

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4704435号
(P4704435)

(45) 発行日 平成23年6月15日 (2011. 6. 15)

(24) 登録日 平成23年3月18日 (2011. 3. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 P 25/00 (2006. 01)

A 6 1 P 25/00

請求項の数 17 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2007-537361 (P2007-537361)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月22日 (2004. 10. 22)
 (65) 公表番号 特表2008-516628 (P2008-516628A)
 (43) 公表日 平成20年5月22日 (2008. 5. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2004/004504
 (87) 国際公開番号 W02006/043014
 (87) 国際公開日 平成18年4月27日 (2006. 4. 27)
 審査請求日 平成19年10月16日 (2007. 10. 16)

(73) 特許権者 507132558
 ニューレジェニクス リミテッド
 NEUREGENIX LIMITED
 イギリス国 バーミンガム ヴィンセント
 ドライブ バーミンガム リサーチ パ
 ーク
 Birmingham Research
 Park, Vincent Drive
 , Birmingham United
 Kingdom
 (74) 代理人 100075557
 弁理士 西教 圭一郎
 (74) 代理人 100072235
 弁理士 杉山 毅至

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニューロン再生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

R h o - A 阻害経路に關与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するよう
 に構成された低分子干渉核酸 (s i N A) であって、

s i N A 分子は：

5 ' - A A T C T C A C C A T C C T G T G G C T G - 3 ' (S E Q I D N o . 6
) ；

5 ' - A A C C T C A C G C A T C T C T T T C T G - 3 ' (S E Q I D N o . 7
) ；または

5 ' - A A T G A C T C T C C A T T T G G G A C T - 3 ' (S E Q I D N o . 1 10
 0) 、

を含むことを特徴とするジーンサイレンシング分子。

【請求項 2】

R h o - A 阻害経路に關与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するよう
 に構成された低分子干渉核酸 (s i N A) であって、

s i N A 分子は：

5 ' - A A G A T T A T G A C C G T C T G A G G C - 3 ' (S E Q I D N o . 1
 1) ；

5 ' - A A G G A T C T T C G G A A T G A T G A G - 3 ' (S E Q I D N o . 1
 2) ；

5' - A A G G C G G G A G T T A G C C A A A A T - 3' (SEQ ID No. 13) ; または

5' - A A A G A C C A A A G A C G G A G T G A G - 3' (SEQ ID No. 15) 、

を含むことを特徴とするジーンサイレンシング分子。

【請求項3】

s i N A 分子は s i R N A 分子を含むことを特徴とする、請求項1または2に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項4】

s i N A 分子は5 b p ~ 5 0 b p を含むことを特徴とする、請求項1 ~ 3 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項5】

s i N A 分子は5 0 % 未満のG C 含量を含むことを特徴とする、請求項1 ~ 4 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項6】

ジーンサイレンシング分子は、配列番号6または12として識別される配列を含むs i N A であることを特徴とする、請求項1 ~ 5 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項7】

ジーンサイレンシング分子は、神経突起成長を活性化する分子と組合わせて用いられることを特徴とする、請求項1 ~ 6 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項8】

神経突起成長を活性化する分子は神経栄養因子 (N T F) を含むことを特徴とする、請求項7に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項9】

N T F は、C N T F、F G F 2、N G F、N T - 3、N T - 4、B D N F、G D N F、F G F - 1、F G F - 5、C T - 1、C D F、インシュリン、I G F - 1、I G F - 2、I L - 6、L I F、N P F、P D G F、P N - 1、S - 1 0 0、T G F - β および V I P などから成る群から独立に選択されることを特徴とする、請求項8に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項10】

N T F は毛様体神経栄養因子 (C N T F) または線維芽細胞増殖因子2 (F G F 2) であることを特徴とする、請求項9に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項11】

ニューロン生存および軸索成長を促進する薬剤の製造のための、請求項1 ~ 10 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子の使用。

【請求項12】

細胞のアポトーシスを阻害する薬剤の製造のための、請求項1 ~ 11 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子の使用。

【請求項13】

ジーンサイレンシング分子は、神経突起成長阻害性分子の不在下よりも神経突起成長阻害性分子の存在下でニューロン生存および軸索成長を誘導するように構成されることを特徴とする、請求項1 ~ 10 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子。

【請求項14】

治療に効果的な量の請求項1 ~ 10 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子と、薬学的仕様に合った媒体とを含む組成物。

【請求項15】

請求項1 ~ 10 のいずれか1項に記載のジーンサイレンシング分子と、神経栄養成長因子とを含むことを特徴とする、ニューロン生存および軸索成長を促進する組成物。

【請求項16】

10

20

30

40

50

NTFは、CNTF、FGF2、NGF、NT-3、NT-4、BDNF、GDNF、FGF-1、FGF-5、CT-1、CDF、インシュリン、IGF-1、IGF-2、IL-6、LIF、NPF、PDGF、PN-1、S-100、TGF- β およびVIPなどから成る群から独立に選択されることを特徴とする、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

請求項14～16のいずれか1項に記載の組成物を、そのような治療の必要な、ヒト以外の対象へ投与することを含むことを特徴とする、対象のニューロン生存および軸索成長を促進する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

本発明は、ニューロン生存および軸索再生、特に、中枢神経系（CNS）における神経成長の調節に関する。本発明はまた、神経生存を改善して軸索成長を促進するための組成物、およびその組成物の使用方法を提供する。

【0002】

全動物種のCNSおよび末梢神経系（PNS）の両方において、軸索および樹状突起は発育中に盛んに伸長する。しかし、成体において、CNSの軸索および樹状突起の再成長は、進化の経過とともに急速に失われている。PNSにおいて、全脊椎動物種の軸索は、損傷を受けた後に、少なくともある程度再成長することができる。しかし、哺乳類のCNSにおいて、損傷後の軸索再成長は、軸索発芽に限定される。ただし、ニューロン突起の再成長は、下位の脊椎動物種のCNSにおいては可能である。

20

【0003】

グリアは軸索再成長を制御する重要な決定因子である。一般に、哺乳類のグリアは、発育中のCNSおよび成体のPNSにおいて、軸索伸長を許容する。したがって、損傷を受けたとき、成体哺乳類のPNSのグリアは、その初期軸索伸長促進能およびフォスター（foster）再生を再発現することができる。下位の脊椎動物数種のCNSグリアは成体期の軸索再成長を許容している。反対に、成体哺乳類のCNSグリアは損傷後にその発育成長能を再発現しない。

【0004】

神経栄養因子（NTF）が神経系の正常な発育中に存在する。そのような発育中に、ニューロンのターゲット構造は、ターゲット構造内に突出するニューロンの生存、分化および成長に不可欠な限られた量の特定のNTFを産生する。NTFは、成熟ニューロンの生存および／または維持を促進し、CNS損傷後のニューロン再生の主な決定因子である。さらに、末梢神経グリア（シュワン細胞）は、成体PNSにおける損傷後の軸索再生に関与するとされる神経栄養因子（NTF）を産生する。しかし、長期間の実験により、CNSに移植された末梢神経移植片は30日損傷後日数（dpi）を超過するとCNS軸索再生を維持せず、100dpiまでにほとんどの軸索が退化することが実証されており、これはおそらく、末梢神経移植片のシュワン細胞が、おそらく軸索の接触が欠如するため、移植後約20日でNTFの産生を止めるためである。

30

【0005】

CNSミエリンは軸索成長阻害物質の豊富な源であり、ミエリン関連糖たんぱく（MAG）、オリゴデンドロサイトミエリン糖たんぱく（OMgp）、ノゴおよびコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）を含み、それらがノゴ受容体（NgR）に結合することで軸索の成長を阻む。ノゴ受容体は、LINGO-I（LRRおよびIgドメイン含有ノゴ受容体結合たんぱく）および腫瘍壊死因子受容体ファミリーの一員であるp75神経栄養因子受容体（p75^{NTR}）と関係している。後者は、下流のRho-Aを活性化することで阻害性シグナルを変換し、逐次ROCK/LIMキナーゼ/コフィリン介在性アクチンフィラメント脱重合および成長円錐崩壊を導く。したがって、NgR、p75^{NTR}およびRhoA阻害分子は、軸索成長阻害経路の重要な要素を共同で形成する。当然のことながら、ROCK/LIM、コフィリンおよびLINGO-Iなどの他の多数の分

40

50

子もまた、この経路に含まれる。

【0006】

長年にわたる幾多の努力にもかかわらず、CNSの神経再生は治療上達成されていない。たとえば、Loganら（Eur. J. Neurosci., 1994年、第1巻、第6号（3）、355-363頁）は、ニューロン再生が誘導されるかどうかを確かめるために、損傷CNSの形質転換成長因子 $\beta 1$ （TGF $\beta 1$ ）の調節レベルの効果を調査した。TGF $\beta 1$ は状況次第で神経栄養因子であり、また、強力な線維形成因子であり、CSPG（軸索成長阻害性リガンド）を含むマトリックス分子の産生を活性化し、それによって軸索成長阻害経路を調節する可能性を有する。Loganらは、TGF $\beta 1$ が瘢痕形成に加わり、次いで瘢痕形成が瘢痕領域周辺の損傷CNSにおいて、おそらく、そこに含まれるGSPGのような阻害性リガンドを経た活性軸索成長阻害によって、軸索投射成長を制限することを実証した。Loganらは、TGF $\beta 1$ 作用の遮断は瘢痕化を抑制するものの、関連する軸索成長はほとんど、または全く存在しないことを示し、瘢痕形成遮断および何種類かの阻害分子の産生が軸索再生の増進を引き起こさないことを示唆している。

10

【0007】

したがって、CNSにおける神経成長を促進し得る再生治療を提供する明確な必要がある。そのような治療は、損傷または罹患神経が損傷後に生存、再成長、および再び機能することを可能にするために用いられ得る。したがって、本発明者らは、ニューロン阻害経路の調節がNTF活性化ニューロン生存および軸索伸長を増進するかどうかを確かめるために、ニューロン阻害経路に研究の焦点を当てることにした。

20

【0008】

本発明の第1の側面によれば、Rh o-A阻害経路に関与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されたジーンサイレンシング分子が提供される。

【0009】

本発明の第2の側面によれば、薬剤としての利用のために、Rh o-A阻害経路に関与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されたジーンサイレンシング分子が提供される。

【0010】

本発明の第3の側面によれば、ニューロン生存および軸索成長を促進する薬剤の製造ための使用であって、Rh o-A阻害経路に関与するたんぱくをコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されたジーンサイレンシング分子の使用が提供される。

30

【0011】

本発明者らは、様々な生化学的経路について、それらが調節されてニューロン成長に影響を与えるか否かを評価するための調査を行った。我々の調査によって、Rh o-A阻害経路は、調節に関して驚くほど良いターゲットであることが立証された。「Rh o-A阻害経路」という表現によって、我々は、とりわけNgR、p75^{NTR}およびRh o-A阻害分子を含む軸索成長阻害経路を意味する。

【0012】

軸索成長が促進されるかをみるために、本発明者らはRh o-A経路の様々な調節因子を試験し続けたが、成功しなかった（たとえば、上述の説明参照）。しかし、驚いたことに、本発明の第1の側面に従ったジーンサイレンシング分子（たとえばsiNA）の使用は効果的であることが証明され、神経成長を活性化した。さらに、驚いたことに、本発明者らは、本発明に従うジーンサイレンシング分子がニューロン生存の促進にも有用であることを立証した（つまり、それらはアポトーシスによるニューロンの除去を減らす）。したがって、第1の側面の分子は第2の側面に従う医学的用途を有し、より具体的には、第3の側面に従ってニューロン生存および軸索成長を活性化することを示した。

40

【0013】

この薬剤はCNSにおけるニューロン生存および軸索再生を促進するのに用いられるのが好ましい。CNS損傷は、外科手術、精神的外傷、圧迫、挫傷、切断、神経毒性もしくは他の肉体的損傷に、出血性もしくは虚血性損傷を含む血管系薬理もしくは他の損傷に、

50

または神経変性もしくは他の神経系疾患に起因し得る。軸索成長の障害または不全を特徴とする、この薬剤によって治療され得る病気は、好ましくはニューロン損傷を特徴とする。たとえば、その病気は、慢性または急性脳外傷、脊髄損傷、神経毒性、脳梗塞、緑内障、視神経損傷、CNS出血、顔面神経損傷、待機手術によって起こされたもの、神経圧迫、脳震盪、虚血、火傷などである。

【0014】

本発明者らは、本発明に従う分子が、細胞死の増加を特徴とする治療条件に用いられ得ることが立証されたことに最も驚いた。したがって我々は、ニューロン生存が重要な課題である治療条件にも、これらの薬剤を用い得ることを立証した。たとえば薬剤を、認知症、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、運動ニューロン疾患、CJDなどのニューロン変性疾患を治療するために用いることができる。

10

【0015】

本発明の第4の側面によれば、細胞のアポトーシスを阻害する薬剤の製造のための使用であって、Rho-A阻害経路に関与するたんぱくをコードする遺伝子の発現を下方制御させるように構成されたジーンサイレンシング分子の使用が提供される。

【0016】

「ジーンサイレンシング分子」という用語によって、我々は、問題になっている遺伝子の発現を妨げる分子すべてを意味する。そのような分子は、アンチセンス分子（アンチセンスDNAまたはアンチセンスRNA）またはリボザイム分子である。リボザイムおよびアンチセンス分子は、Rho-A阻害経路に関与するペプチドをコードする遺伝子の転写、またはその遺伝子のmRNAの翻訳を阻害するために用いられ得る。アンチセンス分子は、DNAまたはRNAなどの核酸に配列特異的に結合するオリゴヌクレオチドである。相補配列を有するmRNAに結合したとき、アンチセンスRNAはmRNAの翻訳を妨げる。三本鎖分子は、二本鎖DNAに結合して共直線性三本鎖分子を形成する一本鎖アンチセンスDNA鎖によるもので、それによって転写を妨げる。特に有用なアンチセンスヌクレオチドおよび三本鎖分子は、Rho-A阻害経路に関与するペプチドをコードするDNA（またはmRNA）のセンス鎖に相補的であるか、またはそのセンス鎖に結合するものである。

20

【0017】

RNAサブ状態の特異的切断を触媒し得る酵素的RNA分子であるリボザイムの発現もまた、たんぱく翻訳の遮断に用いられる。リボザイムの活性化の機構は、相補的ターゲットRNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションを含み、その後、たとえばハンマーヘッドモチーフリボザイムなどのエンドヌクレアーゼ的切断が続く。

30

【0018】

ジーンサイレンシング分子は低分子干渉核酸（siNA）であるのが好ましい。

本発明に従う分子は、NgR、p75^{NTR}および／またはRhoA阻害分子に関する遺伝子をサイレンシングするのが好ましい。

【0019】

分子がsiNA分子であるとき、それは二本鎖構造であってよく、従ってセンス鎖およびアンチセンス鎖から成る。siNA分子はsiDNA分子から成ってもよく、またはsiRNA分子から成ってもよい。しかし、siNA分子はsiRNA分子から成るのが好ましい。したがって、本発明に従うsiNA分子は、RNA干渉（RNAi）によって遺伝子発現を下方制御するのが好ましい。

40

【0020】

RNAiは、動物および植物における配列特異的転写後ジーンサイレンシングの過程である。これには、二本鎖であり、サイレンシングされる（ターゲット）遺伝子配列に相同である低分子干渉RNA分子（siRNA）が用いられる。したがって、ターゲット遺伝子の転写によって産生されるmRNAに対するsiRNA分子の配列特異的結合によって、遺伝子発現の顕著に特異的なターゲット「ノックダウン」が可能になる。

【0021】

50

1つの実験的アプローチとして、本発明者らは、Rho-A阻害経路の調節に対する siRNA分子の効果を試験する目的で、多数の siRNA分子を設計し産生した。驚いたことに、本発明者らは、Rho-A阻害経路に参与する様々なたんぱくに配列特異性を示す様々な siRNA分子を使用することが、その経路の脱阻害、ならびに軸索成長の改善およびニューロン生存の改善をももたらすことを発見した。これによって我々は、本発明に従う分子の使用が、軸索伸長の脱阻害の内生機構およびニューロン生存の改善をも増進するための有用な技術であると考えに至った。

【0022】

Rho-A阻害経路に参与するペプチドをコードする遺伝子を、ターゲット遺伝子とみなすことができる。 siRNA分子は、ターゲット遺伝子の下方制御を可能とするターゲット遺伝子のコード配列の少なくとも1領域と実質的に一致するのが好ましい。好ましくは、 siRNA分子の配列とターゲット遺伝子の領域との相同性は少なくとも60%の配列相同性であり、好ましくは少なくとも75%の配列相同性、好ましくは少なくとも85%の相同性、少なくとも90%の相同性、少なくとも95%の相同性、少なくとも97%の相同性、最も好ましくは少なくとも99%の相同性である。

【0023】

異なるアミノ酸／ポリペプチド／核酸配列間の相同性割合の算出は、以下のように行うことができる。初めに、多重アラインメントをClustalXプログラムによって作成する（ペアワイズパラメータ：ギャップオープニング 10.0、ギャップエクステンション 0.1、たんぱくマトリックス ゴネット250、DNAマトリックス IUB；多重パラメータ：ギャップオープニング 10.0、ギャップエクステンション 0.2、ディレイ発散配列 30%、DNA転位重 0.5、ネガティブマトリックス オフ、たんぱくマトリックス ゴネットシリーズ、DNA重 IUB；たんぱくギャップパラメータ：残基特異的ペナルティ オン、親水性ペナルティ オン、親水性残基 GPSNDQERK、ギャップセパレーションディスタンス 4、エンドギャップセパレーション オフ）。その後、多重アラインメントから相同性割合を $(N/T) \times 100$ として算出する。ここで、Nは2配列が相同残基を共有する位置の数で、Tは比較した位置の総数である。また、相同性割合を $(N/S) \times 100$ として算出することも可能である。ここで、Sは比較したうちの短い方の配列の長さである。アミノ酸／ポリペプチド／核酸配列は新たに合成されてもよく、天然アミノ酸／ポリペプチド／核酸配列またはその誘導体であってもよい。

【0024】

十分に類似するヌクレオチド配列は、厳しい条件の下、ここで言及した核酸配列またはそれらの相補体のいずれかとハイブリダイズする配列によってコードされるであろう。厳しい条件について、我々は、ヌクレオチドが、およそ45℃の6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中で、その後のおよそ5～65℃の0.2×SSC／0.1% SDS中での少なくとも1回の洗浄によって、フィルタ結合DNAまたはRNAにハイブリダイズすることを意味する。あるいは、十分に類似するポリペプチドは、少なくとも1つ、かつ、5, 10, 20, 50または100未満のアミノ酸において、本発明に従うペプチド配列と異なってもよい。

【0025】

遺伝コードの縮重に起因して、どんな核酸配列も、それがコードするたんぱくの配列に実質的に影響を及ぼすことなく変異または変化されて、その機能変異体を与え得ることは明らかである。適したヌクレオチド変異体は、配列内の同じアミノ酸をコードする異なるコドンの置換によって変化した配列を有し、したがってサイレント変化を起こすものである。他の適した変異体は、相同ヌクレオチド配列を有するが、置換するアミノ酸と類似する生物物理的性質の側鎖を持つアミノ酸をコードする異なるコドンの置換によって変化したすべてのまたは一部の配列を含み、保存性変化を起こすものである。たとえば、小型で非極性の疎水性アミノ酸には、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリンおよびメチオニンが含まれ、大型で非極性の疎水性アミノ酸には、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンが含まれ、極性の中性アミノ酸には、セリン、トレ

オニン、システイン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれ、正荷電（塩基性）アミノ酸には、リジン、アルギニンおよびヒスチジンが含まれ、負荷電（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。

【0026】

たんぱくまたはDNA配列の正確なアラインメントは複雑な過程であり、多くの研究者によって詳細に調査されてきた。配列の最適な適合とそのような適合を得るためのギャップの導入との間のトレードオフが特に重要である。たんぱくの場合、適合を評点する手段もまた重要である。他の、同等に適用できるマトリックスが当該技術の熟練者に良く知られているであろうが、PAMマトリックス（たとえば、Dayhoff, M.ら、1978年、Atlas of protein sequence and structure, Natl. Biomed. Res. Found.）およびBLOSUMマトリックスのファミリーが、保存性置換の性質および可能性を定量化し、多重アラインメントアルゴリズムにおいて用いられる。一般的な多重アラインメントプログラムであるClustalWおよびそのウィンドウズ（登録商標）バージョンClustalX（Thompsonら、1994年、Nucleic Acids Research、第22巻、4673-4680頁；Thompsonら、1997年、Nucleic Acids Research、第24巻、4876-4882頁）は、たんぱくおよびDNAの多重アラインメントを作成するのに効果的な方法である。

10

【0027】

しばしば、自動的に作成されるアラインメントは、たとえば重要な保存サイトの生物学的知識といった、研究されるたんぱくファミリーについての熟練したユーザの知識を活用する手動のアラインメントを必要とする。そのようなアラインメントエディタプログラムの1つにAlign（<http://www.gwdg.de/~dhepper/download/>、Hepperle, D.、2001年、Multicolor Sequence Alignment Editor、Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries、16775 シュテッヒリン、ドイツ）があるが、JalView、Cinemaなど他のものも適している。

20

【0028】

たんぱく間の相同性割合の算出は、Clustalによる多重アラインメントの作成中に行われる。しかし、アラインメントを手動で改良する場合には、または2つの配列を念に比較するために、これらの値を再算出する必要がある。アラインメント内のたんぱく配列のペアに関してこの値を算出するプログラムは、PHYLI P系統学パッケージソフトウェア（Felsenstein、<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>）内のPROTDISTを含み、アミノ酸置換（P）のモデルとして「Similarity Table」オプションを用いる。DNA/RNAについて、同一のオプションがPHYLI PのDNADISTプログラム内に存在する。

30

【0029】

好ましい実施形態において、分子はsiNA分子であり、およそ5bp～50bp、より好ましくは10bp～35bp、さらに好ましくは15bp～30bp、さらに好ましくは18bp～25bpの間で構成される。siNA分子は20bp～23bpの間であるのが好ましく、より好ましくはsiNA分子は21bpまたは22bpで構成される。最も好ましくは、siNA分子は22bp未満で構成される。

40

【0030】

適したsiNA分子の設計は複雑な過程であり、ターゲットmRNA分子の配列のかなり注意深い分析を含む。その後、かなりの発明努力をして、本発明者らは、RNA干渉を誘導するのに必要とされる類似性および安定性を有するであろう、あるヌクレオチド塩基組成を有するsiRNAの確定した配列を選択しなければならない。

【0031】

したがって、適するsiNA配列が決定され得るようにするために、ターゲットmRNAをコードするであろうターゲット遺伝子のターゲット領域を決定すべく、初めにそのコード配列を発明者らはスキャンした。ターゲット配列のターゲット領域はジアデニン開始配列および最大60%のGC含量を含むのが好ましい。分子は50%未満のGC含量を含

50

むのが好ましい。s i N A分子のアンチセンス鎖は、5'末端で選択されたターゲット遺伝子のmRNA配列の対応DNAによって設計された。

【0032】

s i N A分子は新たに合成されるか、微生物によって産生されてもよい。たとえばs i N A分子は、たとえばE. coliといった細菌によって産生されてもよく、その場合、s i N A分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の3'末端は、5'-CCTGTC TC-3'の8ヌクレオチド配列を含むのが好ましい。これは、s i N A分子の効率的な転写に必要とされる、T7プロモータプライマーの相補配列に一致する。この8ヌクレオチド配列は、ターゲット遺伝子を下方制御するs i N A分子の使用前に除去されることが好ましい。

10

【0033】

特に好ましいs i N A分子配列は、p75^{NTR}受容体をコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されており、以下の配列を含む。

【0034】

p75^{NTR}配列

配列1、 5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3' (SEQ ID No. 1) ;

配列2、 5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3' (SEQ ID No. 2) ;

配列3、 5'-AAGAGACCAGGAGCATTTGTAC-3' (SEQ ID No. 3) ;

20

配列4、 5'-AAGAACCAGAGCCATGCACTC-3' (SEQ ID No. 4) ; および

配列5、 5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3' (SEQ ID No. 5) 。

【0035】

当然のことながら、そのようなs i N Aはウラシル (s i RNA) またはチミン (s i DNA) を含む。

【0036】

本発明者らは、実施例1および実施例2に記載される方法によって、これら5つのs i N A分子をそれぞれ試験した。

30

【0037】

本発明の重要な特徴は、本発明に従うジーンサイレンシング分子を他の分子と組合わせて用いてもよいことで、軸索成長およびニューロン生存に驚くべき相乗効果を及ぼす神経突起成長を想定している。これら試薬は単独で使用されると中程度かわずかな効果を及ぼすが、試薬を組合わせると劇的に神経再生を改善することができる。適した成長活性剤の例にはあらゆるNTF (TRK依存またはTRK非依存性) が含まれ、たとえば毛様体神経栄養因子 (CNTF) または線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) がある。当然のことながら、CNTFは網膜神経節細胞 (RGC) における神経突起の効果的な成長活性剤であり、FGF2は後根神経節神経 (DRGN) における神経突起の効果的な成長活性剤である。分子と組合わせて用いられ得る他のNTFには、NGF、NT-3、NT-4、BDNF、GDNF、FGF-1、FGF-5、CT-1、CDF、インシュリン、IGF-1、IGF-2、EL-6、LIF、NPF、PDGF、PN-1、S-100、TGF-βおよびVIPが含まれる (Oppenheim、1996年、Neuron、第17巻、195-197頁) 。

40

【0038】

実施例1は、阻害性CNSミエリン存在下でCNTFによって処理された培養網膜神経節細胞 (RGC) におけるp75^{NTR}mRNAに対して、s i N A分子を供給する試験パラダイムを記載している。本発明者らは、図1に示されるように、CNTFとの組合せにおいて、SEQ ID No. 1~5で識別される上記s i N A分子のそれぞれが、阻害性CNSミエリン存在下でのRGCにおけるニューロン生存および神経突起生成を誘導

50

するということを発見して驚いた。5つの s i N A 分子のうち4つ (S E Q I D N o . 2 以外のすべて) によって誘導される神経突起生成の範囲は、ミエリン不在下および C N T F 存在下で誘導されるそれに匹敵した。各配列は、p 7 5 ^{N T R} をコードする遺伝子の発現を下方制御 (ノックダウンとしても知られる) し、それによって下流のシグナル応答要素を下方制御することによって神経突起伸長経路の脱阻害を示した (つまり、阻害性ミエリンの効果を妨げた)。

【0039】

さらに驚くべきことは、S E Q I D N o . 2 を有する s i N A 分子が p 7 5 ^{N T R} を下方制御し、(a) 神経突起を有する R G C 数、(b) 平均神経突起長、および有意に促進された (c) R G C 生存、において有意な増加を誘導することであった。したがって、S E Q I D N o . 2 は、他の4つの s i N A が誘導したように経路の脱阻害を誘導するだけでなく、ミエリン不在下で活性化されるよりも大きな神経成長を誘導することも可能であった。S E Q I D N o . 2 が、知られていない何らかの機構によって、ミエリン不在下でみられる以上の成長を活性化することができたのであるから、これは特に驚くべきことである。これは、分子がミエリン以外の阻害剤を脱阻害したためであるかも知れない。

【0040】

したがって、s i N A 分子は S E Q I D N o . 2 を含むのが特に好ましく、この分子を臨床用途のために N T F と組み合わせることが特に好ましい。

【0041】

当然のことながら、S E Q I D N o . 2 は4つの連続チミン塩基を含む。本発明者らは当初、これは R N A i 計画において問題になり得ると考えた。これは、s i N A 分子における4つの連続チミン塩基が転写終結配列によく似ており、それによって s i N A 鋳型から R N A ポリメラーゼが分離し、s i N A の転写を終結させると我々が考えたからである。幸運なことに、そのようなことはなく、好ましい s i N A は、細菌内で効率的に合成されるだけでなく、p 7 5 ^{N T R} の下方制御において非常に効果的である。

【0042】

したがって本発明者らは、p 7 5 ^{N T R} の s i R N A 介在性ノックダウンが、R G C における C N T F 活性化神経突起伸長の脱阻害をもたらすことを示した。

【0043】

本発明者らは同じ5つの s i N A 分子についてさらに試験を行った。実施例2は、阻害性 C N S ミエリン存在下で F G F 2 によって処理された培養後根神経節神経 (D R G N) における p 7 5 ^{N T R} m R N A に対して、同じ5つの s i N A 分子を供給することを記載している。当然のことながら、F G F 2 は D R G N において神経突起生成を促進し、したがって D R G N における神経突起の陽性成長活性剤として機能する。上記のように、C N S ミエリンは神経突起生成を阻害するように作用した。また本発明者らは、各 s i N A 分子が D R G N の細胞生存を増大させ、軸索成長を促進することも発見して驚き、最も効果的な s i N A 分子は S E Q I D N o . 2 を有していた。しかし、S E Q I D N o . 2 は、他の4つの s i N A が誘導したように経路の脱阻害を誘導するだけでなく、ミエリン不在下で活性化されるよりも大きな神経成長を誘導することも可能であった。S E Q I D N o . 2 が、知られていない何らかの機構によって、ミエリン不在下でみられる以上の成長を活性化することができたのであるから、これは特に驚くべきことである。これは、分子がミエリン関連分子以外の阻害剤を脱阻害したためであるかも知れない。

【0044】

したがって本発明者らはまた、p 7 5 ^{N T R} の s i R N A 介在性ノックダウンが D R G N における F G F 2 活性化神経突起伸長の脱阻害をもたらすことを実証した。

【0045】

特に好ましい s i N A 分子配列は、N g R をコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成され、以下の配列を含む。

【0046】

N g R 配列

配列 1、 5'-A A T C T C A C C A T C C T G T G G C T G-3' (SEQ ID No . 6) ;

配列 2、 5'-A A C C T C A C G C A T C T C T T T C T G-3' (SEQ ID No . 7) ;

配列 3、 5'-A A T C A G C T C A C T G A T G A G G A G-3' (SEQ ID No . 8) ;

配列 4、 5'-A A A T G C A C T C A A G G G A C G T G T-3' (SEQ ID No . 9) ; および

配列 5、 5'-A A T G A C T C T C C A T T T G G G A C T-3' (SEQ ID No . 10) 。 10

【0047】

本発明者らは、実施例 2 に記載される方法によって、上記 s i N A 分子をそれぞれ試験した。実施例 2 は、阻害性 C N S ミエリン（成長阻害剤）存在下で線維芽細胞増殖因子 2（F G F 2）と呼ばれる N G F によって処理された培養 D R G N における N g R m R N A に対して、上記 5 つの s i N A 分子を供給することを記載している。本発明者らは、各 s i N A 分子が D R G N の神経突起生成を増大させることを発見し、最も効果的な s i N A 分子は S E Q I D N o . 6 を有していた。驚いたことに、S E Q I D N o . 6 は、阻害性 ミエリン 不在下よりも ミエリン 存在下で軸索成長をより活性化した。

【0048】 20

したがって、s i N A 分子は S E Q I D N o . 6 を含むのが特に好ましい。

したがって本発明者らはまた、N g R の s i R N A 介在性ノックダウンが、D R G N における F G F 2 活性化神経突起伸長の脱阻害をもたらすことを実証した。

【0049】

特に好ましい s i N A 分子配列は、R h o - A 分子をコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成され、以下の配列を含む。

【0050】R h o - A 配列

配列 1、 5'-A A G A T T A T G A C C G T C T G A G G C-3' (SEQ ID No . 11) ; 30

配列 2、 5'-A A G G A T C T T C G G A A T G A T G A G-3' (SEQ ID No . 12) ;

配列 3、 5'-A A G G C G G G A G T T A G C C A A A A T-3' (SEQ ID No . 13) ;

配列 4、 5'-A A T G A A G C A G G A G C C G G T A A A-3' (SEQ ID No . 14) ; および

配列 5、 5'-A A A G A C C A A A G A C G G A G T G A G-3' (SEQ ID No . 15) 。

【0051】

本発明者らは実施例 2 に記載される方法によって、上記 s i N A 分子をそれぞれ試験した。上述したように、本発明者らは各 s i N A 分子が D R G N の神経突起生成を増大させることを発見し、最も効果的な s i N A 分子は S E Q I D N o . 12 を有していた。本発明者らは、各 s i N A 分子が D R G N の細胞生存を増大させ、軸索成長を促進することを発見して驚き、最も効果的な s i N A 分子は S E Q I D N o . 2 を有していた。しかし、S E Q I D N o . 12 は、（他の s i N A が誘導したように）経路の脱阻害を誘導するだけではなく、ミエリン不在下で活性化されるよりも大きな神経成長を誘導することも可能であった。S E Q I D N o . 12 が、知られていない何らかの機構によって、ミエリン不在下でみられる以上の成長活性化もできるようなので、これは特に驚くべきことである。これは、分子がミエリン関連分子以外の阻害剤を脱阻害したためであるかも知れない。 40 50

【0052】

したがって、s i N A分子はSEQ ID No. 12を含むのが特に好ましい。

したがって本発明者らは、本発明に従う分子によるジーンサイレンシングがニューロン生存および軸索成長を改善するのに用いられ得ることを示した。分子は、Ng R、p 7 5^{N T R}および／またはRh o-Aのいずれかのノックダウンを仲介するs i R N A分子であることが望ましい。本発明に従う分子はN T F（たとえばF G F 2）と組合わせて用いられるのが最も好ましい。この場合、本発明に従う分子はN T F活性化軸索成長と、驚いたことにニューロン生存とを脱阻害するのに顕著に効果的である。本発明者らは、F G F 2活性化D R G Nにおいて、p 7 5^{N T R}、Ng RおよびRh o-Aのノックダウンが、C N Sミエリン存在下で神経突起伸長をそれぞれ5倍、3.5倍および6.5倍促進することを発見した。p 7 5^{N T R}およびNg Rのs i N A介在性ノックダウン後よりも、Rh o-Aのs i N A介在性ノックダウン後の方が、神経突起は長く成長した。これは、Rh o-Aサイレンシングが生体内でC N S軸索再生を促進するのに特に効果的な脱阻害戦略であり得ることを示唆している。したがって、本発明に従うs i N A分子はSEQ ID No. 12であることが特に好ましい。本発明者らは、いかなる仮説によって制約されることなく、Rh o Aのサイレンシングが、一おそらく、未だ明確にされていないフィードバックループによってーシグナル伝達経路の上流成分の驚くべきサイレンシングを導いていると考えている。

10

【0053】

本発明の第5の側面によれば、Rh o-A阻害経路に関与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されたジーンサイレンシング分子が提供され、分子は、神経突起成長阻害分子の不在下よりも阻害分子の存在下においてより多くのニューロン生存および軸索成長を誘導するように構成されることを特徴とする。

20

【0054】

「より多くのニューロン生存および軸索成長」という表現によって、我々は、神経突起成長阻害分子が存在しないときと比較して、同分子が存在するときにより誘導レベルが高く達成されることを意味する。

【0055】

好ましくは、第5の側面に従う分子は、以前名づけられたミエリン関連分子などの神経突起成長阻害分子の存在下で活性が阻害されるN T F（たとえばF G F 2またはC N T F）と組合わせて用いられてもよい。本発明の第5の側面に従う分子は、指摘されたミエリン関連分子などの神経突起成長阻害分子によって誘導されるN T F活性化軸索成長の阻害を無効にするだけでなく、阻害分子の不在下でみられるよりもニューロン生存および軸索成長を驚くほど大きく活性化するであろう。たとえば、その効果は、神経突起が神経突起成長阻害分子不在下（たとえばミエリン剥離C N Sニューロン）でN T Fによって活性化される対照実験でみられるよりも大きい。

30

【0056】

第5の側面に従う分子はs i N A分子を含み、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 6またはSEQ ID No. 12として識別される配列のs i R N A分子群から選択されるのが好ましい。

40

【0057】

本発明のあらゆる側面に従って用いられるジーンサイレンシング分子は核酸であることが好ましい（たとえばs i R N Aまたはアンチセンスまたはリボザイム）。そのような分子は（必ずではないが）治療対象の細胞のD N Aに組込まれ得る。未分化細胞はジーンサイレンシング分子によって安定的に形質転換され、遺伝子組換え娘細胞の産生を導くであろう（その場合、たとえば特定の転写因子または遺伝子活性剤による対象内の発現調節が必要となるであろう）。

【0058】

ジーンサイレンシング分子は、新たに合成されて、（たとえばR N A干渉によって）ジーンサイレンシングを誘導するのに十分な量でターゲット細胞に導入されてもよい。ある

50

いは、分子はたとえばE. coliといった微生物によって産生されて、その後ジーンサイレンシングを誘導するのに十分な量でターゲット細胞に導入されてもよい。

【0059】

分子は、ジーンサイレンシング配列をコードする核酸を含むベクターによって産生されてもよい。ベクターは、核酸の発現を制御および／または増大させることのできる要素を含んでもよい。ベクターは組換えベクターであってもよい。ベクターは、たとえばプラスミド、コスミド、ファージまたはウイルスDNAを含んでもよい。ジーンサイレンシング分子を合成するのにベクターを用いるに加えて、またはその代わりに、ターゲット細胞をジーンサイレンシング配列によって形質転換する運搬システムとして、ベクターを用いてもよい。

10

【0060】

また、組換えベクターは他の機能要素を含んでもよい。たとえば、組換えベクターを、ベクターがターゲット細胞において自己複製するように設計することができる。この場合、核酸複製を誘導する要素が組換えベクター中に必要とされるかもしれない。あるいは、組換えベクターを、ベクターと組換え核酸分子とが一体化してターゲット細胞のゲノムになるように設計してもよい。この場合、（たとえば相同組換えによって）目的とする一体化に有利にはたらく核酸配列が望ましい。また、組換えベクターは、クローニング工程における選択マーカーとして用い得る遺伝子をコードするDNAを有してもよい。

【0061】

また、組換えベクターは、必要に応じて、核酸の発現を制御するプロモータまたはレギュレータまたはエンハンサを含んでもよい。組織特異的プロモータ／エンハンサ要素を、たとえばCNSニューロンといった特定の細胞型における核酸の発現を調節するのに用いてもよい。プロモータは構成性でも誘導性でもよい。

20

【0062】

あるいは、ジーンサイレンシング分子を、ベクターに組込んで、または組込まずに、ターゲット細胞または対象に投与することができる。たとえば、分子はリポソームまたはウイルス粒子（たとえば、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ワクチンウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなど）に組込まれてもよい。あるいは、「裸の」siNAまたはアンチセンス分子を、たとえば直接のエンドサイトーシス摂取といった適当な手段によって対象の細胞に挿入してもよい。

30

【0063】

ジーンサイレンシング分子を、トランスフェクション、感染、マイクロインジェクション、細胞融合、プロトプラスト融合またはバリスティックボンバードメント (ballistic bombardment) のいずれかによって治療対象の細胞に運搬してもよい。たとえば、運搬は、被覆金粒子によるバリスティックトランスフェクション、siNA分子を含むリポソーム、ジーンサイレンシング配列を含むウイルスベクター（たとえばSEQ ID No. 2, 6または12を含むアデノウイルス）、または直接ジーンサイレンシング分子を適用して直接の核酸摂取（たとえばエンドサイトーシス）を与える手段によってなされてもよい。

【0064】

本発明の好ましい実施形態において、siNA分子は（ベクターに入れられて、または「裸」で）ターゲット細胞に供給され、その後、複製を宿主細胞に頼り、それによって治療に効果的なレベルに達する。この場合、siNA（たとえばSEQ ID No. 2, 6または12）が細胞中で転写され、その後Rho-A経路に含まれるたんぱくをコードする内生mRNAの翻訳を阻害することができる発現カセットにsiNAを組込むのが好ましい。

40

【0065】

当然のことながら、本発明に従うジーンサイレンシング分子を単剤治療（たとえば、本発明に従うsiNAの使用によるニューロン生存および軸索成長の活性化）に用いてもよい。しかし、本発明に従う分子を、軸索成長の活性化に用いられる公知の治療の補助とし

50

て、公知の治療と併用して用いてもよい。併用治療はジーンサイレンシング分子およびNTF（たとえばFGF2またはCNGF）を含むことが特に好ましい。

【0066】

本発明に従うジーンサイレンシング分子を、多くの異なる型を有する組成に、特にその組成が用いられる様式に依存して、組込んでもよい。したがって、たとえば組成物は、カプセル、液体、軟膏、クリーム、ゲル、ヒドロゲル、エアロゾル、スプレー、ミセル、経皮貼布、リポソームの性状で、または軸索成長の障害を特徴とする病状を患っているヒトまたは動物に投与される他の適当な性状であればよい。当然のことながら、本発明の組成物の媒体は、それを与える対象がよく耐え得るべきで、軸索成長および／または改善したニューロン生存を必要とするターゲットサイトに分子を送達することができるのが好ましい。

10

【0067】

本発明に従うsiNAを含む組成物は、様々な方法で用いることができる。たとえば、全身投与が必要になるかもしれず、その場合、化合物はたとえば血流に注射されることで投与される組成物に含まれる。注射は静脈内（ボラスまたは注入）、皮下（ボラスまたは注入）、脳室内またはくも膜下でよい。

【0068】

化合物は（たとえば鼻腔内）吸入によって投与されてもよい。

また、ジーンサイレンシング分子は、緩やかな、または遅延型の放出装置内に組込まれてもよい。そのような装置は、たとえば、CNS損傷サイトに挿入されてもよく、分子は数週間または数カ月にわたって放出されてもよい。そのような装置は、本発明に従うジーンサイレンシング分子による長期間の治療が必要とされ、本来なら頻繁な投与（たとえば少なくとも連日注射）が必要になる場合に、特に有利である。

20

【0069】

当然のことながら、必要とされるジーンサイレンシング分子の量は、その生物活性および生体利用率によって決定され、生体利用率は投与様式、用いられる分子の物理化学特性、および単剤治療としてかNTFとの併用治療において用いられるかに依存する。また、投与頻度は、上述の因子と、特に治療対象内における分子の半減期とに影響されるであろう。

【0070】

最適な投与用量は当該技術における熟練者によって決定されればよく、使用時の特定のジーンサイレンシング分子、製剤の力価、投与様式および病状の進行度または重症度、ならびに軸索成長に必要とされる緊急性によって変動するであろう。対象の年齢、体重、性別、食習慣および投与時期を含む特定の治療対象に依存するさらなる因子が、用量を調整する必要をもたらすであろう。

30

【0071】

製薬業界で従来用いられたような公知のやり方（たとえば生体内実験、臨床試験など）が、本発明に従う使用および（ジーンサイレンシング分子の日用量、投与頻度などの）正確な治療計画のための特定の調合を確立するのに用いられ得る。

【0072】

一般に、本発明に従うジーンサイレンシング分子の、体重1kgあたり0.01μg～0.5gの日用量が、軸索成長の活性化（およびニューロン生存の促進）に用いられ得、用いられる特定のジーンサイレンシング分子に依存する。より好ましくは、日用量は、体重1kgあたり0.01mg～200mg、より好ましくはおよそ0.1mg～100mg、さらに好ましくは約1mg～10mgである。

40

【0073】

分子（たとえばsiNAまたはアンチセンス）が細胞に送達されるとき（そしてターゲット細胞における新たな合成は必要とされない）、日用量は単独投与（たとえば1日1回の注射）として与えられてもよい。概して、治療に効果的な用量として、単回投与あたりジーンサイレンシング分子の約1ng～100μg/kgを、好ましくは投与あたり2n

50

g～50ngを規定すべきである。

【0074】

あるいは、分子は1日で2回以上の投与を必要とするかもしれない。例として、本発明に従うs i N Aは、(体重を70kgと想定して) 0.1mg/kg～10mg/kgの2回(または症状の程度に依存してそれ以上)の日用量として投与されてもよい。治療を受ける患者は、1回目の用量を起床時に、(もし2回の用量計画なら)その後2回目の用量を夕刻に、またはその後3または4時間の間隔で摂取してもよい。あるいは、反復投与する必要なしに患者に最適な用量を与えるために、徐放装置を用いてもよい。

【0075】

第6の側面によれば、治療に効果的な量の本発明の第1の側面に従うジーンサイレンシング分子と、薬学的仕様に合った媒体とを含む組成物が提供される。

10

【0076】

1つの実施形態においては、本発明の第6の側面に従う組成物は約0.01μg～0.5gのジーンサイレンシング分子を含むのがよい。より好ましくは、組成量は、0.01mg～200mg、より好ましくはおよそ0.1mg～100mg、さらに好ましくは約1mg～10mgのジーンサイレンシング分子である。最も好ましくは、組成物はおよそ2mg～5mgのジーンサイレンシング分子を含む。

【0077】

好ましくは、組成物はおよそ0.1%(w/w)～90%(w/w)のジーンサイレンシング分子、より好ましくは、1%(w/w)～10%(w/w)のジーンサイレンシング分子を含む。組成物の残りは媒体を含むのがよい。

20

【0078】

本発明は、治療に効果的な量の本発明に従うジーンサイレンシング分子と、薬学的仕様に合った媒体とを組合わせることを含む薬剤組成物の調製プロセスを提供する。

【0079】

「治療に効果的な量」とは、対象に投与されたとき、軸索成長およびニューロン生存を活性化する本発明の第1または第4の側面に従う分子の量である。

【0080】

「対象」は脊椎動物、哺乳類、家畜またはヒトであるのがよい。

ここで言う「薬学的仕様に合った媒体」は、薬剤組成物を調合するのに有用な当該技術における熟練者に公知の生理学的媒体すべてである。

30

【0081】

好ましい実施形態において、薬剤媒体は液体であり、薬剤組成物は溶液の性状をしている。別の実施形態において、薬剤媒体はゲルであり、組成物はクリームなどの性状をしている。

【0082】

滅菌溶液または懸濁液である液体の薬剤組成物は、たとえば筋肉内、くも膜下、硬膜外、腹腔内、静脈内、特に皮下、大脳内または脳室内注射によって利用され得る。s i N Aは、滅菌水、生理食塩水または他の適した滅菌注射媒体を用いて投与時に溶解または懸濁される滅菌固体組成物として調製されてもよい。媒体は、必要で不活性な結合剤、懸濁化剤、滑剤、香味料、甘味料、防腐剤、着色剤および被覆剤を含むことが意図されている。

40

【0083】

ジーンサイレンシング分子とN T Fとの組合せは本発明の重要な特徴を表わす。したがって本発明者らは、これら2つの有効成分の組合せが損傷組織におけるニューロン成長の誘導および細胞生存の促進に特に有益であることを発見したことになる。

【0084】

したがって、本発明の第7の側面によれば、ニューロン生存および軸索成長を促進するための組成物であって、R h o - A 阻害経路に参与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されたジーンサイレンシング分子と、神経栄養成長因子とを含む組成物が提供される。

50

【0085】

第7の側面に従う組成物はCNS損傷を患っている個体を治療するのに用いられる。

第8の側面によれば、対象のニューロン生存および軸索成長を促進する方法であって、Rh-A阻害経路に關与するペプチドをコードする遺伝子の発現を下方制御するように構成されたジーンサイレンシング分子と、NTFとを含む組成物を、そのような治療の必要な対象へ投与することを含む方法が提供される。

【0086】

適当な神経栄養成長因子の例には、CNTF、FGF2、NGF、NT-3、NT-4、BDNF、GDNF、FGF-1、FGF-5、CT-1、CDF、インシュリン、IGF-1、IGF-2、IL-6、LIF、NPF、PDGF、PN-1、S-100、TGF-β およびVIPなどがある（Oppenheim、1996年、Neuron、第17巻、195-197頁）。

10

【0087】

NTFの量は、体重1kgあたりおよそ0.01μg〜0.5g、より好ましくは約0.1mg〜10mgであるのがよい。

【0088】

ジーンサイレンシング分子はアンチセンス分子または低分子干渉核酸（siNA）を含んでもよい。

【0089】

ここで記述した特徴のすべて（付随する請求項、要約および図面を含む）および／または開示した方法またはプロセスのすべての工程は、上記側面のいずれかとあらゆる組合せで組合わされてもよいが、それらの特徴および／または工程の少なくともいくつかが相互に排他的である組合せは除かれる。

20

【0090】

本発明のより詳しい理解のために、そして本発明の実施形態がどのようにして機能するのかを示すために、添付図面を参照して説明する。

【0091】

実施例1材料および方法成体網膜の培養

30

成体ラット（6〜8週齢）の頸椎脱臼による殺後、網膜を切開によって取出し、パバインシステム（Worthington Biochem社、ニュージャージー州、米国）を用いてメーカーのプロトコルに従って分離した。RGCを含む 2×10^6 個の分離網膜細胞を、補足ニューロベサル-A（Invitrogen社）培地中で、4ウェル組織培養プレート（Nunc社、英国）の、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ポリ-D-リジン（Sigma社、ドーセット州、英国）および $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ メロシン（Chemicon社、ハロー、英国）でプレコートされたガラスカバースリップ上で、4日間、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の湿潤環境で培養した。

【0092】

siRNA調製とトランスフェクション

ターゲット特異的siRNA二本鎖を設計するために、NCBI系統番号NM012610であるラットp75^{NT}R mRNAのオープンリーディングフレームから、Elbashir および共同研究者によって設定された基準（Nature、第411巻、494-498頁）を用いて、p75^{NT}Rに対する5つのsiRNA配列を選択した。オリゴヌクレオチドの鋳型および対照のスクランブル配列を化学的に合成し（Alta Biosciences社、Birmingham大学、英国）、siRNA配列をサイレンサーsiRNAコンストラクションキット（Ambion社、テキサス州、米国）を用いて構築した。

40

使用したsiRNA配列は以下のとおりであった：

【0093】

p75^{NT}R配列：

配列1、5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3'；

50

配列 2、 5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3';
配列 3、 5'-AAGAGACCAGGAGCATGTAC-3';
配列 4、 5'-AAGAACCAAGAGCCATGCCTC-3'; および
配列 5、 5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3'。

【0094】

スクランブル配列は以下のとおりであった：

アンチセンス 5'-AATCGCATGCGTTCCATTTTCGCCCTGTCTC-3';

センス 5'-AACGAAATGGAACGCA TGCGACCTGTCTC-3'。

【0095】

RGCを、4ウェル組織培養プレート（Nunc社）において、オリゴフェクタミン試薬（Invitrogen社）を用いてメーカー（Invitrogen社）の取扱説明書に従い、siRNAによってトランスフェクトした。トランスフェクションの5時間後、細胞の溶解および免疫組織化学の前に、補足ニューロベイスル-Aを加え、CNSミエリン（N. Gregson氏、London大学Kings College、英国からの寄贈）の存在／不在下で、さらに72時間インキュベートした。

【0096】

抗体

モノクローナルβ-IIIチューブリン（1：100）およびポリクローナル抗p75^{NTR}（1：500）は両方ともSigma社、プール、英国由来のもので、モノクローナル192-Ig（免疫組織化学で1：100、ウェスタンブロットで1：500）をOncogene Research Products社、サンディエゴ、米国から購入した。免疫組織化学（1：200）およびウェスタンブロット（1：200）によってRhο-Aの局在を突止めるために、ヤギ抗ヒトNgR（ウェスタンブロットで1：100）およびモノクローナル抗ヒトRhο-A（26C4）を使用した（Santa Cruz社、カリフォルニア州、米国）。

【0097】

組織標本および免疫組織化学

少なくとも3体のラット群について、麻酔の過剰摂取による殺後、それらの網膜および視神経（ON）を摘出し、OCT（Miles Inc社、カリフォルニア州、米国）に埋込み、液体窒素中で凍結した。厚さ10μmの長手の低温槽切片は、-20℃で、ONおよび網膜を切出し（Bright Instrument社、ケンブリッジシャー州、英国）、ベクタボンド（Vectabond）被覆スライド（Vector Laboratories社、ケンブリッジシャー州、英国）に集めて、風乾し、先に記載された免疫組織化学（MoI. Cell Neurosci.、第21巻、301-311頁）用に処理された。培養網膜細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、また、先に記載されたように処理した（Lorberら、2002年、MoI. Cell Neurosci.、第21巻、301-311頁）。

【0098】

神経突起伸長測定

アクシオビジョン（Axiovision）ソフトウェア（Zeiss社、ハートフォードシャー州、英国）を用いて各神経突起をトレースし、各カバースリップの50個のRGCについて最長の神経突起を測定することで、βIII-チューブリン免疫染色されたRGCの取込み画像から神経突起伸長を測定した（n=3、3回の独立実験）。その後、平均神経突起長を算出した。

【0099】

たんぱく抽出およびウェスタンブロッティング

ON粉碎後0、6、8および20日目に、各処理群のラットの殺後、6つのプールしたONからたんぱくを抽出し、先に記載されたウェスタンブロッティング用に処理した（J. Biol. Chem.、第277巻、32820-32829頁）。siRNA処理されたRGC培養物におけるp75^{NTR}レベルをウェスタンブロッティングによって決定するために、先に記載されたように（Wintonら、2002年、J. Biol. Chem.、第157巻、565

10

20

30

40

50

－570頁）、 6×10^6 細胞／s i R N Aを溶解し、ブロットした。

【0100】

統計分析

グラフパッドプリズム (GraphPad Prism) (GraphPad Software社、バージョン4.0、サンディエゴ、米国)を用いて、一元配置分散分析 (ANOVA)に続くダネットの方法による事後検定によって、有意性について標本平均を算出し、分析した。

【0101】

結果

p 7 5^{N T R}のs i R N A介在性ノックダウンは、阻害性C N S ミエリン存在下でR h o - Aを下方制御し、C N T F活性化神経突起伸長を増進する

10

本発明者らはC N S 損傷の生体外モデルを提起するために、分離R G Cの初代培養物を用い、100 ng / mlのC N T F、つまり非T r k依存神経栄養因子が最適なR G C神経突起伸長を促進すること、および、このC N T F介在性伸長は10 μ g / mlのラットC N S ミエリンによって阻害されることを発見した (不図示)。p 7 5^{N T R}のノックダウンは、ミエリン存在下で成長するC N T F活性化R G Cにおいてs i R N A p 7 5^{N T R}によって達成された。結果を図1に示す。

【0102】

(a)は、S E Q I D N o . 2として識別されるp 7 5^{N T R}s i R N Aによる完全ノックダウン、およびp 7 5^{N T R}の他のs i R N A配列による「部分」ノックダウン、ならびに、R G Cがミエリン存在下でC N T Fによって活性化されときのR h o - A活性の同時抑制を示す。したがって、すべてのs i R N A配列が効果を示す。(b)網膜細胞培養物からの二次ウェスタンブロットによって、スクランブル配列はp 7 5^{N T R}およびR h o - Aに効果がないことが示され、S E Q I D N o . 2の効果の特異性が実証される。(c)特にS E Q I D N o . 2による生体外ノックダウンは、神経突起伸長レベルをミエリン不在下でみられるレベルに回復し、S E Q I D N o . 2はミエリン不在下でみられるレベル以上に神経突起伸長を有意に活性化した。また、S E Q I D N o . 2はR G C生存を有意に促進した (ミエリン存在下での配列2対C N T Fについて、ANOVAにおいて*** P < 0.0001)。なお、S E Q I D N o . 1～5はすべてミエリンの阻害効果を遮断する。(d)二重免疫組織化学によると、C N T F存在下で成長した β I I I - チューブリン⁺R G Cは、体細胞および神経突起の両方において、p 7 5^{N T R}免疫染色を示した。しかし、S E Q I D N o . 2介在性p 7 5^{N T R}s i R N A実験において、 β I I I - チューブリン⁺R G Cはp 7 5^{N T R}の完全 (体細胞および神経突起) または部分 (神経突起のみ) ノックダウンのいずれかを示した。スケールバーは50 μ mである。

20

30

【0103】

全対照培養物 (無処理R G C、C N T F処理R G CならびにC N T FおよびC N S ミエリン処理R G C)において、p 7 5^{N T R}およびR h o - Aの高いレベルが検出された (図1 a)。5つのp 7 5^{N T R}s i R N A (S E Q I D N o . 1～5)の導入後、S E Q I D N o . 1および3はp 7 5^{N T R}の有意なノックダウンを誘導し (70～80%、ウェスタンブロット濃度測定によって定量した (不図示))、S E Q I D N o . 2はp 7 5^{N T R}およびその加工型 (細胞外ドメイン (E C D) : p 5 5フラグメントおよび細胞内ドメイン (I C D) : p 2 5フラグメント)の100%ノックダウンを誘導した (図1 a)。また、試験した5つのp 7 5^{N T R}s i R N A配列はすべてR h o - A - G T Pレベルを顕著に抑制し、活性は配列1～3を用いて完全に遮断された (図1 a)。S E Q I D N o . 2の対照のスクランブル配列は、別のウェスタンブロットで実証されたように、p 7 5^{N T R}またはR h o - A活性のどちらのレベルにおいても変化を起こさなかった (図1 b)。

40

【0104】

S E Q I D N o . 2による培養R G Cにおけるp 7 5^{N T R} / p 5 5 / p 2 5のノックダウンおよび結果として生じるR h o - A活性の抑制後、ミエリン存在下でC N T Fに

50

よって神経突起を成長させるために活性化されたRGCの数は、ミエリン存在下のCNTFのみによる神経突起にみられるよりも5倍増加しており（図1c）、それにともないRGC神経突起長は5倍の促進があった（図1c）。さらに、p75^{NT}R/p55/p25の下方制御およびRho-A活性抑制は、培養4日後に有意に増加したRGC生存と関連していた（図1c）。興味深いことに、5つのsiRNA配列すべてが、阻害性CNSミエリン存在下のCNTF活性化RGC神経突起伸長を、ミエリン不在下のCNTFによってみられるレベルに回復した。しかし、SEQ ID No.2は、CNSミエリン不在でCNTFによって活性化されたときに観察されるレベル以上に、RGC神経突起伸長を驚くほど増進させた。CNTFおよびスクランブル配列2の存在下で成長したRGCは、CNTFのみの対照と比較して、神経突起伸長において差異を示さなかった（図1d）。 10

【0105】

本発明者らは、いかなる仮説によって制約されることも望まないが、これら結果は、siRNA介在性p75^{NT}R mRNA翻訳サイレンシングによるp75^{NT}Rノックダウンが、Rho-A GTPのRho-A GTPへの変換を遮断し、これによって、成長円錐の完全性を保存することで、阻害環境を通じてCNTF誘導RGC神経突起伸長を増進させ、場合によっては、アクチン重合の増大を介して進展させることを示唆していると考え 10

【0106】

考察

試験した5つのsiRNA分子のそれぞれが、RhoA阻害経路の脱阻害を示した。特に、SEQ ID No.2は、阻害剤の不在下よりも阻害性ミエリン存在下でより成長を活性化するという驚くべき効果があった。生体外では、p75^{NT}RのsiRNA介在性ノックダウンは、下流の阻害性シグナル伝達分子Rho-A活性の完全な遮断を導き、CNTF活性化RGC生存およびCNSミエリン存在下の神経突起伸長が顕著に増進する。SEQ ID No.2以外のp75^{NT}RのsiRNA配列もまた、p75^{NT}Rを部分に除去すると同時に、Rho-A活性の有意な抑制を導き、CNSミエリン存在下でのCNTFによるRGC神経突起伸長を回復した。SEQ ID No.2は、CNSミエリン存在下において、p75^{NT}R型すべてと、Rho-Aとの完全ノックダウンを誘導し、ミエリン不在下でみられるより神経突起伸長を2倍以上増進させた。これは、CNTFの神経栄養因子効力が、ミエリン不在下でさえ阻害性分子によって抑制されていることを示 30

【0107】

結論として、本発明者らの結果は、NTF活性化再生RGCにおいては、p75^{NT}R介在性成長円錐崩壊の下方制御に関する内生機構が存在し、これには下流Rho-A介在性阻害性シグナル伝達の抑制が含まれることを示唆している。このp75^{NT}Rの内生下方制御は、p75^{NT}RターゲットsiRNAの適用によって効果的に増補されるのがよい。したがって、siRNA技術は、軸索がCNSの阻害環境を克服して再生するのに役立つ付加的な治療戦略を提供する。ニューロン死は、最初の考えより、良好なCNS修復の大きな障壁であるらしく、適切なNTFを用いてニューロン生存および軸索再生を増大 40

【0108】

実施例2

材料および方法

成体DRGN培養

L4~L7のDRG対を成体ラット（6~8週齢）から取出し、0.1%コラゲナーゼ（Sigma社、プール、英国）および200U/ml DNアーゼI（Worthington Biochem社、ニュージャージー州、米国）を含むニューロベイスル-A（Invitrogen社、ペーズリー、英国）の溶液を用いて、2時間、37℃、5%CO₂を含む湿潤環境で単細胞に分離 50

し、何度も粉碎し、残渣を除去するために15%ウシ血清アルブミン勾配によって遠心分離にかけた。分離細胞をペレットにして、その後、B27サプリメント、L-グルタミンおよびゲンチミシンを含むニューロベイスル-A（補足ニューロベイスル-A、すべてInvitrogen社より）に再懸濁し、1,500個のDRGN/ウェルを、4ウェル組織培養プレート（Nunc社、英国）の、100 μ g/mlポリ-D-リジンに続き20 μ g/mlラミニニン-I（Sigma社、ドーセット州、英国）でプレコートされた滅菌カバースリップ上で、補足ニューロベイスル-A培地中において、ラットCNSミエリン（Norman Gregson博士、London大学King's College、英国より）の存在下と不在下との両方において、72時間、37℃、5%CO₂を含む湿潤環境で培養した。

【0109】

s i R N A 調製とトランスフェクション

実施例1のように、Elbashirおよび共同研究者によって設定された基準（Elbashirら、2001年、上記を参照）を用いて、p75^{N^TR}、NgRおよびRh o-Aに対するs i R N Aを設計した。ジアデニン開始配列を有して50%未満のGC含量から成る可能領域を同定するために、ラットp75^{N^TR}、NgRおよびRh o-Aのコード配列をスクランブルした。使用したs i R N A配列は以下のとおりである：

p 7 5^{N^TR} 配列

SEQ ID No.1、 5'-AACCTCATTCCTGTCTATTGC-3'；
 SEQ ID No.2、 5'-AACGCTTGATGCCCTTTTAGC-3'；
 SEQ ID No.3、 5'-AAGAGACCAGGAGCATTTGTAC-3'；
 SEQ ID No.4、 5'-AAGAACCAAGAGCCATGCACCTC-3'；お
 よび
 SEQ ID No.5、 5'-AAGCGGAGCGCTGACGCCGGA-3'。

【0110】

N g R 配列

SEQ ID No.6、 5'-AATCTCACCATCCTGTGGCTG-3'；
 SEQ ID No.7、 5'-AACCTCACGCATCTCTTTCTG-3'；
 SEQ ID No.8、 5'-AATCAGCTCACTGATGAGGAG-3'；
 SEQ ID No.9、 5'-AAATGCACCTCAAGGGACGTGT-3'；お
 よび
 SEQ ID No.10、 5'-AATGACTCTCCATTTGGGACT-3'。

【0111】

R h o - A 配列

SEQ ID No.11、 5'-AAGATTATGACCGTCTGAGGC-3'；
 SEQ ID No.12、 5'-AAGGATCTTTCGGAATGATGAG-3'；
 SEQ ID No.13、 5'-AAGGCGGGAGTTAGCCAAAAT-3'；
 SEQ ID No.14、 5'-AATGAAGCAGGAGCCGGTAAA-3'；
 および
 SEQ ID No.15、 5'-AAAGACCAGGAGAGGAGTGA-3'。

【0112】

他の遺伝子と高い相同性を持たないことを確実にするために、選択した配列をBLAST検索にかけた（www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed）。センスs i R N A鑄型は、5'末端がAAダイマで開始し、ターゲット配列に相補的な19ヌクレオチドが続いた。センス鑄型およびアンチセンス鑄型の両方の3'末端は、s i R N Aの効率的な転写に必要なT7プロモータプライマーの相補配列に一致する5'-CCCTGTCTC-3'の8ヌクレオチド配列を含む。脱保護および脱塩オリゴヌクレオチド鑄型および対照のスクランブル配列を化学的に合成した（Alta Biosciences社、バーミンガム大学、英国）。

SEQ ID No.16：スクランブルp75^{N^TR} Seq 2： 5'-AATCGCATGCGTTTCCATTTTCG-3'；

SEQ ID No.17：スクランブルNgR1： 5'-AACTTCCACCATTT

10

20

30

40

50

G G C G G T C - 3 ' ;

S E Q I D N o . 1 8 : ス ク ラ ン ブ ル R h o - A S e q 2 : 5 ' - A A G A G T T C A
T C T G A G T A G G A G - 3 ' ;

【 0 1 1 3 】

s i R N A ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン の た め 、 オ リ ゴ フ ェ ク タ ミ ン 試 薬 (I n v i t r o g e n 社) を
4 ウ ェ ル 組 織 培 養 プ レ ー ト (N u n c 社) に お い て 用 い た 。 1 本 の チ ュ ー ブ で 、 0 . 8 4 μ g
の s i R N A / ウ ェ ル を 5 0 μ l の O p t i - M E M (I n v i t r o g e n 社) に 混 合 し 、 2 番 目
の チ ュ ー ブ に 3 μ l の オ リ ゴ フ ェ ク タ ミ ン (I n v i t r o g e n 社) お よ び 1 2 μ l の O p t i -
M E M (I n v i t r o g e n 社) を 入 れ た 。 こ れ ら チ ュ ー ブ を 、 2 溶 液 を 混 合 す る 前 に 室 温 で 5
分 イ ン キ ュ ベ ー ト し 、 複 合 体 形 成 の た め 、 さ ら に 2 5 分 室 温 で イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 そ の
後 、 D R G N の 各 ウ ェ ル に つ い て 、 1 5 0 μ l の ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 培 地 を 加 え る こ と
の で き る 必 要 量 に ま で 、 全 混 合 物 に O p t i - M E M (I n v i t r o g e n 社) を 補 足 し た 。 ト ラ
ン ス フ ェ ク シ ョ ン 5 時 間 後 、 補 足 ニ ュ ー ロ ペ イ サ ル - A を 、 最 終 量 が 5 0 0 μ l / ウ ェ ル
に な る ま で ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 培 地 に 加 え 、 D R G N を 、 細 胞 溶 解 (ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ
ト 分 析 用) ま た は 免 疫 組 織 化 学 の い ず れ か に 付 す 前 に 、 さ ら に 4 8 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し
た 。

【 0 1 1 4 】

抗体

D R G N 神 経 突 起 を 標 識 す る た め に 、 モ ノ ク ロ ー ナ ル β - I I I チ ュ ー ブ リ ン 抗 体 (
Sigma 社) を 、 免 疫 組 織 化 学 (I C C) で は 1 : 1 0 0 で 、 ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ ト で は 1 :
5 0 0 で 用 い た 。 p 7 5 ^{N T R} を 同 定 し て 局 在 を 突 止 め る た め に 、 ポ リ ク ロ ー ナ ル 抗 p 7
5 ^{N T R} A b を 用 い た (Sigma 社 、 ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ ト お よ び I C C の 両 方 で 1 : 5 0 0
希 釈) 。 p 7 5 ^{N T R} の 2 5 k D a 加 工 細 胞 質 フ ラ グ メ ン ト を 同 定 し て 局 在 を 突 止 め る た
め に 、 モ ノ ク ロ ー ナ ル 1 9 2 - I g を 用 い た (O n c o g e n e R e s e a r c h P r o d u c t s 社 、 サ ン デ ィ
エ ゴ 、 カ リ フ ォ ル ニ ア 州 、 米 国 ; ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ テ ィ ン グ で 1 : 2 0 0 希 釈) 。 R h o
- A (モ ノ ク ロ ー ナ ル お よ び ポ リ ク ロ ー ナ ル A b 、 ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ テ ィ ン グ お よ び I C
C の 両 方 で 1 : 2 0 0 希 釈) お よ び ポ リ ク ロ ー ナ ル 抗 N g R A b (ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ テ
ィ ン グ お よ び I C C の 両 方 で 1 : 1 0 0 希 釈) を 、 S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y 社 、 カ リ フ
ォ ル ニ ア 州 、 米 国 か ら 購 入 し た 。

【 0 1 1 5 】

免疫細胞化学

D R G 培 養 物 を 、 4 % パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド で 1 0 分 間 固 定 し (T A A B L a b o r a t o r i e s 社
、 バ ー ク シ ャ ー 州 、 英 国) 、 リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 (P B S) 中 で 3 回 洗 浄 し 、 0 . 5 %
ウ シ 血 清 ア ル ブ ミ ン (B S A 、 S i g m a 社) お よ び 1 % ト リ ト ン X - 1 0 0 (S i g m a 社) を 含
む P B S 中 で ブ ロ ッ キ ン グ し 、 0 . 5 % B S A お よ び 0 . 5 % T w e e n - 2 0 (S i g m a
社) を 含 む P B S 中 で 1 : 1 0 0 に 希 釈 さ れ た 関 連 一 次 抗 体 と と も に 、 加 湿 チ ャ ン バ 内
に お い て 1 時 間 室 温 で イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 そ の 後 細 胞 を 、 P B S 中 で 3 回 洗 浄 し 、 P B S
- T - B S A に お い て 1 : 1 0 0 に 希 釈 し た A l e x a F l u o r 4 8 8 (G r e e n 社) ま
た は テ キ サ ス レ ッ ド (R e d 社) の い ず れ か 一 方 と と も に 、 1 時 間 室 温 で イ ン キ ュ ベ ー ト し
た 。 P B S 中 で の さ ら な る 洗 浄 に 続 い て 、 カ バ ー ス リ ッ プ を F l u o r S a v e (
C a l b i o c h e m 社 、 サ ン デ ィ エ ゴ 、 米 国) に 載 せ 、 蛍 光 顕 微 鏡 (C a r l Z e i s s 社 、 ウ ェ リ ン - ガ
ー デ ン シ テ ィ ー 、 英 国) で 観 察 し た 。

【 0 1 1 6 】

神経突起伸長の測定

ア ク シ オ ビ ジ ョ ン の 測 定 機 能 を 用 い て ラ ン ダ ム に 選 択 し た 3 0 の D R G N / カ バ ー ス リ
ッ プ か ら 、 β I I I - チ ュ ー ブ リ ン ⁺ 免 疫 染 色 D R G N 神 経 突 起 の 顕 微 鏡 写 真 を 、 ア ク シ
オ ビ ジ ョ ン ソ フ ト ウ ェ ア (C a r l Z e i s s 社) を 用 い て 記 録 し た 。 神 経 突 起 長 を 平 均 ± S D で
表 わ し た 。 神 経 突 起 伸 長 は 広 範 囲 に 及 ぶ た め 、 s i R N A ノ ッ ク ダ ウ ン 実 験 由 来 の 神 経 突
起 を 測 定 す る の に ソ フ ト ウ ェ ア を 用 い る こ と は で き な か っ た 。 そ の よ う な 場 合 、 神 経 突
起 伸 長 の 測 定 と し て 、 D R G N 細 胞 溶 解 物 を β I I I - チ ュ ー ブ リ ン 用 ウ ェ ス タ ン プ ロ ッ
ト

に用いた。

【0117】

たんぱく抽出およびウェスタンブロッティング

s i R N A 処理 D R G 培養物における p 7 5 ^{N T} R、N g R および R h o - A のレベルを決定するため、細胞を P B S で 2 回洗浄し、0. 2 5 % トリプシン / E D T A (Invitrogen 社) と 1 5 分 3 7 ° C でインキュベートし、その後粉碎し 1 3 0 0 r p m で 5 分間遠心した。D R G 細胞ペレットを、2 0 m M トリス-塩酸 (p H 7. 4)、1 m M E D T A、0. 5 m M E G T A、1 5 0 m M N a C l、1 % N P - 4 0 (Sigma 社) およびプロテアーゼインヒビタカクテル (Sigma 社) を含む氷冷溶解バッファに再懸濁し、氷上で 3 0 分間インキュベートした。1 3, 0 0 0 r p m、4 ° C で 3 0 分間遠心した後、比色分析 D C プロテインアッセイ (B i o - R a d 社、ハーキュリーズ、カリフォルニア州、米国) を用いて、たんぱく濃度について溶解物を標準化した。ウェスタンブロット分析に用いるまで、ホモジネートおよび細胞溶解物を - 7 0 ° C で保存した。

10

【0118】

各標本 (総たんぱく量 4 0 μ g) をレメリ (Laemmli) ローディングバッファとともに 9 0 ° C 4 分間で 2 回インキュベートし、1 2 % S D S ポリアクリルアミドゲル (Invitrogen 社) で分離した。たんぱくを P V D F メンブレン (Millipore UK 社、グロスターシャー州、英国) に転写し、0. 1 % T w e e n 2 0 および 5 % 脱脂乳を含むトリス緩衝生理食塩水中において 1 時間室温でブロッキングした。メンブレンを関連抗体に対して一夜ブロットした。検出のために、増進化学発光 (E C L) システム (Amersham 社、バッキンガムシャー州、英国) および H R P - 共役二次抗体 (1 : 1, 0 0 0、Amersham 社) を用いた。各ブロットをはがし、その後関連抗体と再プロービングした。

20

【0119】

D R G N 生存

s i R N A 介在性ノックダウンに続いて、1 s i R N A あたり 9 のカバースリップの全面積をスキャンすることによって蛍光顕微鏡下において、β I I I - チューブリン + D R G N の数をカウントした。D R G N / カバースリップの平均数を、以下に記載するように統計的に算出し、分析した。

【0120】

濃度測定

各 s i R N A について、ウェスタンブロットおよび抗体の評価を 3 つの別々の実験で 3 回実行し、関連する場合は、サイオンイメージングソフトウェア (Scion Corporation 社 / NIH Image、米国) を用いて濃度測定によってブロットを定量した。

30

【0121】

統計分析

標本平均を算出し、グラフパッドプリズム (GraphPad Software 社、バージョン 4. 0、サンディエゴ、米国) を用いて、一元配置分散分析 (A N O V A) によって有意性について分析し、続いて、統計的に有意な群を同定するためにダネットの方法による事後検定を行った。

【0122】

結果

F G F 2 は D R G N 神経突起伸長を促進する

選択した s i R N A 配列の効力を試験するために、本発明者らは初めに生体外モデルを提起し、その中で非 T r k 依存神経栄養因子である F G F 2 を、D R G N の神経突起伸長を活性化するために用いた。その結果を図 2 に示す。

40

【0123】

A, F G F 2 なし; B, 1 n g / m l F G F 2; C, 1 0 n g / m l F G F 2; D, 1 0 0 n g / m l F G F 2; E, 2 0 0 n g / m l F G F 2 は、D R G N 神経突起長において用量依存的な増加を誘導し; F, 画像分析による β I I I - チューブリン + の平均 ± S D 神経突起長の定量化であって、1 0 n g / m l F G F 2 で最適な神経突起伸長を

50

示し、その後平均神経突起伸長は低下した (10 ng/ml FGF2 対 0 ng/ml について、*** $P < 0.0001$)。

【0124】

この結果は、 β III-チューブリンポジティブDRGN神経突起がニューロベイスル-Aのみでも成長して、平均長 $350 \pm 35 \mu\text{m}$ に到達することを示す (図2Aおよび図2F)。しかし、FGF2の濃度が高まるにつれ、 10 ng/ml までは、神経突起伸長は増大した (図2B、図2Cおよび図2F)。この最適濃度を越えると、DRGN神経突起伸長は減少した (図2D~図2F)。これらの結果は、FGF2が濃度依存的に、DRGNの神経突起伸長を効果的に促進できることを実証している。

【0125】

CNSミエリンにおけるFGF2活性化DRGN神経突起伸長の阻害

CNSミエリンによるFGF2活性化DRGN神経突起伸長の阻害を、CNSミエリンに濃度幅を持たせてDRGNを培養することによって決定した。その結果を図3に示す。

【0126】

A, CNSミエリンなし; B, $100 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリン; C, $10 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリン; D, $100 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリン; E, $200 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリンは、DRGN神経突起長において用量依存的な減少を誘導し; F, 画像分析による平均 $\pm$ SD神経突起長の定量化であって、DRGN神経突起伸長阻害に関して $200 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリンが最適濃度であることを示し、より高濃度のCNSミエリン ($500 \mu\text{g/ml}$) はDRGNに有毒である ($200 \mu\text{g/ml}$ 対 $0 \mu\text{g/ml}$ ミエリンについて、*** $P < 0.0001$)。

【0127】

10 ng/ml FGF2によって活性化されたDRGN神経突起伸長 (図3Aに示す) は、 $100 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリンの存在下でDRGNを成長させることによって有意に減少させられ (図3B)、 $200 \mu\text{g/ml}$ CNSミエリンは、ほぼ完全にFGF2介在性DRGN神経突起伸長を阻害した (図3C)。CNSミエリン濃度を $250 \mu\text{g/ml}$ (図3D) および $500 \mu\text{g/ml}$ (図3E) に高めると、神経突起伸長を完全に阻害した。しかし、用いたCNSミエリンの最高濃度によって細胞死の増大およびDRGN形態変化が導かれたため、以降のsiRNA実験については最適な阻害を与えるのに $200 \mu\text{g/ml}$ のミエリンを選択した。神経突起長測定による神経突起伸長の定量化によってこれらの観察は確かめられ (図3F)、FGF2活性化神経突起伸長はCNSミエリンによって効果的に遮断されることが実証された。

【0128】

p75^{NTR} siRNAは、DRGNにおいてp75^{NTR}およびそのフラグメントをノックダウンし、Rho-Aをも下方制御する

本発明者らは実施例1において、p75^{NTR}mRNAに対する5つの選択したsiRNA配列のうち、SEQ ID No.2が、RGCのp75^{NTR}およびその加工フラグメントと下流Rho-Aとを完全にノックダウンすることを実証した (実施例1参照)。FGF2のみの存在下で成長したDRG培養物由来の細胞溶解物のウェスタンブロット分析は、p75^{NTR}およびRho-Aたんぱくレベルのいかなる変化も示さなかった。しかし、FGF2およびCNSミエリンの存在下で成長した細胞溶解物において、p75^{NTR}たんぱくレベルは影響を受けないままであったが、Rho-Aレベルは増進されており、阻害経路の誘導を示している (図4Aに示す)。

【0129】

図4において: A, siRNA介在性ジーンサイレンシング後の細胞溶解物のウェスタンブロットニングは、p75^{NTR}たんぱくの70%ノックダウンおよびp75^{NTR}の全フラグメントの下方制御ならびにその後のRho-A活性抑制を示す; B, β III-チューブリンおよびp75^{NTR}抗体による二重免疫組織化学によって、CNSミエリン不在下におけるFGF2による神経突起伸長を示し、p75^{NTR}免疫染色はDRGN体細胞およびその神経突起に局在している; C, CNSミエリンは神経突起伸長を阻害するが

10

20

30

40

50

、 $p75^{NTR}$ 免疫活性に影響はない；D、 $p75^{NTR}$ 配列2によるDRGNのトランスフェクションは、神経突起伸長と有意（対 $p75^{NTR}$ スクランブル配列2について、*** $P<0.0001$ ）に関連する $p75^{NTR}$ に対する免疫活性の顕著な減少を誘導した；E、 $p75^{NTR}$ 配列2に対するスクランブル配列の存在下で、明らかな神経突起伸長は少しもなく、 $p75^{NTR}$ への免疫活性が維持される。

【0130】

RG Cで用いた $p75^{NTR}$ mRNAに対する同じ5つのsiRNA配列（実施例1参照）でDRGNをトランスフェクトすると、配列2は再び $p75^{NTR}$ ならびにその加工フラグメントp55およびp25の最大ノックダウンを誘導し、70%の効果があつた（対スクランブル2について、 $P<0.0001$ ）（図4A）。配列2のスクランブルバージョンは $p75^{NTR}$ ノックダウンに効果がなかったことから、SEQ ID No. 2で観察されたノックダウンは特異的であつた。プロットをはがし、Rh o-Aと再プロービングしたとき、 $p75^{NTR}$ siRNA SEQ ID No. 2によってRh o-Aのほぼ完全なノックダウンもまた達成された。 $p75^{NTR}$ 免疫活性は、CNSミエリンのないFGF 2の存在下で中程度の神経突起伸長があつた、 β III-チューブリン⁺DRGNに存在した（図4B）。DRGN体細胞および神経突起の $p75^{NTR}$ 免疫活性は、CNSミエリンおよびFGF 2を組合せて存在させても影響されなかったが、神経突起伸長は有意に減少した（図4C）。

【0131】

しかし、CNSミエリンおよびFGF 2と共に $p75^{NTR}$ siRNA配列2の存在下で成長したDRGNの $p75^{NTR}$ 免疫活性には著しい減少があり、神経突起伸長は増進された（図4D）。スクランブル対照配列2は、FGF 2およびCNSミエリンの存在下において $p75^{NTR}$ 免疫活性の変化および神経突起伸長を示さず（図4E）、 $p75^{NTR}$ siRNA SEQ ID No. 2介在性ノックダウンの生物学的反応は、下流の阻害性シグナル伝達分子であるRh o-Aの効果的ノックダウンをも誘導するsiRNAの特異的反応であることが確かめられた。

【0132】

NgR siRNAはDRGNにおいてNgRを有意にノックダウンする

本発明者らは、DRGNにおけるNgRのノックダウンに関して、NgR mRNAに対する5つのsiRNA配列（SEQ ID No. 6～10）を試験した。その結果を図5に示す。

【0133】

A、siRNA介在性ジーンサイレンシング後の細胞溶解物のウェスタンブロッティングは、siRNA SEQ ID No. 6、7および10を用いたときのNgRたんぱくノックダウンが、それぞれ100%、55%および18%であることを示した；B、NgR siRNA SEQ ID No. 6によるDRGNトランスフェクションは、有意な神経突起伸長を促進するものの、免疫活性の有意な減少を誘導する；C、しかし、スクランブル配列1でトランスフェクトされたDRGN中の β III-チューブリンおよびNgR抗体による二重免疫組織化学は、神経突起伸長およびNgR免疫活性変化を明らかにしなかった。

【0134】

本発明者らは、図5Aに示されるように、FGF 2およびCNSミエリン存在下で、SEQ ID No. 6がNgRを完全にノックダウンする（100%ノックダウンで、対スクランブル1について、 $P<0.0001$ ）ことを示した。siRNA NgR SEQ ID No. 6のスクランブルバージョンは、NgRレベルに効果がなく、SEQ ID No. 6 siRNAの特異性を実証した。NgRノックダウン後、 $p75^{NTR}$ およびそのフラグメントの調節はなかったが、有意なノックダウンが達成されたサンプル中では活性Rh o-Aレベルが減少した（図5A）。NgR免疫活性は、NgR siRNA SEQ ID No. 6でトランスフェクトされたDRGNにおいて著しく減少したが、 β III-チューブリン⁺神経突起の成長は、CNSミエリン存在下のFGF 2による活性化後に増

進した（図5B）。スクランブルNgR SEQ ID No. 6は、FGF2およびCNSミエリン存在下のDRGNのNgR免疫活性および神経突起伸長に効果がなかった（図5C）。

【0135】

Rho-A siRNAはDRGNにおいてRho-Aを有意にノックダウンする

次に、本発明者らは、下流の阻害性シグナル伝達分子Rho-Aに対する5つのsiRNA配列（SEQ ID No. 11～15）を構築し、DRGNにおけるRho-Aのノックダウン能を試験した。その結果を図6に示す。

【0136】

A, siRNA介在性ジーンサイレンシング後の細胞溶解物のウェスタンブロッティングは、Rho-A siRNA SEQ ID No. 11, 12, 13および15を用いたときのRho-Aタンパクのノックダウンが、それぞれ80%, 100%, 10%および70%であることを示す。また、p75^{NTR}の全長および加工型における同時減少が明らかである；B, SEQ ID No. 12でトランスフェクトしたDRGNは、減少したRho-A免疫活性と、堅固な神経突起伸長とを有した；C, しかし、スクランブルSEQ ID No. 12でトランスフェクトしたDRGN中のβIII-チューブリンおよびNgR抗体による二重免疫組織化学は、神経突起伸長およびRho-A免疫活性の変化を示していない。

【0137】

SEQ ID No. 12は、CNSミエリン存在下において、FGF2によって活性化されるDRGN中のRho-Aタンパクを完全にノックダウンし（100%ノックダウンで、対スクランブル配列12について、 $P < 0.0001$ ）、一方でスクランブルバージョンは効果がなかった（図6A）。Rho-AのsiRNA介在性ノックダウンは、p75^{NTR}ならびにそのフラグメントp55およびp25の著しいノックダウンと相間があった（図6A）。Rho-A siRNA SEQ ID No. 12は、βIII-チューブリン⁺ DRGNにおけるRho-A免疫活性をほぼ完全に止め、CNSミエリンの存在下において、試験した他のsiRNA配列のどれよりも大きいFGF2活性化神経突起伸長を導いた（図6B）。スクランブルRho-A SEQ ID No. 2は、DRGNのRho-A免疫細胞化学または神経突起伸長のどちらにも効果がなかった。

【0138】

βIII-チューブリンのウェスタンブロットからのDRGN神経突起伸長の定量

多くのDRGNは2つ以上の神経突起を成長させ、これらが周辺のDRGNの神経突起と混在していたため、p75^{NTR}、NgRおよびRho-AのsiRNA介在性ノックダウンで観察される神経突起長を測定するのに、アクシオビジョンソフトウェアを用いるのは困難であった。したがって、βIII-チューブリンのウェスタンブロットの濃度測定分析を神経突起伸長の推定に用いた。その結果を図7に示す。

【0139】

AおよびB, スクランブル、または他のsiRNA配列のどれよりも有意に多い量のβIII-チューブリンタンパクが、p75^{NTR} siRNA SEQ ID No. 2によってトランスフェクトされたDRGNにおいて検出されており（ANOVAにおいて $P < 0.0001$ ）、FGF2およびCNSミエリンのみの存在下で成長したDRGNと比較して5倍の増加を示す；CおよびD, NgRに対するsiRNAを用いて、スクランブル、または他のsiRNA配列のどれよりも有意に多い量のβIII-チューブリンタンパクを、SEQ ID No. 6によってトランスフェクトされたDRGNにおいて検出しており（ANOVAにおいて $P < 0.0001$ ）、FGF2およびミエリンのみの存在下で成長したDRGNと比較して3倍の増加を示す；EおよびF, Rho-Aに対するsiRNAを用いて、スクランブル、または他のsiRNA配列のどれよりも有意に多い量のβIII-チューブリンタンパクを、Rho-A SEQ ID No. 12によってトランスフェクトされたDRGNにおいて検出しており（ANOVAにおいて $P < 0.0001$ ）、FGF2およびミエリンのみの存在下で成長したDRGNと比較して6.5倍の増加を示す

。β I I I -チューブリンたんぱくの最大量（最も堅固な神経突起伸長を反映している）は、R h o - A s i R N A S E Q I D N o . 1 2 によってトランスフェクトされた D R G N において検出されている；G，細胞生存の測定としてβ I I I -チューブリン⁺ D R G N 数を数え、p 7 5 ^{N T R}、N g R または R h o - A の s i R N A 介在性ノックダウン後に有意な変化は示されていない（F G F 2 およびミエリンを伴う対照 D R G N に対し、*** P < 0. 0 0 0 1）。

【0140】

C N S ミエリン存在下の F G F 2 活性化神経突起伸長は、s i R N A S E Q I D N o . 2 を p 7 5 ^{N T R} ノックダウンに用いたときに5倍に増進され（図7Aおよび図7B）、s i R N A S E Q I D N o . 6 を N g R ノックダウンに用いたときに3. 5倍に増進され（図7Cおよび図7D）、s i R N A S E Q I D N o . 1 2 を R h o A ノックダウンに用いたときに6. 5倍に増進された（図6Eおよび図6F）。F G F 2 活性化β I I I -チューブリンレベルは、p 7 5 ^{N T R} ノックダウン後にみられるレベルよりも、R h o - A ノックダウン後でさらに増大された。これらの結果は、R h o - A を遮断することで、C N S ミエリン存在下の F G F 2 活性化 D R G N 神経突起伸長が最適に脱阻害されることを示している。

【0141】

p 7 5 ^{N T R}、N g R および R h o - A のノックダウン後の D R G N 生存

ミエリン存在下で F G F 2 によって活性化した、p 7 5 ^{N T R}、N g R および R h o - A のノックダウン後の培養物に存在するβ I I I -チューブリン⁺ D R G N の数は、影響されないままであった（図7G）。これは、p 7 5 ^{N T R}、N g R または R h o - A のいずれかのノックダウンが、C N S ミエリン存在下の F G F 2 活性化 D R G N 神経突起伸長に悪影響しないことを示唆している。

【0142】

考察

本発明者の軸索成長脱阻害戦略は、阻害性リガンドではなく、阻害性シグナル伝達カスケードをターゲットにする s i R N A を用いる。F G F 2 活性化 D R G N における p 7 5 ^{N T R}、N g R および R h o - A のノックダウンはすべて、C N S 阻害性ミエリンの存在下において神経突起伸長の脱阻害を導き、R h o - A のノックダウンが最も顕著な効果を誘導した。最も効果的な s i R N A である R h o - A S E Q I D N o . 1 2 は、C N S ミエリン存在下の F G F 2 によって観察されるとき6. 5倍以上の、および、s i R N A p 7 5 ^{N T R} S E Q I D N o . 2 によって観察されるとき1. 5倍以上の F G F 2 活性化神経突起伸長を促進した。興味深いことに、p 7 5 ^{N T R} の s i R N A 介在性ノックダウンもまた R h o - A の完全ノックダウンを誘導し、一方で総 R h o - A の s i R N A 介在性ノックダウンは、D R G N における p 7 5 ^{N T R} の中程度の、しかし有意なノックダウンを逆に誘導した。N g R のノックダウンによる神経突起伸長の増進は最小で、C N S ミエリンの存在下で成長した D R G N と比較して、F G F 2 活性化神経突起伸長を3. 5倍増大させた。

【0143】

p 7 5 ^{N T R} の s i R N A 介在性ノックダウン

本発明者らは、p 7 5 ^{N T R} の s i R N A 介在性ジーンサイレンシングが、C N S ミエリン存在下の R G C において神経突起伸長を脱阻害することを実証した（実施例1）。また本発明者らは、p 7 5 ^{N T R} ノックダウンが R h o - A 活性の抑制を導くことを示し、それによって阻害性シグナル伝達の抑制を示唆した（実施例2）。ここで、生体外の D R G N における p 7 5 ^{N T R} ジーンサイレンシングの効果を研究するために、本発明者らは同じ s i R N A 配列を用いた。p 7 5 ^{N T R} およびそのフラグメントのノックダウン、ならびに、それに続く R h o - A 活性の抑制によって、ミエリン存在下で F G F 2 活性化 D R G N 神経突起伸長が増進されたという観察から、多様なニューロン細胞型においてシグナルを変換するために、阻害性リガンド結合分子 N g R によって p 7 5 ^{N T R} が必要とされるという仮説が支持される。

【0144】

結論として、これらの結果は、p75^{NTR}のノックダウンが推定上の阻害性環境（ミエリン）の存在下においてRGCの神経栄養因子活性化（CNTF）神経突起伸長に有意に有益な影響を及ぼすことを実証している。さらに、NgR、p75^{NTR}およびRho-Aのノックダウンは、推定上の阻害性環境の存在下においてDRGNの神経栄養因子活性化（FGF2）神経突起伸長に有意に有益な影響を及ぼす。これは、神経栄養因子活性化機構による神経突起伸長の脱阻害が普遍的現象であるということと、siRNAがこの過程を増補できるということとを暗示している。これら結果は脱阻害戦略に有望であり、下流のシグナル伝達分子に対するRNAiが、最適なCNS軸索再生を促進するのに最も有益であることを示唆している。

10

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1】siRNA処理後の分離網膜培養物におけるp75^{NTR}およびRho-Aのノックダウンを示す。

【図2】DRGN培養物においてFGF2が神経突起伸長を促進することを示す。

【図3】CNSミエリンがFGF2促進DRGN神経突起伸長を遮断することを示す。

【図4】CNSミエリン存在下のFGF2活性化DRGNのp75^{NTR}によるsiRNA介在性ノックダウンを示す。

【図5】ミエリン存在下のFGF2活性化DRGNにおけるNgRのsiRNA介在性ノックダウンを示す。

20

【図6】ミエリン存在下のFGF2活性化DRGNにおけるRho-AのsiRNA介在性ノックダウンを示す。

【図7】p75^{NTR}、NgRおよびRho-AのsiRNA介在性ノックダウン後の、CNSミエリン存在下のFGF2活性化DRGN神経突起伸長の相関として、DRG培養物におけるβIII-チューブリンのウェスタンブロットおよび濃度測定定量化を示す。

【図1】

【図2】

Figure:1

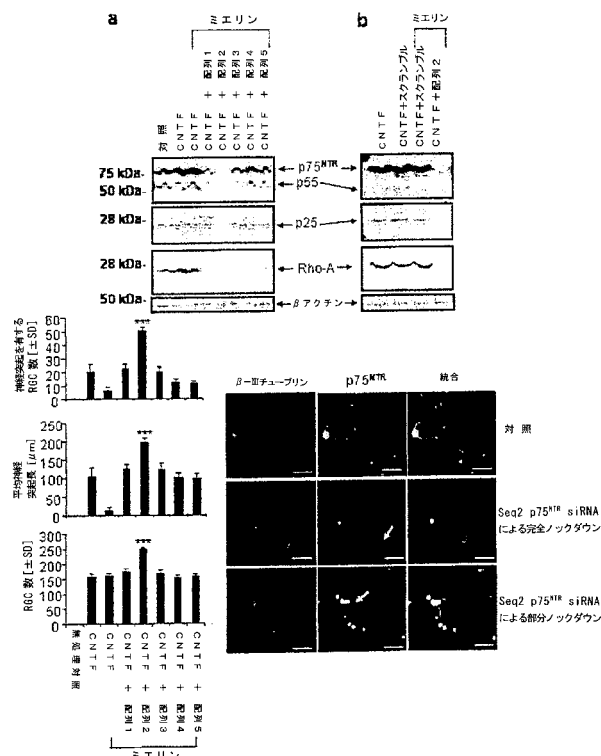
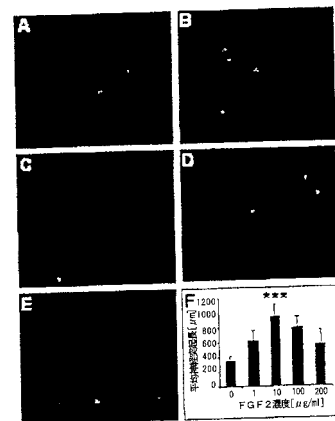
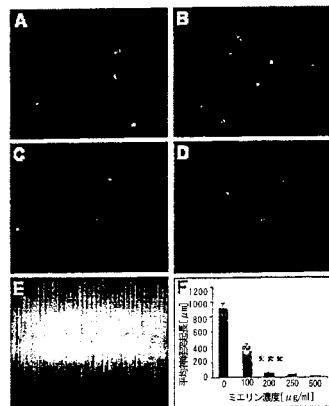


Figure:2



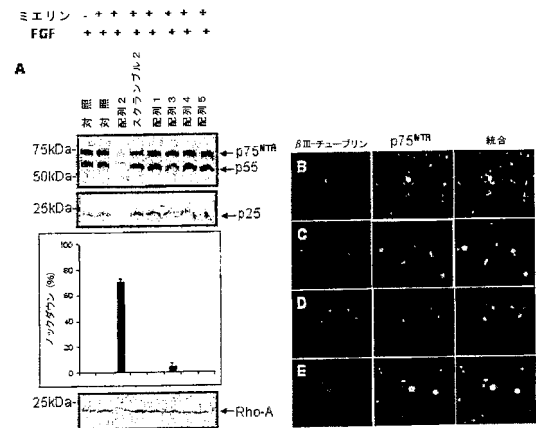
【図 3】

Figure:3



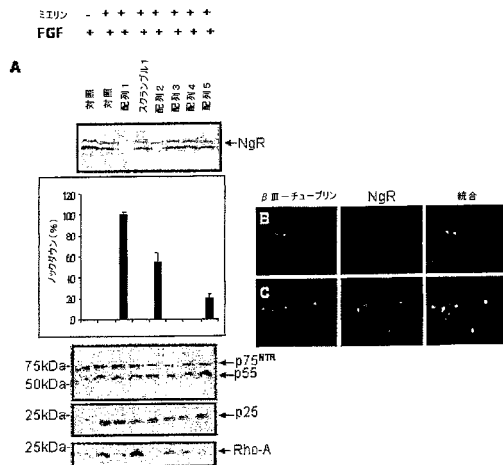
【図 4】

Figure 4



【図 5】

Figure 5



【図 6】

Figure 6

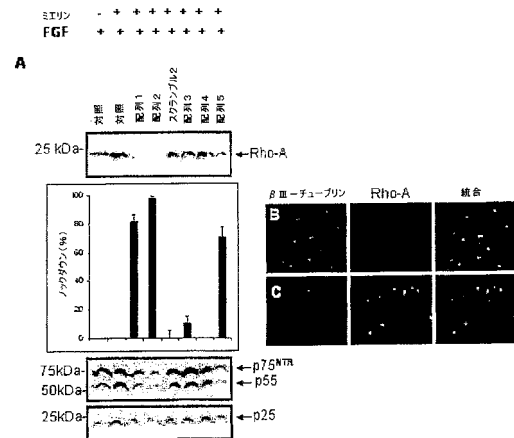
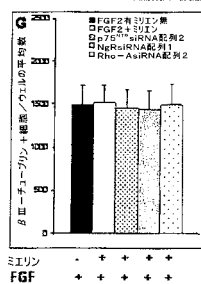


Figure 7



0004704435000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 アフメド, ズベアー
イギリス国 バーミンガム エッジバストン バーミンガム リサーチ アンド デヴェロップメント リミテッド
- (72)発明者 ベリー, マーティン
イギリス国 バーミンガム エッジバストン バーミンガム リサーチ アンド デヴェロップメント リミテッド
- (72)発明者 ローガン, アン
イギリス国 バーミンガム エッジバストン バーミンガム リサーチ アンド デヴェロップメント リミテッド

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 国際公開第2004/087744 (WO, A1)
BBRC, 2003, Vol.301, p.804-809
Ahmed Z. et al., "Enhancement of retinal ganglion cell regeneration by downregulation of p75NTR using short interfering RNA.", [online], 2003, Society for Neuroscience, Neuroscience 2003 Abstract, Presentation Number 816.7, [2010.06.14検索], URL:http://www.sfn.org/index.cfm?pagename=abstracts_archive&task=view&controlID=13754&year=2003&CFID=4646499&CFTOKEN=34409390&jsessionid=b430a36c955047217b11&print=on

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPI