(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119031942 A
(43)申请公布日 2024.11.26

(21)申请号 202380027002.7
(22)申请日 2023.03.19
(30)优先权数据
2022-044972 2022.03.22 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/010775 2023.03.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/182243 JA 2023.09.28
(71)申请人 DEXON制药株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 古贺祥嗣
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 张桂霞 蔡晓菡
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
A61K 31/7105(2006.01)
A61K 35/32(2015.01)
A61P 25/28(2006.01)

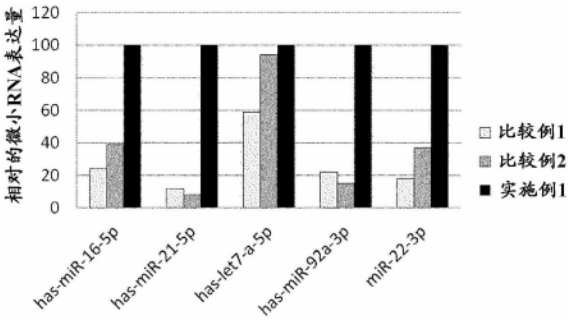
权利要求书3页 说明书27页 附图15页

(54)发明名称

基因表达调控剂、阿尔茨海默症的预防药或治疗药和痴呆的改善方法

(57)摘要

本发明可提供:新型的基因表达调控剂,其是包含miRNA的微粒,该miRNA以与淀粉样前体蛋白(APP)、β-分泌酶(BACE1)、NMDA活化蛋白、糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)和聚谷氨酰胺结合蛋白-1(PQBP1)中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因,该基因表达调控剂可调控(抑制或阻碍等)与阿尔茨海默症等的β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的表达;阿尔茨海默症的预防药或治疗药;痴呆的改善方法。



CN 119031942 A

1.基因表达调控剂,其是包含miRNA的微粒,该miRNA以与淀粉样前体蛋白(APP)、β-分泌酶(BACE1)、NMDA活化蛋白、糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)和聚谷氨酰胺结合蛋白-1(PQBP1)中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因。

2.权利要求1所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒为外来体。

3.权利要求1或2所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒以高于来自牙髓的干细胞的培养上清的浓度包含miRNA,该miRNA以与上述APP、上述BACE1、上述NMDA活化蛋白、上述GSK-3β和上述PQBP1中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因。

4.权利要求1～3中任一项所述的基因表达调控剂,其是与上述APP的表达相关的基因表达抑制剂,

其中,上述微粒包含以与上述APP的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

5.权利要求4所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒包含下述APP抑制相关miRNA组中的至少1种,

APP抑制相关miRNA组:

hsa-miR-101-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-1238-3p、hsa-miR-1260b、hsa-miR-1276、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-151a-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-186-5p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-196a-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-3120-3p、hsa-miR-3132、hsa-miR-323a-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-3620-3p、hsa-miR-3646、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-381-3p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-383-5p、hsa-miR-411-3p、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-424-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-4484、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-4786-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-500a-5p、hsa-miR-5093、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539-3p、hsa-miR-548f-3p、hsa-miR-551b-5p、hsa-miR-5584-5p、hsa-miR-567、hsa-miR-5696、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6073、hsa-miR-873-5p、hsa-miR-93-5p。

6.权利要求1～5中任一项所述的基因表达调控剂,其是与上述BACE1的表达相关的基因抑制剂,

其中,上述微粒包含以与上述BACE1的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

7.权利要求6所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒包含下述BACE1阻碍相关miRNA组中的至少1种,

BACE1阻碍相关miRNA组:

hsa-miR-107、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-1267、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-2-3p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-200a-3p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-212-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-339-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-

497-5p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-7-5p、hsa-miR-874-3p、hsa-miR-9-5p。

8.权利要求1～7中任一项所述的基因表达调控剂,其是与上述GSK-3β的表达相关的基因抑制剂,

其中,上述微粒包含以与上述GSK-3β的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

9.权利要求8所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒包含下述GSK-3β阻碍相关miRNA组中的至少1种,

GSK-3β阻碍相关miRNA组:

hsa-let-7a-3p、hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-let-7f-2-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-1185-1-3p、hsa-miR-1185-2-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-132-3p、hsa-miR-137、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-1910-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-219a-5p、hsa-miR-23a-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26a-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-346、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-377-3p、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-409-5p、hsa-miR-410-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-425-5p、hsa-miR-4465、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6083、hsa-miR-708-5p、hsa-miR-9-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-96-5p、hsa-miR-98-3p。

10.权利要求1～9中任一项所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒为与上述APP的表达相关的基因表达抑制剂、与上述BACE1的表达相关的基因抑制剂和与上述GSK-3β的表达相关的基因抑制剂中的至少1种,并且包含hsa-miR-16-5p。

11.权利要求1～10中任一项所述的基因表达调控剂,其是上述NMDA活化基因的表达抑制剂,

其中,上述NMDA活化蛋白为DLG1、CAMK2D、CAMK2A和CAPN1中的至少1种蛋白,

上述微粒包含以与上述DLG1、上述CAMK2D、上述CAMK2A和上述CAPN1中的至少1种蛋白表达相关的基因作为靶基因的下述DLG1抑制相关miRNA组、下述CAMK2D抑制相关miRNA组、下述CAMK2A抑制相关miRNA组和下述CAPN1抑制相关miRNA组中的至少1种miRNA组,

DLG1抑制相关miRNA组:

hsa-miR-1-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-206、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-613;

CAMK2D抑制相关miRNA组:

hsa-let-7a-5p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-211-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-30a-3p、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-361-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-484、hsa-miR-494-3p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-7-5p;

CAMK2A抑制相关miRNA组:

hsa-miR-129-5p、hsa-miR-137、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-149-3p、hsa-miR-152-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-32-5p、hsa-miR-338-3p、hsa-

miR-340-5p、hsa-miR-363-3p、hsa-miR-3665、hsa-miR-4534、hsa-miR-4665-5p、hsa-miR-4688、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-5010-5p、hsa-miR-505-5p、hsa-miR-5698、hsa-miR-625-5p、hsa-miR-92a-3p;

CAPN1抑制相关miRNA组:

hsa-miR-1-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-17-3p、hsa-miR-22-3p、hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-6511b-5p。

12.权利要求11所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒包含以下的每一种:

上述DLG1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-21-5p、

上述CAMK2D抑制相关miRNA组中的hsa-let-7a-5p、

上述CAMK2A抑制相关miRNA组中的hsa-miR-92a-3p、

上述CAPN1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-22-3p。

13.权利要求1～12中任一项所述的基因表达调控剂,其是上述PQBP1的表达抑制剂,

其中,上述微粒包含以与上述PQBP1的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

14.权利要求13所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒包含下述PQBP1抑制相关miRNA组中的至少1种,

PQBP1抑制相关miRNA组:hsa-miR-6727-3p、hsa-miR-6727-5p。

15.权利要求1～14中任一项所述的基因表达调控剂,其中,上述微粒为由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化并分离的微粒,

上述基因表达调控剂不含从上述来自牙髓的干细胞的培养上清中去除了上述外来体后的成分。

16.阿尔茨海默症的预防药或治疗药,其包含权利要求1～15中任一项所述的基因表达调控剂。

17.痴呆的改善方法,其包括:对发生β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆的对象给予有效量的权利要求1～15中任一项所述的基因表达调控剂、或者有效量的权利要求16所述的阿尔茨海默症的预防药或治疗药。

基因表达调控剂、阿尔茨海默症的预防药或治疗药和痴呆的改善方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因表达调控剂、阿尔茨海默症(阿尔茨海默病)的预防药或治疗药和痴呆的改善方法。

背景技术

[0002] 目前,阿尔茨海默症是占痴呆的原因的半数以上的神经变性疾病,希望进一步发展治疗方法或预防方法。在迄今为止的研究中,阿尔茨海默症的发生机制的阐明正在进行。为了阿尔茨海默症的预防或抑制进展、改善,认为抑制β淀粉样蛋白或作为微管结合蛋白的Tau蛋白的增加、凝集、蓄积、沉积等是要点之一。而且,阿尔茨海默症的治疗药及其作用机制也已知,详情见后述(例如,参照非专利文献1)。

[0003] 另一方面,提示了来自神经细胞的外来体参与脑内β淀粉样蛋白的代谢或阿尔茨海默症的表现、进展(例如,参照专利文献1)。

[0004] 在专利文献1中,关注到对可促进外来体的产生的药剂还未进行充分研究,作为可容易地促进生物体内的外来体的产生的外来体产生促进剂,记载了以可对酸性神经酰胺酶进行功能阻碍和/或表达抑制的物质作为有效成分的外来体产生促进剂。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特开2021-083415号公报;

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:临床神经学54(12),1178-1180,2014。

发明内容

[0010] 发明所要解决的课题

[0011] 然而,在专利文献1中,如由该课题的解决方法可知,关注于实际上发生β淀粉样蛋白的蓄积等的人神经细胞,对于来自其他细胞的外来体则未关注。例如,在专利文献1中,仅记载了促进在来自人神经母细胞瘤的SH-SY5Y细胞中产生外来体的例子。另外,专利文献1中引用的文献是提示来自神经细胞的外来体高度表达β淀粉样蛋白结合性糖脂并具有捕获β淀粉样蛋白的能力、以及具有与脑内的吞噬细胞小神经胶质(Microglia,小胶质细胞)联合以去除β淀粉样蛋白的作用的非专利文献;或为提示来自神经元的外来体通过在其表面捕获β淀粉样蛋白并运输至小神经胶质来提高β淀粉样蛋白的降解效率的非专利文献等。

[0012] 本发明所要解决的课题在于:提供新型的基因表达调控剂,其可调控(抑制或阻碍等)与阿尔茨海默症等的β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的表达。

[0013] 用于解决课题的手段

[0014] 本发明人发现了:包含特定的微小RNA的微粒可调控(抑制或阻碍等)与β淀粉样蛋

白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的表达。

[0015] 具体而言,本发明和本发明的优选构成如下。

[0016] [1]基因表达调控剂,其为包含miRNA的微粒,该miRNA以与淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein,APP)、β-分泌酶(BACE1)、NMDA活化蛋白、糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)和聚谷氨酰胺结合蛋白-1(PQBP1)中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因。

[0017] [2][1]所述的基因表达调控剂,其中,微粒为外来体。

[0018] [3][1]或[2]所述的基因表达调控剂,其中,微粒以高于来自牙髓的干细胞的培养上清的浓度包含miRNA,该miRNA以与APP、BACE1、NMDA活化蛋白、GSK-3β和PQBP1中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因。

[0019] [4][1]~[3]中任一项所述的基因表达调控剂,其是与APP的表达相关的基因表达抑制剂,

[0020] 其中,微粒包含以与APP的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0021] [5][4]所述的基因表达调控剂,其中,微粒包含下述APP抑制相关miRNA组中的至少1种,

[0022] APP抑制相关miRNA组:

[0023] hsa-miR-101-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-1238-3p、hsa-miR-1260b、hsa-miR-1276、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-151a-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-186-5p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-196a-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-3120-3p、hsa-miR-3132、hsa-miR-323a-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-3620-3p、hsa-miR-3646、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-381-3p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-383-5p、hsa-miR-411-3p、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-424-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-4484、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-4786-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-500a-5p、hsa-miR-5093、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539-3p、hsa-miR-548f-3p、hsa-miR-551b-5p、hsa-miR-5584-5p、hsa-miR-567、hsa-miR-5696、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6073、hsa-miR-873-5p、hsa-miR-93-5p。

[0024] [6][1]~[5]中任一项所述的基因表达调控剂,其是与BACE1的表达相关的基因抑制剂,

[0025] 其中,微粒包含以与BACE1的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0026] [7][6]所述的基因表达调控剂,其中,微粒包含下述BACE1阻碍相关miRNA组中的至少1种,

[0027] BACE1阻碍相关miRNA组:

[0028] hsa-miR-107、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-1267、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-2-3p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-200a-3p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-212-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-298、hsa-

miR-299-3p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-339-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-7-5p、hsa-miR-874-3p、hsa-miR-9-5p。

[0029] [8][1]～[7]中任一项所述的基因表达调控剂,其是与GSK-3β的表达相关的基因抑制剂,

[0030] 其中,微粒包含以与GSK-3β的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0031] [9][8]所述的基因表达调控剂,其中,微粒包含下述GSK-3β阻碍相关miRNA组中的至少1种,

[0032] GSK-3β阻碍相关miRNA组:

[0033] hsa-let-7a-3p、hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-let-7f-2-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-1185-1-3p、hsa-miR-1185-2-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-132-3p、hsa-miR-137、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-1910-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-219a-5p、hsa-miR-23a-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26a-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-346、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-377-3p、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-409-5p、hsa-miR-410-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-425-5p、hsa-miR-4465、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6083、hsa-miR-708-5p、hsa-miR-9-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-96-5p、hsa-miR-98-3p。

[0034] [10][1]～[9]中任一项所述的基因表达调控剂,其中,微粒为与APP的表达相关的基因表达抑制剂、与BACE1的表达相关的基因抑制剂和与GSK-3β的表达相关的基因抑制剂中的至少1种,并且包含hsa-miR-16-5p。

[0035] [11][1]～[10]中任一项所述的基因表达调控剂,其是NMDA活化基因的表达抑制剂,

[0036] 其中,NMDA活化蛋白为DLG1、CAMK2D、CAMK2A和CAPN1中的至少1种蛋白,

[0037] 微粒包含以与DLG1、CAMK2D、CAMK2A和CAPN1中的至少1种蛋白表达相关的基因作为靶基因的下述DLG1抑制相关miRNA组、下述CAMK2D抑制相关miRNA组、下述CAMK2A抑制相关miRNA组和下述CAPN1抑制相关miRNA组中的至少1种miRNA组,

[0038] DLG1抑制相关miRNA组:

[0039] hsa-miR-1-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-206、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-613;

[0040] CAMK2D抑制相关miRNA组:

[0041] hsa-let-7a-5p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-211-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-30a-3p、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-361-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-484、hsa-miR-494-3p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-7-5p;

[0042] CAMK2A抑制相关miRNA组:

[0043] hsa-miR-129-5p、hsa-miR-137、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-149-3p、hsa-miR-152-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-32-5p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-363-3p、hsa-miR-3665、hsa-miR-4534、hsa-miR-4665-5p、hsa-miR-4688、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-5010-5p、hsa-miR-505-5p、hsa-miR-5698、hsa-miR-625-5p、hsa-miR-92a-3p;

[0044] CAPN1抑制相关miRNA组:

[0045] hsa-miR-1-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-17-3p、hsa-miR-22-3p、hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-6511b-5p。

[0046] [12][11]所述的基因表达调控剂,其中,微粒包含以下的每一种:

[0047] DLG1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-21-5p、

[0048] CAMK2D抑制相关miRNA组中的hsa-let-7a-5p、

[0049] CAMK2A抑制相关miRNA组中的hsa-miR-92a-3p、

[0050] CAPN1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-22-3p。

[0051] [13][1]~[12]中任一项所述的基因表达调控剂,其是PQBP1的表达抑制剂,

[0052] 其中,微粒包含以与PQBP1的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0053] [14][13]所述的基因表达调控剂,其中,微粒包含下述PQBP1抑制相关miRNA组中的至少1种,

[0054] PQBP1抑制相关miRNA组:hsa-miR-6727-3p、hsa-miR-6727-5p。

[0055] [15][1]~[14]中任一项所述的基因表达调控剂,其中,微粒为由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化并分离的微粒,

[0056] 基因表达调控剂不含从来自牙髓的干细胞的培养上清中去除了外来体后的成分。

[0057] [16]阿尔茨海默症的预防药或治疗药,其包含[1]~[15]中任一项所述的基因表达调控剂。

[0058] [17]痴呆的改善方法,其包括:对发生β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆的对象给予有效量的[1]~[15]中任一项所述的基因表达调控剂、或者有效量的[16]所述的阿尔茨海默症的预防药或治疗药。

[0059] 发明效果

[0060] 根据本发明,可提供新型的基因表达调控剂,其可调控与阿尔茨海默症等的β淀粉状蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的表达。

附图说明

[0061] [图1]图1是显示阿尔茨海默症的发生机制的流程图。

[0062] [图2]图2是非淀粉样蛋白形成路径的APP加工的示意图。

[0063] [图3]图3是淀粉样蛋白形成路径的APP加工的示意图。

[0064] [图4]图4(A)是利用艾滋病毒(AIDS virus,艾滋病病毒)的cDNA经由PQBP1-cGAS-STING路径的炎症基因的表达诱导的示意图。图4(B)是利用Tau蛋白经由PQBP1-cGAS-STING路径的炎症基因的表达诱导的示意图。

[0065] [图5]图5是将以APP为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实

施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0066] [图6]图6是将以β-分泌酶(BASE1)为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0067] [图7]图7是将以DLG1为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0068] [图8]图8是将以CAMK2D为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0069] [图9]图9是将以CAMK2A为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0070] [图10]图10是将以CAPN1为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0071] [图11]图11是将以GSK-3β为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0072] [图12]图12是将以PQBP1为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图。

[0073] [图13]图13是对于β淀粉样蛋白或Tau蛋白相关miRNA,将在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF)中表达的miRNA的表达量与大脑皮质(Cerebral Cortex)中的miRNA的表达量对比而显示的热图(第1页)。

[0074] [图13-2]图13-2是图13的热图的续图(第2页)。

[0075] [图14]图14是显示试验例4中的APP基因的表达量的条形图。

[0076] [图15]图15是显示试验例4中的BASE1基因的表达量的条形图。

[0077] [图16]图16是显示试验例4中的CAMK2D基因的表达量的条形图。

[0078] [图17]图17是显示试验例4中的GSK-3β基因的表达量的条形图。

[0079] [图18]图18是显示试验例4中的PQBP1基因的表达量的条形图。

[0080] [图19]图19是显示试验例5中的各miRNA的表达量的条形图。

具体实施方式

[0081] 以下,对本发明进行详细说明。以下记载的构成要件的说明有时是基于代表性的实施方式或具体例而进行的,但本发明并不限定于这样的实施方式。需要说明的是,在本说明书中,用“~”表示的数值范围是指包含“~”前后记载的数值作为下限值和上限值的范围。

[0082] [基因表达调控剂]

[0083] 本发明的基因表达调控剂是包含miRNA的微粒,该miRNA以与淀粉样前体蛋白(APP)、β-分泌酶(BACE1)、NMDA活化蛋白和糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因(也称为靶)。

[0084] 本发明的基因表达调控剂可调控有关与β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的基因的表达。其结果,本发明的基因表达调控剂优选还可改善、更优选可预防或治疗β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎。治疗是指缓和β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎的症状,可未达到治愈。作为β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆的治疗,优选缓和认知功能或行动中的症状。

[0085] 以下,对本发明的基因表达调控剂的优选方案进行说明。

[0086] <痴呆的定义>

[0087] 本发明中,痴呆通常是指后天的认知功能下降的状态。

[0088] 作为痴呆的类型(病型),例如可列举:阿尔茨海默型痴呆(AD)、血管性痴呆(VaD)、路易体痴呆(DLB,包括伴有痴呆的帕金森病PDD)、额颞叶变性(包括额颞叶痴呆(FTD)、语义性痴呆(SD)、进行性非流利性失语(PNFA))、酒精性痴呆、混合型、轻度认知障碍(MCI)、青年性痴呆等。

[0089] 成为本发明的基因表达调控剂的给药对象的痴呆优选为β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆。对β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆没有特别限制,可列举:发生所谓的被称为Tau蛋白病(タウパクチー)的Tau蓄积的疾病组。具体而言,作为成为本发明的基因表达调控剂的给药对象的痴呆,优选为阿尔茨海默型痴呆、额颞叶痴呆(FTD或bvFTD)、语义性痴呆(SD)、进行性非流利性失语(PNFA)。FTD包括皮克病等。

[0090] 成为本发明的基因表达调控剂的给药对象的痴呆更优选为阿尔茨海默型痴呆。

[0091] <阿尔茨海默症的发生机制>

[0092] 显示阿尔茨海默症的发生机制的流程图见图1。

[0093] 首先,对图1中的实心箭头所表示的流程图进行说明。

[0094] (1)淀粉样前体蛋白(APP)的产生。而且,APP因致病基因(APP、PS1、PS2)的突变和ApoE4(危险因素)而亢进。

[0095] (2)β淀粉样蛋白(Aβ)的产生。而且,通过Aβ降解酶的抑制(脑啡肽酶、胰岛素降解酶等),Aβ的产生亢进。

[0096] (3)β淀粉样蛋白的凝集、蓄积、沉积。而且,因神经细胞内钙稳态的异常、活性氧、内质网应激,而进行Aβ的凝集、蓄积、沉积。

[0097] (21)神经原纤维变化、细胞死亡、反应性神经胶质的增殖。

[0098] (22)阿尔茨海默症的发生。

[0099] 接下来,对图1中的空心箭头所表示的流程图进行说明。

[0100] (11)Tau蛋白的异常磷酸化的诱导通过(3)β淀粉样蛋白的凝集、蓄积、沉积来进行。

[0101] (12)可溶性的单体Tau蛋白从微小管中游离。

[0102] (13)从轴突移动到神经细胞的细胞体树状突起部分。单体Tau蛋白与作为Src酪氨酸激酶的fyn相互作用。

[0103] (14)使fyn定位于树状突起并活化。

[0104] (15)将兴奋性NMDA受体GluN2B磷酸化。通过谷氨酸信号传递的扩增,进行兴奋性NMDA受体GluN2B的磷酸化。

[0105] (16)向细胞内的Ca^{2+}流入量增加。

[0106] (17)Aβ的毒性增加。

[0107] (21)神经原纤维变化、细胞死亡、反应性神经胶质的增殖。

[0108] (22)阿尔茨海默症的发生。

[0109] (APP的加工)

[0110] 与图1的(2)β淀粉样蛋白(Aβ)的产生相关,对淀粉样前体蛋白(APP)的加工进行说明。

[0111] 图2是非淀粉样蛋白形成路径的APP加工的示意图。

[0112] 首先,若用α-分泌酶切割APP,则C83(由C末端侧的83个氨基酸构成的片段)残留在细胞膜中,sAPPα(由N末端侧的胞外结构域构成的片段)被释放到细胞外。

[0113] 接下来,若用γ-分泌酶切割C83,则产生P3肽和CTF。其结果,不产生Aβ。

[0114] 另一方面,图3是淀粉样蛋白形成路径的APP加工的示意图。

[0115] 首先,用β-分泌酶(BACE1)切割APP,C99(C末端侧的99个氨基酸的片段)残留在细胞膜中,sAPPβ(N末端侧的胞外结构域)被释放到细胞外。

[0116] 接下来,用γ-分泌酶切割C99,形成Aβ肽(Aβ1-40或Aβ1-42)。

[0117] 需要说明的是,γ-分泌酶由早老素1(PS1,早老蛋白1)或早老素2(PS2)和呆蛋白、APH-1和PEN2构成。

[0118] <阿尔茨海默症治疗药和作用机制>

[0119] 本发明的基因表达调控剂优选在痴呆中特别是可改善阿尔茨海默症。以下,对阿尔茨海默症治疗药和作用机制与本发明的基因表达调控剂的作用机制一起加以说明。

[0120] 作为阿尔茨海默症治疗药和作用机制,可列举如下。

[0121] (a)乙酰胆碱降解酶抑制剂

[0122] 乙酰胆碱是由神经细胞的突起前端部的突触部释放、且将信息传递至下一个神经细胞的物质,产生乙酰胆碱的细胞在阿尔茨海默型痴呆的脑内减少。通过乙酰胆碱降解酶抑制剂(盐酸多奈哌齐等)抑制突触中的乙酰胆碱降解消失,增加乙酰胆碱的量。

[0123] 需要说明的是,乙酰胆碱降解酶抑制剂与本发明的基因表达调控剂的相关性低。

[0124] (b)烟碱受体刺激剂

[0125] 乙酰胆碱向烟碱受体的信息传递是通过与乙酰胆碱受体结合引起的。乙酰胆碱受体中存在烟碱型受体(也称为烟碱型乙酰胆碱受体)和毒蕈碱型受体。烟碱型受体是由亚单位构成的五聚体,若结合乙酰胆碱,则作为离子通道发挥功能。在阿尔茨海默型痴呆的脑内烟碱型受体数减少。氢溴酸加兰他敏等与除乙酰胆碱以外的部位结合,提高烟碱型受体的功能(APL作用)。

[0126] 需要说明的是,烟碱受体刺激剂与本发明的基因表达调控剂的相关性低。

[0127] (c)NMDA受体抑制剂

[0128] 通过抑制因Aβ或Tau的增加而诱导的NMDA受体的活化,防止因神经细胞的过度兴奋导致的细胞死亡。NMDA与记忆、学习、脑缺血有关。作为调控NMDA的蛋白,可列举:DLG1、

CAMK2D、CAMK2A、CAPN1、EPHB2。

[0129] 本发明的基因表达调控剂中,在微粒包含以与NMDA活化蛋白的表达相关的基因作为靶基因的miRNA的情况下,作为NMDA受体抑制剂发挥功能。特别是,本发明的基因表达调控剂作为DLG1表达抑制剂、CAMK2D表达抑制剂、CAMK2A表达抑制剂和CAPN1表达抑制剂中的至少1种NMDA受体抑制剂发挥功能。

[0130] (d)BACE1抑制剂

[0131] 阻碍作为Aβ的生成酶的BACE1,以抑制Aβ的产生。

[0132] 本发明的基因表达调控剂中,在微粒包含以与β-分泌酶(BACE1)的表达相关的基因作为靶基因的miRNA的情况下,作为BACE1抑制剂发挥功能。

[0133] (e)GSK-3β抑制剂

[0134] 糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)是将各种链蛋白进行磷酸化的酶,对正常细胞的生命维持或调节较为重要且起到多种作用。若GSK-3β病态地亢进,则在脑内促进Aβ的沉积、或在神经细胞中促进Tau蛋白的蓄积。GSK-3β抑制剂抑制Aβ的沉积或Tau蛋白的异常磷酸化(记载于下述表1中。参照临床神经学54(12),1178-1180,2014)。

[0135] 本发明的基因表达调控剂中,在微粒包含以与糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)的表达相关的基因作为靶基因的miRNA的情况下,作为GSK-3β抑制剂发挥功能。

[0136] [表1]

[0137]

靶	化合物	作用机制	对象	治疗性(相)	成绩
过度磷酸化	锂	GSK3β阻碍	aMCI	2	认知功能改善 CSF p-tau减少
	Tideglusib	GSK3β阻碍	轻度～中度AD	2	认知功能改善的倾向
凝集	亚甲基蓝	Tau凝集阻碍	轻度～中度AD	2	认知功能改善 脑血流量的改善 脑内糖利用的增加
Tau	AADvac1	能动免疫疗法	轻度～中度AD	1	试验中

[0138] 关于Tau疾病修饰剂,记载了迄今为止已进入临床试验的修饰剂中的代表性修饰剂。

[0139] aMCI:遗忘型轻度认知障碍(amnestic mild cognitive impairment)。

[0140] GSK:糖原合酶激酶、AD:阿尔茨海默症、CSF:脑脊液。

[0141] (f)APP抑制剂

[0142] APP抑制剂阻碍淀粉样前体蛋白(APP)的产生,以抑制APP的产生。

[0143] 本发明的基因表达调控剂中,在微粒包含以与淀粉样前体蛋白(APP)的表达相关的基因作为靶基因的miRNA的情况下,作为APP抑制剂发挥功能。

[0144] ＜脑炎＞

[0145] 本发明的基因表达调控剂优选可改善脑炎。以下,对脑炎的作用机制和本发明的基因表达调控剂的作用机制一起加以说明。

[0146] 参与以阿尔茨海默症为首的额颞叶变性、帕金森病、亨廷顿病等多种神经变性疾病的病态的Tau蛋白在脑内小神经胶质中被作为艾滋病毒的细胞内受体而已知的PQBP1识别,而诱发脑炎。具体而言,Tau经由PQBP1-cGAC-STING路径将小神经胶质活化,促进脑炎

(Nature Communications第12卷,Article number:6565(2021))。图4(A)是艾滋病毒的cDNA经由PQBP1-cGAS-STING路径进行的炎症基因的表达诱导的示意图。图4(B)是Tau蛋白经由PQBP1-cGAS-STING路径进行的炎症基因的表达诱导的示意图。

[0147] 因此,本发明的基因表达调控剂中,在微粒包含以与聚谷氨酰胺结合蛋白-1(PQBP1)的表达相关的基因作为靶基因的miRNA的情况下,作为PQBP1抑制剂发挥功能。其结果,本发明的基因表达调控剂可改善Tau蛋白相关的痴呆(特别是阿尔茨海默症)或脑炎。

[0148] <微粒>

[0149] 作为本发明的基因表达调控剂的有效成分的miRNA包含在微粒中。

[0150] 用作本发明的基因表达调控剂的微粒例如通过由来自牙髓的干细胞等间充质干细胞分泌、出芽或分散等,从来自牙髓的干细胞等中导出,浸出、释放或脱落到细胞培养基中。微粒优选包含在来自牙髓的干细胞等的培养上清中,更优选为来源于来自牙髓的干细胞的培养上清的微粒。然而,来源于来自牙髓的干细胞的培养上清的微粒未必需要由来自牙髓的干细胞的培养上清中获取。例如,只要是将来自牙髓的干细胞的内部的微粒通过任意的方法分离而得的微粒、或者是与可从来自牙髓的干细胞的培养上清分离的微粒相同的微粒,则可称为来源于来自牙髓的干细胞的培养上清的微粒。

[0151] 来源于来自牙髓的干细胞等的培养上清的微粒可以以包含在培养上清中的状态使用,或者可以以由培养上清纯化的状态使用。微粒优选为由培养上清纯化的微粒。

[0152] 微粒的来源可通过已知方法判别。例如,可通过J Stem Cell Res Ther(2018)8:2中记载的方法判别微粒来源于来自牙髓的干细胞、来自脂肪的干细胞、来自骨髓的干细胞、来自脐带的干细胞等中的哪一种干细胞。具体而言,可根据微粒的miRNA模式(miRNA pattern)判别各自的微粒的来源。

[0153] (miRNA)

[0154] 本发明中,微粒包含miRNA,该miRNA以与淀粉样前体蛋白(APP)、β-分泌酶(BACE1)、NMDA活化蛋白、糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)和聚谷氨酰胺结合蛋白-1(PQBP1)中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因。

[0155] 本发明中,miRNA(MicroRNAs)例如是21～25个碱基(核苷酸)的RNA分子。miRNA可通过靶基因(target;靶)mRNA的降解或解读阶段中的抑制来调节基因表达。

[0156] 本发明中,miRNA可以是单链(单体),也可以是双链(二聚体)。另外,本发明中,miRNA优选通过Dicer等核糖核酸酶切割而得的成熟型miRNA。

[0157] 需要说明的是,hsa-miR-16-5p等的本说明书中记载的miRNA的序列与登录号相关联地登录在已知的数据库(例如,miRBase数据库)中,本领域技术人员可唯一地确定序列。例如,hsa-miR-16-5p的登录号为MIMAT0000069,在miRBase数据库中登录有序列。以下,省略各miRNA的登录号。

[0158] 然而,本说明书中的miRNA还包括相对于hsa-miR-16-5p等的成熟型miRNA有1～5个左右的碱基不同的变体。另外,本说明书中的各miRNA包含由与各miRNA(例如hsa-miR-16-5p)的核苷酸序列具有同一性的核苷酸序列构成的多核苷酸、或由它们的互补性核苷酸序列构成的多核苷酸,这些多核苷酸具有本发明中的miRNA的功能。“同一性”是指将进行比较的序列彼此适当地比对时的同一的程度,是指上述序列间的氨基酸的正确的一致的出现率(%)。比对例如可利用BLAST等任意的算法来进行。同一性例如为80%、85%、90%、91%、

92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或约99％。由具有同一性的核苷酸序列构成的多核苷酸例如在miRNA的核苷酸序列中可具有点突变、缺失和/或添加。上述点突变等的碱基数例如为1～5个、1～3个、1～2个或1个。另外,由互补性核苷酸序列构成的多核苷酸例如包含在严格条件下与由miRNA的核苷酸序列构成的多核苷酸杂交的多核苷酸,其具有本发明中的miRNA的功能。对严格条件没有特别限定,例如可列举:日本特开2017-184642号公报的[0028]中记载的条件,该公报的内容作为参照纳入到本说明书中。

[0159] 本发明中,微粒优选以高于来自牙髓的干细胞的培养上清的浓度包含miRNA,该miRNA以与APP、BACE1、NMDA活化蛋白、GSK-3β和PQBP1中的至少1种蛋白的表达相关的基因作为靶基因。

[0160] 以下,对微粒所包含的miRNA的优选方案进行说明。

[0161] (1)APP的表达抑制剂

[0162] 本发明的基因表达调控剂优选为APP的表达抑制剂。这种情况下,微粒优选包含以与APP的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0163] 本发明中,微粒更优选包含下述APP抑制相关miRNA组(63种)中的至少1种。

[0164] APP抑制相关miRNA组:

[0165] hsa-miR-101-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-1238-3p、hsa-miR-1260b、hsa-miR-1276、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-151a-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-186-5p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-196a-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-3120-3p、hsa-miR-3132、hsa-miR-323a-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-3620-3p、hsa-miR-3646、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-381-3p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-383-5p、hsa-miR-411-3p、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-424-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-4484、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-4786-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-500a-5p、hsa-miR-5093、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539-3p、hsa-miR-548f-3p、hsa-miR-551b-5p、hsa-miR-5584-5p、hsa-miR-567、hsa-miR-5696、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6073、hsa-miR-873-5p、hsa-miR-93-5p。

[0166] 微粒优选包含APP抑制相关miRNA组中的5种以上、更优选包含10种以上、特别优选包含20种以上、更特别优选包含30种以上。

[0167] 微粒优选包含APP抑制相关miRNA组中的hsa-miR-101-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-222-3p和hsa-miR-93-5p中的任1种,特别优选至少包含hsa-miR-16-5p。

[0168] 微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计为4.0以上的APP抑制相关miRNA组中的至少1种、更优选包含10.0以上、特别优选包含15.0以上。微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计均为4.0以上的hsa-miR-101-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-222-3p和hsa-miR-93-5p,更优选包含均为10.0以上的hsa-miR-101-3p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-222-3p和hsa-miR-93-5p,特别优选包含15.0以上的hsa-miR-16-5p。

[0169] 需要说明的是,APP抑制相关miRNA组中所含的hsa-miR-16-5p还是与BACE1的表达相关的基因抑制剂和与GSK-3β的表达相关的基因抑制剂。即,本发明中,微粒优选为与APP的表达相关的基因表达抑制剂、与BACE1的表达相关的基因抑制剂和与GSK-3β的表达相关的基因抑制剂中的至少1种,并且包含hsa-miR-16-5p。

[0170] 而且,微粒更优选为与APP的表达相关的基因表达抑制剂、与BACE1的表达相关的基因抑制剂和与GSK-3β的表达相关的基因抑制剂,并且包含hsa-miR-16-5p。

[0171] 本发明的基因表达调控剂与由来自脂肪的干细胞的培养上清得到的外来体或由来自脐带的干细胞的培养上清得到的外来体相比,优选hsa-miR-16-5p的表达量为1.1倍以上、更优选为1.5倍以上、特别优选为2倍以上。

[0172] 在本发明的基因表达调控剂为APP基因的表达抑制剂的情况下,优选可将任意的细胞内的APP基因的表达抑制在通常的(未处理的细胞的情况下的)0.8倍以下、更优选可抑制在0.6倍以下、特别优选可抑制在0.4倍以下。

[0173] (2)BACE1抑制剂

[0174] 本发明的基因表达调控剂优选为BACE1抑制剂。这种情况下,微粒优选包含以与BACE1的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0175] 本发明中,微粒更优选包含下述BACE1阻碍相关miRNA组(50种)中的至少1种。

[0176] BACE1阻碍相关miRNA组:

[0177] hsa-miR-107、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-1267、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-2-3p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-200a-3p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-212-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-339-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-7-5p、hsa-miR-874-3p、hsa-miR-9-5p。

[0178] 微粒优选包含BACE1阻碍相关miRNA组中的5种以上、更优选包含10种以上、特别优选包含20种以上、更特别优选包含30种以上。

[0179] 微粒优选包含BACE1阻碍相关miRNA组中的hsa-miR-101-3p、hsa-miR-16-5p和hsa-miR-29a-3p中的任1种,特别优选至少包含hsa-miR-16-5p。

[0180] 微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计为4.0以上的BACE1阻碍相关miRNA组中的至少1种、更优选包含10.0以上、特别优选包含15.0以上。微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计均为4.0以上的hsa-miR-101-3p、hsa-miR-16-5p和hsa-miR-29a-3p,更优选包含均为10.0以上的hsa-miR-101-3p、hsa-miR-16-5p和hsa-miR-29a-3p,特别优选包含15.0以上的hsa-miR-16-5p。

[0181] 在本发明的基因表达调控剂为BACE1基因的表达抑制剂的情况下,优选可将任意的细胞内的BACE1基因的表达抑制在通常的(未处理的细胞的情况下的)0.8倍以下、更优选可抑制在0.75倍以下、特别优选可抑制在0.7倍以下。

[0182] (3)NMDA活化基因的表达抑制剂

[0183] 本发明的基因表达调控剂优选为NMDA活化基因的表达抑制剂。这种情况下,优选NMDA活化蛋白为DLG1、CAMK2D、CAMK2A和CAPN1中的至少1种蛋白,且微粒包含miRNA,该miRNA以与DLG1、CAMK2D、CAMK2A和CAPN1中的至少1种蛋白表达相关的基因作为靶基因。

[0184] 本发明中,微粒更优选包含下述DLG1抑制相关miRNA组、下述CAMK2D抑制相关miRNA组、下述CAMK2A抑制相关miRNA组和下述CAPN1抑制相关miRNA组中的至少1种miRNA组(共计51种)。

[0185] DLG1抑制相关miRNA组:

[0186] hsa-miR-1-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-206、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-613。

[0187] CAMK2D抑制相关miRNA组:

[0188] hsa-let-7a-5p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-211-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-30a-3p、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-361-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-484、hsa-miR-494-3p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-7-5p。

[0189] CAMK2A抑制相关miRNA组:

[0190] hsa-miR-129-5p、hsa-miR-137、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-149-3p、hsa-miR-152-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-32-5p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-363-3p、hsa-miR-3665、hsa-miR-4534、hsa-miR-4665-5p、hsa-miR-4688、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-5010-5p、hsa-miR-505-5p、hsa-miR-5698、hsa-miR-625-5p、hsa-miR-92a-3p。

[0191] CAPN1抑制相关miRNA组:

[0192] hsa-miR-1-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-17-3p、hsa-miR-22-3p、hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-6511b-5p。

[0193] 微粒优选包含DLG1抑制相关miRNA组、CAMK2D抑制相关miRNA组、CAMK2A抑制相关miRNA组和CAPN1抑制相关miRNA组中的5种以上、更优选包含10种以上、特别优选包含20种以上、更特别优选包含30种以上。

[0194] 微粒特别优选包含下述的每一种:

[0195] DLG1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-21-5p、

[0196] CAMK2D抑制相关miRNA组中的hsa-let-7a-5p、

[0197] CAMK2A抑制相关miRNA组中的hsa-miR-92a-3p、

[0198] CAPN1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-22-3p。

[0199] 微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计为4.0以上的DLG1抑制相关miRNA组、CAMK2D抑制相关miRNA组、CAMK2A抑制相关miRNA组和CAPN1抑制相关miRNA组中的至少1种、更优选包含10.0以上、特别优选包含15.0以上。微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计均为4.0以上的hsa-miR-21-5p、hsa-let-7a-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-22-3p,更优选包含均为10.0以上的hsa-miR-21-5p、hsa-let-7a-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-22-3p,特别优选包含15.0以上的hsa-miR-21-5p、hsa-let-7a-5p、hsa-miR-92a-3p。

[0200] 本发明的基因表达调控剂与由来自脂肪的干细胞的培养上清得到的外来体或由

来自脐带的干细胞的培养上清得到的外来体相比,hsa-miR-21-5p的表达量优选为1.1倍以上、更优选为1.5倍以上、特别优选为2倍以上、更特别优选为5倍以上。

[0201] 本发明的基因表达调控剂与由来自脂肪的干细胞的培养上清得到的外来体相比,hsa-let-7a-5p的表达量优选为1.1倍以上、更优选为1.5倍以上。另外,本发明的基因表达调控剂与由来自脐带的干细胞的培养上清得到的外来体相比,hsa-let-7a-5p的表达量优选超过1.0倍、更优选为1.05倍以上。

[0202] 本发明的基因表达调控剂与由来自脂肪的干细胞的培养上清得到的外来体或由来自脐带的干细胞的培养上清得到的外来体相比,hsa-miR-92a-3p的表达量优选为1.1倍以上、更优选为1.5倍以上、特别优选为2倍以上、更特别优选为4倍以上。

[0203] 本发明的基因表达调控剂与由来自脂肪的干细胞的培养上清得到的外来体或由来自脐带的干细胞的培养上清得到的外来体相比,hsa-miR-22-3p的表达量优选为1.1倍以上、更优选为1.5倍以上、特别优选为2倍以上。

[0204] 在本发明的基因表达调控剂为NMDA活化基因(优选CAMK2D基因)的表达抑制剂的情况下,优选可将任意的细胞内的NMDA活化基因的表达抑制在通常的(未处理的细胞的情况下的)0.8倍以下、更优选可抑制在0.5倍以下、特别优选可抑制在0.3倍以下。

[0205] (4)GSK-3β抑制剂

[0206] 本发明的基因表达调控剂优选为GSK-3β抑制剂。这种情况下,微粒优选包含以与GSK-3β的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。

[0207] 微粒更优选包含下述GSK-3β阻碍相关miRNA组(54种)中的至少1种。

[0208] GSK-3β阻碍相关miRNA组:

[0209] hsa-let-7a-3p、hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-let-7f-2-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-1185-1-3p、hsa-miR-1185-2-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-132-3p、hsa-miR-137、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-1910-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-219a-5p、hsa-miR-23a-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26a-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-346、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-377-3p、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-409-5p、hsa-miR-410-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-425-5p、hsa-miR-4465、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6083、hsa-miR-708-5p、hsa-miR-9-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-96-5p、hsa-miR-98-3p。

[0210] 微粒优选包含GSK-3β阻碍相关miRNA组中的5种以上、更优选包含10种以上、特别优选包含20种以上、更特别优选包含30种以上。

[0211] 微粒优选包含GSK-3β阻碍相关miRNA组中的hsa-miR-16-5p和hsa-miR-29a-3p中的任1种、特别优选至少包含hsa-miR-16-5p。

[0212] 微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计为4.0以上的GSK-3β阻碍相关miRNA组中的至少1种、更优选包含10.0以上、特别优选包含15.0以上。微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计均为4.0以上的hsa-miR-16-5p和hsa-miR-29a-3p、更优选包含均为10.0以上的hsa-miR-16-5p和hsa-miR-29a-3p、特别优选

包含15.0以上的hsa-miR-16-5p。

[0213] 在本发明的基因表达调控剂为GSK-3β基因抑制剂的情况下,优选可将任意的细胞内的GSK-3β基因的表达抑制在通常的(未处理的细胞的情况下的)0.8倍以下、更优选可抑制在0.75倍以下、特别优选可抑制在0.7倍以下。

[0214] (5)PQBP1的表达抑制剂

[0215] 本发明的基因表达调控剂优选为PQBP1的表达抑制剂。这种情况下,微粒更优选包含以与PQBP1的表达相关的基因作为靶基因的miRNA。如Nature Communications第12卷,Article number:6565(2021)中所示,抑制参与Tau活化的PQBP1的miRNA有可能对Tau疾病(阿尔茨海默症或脑炎)的治疗起作用。

[0216] 微粒特别优选包含下述PQBP1抑制相关miRNA组中的至少1种、更特别优选2种均包含。

[0217] PQBP1抑制相关miRNA组:hsa-miR-6727-3p、hsa-miR-6727-5p。

[0218] 微粒更优选至少包含PQBP1抑制相关miRNA组中的hsa-miR-6727-3p、特别优选hsa-miR-6727-3p和hsa-miR-6727-5p均包含。

[0219] 微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计为1.0以上的PQBP1抑制相关miRNA组中的至少1种、更优选包含2.0以上、特别优选包含3.0以上。微粒优选包含以使用IMOTA分析得到的读取计数的Log2Ratio计均为2.0以上的hsa-miR-6727-3p和hsa-miR-6727-5p、更优选包含均为3.0以上的hsa-miR-6727-3p和hsa-miR-6727-5p、特别优选包含4.0以上的hsa-miR-6727-3p。

[0220] 本发明的基因表达调控剂与由来自脂肪的干细胞的培养上清得到的外来体或由来自脐带的干细胞的培养上清得到的外来体相比,hsa-miR-6727-3p的表达量优选为1.1倍以上、更优选为1.5倍以上、特别优选为2倍以上。

[0221] 在本发明的基因表达调控剂为PQBP1基因的表达抑制剂的情况下,优选可将任意的细胞内的PQBP1基因的表达抑制在通常的(未处理的细胞的情况下的)0.8倍以下、更优选可抑制在0.6倍以下、特别优选可抑制在0.55倍以下。

[0222] (miRNA的种类)

[0223] 这里,在来源于来自牙髓的干细胞的培养上清的微粒中,包含约2600种小RNA。其中的约1800种为miRNA。这些miRNA中,含量多的miRNA为180～200种。来源于来自牙髓的干细胞的微粒中的含量多的miRNA的特征在于:与脑神经疾病或眼病的治疗相关的微小RNA多,这是以往未知的,是本发明人新发现的见解。该特征与其他间充质干细胞的微粒中的含量多的miRNA的种类大不相同。例如,在来自脂肪的干细胞的微粒或来自脐带的干细胞的微粒中的含量多的miRNA中,几乎不含与脑神经疾病或眼病的治疗相关的微小RNA。

[0224] 来源于来自牙髓的干细胞的培养上清的微粒优选包含5种以上的可调控与阿尔茨海默症等的β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的表达的微小RNA(以下,也称为阿尔茨海默相关微小RNA),更优选包含10种以上、特别优选包含20种以上、更特别优选包含30种以上、最优选包含100种以上。

[0225] (微粒的种类)

[0226] 微粒优选为选自外来体(Exosome)、微小泡、膜颗粒、膜小泡、核外颗粒体(Ectosome)和外囊泡(Exovesicle)或微囊泡(Microvesicle)的至少1种,更优选为外来体。

[0227] 微粒的直径优选为10～1000nm、更优选为30～500nm、特别优选为50～150nm。

[0228] 另外,希望在微粒的表面存在CD9、CD63、CD81等称为四旋蛋白(Tetraspanin)的分子,其可以是单独的CD9、单独的CD63、单独的CD81,或者可以是它们中的2种或3种的任意组合。

[0229] 以下,有时是对使用外来体作为微粒的情况下的优选方案进行说明,但用于本发明的微粒并不限定于外来体。

[0230] 外来体优选为在多胞体与原生质膜融合时由细胞释放的细胞外囊泡(Extracellular Vesicles,细胞外小泡)。

[0231] 外来体的表面优选包含来源于来自牙髓的干细胞的细胞膜的脂质和蛋白。

[0232] 在外来体的内部优选包含核酸(微小RNA、信使RNA、DNA等)和蛋白等来自牙髓的干细胞的细胞内物质。

[0233] 已知外来体被用于通过从某个细胞向其他细胞运输遗传信息而进行细胞与细胞的通信。外来体可容易地追踪,可靶向至特异性区域。

[0234] (微粒的含量)

[0235] 本发明的基因表达调控剂对微粒的含量没有特别限制。本发明的基因表达调控剂优选包含0.5×10^{8}个以上的微粒、更优选包含1.0×10^{8}个以上、特别优选包含2.0×10^{8}个以上、更特别优选包含2.5×10^{8}个以上、更进一步特别优选包含1.0×10^{9}个以上。

[0236] 另外,本发明的基因表达调控剂对微粒的含有浓度没有特别限制。本发明的基因表达调控剂优选包含1.0×10^{8}个/mL以上的微粒、更优选包含2.0×10^{8}个/mL以上、特别优选包含4.0×10^{8}个/mL以上、更特别优选包含5.0×10^{8}个/mL以上、更进一步特别优选包含2.0×10^{9}个/mL以上。

[0237] 本发明的基因表达调控剂的优选方案通过如此大量或以高浓度包含微粒,可将miRNA等的量维持在高水平,可调控(特别是抑制)与β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎相关的蛋白的表达。

[0238] ＜其他成分＞

[0239] 本发明的基因表达调控剂除了含有微粒以外,根据给药对象的动物的种类或目的,在不损及本发明效果的范围内,可含有其他成分。作为其他成分,可列举:营养成分、抗生素、细胞因子、保护剂、载体、赋形剂、崩解剂、缓冲剂、乳化剂、悬浮剂、无痛化剂(镇痛剂)、稳定剂、保存剂、防腐剂等。

[0240] 作为营养成分,例如可列举:脂肪酸等、维生素等。

[0241] 作为抗生素,例如可列举:青霉素、链霉素、庆大霉素等。

[0242] 作为载体,可列举:作为药学上可接受的载体而已知的材料。

[0243] 本发明的基因表达调控剂可以是来自牙髓的干细胞的培养上清本身或微粒本身,也可以是进一步包含药学上可接受的载体或赋形剂等的药物组合物。药物组合物的目的在于促进对给药对象给予来自牙髓的干细胞的培养上清或微粒。

[0244] 药学上可接受的载体优选为不会对给药对象引起显著的刺激性、且不会抑制所给予的化合物的生物学活性和特性的载体(包括稀释剂)。载体的例子为:丙二醇;(生理)盐水;乳液;缓冲液;培养基、例如DMEM或RPMI等;含有去除自由基的成分的低温保存培养基。

[0245] 本发明的基因表达调控剂可包含以往已知的基因表达调控剂的有效成分。本领域

技术人员可结合用途或给药对象等进行适当变更。

[0246] 另一方面,本发明的基因表达调控剂优选不含规定的物质。

[0247] 例如,本发明的基因表达调控剂优选不含来自牙髓的干细胞。

[0248] 另外,本发明的基因表达调控剂优选不含MCP-1。然而,可包含除MCP-1以外的细胞因子。作为其他细胞因子,可列举:日本特开2018-023343号公报的[0014]～[0020]中记载的细胞因子等。

[0249] 另外,本发明的基因表达调控剂优选不含Siglec-9。然而,可包含除Siglec-9以外的其他唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素。

[0250] 需要说明的是,本发明的基因表达调控剂优选实质上不含血清(胎牛血清、人血清、羊血清等)。另外,本发明的基因表达调控剂优选实质上不含敲除血清替代品(KSR)等以往的血清替代品。

[0251] 本发明的基因表达调控剂优选上述的其他成分的含量(固体成分量)均为1质量%以下、更优选为0.1质量%以下、特别优选为0.01质量%以下。

[0252] ＜基因表达调控剂的制造方法＞

[0253] 对本发明的基因表达调控剂的制造方法没有特别限制。

[0254] 可调制来自牙髓的干细胞等的培养上清,接着由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化微粒,以调制本发明的基因表达调控剂。或者,可由商业上购入而获取的来自牙髓的干细胞的培养上清纯化微粒,以调制本发明的基因表达调控剂。而且,也可接受被废弃处理的包含来自牙髓的干细胞的培养上清的组合物(或将该组合物适当纯化),从中纯化微粒,以调制本发明的基因表达调控剂。

[0255] (来自牙髓的干细胞等的培养上清的调制方法)

[0256] 对来自牙髓的干细胞等的培养上清没有特别限制。

[0257] 来自牙髓的干细胞等的培养上清优选实质上不含血清。例如,来自牙髓的干细胞等的培养上清优选血清含量为1质量%以下、更优选为0.1质量%以下、特别优选为0.01质量%以下。

[0258] 来自牙髓的干细胞可来源于人,也可来源于除人以外的动物。作为除人以外的动物,可列举:与后述的给予本发明的基因表达调控剂的对象的动物(生物种类)同样的动物,优选哺乳动物。

[0259] 对用于培养上清的来自牙髓的干细胞没有特别限制。可使用脱落乳牙牙髓干细胞(stem cells from exfoliated deciduous teeth:来自脱落乳牙的干细胞)、或通过其他方法获取的乳牙牙髓干细胞、或恒牙牙髓干细胞(dental pulp stem cells:牙髓干细胞;DPSC)。除人乳牙牙髓干细胞或人恒牙牙髓干细胞以外,还可使用猪乳牙牙髓干细胞等来源于除人以外的动物的来自牙髓的干细胞。

[0260] 来自牙髓的干细胞除了产生外来体以外,还可产生血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子-β(TGF-β)-1和-3、TGF-α、KGF、HBEGF、SPARC、其他生长因子、趋化因子等各种细胞因子。另外,还可产生其他的多种生理活性物质。

[0261] 本发明中,用于来自牙髓的干细胞的培养上清的来自牙髓的干细胞特别优选为含有大量蛋白的来自牙髓的干细胞,优选使用乳牙牙髓干细胞。即,本发明中,优选使用乳牙

牙髓干细胞的培养上清。

[0262] 用于本发明的来自牙髓的干细胞只要可实现目标处置即可,可以是天然的干细胞,也可以是经基因修饰的干细胞。

[0263] 特别是,在本发明中可使用来自牙髓的干细胞的永生化干细胞。通过使用实质上可无限增殖的永生化干细胞,可使干细胞的培养上清中所含的生物因子的量和组成长期稳定。对来自牙髓的干细胞的永生化干细胞没有特别限制。永生化干细胞优选为未癌化的永生化干细胞。来自牙髓的干细胞的永生化干细胞可通过向来自牙髓的干细胞中单独或组合添加以下的小分子化合物(抑制剂)进行培养来调制。

[0264] 作为TGFβ受体抑制剂,只要是具有抑制转化生长因子(TGF)β受体的功能的作用的物质,则没有特别限定,例如可列举:2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-4-基-2-叔丁基-1H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶、3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(4-喹啉基)-1-苯硫基氨基甲酰基-1H-吡唑(A-83-01)、2-[(5-氯-2-氟苯基)蝶啶-4-基]吡啶-4-基胺(SD-208)、3-[(吡啶-2-基)-4-(4-醌基)]-1H-吡唑、2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶(以上,Merck公司)、SB431542(Sigma-Aldrich公司)等。可优选列举A-83-01。

[0265] 作为ROCK抑制剂,只要是具有抑制Rho结合激酶的功能的作用的物质,则没有特别限定。作为ROCK抑制剂,例如可列举:GSK269962A(Axonmedchem公司)、盐酸法舒地尔(Tocris Bioscience公司)、Y-27632、H-1152(以上,富士胶片和光纯药株式会社)等。可优选列举Y-27632。

[0266] 作为GSK3抑制剂,只要是抑制GSK-3(Glycogen Synthase Kinase 3(糖原合酶激酶3)、糖原合成酶3)的物质,则没有特别限定,可列举:A 1070722、BIO、BIO-丙酮肟(以上,TOCRIS公司)等。

[0267] 作为MEK抑制剂,只要是具有抑制MEK(MAP激酶-ERK激酶)的功能的作用的物质,则没有特别限定,例如可列举:AZD6244、CI-1040(PD184352)、PD0325901、RDEA119(BAY86-9766)、SL327、U0126-EtOH(以上,Selleck公司)、PD98059、U0124、U0125(以上,Cosmo Bio株式会社)等。

[0268] 在将本发明的基因表达调控剂用于再生医疗的情况下,从再生医疗等安全性保障法的要求出发,设为以下方案:包含来自牙髓的干细胞或它们的永生化干细胞的培养上清或来自其的微粒的组合物不含除来自牙髓的干细胞等以外的其他体干细胞。本发明的基因表达调控剂可含有除来自牙髓的干细胞等以外的间充质干细胞或其他体干细胞,但优选不含有。

[0269] 作为除间充质干细胞以外的其他体干细胞的例子,包括来自真皮系统、消化系统、骨髓系统、神经系统等的干细胞,但不限定于这些。作为真皮系统的体干细胞的例子,包括上皮干细胞、毛囊干细胞等。作为消化系统的体干细胞的例子,包括胰腺(整体的)干细胞、肝干细胞等。作为(除间充质干细胞以外的)骨髓系统的体干细胞的例子,包括造血干细胞等。作为神经系统的体干细胞的例子,包括神经干细胞、视网膜干细胞等。

[0270] 本发明的基因表达调控剂可含有除体干细胞以外的干细胞,优选不含有。作为除体干细胞以外的干细胞,包括胚胎干细胞(ES细胞)、诱导多能干细胞(iPS细胞)、胚胎癌细胞(EC细胞)。

[0271] 对来自牙髓的干细胞或其永生化干细胞的培养上清的调制方法没有特别限制,可

采用以往的方法。

[0272] 来自牙髓的干细胞等的培养上清是培养来自牙髓的干细胞而得到的培养液。例如,通过在培养来自牙髓的干细胞后分离去除细胞成分,可得到可用于本发明的培养上清。可使用适当施行了各种处理(例如,离心处理、浓缩、溶剂的置换、透析、冷冻、干燥、冷冻干燥、稀释、脱盐、保存等)的培养上清。

[0273] 用于得到来自牙髓的干细胞的培养上清的来自牙髓的干细胞可通过常规方法筛选,可根据细胞的大小或形态、或作为粘附性细胞来筛选。可从由脱落的乳牙或恒牙采集的牙髓细胞中作为粘附性细胞或其传代细胞来筛选。在来自牙髓的干细胞的培养上清中,可使用培养所筛选的干细胞而得到的培养上清。

[0274] 需要说明的是,“来自牙髓的干细胞等的培养上清”优选为培养来自牙髓的干细胞等而得到的、不含细胞本身的培养液。本发明中使用的来自牙髓的干细胞的培养上清在其一个方案中优选作为整体也不含细胞(无论细胞种类如何)。该方案的组合物根据该特征,自然地使来自牙髓的干细胞本身与包含来自牙髓的干细胞的各种组合物明确地区别开来。该方案的典型例子是:不含来自牙髓的干细胞、而仅由来自牙髓的干细胞的培养上清构成的组合物。

[0275] 本发明中使用的来自牙髓的干细胞的培养上清可包含来自乳牙牙髓的干细胞和来自成人牙髓的干细胞两者的培养上清。本发明中使用的来自牙髓的干细胞的培养上清优选包含来自乳牙牙髓的干细胞的培养上清作为有效成分,更优选包含50质量%以上、优选包含90质量%以上。本发明中使用的来自牙髓的干细胞的培养上清更特别优选为仅由来自乳牙牙髓的干细胞的培养上清构成的组合物。

[0276] 用于得到培养上清的来自牙髓的干细胞的培养液可使用基础培养基、或在基础培养基中添加了血清等的培养基等。需要说明的是,作为基础培养基,除Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)以外,还可使用Iscove改良Dulbecco培养基(IMDM)(GIBCO公司等)、Ham F12培养基(HamF12)(SIGMA公司、GIBCO公司等)、RPMI1640培养基等。另外,作为可添加在培养基中的成分的例子,可列举:血清(胎牛血清、人血清、羊血清等)、血清替代品(敲除血清替代品(Knockout Serum Replacement,KSR)等)、牛血清白蛋白(BSA)、抗生素、各种维生素、各种矿物质。

[0277] 然而,为了调制不含血清的“来自牙髓的干细胞的培养上清”,关于贯穿整个过程或最后或从最后起的数次的传代培养,可使用无血清培养基。例如,通过用不含血清的培养基(无血清培养基)培养来自牙髓的干细胞,可调制不含血清的来自牙髓的干细胞的培养上清。进行1次或多次的传代培养,通过将最后或从最后起的数次的传代培养用无血清培养基进行培养,也可得到不含血清的来自牙髓的干细胞等的培养上清。另一方面,通过利用透析或基于柱的溶剂置换等从所回收的培养上清中去除血清,也可得到不含血清的来自牙髓的干细胞的培养上清。

[0278] 在用于得到培养上清的来自牙髓的干细胞的培养中,可直接适用通常所采用的条件。关于来自牙髓的干细胞的培养上清的调制方法,除了根据干细胞的种类适当调整干细胞的分离和选拔步骤以外,可与后述的细胞培养方法同样进行。本领域技术人员可根据来自牙髓的干细胞的种类适当进行来自牙髓的干细胞的分离和选拔。

[0279] 另外,在来自牙髓的干细胞的培养中,为了大量生产外来体等微粒,可适用特别的

条件。作为特别的条件,例如可列举:低温条件、低氧条件、微重力条件等与任何刺激物进行共培养的条件等。

[0280] 本发明中用于调制外来体等微粒的来自牙髓的干细胞的培养上清除了包含来自牙髓的干细胞的培养上清以外,还可包含其他成分,但优选实质上不含其他成分。

[0281] 然而,可将用于调制外来体的各种添加剂添加至来自牙髓的干细胞的培养上清中,之后再进行保存。

[0282] (微粒的调制方法)

[0283] 可由来自牙髓的干细胞等的培养上清纯化微粒,以调制微粒。

[0284] 微粒的纯化优选为由来自牙髓的干细胞的培养上清分离包含微粒的组分、更优选为分离微粒。

[0285] 微粒可通过根据微粒的特性从非缔合成分中分离而分离出来。例如,微粒可根据分子量、尺寸、形态、组成或生物学活性进行分离。

[0286] 本发明中,可通过对来自牙髓的干细胞的培养上清进行离心处理,将所得到的含有大量微粒的特定组分(例如沉淀物)进行分取来纯化微粒。可去除规定组分以外的组分的不需要的成分(不溶成分)。从本发明的基因表达调控剂中去除溶剂和分散介质、以及不需要的成分,可以不是完全的去除。离心处理的条件可示例如下:在100~20000g下进行1~30分钟。

[0287] 本发明中,可通过对来自牙髓的干细胞的培养上清或其离心处理物进行过滤处理来纯化微粒。可通过过滤处理去除不需要的成分。另外,如果使用适当孔径的滤膜,则可同时进行不需要的成分的去除和灭菌处理。对用于过滤处理的滤膜的材质、孔径等没有特别限定。可按照已知方法用适当的分子量或尺寸截留的滤膜进行过滤。从容易分取外来体的观点来看,滤膜的孔径优选为10~1000nm、更优选为30~500nm、特别优选为50~150nm。

[0288] 本发明中,可采用柱色谱等进一步的分离方法分离来自牙髓的干细胞的培养上清或其离心处理物或它们的过滤处理物。例如可采用使用了各种柱的高效液相色谱(HPLC)。柱可使用尺寸排阻柱或结合柱。

[0289] 在各处理阶段的各组分中,为了追踪微粒(或其活性),可利用微粒的1种以上的特性或生物学活性。例如,为了追踪微粒,可使用光散射、折射率、动态光散射或UV-可见光检测器。或者,为了追踪各组分中的活性,可利用特定的酶活性等。

[0290] 作为微粒的纯化方法,可采用日本特表2019-524824号公报的[0034]~[0064]中记载的方法,该公报的内容作为参照纳入本说明书中。

[0291] 对本发明的基因表达调控剂的最终形态没有特别限制。例如,本发明的基因表达调控剂可列举:将微粒与溶剂或分散介质一同填充至容器中而成的形态;将微粒与凝胶一同凝胶化且填充至容器中而成的形态;将微粒冷冻和/或干燥进行固化以制成制剂或填充至容器而成的形态等。作为容器,例如可列举:适于冷冻保存的管、离心管、袋等。冷冻温度例如可设为-20℃~-196℃。

[0292] 与以往的可用作基因表达调控剂的组合物相比,本发明的基因表达调控剂具有以下优点:容易大量生产,可有效利用以往作为产业废弃物等废弃的干细胞的培养液,降低干细胞培养液的废弃成本等。特别是在来自牙髓的干细胞的培养上清为来自人牙髓的干细胞的培养上清的情况下,还具有以下优点:在对人适用本发明的基因表达调控剂的情况下,免

疫学上等观点上的安全性高、伦理性的问题也少。在来自牙髓的干细胞的培养上清为来源于痴呆患者的来自牙髓的干细胞的培养上清的情况下,在对该患者适用本发明的基因表达调控剂时,安全性进一步提高,伦理性的问题也会减少。

[0293] 在本发明的基因表达调控剂来源于来自牙髓的干细胞的培养上清的情况下,也可被用于修复医疗的用途。特别是包含来源于来自牙髓的干细胞等的培养上清的微粒的组合物优选用于修复医疗的用途。这里,已知在以干细胞移植为前提的再生医疗中,干细胞并不是再生的主角,而是干细胞所产生的液体成分与自身的干细胞一起修复脏器。以往的干细胞移植所伴随的癌化、标准化、给药方法、保存性、培养方法等困难问题得到解决,利用使用了来自牙髓的干细胞的培养上清或来源于其的微粒的组合物可进行修复医疗。与干细胞移植相比,由于在使用本发明的基因表达调控剂的情况下,不进行细胞移植,所以不易发生肿瘤化等,可谓是更安全的。另外,本发明的基因表达调控剂具有可使用一定标准化的品质的调控剂的优点。由于可选择大量生产或有效的给药方法,所以可低成本地进行利用。

[0294] [痴呆的改善方法]

[0295] 本发明的痴呆的改善方法包括:对发生痴呆的对象给予有效量的本发明的基因表达调控剂。

[0296] 对发生痴呆的对象给予本发明的基因表达调控剂的步骤没有特别限制。

[0297] 给药方法可列举:对口腔、鼻腔或呼吸道的喷雾或吸引、点滴、局部给药、滴鼻剂等,优选侵袭少。作为局部给药的方法,优选注射。另外,还优选电穿孔,其是通过对皮肤表面施加电压(电脉冲),在细胞膜上暂时开微细的孔,使有效成分渗透至常规护理中无法到达的真皮层。在局部给药的情况下,可列举:静脉内给药、动脉内给药、门静脉内给药、皮内给药、皮下给药、肌肉内给药、腹腔内给药等,更优选为动脉内给药、静脉内给药、皮下给药或腹腔内给药。

[0298] 另外,利用各种制剂技术,可改变基因表达调控剂的体内分布。改变体内分布的多个方法为本领域技术人员所已知。这种方法的例子,例如可列举:保护由蛋白、脂质(例如,脂质体)、碳水化合物或合成聚合物这样的物质构成的小泡中的外来体。

[0299] 对发生痴呆的对象给予的本发明的基因表达调控剂可在对象的体内循环,并到达规定的组织。

[0300] 对给药次数和给药间隔没有特别限制。给药次数可设为每周1次以上、优选为5次以上、更优选为6次以上、特别优选为7次以上。给药间隔优选为1小时~1周、更优选为半天~1周、特别优选为1天(每天1次)。然而,可根据给药对象的生物种类或给药对象的症状适当调整。

[0301] 本发明的基因表达调控剂优选为以下用途:对发生痴呆的对象在治疗有效期间1周给予1次以上的基因表达调控剂。在给药对象为人的情况下,优选每周的给药次数多,优选在治疗有效期间1周给药5次以上,优选每天给药。

[0302] 在使用浓度为2.0×10^{9}个/ml的来自牙髓的干细胞的培养上清的情况下,在小鼠模型中,每只小鼠(约25g)优选为0.1~5ml、更优选为0.3~3ml、更特别优选为0.5~1ml。

[0303] 在使用浓度为0.1×10^{8}个/μg的微粒的情况下,在小鼠模型中,每只小鼠(约25g)优选为1~50μg、更优选为3~30μg、更特别优选为5~25μg。

[0304] 对其他动物的每单位体重的给药量的优选范围可利用比例关系由对模型小鼠的

每单位体重(约25g)的给药量来计算。然而,可根据给药对象的症状适当调整。

[0305] 对给予本发明的基因表达调控剂的对象动物(生物种类)没有特别限制。给予本发明的基因表达调控剂的对象动物优选为哺乳动物、鸟类(鸡、鹌鹑、鸭等)、鱼类(鲑鱼、鳟鱼、金枪鱼、鲣鱼等)。作为哺乳动物,可以是人,也可以是非人哺乳动物,但特别优选为人。作为非人哺乳动物,更优选为牛、猪、马、山羊、绵羊、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠。

[0306] 本发明的基因表达调控剂可与以往已知的基因表达调控剂并用。另外,本发明的基因表达调控剂还可与以往已知的β淀粉样蛋白相关或Tau蛋白相关的痴呆或脑炎的治疗药或预防药并用。

[0307] 实施例

[0308] 以下,列举实施例和比较例或参考例,以更具体地说明本发明的特征。以下的实施例中所示的材料、使用量、比例、处理内容、处理顺序等只要不脱离本发明的宗旨即可,可适当变更。因此,本发明的范围不应由以下所示的具体例限定性地解释。

[0309] [实施例1]

[0310] <来自牙髓的干细胞的培养上清的调制>

[0311] 使用DMEM培养基代替DMEM/HamF12混合培养基,其他则依照日本专利第6296622号的实施例6中记载的方法,调制人乳牙牙髓干细胞的培养上清,分取了培养上清。在原代培养中添加胎牛血清(FBS)进行培养,对在传代培养中使用原代培养液进行培养而得的传代培养液的上清进行分取,使其不含FBS,调制了乳牙牙髓干细胞的培养上清。需要说明的是,DMEM为Dulbecco改良Eagle培养基,F12为Ham F12培养基。

[0312] <外来体的调制>

[0313] 通过以下的超离心法,从所得到的来自牙髓的干细胞的培养上清中纯化和回收了来自牙髓的干细胞的外来体。

[0314] 将100mL乳牙牙髓干细胞的培养上清用孔径(pore size)为0.22微米的滤器过滤后,将其溶液在4℃下以100000×g离心分离60分钟。倾析上清,将外来体浓缩颗粒重新悬浮于磷酸缓冲食盐水(PBS)中。将重新悬浮样品以100000×g离心分离60分钟。再次将颗粒以浓缩样品的形式从离心管的底部回收(约100μl)。蛋白浓度通过微量BSA蛋白测定试剂盒(Pierce、Rockford、IL)来确定。包含外来体的组合物(浓缩溶液)在-80℃下保管。

[0315] 将由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的包含外来体的组合物作为实施例1的基因表达调控剂样品。

[0316] 使用纳米颗粒分析系统NanoSight(NanoSight)(日本Quantum Design株式会社制造),对实施例1的基因表达调控剂中所含的微粒的平均粒径、浓度进行评价。

[0317] 实施例1的基因表达调控剂中所含的微粒的平均粒径为50～150nm。

[0318] 实施例1的基因表达调控剂是1.0×10^{9}个/ml以上的高浓度外来体溶液,具体而言,其是2.0×10^{9}个/ml的高浓度外来体溶液。

[0319] 另外,按照已知方法对所得到的实施例1的基因表达调控剂的成分进行分析。其结果可知:实施例1的基因表达调控剂不含来自牙髓的干细胞的干细胞,不含MCP-1,也不含Siglec-9。因此,可知与作为间充质干细胞的培养上清的有效成分的MCP-1和Siglec-9以及它们的类似物不同的有效成分是实施例1的基因表达调控剂的有效成分。

[0320] [比较例1]

[0321] ＜来自脂肪的干细胞的培养上清的调制＞

[0322] 除了使用来自脂肪的干细胞以外,与实施例1同样地操作,调制了来自脂肪的干细胞的培养上清。

[0323] 除了使用来自脂肪的干细胞的培养上清以外,与实施例1同样地操作,纯化了来自脂肪的干细胞的外来体。将所得到的来自脂肪的干细胞的外来体作为比较例1的基因表达抑制剂。

[0324] [比较例2]

[0325] ＜来自脐带的干细胞的培养上清的调制＞

[0326] 除了使用来自脐带的干细胞以外,与实施例1同样地操作,调制了来自脐带的干细胞的培养上清。

[0327] 除了使用来自脐带的干细胞的培养上清以外,与实施例1同样地操作,纯化了来自脐带的干细胞的外来体。将所得到的来自脐带的干细胞的外来体作为比较例2的基因表达抑制剂。

[0328] [试验例1]:在外来体中表达的微小RNA

[0329] 通过下一代测序(NGS)分析对实施例1的基因表达抑制剂中所含的小RNA进行分析。通过NGS分析,鉴定了实施例1的基因表达抑制剂(来自牙髓的干细胞的外来体)中所含的1787个miRNA。所得结果见下述表2。

[0330] [表2]

[0331]

名称	检测数	%
miRNA	1787	72.35

[0332]

piRNA	123	4.98
tRNA	411	16.64
其他RNA	149	6.03
总数	2470	100

[0333] [试验例2]:与大脑皮质的miRNA的对比

[0334] 在微小RNA的分析中,使用了IMOTA(交互式多组学-组织图谱:Interactive Multi-Omics-Tissue Atlas)。

[0335] 在IMOTA中以大脑皮质(Cerebral Cortex)为中心检索了调控蛋白的微小RNA。IMOTA是可对各组织或细胞中的miRNA或mRNA、蛋白的相互作用或表达量进行研究的对话型多组学图谱(Nucleic Acids Research,第46卷,Issue D1,4January 2018,第D770-D775页,"IMOTA:an interactive multi-omics tissue atlas for the analysis of human miRNA-target interactions")。在大脑皮质中,Omic的计数如下:3071个蛋白、14182个mRNA、1124个miRNA。另外,在大脑皮质中表达率(Expression Rate)高的Omic的计数如下:1119个蛋白、1110个mRNA、145个miRNA。

[0336] 在大脑皮质中表达的1124个miRNA与在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体(实施例1的基因表达调控剂;SGF外来体)中表达的1787个miRNA之间共通表达的miRNA为859个。即,在实施例1的基因表达抑制剂(来自牙髓的干细胞的外来体)中表达的miRNA中,也在大脑皮质中表达的miRNA的比例为48.1%,非常高。

[0337] 另外,在实施例1的基因表达抑制剂(来自牙髓的干细胞的外来体)中有表达、且在大脑皮质中的表达为高(High)的miRNA是下述表3和表4中记载的122个。

[0338] [表3]

[0339]

hsa-let-7a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-30d-5p
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-30e-5p
hsa-let-7c-5p	hsa-miR-1260a	hsa-miR-211-3p	hsa-miR-3135b
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-1268a	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-3141
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-1268b	hsa-miR-219a-5p	hsa-miR-3162-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-1273g-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-3196
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-128-3p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-320c
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-129-2-3p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-331-3p
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-338-3p
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-136-5p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-342-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-107	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-34b-5p
hsa-miR-1202	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-3656
hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-2861	hsa-miR-3665
hsa-miR-1225-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3679-5p
hsa-miR-1227-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-376c-3p
hsa-miR-1229-5p	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-377-3p
hsa-miR-124-3p	hsa-miR-1915-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-3960
hsa-miR-1246	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-4270
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-4281

[0340] [表4]

[0341]

hsa-miR-4284	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-940
hsa-miR-4286	hsa-miR-5001-5p	hsa-miR-99a-5p
hsa-miR-4324	hsa-miR-5100	
hsa-miR-4442	hsa-miR-572	
hsa-miR-4443	hsa-miR-5739	
hsa-miR-4459	hsa-miR-574-5p	
hsa-miR-4466	hsa-miR-5787	
hsa-miR-4507	hsa-miR-6068	
hsa-miR-4516	hsa-m iR-6085	
hsa-miR-451a	hsa-miR-6087	
hsa-miR-4530	hsa-miR-6088	
1sa-miR-4634	hsa-miR-6089	
hsa-miR-4669	hsa-mi R-6124	
hsa-miR-4739	hsa-miR-6125	
hsa-miR-4741	hsa-miR-638	

hsa-miR-4763-3p	hsa-miR-6724-5p	
hsa-miR-4800-5p	hsa-miR-7-5p	
hsa-miR-483-5p	hsa-miR-9-3p	
hsa-miR-488-3p	hsa-miR-9-5p	
hsa-miR-494-3p	hsa-miR-939-5p	

[0342] [试验例3]:与疾病相关的微小RNA的探索

[0343] 根据所得到的分析结果,探索了与疾病相关的微小RNA。使用IMOTA进行了与疾病相关的miRNA的提取。这里,探索了是否包含抑制与阿尔茨海默症相关的蛋白的微小RNA、或者是否包含调控作为治疗药的靶的蛋白的微小RNA。在该试验例3中,作为与阿尔茨海默症相关的蛋白,探索了抑制β-分泌酶(BACE1)、APP的微小RNA。作为治疗药的靶的蛋白,探索了抑制NMDA、阻碍GSK-3β或抑制PQBP1的微小RNA。

[0344] 将所得结果与大脑皮质(Cerebral Cortex)和实施例1的基因表达调控剂(SGF)作对比,各miRNA的表达量见图5～图13-2。

[0345] 以APP为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA是下述的APP抑制相关miRNA组(63种)。

[0346] hsa-miR-101-3p、hsa-miR-106b-5p、hsa-miR-1229-5p、hsa-miR-1238-3p、hsa-miR-1260b、hsa-miR-1276、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-151a-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-186-5p、hsa-miR-194-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-196a-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-222-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-3120-3p、hsa-miR-3132、hsa-miR-323a-3p、hsa-miR-324-5p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-3620-3p、hsa-miR-3646、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-381-3p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-383-5p、hsa-miR-411-3p、hsa-miR-423-3p、hsa-miR-424-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-4484、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-4786-5p、hsa-miR-484、hsa-miR-490-5p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-500a-5p、hsa-miR-5093、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-539-3p、hsa-miR-548f-3p、hsa-miR-551b-5p、hsa-miR-5584-5p、hsa-miR-567、hsa-miR-5696、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6073、hsa-miR-873-5p、hsa-miR-93-5p。

[0347] 以β-分泌酶(BASE1)为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA是下述BACE1阻碍相关miRNA组(41种)。

[0348] hsa-miR-107、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-1267、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-2-3p、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-200a-3p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-212-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-298、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-29c-3p、hsa-miR-328-3p、hsa-miR-339-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-382-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-455-3p、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-7-5p、hsa-miR-874-3p、hsa-miR-9-5p。

[0349] 以与NMDA的活化相关的蛋白为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA是下述DLG1抑制相关miRNA组、下述CAMK2D抑制相关miRNA组、下述CAMK2A抑制相关miRNA组和下述CAPN1抑制相关miRNA组(共计51种)。

[0350] DLG1抑制相关miRNA组:

[0351] hsa-miR-1-3p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-206、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-613。

[0352] CAMK2D抑制相关miRNA组:

[0353] hsa-let-7a-5p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-139-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-185-5p、hsa-miR-203a-3p、hsa-miR-204-5p、hsa-miR-211-5p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-30a-3p、hsa-miR-31-5p、hsa-miR-361-5p、hsa-miR-421、hsa-miR-484、hsa-miR-494-3p、hsa-miR-505-3p、hsa-miR-7-5p。

[0354] CAMK2A抑制相关miRNA组:

[0355] hsa-miR-129-5p、hsa-miR-137、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-149-3p、hsa-miR-152-3p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-32-5p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-340-5p、hsa-miR-363-3p、hsa-miR-3665、hsa-miR-4534、hsa-miR-4665-5p、hsa-miR-4688、hsa-miR-485-5p、hsa-miR-5010-5p、hsa-miR-505-5p、hsa-miR-5698、hsa-miR-625-5p、hsa-miR-92a-3p。

[0356] CAPN1抑制相关miRNA组:

[0357] hsa-miR-1-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-17-3p、hsa-miR-22-3p、hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-6511b-5p。

[0358] (共计51种)

[0359] 以GSK-3β为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA是下述GSK-3β阻碍相关miRNA组(54种)。

[0360] hsa-let-7a-3p、hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-let-7f-2-3p、hsa-miR-101-3p、hsa-miR-1185-1-3p、hsa-miR-1185-2-3p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-128-3p、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-132-3p、hsa-miR-137、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-150-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-15a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-1910-5p、hsa-miR-195-5p、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-212-3p、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-219a-5p、hsa-miR-23a-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-26a-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-28-5p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-346、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-374a-5p、hsa-miR-374b-5p、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-377-3p、hsa-miR-409-3p、hsa-miR-409-5p、hsa-miR-410-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-425-5p、hsa-miR-4465、hsa-miR-497-5p、hsa-miR-582-5p、hsa-miR-6083、hsa-miR-708-5p、hsa-miR-9-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-96-5p、hsa-miR-98-3p。

[0361] 以PQBP1为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA是下述PQBP1抑制相关miRNA组(2种)。

[0362] hsa-miR-6727-3p、hsa-miR-6727-5p。

[0363] 被期待治疗阿尔茨海默症的、在来自牙髓的干细胞的外来体中表达的miRNA有153个,它们的表达量的比较结果见图13的热图。热图的浓度用读取计数值的log ratio表示。

[0364] 在以上的试验例3中,分别发现了抑制与阿尔茨海默症相关的蛋白即β-分泌酶(BACE1)或APP的微小RNA、抑制成为治疗药的靶的蛋白即NMDA、阻碍GSK-3β或抑制PQBP1的微小RNA。

[0365] 特别是由图13和图13-2可知:在大脑皮质中确认到表达、并且在实施例1的基因表达抑制剂中也确认到了的859个miRNA中,还包括153个具有以β淀粉样蛋白或Tau蛋白相关的基因(阿尔茨海默症的致病基因等)作为靶进行抑制的效果的miRNA。

[0366] [试验例4]:基因的表达调控

[0367] 向大脑皮质神经元细胞(来自阿尔茨海默症患者的神经细胞)中添加了实施例1中得到的来自牙髓的干细胞的外来体、或比较例1的来自脂肪的干细胞的外来体。添加量设为每个大脑皮质神经元细胞添加1,000个外来体。72小时后,回收大脑皮质神经元细胞,纯化mRNA。对于纯化的mRNA,通过qPCR定量了与阿尔茨海默型痴呆相关(表达上升)的表达分析的对象基因的表达。

[0368] 另一方面,以未添加外来体的大脑皮质神经元细胞作为对照(参考例1),纯化所回收的大脑皮质神经元细胞的mRNA,按照与实施例1和比较例1同样的方法定量了表达分析的对象基因的表达。

[0369] 将实施例1(用来自牙髓的干细胞的外来体处理的细胞)和比较例1(用来自脂肪的干细胞的外来体处理的细胞)的表达分析的对象基因的表达量计算为以参考例1(对照;未处理的细胞)的表达分析的对象基因的表达量为1.0的情况下的相对值。表达分析的对象基因设为淀粉样前体蛋白(APP)基因、β-分泌酶(BACE1)基因、NMDA活化蛋白(CAMK2D)基因、糖原合酶激酶-3β(GSK-3β)基因、聚谷氨酰胺结合蛋白-1(PQBP1)基因这5种。关于各自的表达分析的对象基因的表达量,所得到的结果见图14～18。

[0370] 由图14～18所示的基因的表达分析的结果可知:本发明的基因表达调控剂(实施例1)可调控与阿尔茨海默型痴呆相关(在对照中表达上升)的5种表达分析的对象基因(与APP、BACE1、作为NMDA活化蛋白的CAMK2D、GSK-3β、PQBP1的表达相关的基因)的表达。特别是可知:根据实施例1的基因表达调控剂,与比较例1的基因表达调控剂相比,可更显著地抑制与阿尔茨海默型痴呆相关的5种表达分析的对象基因的表达。

[0371] [试验例5]:miRNA的种类和表达量

[0372] 与试验例4同样,利用qPCR进行了实施例1的基因表达抑制剂(来自牙髓的干细胞的外来体)、比较例1的基因表达抑制剂(来自脂肪组织干细胞的外来体;ADSC)和比较例2的基因表达抑制剂(来自脐带干细胞的外来体;Placenta-MSC)的miRNA分析。在所得到的分析结果中,将作为阿尔茨海默症的对象基因群组的下述miRNA的表达量进行比较。

[0373] hsa-miR-16-5p(APP抑制相关miRNA、BACE1阻碍相关miRNA、GSK-3β阻碍相关miRNA)、

[0374] hsa-miR-21-5p(DLG1抑制相关miRNA)、

[0375] hsa-let7-a-5p(CAMK2D抑制相关miRNA)

[0376] hsa-miR-92a-3p(CAMK2A抑制相关miRNA)、

[0377] hsa-miR-22-3p(CAPN1抑制相关miRNA)。

[0378] 其结果见图19。图19中,以实施例1的基因表达抑制剂(来自牙髓的干细胞的外来体)中的miRNA的表达量为100的情况下的相对值表示。

[0379] 由图19可知:实施例1的基因表达抑制剂(来自牙髓的干细胞的外来体)中的抑制与阿尔茨海默症相关而表达上升的基因群组的miRNA(预测有治疗效果的微小RNA)的表达量与其他来自间充质干细胞的外来体(比较例1的来自脂肪干细胞的外来体、比较例2的来自脐带干细胞的外来体)相比明显多。

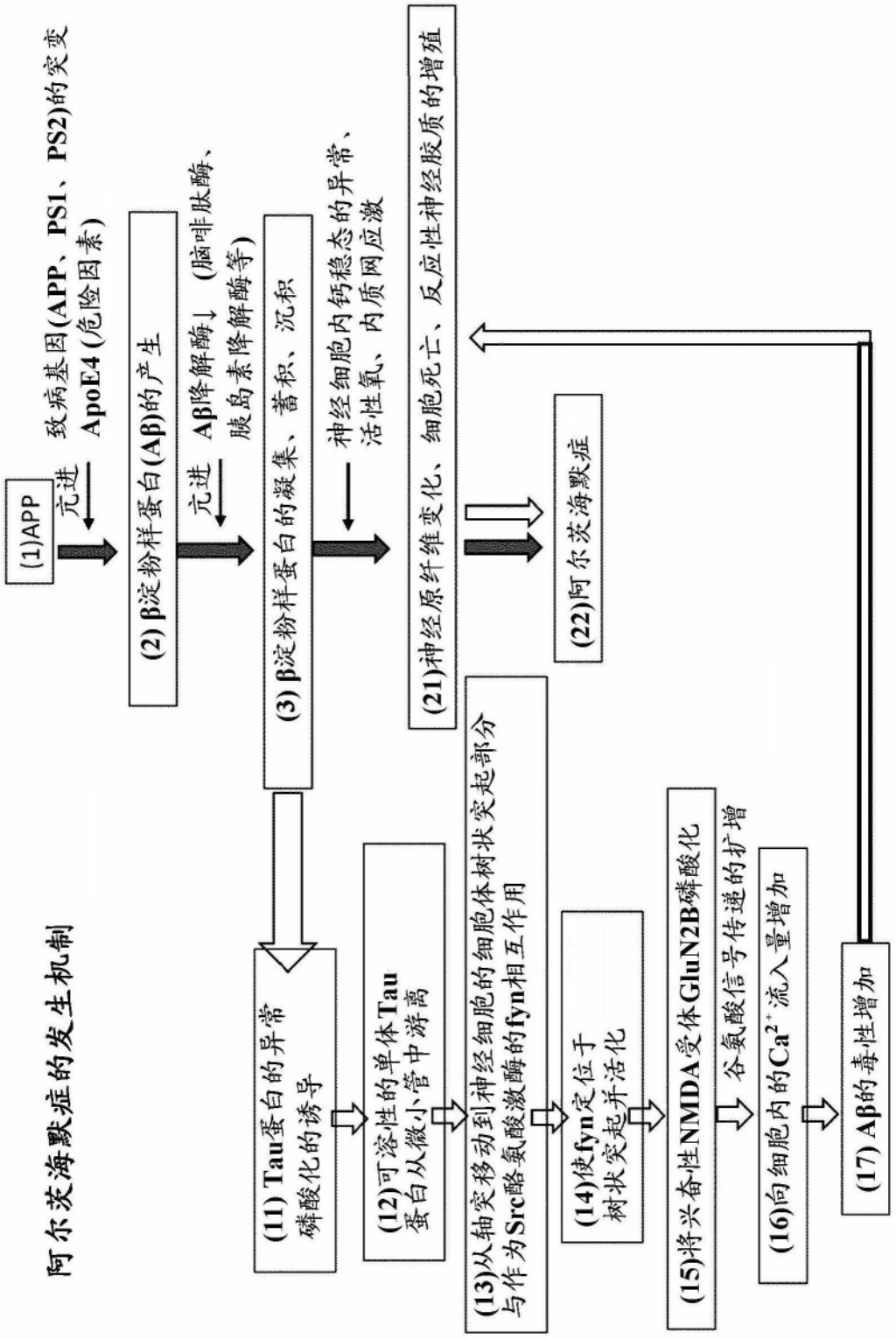

阿尔茨海默症的发生机制
(1)APP
亢进
致病基因(APP、PS1、PS2)的突变
ApoE4 (危险因素)
(2) β淀粉样蛋白(Aβ)的产生
亢进
Aβ降解酶↓ (脑啡肽酶、胰岛素降解酶等)
(3) β淀粉样蛋白的凝集、蓄积、沉积
神经细胞内钙稳态的异常、活性氧、内质网应激
(21)神经原纤维变化、细胞死亡、反应性神经胶质的增殖
(22)阿尔茨海默症
(11) Tau蛋白的异常磷酸化的诱导
(12)可溶性的单体Tau蛋白从微小管中游离
(13)从轴突移动到神经细胞的细胞体树状突起部分与作为Src酪氨酸激酶的fyn相互作用
(14)使fyn定位于树状突起并活化
(15)将兴奋性NMDA受体GluN2B磷酸化
谷氨酸信号传递的扩增
(16)向细胞内的Ca^{2+}流入量增加
(17) Aβ的毒性增加

图1

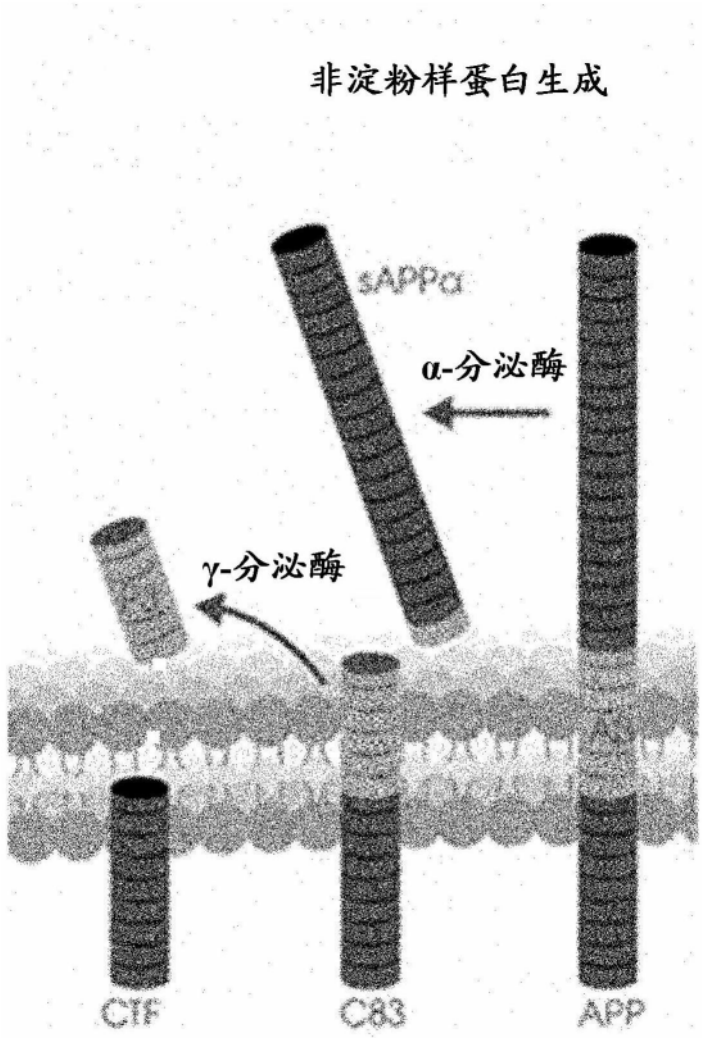


图2

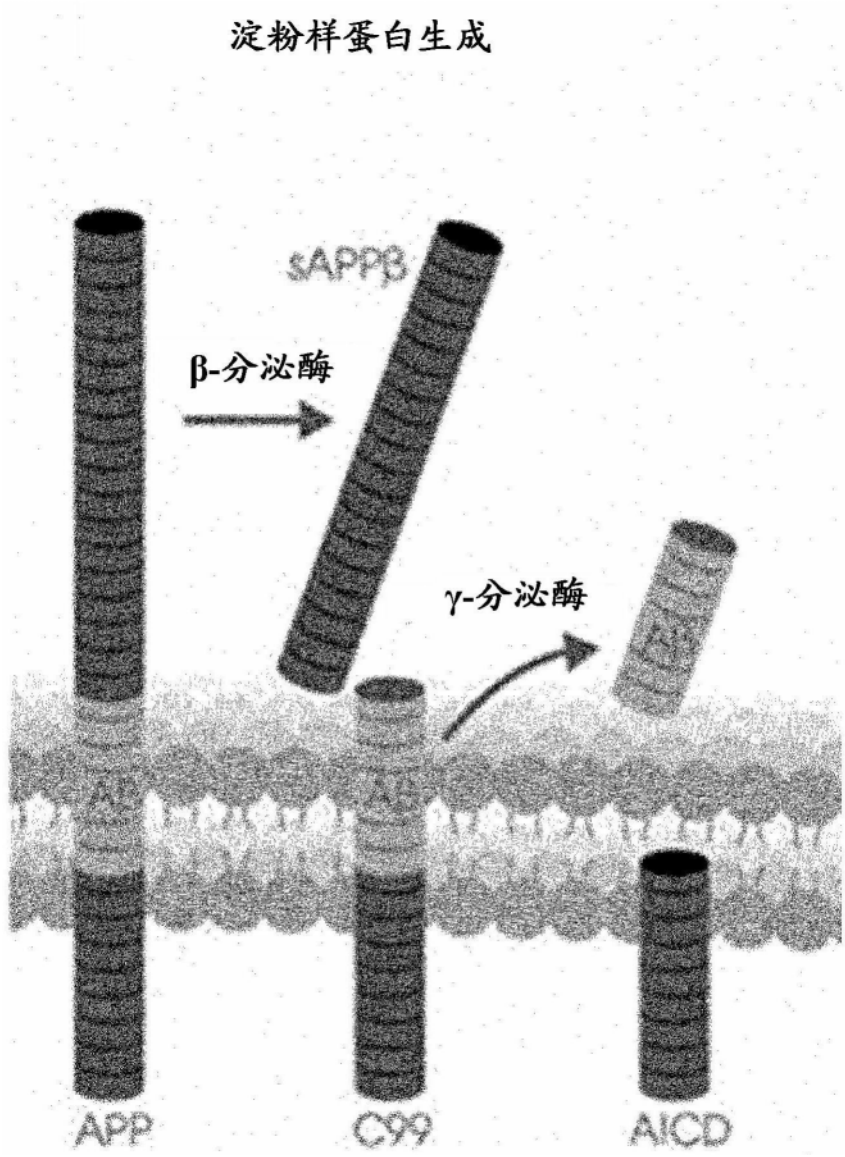


图3

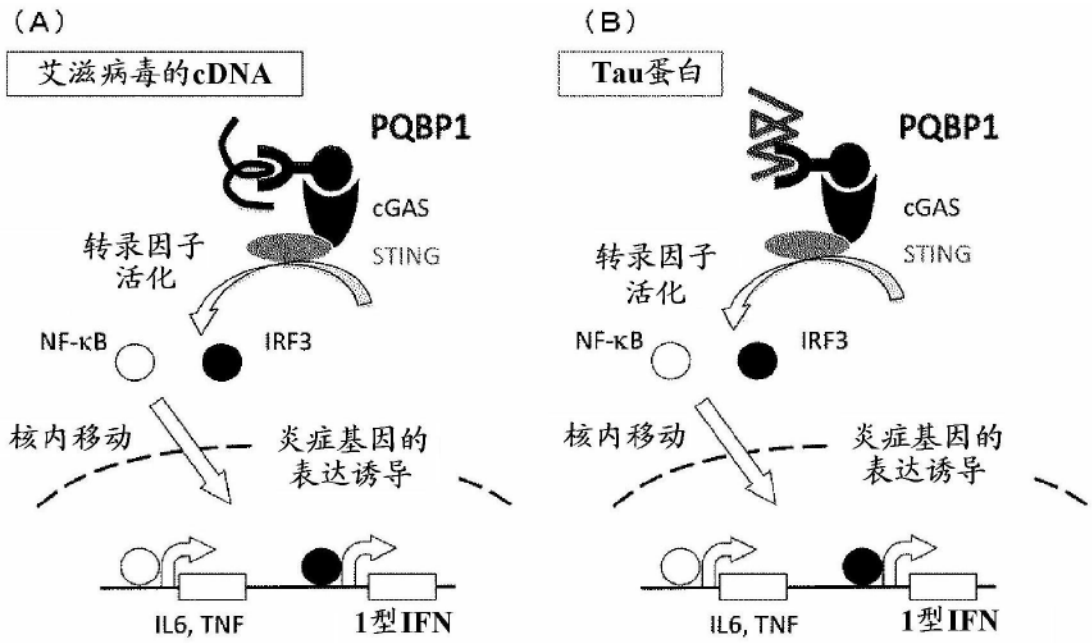
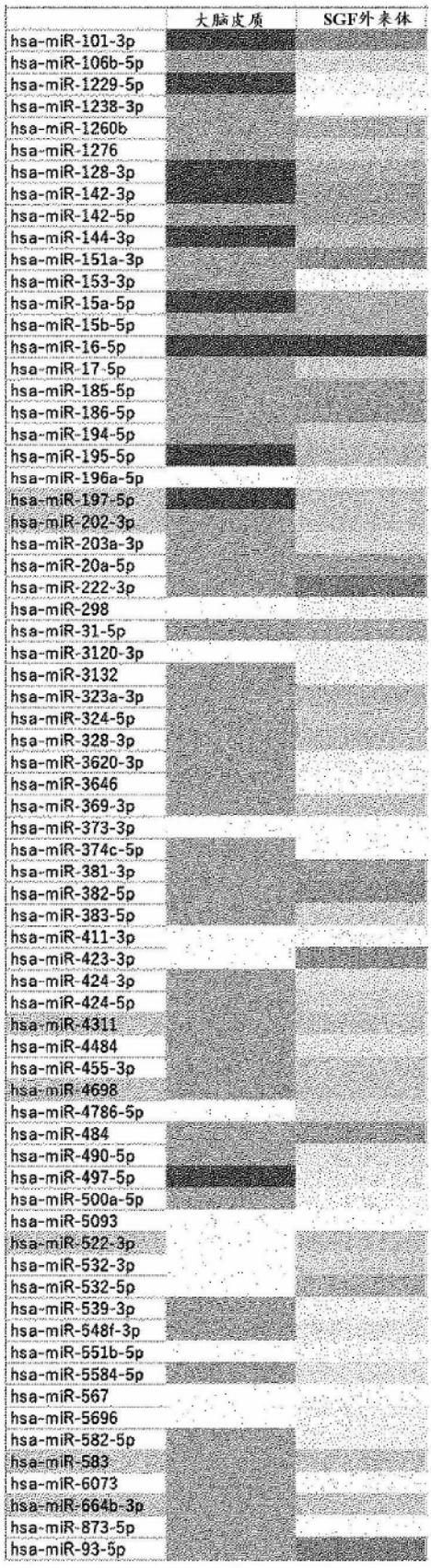

（A）
艾滋病毒的cDNA
PQBP1
cGAS
STING
转录因子
活化
NF-κB
IRF3
核内移动
炎症基因的
表达诱导
IL6, TNF
1型IFN
（B）
Tau蛋白
PQBP1
cGAS
STING
转录因子
活化
NF-κB
IRF3
核内移动
炎症基因的
表达诱导
IL6, TNF
1型IFN

图4



以APP为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA (63种)

图5

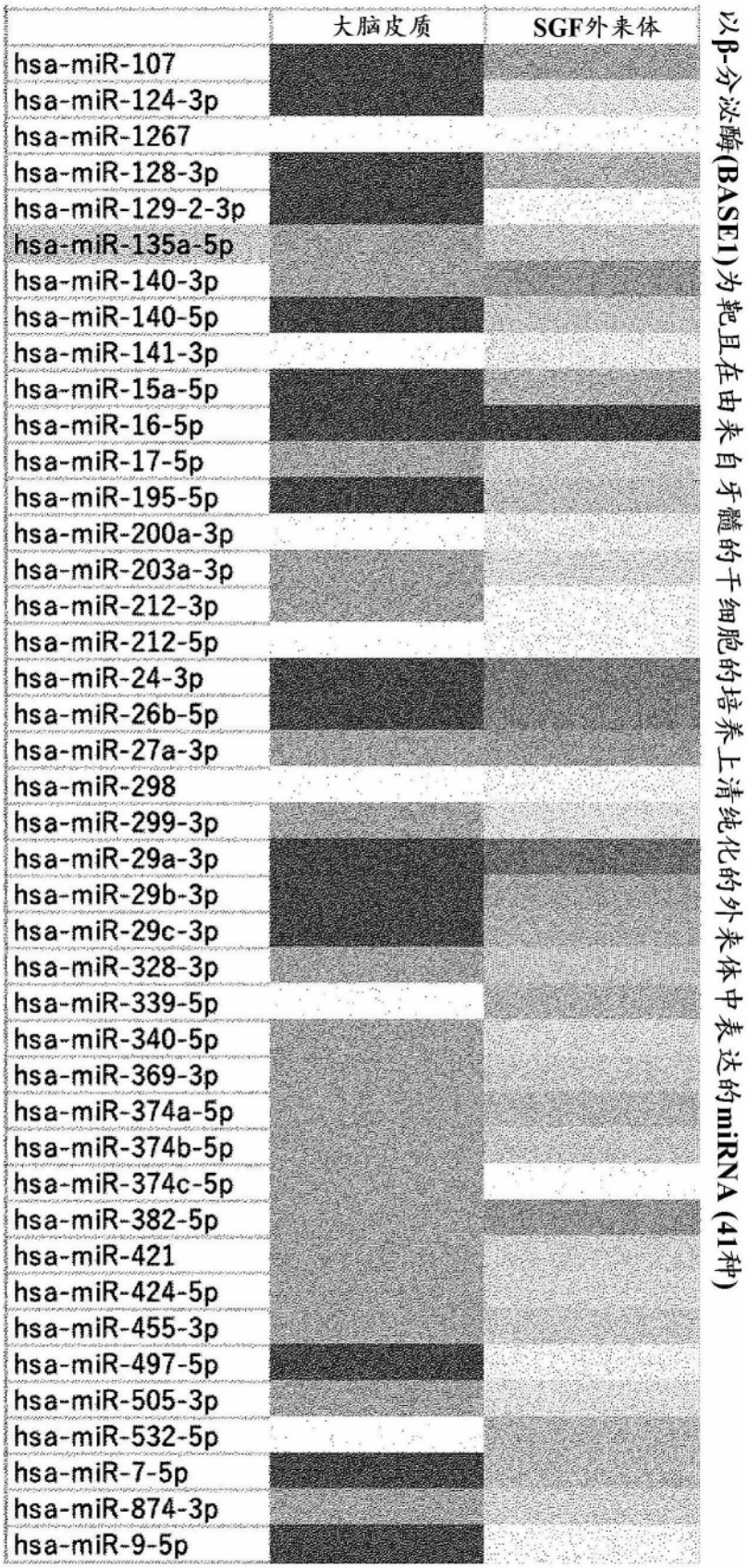

大脑皮质
SGF外来体
hsa-miR-107
hsa-miR-124-3p
hsa-miR-1267
hsa-miR-128-3p
hsa-miR-129-2-3p
hsa-miR-135a-5p
hsa-miR-140-3p
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-141-3p
hsa-miR-15a-5p
hsa-miR-16-5p
hsa-miR-17-5p
hsa-miR-195-5p
hsa-miR-200a-3p
hsa-miR-203a-3p
hsa-miR-212-3p
hsa-miR-212-5p
hsa-miR-24-3p
hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-298
hsa-miR-299-3p
hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-29b-3p
hsa-miR-29c-3p
hsa-miR-328-3p
hsa-miR-339-5p
hsa-miR-340-5p
hsa-miR-369-3p
hsa-miR-374a-5p
hsa-miR-374b-5p
hsa-miR-374c-5p
hsa-miR-382-5p
hsa-miR-421
hsa-miR-424-5p
hsa-miR-455-3p
hsa-miR-497-5p
hsa-miR-505-3p
hsa-miR-532-5p
hsa-miR-7-5p
hsa-miR-874-3p
hsa-miR-9-5p
以β-分泌酶(BASE1)为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA (41种)

图6

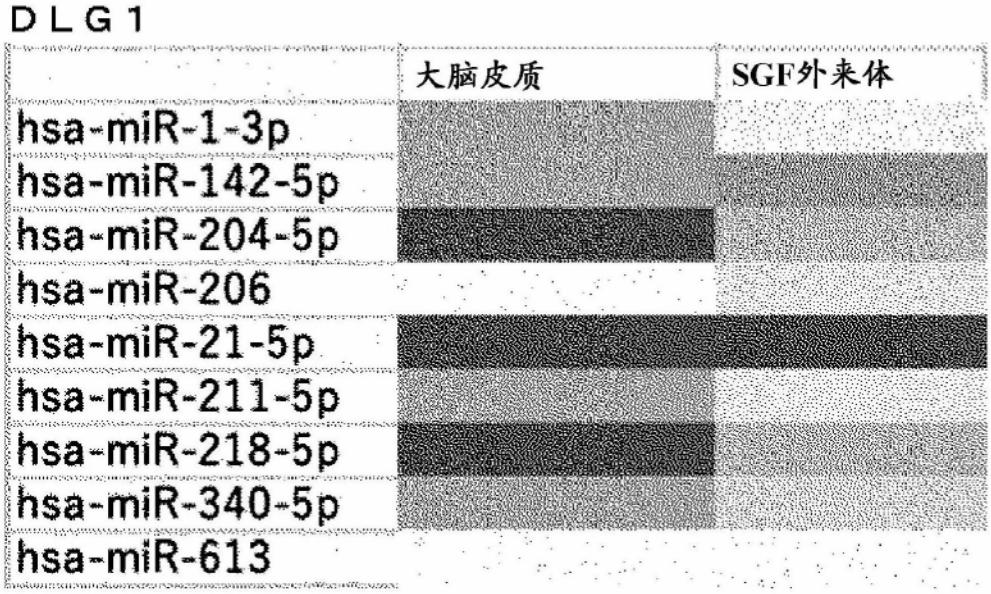

DLG1
大脑皮质
SGF外来体
hsa-miR-1-3p
hsa-miR-142-5p
hsa-miR-204-5p
hsa-miR-206
hsa-miR-21-5p
hsa-miR-211-5p
hsa-miR-218-5p
hsa-miR-340-5p
hsa-miR-613

图7

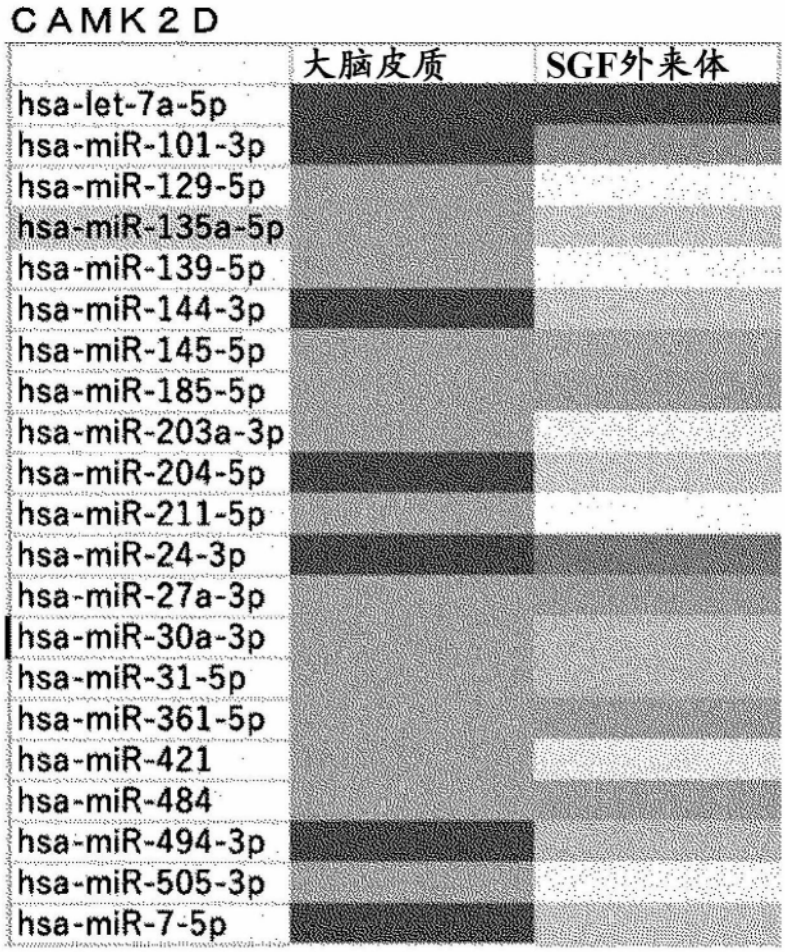

CAMK2D
大脑皮质
SGF外来体
hsa-let-7a-5p
hsa-miR-101-3p
hsa-miR-129-5p
hsa-miR-135a-5p
hsa-miR-139-5p
hsa-miR-144-3p
hsa-miR-145-5p
hsa-miR-185-5p
hsa-miR-203a-3p
hsa-miR-204-5p
hsa-miR-211-5p
hsa-miR-24-3p
hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-30a-3p
hsa-miR-31-5p
hsa-miR-361-5p
hsa-miR-421
hsa-miR-484
hsa-miR-494-3p
hsa-miR-505-3p
hsa-miR-7-5p

图8

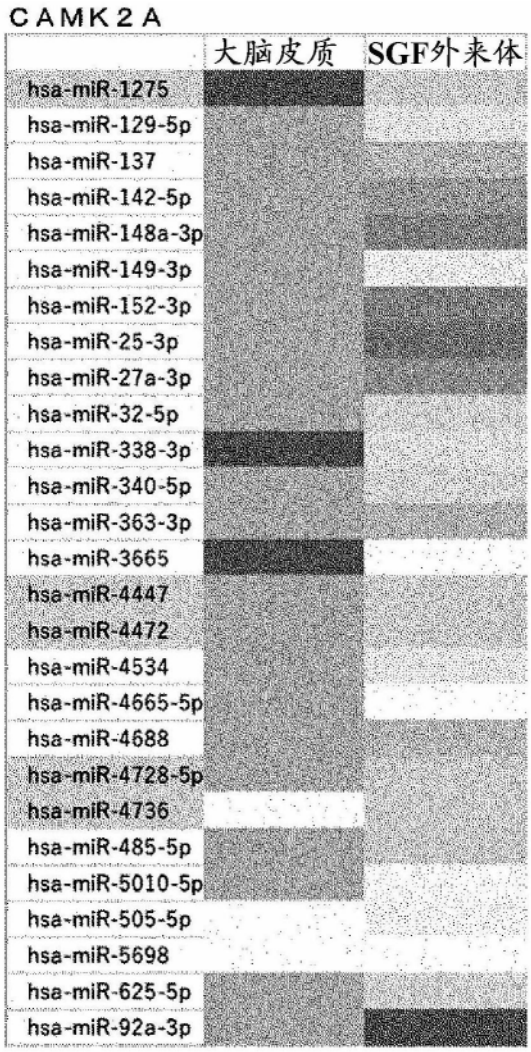

CAMK2A
大脑皮质
SGF外来体
hsa-miR-1275
hsa-miR-129-5p
hsa-miR-137
hsa-miR-142-5p
hsa-miR-148a-3p
hsa-miR-149-3p
hsa-miR-152-3p
hsa-miR-25-3p
hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-32-5p
hsa-miR-338-3p
hsa-miR-340-5p
hsa-miR-363-3p
hsa-miR-3665
hsa-miR-4447
hsa-miR-4472
hsa-miR-4534
hsa-miR-4665-5p
hsa-miR-4688
hsa-miR-4728-5p
hsa-miR-4736
hsa-miR-485-5p
hsa-miR-5010-5p
hsa-miR-505-5p
hsa-miR-5698
hsa-miR-625-5p
hsa-miR-92a-3p

图9

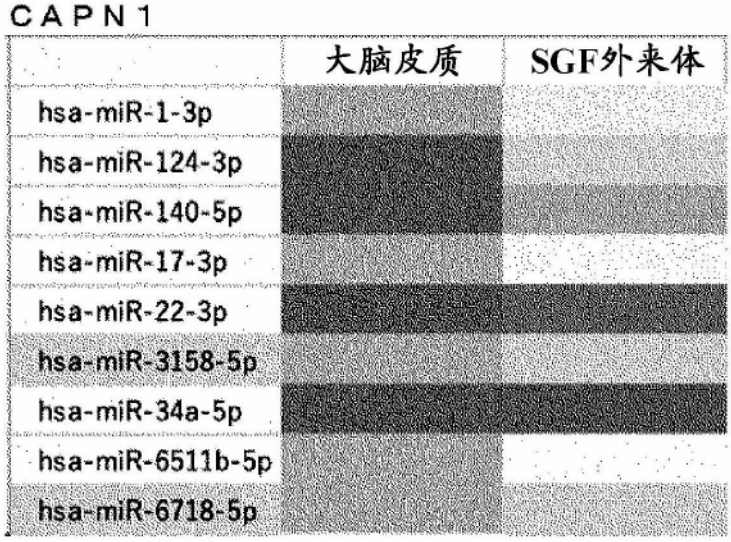
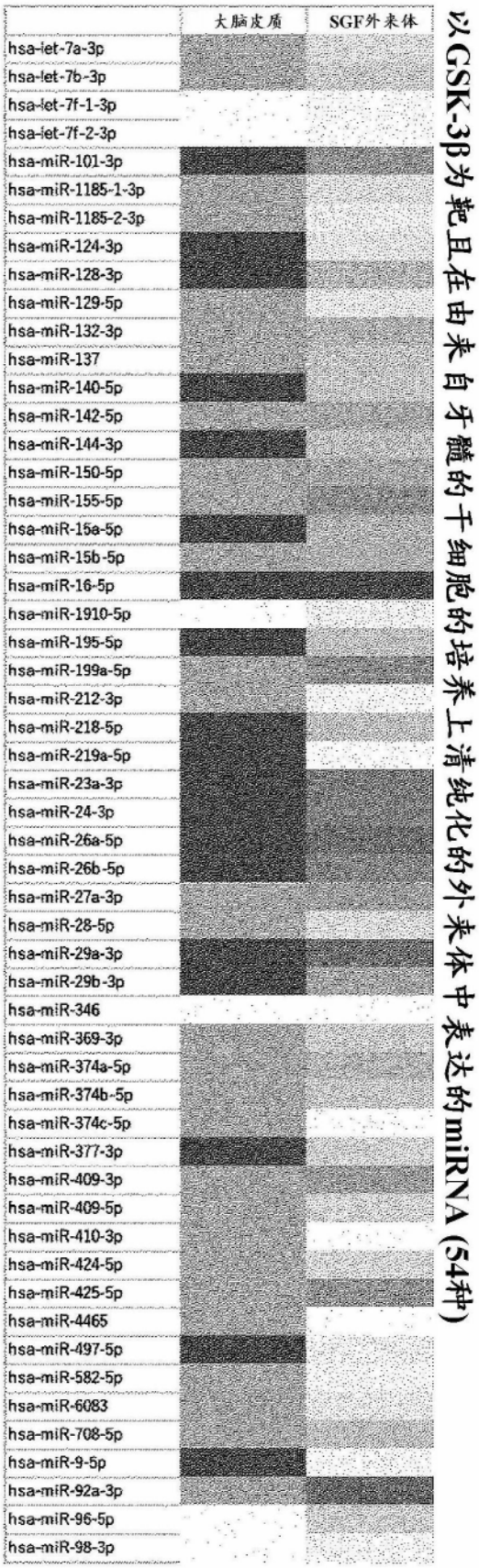

CAPN1
大脑皮质
SGF外来体
hsa-miR-1-3p
hsa-miR-124-3p
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-17-3p
hsa-miR-22-3p
hsa-miR-3158-5p
hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-6511b-5p
hsa-miR-6718-5p

图10



以GSK-3β为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA (54种)

图11

以PQBP1为靶且在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中表达的miRNA (2种)

hsa-miR-671-5p	
hsa-miR-6715b-5p	
hsa-miR-6716-3p	
hsa-miR-6717-5p	
hsa-miR-6719-3p	
hsa-miR-6720-3p	
hsa-miR-6720-5p	
hsa-miR-6721-5p	
hsa-miR-6722-5p	
hsa-miR-6723-5p	
hsa-miR-6724-5p	
hsa-miR-6726-3p	
hsa-miR-6726-5p	
hsa-miR-6727-3p	
hsa-miR-6727-5p	
hsa-miR-6728-5p	
hsa-miR-6729-3p	

图12

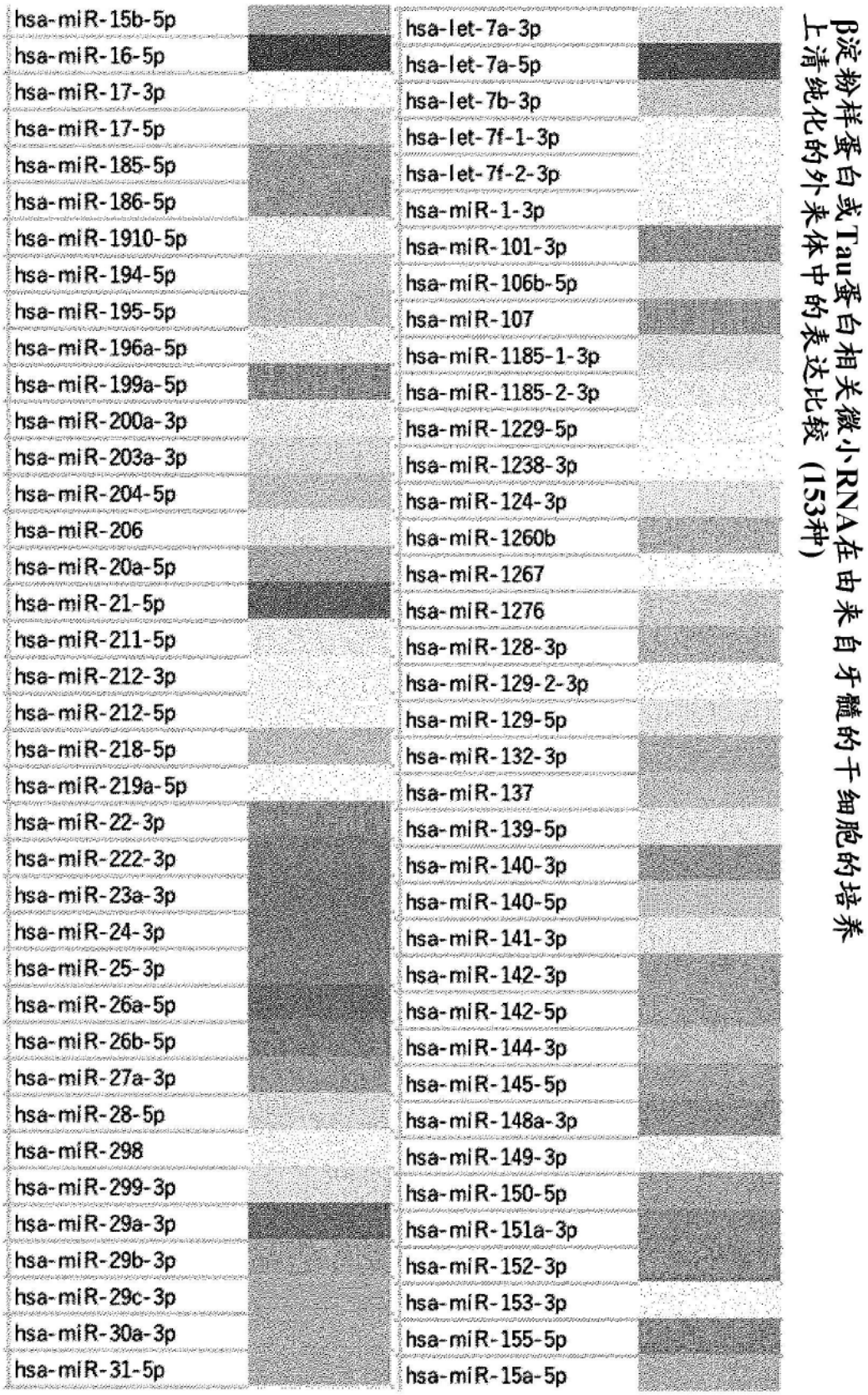

β淀粉样蛋白或Tau蛋白相关微小RNA在由来自牙髓的干细胞的培养上清纯化的外来体中的表达比较（153种）
hsa-miR-15b-5p
hsa-miR-16-5p
hsa-miR-17-3p
hsa-miR-17-5p
hsa-miR-185-5p
hsa-miR-186-5p
hsa-miR-1910-5p
hsa-miR-194-5p
hsa-miR-195-5p
hsa-miR-196a-5p
hsa-miR-199a-5p
hsa-miR-200a-3p
hsa-miR-203a-3p
hsa-miR-204-5p
hsa-miR-206
hsa-miR-20a-5p
hsa-miR-21-5p
hsa-miR-211-5p
hsa-miR-212-3p
hsa-miR-212-5p
hsa-miR-218-5p
hsa-miR-219a-5p
hsa-miR-22-3p
hsa-miR-222-3p
hsa-miR-23a-3p
hsa-miR-24-3p
hsa-miR-25-3p
hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-26b-5p
hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-28-5p
hsa-miR-298
hsa-miR-299-3p
hsa-miR-29a-3p
hsa-miR-29b-3p
hsa-miR-29c-3p
hsa-miR-30a-3p
hsa-miR-31-5p
hsa-let-7a-3p
hsa-let-7a-5p
hsa-let-7b-3p
hsa-let-7f-1-3p
hsa-let-7f-2-3p
hsa-miR-1-3p
hsa-miR-101-3p
hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-107
hsa-miR-1185-1-3p
hsa-miR-1185-2-3p
hsa-miR-1229-5p
hsa-miR-1238-3p
hsa-miR-124-3p
hsa-miR-1260b
hsa-miR-1267
hsa-miR-1276
hsa-miR-128-3p
hsa-miR-129-2-3p
hsa-miR-129-5p
hsa-miR-132-3p
hsa-miR-137
hsa-miR-139-5p
hsa-miR-140-3p
hsa-miR-140-5p
hsa-miR-141-3p
hsa-miR-142-3p
hsa-miR-142-5p
hsa-miR-144-3p
hsa-miR-145-5p
hsa-miR-148a-3p
hsa-miR-149-3p
hsa-miR-150-5p
hsa-miR-151a-3p
hsa-miR-152-3p
hsa-miR-153-3p
hsa-miR-155-5p
hsa-miR-15a-5p

图13

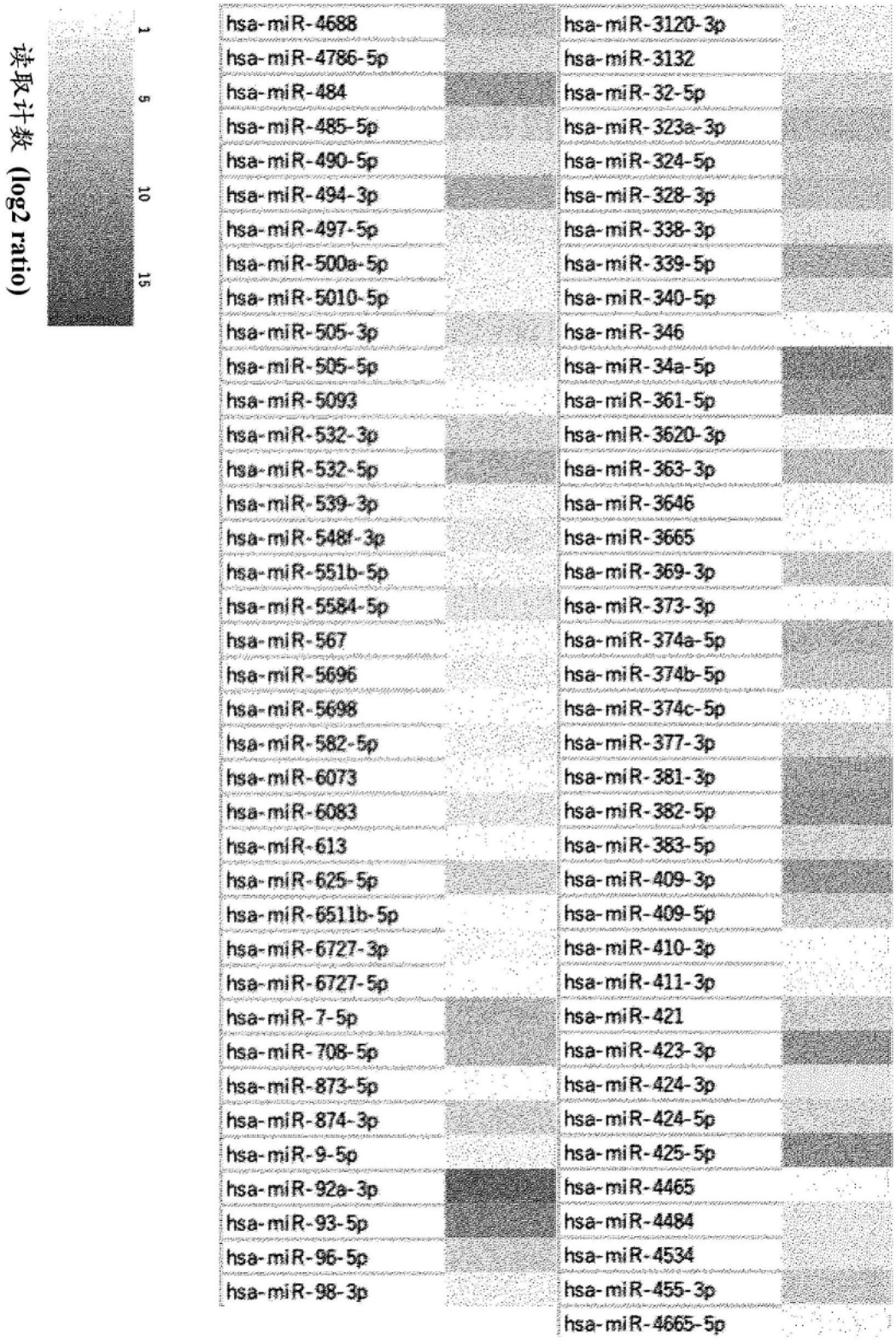

读取计数 (log2 ratio)
1
5
10
15
hsa-miR-4688
hsa-miR-4786-5p
hsa-miR-484
hsa-miR-485-5p
hsa-miR-490-5p
hsa-miR-494-3p
hsa-miR-497-5p
hsa-miR-500a-5p
hsa-miR-5010-5p
hsa-miR-505-3p
hsa-miR-505-5p
hsa-miR-5093
hsa-miR-532-3p
hsa-miR-532-5p
hsa-miR-539-3p
hsa-miR-548f-3p
hsa-miR-551b-5p
hsa-miR-5584-5p
hsa-miR-567
hsa-miR-5696
hsa-miR-5698
hsa-miR-582-5p
hsa-miR-6073
hsa-miR-6083
hsa-miR-613
hsa-miR-625-5p
hsa-miR-6511b-5p
hsa-miR-6727-3p
hsa-miR-6727-5p
hsa-miR-7-5p
hsa-miR-708-5p
hsa-miR-873-5p
hsa-miR-874-3p
hsa-miR-9-5p
hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-93-5p
hsa-miR-96-5p
hsa-miR-98-3p
hsa-miR-3120-3p
hsa-miR-3132
hsa-miR-32-5p
hsa-miR-323a-3p
hsa-miR-324-5p
hsa-miR-328-3p
hsa-miR-338-3p
hsa-miR-339-5p
hsa-miR-340-5p
hsa-miR-346
hsa-miR-34a-5p
hsa-miR-361-5p
hsa-miR-3620-3p
hsa-miR-363-3p
hsa-miR-3646
hsa-miR-3665
hsa-miR-369-3p
hsa-miR-373-3p
hsa-miR-374a-5p
hsa-miR-374b-5p
hsa-miR-374c-5p
hsa-miR-377-3p
hsa-miR-381-3p
hsa-miR-382-5p
hsa-miR-383-5p
hsa-miR-409-3p
hsa-miR-409-5p
hsa-miR-410-3p
hsa-miR-411-3p
hsa-miR-421
hsa-miR-423-3p
hsa-miR-424-3p
hsa-miR-424-5p
hsa-miR-425-5p
hsa-miR-4465
hsa-miR-4484
hsa-miR-4534
hsa-miR-455-3p
hsa-miR-4665-5p

图13-2

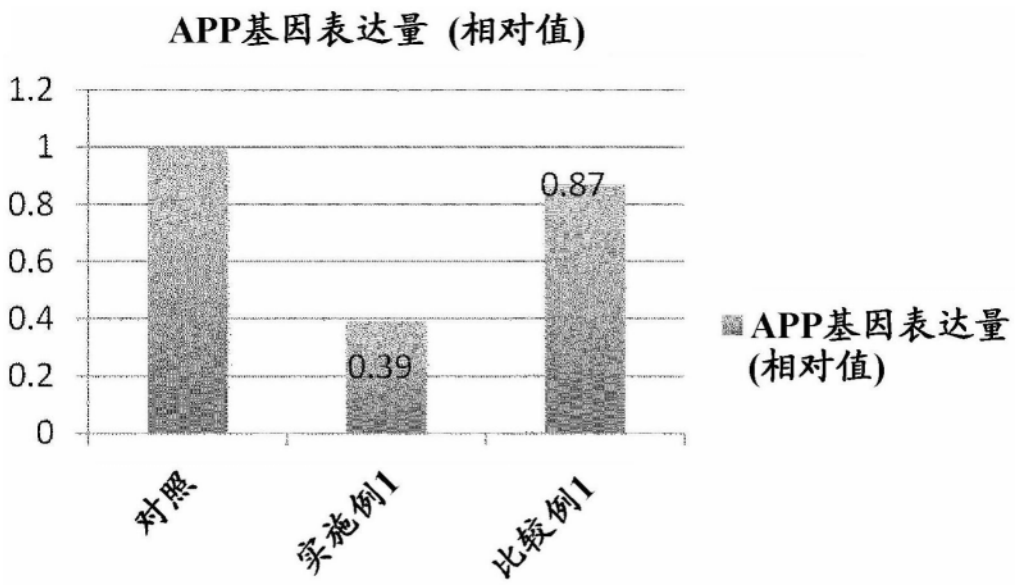

APP基因表达量 (相对值)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.87
0.39
对照
实施例1
比较例1
APP基因表达量
(相对值)

图14

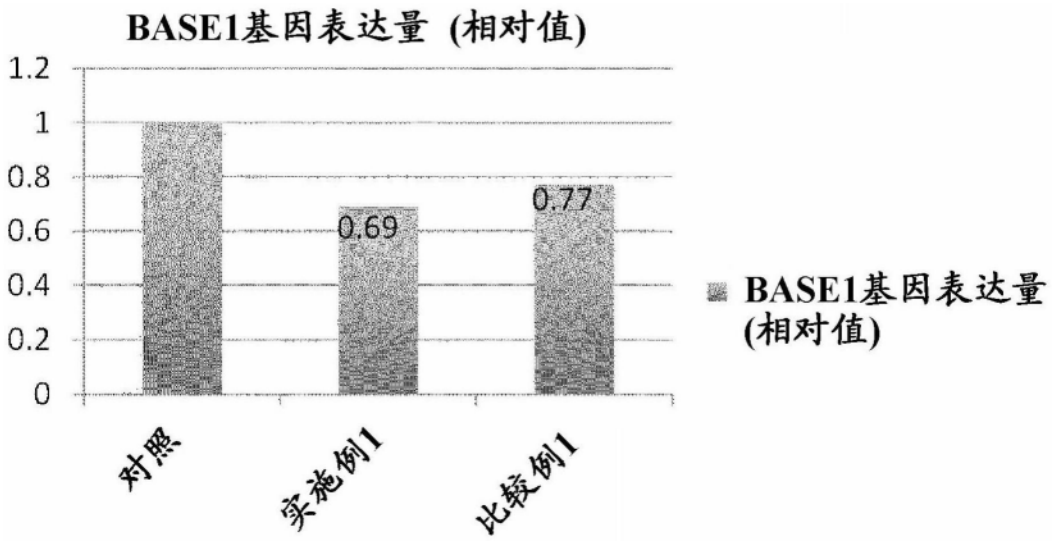

BASE1基因表达量 (相对值)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.69
0.77
对照
实施例1
比较例1
BASE1基因表达量
(相对值)

图15

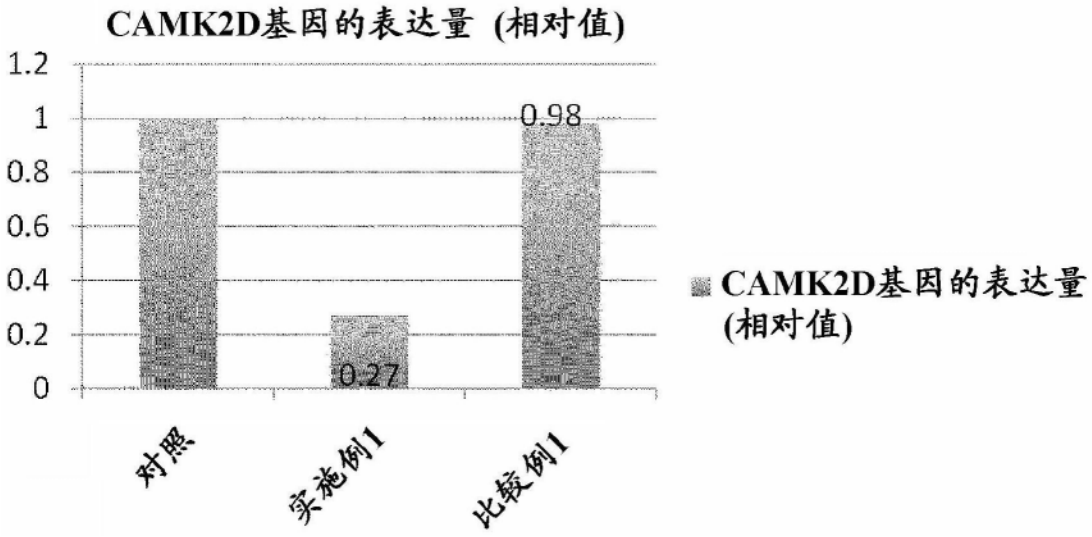

CAMK2D基因的表达量 (相对值)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.98
0.27
对照
实施例1
比较例1
CAMK2D基因的表达量
(相对值)

图16

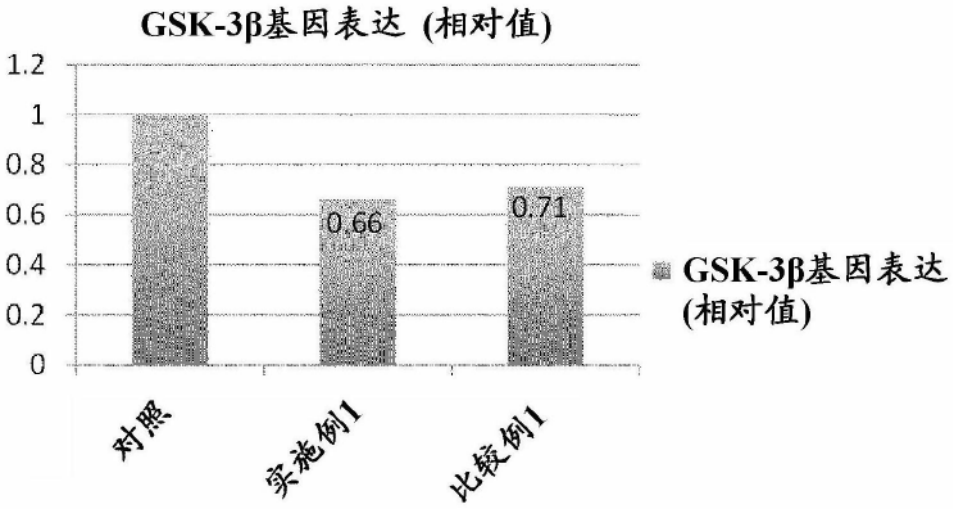

GSK-3β基因表达 (相对值)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.66
0.71
对照
实施例1
比较例1
GSK-3β基因表达
(相对值)

图17

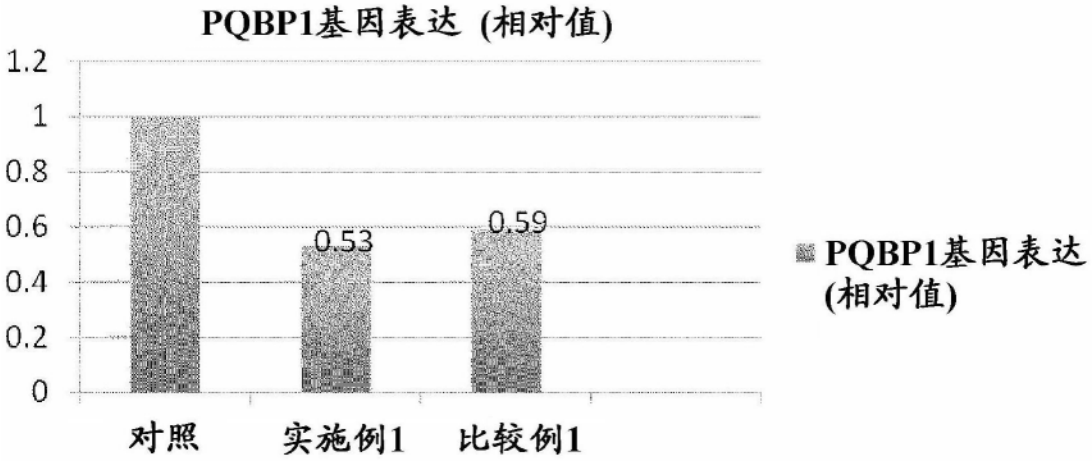

PQBP1基因表达 (相对值)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.53
0.59
对照
实施例1
比较例1
PQBP1基因表达 (相对值)

图18

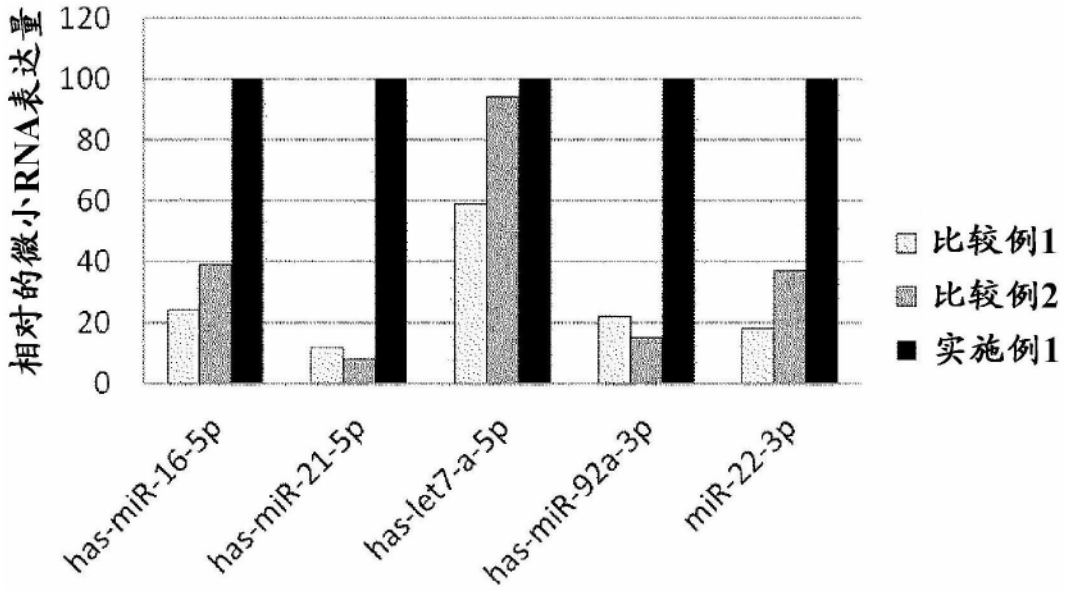

相对的微小RNA表达量
120
100
80
60
40
20
0
has-miR-16-5p
has-miR-21-5p
has-let7-a-5p
has-miR-92a-3p
miR-22-3p
比较例1
比较例2
实施例1

图19