(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2022-531466
(P2022-531466A)
(43)公表日　令和4年7月6日(2022.7.6)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	ＺＮＡ	４Ｂ０５０
Ａ６１Ｋ	*31/426 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/426		４Ｂ０６３
Ａ６１Ｋ	*31/499 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/499		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*25/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全41頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-565930(P2021-565930)
(86)(22)出願日　令和2年5月6日(2020.5.6)
(85)翻訳文提出日　令和3年12月29日(2021.12.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/031708
(87)国際公開番号　WO2020/227430
(87)国際公開日　令和2年11月12日(2020.11.12)
(31)優先権主張番号　62/844,370
(32)優先日　令和1年5月7日(2019.5.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/987,151
(32)優先日　令和2年3月9日(2020.3.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　514198183
ユニバーシティ オブ マイアミ
アメリカ合衆国 ３３１３６ フロリダ州，マイアミ，ルーム ３１０，スイート ３００，３アールデー フロア，エヌダブリュ ７ティーエイチ アベニュー １９５１
(71)出願人　507245021
ユニバーシティー オブ ロチェスター
アメリカ合衆国 ニューヨーク １４６４２， ロチェスター， エルムウッド アベニュー ６０１， ボックス ユーアールブイ
(71)出願人　507299817
ユーシーエル ビジネス リミテッド
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　遺伝性ニューロパチーおよび関連障害の処置および検出

(57)【要約】
本開示は、遺伝性ニューロパチーを検出および処置する方法に関する。種々の局面において、上記方法は、被験体に由来するサンプル中でソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在を検出することを包含する。種々の実施形態において、上記ＳＯＲＤ変異は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（ＡＣＭＧ）基準に従って病原性またはおそらく病原性として分類されるＤＮＡバリアントである。

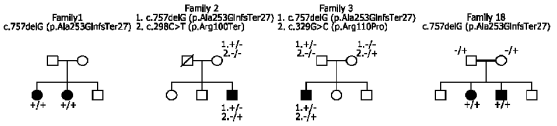

FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物被験体において遺伝性ニューロパチーを処置する方法であって、前記方法は、
（ａ）前記被験体に由来するサンプル中でソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在を検出すること；および
（ｂ）前記被験体に、ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド、アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤、ＳＯＲＤ遺伝子における前記変異を矯正する薬剤、または前記のうちのいずれかの組み合わせを投与すること、
を包含する方法。
【請求項２】
前記方法は、前記ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することを包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記方法は、前記ＳＯＲＤ遺伝子における前記変異を矯正する薬剤を投与することを包含し、ここで前記薬剤は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９タンパク質および１またはこれより多くのガイドＲＮＡ分子である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
哺乳動物被験体において遺伝性ニューロパチーを処置する方法であって、前記方法は、
（ａ）前記被験体に由来するサンプル中でソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在を検出すること；および
（ｂ）前記被験体に、アルレスタチン、エパルレスタット、ジエパルレスタット、フィダレスタット、イミレスタット、リドレスタット、ミナルレスタット、ポナルレスタット、ラニレスタット、サルフレジン　Ｂ１１、ソルビニル、トルレスタット、ゼナレスタット、またはゾポルレスタットを投与すること、
を包含する方法。
【請求項５】
哺乳動物被験体において遺伝性ニューロパチーを処置する方法であって、前記方法は、
（ａ）前記被験体に由来するサンプル中でソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在を検出すること；および
（ｂ）前記被験体に、ＳＯＲＤペプチドを投与すること、
を包含する方法。
【請求項６】
前記ＳＯＲＤ遺伝子における前記変異は、ｃ．７５３ｄｅｌＧ；　ｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７、ｃ．３２９Ｇ＞Ｃ；　ｐ．Ａｒｇ１１０Ｐｒｏ、ｃ．２９８Ｃ＞Ｔ；　ｐ．Ａｒｇ１００Ｔｅｒ、またはｃ．４５８Ｃ＞Ａ；　ｐ．Ａｌａ１５３Ａｓｐである、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記ＳＯＲＤ遺伝子における前記変異は、ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７、ｃ．２８Ｃ＞Ｔ；　ｐ．Ｌｅｕ１０Ｐｈｅ、ｃ．３１６＿４２５＋１６５ｄｅｌ；　ｐ．Ｃｙｓ１０６Ｔｅｒ、ｃ．２９５Ｃ＞Ｔ；　ｐ．Ａｒｇ２９９Ｔｅｒ、ｃ．９６４Ｇ＞Ａ；　ｐ．Ｖａｌ３２２Ｉｌｅ、または個々のもしくは複数のコードエキソンまたは前記ＳＯＲＤ遺伝子全体の欠失である、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記被験体に由来するサンプル中でソルビトールを測定することをさらに包含する、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
哺乳動物被験体におけるニューロパチーを特徴づける方法であって、前記方法は、ニューロパチーに罹患している被験体におけるソルビトールのレベルを測定することであって、

ここで約１０ｇ／Ｌより大きいソルビトールレベルは、前記ニューロパチーが、ソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異と関連することを示すことを包含する方法。
【請求項１０】
被験体における遺伝性ニューロパチーの処置の有効性を評価する方法であって、前記方法は、
前記被験体に、アルドースレダクターゼインヒビター、アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチド、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤、およびＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤、または前記のうちのいずれかの組み合わせからなる群より選択される薬剤を投与すること；ならびに
被験体におけるソルビトールのレベルを測定すること、
を包含する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
助成金資金調達の開示
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ（ＮＩＨ）によって授与された助成金番号ＮＳ０６５７１２およびＮＳ０７５７６４の下で政府の支援を得て行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。
【０００２】
関連出願の相互参照および電子的に提出された資料の参照による援用
本出願は、これによって、２０１９年５月７日出願の米国仮特許出願第６２／８４４，３７０号および２０２０年３月９日出願の同第６２／９８７，１５１号（これらの各々は、それらの全体において参照により援用される）への優先権を主張する。
【０００３】
それと共に併せて提出されかつ以下のとおり特定される、コンピューター可読ヌクレオチド／アミノ酸配列表が、その全体において参照により援用される： ファイル名： ５４０９５Ａ＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ； サイズ：１４１，９３０バイト； 作成日： ２０２０年５月５日。
【０００４】
発明の分野
本開示は、遺伝性ニューロパチーを検出および処置する方法に関する。
【背景技術】
【０００５】
背景
末梢性ニューロパチーは、最も頻度の高い神経変性疾患の１つであり、最も一般的な作用機序の中には、糖尿病性ニューロパチーおよび遺伝性起源のものがある。遺伝性ニューロパチー（シャルコー・マリー・トゥース病（ＣＭＴ），としても公知）に関しては、患者の診断ギャップは、約５０％残っている。本発明者らの理解では、ＣＭＴは、末梢神経に影響を及ぼす臨床上のおよび遺伝的に不均一な遺伝性の単一遺伝子の高度に表現型的に浸透性の状態に関する包括的概念を表す。ＣＭＴは、伝導速度に応じて脱髄型（ＣＭＴ１）および軸索型（ＣＭＴ２）として分類される。遠位型遺伝性運動ニューロパチー（ｄＨＭＮ）は、疾病負荷が主にまたは専ら運動神経に降りかかるＣＭＴ２の一形態を表す（Ｒｏｓｓｏｒ， Ｔｏｍａｓｅｌｌｉ， ａｎｄ Ｒｅｉｌｌｙ ２０１６）。類似の状態としては、ＡＬＳ４（若年性ｄＨＭＮ＋上位運動ニューロン関与の徴候としての活発な反射（ｂｒｉｓｋ ｒｅｆｌｅｘ））が挙げられる。症例のうちの９０％超が既知の遺伝子における変異を有するＣＭＴ１とは対照的に、ＣＭＴ２および遠位型ＨＭＮ患者のうち２０～３０％が、遺伝子診断を受けるに過ぎない（Ｆｒｉｄｍａｎら． ２０１５）。
【発明の概要】

【課題を解決するための手段】
【０００６】
要旨
本開示は、遺伝性ニューロパチーを処置および／または検出する方法を提供する。種々の局面において、上記方法は、被験体に由来するサンプル中でソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在を検出することを包含する。種々の実施形態において、上記ＳＯＲＤ変異は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ （ＡＣＭＧ）基準に従って病原性またはおそらく病原性として分類されるＤＮＡバリアントである。必要に応じて、上記方法は、ＳＯＲＤ遺伝子における変異の存在が検出される場合に、遺伝性ニューロパチーを有する被験体を診断することを包含する。必要に応じて、上記方法は、上記被験体に、アルドースレダクターゼインヒビター；アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド；ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド；ＳＯＲＤペプチド；変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤；およびＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤からなる群より選択される薬剤を含む組成物を投与することを包含する。種々の局面において、上記方法は、上記被験体に、アルレスタチン、エパルレスタット、ジエパルレスタット（diepalrestat）、フィダレスタット、イミレスタット、リドレスタット、ミナルレスタット、ポナルレスタット、ラニレスタット、サルフレジン　Ｂ１１、ソルビニル、トルレスタット、ゼナレスタット、またはゾポルレスタット（またはこれらの組み合わせ）を投与することを包含する。種々の局面において、上記方法は、上記被験体に、アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド；ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド；変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤；ＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤；または前記のうちのいずれかの組み合わせを投与することを包含する。種々の局面において、上記方法は、上記被験体にＳＯＲＤペプチドを投与することを包含する。前記のうちのいずれかの組み合わせの投与も企図される。必要に応じて、上記方法は、上記被験体に由来するサンプル中でソルビトールレベルを測定することを包含する。
【０００７】
ソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在に関して試験した被験体における遺伝性ニューロパチーの処置のための（または遺伝性ニューロパチーの処置のための医薬の調製における使用のための）、（ｉ）アルドースレダクターゼインヒビター（例えば、アルレスタチン、エパルレスタット、ジエパルレスタット、フィダレスタット、イミレスタット、リドレスタット、ミナルレスタット、ポナルレスタット、ラニレスタット、サルフレジン　Ｂ１１、ソルビニル、トルレスタット、ゼナレスタット、および／またはゾポルレスタット）；（ｉｉ）アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤、および／もしくはＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤；ならびに／または（ｉｉｉ）ＳＯＲＤペプチドの使用がまた、提供される。
【０００８】
本開示は、哺乳動物被験体におけるニューロパチーを特徴づける方法であって、上記方法は、ニューロパチーに罹患している被験体におけるソルビトールのレベルを測定することを包含し、ここで約１０ｇ／Ｌより大きいソルビトールレベルは、上記ニューロパチーが、ソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異と関連することを示す方法をさらに提供する。本開示はまた、被験体における遺伝性ニューロパチーの処置の有効性を評価する方法であって、上記方法は、上記被験体に、アルドースレダクターゼインヒビター（例えば、アルレスタチン、エパルレスタット、ジエパルレスタット、フィダレスタット、イミレスタット、リドレスタット、ミナルレスタット、ポナルレスタット、ラニレスタット、サルフレジン　Ｂ１１、ソルビニル、トルレスタット、ゼナレスタット、および／またはゾポルレスタット）、アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチド、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤、およびＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤

（または前記のうちのいずれかの組み合わせ）からなる群より選択される薬剤を投与すること；ならびに被験体におけるソルビトールのレベルを測定すること、を包含する方法を提供する。

【０００９】

本明細書で記載される各特徴もしくは実施形態、または組み合わせが、本開示の局面のうちのいずれかの非限定的な例証的例であり、よって、本明細書で記載される任意の他の特徴もしくは実施形態、または組み合わせと組み合わせ可能であることが意味されることは、理解される。例えば、特徴が、「１つの実施形態」、「いくつかの実施形態」、「種々の実施形態」、「関連する実施形態」のような文言とともに記載される場合、これらのタイプの実施形態の各々は、あらゆる考えられる組み合わせを列挙する必要なしに、本明細書で記載される任意の他の特徴、または特徴の組み合わせと組み合わされることが意図される、特徴の非限定的な例である。このような特徴または特徴の組み合わせは、本発明の局面のうちのいずれかに該当する。

【００１０】

本明細書中の見出しは、読み手の便宜のためであって、限定であることは意図しない。本発明のさらなる局面、実施形態、およびバリエーションは、詳細な説明および／または図面および／または特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１－１】図１Ａ～Ｆ。ＳＯＲＤ遺伝子および系図。ＳＯＲＤにおける両アレル変異は、常染色体劣性ｄＨＭＮ／ＣＭＴ２を引きおこす。（図１Ａ）ＳＯＲＤにおいて両アレル変異を有するｄＨＭＮ／ＣＭＴ２家族の代表的系図。四角は男性を、丸は女性を示す。斜線は、死亡した個体に関して使用される。患者は、黒塗りの形で示される。（図１Ｂ）ＮＣＢＩ参照配列： ＮＭ＿００３１０４．６に基づいてＳＯＲＤの全てのエキソン、イントロンおよび非翻訳領域（ＵＴＲ）を示す模式的ダイアグラム。灰色および白のボックスは、それぞれ、ＳＯＲＤのコード配列およびＵＴＲを表す。本研究の中で考慮される家族の中で同定されたバリアントは、遺伝子のコード領域全体にわたってマップする。エキソン７上のナンセンスｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）バリアントを、特定の高い頻度で同定した。（図１Ｃ）ＳＯＲＤタンパク質ドメインにわたる変異の分布。（図１Ｄ）この研究におけるｄＨＭＮ／ＣＭＴ２家族の中で同定された４つのミスセンス置換が、ヒトからゾウまでの種にわたって高度に保存された残基に位置することを示すＳＯＲＤタンパク質オルソログアラインメント。（図１Ｅおよび１Ｆ）ＳＯＲＤ（逆方向鎖）およびＳＯＲＤ２Ｐ（順方向鎖）のエキソン７における高度に相同性の領域のヌクレオチド配列の拡大図。ＳＯＲＤに由来するＳＯＲＤ２Ｐにおいて異なるヌクレオチドは、図１ＣのＳＯＲＤ２Ｐにおける欠失を含め、矢印で示される。代表的な電気泳動図は、ＳＯＲＤにおいて、ｄＨＭＮ／ＣＭＴ２患者においてホモ接合性状態、および入手可能な特許におけるヘテロ接合性状態（右側のボックス、上側のプロット）で見出されるｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）バリアントが、健常コントロール（右側のボックス、下側のプロット）から両アレル状態で存在しないが、ＳＯＲＰ２Ｐにおいて固定される（左のボックス、下側のプロット）ことを示す。

【図１－２】同上。

【図１－３】同上。

【００１２】

【図２】図２Ａ～Ｃ。患者の線維芽細胞における減少したＳＯＲＤ発現およびソルビトール蓄積。（図２Ａ）グルコースをフルクトースに変換する２段階ポリオール経路の模式図。（図２Ｂ）健常コントロール（ｎ＝４、レーン１～４）、ＳＯＲＤにおいてｃ．７５７ｄｅｌＧ；ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）バリアントのヘテロ接合性キャリア（ｎ＝２、レーン１０～１１）およびホモ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ；ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）変化を有する患者（ｎ＝４、レーン５～８）または第２のナンセンスｃ．８９５Ｃ＞Ｔ；ｐ．（Ａｒｇ２９９Ｔｅｒ）変異を一緒に有する複合性ヘテ

口接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ；ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）バリアント（ｎ＝１、レーン９）におけるポリクローナル抗体ａｂ１８９２４８を使用し、チューブリンで正規化したＳＯＲＤのタンパク質レベルを示すイムノブロット。（図２Ｃ）ＵＰＬＣによって測定され、健常コントロール（ｎ＝５）およびＳＯＲＤにおいて両アレルナンセンス変異を有する患者（ｎ＝５）におけるタンパク質含有量に対して正規化した場合の細胞内ソルビトールのレベル。グラフは、平均±ｓ．ｄ．およびデータ分布（ドット）を示す。両側ｔ検定を行って、群にわたってＳＯＲＤによってコードされるタンパク質（図２Ｂ）またはソルビトールレベル（図２Ｃ）を比較した。統計的有意性を、Ｐ値が＜０．０５、＜０．０１または＜０．００１である場合に、それぞれ、＊、＊＊または＊＊＊として示す。全ての実験を独立して２回反復したところ、類似の結果を得た。

【００１３】

【図３－１】図３Ａ～Ｆ。Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｓｏｒｄ２の喪失は、年齢依存性シナプス変性を引きおこす。（図３Ａ）視葉板（lamina）、視髄（medulla）、および視小葉（lobula）を示すＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ視覚系の３Ｄ構造。光受容体末端および視葉板ニューロンを示すｘｙ面およびｘｚ面が、示される。（図３Ｂ）２　ＤＡＥでのｙｗコントロールハエの視葉板。組織化した視葉板カートリッジおよび円柱状光受容体ニューロン（ｃｏｌｕｍｎａｒ　ｐｈｏｔｏｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｎｅｕｒｏｎ）を、それぞれ、ｘｙ面およびｘｚ面に示す。（図３Ｃ）２　ＤＡＥおよび１０　ＤＡＥにおけるＳｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５ホモ接合性ハエの視葉板。矢頭は、視葉板空胞を示す。ボックスは、視葉板のより高倍率の領域を示す。ＢＲＰの強度を示す。点線は、視葉板空胞の領域を示す。スケールバー：３０μｍ。（図３Ｄ）空胞の数、サイズ、およびＢＲＰ強度の定量。各群の合計３個の視葉板を定量した。データを平均±ｓ．ｄ．として示す。統計分析を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙの事後多重比較検定を使用して行った。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。（図３Ｅ～３Ｆ）コントロールハエ（ｙｗ）およびＳｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５（図３Ｅ）またはＳｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２汎ニューロン二重ノックダウン（ＲＮＡｉ）（図３Ｆ）ハエの自発運動活性。各群においてｎ＝１０。データを平均±ｓ．ｄ．として示す。統計分析を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙの事後多重比較検定を使用して行った。＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【図３－２】同上。

【００１４】

【図４－１】図４Ａ～Ｇ。アルドースレダクターゼインヒビターであるエパルレスタットおよびラニレスタットでの処置は、ソルビトールレベルを減少させ、機能を回復させる。（図４Ａ）エパルレスタット　１００μＭ、ラニレスタット　１０μＭまたはＤＭＳＯでの処置の３日後に健常コントロール（ｎ＝５、丸のドット）およびＳＯＲＤにおいて両アレルナンセンス変異を有する患者（ｎ＝５、四角のドット）に由来する線維芽細胞において、ＵＰＬＣによって測定し、タンパク質含有量に対して正規化した細胞内ソルビトールレベル。（図４Ｂ）卵封入後１０日間での野生型（ｙｗ、白丸のドット）、Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５（黒丸のドット）、ならびにＲＮＡｉによるＳｏｄｈ１およびＳｏｄｈ１のニューロン特異的ノックダウン（四角のドット）のＤｒｏｓｏｐｈｉｌａｅからの、脳／頭部ホモジネート由来のＵＰＬＣによって測定され、タンパク質濃度に対して正規化した場合のソルビトールレベル。Ｓｏｄｈ２模倣物（Ｓｏｄｈ２　Ｍｉｍｉｃ）ならびにＳｏｄｈ１およびＳｏｈ２　ＲＮＡｉ　Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｅに、８０μＭ　エパルレスタット、８０μＭ　ラニレスタットまたはＤＭＳＯのいずれかを供給した。グラフは、平均±ｓ．ｄ．を示す。両側ｔ検定を行って、ソルビトールレベルを比較した。統計的有意性は、別段特定されなければ、Ｐ値が＜０．０５、＜０．０１または＜０．００１である場合、それぞれ、＊、＊＊または＊＊＊として示される。全ての実験を独立して２回反復したところ、類似の結果を得た。（図４Ｃ）ＤＭＳＯを供給したコントロールハエ（ｙｗ）、ＤＭＳＯ、８０μＭ　エパルレスタット、または８０μＭ　ラニレスタットを供給したＳｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５ハエ（各群においてｎ＝１

０）の自発運動活性。データを平均±ｓ．ｄ．として示す。統計分析を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙの事後多重比較検定を使用して行った。＊Ｐ＜０．０５、＊＊＊Ｐ＜０．００１。（図４Ｄ～４Ｆ）ＤＭＳＯ（図４Ｄ）、８０μＭ　エパルレスタット（図４Ｅ）、または８０μＭ　ラニレスタット（図４Ｆ）を供給した１０　ＤＡＥおよび４０　ＤＡＥでのＳｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５ホモ接合性ハエの視葉板。矢頭は、視葉板空胞を示す。ボックスは、視葉板のより高倍率の領域を示す。ＢＲＰの強度を示す。点線は、視葉板空胞の領域を示す。スケールバー：３０μｍ。（図４Ｇ）空胞の数、サイズ、およびＢＲＰ強度の定量（図４Ｄ～４Ｆ）。ｎ＝３。データを平均±ｓ．ｄ．として示す。統計分析を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙの事後多重比較検定を使用して行った。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【図４－２】同上。

【００１５】

【図５－１】図５。ＳＯＲＤにおいて両アレル変異を有する家族の系図。四角は男性を、丸は女性を示す。斜線は、死亡した個体に関して使用される。患者は、黒塗りの形で示される。

【図５－２】同上。

【図５－３】同上。

【００１６】

【図６】図６Ａ～Ｂ。Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｓｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２の二重ノックダウンは、年齢依存性シナプス変性をもたらす。（図６Ａ）２　ＤＡＥおよび１０　ＤＡＥでのＳｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２二重ノックダウンホモ接合性ハエの視葉板。矢頭は、視葉板空胞を示す。ボックスは、視葉板のより高倍率の領域を示す。ＢＲＰの強度を示す。点線は、視葉板空胞の領域を示す。スケールバー：３０μｍ。（図６Ｂ）空胞の数、サイズ、およびＢＲＰ強度の定量。各群の合計３個の視葉板を定量した。データを平均±ｓ．ｄ．として示す。統計分析を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙの事後多重比較検定を使用して行った。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【００１７】

【図７】図７。アルドースレダクターゼインヒビターであるエパルレスタットおよびラニレスタットでの処置は、Ｓｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２二重ノックダウンハエの自発運動機能を回復させる。ＤＭＳＯを供給するコントロールハエ（ｙｗ）（ドット、示した各ＤＡＥ点に関して左から１番目のデータ点）、またはＤＭＳＯ（四角、示した各ＤＡＥ点に関して左から２番目のデータ点）、８０μＭ　エパルレスタット（四角、示した各ＤＡＥ点に関して左から３番目のデータ点）、もしくは８０μＭ　ラニレスタット（四角、示した各ＤＡＥ点に関して左から４番目のデータ点）を供給するＳｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２のニューロン特異的ノックダウンを有するハエの自発運動活性。各群においてｎ＝１０。データを平均±ｓ．ｄ．として示す。統計分析を、二元配置ＡＮＯＶＡ、続いて、Ｔｕｋｅｙの事後多重比較検定を使用して行った。＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【００１８】

【図８】図８。ＳＯＲＤペプチドをコードする例示的発現ベクター（ｐＡＡＶ－ＳＯＲＤ）の図示。

【００１９】

【図９】図９。ＳＯＲＤコード配列を含む例示的完全ＡＡＶベクターＤＮＡ配列（ｐＡＡＶ－ＳＯＲＤ）（配列番号１）。

【００２０】

【図１０】図１０。ＳＯＲＤプライマー配列およびサーモサイクリング条件。ＰＣＲ：ポリメラーゼ連鎖反応；　Ｆｗ：順方向；　Ｒｖ：逆方向。

【００２１】

【図１１－１】図１１。遺伝性ニューロパチーを有し、ＳＯＲＤにおいて両アレル変異を有する患者の臨床的特徴。
【図１１－２】同上。
【図１１－３】同上。
【図１１－４】同上。
【００２２】
【図１２】図１２。遺伝性ニューロパチーに冒され、ＳＯＲＤにおいて両アレル変異を有する患者の臨床的特徴。カテゴリカルデータは、データが全個体で利用可能である場合Ｎ（％）、またはＮ／検討した個体数（％）として表される。連続変数は、平均±標準偏差（最小－最大）として表される。ＣＭＴはシャルコー・マリー・トゥース病、ｄＨＭＮは遠位型遺伝性運動ニューロパチー。
【００２３】
【図１３】図１３。１０名の血縁でない健常コントロールおよびＳＯＲＤにおいて両アレルｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７変異を有する１０名の患者に由来する血清中の空腹時ソルビトールレベル。グラフは、平均±ｓ．ｄ．およびデータ分布（ドット）、および、群にわたってＳＯＲＤタンパク質およびソルビトールレベルを比較する両側ｔ検定のｐ値を示す－　＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、および＊＊＊ｐ＜０．００１。全実験を、独立して２回反復した。
【００２４】
【図１４】図１４Ａ～１４Ｃ。ＳＯＲＤ遺伝子補充療法のための例示的ベクター設計。（図１４Ａ）ＳＯＲＤ遺伝子補充療法のためのＡＡＶ－９パッケージされたベクター設計。ＣＢ７プロモーターは、高発現を駆動するにあたって有効であることが示されており、ＳＯＲＤ　ｃＤＮＡ（ＮＣＢＩ参照配列：　ＮＭ＿００３１０４．６）、発現および標的特異性をさらに増強するための転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、および転写終結ポリ（Ａ）エレメント、さらに複製起点（ｐＵＣ－ｏｒｉ）およびＩＴＲ配列（逆方向末端反復配列）が続く。（図１４Ｂ）ＳＯＲＤ　ｃＤＮＡ配列。（図１４Ｃ）ＳＯＲＤポリペプチド配列。
【００２５】
【図１５－１】図１５Ａ～１５Ｄ。アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）（ＡＲ１Ａ、（配列番号２２））を介するアルドースレダクターゼ（ＡＲ）（ＡＫＲ１Ｂ１遺伝子）の有意なノックダウン。標的化ＡＳＯ（ＡＲ　１Ａ）配列およびＡＳＯ－Ｓ混合配列（ＡＲ－Ｓ　１Ａ、（配列番号４７））を、図１５Ａに示す。図１５Ｂは、ＡＳＯのヌクレオチド骨格に対する改変を示す。これは、ＳＯＲＤ患者線維芽細胞およびコントロール線維芽細胞において行い、β－チューブリンに対して正規化し、ウェスタンブロットを介して測定した（図１５Ｃ～１５Ｄ）。さらなるコントロールは、ランダムヌクレオチドを示すＡＳＯ－Ｓの混合バージョン（ＡＲ－Ｓ　１Ａ）を使用した（図１５Ｃ）。
【図１５－２】同上。
【００２６】
【図１６－１】図１６。Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓアルド－ケトレダクターゼファミリー１メンバーＢ（ＡＫＲ１Ｂ１）におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド配列および標的部位（エキソン標的のみ）の表。フィルター基準：　Ａ）４０％≦ＧＣ％≦６０％；　Ｂ）アンチセンスオリゴ結合エネルギー≦－８ｋｃａｌ／ｍｏｌ；　Ｃ）標的配列の中にＧＧＧがない。
【図１６－２】同上。
【図１６－３】同上。
【図１６－４】同上。
【図１６－５】同上。
【図１６－６】同上。
【００２７】
【図１７】図１７。Ｈｏｍｏ　ｓａｐｉｅｎｓアルド－ケトレダクターゼファミリー１メ

ンバーＢ（ＡＫＲ１Ｂ１）におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）配列および標的部位（エキソン標的のみ）の表。フィルター基準： Ａ）４０％≦ＧＣ％≦６０％； Ｂ）標的配列の中にＧＧＧＧがない； Ｃ）標的部位ヌクレオチドの平均非対形成確率（average unpaired probability）≧０．５； Ｄ）閾値確率０．５を上回るアクセシビリティプロファイルにおける各ピークに関しては、この同じピークに標的化される全ての部位を、それらの平均非対形成確率によってランク付けし（高いほどよい）、ピーク毎に多くてもｎ個の部位が選択され、ここで、ｎが最大（［ピーク幅／部位の長さ］、２）によって決定される； Ｅ）基準Ａ～Ｄを満たす部位の中でも、最高の平均非対形成確率を有する上位２０個の特有のものを列挙する。

【００２８】

【図１８－１】図１８。Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓアルドケトレダクターゼファミリー１メンバーＢ（ＡＫＲ１Ｂ１）， ｈｇ１９＿ｄｎａ ｒａｎｇｅ＝ｃｈｒ７：１３４１２７１０２－１３４１４３９４４におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）配列および標的部位（イントロン標的のみ）の表。フィルター基準： Ａ）４０％≦ＧＣ％≦６０％； Ｂ）標的配列の中にＧＧＧＧがない； Ｃ）標的部位ヌクレオチドの平均非対形成確率≧０．５； Ｄ）閾値確率０．５を上回るアクセシビリティプロファイルにおける各ピークに関しては、この同じピークに標的化される全ての部位を、それらの平均非対形成確率によってランク付けし（高いほどよい）、ピーク毎に多くてもｎ個の部位が選択され、ここで、ｎが最大（［ピーク幅／部位の長さ］、２）によって決定される； Ｅ）基準Ａ～Ｄを満たす部位の中でも、最高の平均非対形成確率を有する上位２０個の特有のものを列挙する。

【図１８－２】同上。

【図１８－３】同上。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

詳細な説明

本開示は、遺伝性ニューロパチーおよび関連する遺伝状態を検出および／または処置する方法を提供する。

【００３０】

遺伝性（ｉｎｈｅｒｉｔｅｄ）（または遺伝性（ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ））ニューロパチーとしては、シャルコー・マリー・トゥース病（ＣＭＴ）、遺伝性運動感覚性ニューロパシー、遺伝性運動ニューロパチー、遠位型遺伝性運動ニューロパチー（ｄＨＭＮ）、軸索型ニューロパチー、中間型ニューロパチー、および筋萎縮性側索硬化症型ＡＬＳ４が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３１】

種々の局面において、本開示は、ソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異の存在が被験体に由来するサンプル中で検出される方法を提供する。上記変異は、遺伝子のＤＮＡ配列を調べるか、ＲＮＡを調べるか、またはある機能喪失を生じる変異を有するタンパク質を調べることによって検出され得る。

【００３２】

ＣＭＴの最も頻度の高い劣性形態と関連するソルビトールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ＳＯＲＤ）における両アレル変異の同定が、本明細書で開示される。ＳＯＲＤは、ソルビトールをフルクトースに変換する酵素であるソルビトールデヒドロゲナーゼをコードする。それは、糖尿病の高血糖状態における神経損傷に中心的と以前に同定された２段階ポリオール経路に属する。異なる民族性にわたるＣＭＴの４２症例を、ホモ接合性状態または複合性ヘテロ接合性状態のいずれかにあるＳＯＲＤにおけるナンセンス変異、ｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７を有すると同定した。さらなる症例および複数のコントロールセットにおけるｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７変化をスクリーニングすることによって、このバリアントを、メンデルの法則に従って遺伝した男性における最も一般的な病原性アレルのうちの１つとして確立した（ＭＡＦ＝０．００３）

。患者線維芽細胞培養物は、ＳＯＲＤタンパク質の完全な喪失および組織損傷を引きおこす細胞内ソルビトール蓄積の喪失を示す。Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａにおけるｓｏｄｈ１の喪失は、シナプス変性および進行性の運動障害をもたらした。顕著なことには、アルドースレダクターゼインヒビターでの処置によるポリオール流入の低減は、患者線維芽細胞およびＳｏｄｈ１　Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａモデルにおける細胞内ソルビトールレベルを十分に救済した。後者のモデルにおいて、上記処置はまた、運動および眼の表現型を完全に改善した。まとめると、これらの所見は、遺伝性ニューロパチーにおけるポリオール経路およびソルビトール蓄積の主要な役割を示し、症例の有意な割合において潜在的に処置可能な状態の分子的な根拠を確立する。これらの所見はまた、糖尿病の分野においてより広い影響とともに、遺伝性および後天性のニューロパチーの集中的な病理機序の一例を表す。

【００３３】

従って、本開示の種々の局面において、上記方法は、ＳＯＲＤ遺伝子変異、７５３ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）、ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７、ｃ．２８Ｃ＞Ｔ；　ｐ．Ｌｅｕ１０Ｐｈｅ、ｃ．３１６＿４２５＋１６５ｄｅｌ；　ｐ．Ｃｙｓ１０６Ｔｅｒ、ｃ．３２９Ｇ＞Ｃ；　ｐ．Ａｒｇ１１０Ｐｒｏ、ｃ．２９８Ｃ＞Ｔ；　ｐ．Ａｒｇ１００Ｔｅｒ、ｃ．２９５Ｃ＞Ｔ；　ｐ．Ａｒｇ２９９Ｔｅｒ、ｃ．９６４Ｇ＞Ａ；　ｐ．Ｖａｌ３２２Ｉｌｅ、ｃ．４５８Ｃ＞Ａ；　ｐ．Ａｌａ１５３Ａｓｐ；コピー数バリエーションを介する個々のもしくは複数のコードエキソンまたはＳＯＲＤ遺伝子全体の欠失；あるいは任意のタンパク質短縮変異および／またはタンパク質の「機能喪失」もしくは低次形態機能（ｈｙｐｏｍｏｒｐｈｉｃ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ）をもたらす変異を検出することを包含する。

【００３４】

種々の局面において、上記ＳＯＲＤ変異は、ＤＮＡシーケンシング法、例えば、全エキソームシーケンシング、全ゲノムシーケンシング（ＷＧＳ）および／または次世代シーケンシング（ＮＧＳ）、アレル特異的オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、定量的またはリアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、多重ＰＣＲ、ネスト化ＰＣＲ、増幅不応性変異システム（Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ　Ｍｕｔａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ）（ＡＲＭＳ）ＰＣＲ、多重ライゲーション依存性プローブ増幅（ＭＬＰＡ）、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）、１本鎖高次構造多型（ＳＳＣＰ）、タンパク質短縮試験（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｒｕｎｃａｔｉｏｎ　Ｔｅｓｔ）（ＰＴＴ）、ＲＦＬＰ、ＤＮＡマイクロアレイ、ＲＮＡ－ｓｅｑを使用して、ＣＲＩＳＰＲベースの変異検出（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃｈｉｐ，　Ｈａｊｉａｎら．，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　３，　４２７－４３７（２０１９））、または変異検出に適した他のＤＮＡもしくはＲＮＡ変異検出法を使用して検出される。

【００３５】

種々の局面において、上記ＳＯＲＤ変異は、ウェスタンブロット法（イムノブロット）、高速液体クラマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ／ＭＳ）、抗体依存性の方法（例えば、酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ）、タンパク質免疫沈降法、タンパク質免疫染色法、タンパク質チップ法または変異検出に適した他のタンパク質検出法を使用してタンパク質を調べることによって検出される。

【００３６】

必要に応じて、上記方法は、被験体のサンプル中でソルビトールレベルを測定することをさらに包含する。ソルビトールを測定するための方法としては、例えば、酵素アッセイ、蛍光アッセイ、クロマトグラフィーベースの方法、および分光法ベースの方法が挙げられる。ソルビトール測定の例示的方法は、実施例の中で提供される。

【００３７】

本開示は、ＳＯＲＤ変異が関わるニューロパチー（例えば、遺伝性ニューロパチー）および関連状態を特徴づける方法をさらに提供する。種々の局面において、上記方法は、ニューロパチーに罹患している被験体の生物学的サンプル中でソルビトールレベルを測定することを包含する。種々の局面において、上記方法は、上記生物学的サンプル中でソルビト

ールの増加したレベルを検出することを包含する。「ソルビトールの増加したレベル」とは、例えば、約１０ｍｇ／Ｌを上回るソルビトールレベルを意味する。ＳＯＲＤ関連ニューロパチーは、実施例および図１３に記載されるように、患者において高レベルのソルビトールをもたらす。よって、約１０ｍｇ／Ｌを上回るソルビトールレベルの検出は、上記ニューロパチーが、ＳＯＲＤ変異と関連する遺伝性ニューロパチーであり、それによって、臨床医が上記被験体を悩ますニューロパチーを特徴づけることを可能にすることを示す。必要に応じて、上記方法は、上記被験体に、アルドースレダクターゼインヒビター；アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド；ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド；ＳＯＲＤペプチド；変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤；およびＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤からなる群より選択される薬剤を投与することを包含する処置ステップを包含する。

【００３８】

種々の局面において、本開示は、被験体におけるソルビトールレベルを測定することの前または後に、上記被験体に由来するサンプル中でソルビトールデヒドロゲナーゼ（ＳＯＲＤ）遺伝子における変異を同定することを包含する方法を提供する。この点において、上記方法は、遺伝性ニューロパチーの診断を確定するために使用され得る。同様に、本開示は、病原性であるＳＯＲＤ変異を同定するための方法であって、上記方法は、ＳＯＲＤ遺伝子において変異を含む被験体においてソルビトールレベルを測定することを包含する方法を提供する。増加したソルビトールレベル（例えば、約１０ｍｇ／Ｌより高い）の存在は、ＳＯＲＤ変異が病原性であることを示す。

【００３９】

代わりに（またはさらに）、上記方法は、被験体において遺伝性ニューロパチーの処置の有効性を評価するために使用され得る。この点において、上記方法は、上記被験体に治療を投与すること、次いで、生物学的サンプル中でソルビトールレベルを測定することを包含する。前処置で観察されたソルビトールのレベルと比較したソルビトールレベルの減少（例えば、約１０ｇ／Ｌを下回るソルビトールレベルの低減）は、上記被験体の状態の改善を示す。本明細書で記載される材料および方法はまた、ＳＯＲＤ関連遺伝性ニューロパチーの処置のための医薬を摂取するにあたって、患者コンプライアンスを特徴付け得るか、または臨床試験における候補治療剤の成功をモニターし得る。

【００４０】

上記サンプルは、上記被験体から採取された任意の生物学的サンプル（目的の形質（例えば、核酸（例えば、ＳＯＲＤ　ｍＲＮＡ）、タンパク質（例えば、ＳＯＲＤタンパク質）、またはソルビトールの存在または量）に関して分析され得る任意の組織、細胞、または流体（例えば、血液、血漿、血清、または尿）が挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。種々の実施形態において、上記生物学的サンプルは、血漿、血清、唾液、尿、または皮膚サンプルである。

【００４１】

「被験体」とは、本明細書で言及される場合、任意の哺乳動物（例えば、ヒト）であり得る。飼い慣らされた愛玩動物（イヌおよびネコが挙げられる）として重要な動物；研究において重要な動物（齧歯類および霊長類が挙げられる）；および大型の絶滅危惧種および動物園動物（例えば、霊長類、猫、キリン、ゾウ、サイ）だけでなく、農業上重要な動物（例えば、ウシ、ウマ、およびブタ動物）が企図される。

【００４２】

種々の局面において、上記方法は、１またはこれより多くのアルドースレダクターゼインヒビターを含む組成物を上記被験体に投与することによって、上記被験体を処置することを包含する。いくつかの実施形態において、上記アルドースレダクターゼインヒビターは、アルレスタチン、エパルレスタット、ジエパルレスタット、フィダレスタット、イミレスタット、リドレスタット、ミナルレスタット、ポナルレスタット、ラニレスタット、サルフレジン　Ｂ１１、ソルビニル、トルレスタット、ゼナレスタット、またはゾポルレスタットである。アルドースレダクターゼインヒビターは、Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ　Ｔｈ

ｅｒ Ｐａｔ． ２０１９；２９（３）：１９９－２１３； Ｃｈａｔｚｏｐｏｕｌｏｕら．， Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｔｈｅｒ Ｐａｔ． ２０１２；２２（１１）：１３０３－２３（それらの全体において参照により援用される）において総説される。

【００４３】

いくつかの実施形態において、酵素補充療法が使用され、ＳＯＲＤペプチドが上記被験体に投与される。よって、上記治療は、内因性ＳＯＲＤレベルが不適切であるかまたは存在しないＳＯＲＤペプチドレベルを補う。例示的なＳＯＲＤペプチドは、配列番号４６に提供される。本開示は、配列番号４６と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または１００％ 同一性を構成するペプチドの使用を企図する。

【００４４】

種々の実施形態において、上記方法は、ポリヌクレオチド（例えば、アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチド／タンパク質をコードするポリヌクレオチド、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤、および／またはＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤）を上記被験体に投与することを包含する。ポリヌクレオチドは、代表的には、発現ベクターを介して宿主細胞に送達され、その発現ベクターは、送達および発現に必要な調節配列を含むが、発現ベクターの使用は、本開示との関係では要求されない。いくつかの局面において、本明細書で記載される構築物は、プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーターまたはＣＢ７プロモーター）、タンパク質コード領域（必要に応じて、発現を促進する非コード（例えば、３’－ＵＴＲ）領域を伴う）、転写終結配列、ならびに／またはレギュレーターエレメント配列（例えば、転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、ポリ（Ａ）エレメント、複製起点（ｐＵＣ－ｏｒｉ）および／もしくはＩＴＲ配列（逆方向末端反復配列））を含む。種々の局面において、本明細書で記載される構築物は、表１に列挙されるベクター特徴のうちの１またはこれより多くを含む。ベクター特徴はまた、Ｐｏｗｅｌｌら．， Ｄｉｓｃｏｖ Ｍｅｄ． ２０１５； １９（１０２）： ４９－５７（その全体において参照により援用される）に総説される。例えば、Ｃｒｅ－ｌｏｘＰシステムは、目的のペプチドを（例えば、ＳＯＲＤペプチドを、必要に応じて、目的の特異的組織において）発現させるために利用され得る。発現ベクターは、ウイルスベース（例えば、レトロウイルスベース、アデノウイルスベース、またはアデノ随伴ウイルスベース）であっても、非ウイルスベクター（例えば、プラスミド）であってもよい。非ベクターベースの方法（例えば、裸のＤＮＡ、ＤＮＡ複合体などを使用する）がまた、使用されてもよい。必要に応じて、上記ベクターは、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクターまたはバキュロウイルスベクター）であり、種々の好ましい実施形態において、上記ベクターは、アデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）である。上記発現ベクターは、任意のＡＡＶ血清型（ＡＡＶ－１、ＡＡＶ－２、ＡＡＶ－３、ＡＡＶ－４、ＡＡＶ－５、ＡＡＶ－６、ＡＡＶ－７、ＡＡＶ－８、ＡＡＶ－９、ＡＡＶ－１０、ＡＡＶ－１１、ＡＡＶ－１２、またはＡＡＶ－１３を含む）に基づき得る。ポリヌクレオチドはまた、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、微小小胞、流体力学ベースの遺伝子送達を介するか、または「遺伝子銃」を介して送達され得る。

【００４５】

【表１】

遍在性プロモーター	ニューロン特異的プロモーター	イントロン(増強された発現)	転写後調節エレメント	ポリアデニル化シグナルエンハンサー	細菌耐性
CMV, Cba, CAG, CBh, EF1-α, PGK, UBC	NFL, NFH, シナプシン, CaMKII, Hb9, MeCP2	b-Glob, MVM, I.IX, アデノウイルス SD/ 免疫グロブリン SA, SV40 後期 SD/SA	HPRE, WPRE	hGH, bGHpA, SPA, SV40 後期	アンピシリン カナマイシン

表1： ベクター特徴エレメント

【００４６】

本開示の方法において投与されるべきＡＡＶの力価は、例えば、特定のＡＡＶ、投与様式、処置目的、個体、標的化されている細胞タイプ（複数可）に依存して変動し、当該分野で公知の方法によって決定され得る。ＡＡＶの力価は、１ｍｌあたり約１×１０６、約１×１０７、約１×１０８、約１×１０９、約１×１０１０、約１×１０１１、約１×１０１２、約１×１０１３～約１×１０１４またはより多くのＤＮａｓｅ耐性粒子（ＤＲＰ）の範囲に及び得る。投与量はまた、ウイルスゲノム（ｖｇ）の単位で表され得る。

【００４７】

種々の実施形態において、ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチドは、上記被験体に投与される。ＳＯＲＤのアミノ酸配列は、配列番号４６として提供される（図１４Ｃ、ＮＣＢＩ参照配列： ＮＰ＿００３０９５．２）。上記方法で使用されるポリヌクレオチドは、必要に応じて、配列番号４６のアミノ酸配列、または配列番号４６のアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは１００％ 同一である配列（これはＳＯＲＤの機能を保持する）をコードする。必要に応じて、上記ポリヌクレオチドは、配列番号４５（図１４Ｂ）、または配列番号４５のポリヌクレオチド配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは１００％ 同一である配列（そしてこれは、ＳＯＲＤをコードする）を含む。上記ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む例示的な発現ベクターは、図８および１４Ａに図示される。上記ポリヌクレオチドは、本開示の少なくとも1つの局面において、図９に示される核酸配列（配列番号１）を含み、この配列は、ＳＯＲＤをコードするポリヌクレオチドを含むＡＡＶベクターの配列に相当する。

【００４８】

種々の実施形態において、上記方法は、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤を上記被験体に投与することを包含する。変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤とは、ＳＯＲＤ遺伝子発現および／またはＳＯＲＤタンパク質レベルが、基底／野生型レベルと比較して低減されるように、ＳＯＲＤ遺伝子の発現に干渉する薬剤に言及する。変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を「遮断すること」は、発現およびＳＯＲＤ生成の１００％消滅（ａｂｏｌｉｔｉｏｎ）を要求しない；異常なＳＯＲＤの低減した発現の任意のレベルが、被験体に有益であり得ることが認識される。例示的な薬剤としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、またはマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４９】
種々の実施形態において、上記方法は、アルドースレダクターゼ配列を標的とするアルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチドを、上記酵素の発現が遮断されるように、上記被験体に投与することを包含する。アルドースレダクターゼ、アルド－ケトレダクターゼファミリー１メンバーＢ（ＡＫＲ１Ｂ１）は、配列番号４８（ＮＣＢＩ参照配列：　ＮＭ＿００１６２８）によってコードされる。アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＡＫＲ１Ｂ１遺伝子発現および／またはアルドースレダクターゼタンパク質レベルが、基底／野生型レベルと比較して低減されるように、アルドースレダクターゼ遺伝子（ＡＫＲ１Ｂ１）の発現に干渉する。アルドースレダクターゼ遺伝子（ＡＫＲ１Ｂ１遺伝子）の発現の「遮断」は、発現およびアルドースレダクターゼ生成の１００％消滅を要求しない；アルドースレダクターゼの低減した発現の任意のレベルが、被験体に有益であり得ることが認識される。例えば、種々の局面において、上記アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アルドースレダクターゼの発現を低減する。ＡＳＯは、1本鎖デオキシリボヌクレオチドであり、これは、ｍＲＮＡ標的配列に相補的である。種々の局面において、上記アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アルドースレダクターゼ遺伝子のエキソン配列またはイントロン配列を標的とする。

【００５０】
アルドースレダクターゼを標的とするＡＳＯ配列を同定するための例示的方法において、以下の基準を使用した：　Ａ）アルドースレダクターゼ（ＡＫＲ１Ｂ１）を標的とする配列は、≦４０％　ＧＣまたは≦６０％　ＧＣ含有量を含むものを選択した；　Ｂ）ＧＧＧＧヌクレオチドを含む配列を排除した；　Ｃ）標的部位ヌクレオチドの平均非対形成確率≧０．５を有する配列を選択した；　Ｄ）閾値確率０．５を上回ったアクセシビリティプロファイルにおける各ピークに関して、その同じピークに標的化される全ての部位を、それらの平均非対形成確率によってランク付けし（高いほどよい）、ピーク毎に多くてもｎ個の部位が選択され、ここで、ｎが最大ピーク幅／部位の長さによって決定される。これらの基準を満たす例示的な薬剤は、表２に提供される。さらなる例示的なＡＳＯ配列およびフィルター基準は、図１６～１８に示される。

【００５１】
【表２】

標的位置の開始	標的位置の終了	標的配列 (5'-3')	配列番号	アンチセンスオリゴ (5'-3')	配列番号	GC含有量	平均非対形成確率	結合部位破壊
475	494	AGGUGGAGAUGAUCUUAAAC	21	GTTTAAGATCATCTCCACCT	22	40.00%	0.594	12.5
476	495	GGUGGAGAUGAUCUUAAACA	23	TGTTTAAGATCATCTCCACC	24	40.00%	0.592	12.6
484	503	UGAUCUUAAACAAACCUGGC	25	GCCAGGTTTGTTTAAGATCA	26	40.00%	0.66	12.5
490	509	UAAACAAACCUGGCUUGAAG	27	CTTCAAGCCAGGTTTGTTTA	28	40.00%	0.633	9.2
534	555	CAGGUGGAGAUGAUCUUAAACA	29	TGTTTAAGATCATCTCCACCTG	30	40.90%	0.584	12.6
545	566	GAUCUUAAACAAACCUGGCUUG	31	CAAGCCAGGTTTGTTTAAGATC	32	40.90%	0.611	10.3
548	569	CUUAAACAAACCUGGCUUGAAG	33	CTTCAAGCCAGGTTTGTTTAAG	34	40.90%	0.646	9.5
567	588	AAGUAUAAGCCUGCAGUUAACC	35	GGTTAACTGCAGGCTTATACTT	36	40.90%	0.584	7.7
739	760	UCAAGGCGAUCGCAGCCAAGCA	37	TGCTTGGCTGCGATCGCCTTGA	38	59.10%	0.669	10
741	762	AAGGCGAUCGCAGCCAAGCACA	39	TGTGCTTGGCTGCGATCGCCTT	40	59.10%	0.694	9.3
1025	1046	ACCUGUGUUUCUUGCCUCAUUU	41	AAATGAGGCAAGAAACACAGGT	42	40.90%	0.641	5.5

表2：　*AKR1B1*／アルドースレダクターゼを標的とするASO配列

【００５２】
種々の実施形態において、ＡＳＯ配列のヌクレオチド骨格を、基底／野生型レベルと比較した場合に、遺伝子発現を低減するために、キメラまたはギャプマーデザインに改変される。種々の実施形態において、ギャップマーデザインは、ＲＮａｓｅ　Ｈ認識および他のヌクレアーゼに対して耐性のリボース糖部分における改変を有するように、上記アンチセンスオリゴヌクレオチド配列の各末端上で３－５ヌクレオチドの指定を必要とする一方で、全ての他のヌクレオチドが、ＲＮａｓｅ　Ｈ適合性改変を含む。ＲＮａｓｅ　Ｈは、ＲＮＡ－ＤＮＡ二重鎖（例えば、異常なｍＲＮＡ転写物と合成的にデザインされたＤＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチドとの間で形成されるもの）の切断を担う。種々の実施形態において、ＡＳＯ配列の改変としては、ホスホロチオエート（ＰＳ）－ＲＮａｓｅ　Ｈ認識可能、ホスホロジアミデートモルホリノ（ＰＭＯ）－ＲＮａｓｅ　Ｈ耐性、２’－Ｏ－

メチル－ＲＮａｓｅ　Ｈ耐性、２’－Ｏ－メトキシエチル（ＭＯＥ）－ＲＮａｓｅ　Ｈ耐性、ロック核酸（ＬＮＡ）－ＲＮａｓｅ　Ｈ耐性、エチレン架橋核酸（ＥＮＡ）－ＲＮａｓｅ　Ｈ耐性、または（Ｓ）－拘束エチル（ｃＥｔ）－ＲＮａｓｅ　Ｈ耐性が挙げられるが、これらに限定されない。ＡＳＯ配列の例示的な改変は、図１５Ａ～１５Ｂに示される。ＡＳＯ配列に対する改変は、Ｓｃｏｌｅｓら．，　Ｎｅｕｒｏｌ　Ｇｅｎｅｔ．　２０１９；５（２）：ｅ３２３（その全体において参照により援用される）において総説される。

【００５３】

種々の局面において、上記方法は、ＳＯＲＤの発現を調節するためにＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を使用する。ＲＮＡｉ経路は、Ｍｕｓｃｌｅ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ，　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ＋Ｂｕｓｉｎｅｓｓ　Ｍｅｄｉａ，　ＬＬＣ（２０１０）の第７章の７．３節、Ｄｕａｎ（編）にまとめられている。適切な薬剤としては、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、およびｓｈＲＮＡが挙げられる。ｓｈＲＮＡ／Ｈａｉｒｐｉｎベクターは、ＲＮＡｉを介して標的遺伝子発現をサイレントにするために使用され得るタイトなヘアピンターンを有する人工ＲＮＡ分子（ヌクレオチド）である。ｓｈＲＮＡは、比較的遅い分解およびターンオーバー速度を有するという点で、ＲＮＡｉの有利なメディエーターであるが、それはしばしば、発現ベクターの使用を必要とする。例示的な局面において、本開示はｌ、ＳＯＲＤを標的とする１またはこれより多くのｓｈＲＮＡを発現するＡＡＶベクターの生成および投与を含む。ｓｈＲＮＡの発現は、種々のプロモーターの使用によって調節される。種々の局面において、ポリメラーゼＩＩＩプロモーター（例えば、Ｕ６およびＨ１）、およびポリメラーゼＩＩＩプロモーターが、使用される。いくつかの局面において、Ｕ６　ｓｈＲＮＡが使用される。ＲＮＡｉはまた、アルドースレダクターゼ（例えば、ＡＫＲ１Ｂ１）の発現をダウンレギュレートする（すなわち、遮断する）ために使用され得ることが認識される；よって、本開示は、アルドースレダクターゼの発現を遮断するために、アルドースレダクターゼイントロン配列またはエキソン配列（ｅｘｔｒｏｎｉｃ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を標的とするｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、およびｓｈＲＮＡの使用（ｓｕｅ）を企図する。

【００５４】

旧来の低分子／ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）配列は、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター（例えば、Ｕ６）を含むベクターから細胞核の内部で通常転写される。内因性Ｕ６プロモーターは通常、Ｕ６　ＲＮＡ（スプライシングに関与する低分子ＲＮＡ）の発現を制御し、十分に特徴づけられている（Ｋｕｎｋｅｌら．，　Ｎａｔｕｒｅ．　３２２（６０７４）：７３－７　（１９８６）；　Ｋｕｎｋｅｌら．，　Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．　２（２）：１９６－２０４　（１９８８）；　Ｐａｕｌｅｓ．，　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　２８（６）：１２８３－９８　（２０００））。本開示は、マウスおよびヒト両方のＵ６またはＨ１プロモーターを含む。ループによって接続された標的遺伝子からのセンス配列およびアンチセンス配列を含むｓｈＲＮＡは、核から、ＤｉｃｅｒがこれをｓｉＲＮＡへと処理する場所である細胞質へと輸送される。

【００５５】

本開示のいくつかの局面において、ＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤が使用される。ＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤とは、ＳＯＲＤコード配列もしくは調節エレメントおよび／またはＳＯＲＤ遺伝子と関連する非コード領域を改変して、配列の中で所望の変化を達成し得る薬剤に言及する。種々の局面において、ゲノム編集は、ＳＯＲＤ遺伝子配列のうちの一部もしくは全てを置き換えるか、またはＳＯＲＤタンパク質発現レベルを変化させるために、使用され得る。種々の実施形態において、上記薬剤は、ゲノム編集技術（例えば、デザイナージンクフィンガー、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮｓ）、またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート－ＣＲＩＳＰＲ関連）システムにおいて使用される構成成分を含み得る。本開示の方法における使用のための例示的な薬剤は、Ｃａｓ９分子および／またはｇＲＮＡ分子をコードするＤＮＡである。Ｃａｓ９およびｇＲＮＡは、単一発現ベ

クターまたは別個の発現ベクターの中に存在し得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムのアデノウイルス送達は、Ｈｏｌｋｅｒｓら．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ（２０１４），１１（１０）：１０５１－１０５７（これは、その全体において参照により援用される）に記載される。

【００５６】

ＣＲＩＳＰＲシステムおよびＣａｓ９を記載する他の刊行物としては、以下が挙げられる：Ｃｏｎｇら．Ｓｃｉｅｎｃｅ（２０１３）３３９：８１９－２３；Ｊｉｎｅｋら．，Ｅｌｉｆｅ．（２０１３）２：ｅ００４７１；Ｌｅｉら．Ｃｅｌｌ（２０１３）１５２：１１７３－１１８３；Ｇｉｌｂｅｒｔら．Ｃｅｌｌ（２０１３）１５４：４４２－５１；Ｌｅｉら．Ｅｌｉｆｅ（２０１４）３：ｅ０４７６６；Ｐｅｒｅｚ－Ｐｉｎｅｌａら．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ（２０１３）１０：９７３－９７６；Ｍａｉｄｅｒら．Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ（２０１３）１０，９７７－９７９；米国特許第８，６９７，３５９号；同第８，７７１，９４５号；同第８，７９５，９６５号；同第８，８６５，４０６号；同第８，８７１，４４５号；同第８，８８９，３５６号；同第８，８９５，３０８号；同第８，９０６，６１６号；同第８，９３２，８１４号；同第８，９４５，８３９号；同第８，９９３，２３３号；同第８，９９９，６４１号；米国特許公開番号２０１４／００６８７９７；および国際特許公開番号ＷＯ ２０１４／１９７５６８（全て、それらの全体において参照により援用される）。

【００５７】

いくつかの実施形態において、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９多重化は、２またはこれより多くのガイドＲＮＡがＣＲＩＳＰＲ １０１：Ａ Ｄｅｓｋｔｏｐ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ（１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ａｄｄｇｅｎｅ，Ｊａｎｕａｒｙ ２０１６（これは、その全体において参照により援用される）に記載されるように発現される複数のゲノム遺伝子座を標的とするために使用され得る。

【００５８】

用語「処置すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」または「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」とは、遺伝性ニューロパチーおよび／または関連障害および／またはこれらと関連する症状を低減または改善することに言及する。これらの用語は、上記ニューロパチーまたはこれと関連する症状の発生または再発の頻度を低減または遅らせる（すなわち、その障害に罹患した患者における寛解の期間を長くする）、ならびに上記障害またはこれと関連する任意の障害の重症度を低減することを含む。排除はされないが、障害または状態を「処置すること」または「処置」は、その障害、状態、またはこれと関連する症状が、完全に排除されることを要求しないことは、認識される。

【００５９】

活性薬剤（例えば、アルドースレダクターゼインヒビター、アルドースレダクターゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチドをコードするポリヌクレオチド、ＳＯＲＤペプチド、変異型ＳＯＲＤ遺伝子の発現を遮断する薬剤、またはＳＯＲＤ遺伝子における変異を矯正する薬剤）の用量は、投与経路（例えば、局所 対 全身）、患者の特性（例えば、性別、体重、健康状態、副作用）、遺伝性ニューロパチーまたは関連障害の性質および程度、ならびに特定の活性薬剤または投与のために選択された活性薬剤の組み合わせのような要因に依存する。

【００６０】

本明細書で記載される活性薬剤は、被験体への投与に適した製剤構成成分、およびさらなる治療剤を含み得る組成物（例えば、薬学的に受容可能な組成物）中に提供される。薬学的に受容可能な組成物（例えば、本明細書で記載される薬剤を含む医薬組成物）の適切な投与方法は、当該分野で周知である。種々の局面において、１より多くの経路が、本明細書で開示される薬剤のうちの１またはこれより多くを投与するために使用され得る。特定の経路が、別の経路よりも即座のかつ効果的な反応を提供し得る。例えば、ある特定の状況において、上記組成物を経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内

、眼内、動脈内、門脈内、病変内、髄内、髄腔内（intrathecal）、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、経腸的、局所的、舌下、尿道、膣、もしくは直腸手段による；制御された、遅延した、徐放のもしくは別の方法で改変された放出システムによる；移植デバイスによる；ナノ粒子を使用する；またはコンジュゲートとしての注射または注入を通じて送達することは望ましい。

【００６１】

本明細書で記載される２またはこれより多くの活性薬剤が治療レジメンの一部として投与され得ることは、企図される。代わりにまたはさらに、上記活性薬剤のうちの１またはこれより多くが、治療レジメンの一部として他の治療剤とともに投与され得る。上記活性薬剤（複数可）は、単剤療法として、または同時にもしくは規則正しく（metronomically）投与される他の処置との併用療法として、投与され得る。用語「同時の」または「同時に」とは、２種の薬剤を６時間以内またはそれ未満で（例えば、互いに３時間以内または１時間以内）に投与することに言及する。この点において、複数の活性（または治療）薬剤が、同じ組成物の中で、または短期間内に（例えば、３０分以内に）提供される別個の組成物において投与され得る。用語「規則正しく」とは、異なる薬剤を異なる時間でかつ反復投与に関連する頻度で投与することを意味する。活性薬剤は、同じ時間にまたは同じ経路によって投与される必要はない；好ましくは、種々の実施形態において、異なる活性薬剤がそれらの治療効果を発揮している期間において重複が存在する。本開示のさらなる局面および詳細は、以下の実施例から明らかであり、この実施例は、例証であって限定ではないことが意図される。

【実施例】

【００６２】

一般的方法

家族

全ての家族に、書面によるインフォームド・コンセントを提供して、試験に参加してもらった。その試験プロトコールは、提供機関の機関内審査委員会による承認を得た。全ての患者は、神経科医によって臨床的に評価された。

【００６３】

全エキソームおよびサンガーシーケンシング

全エキソームシーケンシングを、散発性および劣性のＣＭＴおよびｄＨＭＮ家族の指標個体において行った。ＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔ Ｈｕｍａｎ Ａｌｌ Ｅｘｏｎ ５０ ＭＢ Ｋｉｔ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を、液中富化（ｉｎ－ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）のために使用し、ＨｉＳｅｑ ２５００機器（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を使用して、約１２０ｂｐペアエンド配列リードを生成した。Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ ａｌｉｇｎｅｒ、およびＦｒｅｅｂａｙｅｒｓを使用して、配列リードのアラインメントおよびバリアントコールを行った。最終的なデータを、分析のためにＧＥＮＥＳＩＳソフトウェアにアップロードした。同じホモ接合性バリアントを共有する家族の検索のためのフィルタリングアプローチを、データベースの中の全エキソームにわたって適用した。サンガーシーケンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ Ｇｅｎｏｍｉｃｓが行った）は、ＳＯＲＤバリアントの分離を確認した。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を、Ｖｅｒｉｔｉ Ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ）で行い、Ｐｌａｔｉｎｕｍ Ｔａｑ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して、標的変異を含む領域を増幅した。以下のプライマーを使用して、ＳＯＲ２ＰではなくＳＯＲＤを特異的に標的とした（図１０）。

【００６４】

線維芽細胞培養

線維芽細胞を患者から得て、１０％ ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、ペニシリンおよびストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中で培養した。細胞を、５％ CO_2 中、３７℃で加湿インキュベーターの中で維持した。非同期細胞培養物を、およそ８０％コンフルエントになるまで成長させ、エパルレスタット（１００μＭ）、ラニレスタット（１０μＭ）またはＤＭＳＯで７２時間

処理した。上記薬物またはＤＭＳＯを含む培地を、２４時間ごとに交換した。

【００６５】

ウェスタンブロット

線維芽細胞を、プロテアーゼインヒビター（Ｒｏｃｈｅ）を含むＲＩＰＡ緩衝液（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中で溶解し、５分間、Ｂｉｏｒｕｐｔｏｒ超音波デバイス（Ｄｉａｇｅｎｏｄｅ）で超音波処理した。細胞溶解物を１３，０００×ｇで１０分間、４℃において遠心分離し、その上清を、タンパク質定量（Ｐｉｅｒｃｅ ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ）のために集めた。３０μｇのタンパク質サンプルを、Ｂｏｌｔ ＬＤＳサンプル緩衝液およびサンプル還元剤（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）と混合し、９０℃で５分間加熱した。サンプルを、Ｂｏｌｔ ４－１２％ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ Ｐｌｕｓ ミニゲルにロードし、続いて、ニトロセルロース膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に転写した。膜を５％ 無脂肪乳でブロッキングし、抗ＳＯＲＤ（ａｂ１８９２４８， Ａｂｃａｍ）抗体とともに２時間インキュベートし、０．０１％ Ｔｗｅｅｎ（登録商標） ２０を含むＴＢＳ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で洗浄し、二次抗ウサギ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）とともにインキュベートした。膜を、続いて、ＧＡＰＤＨ一次抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ）および二次抗マウス抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）とともにインキュベートした。化学発光検出を、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｐｉｃｏ ＰＬＵＳ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅで行い、ＦｌｕｏｒＣｈｅｍ Ｅ（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ）で画像化した。

【００６６】

ソルビトール測定

線維芽細胞を集め、ウェスタンブロットの節で記載されるように、プロテイナーゼインヒビターの非存在下で溶解した。ヒト線維芽細胞溶解物中のソルビトールの決定を、超高速液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析（ＵＰＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）（Ｗａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣ ＆ ＴＱＤ質量分析計－ Ｗａｔｅｒｓ， Ｍｉｌｆｏｒｄ， ＭＡ， ＵＳＡ）で行った。線維芽細胞を集め、ウェスタンブロットの節で記載されるように、プロテイナーゼインヒビターの非存在下で溶解した。プロテイナーゼインヒビターは、高濃度マンニトール（マンニトールはソルビトールのエナンチオマーである）を含み、ＵＰＬＣ－ＭＳ／ＭＳソルビトール決定に干渉する可能性がある。溶解物サンプルは、ＵＰＬＣに注入（３μＬ）する前に、アセトニトリル（１：５）でタンパク質沈殿およびアセトニトリル－水（５０／５０）での１０倍希釈、およびＯａｓｉｓ ＨＬＢカートリッジでのクリーンアップ（１０ｍｇ／１ｍｌ）を受けた。ＵＰＬＣ条件： カラム，８８℃でＢＥＨ Ａｍｉｄｅ １．７μｍ（２．１×１００ｍｍ）、溶離液Ａ， アセトニトリル ９０％－水 ５％－イソプロパノール ５％、溶離液Ｂ， アセトニトリル ８０％－水２０％、勾配溶離０分， １００％ Ａ、３．６分 １００％ Ｂ、流速 ０．４５ｍｌ／分。ソルビトールの保持時間は、２．７分であった。ＭＳ／ＭＳ条件： インターフェース， 陰イオンモードにおいてエレクトロスプレーインターフェース、多重反応モニタリング収集（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ ａｃｑｕｉｓｉｔｉｏｎ）， ｍ／ｚ １８０．９→８８．９（ＣＶ ２４， ＣＥ １５）。

【００６７】

空腹時ソルビトールレベル検査のために、一晩絶食（最後の食事は前夜）後に、血清分離チューブの中に血液を集めた。サンプルを、５００ｇで１０分間遠心分離した。血清を分離し、採血から１時間以内に凍結した。ソルビトールレベルを、Ｌｉｓ． Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ． ２００９ Ｏｃｔ ２；３８７（４）：７７８－８３から修正した方法を使用して、ＵＰＬＣによって検査した。条件は以下のとおりであった： カラム， ＢＥＨ Ａｍｉｄｅ １．７μｍを２５℃で（４５℃の代わりに）維持； 溶離液Ａ， １０ｍＭ 酢酸アンモニウム ｐＨ１０； 溶離液Ｂ， アセトニトリル、流速， ０．６ｍｌ／分で２０回の同じ勾配。ソルビトールの保持時間は、６．０分であった。ＭＳ／ＭＳ条件は、線維芽細胞分析のものと同じであった。血清サンプルは、ＵＰＬＣに注入（３μＬ）する前に、冷メタノール（１：５）でタンパク質沈

殿、アセトニトリル－水（５０／５０）で５倍希釈およびＯａｓｉｓ　ＨＬＢカートリッジでクリーンアップ（１０ｍｇ／１ｍｌ）を受けた。較正曲線を、ソルビトール濃度範囲０．１～２０ｍｇ／Ｌにおいて血清中で作成した。

【００６８】

Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａストックおよび遺伝学

特定されなければ、全てのハエは、コーンミール－糖蜜－酵母培地上で、２５℃で６５％湿度において、１２時間明／１２時間暗サイクルで維持した。この試験において使用した以下のハエ系統は、Ｂｌｏｏｍｉｎｇｔｏｎ　Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｓｔｏｃｋ　Ｃｅｎｔｅｒから得た：　ｅｌａｖ^{Ｃ１５５}－ＧＡＬ４、ＧＭＲ－ＧＡＬ４，　Ｓｄｈ２^{ＭＢ０１２６５}、ＵＡＳ－Ｓｄｈ１ＲＮＡｉ、およびＵＡＳ－Ｓｄｈ２ＲＮＡｉ。

【００６９】

薬物供給

エパルレスタットまたはラニレスタットを、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）中に溶解してストック濃度　１０ｍｇ／ｍｌを達成し、次いで、１０ｍｌ　ハエ飼料の中に最終濃度８０μｇ／ｍｌで混合した。コントロールとして、等量のＤＭＳＯをハエ飼料の中に混合した。供給する前に、バイアルを室温で１２時間乾燥させた。

【００７０】

Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ寿命アッセイおよび負の走地性アッセイ

寿命アッセイに関しては、各群の１００匹の新たに閉じ込めた雌性ハエを集め、２０の個体のバイアルに入れた。ハエを２日ごとに新たなバイアルの中に移し、死んだハエの数を計数した。生存データを、カプラン－マイアープロットを使用してプロットし、ログランク検定を使用して群間比較を行った。負の走地性行動アッセイ（negative geotaxis behavior assay）に関しては、１０匹の年齢を合わせた雌性ハエを、底から８ｃｍ上に黒の水平線を引いて印を付けたバイアルの中に入れた。ハエに、$ＣＯ_2$麻酔から完全回復するために６０分間を与え、底面を穏やかにタップして、１０秒間を与えて登らせた。８ｃｍの線を越えたハエを計数した。各バイアルに関して、このアッセイを１０回反復し、各群１０個の独立したバイアル（１群あたり合計１００匹のハエ）を試験した。観察者期待バイアスを最小限にするために、このアッセイは、実験者には群割り当てを盲検にして行われた。

【００７１】

Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ脳解剖、免疫染色、および共焦点顕微鏡検査

脳解剖および染色を、以前に記載されるように行った（Ｂｒａｚｉｌｌら．，　Ｊ　Ｖｉｓ　Ｅｘｐ．　２０１８；（１３８））。簡潔には、ハエの脳を、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ，　ｐＨ　７．４）中で解剖し、４％　ホルムアルデヒド中で１０分間固定し、ＰＢＴＸ（０．４％　ｖ／ｖ　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むＰＢＳ）中で３回（各１５分間）洗浄した。次いで、脳を、５％　正常ヤギ血清を含む０．４％　ＰＢＴＸ中で１：２５０希釈した一次マウス抗ＢＲＰ抗体（ｎｃ８２，　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｂａｎｋ）とともに４℃で一晩、穏やかに振盪しながらインキュベートした。その後、脳を、１：２５０希釈したＣｙ３コンジュゲート抗マウス二次抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ）およびＣｙ５コンジュゲート抗ＨＲＰ（ＪａｃｋｓｏｎＩｍｍｕｎｏＬａｂ）とともに、４℃で一晩、穏やかに振盪しながらインキュベートし、続いて、４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ，　１：３００，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）染色を室温で１０分間行った。サンプルを、ガラススライド上にＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ　Ａｎｔｉｆａｄｅ　Ｍｏｕｎｔｉｎｇ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．）とともに載せた。ハエの脳スライドを、スキャン速度８．０μｓ／画素および空間分解能１０２４×１０２４画素で、６０×油浸対物レンズ付きのＯｌｙｍｐｕｓ　ＩＸ８１共焦点顕微鏡を使用して撮像した。画像を処理し、ＦｌｕｏＶｉｅｗ　１０－ＡＳＷ（Ｏｌｙｍｐｕｓ）を使用して分析した。

【００７２】

本開示のさらなる局面および詳細は、以下の実施例から明らかであり、この実施例は、例

証であって限定ではないことが意図される。

【００７３】

実施例１： ＧＥＮＥＳＩＳ分析を使用するＣＭＴにおけるＤＮＡバリアントの同定

遺伝性ニューロパチー（シャルコー・マリー・トゥース病（ＣＭＴ）を含む）は、末梢神経に影響を及ぼす臨床上および遺伝的に不均一な状態に関する包括的概念を表す。ＣＭＴは、伝導速度に応じて、脱髄型（ＣＭＴ１）および軸索型（ＣＭＴ２）として分類される。遠位型遺伝性運動ニューロパチー（ｄＨＭＮ）は、疾病負荷が主にまたは専ら運動神経にかかるＣＭＴ２の一形態を表す（Ｒｏｓｓｏｒ， Ｔｏｍａｓｅｌｌｉ， ａｎｄ Ｒｅｉｌｌｙ ２０１６）。症例のうちの９０％超が既知の遺伝子における変異を有するＣＭＴ１とは対照的に、ＣＭＴ２および遠位型ＨＭＮ患者のうちの２０～３０％が、遺伝子診断を受けるに過ぎない（Ｆｒｉｄｍａｎら． ２０１５）。ＣＭＴ２およびｄＨＭＮ症例のうちの７０％までが散発性であることから、１つの症例の全エキソームおよびゲノム配列から候補の病原性遺伝子を同定することはより困難になる；従って、大きな集合的データセットが必要である。ＧＥＮＥＳＩＳ分析プラットフォームで利用可能な１，１００を超えるＣＭＴ全エキソームシーケンシング（ＷＥＳ）および全ゲノムシーケンシング（ＷＧＳ）のデータ集約を使用することで、このような高品質データの最大の収集が利用可能になった（Ｇｏｎｚａｌｅｚら． ２０１５）。複数の家族に存在する有意なＤＮＡバリアントを有する遺伝子を、ＣＭＴ症例で大きな比率を占める個々のアレルと同様に同定した。＞３家族によって共有されかつｇｎｏｍＡＤコントロールデータベースにおけるマイナーアレル頻度＜１％を有する遺伝子における劣性のナンセンスバリアントに関して、５９８名の診断されていないＣＭＴ患者の部分セットを問い合わせする場合に、１２症例を、ＳＯＲＤにおいてホモ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）変異を有する１１の血縁でない家族から同定した。血縁でない３家族からさらに４症例が、ヘテロ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）バリアントを、第２のバリアント、家族２ではｃ．２９８Ｃ＞Ｔ； ｐ．（Ａｒｇ１００Ｔｅｒ）、家族３ではｃ．３２９Ｇ＞Ｃ； ｐ．（Ａｒｇ１１０Ｐｒｏ）、ならびに家族１４のＩＩ－１およびＩＩ－２ではｃ．４５８Ｃ＞Ａ； ｐ．（Ａｌａ１５３Ａｓｐ）と一緒に有した（図１Ａ～Ｄおよび図５）。全ての変異は、ｃ．３２９Ｇ＞Ｃ； ｐ．（Ａｒｇ１１０Ｐｒｏ）を除いて、機能喪失型（ＬＯＦ）アレルを表した。興味深いことに、Ａｒｇ１１０Ｐｒｏ変化は、以前に報告した、Ｔｙｒ１１１Ｐｈｅ（ラットにおけるＴｙｒ１１０Ｐｈｅに相当）（これは、ＳＯＲＤ酵素活性を消滅させ、タンパク質を不安定化することが示された（Ｈｅｌｌｇｒｅｎら． ２００７））に隣り合っている。

【００７４】

興味深いことに、ＳＯＲＤは、非機能的な高度に相同性のパラログ、偽遺伝子ＳＯＲＤ２Ｐを有し、この偽遺伝子は、第１５染色体上の０．５Ｍｂ領域内でのＳＯＲＤの重複から生じると考えられる（Ｃａｒｒら． ２０１６）（図１Ｅ）。Ｓａｎｇｅｒ確認試験においてＳＯＲＤ２Ｐではなく、ＳＯＲＤを特異的に増幅するために、プライマーを、両方の遺伝子領域においてヌクレオチド配列差異および別個のレトロトランスポゾン挿入を利用してデザインした（図５）。顕著なことには、ＳＯＲＤのエキソン７におけるｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）変異は、多くのさらなるエキソンインデル変異（これは、ＳＯＰＲ２Ｐの効果的な翻訳を防止する（１０００ Ｇｅｎｏｍｅｓ Ｐｒｏｊｅｃｔ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍら． ２０１５； Ｌｅｋら． ２０１６））とともに、コントロール染色体の９５％超において偽遺伝子ＳＯＲＰ２Ｐの中に固定される。上記領域の高い類似性が原因で、ネスト化ＰＣＲアプローチは、ＳＯＲＤのエキソン７の特異的増幅を得、それをＳＯＲＤ２Ｐにおける相同領域から区別することが必要であった。ＷＥＳによって検出されたバリアントの存在は、Ｓａｎｇｅｒシーケンシングによって全症例で確認され、直近親族のキャリアにおける分離データを提供した（図１Ｆおよび図５）。

【００７５】

（ロンドン（ＵＫ）のＵＣＬ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ）での１

０３の未解明のＣＭＴ２／ｄＨＭＮ症例のＷＥＳの独立したセットをスクリーニングした。血縁でない６家族から、ＳＯＲＤにおいてホモ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）変異を有する９症例を同定した（８．７％）。２９７名の劣性または散発性のＣＭＴ２／ｄＨＭＮ患者の第３の独立したセットを、ＳＯＲＤのエキソン７の標的化Ｓａｎｇｅｒシーケンシングによってスクリーニングし、これを、１つのｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）が同定された場合に他のコードエキソンに拡げたところ、ＳＯＲＤにおいて両アレル変異を有する１８家族から２０の追加症例（７％）が明らかになった：１６症例は、ホモ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）変異を有し、４症例は、ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）を、第２のおそらく病原性バリアントとの複合性ヘテロ接合性状態において有する。後者は、家族２９においてｃ．９６４Ｇ＞Ａ；　ｐ．（Ｖａｌ３２２Ｉｌｅ）を、家族３０においてエキソン４中の２７５ｂｐ欠失　ｃ．３１６＿４２５＋１６５ｄｅｌを、家族３２において新規なｃ．２８Ｃ＞Ｔ；　ｐ．（Ｌｅｕ１０Ｐｈｅ）を、および家族３３においてｃ．８９５Ｃ＞Ｔ；　ｐ．（Ａｒｇ２９９Ｔｅｒ）を含んだ。全ての変化は、ｇｎｏｍＡＤにおいてマイナーアレル頻度（ＭＡＦ）＜０．０００１を有する（Ｌｅｋら．　２０１６）。ミスセンス変異によって影響を及ぼされた残基は、３より大きいＧＥＲＰスコアを有する複数の種にわたって高度に保存されている（図１Ｄ）。さらに、ＳＯＲＤにおける両アレルのナンセンスバリアントは、ＧＥＮＥＳＩＳデータベースの中に存在するＣＭＴ以外の別個の神経学的障害に罹患した４，５９８の指標症例には存在しなかった。

【００７６】

正常集団におけるｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）バリアントのアレルキャリア頻度は、ｇｎｏｍＡＤゲノムの中の３０，８７２のうち９４というアレル数に基づいて０．００３％である（Ｌｅｋら．　２０１６）。注目すべきは、ｇｎｏｍＡＤエキソームセットは、ランダムフォレストフィルターを通過しなかったことに起因して、ＭＡＦ＝０．０００００８において有意に低い割合でｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）変化を検出した。ＧＥＮＥＳＩＳは、バリアントコーリングにＦｒｅｅＢａｙｅｓソフトウェアを使用する（Ｇｏｎｚａｌｅｚら．　２０１５）。これは、ｇｎｏｍＡＤゲノムベースのコールセット（ＭＡＦＧＥＮＥＳＩＳ＝０．００２、９，１９６のうち２２）により近いアレル頻度を生じた可能性がある。６００の健常コントロールのＳａｎｇｅｒシーケンシングを行い（欧州起源の２００のサンプル、トルコ起源の１００のサンプル、および中東起源の２００のサンプルを含む）、３つのヘテロ接合性を同定したが、ホモ接合性、ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）アレルは同定されなかった（ＭＡＦ＝０．００２５）。これらの計算は、約１／１００，０００個体というホモ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）アレル単独の予測有症率を裏付け、このことは、そのアレルを軸索型ニューロパチーにおいて最も一般的な個々の病原性アレルかつ任意のメンデル疾患の最も一般的なアレルのうちの１つにしている。

【００７７】

血縁でない３８家族から、遺伝性ニューロパチーに冒された全４５名の個体を本試験においてＳＯＲＤにおいて両アレル変異を有すると同定した（図１１および１２）。注目すべきは、症例のうちの７１％が、家族歴または血族の証拠もない散発性であった。正式の臨床診断は、症例のうちの５１％（ｎ＝１６）において軸索型ＣＭＴ、４０％（ｎ＝１８）において遠位型ＨＭＮ、および９％（ｎ＝４）において中間型ＣＭＴであてた。ニューロパチーの平均発症年齢は、１７±８歳であり、歩行困難が、発症時の最も共通する主訴であった。運動発達のマイルストーンの遅滞は希であったが、患者のうちの２／３が、足の変形を報告した。これは、ニューロパチーが、おそらく人生の早い時期に始まったことを示す。最初の試験において、全個体が、四肢の虚弱を有したが、半数のみが感覚障害を示した。虚弱は、上肢遠位において軽度であり、下肢遠位では、軽度からほぼ完全な麻痺までの範囲に及んだ。上肢および下肢の近位の筋は、代表的には影響を及ぼされていなかっ

た。７名の患者は上肢の振戦を有し、４名は軽度側弯症を有し、２名は軽度難聴を有した。１症例は、同時の、おそらく関連のない、異形成顔貌（ｄｙｓｍｏｒｐｈｉｃ ｆｅａｔｕｒｅｓ）、３歳齢以来の非進行性の精神遅滞、および脳ＭＲＩで小脳萎縮の証拠がある痙性運動失調を含む症候性の障害を有した。患者はいずれも、白内障も他の器官の関与もなかった。ＣＭＴニューロパチースコアによれば、ニューロパチーは、６７％（ｎ＝３０）が軽度、３１％（ｎ＝１４）が中程度、および１症例が重度であった。患者のうちの４２％（ｎ＝１９）が、歩行時に足を支えるために短下肢装具を必要とし、１名の患者は、片側の支持を必要とし、１名の患者は、車椅子に依存した。詳細な神経伝導試験は、４２名の患者において利用可能であり、常に運動性軸索型ニューロパチーを示し、２６％（ｎ＝１１）では中程度の神経伝導速度の低下および２６％（ｎ＝６５）では感覚活動電位の低下が伴った。

【００７８】

実施例２： ヒト線維芽細胞におけるＳＯＲＤタンパク質発現および血中のＳＯＲＤレベルの評価

ソルビトールデヒドロゲナーゼは、３８ｋＤａサブユニットのホモテトラマー酵素であり、これは、哺乳動物組織において広く分布している（Ｊｏｈａｎｓｓｏｎら． ２００１； Ｈｅｌｌｇｒｅｎら． ２００７； Ｌｉｎｄｓｔａｄ， Ｔｅｉｇｅｎ， ａｎｄ Ｓｋｊｅｌｄａｌ ２０１３）。それは、２段階ポリオール経路の第２の酵素を表し、その経路においてグルコースは、酵素アルドースレダクターゼ（ＡＲ）によって、比較的非代謝性の糖であるソルビトールに変換される。次いで、ソルビトールは、ＳＯＲＤによってフルクトースへと酸化される（図２Ａ）。さらなる洞察をＳＯＲＤにおける劣性変異の機能的結論へと集めるために、次のＳＯＲＤ発現を、ホモ接合性ｃ．７５７ｄｅｌＧ；ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）（ｎ＝４）またはｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）およびｃ．８９５Ｃ＞Ｔ； ｐ．（Ａｒｇ２９９Ｔｅｒ）（ｎ＝１）バリアントを有する血縁でない５名の罹患被験体、ならびにヘテロ接合性状態においてｃ．７５７ｄｅｌＧ； ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）の２名の非罹患キャリアに由来する線維芽細胞において評価した。ＳＯＲＤタンパク質は、全患者において存在せず、野生型レベルは、コントロールと比較して、非罹患キャリアにおいて低減した（図２Ｂ）。よって、細胞内ソルビトール濃度は、ＳＯＲＤ酵素活性の喪失と一致して、コントロールと比較して患者の線維芽細胞において１０倍を超えて高かった（図２Ｃ）。ホモ接合性ｐ．Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７変異を有する１０名の患者および血縁でない１０名のコントロールに由来する血清中の空腹時ソルビトールレベルを決定したところ、１００倍を超えて高い（１４．８２±０．７８０ 対 ０．０４６±０．００４ｍｇ／Ｌ， ｐ＜０．０００１）ことが見出された。これは、患者においてＳＯＲＤ酵素活性を欠いていることを確認する（図１３）。この試験はまた、ソルビトールが、哺乳動物被験体においてＳＯＲＤ変異と関連する遺伝性ニューロパチーを検出または特徴づけるために有用なマーカーであることを示す。

【００７９】

実施例３： ＳＯＲＤ欠損症のモデルにおけるＳＯＲＤ変異の調査

ＳＯＲＤ変異の病態生理をインビボでさらに調査するために、ＳＯＲＤ欠損症のＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒモデルを樹立した。Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａは、９０％ 残基同一性を共有する２つの機能的ＳＯＲＤ遺伝子（Ｓｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２）を有する（Ｌｕｑｕｅら． １９９８）。ＳＯＲＤは、遠い系統間で保存されており、ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）Ｓｏｄｈ１（ＮＰ＿００１２８７２０３．１）およびＳｏｄｈ２（ＮＣＢＩ参照配列： ＮＰ＿５２４３１１．１）によってコードされるタンパク質は、ヒトＳＯＲＤタンパク質（ＮＣＢＩ参照配列： ＮＰ＿００３０９５．２（配列番号４６））と、それぞれ、７５％および７３％の同一性を共有する。Ｓｏｄｈ２の変異型アレルは、その遺伝子がトランスポゾンＭｉｎｏｓ媒介性組み込みカセット（ＭｉＭＩＣ）挿入（Ｓｏｄｈ２^{ＭＢ０１２６５}）によって破壊される場合に得られる（Ｂｅｌｌｅｎら． ２０１１）。ホモ接合性Ｓｏｄｈ２（Ｓｏｄｈ２^{ＭＢ０１２６５}／

ＭＢ０１２６５）変異体は、正常の寿命で生存できる。神経変性性表現型を特徴づけるために、そのＤｒｏｓｏｐｈｉｌａの視覚系を使用して、微細なニューロンおよびシナプスの病理的変化のインビボ検出を可能にする複眼の高度に組織化された平行軸索を利用した（Ｂａｕｓｅｎｗｅｉｎ，　Ｄｉｔｔｒｉｃｈ，　ａｎｄ　Ｆｉｓｃｈｂａｃｈ　１９９２）。外側の光受容体軸索は、視葉板皮質を横断し、視葉板の層における視葉板の単極性ニューロンとのシナプス接続を作る（図３Ａ）。羽化後２日（ＤＡＥ）のコントロールハエ（ｙｗ）において、光受容体シナプスの組織化された視葉板カートリッジが、それぞれ、ｘｙ面およびｘｚ面において可視化され得る（図３Ｂ）。Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５変異体の視葉板層における光受容体末端の喪失は、羽化後２日（ＤＡＥ）で観察された（図３Ｃ）。その表現型は、１０　ＤＡＥで進行性に重篤になり、空胞は、数がより多く、サイズがより大きくなり、シナプス視葉板層にわたって分布した（図３Ｃ、Ｄ）。これらの空胞は、ニューロン膜の喪失（ＨＲＰ標識によって顕著）、およびＢｒｕｃｈｐｉｌｏｔ（ＢＲＰ、シナプス活性ゾーンサイトマトリクスタンパク質）標識の減少を示した。これは、シナプス変性を示す（図３Ｃ、Ｄ）。本明細書で記載される所見を検証するために、第２のＳＯＲＤモデルを、汎ニューロン駆動因子ｅｌａｖＣ１５５を使用して、ニューロンにおけるＳｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２の両方の発現の特異的ノックダウンによって生成した。Ｓｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２の両方の喪失は、ホモ接合性Ｓｏｄｈ２（Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５）のものと同様に、年齢依存性シナプス変性を生じた（図６）。Ｓｏｄｈ２における機能を全身的に喪失した、ＳＯＲＤ欠損症の行動表現型Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５　ホモ接合性ハエを特徴付けたところ、これらのハエは、正常寿命を示したが、それらの自発運動活性は、後期ステージ（４０　ＤＡＥ）において有意に損なわれた（図３Ｅ、Ｆ）。これは、遺伝性ニューロパチーを思い起こさせる進行性の年齢依存性神経筋機能障害を示した。さらに、ソルビトールレベルを１０　ＤＡＥにおいてハエの頭部で測定したところ、患者線維芽細胞における観察と一致して、Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５モデルにおいて有意な増加を観察した（図４Ｂ）。まとめると、ＳＯＲＤ欠損症のＤｒｏｓｏｐｈｉｌａモデルは、成功裡に樹立され、（１）正常寿命、（２）進行性かつ年齢依存性のシナプス変性および自発運動欠陥、ならびに（３）増加したソルビトールレベルを含め、ヒト患者における代表的病的表現型を再現した。

【００８０】

作用機序および既知の酵素経路として機能喪失を確立した後に、ＳＯＲＤ関連遺伝性ニューロパチーの処置選択肢を調査した。アルドースレダクターゼ（ＳＯＲＤの上流にある酵素）の薬理学的阻害が、糖尿病の細胞モデルおよび動物モデル（Ｋｉｋｋａｗａら．　１９８３；　Ｍａｔｓｕｍｏｔｏら．　２００８；　Ｒａｍｉｒｅｚ　ａｎｄ　Ｂｏｒｊａ　２００８；　Ｈａｏら．　２０１５；　Ｇｒｅｗａｌら．　２０１６）、ならびに議論の余地はあるものの、同様にヒト（Ｃｈａｌｋ，　Ｂｅｎｓｔｅａｄ，　ａｎｄ　Ｍｏｏｒｅ　２００７；　Ｐｏｌｙｄｅｆｋｉｓら．　２０１５；　Ｓｅｋｉｇｕｃｈｉｓ．　２０１９）において毒性のソルビトール蓄積を低減する成功裡のストラテジーを表すことは、以前示された。２種の市販のアルドースレダクターゼインヒビター（ＡＲＩ）、エパルレスタットおよびラニレスタットの効果を、機能的ＳＯＲＤを欠いている患者線維芽細胞において細胞内ソルビトール蓄積に対して試験した。患者およびコントロールの線維芽細胞を、エパルレスタット（１００μＭ）またはラニレスタット（１０μＭ）の存在下または非存在下で７２時間成長させ、細胞内ソルビトールレベルを後に測定した。ＡＲＩであるエパルレスタットおよびラニレスタットはともに、ソルビトールの有意な低減を、コントロールに匹敵するレベルへと達成した（図４Ａ）。さらに、ＳＯＲＤのＤｒｏｓｏｐｈｉｌａモデルに、２　ＤＡＥにおいて開始してエパルレスタットおよびラニレスタットを供給した。ソルビトールレベルの有意な低減が、１０　ＤＡＥにおいてＳｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５ハエの頭部で観察された（図４Ｂ）。重要なことには、Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５ハエならびにＳｏｄｈ１およびＳｏｄｈ２の両方のニューロン特異的ノックダウンを有するハエの自発運動活性は、ｙｗコントロールハエの

レベルへと救済された（図４Ｃ、図７）。さらに、エパルレスタットまたはラニレスタット供給は、Ｓｏｄｈ２ＭＢ０１２６５／ＭＢ０１２６５変異型ハエにおける年齢依存性シナプス欠陥を回復させた。ＤＭＳＯビヒクル処置したハエでは、シナプス末端の喪失は、隣り合う空胞の拡大が、複数のシナプスカートリッジを含む融合した遙かに大きな空胞を生じた４０　ＤＡＥという高齢において非常に顕著であった（図４Ｄ）。著しくも、エパルレスタット／ラニレスタット供給は、空胞の数を低減し、１０　ＤＡＥおよび４０　ＤＡＥの両方において、シナプスサイトマトリクスタンパク質ＢＲＰの局在を回復させた（図４Ｅ～Ｇ）。

【００８１】

まとめると、ＳＯＲＤは、軸索型／中間型の、運動優勢型（ｍｏｔｏｒ　ｐｒｅｄｏｍｉｎａｎｔ）ＣＭＴを引きおこす新規な劣性遺伝子を表す。コホート由来のおよびコントロールデータベース由来の遺伝的データは、ＳＯＲＤにおける優勢な病原性バリアントであるｃ．７５７ｄｅｌＧ；　ｐ．（Ａｌａ２５３ＧｌｎｆｓＴｅｒ２７）（キャリア頻度は、集団において約３／１，０００個体）が、劣性のメンデル疾患を引きおこす最も一般的な特異的アレルのうちの１つを表し得ることを示唆する。実際に、診断されていないＣＭＴ２およびｄＨＭＮ症例における頻度は、約１０％までであるが、それは、遺伝性の軸索型ニューロパチーにおける診断ギャップの有意な割合をおそらく説明する。それらの頻度にもかかわらず、ＳＯＲＤにおける変異が、以前の研究によってＣＭＴの原因として同定されていなかったことは、好奇心をそそるものである。ヒトＳＯＲＤ２Ｐ遺伝子重複の存在は、機能的ＳＯＲＤにおけるバリアントの検出を妨げた可能性がある。なぜなら利用可能な註釈プログラムが、現在の次世代シーケンシング技術によって生成される１５０～３００ｂｐ長のリードの特有のマッピングに高度に依存するからである。他の公知の病原性バリアントは、偽遺伝子の存在によって隠されていることが以前示された（Ｄｅ　Ｖｏｓら．　２００４）。ＳＯＲＤ変異の病原性は、ＳＯＲＤタンパク質の非存在および細胞内ソルビトール蓄積を示した患者由来の線維芽細胞のインビトロデータによってさらに裏付けられる。２つのインビボＤｒｏｓｏｐｈｉｌａモデルは、進行性のシナプス変性および運動障害、ＳＯＲＤ欠損症、および増加したソルビトールレベルを有するヒト表現型を再現した。

【００８２】

本明細書で記載される試験は、酵素の機能喪失およびその後のソルビトール蓄積が、ＳＯＲＤ関連ＣＭＴの作用機序であることを示す。糖尿病の細胞モデルおよび動物モデルにおける以前の研究は、増加したポリオール流入と細胞内ソルビトール蓄積とが、細胞の容量オスモル濃度の増加、酸化的ストレスおよび減少したＮＡＤＰＨレベルに平行しており、これらが全て、末梢神経に対して有害な効果を有し得ることを示した（Ｓｃｈｍｉｄｔら．　２００１；　Ｏｂｒｏｓｏｖａ　２００５；　Ｓａｎｇｏら．　２００６）。しかし、イントロンスプライシング変異に起因して低減したレベルのＳＯＲＤタンパク質を発現する成体Ｃ５７ＢＬ／ＬｉＡマウスに対する以前の研究から、明白な神経学的欠陥は同定されなかった（Ｈｏｌｍｅｓ，　Ｄｕｌｅｙ，　ａｎｄ　Ｈｉｌｇｅｒｓ　１９８２；　Ｌｅｅ，　Ｃｈｕｎｇ，　ａｎｄ　Ｃｈｕｎｇ　１９９５；　Ｎｇら．　１９９８）。患者臨床データおよびハエにおける後期発症型表現型に基づくと、加齢しているＣ５７ＢＬ／ＬｉＡマウスに対する観察を拡張するか、または完全ノックアウトＳＯＲＤマウスもしくはラットモデルを作製することは、重要である。その研究はさらに、正常血糖状態における末梢神経代謝および生存におけるポリオール経路の中心的役割を解明する。細胞内ソルビトール蓄積が末梢神経の選択的変性をもたらし得る機序は未知であるが、この試験における患者由来細胞の増加したソルビトールレベルの観察には、基質低減、遺伝子置換または矯正、およびＳＯＲＤ酵素置換のための方法を含め、疾患の成体マーカーとして、および将来的な治療的介入の標的としての両方の有望な暗示がある。よって、ヒト由来細胞およびＤｒｏｓｏｐｈｉｌａモデルにおけるＡＲＩ適用を介して基質低減の有益な効果を示す前臨床試験が、本明細書で開示される。エパルレスタットは現在、糖尿病合併症の処置のために数カ国において市場で販売されている（Ｇｒｅｗａｌら．　２０１６）。その

一方で、ラニレスタットは、臨床試験の後期ステージに進んでいる（Ｐｏｌｙｄｅｆｋｉｓら．２０１５；Ｓｅｋｉｇｕｃｈｉら．２０１９）。

【００８３】

参考文献

【００８４】

Auton, et al. 1000 Genomes Project Consortium, 2015. “A Global Reference for Human Genetic Variation.” Nature 526 (7571): 68－74.

【００８５】

Bausenwein, et al. 1992. “The Optic Lobe of Drosophila Melanogaster. II. Sorting of Retinotopic Pathways in the Medulla.” Cell and Tissue Research 267 (1): 17－28.

【００８６】

Bellen, et al. 2011. “The Drosophila Gene Disruption Project: Progress Using Transposons with Distinctive Site Specificities.” Genetics 188 (3): 731－43.

【００８７】

Brazill, et al. 2018. “Quantitative Cell Biology of Neurodegeneration in Drosophila Through Unbiased Analysis of Fluorescently Tagged Proteins Using ImageJ.” Journal of Visualized Experiments: JoVE, no. 138 (03).

【００８８】

Callaghan, et al. 2012. “Diabetic Neuropathy: Clinical Manifestations and Current Treatments.” The Lancet. Neurology 11 (6): 521－34.

【００８９】

Carr, et al. 2016. “A Study of the Neuropathy Associated with Transthyretin Amyloidosis (ATTR) in the UK.” Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry 87 (6): 620－27.

【００９０】

Chalk, et al. 2007. “Aldose Reductase Inhibitors for the Treatment of Diabetic Polyneuropathy.” The Cochrane Database of Systematic Reviews, no. 4 (October): CD004572.

【００９１】

De Vos, et al. 2004. “Novel PMS2 Pseudogenes Can Conceal Recessive Mutations Causing a Distinctive Childhood Cancer Syndrome.” American Journal of Human Genetics 74 (5): 954－64.

【００９２】

Dyck, et al. 1993. “The Prevalence by Staged Severity of Various Types of Diabetic Neuropathy, Retinopathy, and Nephropathy in a Population-Based Cohort: The Rochester Diabetic Neuropathy Study.” Neurology 43 (4): 817－24.

【００９３】

Fridman, et al. 2015. “CMT Subtypes and Disease Burden in Patients Enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium Natural History Study: A Cross-Sectional Analysis.” Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry 86 (8): 873－78.

【００９４】

Gonzalez, et al. 2015. “Innovative Genomic Collaboration Using the GENESIS (GEM.App) Platform.” Human Mutation 36 (10): 950－56.

【００９５】

Grewal, et al. 2016. “Updates on Aldose Reductase Inhibitors for

Management of Diabetic Complications and Non-Diabetic Diseases." Mini Reviews in Medicinal Chemistry 16 (2): 120－62.
【００９６】
Hao, et al. 2015. "Hyperglycemia Promotes Schwann Cell De-Differentiation and De-Myelination via Sorbitol Accumulation and Igf1 Protein Down-Regulation." The Journal of Biological Chemistry 290 (28): 17106－15.
【００９７】
Hellgren, et al. 2007. "A Hydrogen-Bonding Network in Mammalian Sorbitol Dehydrogenase Stabilizes the Tetrameric State and Is Essential for the Catalytic Power." Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 64 (23): 3129－38.
【００９８】
Holmes, et al. 1982. "Sorbitol Dehydrogenase Genetics in the Mouse: A 'null' Mutant in a 'European' C57BL Strain." Animal Blood Groups and Biochemical Genetics 13 (4): 263－72.
【００９９】
Johansson, et al. 2001. "Crystal Structure of Sorbitol Dehydrogenase." Chemico-Biological Interactions 130－132 (1－3): 351－58.
【０１００】
Kikkawa, et al. 1983. "Effect of a New Aldose Reductase Inhibitor, (E)-3-Carboxymethyl-5-[(2E)-Methyl-3-Phenylpropenylidene]Rhodanine (ONO-2235) on Peripheral Nerve Disorders in Streptozotocin-Diabetic Rats." Diabetologia 24 (4): 290－92.
【０１０１】
Lee, et al. 1995. "Demonstration That Polyol Accumulation Is Responsible for Diabetic Cataract by the Use of Transgenic Mice Expressing the Aldose Reductase Gene in the Lens." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92 (7): 2780－84.
【０１０２】
Lek, et al. 2016. "Analysis of Protein-Coding Genetic Variation in 60,706 Humans." Nature 536 (7616): 285－91.
【０１０３】
Lindstad, et al. 2013. "Inhibition of Sorbitol Dehydrogenase by Nucleosides and Nucleotides." Biochemical and Biophysical Research Communications 435 (2): 202－8.
【０１０４】
Luque, et al. 1998. "Sorbitol Dehydrogenase of Drosophila. Gene, Protein, and Expression Data Show a Two-Gene System." The Journal of Biological Chemistry 273 (51): 34293－301.
【０１０５】
Matsumoto, et al. 2008. "Long-Term Treatment with Ranirestat (AS-3201), a Potent Aldose Reductase Inhibitor, Suppresses Diabetic Neuropathy and Cataract Formation in Rats." Journal of Pharmacological Sciences 107 (3): 340－48.
【０１０６】
Ng, et al. 1998. "Effects of Sorbitol Dehydrogenase Deficiency on Nerve Conduction in Experimental Diabetic Mice." Diabetes 47 (6): 961－66.

【０１０７】
Obrosova I. 2005. “Increased Sorbitol Pathway Activity Generates Oxidative Stress in Tissue Sites for Diabetic Complications.” Antioxidants & Redox Signaling 7 (11－12): 1543－52.
【０１０８】
Polydefkis, et al. 2015. “Safety and Efficacy of Ranirestat in Patients with Mild-to-Moderate Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy.” Journal of the Peripheral Nervous System: JPNS 20 (4): 363－71.
【０１０９】
Ramirez, et al. 2008. “Epalrestat: An Aldose Reductase Inhibitor for the Treatment of Diabetic Neuropathy.” Pharmacotherapy 28 (5): 646－55.
【０１１０】
Rossor, et al. 2016. “Recent Advances in the Genetic Neuropathies.” Current Opinion in Neurology 29 (5): 537－48.
【０１１１】
Sango, et al. 2006. “High Glucose-Induced Activation of the Polyol Pathway and Changes of Gene Expression Profiles in Immortalized Adult Mouse Schwann Cells IMS32.” Journal of Neurochemistry 98 (2): 446－58.
【０１１２】
Schmidt, et al. 2001. “Inhibition of Sorbitol Dehydrogenase Exacerbates Autonomic Neuropathy in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes.” Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 60 (12): 1153－69.
【０１１３】
Sekiguchi, et al. 2019. “Aldose Reductase Inhibitor Ranirestat Significantly Improves Nerve Conduction Velocity in Diabetic Polyneuropathy: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study in Japan.” Journal of Diabetes Investigation 10 (2): 466－74.

【図面】

【図１－１】

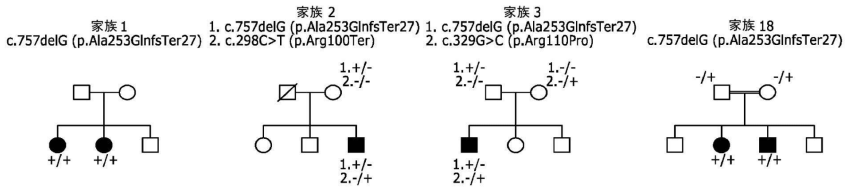

FIG. 1A

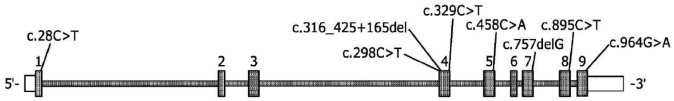

FIG. 1B

【図１－２】

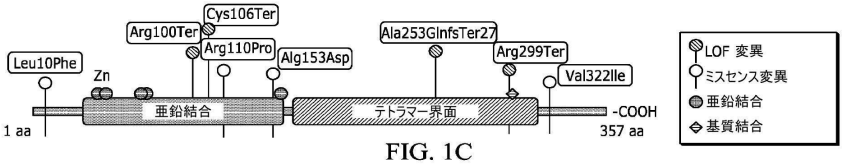

FIG. 1C

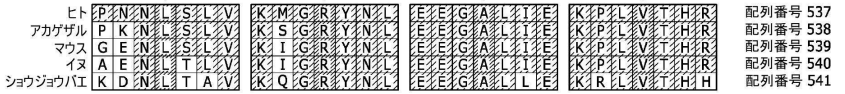

FIG. 1D

【図１－３】

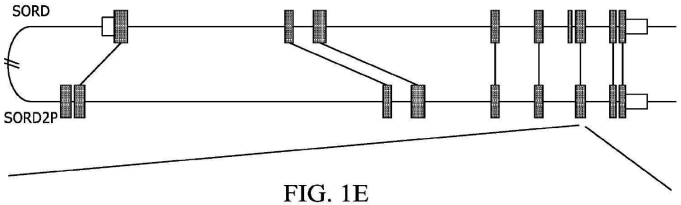

FIG. 1E

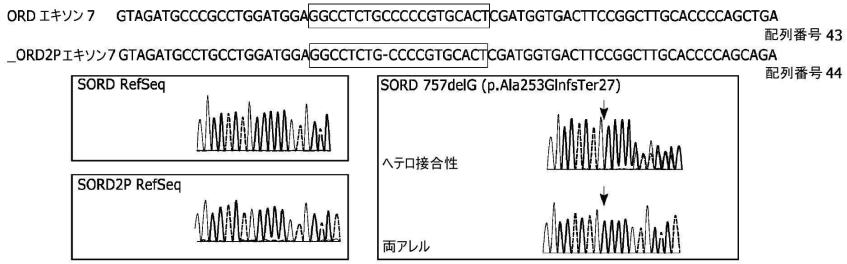

FIG. 1F

【図２】



FIG. 2A

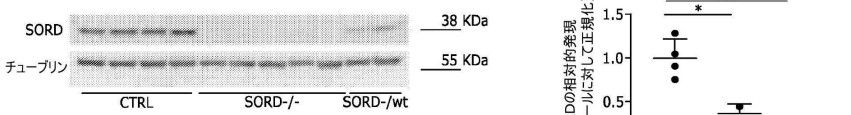

FIG. 2B

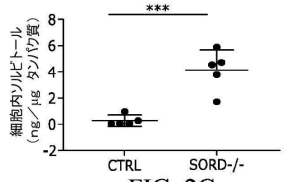

FIG. 2C

10 20 30 40 50

【図３－１】

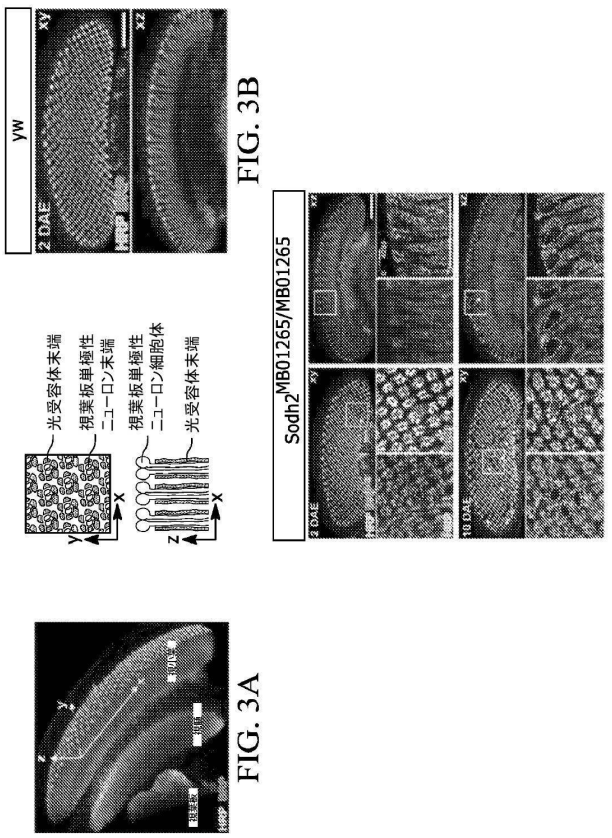

FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

【図３－２】

FIG. 3D

FIG. 3E

FIG. 3F

【図４－１】

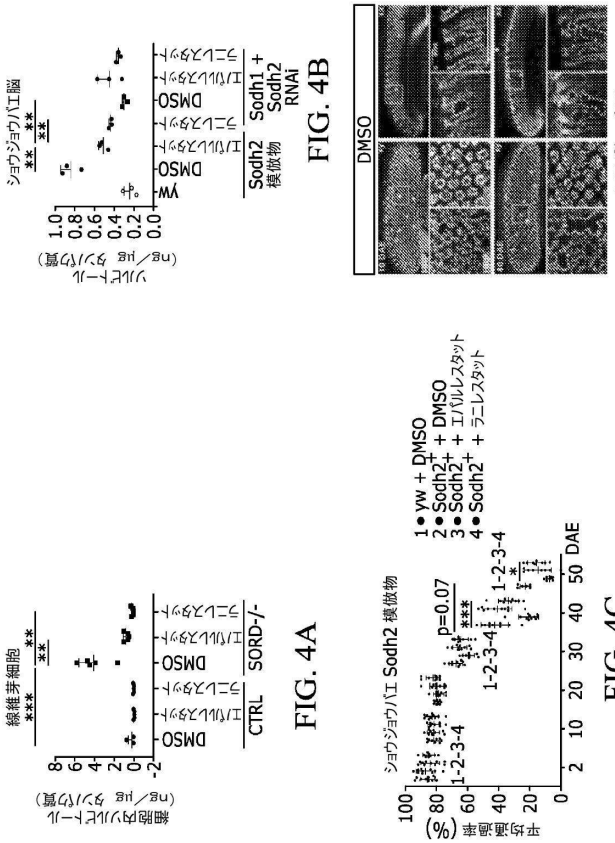

FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

FIG. 4D

【図４－２】

FIG. 4E

FIG. 4F

FIG. 4G

【図５－１】

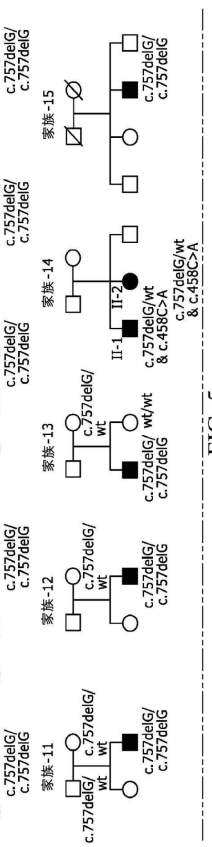

FIG. 5

【図５－２】

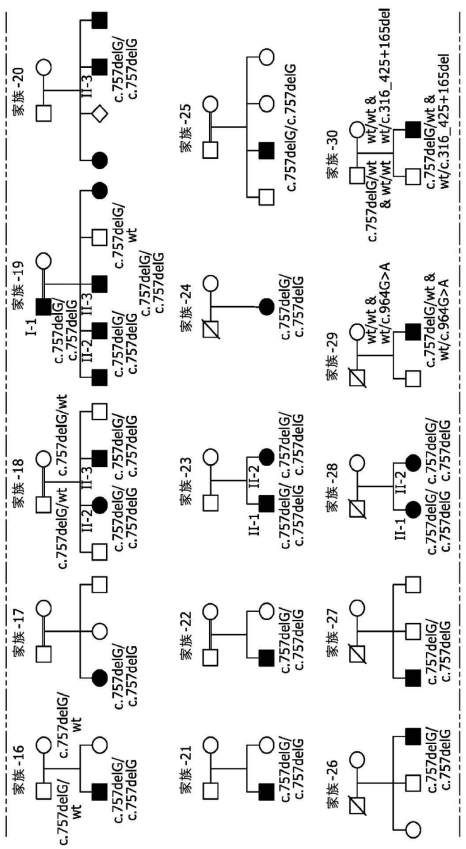

FIG. 5 続き

【図５－３】

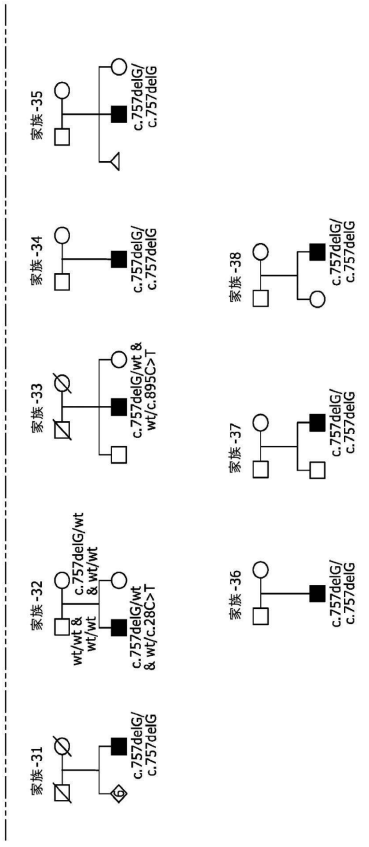

FIG. 5 続き

【図６】

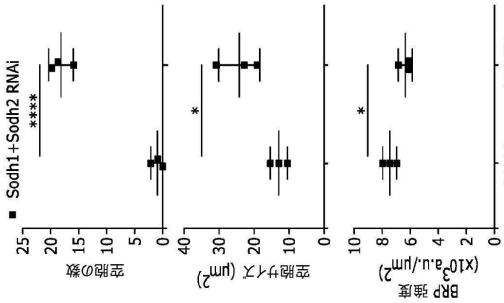

FIG. 6B

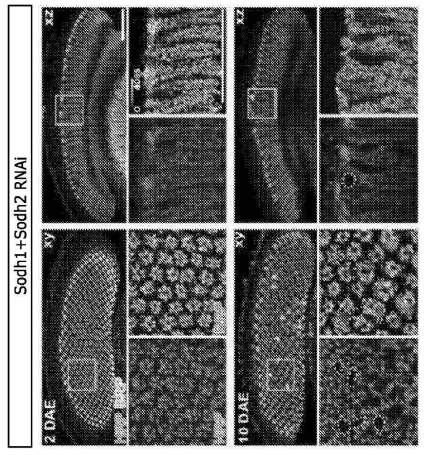

FIG. 6A

【図７】

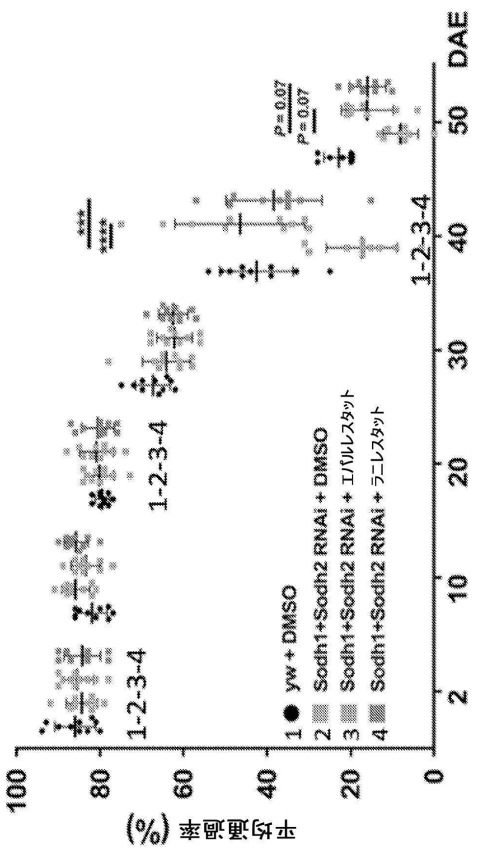

FIG. 7

【図８】

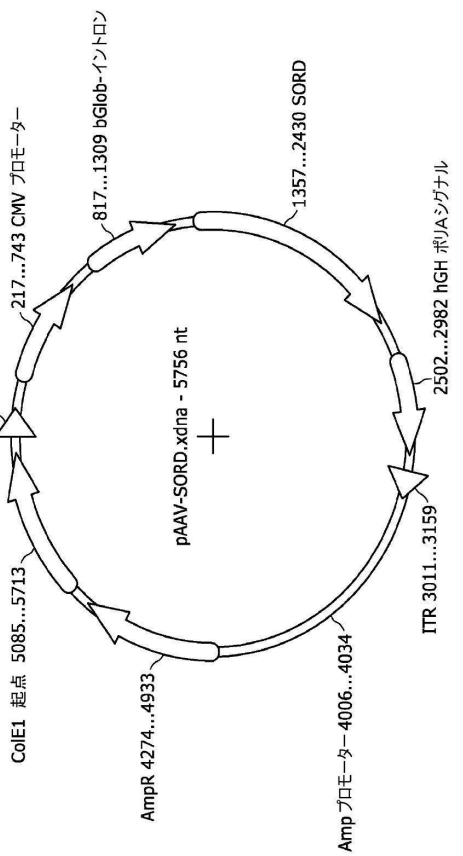

FIG. 8

【図９】

> [pAAV-SORD.xdna] - 5756 bp 配列番号 48

```
CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTGCGGCCGCACCGTCTAGT
TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGG
CCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGT
ACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC
TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC
TTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGAT
CCAGCCTCCGCGGAATTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTAC
CGCCTATAGAGTCTATAGGCCCACAAAAAATGCTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTT
CCCTAATCTCTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAA
TTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCAT
ATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCA
AGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGCT
GGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTCGAACATCGATTCCGAGGAGATCTGCCGCCGCGATCGCCGGCGCGCCATGG
CGGCGGCGGCGCCAAGCCCAACAACCTTTCCTGGTGGTGCACGGACGGGGGACTTGCGCCTGGAGAACTATCCTATCCCT
GAACCAGGCCCAAATGAGGTCTTGCTGAGGATGCATTCTGTTGGAATCTGTGGCTCAGATGTCCACTACTGGGAGTATGG
TCGAATTGGGAATTTTATTGTGAAAAGCCCATGGTGCTGGGACATGAAGCTTCGGGAACAGTCGAAAAAGTGGGATCAT
CGGTAAAGCACCTAAAACCAGGTGATCGTGTTGCCATCGAGCCTGGTGCTCCCCGAGAAAATGATGAATTCTGCAAGATG
GGCCGATACAATCTGTCACCTTCCATCTTCTTCTGTGCCACGCCCCCCGATGACGGGAACCTCTGCCGGTTCTATAAGCA
CAATGCAGCCTTTGTTACAAGCTTCCTGACAATGTCACCTTTGAGGAAGGGCGCCCTGATCGAGCCACTTCTGTGGGGA
TCCATGCCTGCAGGAGAGGCGAGGCTACCCTGGGACACAAGGTCCTTGTGTGGAGCTGGGCCAATCGGGATGGTCACT
TTGCTCGTGGCCAAAGCAATGGGAGCAGCTAAGTAGTGGTGACTGATCTGTCTGCTACCCGATTGTCCAAAGCCAAGGA
GATTGGGGCTGATTTAGTCCTCCAGATCTCCAAGGAGAGCCCTCAGGAAATCGCCAGGAAAGTAGAAGGTCAGCTGGGGT
GCAAGCCGGAAGTCACCATCGAGTGCACCGGGGGCAGAGGCCTCCATCCAGGCGGGCATCTACGCCACTCGCTCTGGTGGG
AACCTCGTGCTTGTGGGGCTGGGCTCTGAGATGACCACCGTACCCCTACTGCATGCAGCCATCCGGGAGGTGGATATCAA
GGGGCTGTTTCGATACTGCAACAACGTGGCCAGTGGCGATTCGATGCTTGCGTCCAAGTCTGTGAAACCCCTCCG
TCACCCATAGGTTTCCTCGTGAGAAAGCTCTGGAGGCCTTGAAACATTAAAAGGGATTGGGGTGAAAATCATGCTC
AAGTGTGACCCAGTGACCAGAATCCCTGAAGATCTCAAGCTTAACTAGCTAGCGGACCGACGCGTACGCGGCCGCTCGT
TTAAACGGCCGGCCGGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTC
CAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGG
TGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTG
GAAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCGAGT
TGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCC
AGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCAC
TGCTCCCTTCCCTGTCCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT
GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG
CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGGCCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
ATTTCACACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACG
CGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGC
CGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA
AACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG
TTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTCGGTCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGT
TTACAATTTATAGGTGCACGATGCACAGTTCAGTACGGCGTAGTTAAGCTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT
GCTGACGCGGGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTG
TCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCA
TGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAA
ATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGG
TGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT
GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT
TGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAA
AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTA
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC
GCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA
GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGG
TATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG
ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATAT
ATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA
AATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTT
TTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCA
ACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA
CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC
ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC
CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAA
ACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT
```

FIG. 9

【図１０】

補足表1 | プライマー配列およびサーモサイクリング条件

	プライマー	配列番号	試薬	サーモサイクリング条件
SORD エキソン1	Fw:シークエンシング CAGGCTGGCACAAAGGAG Rv: AGTGAGGCACGATCGGTATG	2 3	Fastsart Master Mix 2X (Kodbe) プライマー 0.5 mM ゲノム DNA 50 ng	95°C 4 分 [95°C 30 秒 65°C 30 秒 - 各サイクル 0.5°C ずつ減少 72°C 1 分] X18 サイクル [95°C 30 秒 55°C 30 秒 72°C 1 分] X18 サイクル 72°C 5 分
SORD エキソン2	Fw:シークエンシング: AGCGTGCCATTTAGGGTATC Rv: GCAGTAGACTCTGTTCTCAGCCTAAC	4 5		
SORD エキソン3	Fw ACCTTTCTCATAAATAGATACGAATCC Rv:シークエンシング TCTTGTTCCCTGCTGTACCC	6 7		
SORD エキソン4	Fw:ネスト-シークエンシング GCATGCAAGCCTTCATAAACA Rv CGAAGTCTTCATTGTTCTTATGACG	8 9		
SORD エキソン5	Fw:シークエンシング CGTGGCCATGTTAACTCCTT Rv: GTTCCCTGAATTCCCAGTCA	10 11		
SORD エキソン6	Fw:シークエンシング ATGTTTAATATTTCATGAACATATTCC Rv: GCTGTTTCCCAGTCAAGGAG	12 13		
SORD エキソン7	Fw: TGAGTCATCAGATTTCTCCTCTTTG Rv: AGCCTGGCGACTAGTTGAG シークエンシング AAAAGAAAACATAGATGGCAAAAGA	14 15 16		
SORD エキソン8	Fw:シークエンシング TCCCGCTCAGTTAAGTTTGG Rv: GCTTCAAAATCCCCTCCTTC	17 18		
SORD エキソン9	Fw:シークエンシング CACCTGGCTCTTTCCTCTG Rv: CCCTGAGATCCCAACGACTG	19 20		
SORD2P エキソン7	Fw Rv			

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応 ；Fw：順方向；Rv：逆方向

FIG. 10

【図１１－１】

症例ID	家族ID	性別	発症年齢	試験時の年齢	人種および民族	家族歴	診断	発症時の症状	おむね最近状態	遅発NCS	感覚NCS UL/LL	疾患重症度	c.753delG (p.Ala252Profs*27) SORD欠損対立遺伝子型	SORD欠損対立遺伝子型
1	家族1	女性	30	43	白人 アメリカ人	あり	CMT2	歩行困難		軸索型	入手可能でない	軽度	未主張合性	
2	家族1	女性	30	38	白人 アメリカ人	あり	CMT2	下肢の筋の萎縮		軸索型	入手可能でない	軽度	未主張合性	
3	家族2	男性	35	38	白人 ギリシャ人	なし	CMT2 (運動軸索型)	つま先および脚で立つことができない	最期時症状様に急激に発症。上肢無帳	軸索型	低減／なし	軽度	ヘテロ接合性 (母系)	c.298G>T; p.(Arg100Ter) (SORD欠損対立遺伝子型) (父親は果ゴ)
4	家族3	男性	13	17	白人 アフリカ人	なし	CMT 中間型	走一式り脚ぬ内手ならこが脚ない	上肢無帳、軽度無帳	中間型	低減／低減	中程度	ヘテロ接合性 (父系)	c.329G>C; p.(Arg110Pro) (母系)
5	家族4	男性	14	20	白人 アメリカ人	なし	CMT2 (運動軸索型)	つま先をつまことができない	筋萎縮、上肢は近CK上昇	軸索型	低減／正常	軽度	未主張合性	
6	家族5	男性	12	23	白人 アメリカ人	なし	dHMN	歩いてりまっまり手ならこが脚ない バランスの低下		軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性	
7	家族6	女性	26	59	白人 アメリカ人	なし	dHMN	不安定さ		軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性	
8	家族7	男性	14	28	中東 イラン人	あり	dHMN	入手可能でない	社歴中の 下肢の問題	軸索型	正常／低減	軽度	未主張合性	
9	家族8	女性	20	32	白人 アメリカ人	なし	dHMN	歩いてりまっまり手ならこが脚ない	急激な増悪	中間型	正常／正常	軽度	未主張合性	
10	家族9	男性	12	15	白人と アメリカ人 の混血	なし	CMT 中間型	歩行困難	上肢無帳	中間型	低減／正常	軽度	未主張合性	
11	家族10	女性	12	23	白人 アメリカ人	なし	CMT2	歩行困難		軸索型	正常／低減	軽度	未主張合性	
12	家族11	男性	15	34	白人 イギリス人	なし	dHMN	つま先でつまことができない	筋労有所	軸索型	低減／正常	軽度	未主張合性	

FIG. 11

【図１１－２】

13	家族12	男性	13	43	白人 イギリス人	なし	遠心型 CMT2	つま先をつまこと ができない	特発神経 モノニューロパチー 必然的な存う 複合型運動失調 起撃性反応消滅 (ALS様症状)、 腕は無帳	軸索型	低減／正常	軽度	未主張合性	
14	家族13	男性	29	34	白人 アイルランド人	なし	CMT2	歩行困難	上肢無帳	軸索型	低減／低減	軽度	未主張合性	
15	家族14-1	男性	30	37	白人 オーストリア人	なし	CMT2	歩行困難	上肢運動の 感覚低下	中間型	低減／ 入手可能でない	中程度	ヘテロ接合性 (両親は入手可能でない)	c.458C>A; p.(Ala153Glu) (両親は入手可能でない)
16	家族14-2	女性	26	30	白人 オーストリア人	なし	CMT2	歩行困難		中間型	低減／ 入手可能でない	軽度	ヘテロ接合性 (両親は入手可能でない)	c.458C>A; p.(Ala153Glu) (両親は入手可能でない)
17	家族15	女性	18	28	中東 (イラク) ユダヤ人	なし	dHMN	つま先をつまこと ができない、 ハイヒールを 履けない	歩行困難	軸索型	低減／低減	軽度	未主張合性	
18	家族16	男性	15	55	白人 イタリア人	なし	dHMN	歩行困難		軸索型	なし／正常	軽度	未主張合性	
19	家族17	男性	12	23	東アジア シンガポール人	なし	CMT 中間型	歩いてりまっまり手ならこが脚ない		軸索型	低減／正常	中程度	未主張合性	
20	家族18-2	女性	12	20	中東 エジプト人	あり	CMT2	手足の力の喪失		軸索型	正常／なし	中程度	未主張合性	
21	家族18-3	男性	15	17	中東 エジプト人	あり	CMT2	歩行困難		中間型	正常／なし	中程度	未主張合性	
22	家族19-1	男性	40	70	中東 エジプト人	あり	CMT2	歩行困難		入手可能でない	入手可能でない	重度	未主張合性	
23	家族19-2	男性	29	39	中東 エジプト人	あり	CMT2	歩行困難		入手可能でない	入手可能でない	中程度	未主張合性	
24	家族19-3	男性	16	19	中東 エジプト人	あり	CMT2	歩行困難		入手可能でない	入手可能でない	軽度	未主張合性	
25	家族19-3	男性	18	26	中東 (イラク・ユダヤ人)	あり	CMT2 (運動軸索型)	走一式り脚ぬ内手ならこが脚ない		中間型	正常／低減	軽度	未主張合性	

FIG. 11 続き

【図１１－３】

26	家族 21															
27	家族 22															
28	家族 23-1-3	男性	25	52	白人 イタリア人	なし	dHMN	歩行困難	てんかん、 血管性脳症、 上肢無帳、 聴覚低下、 正常な膝蓋伸縮反射を有する	軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性			
29	家族 23-2-2	女性	20	45	白人 イタリア人	あり	CMT2	凹足		軸索型	低減／低減	軽度	未主張合性			
30	家族 24	女性	20	42	白人 イタリア人	なし	dHMN	歩行困難	改善な反射	軸索型	正常／正常	中程度	未主張合性			
31	家族 25	男性	34	46	白人 イタリア人	なし	dHMN	歩行困難		軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性			
32	家族 26	男性	32	41	白人 イタリア人	なし	CMT2 (運動軸索型)	歩行困難	筋萎縮	軸索型	低減／正常	中程度	未主張合性			
33	家族 27	男性	13	28	白人 イタリア人	なし	dHMN	歩行困難	腓筋萎縮、CK上昇	軸索型	正常／正常	中程度	未主張合性			
34	家族 28-1-1	女性	40	70	白人 イタリア人	あり	dHMN	歩行困難	改善な反射	軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性			
35	家族 28-1-2	女性	20	52	白人 イタリア人	あり	dHMN	歩行困難	改善な反射	軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性			
36	家族 29	男性	2	10	白人 イタリア人	なし	CMT2	突発のてん かんストーンの発症	腓萎縮	軸索型	なし／なし	中程度	ヘテロ接合性 (父親は入手可能でない)	c.964G>A; (p.Val322Ile) (母系)		
37	家族 30	男性	35	38	白人 イタリア人	なし	CMT2	転倒	腓萎縮	中間型	低減／なし	軽度	ヘテロ接合性 (父系)	c.316_425+165del (母系)		
38	家族 31	男性	30	42	白人 イタリア人	なし	CMT2	歩行困難	腓萎縮	中間型	低減／なし	中程度	未主張合性			
39	家族 32	男性	28	29	白人 イタリア人	なし	dHMN	歩行困難、痙攣	CK上昇	軸索型	正常／正常	軽度	ヘテロ接合性 (両親は入手可能でない)	c.248C>T; (p.Leu20Phe) (母系)		
40	家族 33	男性	35	60	白人 イタリア人	なし	CMT2 (運動軸索型)	転倒	軽度腓萎縮	軸索型	正常／低減	中程度	ヘテロ接合性 (両親は入手可能でない)	c.883G>T; (p.Asp295Tyr)		
41	家族 34	男性	25	36	白人 イタリア人	なし	CMT2 中間型	下肢の筋の萎縮		中間型	正常／正常	軽度	未主張合性			
42	家族 35	男性	12	18	ネイティブ アメリカン (アラスカ人) と白人の 混血	なし	dHMN	走るのが困難		軸索型	低減／正常	軽度	未主張合性			

FIG. 11 続き

【図１１－４】

43	家族 36	男性	10	29	東アジア (中国) 人	肝炎性	CMT2 (運動軸索型)	下垂足および歩行困難		軸索型	正常／正常	軽度	未主張合性			
44	家族 37	男性	10	24	東アジア (韓国) 人	肝炎性	CMT2	歩行困難		軸索型	正常／低減	軽度	未主張合性			
45	家族 38	男性	16	26	東アジア (韓国) 人	肝炎性	CMT2	歩行困難		軸索型	正常／低減	軽度	未主張合性			

FIG. 11 続き

【図１２】

	N=45
男性	32 (71%)
発症年齢	17 ± 8 (2-40)
試験時の年齢	34 ± 14 (10-70)
ニューロパチーの家族歴	13 (29%)
CMT サブタイプ	
CMT2	23 (51%)
dHMN	18 (40%)
CMT 中間型	4 (9%)
足の変形	31 (69%)
上肢の虚弱	
近位筋群	0/44 (0%)
遠位筋群	26/44 (59%)
下肢の虚弱	
近位筋群	2/44 (5%)
遠位筋群	43/44 (98%)
足の底屈の顕著な関与	15/37 (41%)
振動覚低下	17/40 (42%)
針刺しによる表在感覚の低下	13/39 (33%)
疾患重症度	
軽度	30 (67%)
中程度	14 (31%)
重度	1 (2%)
短下肢装具 (AFO) の使用	19 (42%)
他の歩行補助具	2 (4%)
神経伝導試験	
運動神経伝導速度の低下	11/42 (26%)
感覚神経活動電位の低下	26/40 (65%)

【図１３】

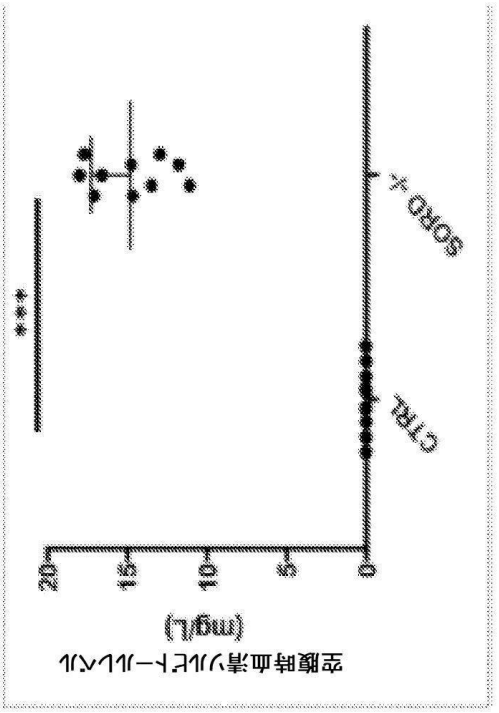

FIG. 12

FIG. 13

【図１４】

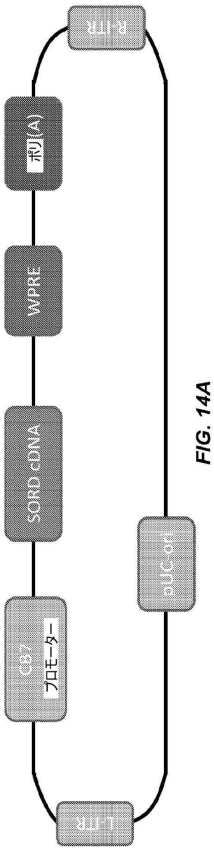

FIG. 14A

atggcggcggcggccaagcccaacaacctttccctggtgtgcacggaccgggggaacttgcgcctgagaaactatccctacgaccaggcccaaatgagtctttgctgaggatgcattctgttggaatctgtcag
atgtccactacttggaatatagttcgaatttagtgaaaaagcccatgtgctgaggacatgaagcttcgggaacatcgctaaagcactaaaacaaggtgatcgtgttgccatcga
gcctggtgctcccccgaagaaaatgatgaattctgcaagtgggcccgatacaatctgtcacttccatcttctgtgccaagccccccgatgcaagggaacctctgccggttctataagcacaatgcagccttttgtacaagctt
cctgacaatgtcacctttgaggaaggcgccctgatcgagcacttttctgtggaatccagcagcgcggaggtacctggacacacaaggtccttgtgtgtgtggcgccaatcggaaatcgcctttgtcgt
ggccaaggcattgggagccagctcaagtagtgctgactgatctgctctaccgattgtccaaggcaagagaatgggctgatttagtccttcccagatctccgaggagaagccccaggaaagtgagaag
gtcagctgggtgtgcaagccgggaagtcaccatcgagtgcagggggcaggaggcctccatcaggcgggcatctacgccctgtgtgggggctcgaggatgaccacgtacccctact
gcatgcagccatccgggaggtgtgaatcaaggacgttgtttcgatactgcaacacgtggagcagtgggcgattttgcgatgcttgctgcccaatagtttcctctgggagaaagcttctgg
aggccttttgaaacatttaaaaaggaatgggattgaaaatcatgctcaagtgtgacccagtgacccagaatatccctga

FIG. 14B (配列番号 45)

MAAAAKPNNLSLVVHGPGDLRLENVPIPEPGPNEVLIRMHSVGICGSDVHYWEYGRIGNFIVKKPMVLGHEASGTVEKVGSSVKHLKPGDRVAIEPGAPRENDEFCKMGRYN
LSPSIFFCATPPDDGNLCRFYKHNAAFCYKLPDNVTFEEGALIEPLSVGIHACRRGGVTLGHKVLVCGAGPIGMVTLLVAKAMGAAQVVVVTDLSATRLSKAKEIGADLVLQISKES
PQEIARKVEGQLGCKPEVTIECTGAEASIQAGIYATRSGGNLVLVGLGSEMTTVPLLHAAIREVDIKGVFRYCNTWPVAISMLASKSVNVKPLVTHRFPLEGALEAFETFKKGLGLKI
MLKCDPSDQNP

FIG. 14C (配列番号 46)

【図１５－１】

AR 1A

G*T*T*T*A*A*G*A*T*C*A*T*C*T*C*C*A*C*C*T

[配列番号 22]

AR-S 1A

T*A*T*T*A*C*A*G*C*T*A*C*A*T*C*C*T*G*T*C

[配列番号 47]

FIG. 15A

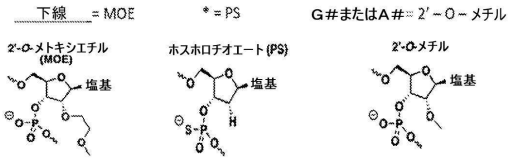

FIG. 15B

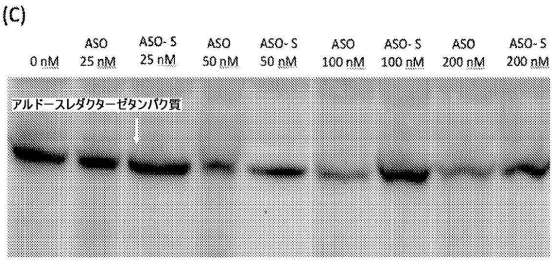

FIG. 15C

【図１５－２】

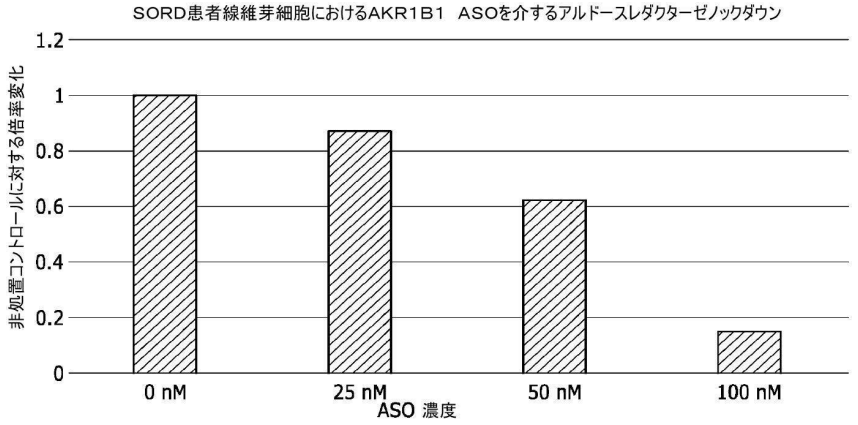

FIG. 15D

【図１６－１】

*Homo sapiens*アルドーケトレダクターゼファミリー1メンバーB(AKR1B1)におけるASO配列および相当する標的部位
(エキソン標的のみ)

順位	配列番号	標的配列 (5p --> 3p)	アンチセンスオリゴ (5p --> 3p)	配列番号	GC 含有量	オリゴ結合エネルギー (kcal/mol)
1	49	UCGCAGCCAAGCACAAUAAA	TTTATTGTGCTTGGCTGCGA	50	45.00%	-16.3
2	51	GCAGCCAAGCACAAUAAAAC	GTTTTATTGTGCTTGGCTGC	52	45.00%	-16.3
3	53	GAUCGCAGCCAAGCACAAUA	TATTGTGCTTGGCTGCGATC	54	50.00%	-16.2
4	55	AUCGCAGCCAAGCACAAUAA	TTATTGTGCTTGGCTGCGAT	56	45.00%	-16.1
5	57	CGCAGCCAAGCACAAUAAAA	TTTTATTGTGCTTGGCTGCG	58	45.00%	-15.9
6	59	GCCAAGCACAAUAAAACUAC	GTAGTTTTATTGTGCTTGGC	60	40.00%	-15.7
7	61	CGAUCGCAGCCAAGCACAAU	ATTGTGCTTGGCTGCGATCG	62	55.00%	-15.6
8	63	AGCACAAUAAAACUACAGCC	GGCTGTAGTTTTATTGTGCT	64	40.00%	-15.2
9	65	CAGCCAAGCACAAUAAAACU	AGTTTTATTGTGCTTGGCTG	66	40.00%	-14.8
10	67	GCGAUCGCAGCCAAGCACAA	TTGTGCTTGGCTGCGATCGC	68	60.00%	-14.7
11	69	GCACAAUAAAACUACAGCCC	GGGCTGTAGTTTTATTGTGC	70	45.00%	-13.6
12	71	AACCAGAUUGAGUGCCACCC	GGGTGGCACTCAATCTGGTT	72	55.00%	-13
13	73	ACCAGAUUGAGUGCCACCCA	TGGGTGGCACTCAATCTGGT	74	55.00%	-13
14	75	ACCUCCCACAAGGAUUACCC	GGGTAATCCTTGTGGGAGGT	76	55.00%	-12.7
15	77	CCUCCCACAAGGAUUACCCC	GGGGTAATCCTTGTGGGAGG	78	60.00%	-12.6
16	79	ACAACCUGAAUACCCUUUUC	GAAAAGGGTATTCAGGTTGT	80	40.00%	-12.3
17	81	CUCCCACAAGGAUUACCCCU	AGGGGTAATCCTTGTGGGAG	82	55.00%	-12.2
18	83	CCAGAUUGAGUGCCACCCAU	ATGGGTGGCACTCAATCTGG	84	55.00%	-12.1
19	85	CAACCUGAAUACCCUUUUCU	AGAAAAGGGTATTCAGGTTG	86	40.00%	-12.1
20	87	AGUACAACCUGAAUACCCUU	AAGGGTATTCAGGTTGTACT	88	40.00%	-11.9
21	89	GUACAACCUGAAUACCCUUU	AAAGGGTATTCAGGTTGTAC	90	40.00%	-11.9
22	91	AAGGCGAUCGCAGCCAAGCA	TGCTTGGCTGCGATCGCCTT	92	60.00%	-11.8
23	93	UCCCACAAGGAUUACCCCUU	AAGGGGTAATCCTTGTGGGA	94	50.00%	-11.8

FIG. 16

【図１６－２】

24	95	AAGUACAACCUGAAUACCCU	AGGGTATTCAGGTTGTACTT	96	40.00%	-11.8
25	97	AACCUGAAUACCCUUUUCUG	CAGAAAAGGGTATTCAGGTT	98	40.00%	-11.8
26	99	ACCUGAAUACCCUUUUCUGA	TCAGAAAAGGGTATTCAGGT	100	40.00%	-11.7
27	101	UACCUCCCACAAGGAUUACC	GGTAATCCTTGTGGGAGGTA	102	50.00%	-11.5
28	103	AAAGUACAACCUGAAUACCC	GGGTATTCAGGTTGTACTTT	104	40.00%	-11.5
29	105	CCUGAAUACCCUUUUCUGAC	GTCAGAAAAGGGTATTCAGG	106	45.00%	-11.5
30	107	UAACCAGAUUGAGUGCCACC	GGTGGCACTCAATCTGGTTA	108	50.00%	-11.2
31	109	AUUGAGUGCCACCCAUAUCU	AGATATGGGTGGCACTCAAT	110	45.00%	-11.2
32	111	GUGCCACCCAUAUCUCACUC	GAGTGAGATATGGGTGGCAC	112	55.00%	-11.2
33	113	UGCCACCCAUAUCUCACUCA	TGAGTGAGATATGGGTGGCA	114	50.00%	-11.2
34	115	CACAAUAAAACUACAGCCCA	TGGGCTGTAGTTTTATTGTG	116	40.00%	-11.2
35	117	CCCACAAGGAUUACCCCUUC	GAAGGGGTAATCCTTGTGGG	118	55.00%	-11.2
36	119	CUGAAUACCCUUUUCUGACC	GGTCAGAAAAGGGTATTCAG	120	45.00%	-11.2
37	121	GAUUGAGUGCCACCCAUAUC	GATATGGGTGGCACTCAATC	122	50.00%	-11.1
38	123	AGUGCCACCCAUAUCUCACU	AGTGAGATATGGGTGGCACT	124	50.00%	-11.1
39	125	GCCACCCAUAUCUCACUCAG	CTGAGTGAGATATGGGTGGC	126	55.00%	-11.1
40	127	GAGUGCCACCCAUAUCUCAC	GTGAGATATGGGTGGCACTC	128	55.00%	-11
41	129	UGAAUACCCUUUUCUGACCA	TGGTCAGAAAAGGGTATTCA	130	40.00%	-11
42	131	UUGAGUGCCACCCAUAUCUC	GAGATATGGGTGGCACTCAA	132	50.00%	-10.9
43	133	UGAGUGCCACCCAUAUCUCA	TGAGATATGGGTGGCACTCA	134	50.00%	-10.9
44	135	AGAUUGAGUGCCACCCAUAU	ATATGGGTGGCACTCAATCT	136	45.00%	-10.8
45	137	CCACCCAUAUCUCACUCAGG	CCTGAGTGAGATATGGGTGG	138	55.00%	-10.8
46	139	CAGAUUGAGUGCCACCCAUA	TATGGGTGGCACTCAATCTG	140	50.00%	-10.7
47	141	CCACAAGGAUUACCCCUUCC	GGAAGGGGTAATCCTTGTGG	142	55.00%	-10.6
48	143	GAAAGUACAACCUGAAUACC	GGTATTCAGGTTGTACTTTC	144	40.00%	-10.6
49	145	GAAUACCCUUUUCUGACCAA	TTGGTCAGAAAAGGGTATTC	146	40.00%	-10.5
50	147	ACAAUAAAACUACAGCCCAG	CTGGGCTGTAGTTTTATTGT	148	40.00%	-10.4
51	149	GUACCUCCCACAAGGAUUAC	GTAATCCTTGTGGGAGGTAC	150	50.00%	-10.3
52	151	AAACAAACCUGGCUUGAAGU	ACTTCAAGCCAGGTTTGTTT	152	40.00%	-10.1

FIG. 16 続き

【図１６－３】

53	153	UCAAGGCGAUCGCAGCCAAG	CTTGGCTGCGATCGCCTTGA	154	60.00%	-10.1
54	155	AUGGCAAGCCGUCUCCUGCU	AGCAGGAGACGGCTTGCCAT	156	60.00%	-10
55	157	GAUCUUAAACAAACCUGGCU	AGCCAGGTTTGTTTAAGATC	158	40.00%	-10
56	159	UGAUCUUAAACAAACCUGGC	GCCAGGTTTGTTTAAGATCA	160	40.00%	-9.9
57	161	UAAACAAACCUGGCUUGAAG	CTTCAAGCCAGGTTTGTTTA	162	40.00%	-9.8
58	163	AACAAACCUGGCUUGAAGUA	TACTTCAAGCCAGGTTTGTT	164	40.00%	-9.8
59	165	CUCAGCAGUGGGACAGCAAC	GTTGCTGTCCCACTGCTGAG	166	60.00%	-9.8
60	167	UCAGCAGUGGGACAGCAACC	GGTTGCTGTCCCACTGCTGA	168	60.00%	-9.8
61	169	CAGCAGUGGGACAGCAACCU	AGGTTGCTGTCCCACTGCTG	170	60.00%	-9.8
62	171	AGCAGUGGGACAGCAACCUG	CAGGTTGCTGTCCCACTGCT	172	60.00%	-9.8
63	173	GCAGUGGGACAGCAACCUGU	ACAGGTTGCTGTCCCACTGC	174	60.00%	-9.7
64	175	CAGUGGGACAGCAACCUGUA	TACAGGTTGCTGTCCCACTG	176	55.00%	-9.7
65	177	AGUGGGACAGCAACCUGUAG	CTACAGGTTGCTGTCCCACT	178	55.00%	-9.7
66	179	UGUACCUCCCACAAGGAUUA	TAATCCTTGTGGGAGGTACA	180	45.00%	-9.6
67	181	AAGUGACCUAUACCUGUGUU	AACACAGGTATAGGTCACTT	182	40.00%	-9.6
68	183	GUGGGACAGCAACCUGUAGA	TCTACAGGTTGCTGTCCCAC	184	55.00%	-9.6
69	185	UAGUGCCACUAACGGUUGAG	CTCAACCGTTAGTGGCACTA	186	50.00%	-9.6
70	187	AGUGCCACUAACGGUUGAGU	ACTCAACCGTTAGTGGCACT	188	50.00%	-9.6
71	189	AGGUGGAGAUGAUCUUAAAC	GTTTAAGATCATCTCCACCT	190	40.00%	-9.5
72	191	UGGGACAGCAACCUGUAGAG	CTCTACAGGTTGCTGTCCCA	192	55.00%	-9.5
73	193	AUAGUGCCACUAACGGUUGA	TCAACCGTTAGTGGCACTAT	194	45.00%	-9.5
74	195	CAAGUGACCUAUACCUGUGU	ACACAGGTATAGGTCACTTG	196	45.00%	-9.4
75	197	AGUGACCUAUACCUGUGUUU	AAACACAGGTATAGGTCACT	198	40.00%	-9.4
76	199	GCAAGCCGUCUCCUGCUCAA	TTGAGCAGGAGACGGCTTGC	200	60.00%	-9.3
77	201	CAAGCCGUCUCCUGCUCAAC	GTTGAGCAGGAGACGGCTTG	202	60.00%	-9.3
78	203	AAGCCGUCUCCUGCUCAACA	TGTTGAGCAGGAGACGGCTT	204	55.00%	-9.3
79	205	UCUUAAACAAACCUGGCUUG	CAAGCCAGGTTTGTTTAAGA	206	40.00%	-9.3
80	207	UCUGUGACACCAGAACGCAU	ATGCGTTCTGGTGTCACAGA	208	50.00%	-9.3
81	209	CUGUGACACCAGAACGCAUU	AATGCGTTCTGGTGTCACAG	210	50.00%	-9.3

FIG. 16 続き

【図１６－４】

82	211	UGUGACACCAGAACGCAUUG	CAATGCGTTCTGGTGTCACA	212	50.00%	-9.3
83	213	AACUUACACCAUCUCCAGGU	ACCTGGAGATGGTTGAAGTT	214	45.00%	-9.2
84	215	ACAAACCUGGCUUGAAGUAU	ATACTTCAAGCCAGGTTTGT	216	40.00%	-9.2
85	217	UUAACCAGAUUGAGUGCCAC	GTGGCACTCAATCTGGTTAA	218	45.00%	-9.2
86	219	GUGACACCAGAACGCAUUGC	GCAATGCGTTCTGGTGTCAC	220	55.00%	-9.2
87	221	UGACACCAGAACGCAUUGCU	AGCAATGCGTTCTGGTGTCA	222	50.00%	-9.1
88	223	AUUACCCCUUCCAUGAAGAG	CTCTTCATGGAAGGGGTAAT	224	45.00%	-9.1
89	225	GGGACAGCAACCUGUAGAGU	ACTCTACAGGTTGCTGTCCC	226	55.00%	-9.1
90	227	AUACCCUUUUCUGACCAAAG	CTTTGGTCAGAAAGGGTAT	228	40.00%	-9.1
91	229	AUCAAGGCGAUCGCAGCCAA	TTGGCTGCGATCGCCTTGAT	230	55.00%	-9
92	231	AGUCUGUGACACCAGAACGC	GCGTTCTGGTGTCACAGACT	232	55.00%	-9
93	233	CUGUACCUCCCACAAGGAUU	AATCCTTGTGGGAGGTACAG	234	50.00%	-9
94	235	CACAAGGAUUACCCCUUCCA	TGGAAGGGGTAATCCTTGTG	236	50.00%	-9
95	237	GAUUACCCCUUCCAUGAAGA	TCTTCATGGAAGGGGTAATC	238	45.00%	-9
96	239	UUACCCCUUCCAUGAAGAGU	ACTCTTCATGGAAGGGGTAA	240	45.00%	-9
97	241	UACCCCUUCCAUGAAGAGUU	AACTCTTCATGGAAGGGGTA	242	45.00%	-9
98	243	CACCCAUAUCUCACUCAGGA	TCCTGAGTGAGATATGGGTG	244	50.00%	-8.9
99	245	GGAUUACCCCUUCCAUGAAG	CTTCATGGAAGGGGTAATCC	246	50.00%	-8.9
100	247	ACUCAGCAGUGGGACAGCAA	TTGCTGTCCCACTGCTGAGT	248	55.00%	-8.9
101	249	AAGCCUGCAGUUAACCAGAU	ATCTGGTTAACTGCAGGCTT	250	45.00%	-8.8
102	251	GUCUGUGACACCAGAACGCA	TGCGTTCTGGTGTCACAGAC	252	55.00%	-8.8
103	253	GCUGUACCUCCCACAAGGAU	ATCCTTGTGGGAGGTACAGC	254	55.00%	-8.8
104	255	AGGAUUACCCCUUCCAUGAA	TTCATGGAAGGGGTAATCCT	256	45.00%	-8.8
105	257	AGCCUGCAGUUAACCAGAUU	AATCTGGTTAACTGCAGGCT	258	45.00%	-8.7
106	259	CCAAGUGACCUAUACCUGUG	CACAGGTATAGGTCACTTGG	260	50.00%	-8.7
107	261	ACUUCAACCAUCUCCAGGUG	CACCTGGAGATGGTTGAAGT	262	50.00%	-8.6
108	263	UUGAGCUGUACCUCCCACAA	TTGTGGGAGGTACAGCTCAA	264	50.00%	-8.6
109	265	UGAGCUGUACCUCCCACAAG	CTTGTGGGAGGTACAGCTCA	266	55.00%	-8.6
110	267	GAGCUGUACCUCCCACAAGG	CCTTGTGGGAGGTACAGCTC	268	60.00%	-8.6

FIG. 16 続き

【図１６－５】

111	269	AGCUGUACCUCCCACAAGGA	TCCTTGTGGGAGGTACAGCT	270	55.00%	-8.6
112	271	ACCCCUUCCAUGAAGAGUUU	AAACTCTTCATGGAAGGGGT	272	45.00%	-8.6
113	273	GGAAAGUACAACCUGAAUAC	GTATTCAGGTTGTACTTTCC	274	40.00%	-8.6
114	275	GGAAUUUUUCCCAUUGGAUG	CATCCAATGGGAAAAATTCC	276	40.00%	-8.5
115	277	GGUGGAGAUGAUCUUAAACA	TGTTTAAGATCATCTCCACC	278	40.00%	-8.5
116	279	GCCUGCAGUUAACCAGAUUG	CAATCTGGTTAACTGCAGGC	280	50.00%	-8.5
117	281	ACAAGGAUUACCCCUUCCAU	ATGGAAGGGGTAATCCTTGT	282	45.00%	-8.5
118	283	AGCCGUCUCCUGCUACAACA	TTGTTGAGCAGGAGACGGCT	284	55.00%	-8.4
119	285	AUUGGAUGAGUCGGGCAAUG	CATTGCCCGACTCATCCAAT	286	50.00%	-8.4
120	287	UAAGCCUGCAGUUAACCAGA	TCTGGTTAACTGCAGGCTTA	288	45.00%	-8.4
121	289	CCCCAAGUCUGUGACACCAG	CTGGTGTCACAGACTTGGGG	290	60.00%	-8.4
122	291	GUGACCUAUACCUGUGUUUC	GAAACACAGGTATAGGTCAC	292	45.00%	-8.4
123	293	GGACAGCAACCUGUAGAGUG	CACTCTACAGGTTGCTGTCC	294	55.00%	-8.4
124	295	CUUAAAACAAACCUGGCUUGA	TCAAGCCAGGTTTGTTTAAG	296	40.00%	-8.3
125	297	CAAUAAAACUACAGCCCAGG	CCTGGGCTGTAGTTTTATTG	298	45.00%	-8.3
126	299	AAGUCUGUGACACCAGAACG	CGTTCTGGTGTCACAGACTT	300	50.00%	-8.3
127	301	GUUUGAGCUGUACCUCCCAC	TGTGGGAGGTACAGCTCAAC	302	55.00%	-8.3
128	303	UACCCUUUUCUGACCAAAGA	TCTTTGGTCAGAAAAGGGTA	304	40.00%	-8.3
129	305	ACCCAUAUCUCACUCAGGAG	CTCCTGAGTGAGATATGGGT	306	50.00%	-8.2
130	307	AUCCCCAAGUCUGUGACACC	GGTGTCACAGACTTGGGGAT	308	55.00%	-8.2
131	309	UCCCCAAGUCUGUGACACCA	TGGTGTCACAGACTTGGGGA	310	55.00%	-8.2
132	311	CAAGGAUUACCCCUUCCAUG	CATGGAAGGGGTAATCCTTG	312	50.00%	-8.2
133	313	AAUGAUUACCCCUUCCAUGA	TCATGGAAGGGGTAATCCTT	314	45.00%	-8.2
134	315	AAUAGUGCCACUAACGGUUG	CAACCGTTAGTGGCACTATT	316	45.00%	-8.2
135	317	UUGGAUGAGUCGGGCAAUGU	ACATTGCCCGACTCATCCAA	318	50.00%	-8.1
136	319	CAACUUCAAACCAUCUCCAGG	CCTGGAGATGGTTGAAGTTG	320	50.00%	-8.1
137	321	AUAAGCCUGCAGUUAACCAG	CTGGTTAACTGCAGGCTTAT	322	45.00%	-8.1
138	323	CCUGCAGUUAACCAGAUUGA	TCAATCTGGTTAACTGCAGG	324	45.00%	-8.1
139	325	GAUCCCCAAGUCUGUGACAC	GTGTCACAGACTTGGGGATC	326	55.00%	-8.1

FIG. 16 続き

【図１６－６】

140	327	UGUUGAGCUGUACCUCCCAC	GTGGGAGGTACAGCTCAACA	328	55.00%	-8.1
141	329	CACUCAGCAGUGGGACAGCA	TGCTGTCCCACTGCTGAGTG	330	60.00%	-8.1
142	331	UGGAUGAGUCGGGCAAUGUG	CACATTGCCCGACTCATCCA	332	55.00%	-8
143	333	AAUGUGGUUCCCAGUGACAC	GTGTCACTGGGAACCACATT	334	50.00%	-8
144	335	GAUCAAGGCGAUCGCAGCCA	TGGCTGCGATCGCCTTGATC	336	60.00%	-8

FIG. 16 続き

【図１７】

Homo sapiensアルドケトレダクターゼファミリー1メンバーB(AKR1B1)における**ASO**部位(エキソン境界のみ)

順位	配列番号	標的配列 (5p --> 3p)	アンチセンスオリゴ (5p --> 3p)	配列番号	GC含有量	標的部位のアリルオドの平均非対形成確率	結合部位の破壊エネルギー (kcal/mol)
1	337	UCGCAGCCAAGCACAAUAAA	TTTATTGTGCTTGGCTGCGA	338	45.00%	0.819	8.6
2	339	CGCAGCCAAGCACAAUAAAA	TTTTATTGTGCTTGGCTGCG	340	45.00%	0.818	9
3	341	GCCCUUCUUUCUACCCUGCU	AGCAGGGTAGAAAGAAGGGC	342	55.00%	0.735	9.9
4	343	GACCUCACGGGCUAUUUUAAA	TTTAAATAGCCCGTGAGGTC	344	45.00%	0.698	7.8
5	345	UACCUCCCACAAGGAUUACC	GGTAATCCTTGTGGGAGGTA	346	50.00%	0.694	7.3
6	347	CCCUCUUUCUACCCUGCUG	CAGCAGGGTAGAAAGAAGGG	348	55.00%	0.693	9.9
7	349	ACCUCCCACAAGGAUUACCC	GGGTAATCCTTGTGGGAGGT	350	55.00%	0.69	7.4
8	351	ACCUCACGGGCUAUUUAAAG	CTTTAAATAGCCCGTGAGGT	352	45.00%	0.684	9.9
9	353	AUUGAGUGCCACCCAUAUCU	AGATATGGGTGGCACTCAAT	354	45.00%	0.668	6.7
10	355	GAUCUUAAACAAACCUGGCU	AGCCAGGTTTGTTTAAGATC	356	40.00%	0.666	12
11	357	UGAUCUUAAACAAACCUGGC	GCCAGGTTTGTTTAAGATCA	358	40.00%	0.664	12.7
12	359	AAGGCGAUCGCAGCCAAGCA	TGCTTGGCTGCGATCGCCTT	360	60.00%	0.663	9.4
13	361	GAUUGAGUGCCACCCAUAUC	GATATGGGTGGCACTCAATC	362	50.00%	0.649	6.2
14	363	CAGAUUGAGUGCCACCCAUA	TATGGGTGGCACTCAATCTG	364	50.00%	0.644	5.8
15	365	CCAGAUUGAGUGCCACCCAU	ATGGGTGGCACTCAATCTGG	366	55.00%	0.643	5.6
16	367	UCAAGGCGAUCGCAGCCAAG	CTTGGCTGCGATCGCCTTGA	368	60.00%	0.639	10.1
17	369	UAAACAAACCUGGCUUGAAG	CTTCAAGCCAGGTTTGTTTA	370	40.00%	0.636	9.3
18	371	UUACCCCUUCCAUGAAGAGU	ACTCTTCATGGAAGGGGTAA	372	45.00%	0.633	8.6
19	373	AAACAAACCUGGCUUGAAGU	ACTTCAAGCCAGGTTTGTTT	374	40.00%	0.631	8.5
20	375	UACCCCUUCCAUGAAGAGUU	AACTCTTCATGGAAGGGGTA	376	45.00%	0.627	8.6

FIG. 17

【図１８－１】

*Homo sapiens*アルドケトレダクターゼファミリー1メンバーB(AKR1B1)，hg19 dna range=chr7:134127102–134143944におけるASO領位(イントロン標的のみ)

順位	配列番号	標的配列 (5p --> 3p)	アンチセンスオリゴ (5p --> 3p)	配列番号	GC 含有量	標的部位ダブレオチドの平均非対形成確率	結合部位破壊エネルギー (kcal/mol)
1	377	AAUACAAAAAUUAGCCCGGC	GCCGGGCTAATTTTTGTATT	378	40.00%	0.859	7.5
2	379	AAUACCAUCUCCUUCGGC	GCCGAAGAGGAGATGGTATT	380	50.00%	0.818	3.8
3	381	AAAUACCAUCUCCUUCGG	CCGAAGAGGAGATGGTATTT	382	45.00%	0.817	3.8
4	383	AUACCAUCUCCUUCGGCU	AGCCGAAGAGGAGATGGTAT	384	50.00%	0.812	3.8
5	385	CACUACCCUUAUUCUUGUCU	AGACAAGAAATAAGGGTAGTG	386	40.00%	0.812	4.3
6	387	AUACAAAAAUUAGCCCGGCA	TGCCGGGCTAATTTTTGTAT	388	40.00%	0.811	7.6
7	389	UCACUACCCUUAUUCUUGUC	GACAAGAATAAGGGTAGTGA	390	40.00%	0.805	3
8	391	UACCAUCUCCUUCGGCUG	CAGCCGAAGAGGAGATGGTA	392	55.00%	0.802	4.1
9	393	ACACCCAUUCAGUCAUUUUG	CAAAATGACTGAATGGGTGT	394	40.00%	0.795	0.5
10	395	GACACCCAUUCAGUCAUUUU	AAAATGACTGAATGGGTGTC	396	40.00%	0.787	1.9
11	397	UCAUGAUAAUCUCCCAGAAC	GTTCTGGGAGATTATCATGA	398	40.00%	0.783	4
12	399	CAGUUUAUCUUAUCGCUCCU	AGGAGCGATAAGATAAACTG	400	40.00%	0.783	10
13	401	AGUUUAUCUUAUCGCUCCUC	GAGGAGCGATAAGATAAACT	402	40.00%	0.782	9.9
14	403	ACCUCCCACAAGGAUUACCC	GGGTAATCCTTGTGGGAGGT	404	55.00%	0.777	7.3
15	405	CCUCCCACAAGGAUUACCCC	GGGGTAATCCTTGTGGGAGG	406	60.00%	0.767	7.3
16	407	CAUGAGGGUCAGAAGAUAGAG	CTCTATCTTCTGACCTCATG	408	45.00%	0.761	7.5
17	409	CUUCAUGAUAAUCUCCCAGA	TCTGGGAGATTATCATGAAG	410	40.00%	0.759	1.6
18	411	AUGAGGUCAGAAGAUAGAGA	TCTCTATCTTCTGACCTCAT	412	40.00%	0.757	8
19	413	ACUGUUUUCUCCUUUCUCCU	AGGAGAAAGGAGAAAAACAGT	414	40.00%	0.755	7.2
20	415	UUCUCCUUUCUCCUGACAGC	GCTGTCAGGAGAAAGGAGAA	416	50.00%	0.753	7.2
21	417	AGACCCAGCCUCCUUUCCCU	AGGGAAAGGAGGCTGGGTCT	418	60.00%	0.751	10.9
22	419	CCCUUAUUCCUUGUCUGAGCU	AGCTCAGACAAGAATAAGGG	420	45.00%	0.75	3.4

FIG. 18

【図１８－２】

23	421	CUCUCCCAUUCAUCCGUCUU	AAGACGGATGAATGGGAGAG	422	50.00%	0.749	5
24	423	CAUGAUAAUCUCCCAGAACC	GGTTCTGGGAGATTATCATG	424	45.00%	0.747	8.5
25	425	UCUCUCCCAUUCAUCCGUCU	AGACGGATGAATGGGAGAGA	426	50.00%	0.747	4.3
26	427	CCUUAUUCUUGUCUGAGCUC	GAGCTCAGACAAGAATAAGG	428	45.00%	0.744	3.4
27	429	UCUCUCACUACCCUUAUUCU	AGAATAAGGGTAGTGAGAGA	430	40.00%	0.734	4.8
28	431	CCUUUCUUGGCCCUCUCGUC	GACAGAGAGGGCAAGAAAGG	432	55.00%	0.718	-0.1
29	433	CCAAUCUGUCCAUUCCAUUU	AAATGGAATTGGACAGATTGG	434	40.00%	0.716	3.8
30	435	CUCUCCUCUUUAGUACUUCC	GGAAGTACTAAAGGAGAAGG	436	45.00%	0.716	5.6
31	437	UCUCUCCUUUAGUACUUCCU	AGGAAGTACTAAAGGAGAAG	438	40.00%	0.715	4.6
32	439	CCUGAGCCUGAUUAUCUGAA	TTCAGATAATCAGGCTCAGG	440	45.00%	0.709	2.7
33	441	CCAUCUUUUGCCAUGAUCAC	GTGATCATGGCAAAAGATGG	442	45.00%	0.709	1.6
34	443	UUUCUCCAUCUUUUGCCAUG	CATGGCAAAAGATGGAGAAA	444	40.00%	0.708	2.3
35	445	GCCAAUCUGUCCAUUCCAUU	AATGGAATGGACAGATTGGC	446	45.00%	0.708	3.8
36	447	UCCAUCUUUUGCCAUGAUCA	TGATCATGGCAAAAGATGGA	448	40.00%	0.707	1.6
37	449	CUGAGCCUGAUUAUCUGAAA	TTTCAGATAATCAGGCTCAG	450	40.00%	0.706	3
38	451	CUUCUUCGUGACCUCUUGCA	TGCAAGAGGTCACGAAGAAG	452	50.00%	0.696	5.3
39	453	AUUGACUUCCCCAAACAACA	TGTTGTTTGGGGAAGTCAAT	454	40.00%	0.691	13
40	455	CUAGAAAAACCUCACAACAC	GTTGTGAGAGGTTTTTCTAG	456	40.00%	0.688	5.3
41	457	UUGACUUCCCCAAACAACAG	CTGTTGTTTGGGGAAGTCAA	458	45.00%	0.688	13.1
42	459	UAGCCUGAGCCUGAUUAUCU	AGATAATCAGGCTCAGGCTA	460	45.00%	0.686	2.9
43	461	AACGUAUCACCCACGGCCAU	ATGGCCGTGGGTGATACGTT	462	55.00%	0.684	8.3
44	463	ACACUCAAUACAGCUACACU	AGTGTAGCTGTATTGAGTGT	464	40.00%	0.68	5.9
45	465	GCUUCUUCGUGACCUCUUGC	GCAAGAGGTCACGAAGAAGC	466	55.00%	0.677	6.6
46	467	AUAGCCUGAGCCUGAUUAUC	GATAATCAGGCTCAGGCTAT	468	45.00%	0.676	2.5
47	469	GUAACUAGCAAGACCUGUAA	TTACAGGTCTTGCTAGTTAC	470	40.00%	0.676	5.3
48	471	AUAAGCAUCUCAAGCCGGUA	TACCGGCTTGAGATGCTTAT	472	45.00%	0.672	4.2
49	473	AAACGUAUCACCCACGGCCA	TGGCCGTGGGTGATACGTTT	474	55.00%	0.672	8.7
50	475	CCGUAGCUAGUUGAUAAUUC	GAATTATCAACTAGCTACGG	476	40.00%	0.67	6.8
51	477	AUUUGUUUCUACCCCAGCUC	GAGCTGGGGTAGAAACAAAT	478	45.00%	0.67	7.5

FIG. 18 続き

【図１８－３】

52	479	AAUAAGCAUCUCAAGCCGGU	ACCGGCTTGAGATGCTTATT	480	45.00%	0.669	4.2
53	481	UUUGUUUCUACCCCAGCUCU	AGAGCTGGGGTAGAAACAAA	482	45.00%	0.669	7.6
54	483	ACGUAUCACCCACGGCCAUA	TATGGCCGTGGGTGATACGT	484	55.00%	0.669	9.4
55	485	UAAAACCUCAACACCACACA	TGTGTGGTGTTGAGGTTTTA	486	40.00%	0.668	6.7
56	487	GUCCCCUCUUAACCCACACC	GGTGTGGGTTAAGAGGGGAC	488	60.00%	0.667	11.1
57	489	GUCUCAGCUCCAGCCCGUUU	AAACGGGCTGGAGCTGAGAC	490	60.00%	0.663	8.3
58	491	AGUCUCAGCUCCAGCCCGUU	AACGGGCTGGAGCTGAGACT	492	60.00%	0.656	5.3
59	493	AAAACCUCAACACCACACAG	CTGTGTGGTGTTGAGGTTTT	494	45.00%	0.65	8.6
60	495	CCGUAGCUAGUUGAUAAUUU	AATTATCAACTAGCTACGGG	496	40.00%	0.644	8.9
61	497	UAGUGUCCAUGUCUCCGUCU	AGACGGAGACATGGACACTA	498	50.00%	0.644	9.2
62	499	CUCACAACCAUUCACAGCAU	ATGCTGTGAATGGTTGTGAG	500	45.00%	0.643	13.6
63	501	ACAACCAUUUCACAGCAUCAU	ATGATGCTGTGAATGGTTGT	502	40.00%	0.641	12.4
64	503	GCAUUUUGUUAUUCUGUCCC	GGGACAGAATAACAAAATGC	504	40.00%	0.633	8.6
65	505	UCCGUCUGACAGUCUCAGCU	AGCTGAGACTGTCAGACGGA	506	55.00%	0.632	9.5
66	507	CAUUCCAUUUUGUGUCCUCU	AGAGGACACAAAATGGAATG	508	40.00%	0.631	9
67	509	UUAGAGUCCCGUGCUGAUGA	TCATCAGCACGGGACTCTAA	510	50.00%	0.627	6.8
68	511	GUUUUAUUGCACCACAGCAU	ATGCTGTGGTGCAATAAAAC	512	40.00%	0.626	6.1
69	513	UAAGCAUCUCAAGCCGGUAG	CTACCGGCTTGAGATGCTTA	514	50.00%	0.624	6.5
70	515	UGCCCUCACAACCAUUCACA	TGTGAATGGTTGTGAGGGCA	516	50.00%	0.623	11.9
71	517	UAUCACCCACGGCCAUACAG	CTGTATGGCCGTGGGTGATA	518	55.00%	0.621	14.3
72	519	AUGACACCAAGCUAAUUUCC	GGAAATTAGCTTGGTGTCAT	520	40.00%	0.618	9
73	521	UUAUUGCACCACAGCAUAUC	GATATGCTGTGGTGCAATAA	522	40.00%	0.616	6.4
74	523	GCAUGGGCUCUUAGAUUAAU	ATTAATCTAAGAGCCCATGC	524	40.00%	0.616	9.9
75	525	AUUCCAUUUUGUGUCCUCUG	CAGAGGACACAAAATGGAAT	526	40.00%	0.613	11.3
76	527	GGCUAAUCUUUUUUCUUCCC	GGGAAGAAAAAAGATTAGCC	528	40.00%	0.601	14.3
77	528	ACAGAUGCUCGACAGAAGAU	ATCTTCTGTCGAGCATCTGT	530	45.00%	0.6	7.2
78	531	GAUGCUCGACAGAAGAUGUG	CACATCTTCTGTCGAGCATC	532	50.00%	0.599	8.6
79	533	UUGUUUCCUCCAAAAACUCC	GGAGTTTTGGAGGAAACAA	534	40.00%	0.597	9.6
80	535	GUACUUAACCUAUGUAGGCU	AGCCTACATAGGTTAAGTAC	536	40.00%	0.594	6.6

FIG. 18 続き

【配列表】
20225314660000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/031708

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 9/00; C12Q 1/6883 (2020.01)
CPC - C12N 9/0006; C12Q 2600/156; C12Y 101/01014; G01N 2800/52 (2020.05)

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)
see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/0209997 A1 (PHARNEXT) 26 July 2018 (26.07.2018) entire document	1-5, 9
Y	WO 2017/191274 A2 (CUREVAC AG) 09 November 2017 (09.11.2017) entire document	1-3
Y	US 2018/0312828 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 01 November 2018 (01.11.2018) entire document	3
Y	US 6,696,407 B1 (LONGO et al) 24 February 2004 (24.02.2004) entire document	4, 10
Y	US 2018/0085437 A1 (FAN et al) 29 March 2018 (29.03.2018) entire document	5
Y	Il et al. "Redox State-Dependent and Sorbitol Accumulation-Independent Diabetic Albuminuria in Mice With Transgene-Derived Human Aldose Reductase and Sorbitol Dehydrogenase Deficiency," Diabetologia, 14 February 2004 (14.02.2004), Vol. 47, No. 3, Pgs. 541-548. entire document	9
Y	US 6,544,756 B1 (UCHIDA et al) 08 April 2003 (08.04.2003) entire document	10
A	WO 2018/090006 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER et al) 17 May 2018 (17.05.2018) entire document	1-7, 9, 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
15 July 2020	12 AUG 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/031708

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.: 8
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:

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 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.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6827(2018.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6827	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		
Ｃ１２Ｑ	*1/06 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	１３０Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*9/04 (2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/06		
		Ｃ１２Ｎ	9/04	Ｚ	

,RW,SD,SL,ST,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,KM,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

イギリス国 ダブリュシー１イー ６ビーティー ロンドン，ゴーワー ストリート，ユニバーシティ カレッジ ロンドン

(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ザックナー， スティーブン エル．
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３６， マイアミ， エヌダブリュー １０ティーエイチ アベニュー １５０１， バイオメディカル リサーチ ビルディング， エルシー： エム－８６０， ルーム ５２３， ミラー スクール オブ メディシン， ハスマン インスティテュート フォー ヒューマン ゲノミクス 気付

(72)発明者 レベロ， アドリアーナ
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３６， マイアミ， エヌダブリュー ７ティーエイチ アベニュー １９５１， ユニバーシティ オブ マイアミ， エイチアイエイチジー オーガナイズド リサーチ ラボ 気付

(72)発明者 コルティース， アンドレア
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３６， マイアミ， エヌダブリュー １０ティーエイチ アベニュー １５０１， バイオメディカル リサーチ ビルディング， エルシー： エム－８６０， ルーム ５２３， ミラー スクール オブ メディシン， ハスマン インスティテュート フォー ヒューマン ゲノミクス 気付

(72)発明者 ジャイ， ロン グレース
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３６， マイアミ， エヌダブリュー １０ティーエイチ アベニュー １６００， ローゼンティール メッド サイエンス ビルディング， フロア ０６， ルーム ６０６９， エムエスオーエム － モレキュラー アンド セルラー ファーマコロジー

(72)発明者 ハーマン， デイビッド エヌ．
アメリカ合衆国 ニューヨーク １４６４２－０００１， ロチェスター， エルムウッド アベニュ

ー ６０１， エーシー－１， ユニバーシティー オブ ロチェスター メディカル センター， ストロング メモリアル ホスピタル 気付

Ｆターム（参考） 4B050 DD11 LL01
4B063 QA01 QA13 QA17 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ68 QR32 QR35
QR44 QR72 QR77 QS36 QX01
4C084 AA17 NA14 ZA151 ZA152 ZB211 ZB212
4C086 AA01 AA02 BC82 CB05 MA01 MA04 NA14 ZA15