から得られる細胞の混合物を可能にする。複数の移植片が、細胞タイプの混合物、および/または細胞に挿入される導入遺伝子の混合物からなる場合がある。好ましくは、およそ 10^4 ~ およそ 10^9 個の細胞が移植片あたり導入される。細胞は、冒された区域への標的化の機会を最大にするために、異なる場所に同時に投与することができる（例えば、クモ膜下腔内および静脈内の組み合わせられた投与など）。

10

【0258】

脊髄移植に好ましい場合がある腔内への移植のために、組織が中枢神経系（CNS）の外側表面に近い領域から取り出され、例えば、Stenevi 他（Brain Res、114：1～20、1976）によって記載されるように、脳の上にある骨を除き、出血をゲルフォームなどの材料により止めることによって移植腔を形成する。吸引が、腔を作り出すために使用される場合がある。その後、移植片が腔に置かれる。2つ以上の移植片が、細胞または充実組織埋め込み物の注入を使用して同じ腔に置かれる場合がある。好ましくは、埋め込み部位が、処置されるCNS障害によって決定される。脱髄したMS病変が、MSの効果的な処置が適切な標的部位への細胞の遊走能により依拠し得るように、CNSの至るところ、多数の場所にわたって分布する。

20

【0259】

細胞の鼻腔内投与もまた意図される。

【0260】

MSCは典型的には、MHCクラス2をダウンレギュレーションし、したがって、免疫原性がそれほど大きくない。臍帯血、臍帯ワルトンゼリーまたは胎盤から得られる胚性細胞または新生児細胞は、特にそのような細胞は最初は免疫抑制的かつ免疫調節性であるので、強い免疫原性である可能性がさらにより少なく、したがって、拒絶される可能性がそれほど大きくない。

30

【0261】

それにもかかわらず、非自己細胞は、身体に投与されたときには免疫反応を誘導することがあるので、いくつかの取り組みが、非自己細胞の拒絶の可能性を軽減するために開発されている。さらに、多発性硬化症などの疾患は、炎症に基づく疾患であるので、免疫反応の問題が悪化する。これらには、細胞を免疫学的寛容部位に投与すること、あるいは、代替では、最初は自己免疫障害を抑えるために適応されることがある抗炎症性処置を提供して、および/または、非自己/半自己の細胞を移植前に免疫隔離性の半透過性膜でカプセル封入して、レシピエントの免疫系を抑制することのどちらもが含まれる。

【0262】

本明細書中上記で述べられたように、本発明者らはまた、免疫反応を制限するための新生児間葉系幹細胞の使用を提案する。

40

【0263】

下記の実験が、神経学的障害を処置するための、臍帯/胎盤から単離される新生児MSCの潜在的な使用を確認するために行われる場合がある。

1) 分化MSC（様々な神経細胞または神経始原体細胞に至るもの）が、同種T細胞との一方向混合リンパ球培養において刺激因子として役立つ場合があり、同じドナーから単離される同種リンパ球に対して応答するT細胞との比較での増殖応答が、低応答性を実証するために³H-チミジン取り込みによって評価される場合がある。

2) 分化MSCが、T細胞により媒介される増殖応答に対する免疫抑制影響を確認するために、一方向混合リンパ球培養に対して、また、T細胞マイトジェン（フィトヘマグル

50

チニンおよびコンカナバリン A) との細胞培養に対して添加 / 共培養される場合がある。

3) Brown Norway ラットから培養される臍帯細胞および胎盤細胞 (非改変細胞および分化細胞) が MSC について富化される場合があり、これらの細胞が、誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を有する Lewis ラットに注入される場合がある。代替では、BALB / c マウスの (BALB / c x C57BL / 6) F1 から培養される臍帯細胞および胎盤細胞、または、Brown Norway ラットから得られる異種細胞 (非改変細胞および分化細胞) が MSC について富化される場合があり、これらの細胞が、誘導された実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を有する C57BL / 6 または SJL / j レシピエントに注入される場合がある。麻痺に対する臨床効果が、異種の MHC、完全不一致 MSC またはハプロタイプ一致した不一致 MSC の治療効果を評価するために調べられる場合がある。そのような実験は、遺伝的障害または遺伝的傾向のある障害を有する患者を家族の一員のハプロタイプ一致した MSC により処置するための基礎を提供する場合がある。

10

4) 臍帯および胎盤から培養される BALB / c の MSC が、GFP または RFP により標識されるプレ - mi R とともに輸注される場合がある (この場合、GFP または RFP は、本発明者らが、誘導された EAE を有する C57BL / 6 レシピエントの脳におけるこれらの細胞の遊走および持続を追跡することを可能にするであろう) 。標識された MHC 不一致の分化 MSC の臨床効果が、疾患、麻痺および組織病理学の兆候をモニターすることによって評価される場合がある。そのような細胞の遊走および局在化もまた、遺伝的に形質導入された GFP 「緑色」ドナーまたは Red 2 「赤色」ドナーに由来する蛍光性細胞を使用することによってモニターされる場合がある。

20

【0264】

述べられたように、本発明ではまた、免疫応答を最小限に抑えるためのカプセル化技術も意図される。

【0265】

カプセル化技術は一般には、小さい球状ビヒクルを伴うマイクロカプセル化として、また、より大きい平坦シートおよび中空繊維膜を伴うマクロカプセル化として分類される (Uludag, H. 他、Technology of mammalian cell encapsulation、Adv Drug Deliv Rev、2000、42 : 29 ~ 64) 。

30

【0266】

マイクロカプセルを調製する様々な方法が当技術分野で公知であり、これらには、例えば、下記によって開示される方法が含まれる : Lu M Z 他、Cell encapsulation with alginate and alpha - phenoxycinnamylidene - acetylated poly (allylamine) 、Biotechnol Bioeng、2000、70 : 479 ~ 83 ; Chang T M および Prakash S、Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms、Mol. Biotechnol、2001、17 : 249 ~ 60、ならびに、Lu M Z 他、A novel cell encapsulation method using photosensitive poly (allylamine alpha - cyanocinnamylideneacetate) 、J. Microencapsul、2000、17 : 245 ~ 51。

40

【0267】

例えば、マイクロカプセルが、修飾コラーゲンを、メチルアタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル (HEMA) 、メタクリル酸 (MAA) およびメタクリル酸メチル (MMA) のターポリマー殻と複合体化することによって調製され、これは 2 ~ 5 . mu . m のカプセル厚さを生じさせる。そのようなマイクロカプセルはさらに、負荷電の滑らかな表面を与えるために、また、血漿タンパク質の吸収を最小限に抑えるために、さらなる 2 ~ 5 . mu

50

. mのターポリマー殻によりカプセル化することができる (Chia, S. M. 他、Multi-layered microcapsules for cell encapsulation、Biomaterials、2002、23: 849 ~ 56)。

【0268】

他のマイクロカプセルが、海洋多糖であるアルギン酸塩 (Sambanis, A.、Encapsulated islets in diabetes treatment、Diabetes Technol Ther、2003、5: 665 ~ 8) またはその誘導体に基づく。例えば、マイクロカプセルを、ポリアニオンのアルギン酸ナトリウムおよびセルロース硫酸ナトリウムと、ポリカチオンのポリ (メチレン - co - グアニジン) 塩酸塩との間における塩化カルシウム存在下での高分子電解質複合体化によって調製することができる。

10

【0269】

細胞のカプセル化が、より小さいカプセルが使用されるときには改善されることが理解されるであろう。したがって、カプセル化された細胞の品質管理、機械的安定性、拡散特性およびインビトロ活性が、カプセルサイズが1mmから400 . mu . mに縮小されたときに改善した (Canaple L. 他、Improving cell encapsulation through size control、J Biomater Sci Polym Ed、2002、13: 783 ~ 96)。そのうえ、7nmもの小さい十分に制御された細孔サイズ、調整された表面化学、および、精密な微細構造様式を有するナノ多孔性バイオカプセルが、細胞のための微小環境を首尾良く免疫隔離することが見出された (Williams D、Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices、Med Device Technol、1999、10: 6 ~ 9; および Desai, T. A.、Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation、Expert Opin Biol Ther、2002、2: 633 ~ 46)。

20

【0270】

免疫抑制剤の例には、メトトレキサート、シクロホスファミド、シクロスポリン、シクロスポリンA、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン (スルファサラジピリン)、金塩、D - ペニシラミン、レフルノミド、アザチオプリン、アナキンラ、インフリキシマブ (REMICADE (商標))、エタネルセプト、TNFアルファ遮断剤、炎症性サイトカインを標的とする生物学的作用因、および、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) が含まれるが、これらに限定されない。NSAIDの例には、アセチルサリチル酸、サリチル酸コリンマグネシウム、ジフルニサル、サリチル酸マグネシウム、サルサラート、サリチル酸ナトリウム、ジクロフェナク、エトドラク、フェノプロフェン、フルビプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ケトロラク、メクロフェナマート、ナプロキセン、ナブメトン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、Cox - 2 阻害剤およびトラマドールが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0271】

本明細書中に記載される方法のどれにおいても、細胞は、それ自体で、または、好ましくは、医薬的に許容される担体をさらに含む医薬組成物の一部としてそのどちらでも投与することができる。

【0272】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される細胞組成物の1つまたは複数と、他の化学的成分 (例えば、医薬的に好適な担体および賦形剤など) との調製物を示す。医薬組成物の目的は、対象に対する細胞の投与を容易にすることである。

【0273】

本明細書中以降、表現「医薬的に許容される担体」は、対象に対する著しい刺激を生じ

50

させず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性および性質を妨げない担体または希釈剤を示す。担体の非限定的な例としては、ポリプロピレングリコール、生理食塩水、乳剤、および有機溶媒と水の混合物が挙げられる。

【0274】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、化合物の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0275】

薬物の配合および投与のための技術が「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA、最新版)に見出されることができ、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

10

【0276】

好適な投与経路には、血液循環(静脈または動脈内)内へ、髄液内へ、または関心のある組織もしくは器官内への直接投与を含む。したがって、例えば細胞は脳内へ直接投与されることができる。

【0277】

本発明の方法において使用されるいかなる調製物についても、投与量または治療有効量は、生体外および細胞培養アッセイから最初に推定されることができる。好ましくは、投与量は、所望の濃度または力価を達成するために動物モデルにおいて決定される。そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用されることができる。

20

【0278】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、生体外、細胞培養物、または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定されることができる。例えば、脱髄性疾患の動物モデルには、シバラー(s h i / s h i、MBP欠失)マウス、MDラット(PLP欠損)、Jumpyマウス(PLP変異)、イヌの身震いする子犬(PLP変異)、単収縮体マウス(ガラクトシルセラミダーゼ欠如、ヒトのグラッペ病の場合のように)、振せん体マウス(PMP-22欠損)が含まれる。ウイルス誘導の脱髄モデルは、タ

30

【0279】

これらの生体外、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量範囲を定めるために使用されることができる。投与量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化する。正確な配合、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択されることができる(例えば、Fingl他、(1975)「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1を参照のこと)。例えば、多発性硬化症患者を、処置に対する陽性の応答を示している改善された運動機能について症候的にモニターすることができる。

40

【0280】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合しうる緩衝液(例えば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理学的な食塩緩衝液など)において配合されることができる。

【0281】

投薬量および投薬間隔は、脳疾患/障害を効果的に処置するために十分である有効成分のレベルに個々に調節され得る。所望される効果を達成するために必要である投薬量は、個体の特徴および投与経路に依存するであろう。様々な検出アッセイを、血漿中濃度を求めるために使用されることができる。

50

【0282】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は、単回または複数回投与で行われることができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、または疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

【0283】

投与されるための組成物の量は当然のことながら、処置されている個体、病気の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存しているであろう。投与量および投与時期が、個体の変化する状態の注意深い連続したモニタリングに応じて変わるであろう。例えば、処置された多発性硬化症患者には、モニターしている徴候に基づいて、疾患の症状を軽減するために十分である量の細胞が投与されるであろう。

10

【0284】

本発明の細胞は、神経変性障害を処置することにおいて有用である治療剤、例えば、グリコチド；抗生物質、神経伝達物質、神経ホルモン、トキシン、神経突起促進分子；ならびに、神経伝達物質分子（例えば、L-DOPAなど）の代謝拮抗剤および前駆体などとともに共投与され得る。

【0285】

本明細書中で使用される用語「約」は、 $\pm 10\%$ を示す。

【0286】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など）、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値（例えば、1、2、3、4、5および6）を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

20

【0287】

本明細書中で使用される用語「方法（method）」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

30

【0288】

本明細書で使用される場合、用語「治療する／処置する」には、状態の進行を取り消すこと、実質的に阻害すること、遅くすること、または、逆向きにすること、状態の臨床的症状または審美的症状を実質的に改善すること、あるいは、状態の臨床的症状または審美的症状の出現を実質的に防止することが含まれる。

【0289】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴が、単一の実施形態に組み合わせて提供されることもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで、あるいは本発明の他の記載される実施形態において好適なように提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であるとは見なされるべきではない。

40

【0290】

本明細書中上記に描かれるような、および、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

50

【0291】

本明細書中で使用される用語「約」は、 $\pm 10\%$ を示す。

【0292】

用語「含む／備える (comprises、comprising、includes、including)」、「有する (having)」、およびそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない (including but not limited to)」ことを意味する。

【0293】

用語「からなる (consisting of)」は、「含み、それらに限定される (including and limited to)」ことを意味する。

10

【0294】

表現「から本質的になる (consisting essentially of)」は、さらなる成分、工程および／または部分が、主張される組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物、方法または構造がさらなる成分、工程および／または部分を含み得ることを意味する。

【0295】

本明細書中で使用される場合、単数形態（「a」、「an」および「the」）は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物 (a compound)」または用語「少なくとも1つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含し得る。

20

【0296】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など）、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値（例えば、1、2、3、4、5および6）を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

【0297】

30

数値範囲が本明細書中で示される場合には常に、示された範囲に含まれる任意の言及された数字（分数または整数）を含むことが意味される。第1の示された数字および第2の示された数字「の範囲である／の間の範囲」という表現、および、第1の示された数字「から」第2の示された数「まで及ぶ／までの範囲」という表現は、交換可能に使用され、第1の示された数字と、第2の示された数字と、その間のすべての分数および整数とを含むことが意味される。

【0298】

本明細書中で使用される用語「方法 (method)」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

40

【0299】

本明細書で使用される場合、用語「治療する／処置する」には、状態の進行を取り消すこと、実質的に阻害すること、遅くすること、または、逆向きにすること、状態の臨床的症状または審美的症状を実質的に改善すること、あるいは、状態の臨床的症状または審美的症状の出現を実質的に防止することが含まれる。

【0300】

本明細書で記載される各miRについて対応する配列（成熟およびプレ）が本明細書の

50

部分として見なされるべきである配列表に与えられる。

【0301】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴が、単一の実施形態に組み合わせて提供されることもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで、あるいは本発明の他の記載される実施形態において好適なように提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であるとは見なされるべきではない。

【0302】

本明細書中上記に描かれるような、および、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

【実施例】

【0303】

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

【0304】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrook他、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I~II巻、Ausubel, R. M. 編(1994)；Ausubel他、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、米国ニューヨーク(1988)；Watson他、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birren他編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク(1998)；米国特許の第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5192659号および同第5272057号に記載される方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻、Cellis, J. E. 編(1994)；「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」Freshney編, Wiley-Liss, N. Y. (1994), 第3版；「Current Protocols in Immunology」I~III巻、Coligan, J. E. 編(1994)；Stites他編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994)；MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co., 米国ニューヨーク(1980)；利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば：米国特許の第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号および同第5281521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J.

10

20

30

40

50

編(1984);「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編(1985);「Transcription and Translation」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編(1984);「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編(1986);「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press(1986);「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B. (1984) および「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press;「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ(1990); Marshak 他、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press(1996);これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0305】

実施例 1

間葉系幹細胞(MSC)の神経幹細胞(NSC)への分化

方法

骨髄、脂肪、胎盤または臍帯のどれからも得られる間葉系幹細胞(MSC)を、細菌用ディッシュにおいて高密度で、10mg/mlのEGFおよびbFGFが補充される血清非含有培地に10日間置床した。細胞は凝集し始め、4~5日後において、プレートからのそれらの剥離を促進させるために機械的に解離させた。その後、細胞を2週間維持し、その後、細胞をNSCマーカーの発現について、また、低血清(5%)培地においてラミニンに置床したときには、ニューロン、星状膠細胞および乏突起膠細胞を生じさせることができるかについて分析した。

【0306】

その後、細胞を、記載されるようなmiRNAマイクロアレイに供した。

【0307】

結果

図1A~図1Bに例示されるように、間葉系幹細胞は神経幹細胞分化の後でニューロンマーカーを発現した。

【0308】

実施例 2

NSC分化期間中でのmiRNA発現における変化

材料および方法

様々なmiRNAは、様々な神経細胞および神経幹細胞の分化において役割を果たすことが示されている。特異的miRNAの発現および機能をMSC由来のNSCにおいて分析するために、MSCを実施例1に記載されるようにNSCに向かって分化させ、miRNAアレイ分析を対照細胞および分化細胞に対して行った。幹細胞にすべてが関連づけられ、幹細胞とのそれらの公知の関連に基づいてサブグループ(神経関連miRNA、造血miRNAおよび器官関連miRNA)に分けられた96個のmiRNAを含有するqRT-PCRマクロアレイを行った。

【0309】

対照MSCおよび分化MSCにおける特異的miRNAの示差的発現を分析するために、幹細胞マイクロRNAのqPCRアレイを、使用者プロトコル(その内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)に従って、SBI社から得られるquantimiR(カタログ#RA620A-1)とともに用いた。qPCRのために、Applied Bio

10

20

30

40

50

systems Power SYBRマスタミックス (cat # 4367659) を使用した。

【0310】

このシステムは、2つの別個の実験用RNAサンプルの間における95個の別々のマイクロRNAの倍数差を定量化することを可能にする。アレイプレートはまた、U6転写物を正規化シグナルとして含む。アレイのために選ばれる95個すべてのマイクロRNAは、幹細胞自己再生、造血、ニューロン発達および分化組織特定における可能性のある役割に関して、公表された意味付けを有する。アレイプレートはまた、U6 RNAを正規化シグナルとして含む。

【0311】

総RNAを、サイズが200bp未満であるRNA画分を単離するQiagenから得られるmiRneasy総RNA単離キット (カタログ# 217004) を使用して、対照MSCおよび分化MSCの 10^5 個~ 10^6 個の細胞から単離した。

【0312】

500ngの総RNAを、“SBI Stem Cell MicroRNA qPCR Array with QuantiMir (商標)” (Cat. # RA620A-1) の使用者プロトコルに従って処理した。qPCRのために、Applied Biosystems Power SYBRマスタミックス (cat # 4367659) を使用した。

【0313】

妥当性確認のために、目的とする特異的miRNAのsybr-green qPCRを、QIAGEN社のmiScript Systemのハンドブック (cat. # 218061 & 218073) に従って処理される同じRNAサンプルに対して行った。

【0314】

96個のmiRNAの発現を検出するHu hsa-miRマイクロRNAプロファイリングキット (System Biosciences) “SBI Stem Cell MicroRNA qPCR Array with QuantiMir (商標)” (Cat. # RA620A-1) を使用して、星状膠細胞に分化させられるMSCと比較される非改変のBM-MSCにおけるmiRNAのプロファイリングを行った。500ngの総RNAをポリAポリメラーゼによってその3'末端に対してポリ(A)によりタグ化し、QuantiMir RT技術によってオリゴdTアダプターとともに逆転写した。miRNAの発現レベルを、SYBRグリーン試薬およびVIA7を使用する定量的PCRによって、すなわち、リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) によって測定した。すべてのmiRNAをmiRNA特異的順方向プライマーおよび万能的逆方向プライマー (SBI) により測定することができた。miRNAの発現レベルを、下記の式により計算されるような相対的定量化のための比較CT法を使用して、U6 snRNAに対して正規化した： $2^{-[(CT_{星状膠細胞} - CT_{miRNA} - CT_{星状膠細胞内因性対照}) - (CT_{DMEEM} - CT_{miRNA} - CT_{DMEEM内因性対照})]}$ 。

【0315】

加えて、Affymetrix社のmiRNA 3.0アレイを使用して、BM-MSCおよびヒトNSCを比較し、示差的に発現されたmiRNAを特定した。

【0316】

結果

図2、図3および図4Aに示されるように、各グループの特異的miRNAの発現における有意な変化が対照MSCと分化MSCとの間に存在した。

【0317】

Affymetrix社のmiRNA 3.0アレイによる分析の結果が本明細書中下記の表1に詳しく記載される。

10

20

30

40

表 1

| MSCs/NSCs | アップレギュレーション | MSCs/NSCs | ダウンレギュレーション | | |
|---------------------|-------------|-----------------------|-------------|------------------------|----------|
| miRNA | 倍数変化 | miRNA | 倍数変化 | miRNA | 倍数変化 |
| hsa-miR-145_st | 1379.78 | hsa-let-7c_st | -1.53698 | hsa-miR-324-3p_st | -7.34456 |
| hsa-miR-143_st | 752.7381 | hsa-miR-665_st | -1.58884 | hsa-miR-20a_st | -7.83858 |
| hsa-miR-214_st | 552.6854 | hsa-miR-4258_st | -1.61841 | hsa-miR-501-5p_st | -8.36351 |
| hsa-miR-199a-3p_st | 511.1263 | hsa-miR-361-3p_st | -1.63684 | hsa-miR-330-3p_st | -8.71869 |
| hsa-miR-199a-5p_st | 362.5667 | hsa-miR-374a-star_st | -1.76218 | hsa-miR-874_st | -9.13392 |
| hsa-miR-199b-3p_st | 347.4311 | hsa-miR-892b_st | -1.85672 | hsa-miR-500_st | -9.68441 |
| hsa-miR-138_st | 229.2463 | hsa-miR-361-5p_st | -1.90874 | hsa-miR-25_st | -9.86881 |
| hsa-miR-31_st | 190.5331 | hsa-miR-181a_st | -1.93941 | hsa-miR-769-5p_st | -10.1382 |
| hsa-miR-21_st | 59.83459 | hsa-miR-16_st | -2.19583 | hsa-miR-125b-2-star_st | -10.3325 |
| hsa-miR-193a-5p_st | 23.8986 | hsa-miR-636_st | -2.27398 | hsa-miR-130b_st | -16.7436 |
| hsa-miR-224-star_st | 21.60842 | hsa-miR-4284_st | -2.79417 | hsa-miR-504_st | -16.9435 |
| hsa-miR-196a_st | 21.38142 | hsa-miR-1208_st | -3.00768 | hsa-miR-181a-2-star_st | -17.7877 |
| hsa-miR-487b_st | 19.18475 | hsa-miR-1274b_st | -3.01855 | hsa-miR-885-3p_st | -20.1501 |
| hsa-miR-409-5p_st | 17.45522 | hsa-miR-30c-2-star_st | -3.46182 | hsa-miR-1246_st | -21.0971 |

10

20

30

| | | | | | |
|----------------------|----------|---------------------|----------|--------------------|----------|
| hsa-miR-193b-star_st | 10.34438 | hsa-miR-501-3p_st | -3.49025 | hsa-miR-92b_st | -22.8735 |
| hsa-miR-379_st | 9.571106 | hsa-miR-92a_st | -3.7152 | hsa-miR-362-5p_st | -23.3686 |
| hsa-miR-21-star_st | 8.401508 | hsa-miR-378b_st | -3.72739 | hsa-miR-572_st | -23.3743 |
| hsa-miR-27a-star_st | 7.080883 | hsa-miR-1287_st | -3.87466 | hsa-miR-4270_st | -24.4173 |
| hsa-miR-27a_st | 6.122331 | hsa-miR-425-star_st | -4.0524 | hsa-miR-378c_st | -26.6758 |
| hsa-miR-4317_st | 5.715753 | hsa-miR-324-5p_st | -4.37339 | hsa-miR-93-star_st | -28.4948 |
| hsa-miR-193b_st | 4.920511 | hsa-miR-3178_st | -4.40631 | hsa-miR-149_st | -28.7369 |
| hsa-miR-27b_st | 4.889609 | hsa-miR-219-1-3p_st | -4.52146 | hsa-miR-363_st | -28.9968 |
| hsa-miR-22_st | 4.798265 | hsa-miR-197_st | -4.609 | hsa-miR-9_st | -31.2283 |
| hsa-miR-574-3p_st | 3.402782 | hsa-miR-181b_st | -4.61406 | hsa-miR-18a_st | -32.3908 |
| hsa-miR-4288_st | 3.375774 | hsa-miR-500-star_st | -4.72807 | hsa-miR-891a_st | -33.1912 |
| hsa-miR-23a_st | 3.34163 | hsa-miR-106b_st | -4.96582 | hsa-miR-346_st | -38.7283 |
| hsa-miR-221-star_st | 3.09015 | hsa-miR-502-3p_st | -4.97984 | hsa-miR-124_st | -50.7583 |
| hsa-miR-2113_st | 3.030064 | hsa-miR-30c_st | -5.17107 | hsa-miR-497_st | -72.2314 |
| hsa-let-7i_st | 2.551577 | hsa-miR-1275_st | -5.29365 | hsa-miR-378_st | -73.6306 |
| hsa-miR-24_st | 2.300083 | hsa-miR-422a_st | -5.54416 | hsa-miR-1231_st | -82.7066 |
| hsa-miR-23b_st | 2.217338 | hsa-miR-93_st | -5.6233 | hsa-miR-139-5p_st | -92.6078 |
| hsa-miR-299-3p_st | 2.201907 | hsa-miR-181d_st | -5.74741 | hsa-miR-3180-3p_st | -94.3695 |
| hsa-miR-518c-star_st | 2.197822 | hsa-miR-1307_st | -5.82664 | hsa-miR-9-star_st | -114.107 |
| hsa-miR-221_st | 2.186328 | hsa-miR-1301_st | -5.84397 | hsa-miR-935_st | -140.688 |
| hsa-miR-431-star_st | 2.177192 | hsa-miR-99a_st | -5.88481 | hsa-miR-20b_st | -156.762 |
| hsa-miR-523_st | 2.116276 | hsa-miR-505-star_st | -5.9383 | | |
| hsa-miR-4313_st | 1.937531 | hsa-miR-1202_st | -5.94177 | | |
| hsa-miR-559_st | 1.916531 | hsa-miR-128_st | -6.05212 | | |
| hsa-miR-614_st | 1.894046 | hsa-miR-532-5p_st | -6.11976 | | |
| hsa-miR-653_st | 1.803374 | hsa-miR-195_st | -6.5161 | | |

10

20

30

40

| | | | | | |
|-----------------------|----------|-------------------|----------|--|--|
| hsa-miR-2278_st | 1.675887 | hsa-miR-532-3p_st | -6.66014 | | |
| v11_hsa-miR-768-5p_st | 1.647103 | hsa-miR-106a_st | -6.91155 | | |
| hsa-miR-154-star_st | 1.608659 | hsa-miR-17_st | -6.91565 | | |
| hsa-miR-302a-star_st | 1.598961 | hsa-miR-1271_st | -7.05548 | | |
| hsa-miR-3199_st | 1.580479 | hsa-miR-769-3p_st | -7.1367 | | |
| hsa-miR-3137_st | 1.476948 | hsa-miR-15b_st | -7.31636 | | |

10

【 0 3 1 8 】

ネスチンプロモーターに基づくレポーターアッセイを使用して、本発明者らは、miR-20b、miR-935、miR-891およびmiR-378の過剰発現がまた、MSCのNSCへの分化を誘導したことを確認した（図4B）。

【 0 3 1 9 】

同様に、miR-138、miR-214、miR-199aおよびmiR-199bのサイレンシングがすべてのMSCの間葉系表現型を低下させ、それらのNSC分化を誘導した（図4C）。

20

【 0 3 2 0 】

miR-20bまたはmiR-378のantagomiR-138との組合せを用いたMSCの共トランスフェクションは、MSCのネスチン陽性細胞への分化をさらに増大させた（図4D）。

【 0 3 2 1 】

図4E～図4Fに示されるように、antagomiR-138およびmiR-891模倣体の過剰発現は、ネスチン-GFPレポーターにより形質導入される細胞の増大した蛍光強度によって明らかにされるように、トランスフェクションされたMSCにおけるネスチン陽性細胞の生成における有意な増大を誘導した。

30

【 0 3 2 2 】

実施例3

MSCのNSCへの分化において役割を果たすmiRNA

本発明者らはさらに、MSCのNSCへの分化のときにmiRマイクロアレイにおいて変化することが見出された特異的miRNAの役割を調べた。これらの実験を、特異的な成熟型miRNA模倣体またはmiRNA阻害剤、あるいは、成熟型miRNA模倣体またはmiRNA阻害剤の組合せのどちらかによりMSCをトランスフェクションすることによって行い、その後、ニューロスフェアを生じさせ、かつ、マーカーのネスチンおよびSox2を発現するそれらの能力を調べた。

40

【 0 3 2 3 】

結果

miR-124の発現と一緒にlet-7の阻害がNSC分化を増大させたことが見出された。

【 0 3 2 4 】

加えて、下記miRNA、すなわち、miR302b、miR-371、miR-134、miR-219、miR-154、miR-155、miR-32、miR-33、miR-126およびmiR-127のアップレギュレーション、ならびに、下記miR、すなわち、miR-10b、miR-142-3p、miR-131a、miR-125b、miR-153およびmiR-181aのダウンレギュレーションは、単独または

50

様々な組合せのどちらでも、種々の程度にもかかわらず、MSCのNSCへの分化を誘導したことが見出された。

【0325】

miRNAアレイにおいて記載されたmiRNAに加えて、miR-132およびmiR-137によるMSCのトランスフェクションもまたNSC分化を増大させることがまた見出された。

【0326】

実施例4

MSCのNSCへの分化を促進させるさらなる因子

Related to testis-specific, vespid and pathogenesisタンパク質1(RTV P-1)が、2つのグループによってヒトGBM細胞株からクローン化され、神経膠腫病理発生関連タンパク質、すなわち、GLIPR1またはRTVP-1と名づけられた[3]。RTVP-1は、TPX-1[4]、毒液アレルゲン抗原5[5]、および、植物病理発生関連タンパク質のグループ1(PR-1)を含む他のRTVP-1ホモログにもまた見出される未だに不明の機能とともに、推定されるシグナルペプチド、膜貫通ドメインおよびSCPドメインを含有する。RTVP-1が神経膠腫において腫瘍プロモーターとして作用することが近年には報告されている。したがって、RTVP-1の発現は星状膠細胞腫瘍の悪性度と相関し、また、RTVP-1の過剰発現は、細胞増殖、浸潤、遊走および足場非依存的成長を増大させる。そのうえ、RTVP-1のサイレンシングはアポトーシスを神経膠腫細胞株および原発性神経膠腫培養物において誘導する[6]。興味深いことに、RTVP-1は前立腺ガン細胞において腫瘍抑制因子として作用し、また、RTVP-1のアデノウイルス媒介送達治療効果をマウス前立腺ガンモデルにおいて有する[7~9]。

【0327】

結果

RTVP-1のMSCにおける発現は、ウエスタンブロットによって明らかにされるように非常に大きい(図5A)。そのうえ、RTVP-1のMSCにおけるサイレンシングは、間葉系譜細胞に分化するその能力をなくし、神経幹細胞マーカーおよび神経マーカーの発現を低下させた(図5C~図5D)。

【0328】

さらに、RTVP-1のMSCにおけるサイレンシングはネスチンおよびSox2の両方の発現を増大させ、また、ベータ3チューブリンのレベルをいくらか増大させた(データは示されず)。

【0329】

興味深いことに、RTVP-1がmiR-137の新規な標的であることが見出された。このことは、MSCのNSC分化に対するmiR-137の正の影響がRTVP-1によって媒介され得ることを示唆する。

【0330】

RTVP-1の役割をさらに調べるために、その発現を、MSC、NSC、および、NSCに分化させられたMSCにおいて調べた。

【0331】

ヒトNSCはRTVP-1を全く発現せず(データは示されず)、RTVP-1のMSCにおける発現が、調べられたMSCの供給源にかかわらず、NSCに分化させられたMSCの発現よりも有意に大きかった(図5E)。

【0332】

RTVP-1過剰発現のヒトNSCにおける影響を調べた。これらの細胞が間葉系表現型を獲得し、とりわけ、脂肪細胞に分化しやすくなったことが見出された(データは示されず)。

【0333】

調べられた種々のMSCにおけるRTVP-1のサイレンシングはこれらの細胞におけ

10

20

30

40

50

るネスチンの発現を増大させた（図5F）。

【0334】

間葉系の形質転換に対するRTVP-1の影響をさらに分析するために、遺伝子アレイ分析を、RTVP-1の発現が沈黙させられたBM-MSCに対して行った。RTVP-1のサイレンシングはALDH1A3の発現を3.2倍増大させ、VAV3の発現を15倍増大させ、CD200の発現を5倍増大させ、また、幹細胞性マーカーのOct4、NanogおよびSox2の発現を、2.3倍、3.4倍および4.2倍それぞれ増大させた。まとめると、これらの結果は、RTVP-1がこれらの細胞の増殖および幹細胞性シグナチャーを低下させることを示している。

【0335】

対照的に、RTVP-1は、ある種の遺伝子の発現を増大させた（例えば、ネスチン（3.4倍）、NKX2.2（4.7倍）およびカルシウムチャネル電位依存性型（3倍）など）。

【0336】

まとめると、これらの結果はRTVP-1を主要な間葉調節因子として暗示しており、RTVP-1のサイレンシングが、神経表現型を有する細胞へのMSCの分化を誘導することを明らかにする。

【0337】

実施例5

神経始原体細胞の運動ニューロンへの分化

材料および方法

プレートを20μg/mlのラミニンにより一晚被覆し、その後、PBSにより2回洗浄した。NPCを50%のコンフルエンスで置床し、24時間後、プライミング培地、すなわち、ヘパリン（10μg/mlを使用する）およびbFGF（100μg/ml）を有するNM培地と5日間インキュベーションした。5日後、培地を、分化培地、すなわち、50mLのF12における1mLのB27（すなわち、2%）、レチノイン酸（RA、1μM）およびSHH（200ng/mL）を有するF12に変更した。RAを1日おきに加えた。5日後、GDNFおよびBDNFを培地に加えた（10ng/mL）。

【0338】

結果

発達中の脊髄において、運動ニューロン（MN）および乏突起膠細胞（OLP）の逐次生成が認められる。最初にMNを生じさせ、その後、乏突起膠細胞を生じさせるpMNと呼ばれる共通の始原体が存在する。塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス（bHLH）転写因子のOlig2がpMNDメインにおいて発現され、Olig2は、両方の細胞タイプの発達において役割を果たす重要な転写因子の1つである。200ng/mlの組換えSHH、それぞれが20ng/mlのGDNF、BDNF、CNTFおよびNT-3、ならびに、1mMのレチノイン酸が補充されるNM培地で成長させられたMSCにおけるOlig2の過剰発現は、運動ニューロンの2つの特異的マーカー、すなわち、Hb9およびIsl1の発現を誘導した（図6A～図6D）。

【0339】

実施例6

NPCの運動ニューロンへの分化におけるmiRNAの関与

材料および方法

運動ニューロン分化と関係する特異的なmiRNAを特定するために、本発明者らは、実施例5に記載されるプロトコルを使用して、2つのタイプの神経幹細胞/始原体細胞を発達の異なる段階にある運動ニューロンに分化させた。運動ニューロンとしての細胞の特徴づけを、特異的マーカーのIsl1、Hb9、ならびに、ニューロンマーカーのニューロフィラメントおよび3チューブリンの発現によって特徴づけた。

【0340】

運動ニューロンにおける特異的miRNAの発現および機能を分析するために、本明細

10

20

30

40

50

書中上記で記載される神経始原体細胞システムを使用した。miRNAアレイ分析を対照細胞および分化細胞に対して行った。実施例2に記載されるように、幹細胞にすべてが関連づけられ、かつ、幹細胞とのそれらの公知の関連に基づいてサブグループ(神経関連miRNA、造血miRNAおよび器官関連miRNA)に分けられた96個のmiRNAを含有したqRT-PCRマイクロアレイ。

【0341】

結果

図7A～図7Bに例示されるように、神経幹細胞が、運動ニューロンに分化するように誘導される場合がある。

【0342】

図8～図10に示されるように、各グループの特異的miRNAの発現における有意な変化が対照MSCと分化MSCとの間に存在した。

【0343】

qRT-PCR研究を、対照細胞と分化細胞との間で認められたmiRNA発現における差を検証するために行った。

【0344】

マイクロアレイのデータに関して得られた結果と類似して、qRT-PCRの結果により、miR372、miR373、miR141、miR199a、miR32、miR33、miR221およびmiR223における低下が明らかにされた。

【0345】

対照的に、有意な増大が、アレイにおいて増大したmiRNAのすべてにおいて、具体的には下記のmiRNAにおいて認められた：miR-368、302b、365-3p、365-5p、Let-7a、Let-7b、218、134、124、125a、9、154、20a、130a。

【0346】

本発明者らはさらに、MSCの運動ニューロンへの分化における特異的miRNAの役割を調べた。Let-7aおよびmiR-124、miR-368およびmiR-154の組合せが、Hb9およびIslet-1の発現を増大させたことが見出された。同様に、miR-125a、9、130aおよび218、134および20aの互いの組合せ、ならびに、miR-141、32、33、221、223およびmiR373のmiRNA阻害剤との組合せでの組合せによるトランスフェクションもまた、運動ニューロン始原体または未成熟な運動ニューロンへのどちらに対してもMSCの分化を誘導した。

【0347】

実施例7

配列

表 2

| 名称 | 成熟miRNAの配列 | プレmiRNAの配列 |
|------------|------------|------------|
| hsa-let-7a | 配列番号: 1 | 配列番号: 73 |
| | | 配列番号: 74 |
| | | 配列番号: 75 |
| hsa-let-7b | 配列番号: 2 | 配列番号: 76 |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|----------|-----------|
| hsa-let-7c | 配列番号: 3 | 配列番号: 77 |
| hsa-let-7d | 配列番号: 4 | 配列番号: 78 |
| hsa-let-7e | 配列番号: 5 | 配列番号: 79 |
| hsa-let-7f | 配列番号: 6 | 配列番号: 80 |
| hsa-let-7g | 配列番号: 7 | 配列番号: 81 |
| hsa-let-7i | 配列番号: 8 | 配列番号: 82 |
| hsa-mir-106a | 配列番号: 9 | 配列番号: 83 |
| hsa-mir-106b | 配列番号: 10 | 配列番号: 84 |
| hsa-mir-1294 | 配列番号: 11 | 配列番号: 85 |
| hsa-mir-1297 | 配列番号: 12 | 配列番号: 86 |
| hsa-mir-143 | 配列番号: 13 | 配列番号: 87 |
| hsa-mir-144 | 配列番号: 14 | 配列番号: 88 |
| hsa-mir-145 | 配列番号: 15 | 配列番号: 89 |
| hsa-mir-17 | 配列番号: 16 | 配列番号: 90 |
| miR-181a | 配列番号: 17 | 配列番号: 91 |
| miR-181a | 配列番号: 18 | 配列番号: 92 |
| miR-181b | 配列番号: 19 | 配列番号: 93 |
| miR-181b | 配列番号: 20 | 配列番号: 94 |
| miR-181c | 配列番号: 21 | 配列番号: 95 |
| hsa-mir-181d | 配列番号: 22 | 配列番号: 96 |
| hsa-mir-199a-3p | 配列番号: 23 | 配列番号: 97 |
| hsa-mir-199b-3p | 配列番号: 24 | 配列番号: 98 |
| hsa-mir-202 | 配列番号: 25 | 配列番号: 99 |
| hsa-mir-20a | 配列番号: 26 | 配列番号: 100 |
| hsa-mir-20b | 配列番号: 27 | 配列番号: 101 |
| hsa-mir-2113 | 配列番号: 28 | 配列番号: 102 |
| hsa-mir-25 | 配列番号: 29 | 配列番号: 103 |
| hsa-mir-26a | 配列番号: 30 | 配列番号: 104 |
| | 配列番号: 31 | 配列番号: 105 |
| hsa-mir-26b | 配列番号: 32 | 配列番号: 106 |
| hsa-mir-29a | 配列番号: 33 | 配列番号: 107 |
| hsa-mir-29b | 配列番号: 34 | 配列番号: 108 |
| | | 配列番号: 109 |
| hsa-mir-29c | 配列番号: 35 | 配列番号: 110 |
| hsa-mir-3129-5p | 配列番号: 36 | 配列番号: 111 |
| hsa-mir-3177-5p | 配列番号: 37 | 配列番号: 112 |
| hsa-mir-32 | 配列番号: 38 | 配列番号: 113 |
| hsa-mir-326 | 配列番号: 39 | 配列番号: 114 |
| hsa-mir-330-5p | 配列番号: 40 | 配列番号: 115 |
| hsa-mir-363 | 配列番号: 41 | 配列番号: 116 |

10

20

30

40

| | | |
|-----------------|----------|-----------|
| hsa-mir-3659 | 配列番号: 42 | 配列番号: 117 |
| hsa-mir-3662 | 配列番号: 43 | 配列番号: 118 |
| hsa-mir-367 | 配列番号: 44 | 配列番号: 119 |
| hsa-mir-372 | 配列番号: 45 | 配列番号: 120 |
| hsa-mir-373 | 配列番号: 46 | 配列番号: 121 |
| hsa-mir-3927 | 配列番号: 47 | 配列番号: 122 |
| hsa-mir-4262 | 配列番号: 48 | 配列番号: 123 |
| hsa-mir-4279 | 配列番号: 49 | 配列番号: 124 |
| hsa-mir-4458 | 配列番号: 50 | 配列番号: 125 |
| hsa-mir-4465 | 配列番号: 51 | 配列番号: 126 |
| hsa-mir-4500 | 配列番号: 52 | 配列番号: 127 |
| hsa-mir-4658 | 配列番号: 53 | 配列番号: 128 |
| hsa-mir-4724-3p | 配列番号: 54 | 配列番号: 129 |
| hsa-mir-4742-3p | 配列番号: 55 | 配列番号: 130 |
| hsa-mir-4770 | 配列番号: 56 | 配列番号: 131 |
| hsa-mir-519d | 配列番号: 57 | 配列番号: 132 |
| hsa-mir-520a-3p | 配列番号: 58 | 配列番号: 133 |
| hsa-mir-520b | 配列番号: 59 | 配列番号: 134 |
| hsa-mir-520c-3p | 配列番号: 60 | 配列番号: 135 |
| hsa-mir-520d-3p | 配列番号: 61 | 配列番号: 136 |
| hsa-mir-520d-5p | 配列番号: 62 | 配列番号: 137 |
| hsa-mir-520e | 配列番号: 63 | 配列番号: 138 |
| hsa-mir-524-5p | 配列番号: 64 | 配列番号: 139 |
| hsa-mir-642b | 配列番号: 65 | 配列番号: 140 |
| hsa-mir-656 | 配列番号: 66 | 配列番号: 141 |
| hsa-mir-767-5p | 配列番号: 67 | 配列番号: 142 |
| hsa-mir-92a | 配列番号: 68 | 配列番号: 143 |
| | 配列番号: 69 | 配列番号: 144 |
| hsa-mir-92b | 配列番号: 70 | 配列番号: 145 |
| hsa-mir-93 | 配列番号: 71 | 配列番号: 146 |
| hsa-mir-98 | 配列番号: 72 | 配列番号: 147 |

10

20

30

表 3

| 名称 | 成熟miRNAの配列 | プレmiRNAの配列 |
|-----------------|------------|------------|
| hsa-mir-410 | 配列番号: 148 | 配列番号: 156 |
| hsa-mir-3163 | 配列番号: 149 | 配列番号: 157 |
| hsa-mir-148a | 配列番号: 150 | 配列番号: 158 |
| hsa-mir-148b | 配列番号: 151 | 配列番号: 159 |
| hsa-mir-152 | 配列番号: 152 | 配列番号: 160 |
| hsa-mir-3121-3p | 配列番号: 153 | 配列番号: 161 |
| hsa-mir-495 | 配列番号: 154 | 配列番号: 162 |
| | | |
| hsa-mir-4680-3p | 配列番号: 155 | 配列番号: 163 |

表 4

| 名称 | 成熟miRNAの 配列 | PMIR id | プレmiRNAの 配列 |
|------------------------|----------------|-----------|----------------|
| miR-92ap | 配列番号: 164 | MI0000093 | 配列番号: 269 |
| | 配列番号: 165 | MI0000094 | 配列番号: 270 |
| miR-21 | 配列番号: 166 | MI0000077 | 配列番号: 271 |
| miR-26a 5P | 配列番号: 167 | MI0000083 | 配列番号: 272 |
| | 配列番号: 168 | MI0000750 | 配列番号: 273 |
| miR-18a | 配列番号: 169 | MI0000072 | 配列番号: 274 |
| miR-124 | 配列番号: 170 | MI0000445 | 配列番号: 275 |
| | 配列番号: 171 | MI0000443 | 配列番号: 276 |
| | 配列番号: 172 | MI0000444 | 配列番号: 277 |
| miR-99a | 配列番号: 173 | MI0000101 | 配列番号: 278 |
| miR-30c | 配列番号: 174 | MI0000736 | 配列番号: 279 |
| | | MI0000254 | 配列番号: 280 |
| miR-301a 3P | 配列番号: 175 | MI0000745 | 配列番号: 281 |
| miR-145-50 | 配列番号: 176 | MI0000461 | 配列番号: 282 |
| miR-143-3p | 配列番号: 177 | MI0000459 | 配列番号: 283 |
| miR-373 3P | 配列番号: 178 | MI0000781 | 配列番号: 284 |
| miR-20b | 配列番号: 179 | MI0001519 | 配列番号: 285 |
| miR-29c 3P | 配列番号: 180 | MI0000735 | 配列番号: 286 |
| miR-29b 3P | 配列番号: 181 | MI0000105 | 配列番号: 287 |
| | | MI0000107 | 配列番号: 288 |
| miR-143 | | | |
| let-7g | 配列番号: 182 | MI0000433 | 配列番号: 289 |
| let-7a | 配列番号: 183 | MI0000060 | 配列番号: 290 |
| | | MI0000061 | 配列番号: 291 |
| | | MI0000062 | 配列番号: 292 |
| let-7b | 配列番号: 184 | MI0000063 | 配列番号: 293 |
| miR-98 | 配列番号: 185 | MI0000100 | 配列番号: 294 |
| miR-30a* | 配列番号: 186 | MI0000088 | 配列番号: 295 |
| miR-17 | 配列番号: 187 | MI0000071 | 配列番号: 296 |
| miR-1-1 | 配列番号: 188 | MI0000651 | 配列番号: 297 |
| miR-1-2 | 配列番号: 189 | MI0000437 | 配列番号: 298 |
| miR-192 | 配列番号: 190 | MI0000234 | 配列番号: 299 |
| miR-155 | 配列番号: 191 | MI0000681 | 配列番号: 300 |
| miR-516-ap a1- 5p-- | 配列番号: 192 | MI0003180 | 配列番号: 301 |
| a2-3p-- | 配列番号: 193 | MI0003181 | 配列番号: 302 |
| miR-31 | 配列番号: 194 | MI0000089 | 配列番号: 303 |
| miR-181a | 配列番号: 195 | MI0000289 | 配列番号: 304 |
| | 配列番号: 196 | MI0000269 | 配列番号: 305 |
| miR-181b | 配列番号: 197 | MI0000270 | 配列番号: 306 |

10

20

30

40

| | | | |
|--------------------|-----------|------------|-----------|
| | 配列番号: 198 | MI0000683 | 配列番号: 307 |
| miR-181c | 配列番号: 199 | MI0000271 | 配列番号: 308 |
| miR-34-c | 配列番号: 200 | MI0000743 | 配列番号: 309 |
| miR-34b* | 配列番号: 201 | MI0000742 | 配列番号: 310 |
| miR-103a | 配列番号: 202 | MI0000109 | 配列番号: 311 |
| | 配列番号: 203 | MI0000108 | 配列番号: 312 |
| miR-210 | 配列番号: 204 | MI0000286 | 配列番号: 313 |
| miR-16 | 配列番号: 205 | MI0000070 | 配列番号: 314 |
| | 配列番号: 206 | MI0000115 | 配列番号: 315 |
| miR-30a | 配列番号: 207 | MI0000088 | 配列番号: 316 |
| miR-31 | 配列番号: 208 | MI0000089 | 配列番号: 317 |
| miR-222 | 配列番号: 209 | MI0000299 | 配列番号: 318 |
| miR-17 | 配列番号: 210 | MI0000071 | 配列番号: 319 |
| miR-17* | 配列番号: 211 | MI0000071 | 配列番号: 320 |
| miR-200b | 配列番号: 212 | MI0000342 | 配列番号: 321 |
| miR-200c | 配列番号: 213 | MI0000650 | 配列番号: 322 |
| miR-128 | 配列番号: 214 | MI0000447 | 配列番号: 323 |
| | | MI0000727 | 配列番号: 324 |
| miR-503 | 配列番号: 215 | MI0003188 | 配列番号: 325 |
| miR-424 | 配列番号: 216 | MI0001446 | 配列番号: 326 |
| miR-195 | 配列番号: 217 | MI0000489 | 配列番号: 327 |
| miR-1256 | 配列番号: 218 | MI00006390 | 配列番号: 328 |
| miR-203a | 配列番号: 219 | MI0000283 | 配列番号: 329 |
| miR-199 ?? | | | |
| hsa-miR-199a-3p_st | 配列番号: 220 | MI0000242 | 配列番号: 330 |
| hsa-miR-199a-5p_st | 配列番号: 221 | MI0000242 | 配列番号: 331 |
| hsa-miR-199b-3p_st | 配列番号: 222 | MI0000282 | 配列番号: 332 |
| miR-93 | 配列番号: 223 | MI0000095 | 配列番号: 333 |
| miR-98 | 配列番号: 224 | MI0000100 | 配列番号: 334 |
| miR-125-a | 配列番号: 225 | MI0000469 | 配列番号: 335 |
| miR-133a | 配列番号: 226 | MI0000450 | 配列番号: 336 |
| | | MI0000451 | 配列番号: 337 |
| miR-133b | 配列番号: 227 | MI0000822 | 配列番号: 338 |
| miR-126 | 配列番号: 228 | MI0000471 | 配列番号: 339 |
| miR-194 | 配列番号: 229 | MI0000488 | 配列番号: 340 |
| | | MI0000732 | 配列番号: 341 |
| miR-346 | 配列番号: 230 | MI0000826 | 配列番号: 342 |
| miR-15b | 配列番号: 231 | MI0000438 | 配列番号: 343 |
| miR-338-3p | 配列番号: 232 | MI0000814 | 配列番号: 344 |
| miR-373 | | | |
| miR-205 | 配列番号: 233 | MI0000285 | 配列番号: 345 |
| miR-210 | | | |
| miR-125 | | | |
| miR-1226 | 配列番号: 234 | MI0006313 | 配列番号: 346 |
| miR-708 | 配列番号: 235 | MI0005543 | 配列番号: 347 |
| miR-449 | 配列番号: 236 | MI0001648 | 配列番号: 348 |
| miR-422 | 配列番号: 237 | MI0001444 | 配列番号: 349 |

10

20

30

40

| | | | |
|-------------|-----------|-----------|-----------|
| miR-340 | 配列番号: 238 | MI0000802 | 配列番号: 350 |
| miR-605 | 配列番号: 239 | MI0003618 | 配列番号: 351 |
| miR-522 | 配列番号: 240 | MI0003177 | 配列番号: 352 |
| miR-663 | 配列番号: 241 | MI0003672 | 配列番号: 353 |
| miR-130a | 配列番号: 242 | MI0000448 | 配列番号: 354 |
| miR-130b | 配列番号: 243 | MI0000748 | 配列番号: 355 |
| miR-942 | 配列番号: 244 | MI0005767 | 配列番号: 356 |
| miR-572 | 配列番号: 245 | MI0003579 | 配列番号: 357 |
| miR-520 | | | |
| miR-639 | 配列番号: 246 | MI0003654 | 配列番号: 358 |
| miR-654 | 配列番号: 247 | MI0003676 | 配列番号: 359 |
| miR-519 | | | |
| | | | |
| miR-204 | | 配列番号: 248 | MI0000284 |
| miR-224 | 配列番号: 249 | MI0000301 | 配列番号: 360 |
| miR-616 | 配列番号: 250 | MI0003629 | 配列番号: 361 |
| miR-122 | 配列番号: 251 | MI0000442 | 配列番号: 362 |
| miR-299 3p- | 配列番号: 252 | MI0000744 | 配列番号: 363 |
| 5p- | 配列番号: 253 | | 配列番号: 364 |
| | miR-100 | 配列番号: 254 | MI0000102 |
| miR-138 | 配列番号: 255 | MI0000476 | 配列番号: 365 |
| miR-140 | 配列番号: 256 | MI0000456 | 配列番号: 366 |
| miR-375 | 配列番号: 257 | MI0000783 | 配列番号: 367 |
| miR-217 | 配列番号: 258 | MI0000293 | 配列番号: 368 |
| miR-302 | | | 配列番号: 369 |
| miR-372 | 配列番号: 259 | MI0000780 | |
| miR-96 | 配列番号: 260 | MI0000098 | 配列番号: 370 |
| miR-127-3p | 配列番号: 261 | MI0000472 | 配列番号: 371 |
| miR-449 | | | 配列番号: 372 |
| miR-135b | 配列番号: 262 | MI0000810 | |
| miR-101 | 配列番号: 263 | MI0000103 | 配列番号: 373 |
| | | MI0000739 | 配列番号: 374 |
| miR-326 | 配列番号: 264 | MI0000808 | 配列番号: 375 |
| miR-3245p- | 配列番号: 265 | MI0000813 | 配列番号: 376 |
| 3p- | 配列番号: 266 | MI0000813 | 配列番号: 377 |
| miR-335 | 配列番号: 267 | MI0000816 | 配列番号: 378 |
| miR-141 | 配列番号: 268 | MI0000457 | 配列番号: 379 |
| | | | |

10

20

30

表 5

| 名称 | 成熟miRNAの配列 | プレmiRNAの配列 |
|----------|------------|------------|
| miR-1275 | 配列番号: 381 | 配列番号: 414 |
| miR-891a | 配列番号: 382 | 配列番号: 415 |
| miR-154 | 配列番号: 383 | 配列番号: 416 |

40

| | | |
|------------------------|--------------|--------------|
| miR-1202 | 配列番号: 384 | 配列番号: 417 |
| miR-572 | 配列番号: 385 | 配列番号: 418 |
| miR-935a | 配列番号: 386 | 配列番号: 419 |
| miR-4317 | 配列番号: 387 | 配列番号: 420 |
| miR-153 | 配列番号: 388 | 配列番号: 421 |
| | | 配列番号: 422 |
| miR-4288 | 配列番号: 389 | 配列番号: 423 |
| miR-409-5p | 配列番号: 390 | 配列番号: 424 |
| miR-193a-5p | 配列番号: 391 | 配列番号: 425 |
| miR-648 | 配列番号: 392 | 配列番号: 426 |
| miR-368 | | |
| miR-365 | 配列番号: 393 | 配列番号: 427 |
| miR-500 | 配列番号: 394 | 配列番号: 428 |
| miR-491 | 配列番号: 395 | 配列番号: 429 |
| hsa-miR-199a- 3p_st | 配列番号: 396 | 配列番号: 430 |
| | 配列番号: 397 | 配列番号: 431 |
| hsa-miR-199a- 5p_st | 配列番号: 398 | 配列番号: 432 |
| | 配列番号: 399 | 配列番号: 433 |
| miR-2113 | 配列番号: 400 | 配列番号: 434 |
| miR-372 | 配列番号: 401 | 配列番号: 435 |
| miR-373 | 配列番号: 402 | 配列番号: 436 |
| miR-942 | 配列番号: 403 | 配列番号: 437 |
| miR-1293 | 配列番号: 404 | 配列番号: 438 |
| miR-18 | 配列番号: 405 | 配列番号: 439 |
| miR-1182 | 配列番号: 406 | 配列番号: 440 |
| miR-1185 | 配列番号: 407 | 配列番号: 441 |
| | | 配列番号: 442 |
| miR-1276 | 配列番号: 408 | 配列番号: 443 |

10

20

30

40

| | | |
|------------|--------------|--------------|
| miR-193b | 配列番号: 409 | 配列番号: 444 |
| miR-1238 | 配列番号: 410 | 配列番号: 445 |
| miR-889 | 配列番号: 411 | 配列番号: 446 |
| miR-370 | 配列番号: 412 | 配列番号: 447 |
| miR-548-d1 | 配列番号: 413 | 配列番号: 448 |

10

表 6

| mir 指定 | 配列番号: |
|----------------|-----------|
| hsa-miR-302b | 配列番号: 449 |
| hsa-miR-371 | 配列番号: 450 |
| hsa-miR-134 | 配列番号: 451 |
| hsa-miR-219 | 配列番号: 452 |
| hsa-miR-154 | 配列番号: 453 |
| hsa-miR-155 | 配列番号: 454 |
| hsa-miR-32 | 配列番号: 455 |
| hsa-miR-33 | 配列番号: 456 |
| hsa-miR-126 | 配列番号: 457 |
| hsa-miR-127 | 配列番号: 458 |
| hsa-miR-132 | 配列番号: 459 |
| hsa-miR-137 | 配列番号: 460 |
| hsa-miR-10b | 配列番号: 461 |
| hsa-miR-142-3p | 配列番号: 462 |
| hsa-miR-131a | |
| hsa-miR-125b | 配列番号: 463 |
| hsa-miR-153 | 配列番号: 464 |
| hsa-miR-181a | 配列番号: 465 |
| hsa-miR-123 | |
| hsa-miR-let-7a | 配列番号: 466 |
| hsa-miR-let-7b | 配列番号: 467 |
| hsa-miR-368 | 配列番号: 468 |
| hsa-miR-365-3p | |
| hsa-miR-365-5p | |
| hsa-miR-218 | 配列番号: 469 |
| hsa-miR-124 | 配列番号: 470 |
| hsa-miR-125a | 配列番号: 471 |
| hsa-miR-9 | 配列番号: 472 |
| hsa-miR-20a | 配列番号: 473 |
| hsa-miR-130a | 配列番号: 474 |
| hsa-miR-372 | 配列番号: 475 |
| hsa-miR-373 | 配列番号: 476 |
| hsa-miR-141 | 配列番号: 477 |
| hsa-miR-199a | 配列番号: 478 |
| hsa-miR-221 | 配列番号: 479 |
| hsa-miR-223 | 配列番号: 480 |

20

30

40

【 0 3 4 8 】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものであ

50

る。

【 0 3 4 9 】

本明細書で挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許および特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定であると解釈されるべきではない。

【図 1 A - 1 B】

FIG. 1A

MSCは神経様前駆体細胞を形成することができる

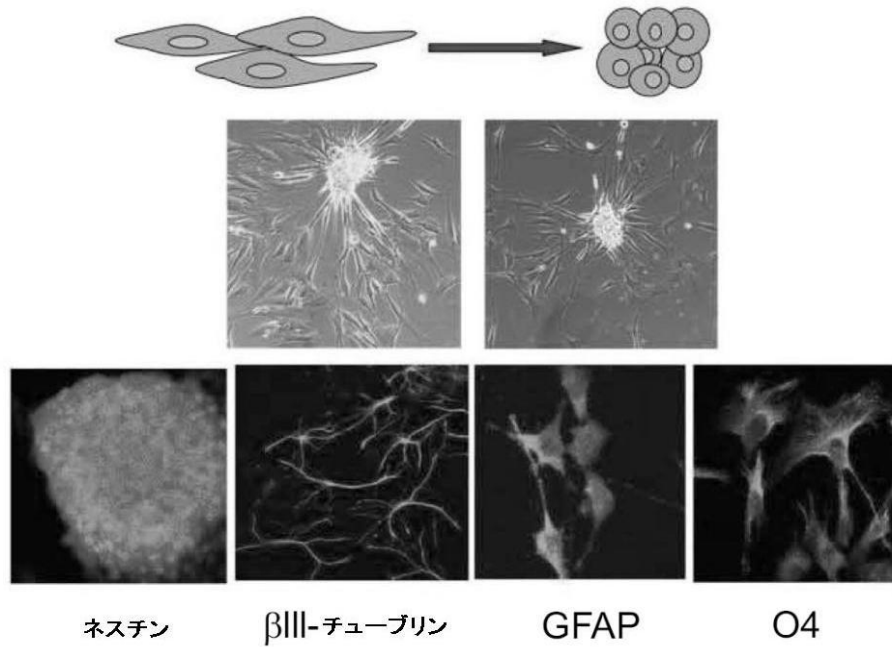
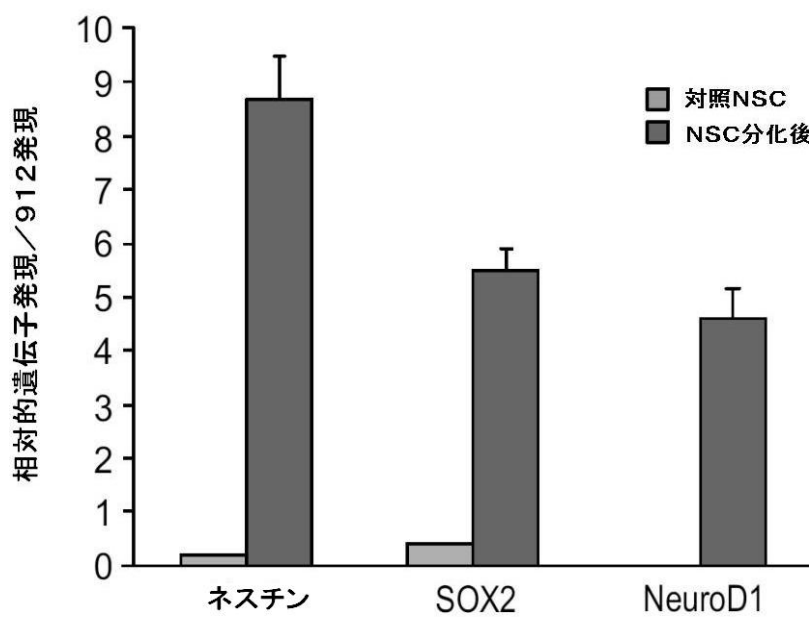
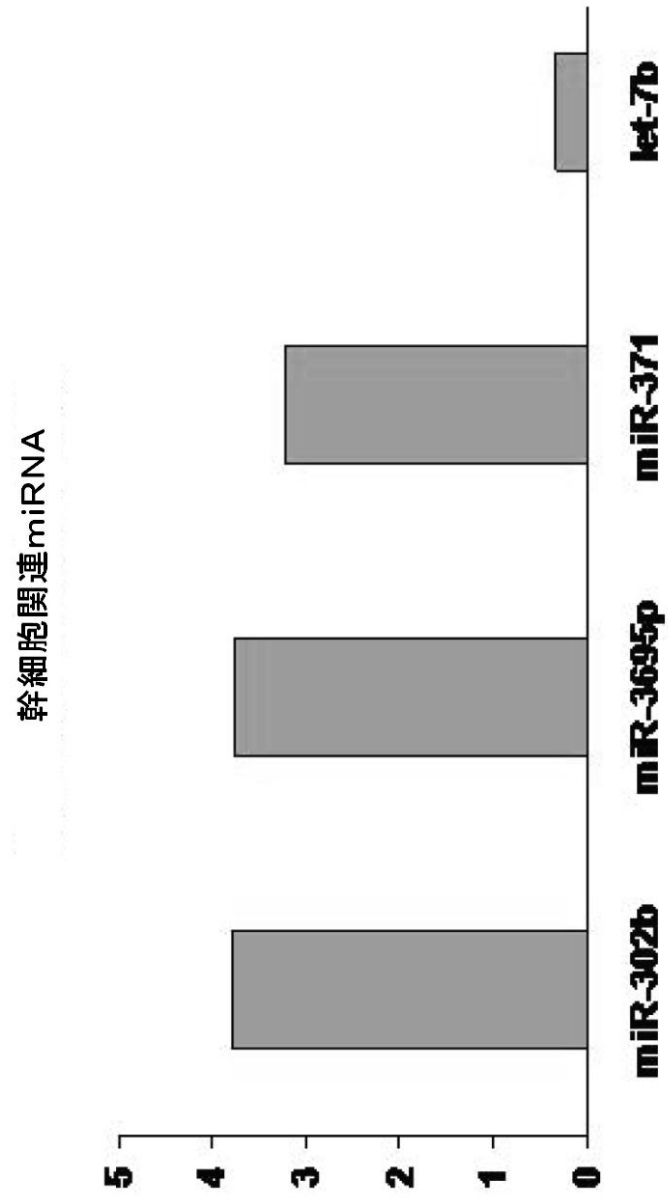


FIG. 1B



【 図 2 】

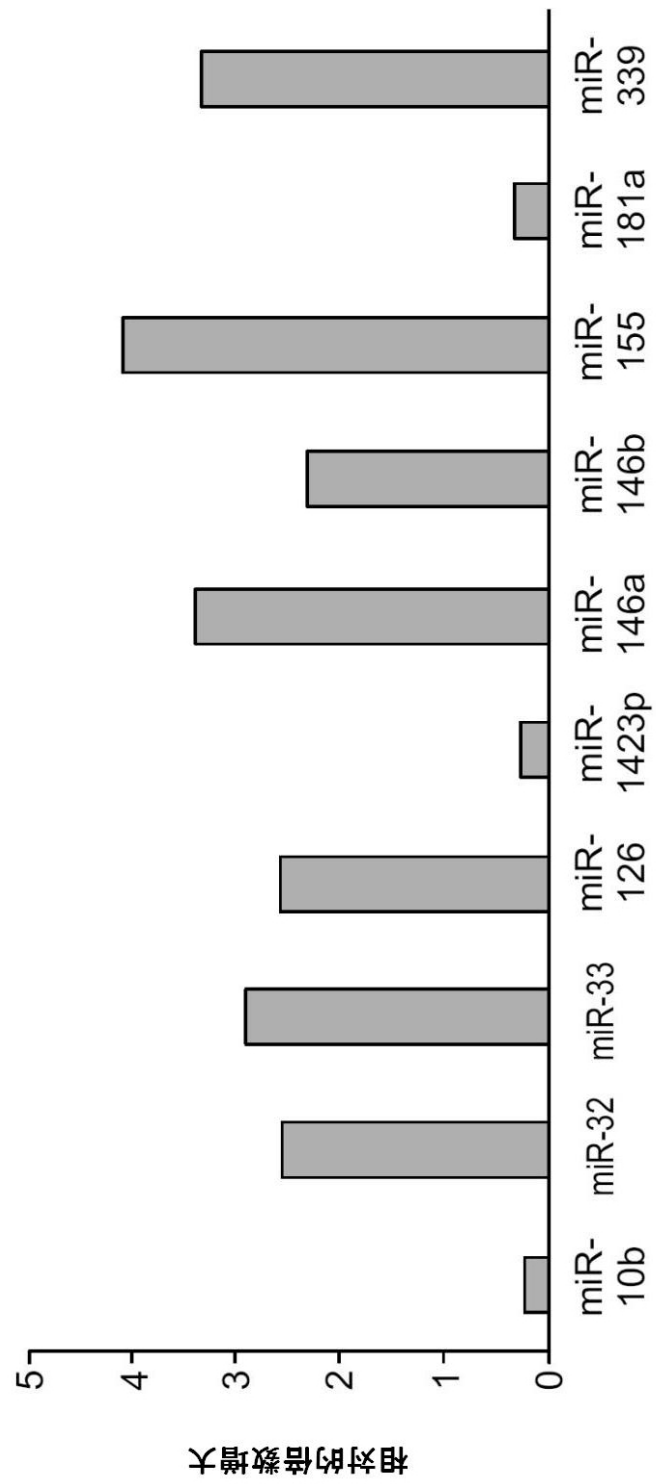
FIG. 2



【 図 3 】

FIG. 3

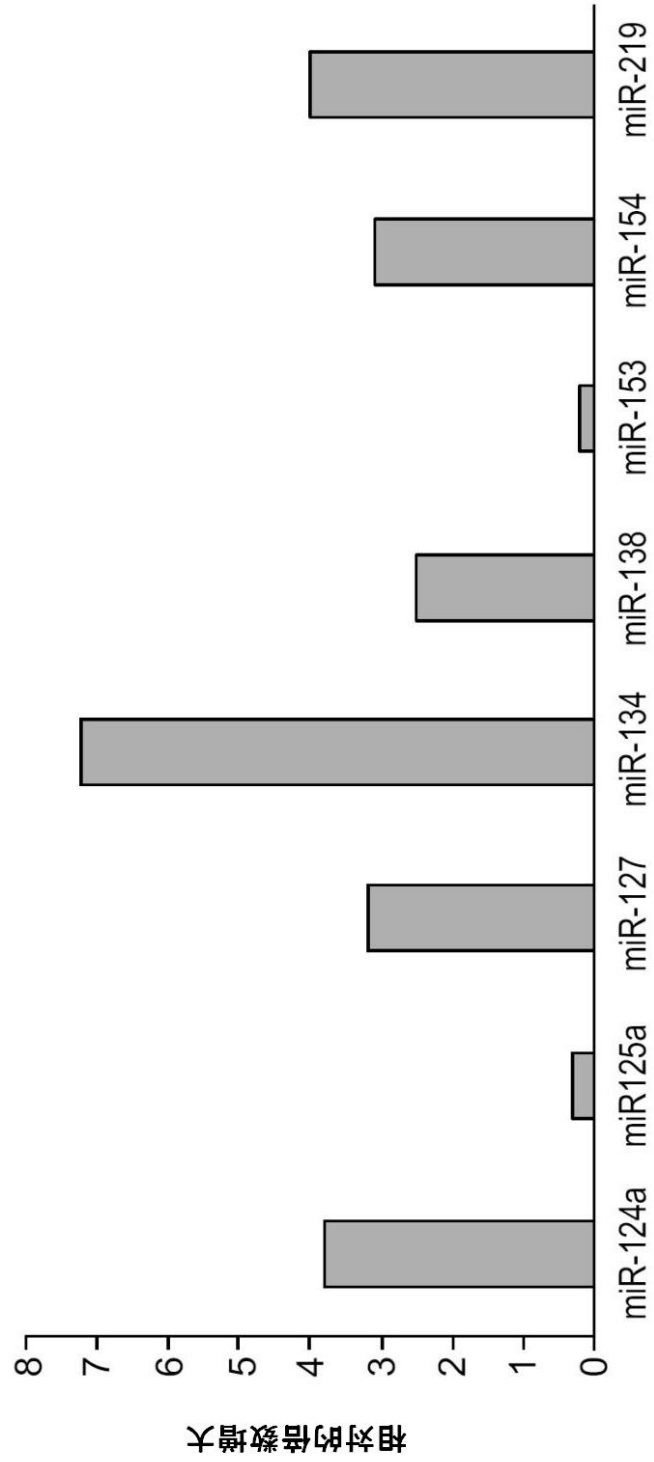
造血関連miRNA



【 図 4 A 】

FIG. 4A

神経関連miRNA



【 図 4 B - 4 D 】

FIG. 4B

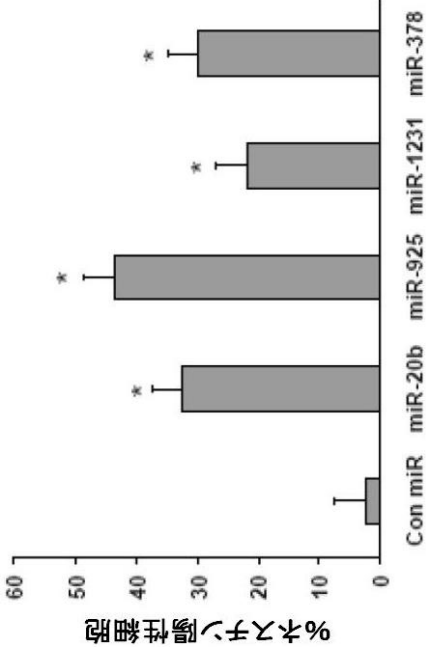


FIG. 4C

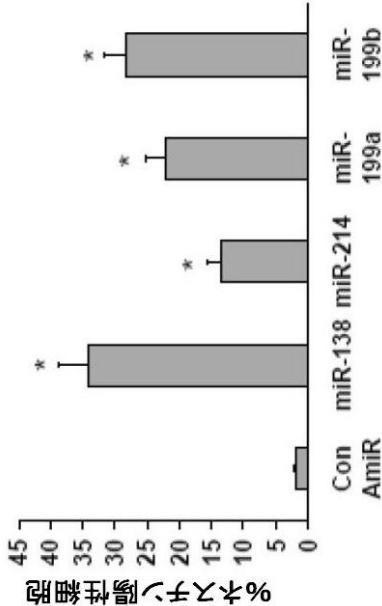
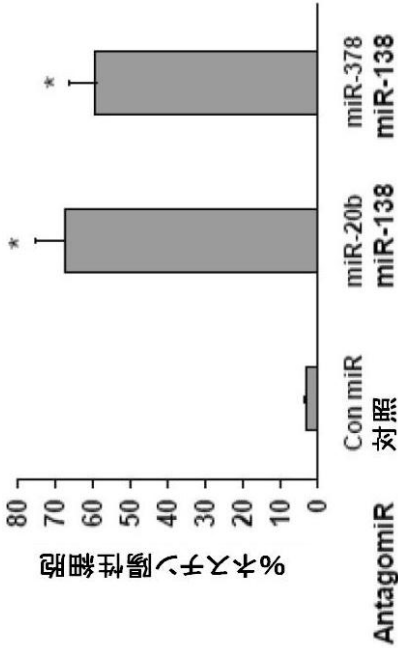


FIG. 4D



【 図 4 E - 4 F 】

FIG. 4F

MSC由来NSC

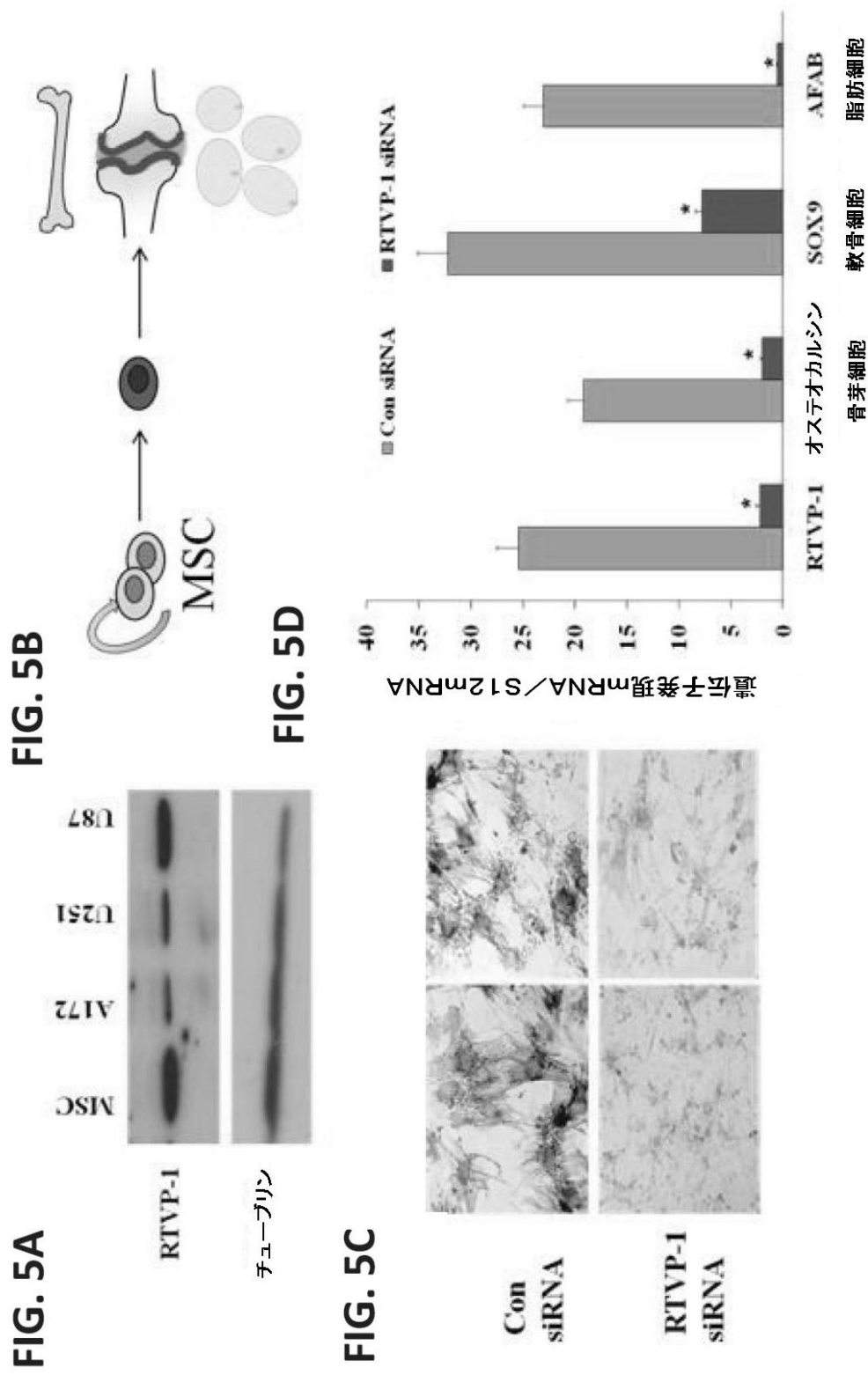


FIG. 4E

MSCs



【 図 5 A - 5 D 】



【図 5 E - 5 F】

FIG. 5F

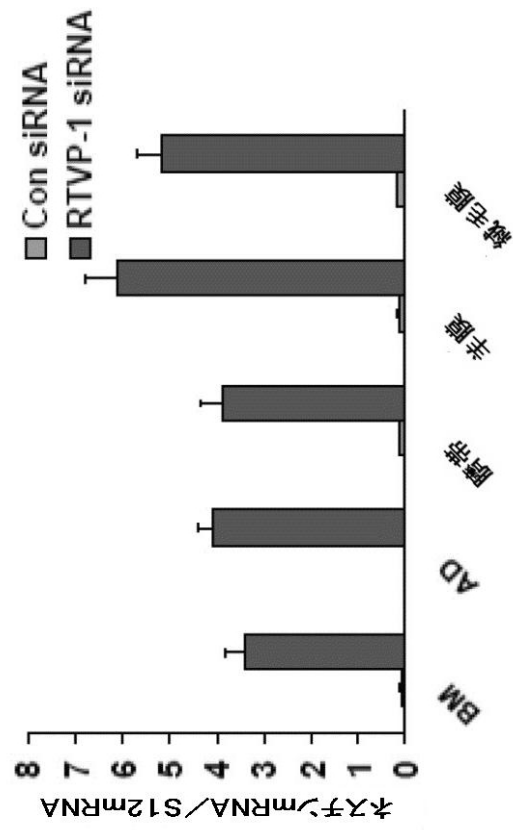
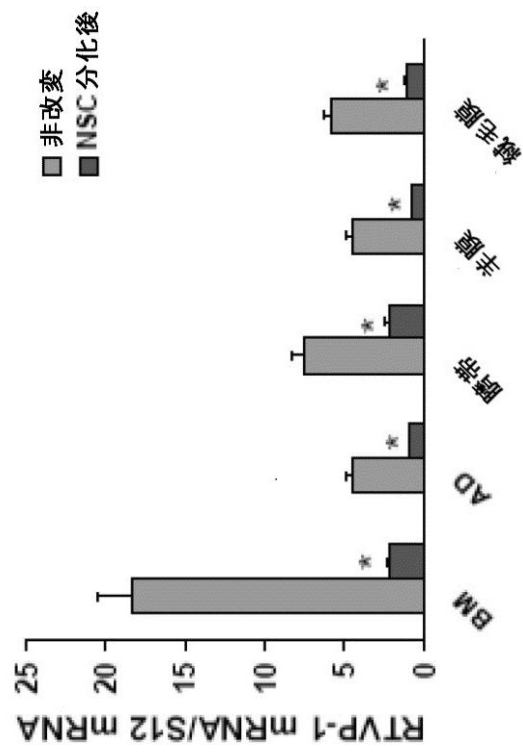


FIG. 5E



【図 6 A - 6 D】

FIG. 6A

対照

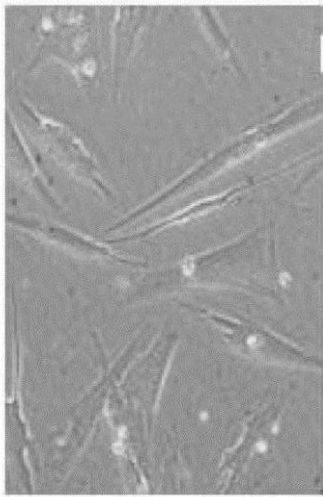


FIG. 6B

処理

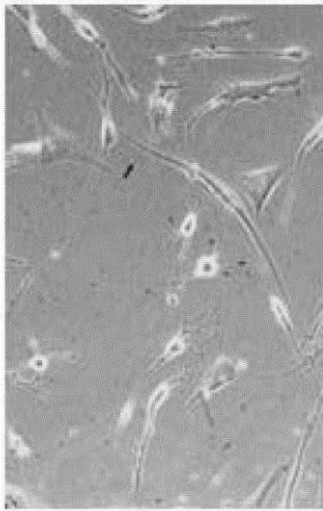


FIG. 6C

運動ニューロン始原体マーカー

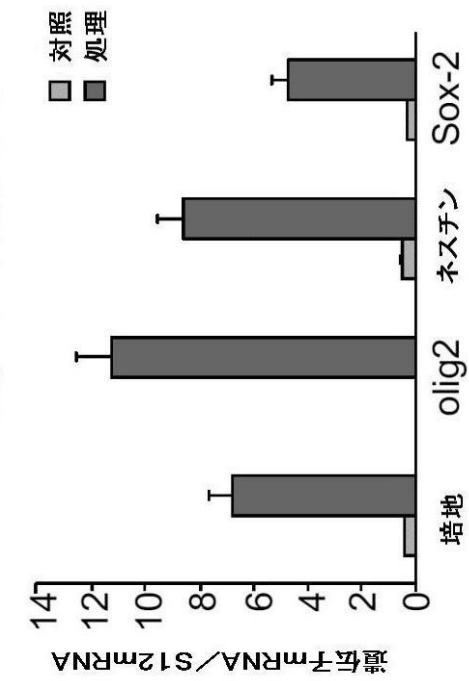
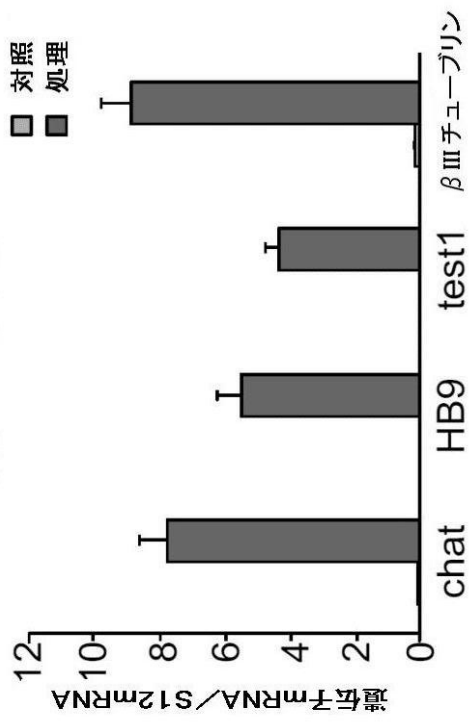


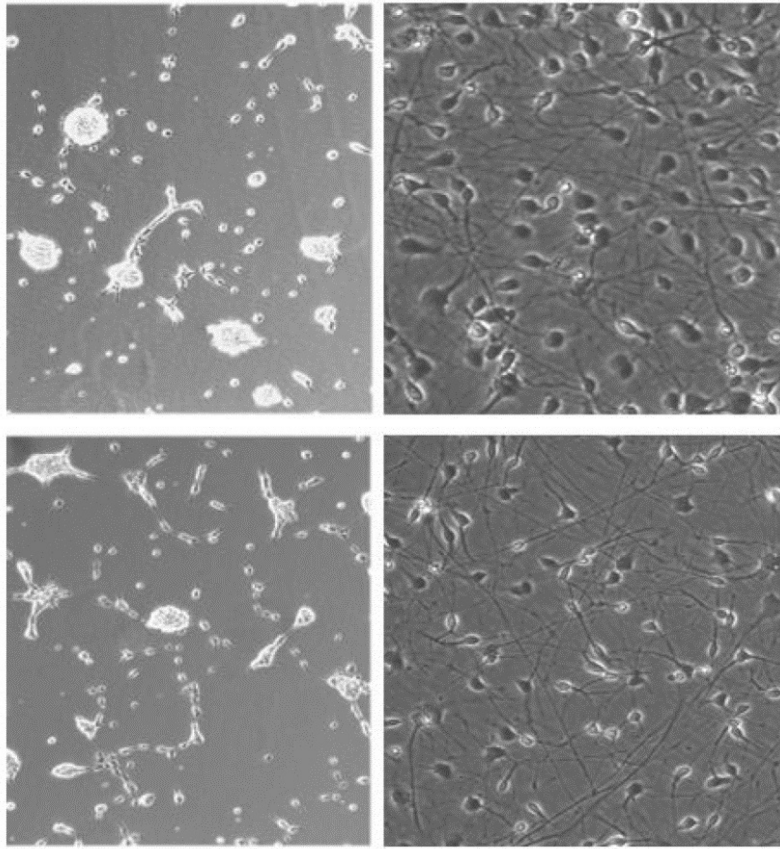
FIG. 6D

運動ニューロンマーカー



【図 7 A】

FIG. 7A



神経原始体細胞

運動ニューロン

【 図 7 B 】

FIG. 7B

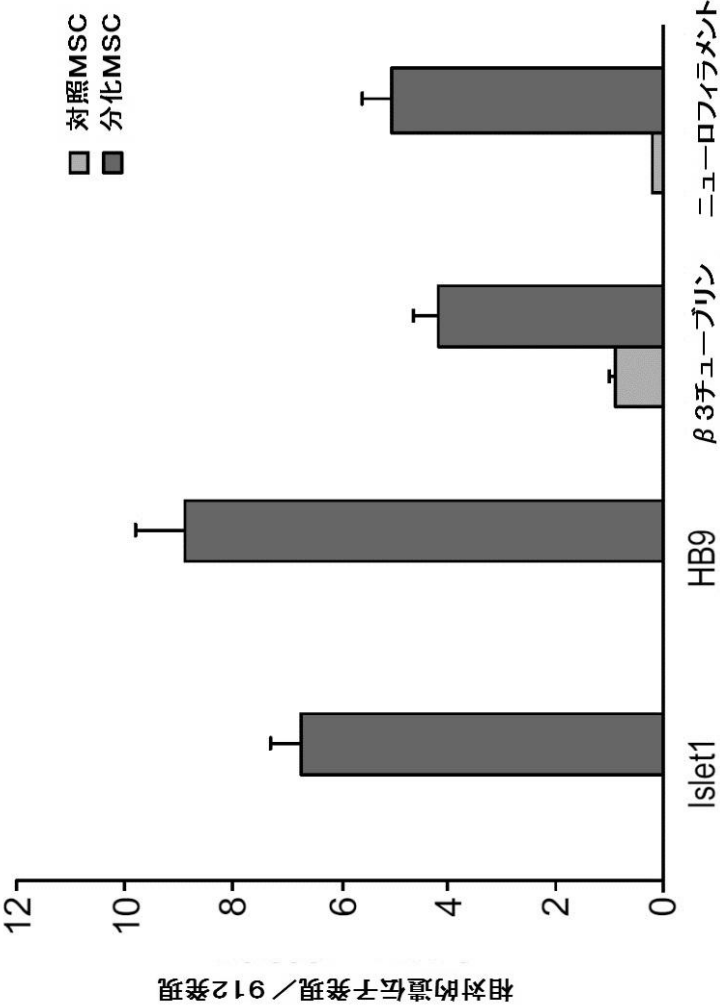


FIG. 8

幹細胞関連miRNA

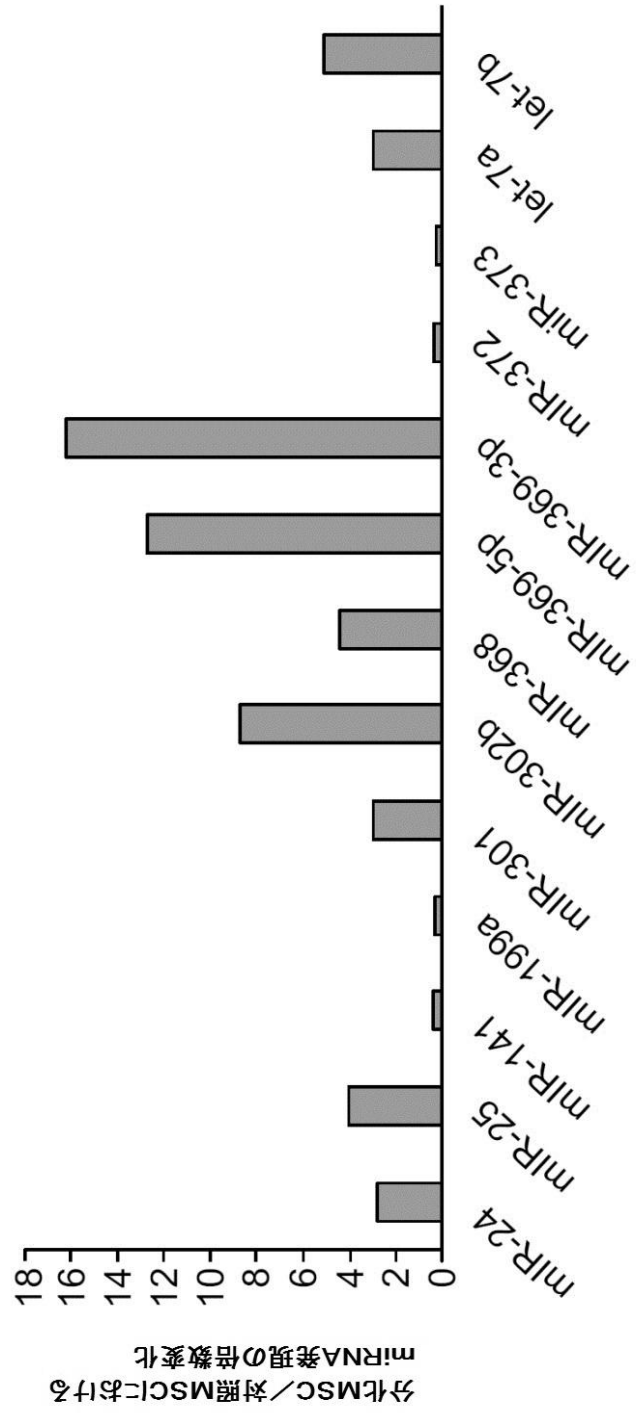
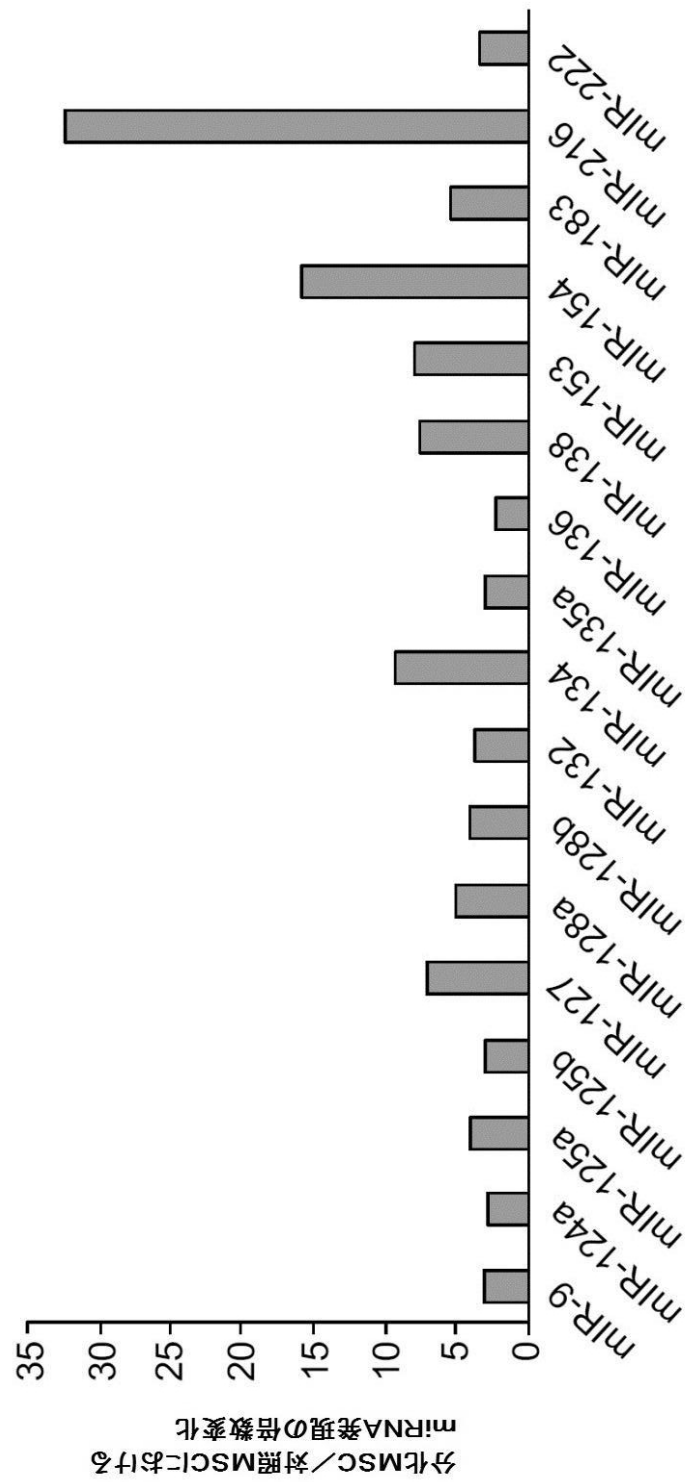


FIG. 9

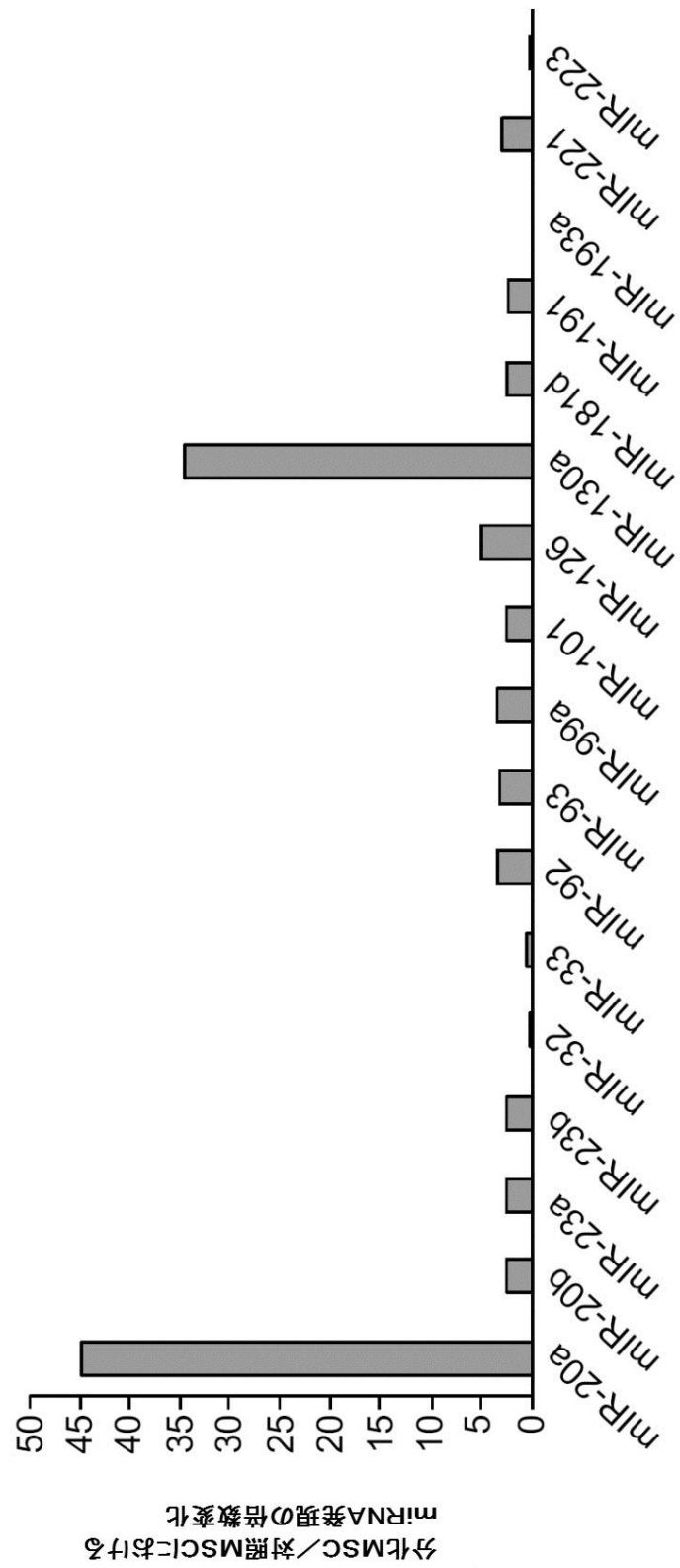
ニューロン関連miRNA



【図 10】

FIG. 10

造血関連miRNA



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/051429

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0793 C12N5/0797 A61P25/00 ADD. C12N15/113 | | |
|---|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 2011/159075 A2 (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATIO) 22 December 2011 (2011-12-22) ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | EP 1 705 245 A1 (STIFTUNG CAESAR [DE]) 27 September 2006 (2006-09-27) ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | EP 1 506 997 A1 (NEUROPROGEN GMBH LEIPZIG [DE]) 16 February 2005 (2005-02-16) ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | GAO FEN-BIAO: "Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development", NEURAL DEVELOPMENT, vol. 5, no. 1, 25, October 2010 (2010-10), XP021081673, ISSN: 1749-8104, DOI: 10.1186/1749-8104-5-25 ----- -/- | 1,2, 22-32,49 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 6 August 2013 | | 10/10/2013 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Teyssier, Bertrand |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2013/051429

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | ÅKERBLOM M ET AL: "Functional Studies of microRNAs in Neural Stem Cells: Problems and Perspectives", FRONTIERS IN NEUROSCIENCE, vol. 6, 14, January 2012 (2012-01), XP055074176, ISSN: 1662-4548, DOI: 10.3389/fnins.2012.00014 ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | MAISEL M ET AL.: "Genome-wide expression profiling and functional network analysis upon neuroectodermal conversion of human mesenchymal stem cells suggest HIF-1 and miR-124a as important regulators", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 316, no. 17, October 2010 (2010-10), pages 2760-2778, XP055074156, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.06.012 ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | LIU SHIH-PING ET AL.: "MicroRNAs regulation modulated self-renewal and lineage differentiation of stem cells", CELL TRANSPLANTATION, vol. 18, no. 9, January 2009 (2009-01), pages 1039-1045, XP002605501, ISSN: 0963-6897, DOI: 10.3727/096368909X471224 ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | Shookhoff J M & Gallicano G I: "The Emerging Role of microRNAs in Adult Stem Cells"; "Chapter 3" In: Phinney D G (Ed.): "Adult Stem Cells: Biology and Methods of Analysis", 2011, Humana Press Inc., Totowa, NJ 07512-1165, USA, XP008163996, ISSN: null ISBN: 978-1-61779-001-0 pages 57-94, DOI: 10.1007/978-1-61779-002-7_3, ----- | 1,2, 22-32,49 |
| A | ÖZATA D M ET AL: "The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma", ENDOCRINE RELATED CANCER, vol. 18, no. 6, 27 October 2011 (2011-10-27), pages 643-655, XP055074162, ISSN: 1351-0088, DOI: 10.1530/ERC-11-0082 ----- -/-- | 1,2 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/051429

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A, P | KATSUSHIMA K ET AL: "Contribution of MicroRNA-1275 to Claudin11 Protein Suppression via a Polycomb-mediated Silencing Mechanism in Human Glioma Stem-like Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, no. 33, 10 August 2012 (2012-08-10), pages 27396-27406, XP055074166, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.359109 ----- | 1,2 |
| T | WO 2009/122413 A1 (HADASIT MED RES SERVICE [IL]; REUBINOFF BENJAMIN [IL]; BEN SHUSHAN ET) 8 October 2009 (2009-10-08) ----- | |
| T | US 2008/176328 A1 (CHANG MI-SOOK [KR] ET AL) 24 July 2008 (2008-07-24) ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/IB2013/051429

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 2, 22-32, 49(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2013/051429

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 22-32, 49(all partially)

Method of differentiating mesenchymal stem cells (MSC) into neural stem cells (NSC) by up-regulating miR-1275; cells so obtained.

2-93. claims: 1-3, 22-34, 37-39, 42-44, 46, 49(all partially)

Method as in invention 1 up-regulating, respectively, (2) miR-891a, (3) miR-154, (4) miR-1202, (5) miR-572, (6) miR-935a, (7) miR302b, (8) miR-371, (9) miR-134, (10) miR-219, (11) miR-155, (12) miR-32, (13) miR-33, (14) miR-126, (15) miR-127, (16) miR-132, (17) miR-let-7c, (18) miR-665, (19) miR-4258, (20) miR-361-3p, (21) miR-374a*, (22) miR-892b, (23) miR-361-5p, (24) miR-181a, (25) miR-16, (26) miR-636, (27) miR-4284, (28) miR-1208, (29) miR-1274b, (30) miR-30c-2*, (31) miR-501-3p, (32) hsa-miR-92a, (33) miR-378b, (34) miR-1287, (35) miR-425*, (36) miR-324-5p, (37) miR-3178, (38) miR-219-1-3p, (39) miR-197, (40) miR-181b, (41) miR-500*, (42) miR-106b, (43) miR-502-3p, (44) miR-30c, (45) miR-422a, (46) miR-93, (47) miR-181d, (48) miR-1307, (49) miR-1301, (50) miR-99a, (51) miR-505*, (52) miR-1202, (53) miR-12, (54) miR-532-5p, (55) miR-195, (56) miR-532-3p, (57) miR-106a, (58) miR-17, (59) miR-1271, (60) miR-769-3p, (61) miR-15b, (62) miR-324-3p, (63) miR-20a, (64) miR-501-5p, (65) miR-330-3p, (66) miR-874, (67) miR-500, (68) miR-25, (69) miR-769-5p, (70) miR-125-b2*, (71) miR-130b, (72) miR-504, (73) miR-181-a2*, (74) miR-885-3p, (75) miR-1246, (76) miR-92b, (77) miR-362-5p, (78) miR-572, (79) miR-4270, (80) miR-378c, (81) miR-93-star, (82) miR-149, (83) miR-363, (84) miR-9, (85) miR-18a, (86) miR-346, (87) miR-497, (88) miR-378, (89) miR-1231, (90) miR-139-5p, (91) miR-3180-3p, (92) miR-935 or (93) miR-20b as recited in claim 1, each distinct miR being a distinct invention.

Cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment.

(Some claims may not belong to some inventions.)

94-147. claims: 4-6, 31-34, 37-39, 42-44, 46, 49(all partially)

Same as inventions 2-93 but down-regulating, respectively, (94) miR-4317, (95) miR-153, (96) miR-4288, (97) miR-409-5p, (98) miR-193a-5p, (99) miR-10b, (100) miR-142-3p, (101) miR-131a, (102) miR-125b, (103) miR-181a, (104) miR-145, (105) miR-143, (106) miR-214, (107) miR-199a-3p, (108) miR-199a-5p, (109) miR-199b-3p, (110) miR-138, (111) miR-31, (112) miR-21, (113) miR-193a-5p, (114) miR-224*, (115) miR-196a, (116) miR-487b, (117) miR-409-5p, (118) miR-193b*, (119) miR-379, (120) miR-21*, (121) miR-27a*, (122) miR-27a,

International Application No. PCT/ IB2013/ 051429

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

(123) miR-193b, (124) miR-27b, (125) miR-22, (126) miR-574-3p, (127) miR-23a, (128) miR-221*, (129) miR-2113, (130) miR-let-7i, (131) miR-24, (132) miR-23b, (133) miR-299-3p, (134) miR-518c*, (135) miR-221, (136) miR-431*, (137) miR-523, (138) miR-4313, (139) miR-559, (140) miR-614, (141) miR-653, (142) miR-2278, (143) miR-768-5p, (144) miR-154*, (145) miR-302a*, (146) miR-3199 or (147) miR-3137 as recited in claim 4, each distinct miR being a distinct invention.
(Some claims may not belong to some inventions.)

148. claims: 7(completely); 4, 6(partially)

Method of differentiating MSC into NSC by down-regulating miR-138 and miR-891 and up-regulating miR-20b and miR-378.

149. claims: 8(completely); 23-32(partially)

Method of differentiating MSC into NSC by up-regulating miR-124 and down-regulating miR-let-7.

150. claims: 9(completely); 22-25(partially)

Method of differentiating MSC into NSC by down-regulating RTVP-1.

151-164. claims: 10, 20-28, 30-32, 35, 36, 40, 41, 45, 47, 48(all partially)

Method of differentiating neural stem cells into motor neurons by up-regulating, respectively, (151) miR-368, (152) miR-302b, (153) miR-365-3p, (154) miR-365-5p, (155) miR-let-7a, (156) miR-let-7b, (157) miR-218, (158) miR-134, (159) miR-124, (160) miR-125a, (161) miR-9, (162) miR-154, (163) miR-20a or (164) miR-130a as recited in claim 10, each distinct miR being a different invention.
Cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment. Method of screening miR.

165-244. claims: 11, 12(partially)

Method of differentiating MSC into motor neurons by up-regulating, respectively, (165) miR-648, (166) miR-368, (167) miR-365, (168) miR-500, (169) miR-491, (170) miR-218, (171) miR-155, (172) miR-192, (173) miR-let-7b, (174) miR-16, (175) miR-210, (176) miR-197, (177) miR-21, (178) miR-373, (179) miR-27a, (180) miR-122, (181) miR-17, (182) miR-494, (183) miR-449, (184) miR-503, (185) miR-30a, (186) miR-196a, (187) miR-7, (188) miR-151-5p, (189) miR-22, (190) miR-31, (191) miR-424, (192) miR-1, (193) miR-29c, (194)

International Application No. PCT/ IB2013/ 051429

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

miR-942, (195) miR-100, (196) miR-520, (197) miR-663a, (198) miR-562, (199) miR-449a, (200) miR-449b-5p, (201) miR-520b, (202) miR-451, (203) miR-532-59, (204) miR-605, (205) miR-504, (206) miR-34a, (207) miR-7b, (208) miR-103, (209) miR-124, (210) miR-1385p, (211) miR-330, (212) miR-608, (213) miR-708, (214) miR-107, (215) miR-137, (216) miR-132, (217) miR-145, (218) miR-204, (219) miR-125b, (220) miR-224, (221) miR-375, (222) miR-101, (223) miR-106b, (224) miR-128, (225) miR-129-5p, (226) miR-153, (227) miR-203, (228) miR-214, (229) miR-338-3p, (230) miR-346, (231) miR-98, (232) miR-141, (233) miR-217, (234) miR-9, (234) miR-93, (235) miR-99a, (236) miR-100, (237) miR-1228, (238) miR-183, (239) miR-185, (240) miR-190, (241) miR-522, (242) miR-650, (243) miR-675 or (244) miR-342-3p as recited in claim 11, each distinct miR being a different invention.
Cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment.

245-252. claims: 13, 20-25, 30-32, 35, 36, 40, 41, 45, 47, 48(all partially)

Method of differentiating neural stem cells into motor neurons by down-regulating, respectively, (245) miR-372, (246) miR-373, (247) miR-141, (248) miR-199a, (249) miR-32, (250) miR-33, (251) miR-221 or (252) miR-223 as recited in claim 13, each distinct miR being a different invention.
Cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment. Method of screening miR.

253-301. claims: 14, 15, 50(all partially)

Method of differentiating MSC into motor neurons by down-regulating, respectively, (253) miR-372, (254) miR-373, (255) miR-942, (256) miR-2113, (257) miR-199a-3p, (258) miR-199a-5p, (259) miR-301a-3p, (260) miR-302c, (261) miR-30b-5p, (262) miR-30c, (263) miR-326, (264) miR-328, (265) miR-331-3p, (266) miR-340, (267) miR-345, (268) miR-361-5p, (269) miR-363, (270) miR-365a-3p, (271) miR-371a-3p, (272) miR-373-3p, (273) miR-374a, (274) miR-423-3p, (275) miR-449b-5p, (276) miR-451a, (277) miR-494, (278) miR-504, (279) miR-515-3p, (280) miR-516a-3p, (281) miR-519e, (282) miR-520a-3p, (283) miR-520c-3p, (284) miR-520g, (285) miR-532-5p, (286) miR-559, (287) miR-562, (288) miR-572, (289) miR-590-5p, (290) miR-605, (291) miR-608, (292) miR-626, (293) miR-639, (294) miR-654-3p, (295) miR-657, (296) miR-661, (297) miR-708-5p, (298) miR-942, (299) miR-96, (300) miR-99a or (301) miR-194 as recited in claim 14, each distinct miR being a different invention.
Cells so obtained (claim 50: inventions 253-258 only).

302. claims: 16(completely); 19, 31, 32, 35, 36, 40, 41, 45,

International Application No. PCT/ IB2013/ 051429

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

47(partially)

Method of differentiating neural stem cells into motor neurons by up-regulating each of miR-let-7a, miR-124, miR-368 and miR-154; cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment.

303. claims: 17(completely); 19, 31, 32, 35, 36, 40, 41, 45, 47(partially)

Method of differentiating neural stem cells into motor neurons by up-regulating each of miR- 125a, miR-9 and miR-130a; cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment.

304. claims: 18(completely); 19, 31, 32, 35, 36, 40, 41, 45, 47(partially)

Method of differentiating neural stem cells into motor neurons by up-regulating each of miR-218, miR-134 and miR-20a; cells so obtained, pharmaceutical composition and method of treatment.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2013/051429

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---|
| WO 2011159075 | A2 | 22-12-2011 | NONE |
| EP 1705245 | A1 | 27-09-2006 | AT 431846 T 15-06-2009 AU 2006226522 A1 28-09-2006 EP 1705245 A1 27-09-2006 US 2009324555 A1 31-12-2009 WO 2006100088 A1 28-09-2006 |
| EP 1506997 | A1 | 16-02-2005 | AU 2004265432 A1 24-02-2005 CA 2535685 A1 24-02-2005 EP 1506997 A1 16-02-2005 EP 1654351 A1 10-05-2006 JP 2007502104 A 08-02-2007 US 2006177928 A1 10-08-2006 WO 2005017132 A1 24-02-2005 |
| WO 2009122413 | A1 | 08-10-2009 | AU 2009233369 A1 08-10-2009 EP 2268797 A1 05-01-2011 US 2011091927 A1 21-04-2011 WO 2009122413 A1 08-10-2009 |
| US 2008176328 | A1 | 24-07-2008 | NONE |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード (参考) |
|----------------------------------|--|-----------------|---------|---------------|
| A 6 1 P 25/16 (2006.01) | | A 6 1 P 25/16 | | |
| A 6 1 P 25/08 (2006.01) | | A 6 1 P 25/08 | | |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01) | | A 6 1 P 25/00 | | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | | A 6 1 P 9/00 | | |
| A 6 1 P 25/14 (2006.01) | | A 6 1 P 25/14 | | |
| A 6 1 K 31/7105 (2006.01) | | A 6 1 K 31/7105 | | |
| C 1 2 N 15/115 (2010.01) | | C 1 2 N 15/00 | Z N A H | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | | C 1 2 N 15/00 | A | |

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

(72)発明者 ブローディー , チャヤ
アメリカ合衆国 , ミシガン 4 8 0 7 5 , サウスフィールド , サウスウッド ドライヴ 2
5 2 3 6

(72)発明者 スラヴィン , シモン
イスラエル , 6 5 1 4 9 テル - アヴィヴ , シュラッシュ ストリート 3 4 エー

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 EA04 HA17
4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 CA44
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA36
ZA94
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA36 ZA94