

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月9日(09.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/186089 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/12 (2006.01) *A61P 27/16* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 35/761 (2015.01) *C12N 15/86* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12Q 1/06* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/008055

(22) 国際出願日: 2022年2月25日(25.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-033464 2021年3月3日(03.03.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 影山 龍一郎 (KAGEYAMA Ryoichiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 貝瀬峻 (KAISE Takashi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 福井 雅弘 (FUKUI Masahiro);

〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3 6番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人 津国 (TSUKUNI & ASSOCIATES); 〒1020083 東京都千代田区麹町5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IT, JM, 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.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE FOR TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASE, VECTOR, CELL, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: 神経変性疾患治療のためのポリヌクレオチド、ベクター、細胞、医薬組成物及びスクリーニング方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel method for increasing the number of newly generated neurons in the adult brain, and to provide a polynucleotide, a vector, and a pharmaceutical composition for use in the method. The present invention provides: a polynucleotide characterized by including (A) the nucleic acid sequence of the *Plagl2* gene, (B) an miR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) nucleic acid sequence for the *Dyrk1a* gene, and (C) a promoter sequence operatively connected to the nucleic acid sequences; a vector including the polynucleotide; and a pharmaceutical composition including the polynucleotide and the vector.

(57) 要約: 本開示は、成体脳において新生ニューロン数を増やす新規の方法を提供すること、また、この方法に用いられるポリヌクレオチド、ベクター、医薬組成物を提供することを目的とする。本開示は、(A) *Plagl2* 遺伝子の核酸配列、(B) *Dyrk1a* 遺伝子に対する miR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列、及び (C) 上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド、これを含むベクター、これらを含む医薬組成物である。



添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：

神経変性疾患治療のためのポリヌクレオチド、ベクター、細胞、医薬組成物及びスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、神経変性疾患治療のためのポリヌクレオチド、ベクター、細胞、医薬組成物及びスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] ヒトを含めた哺乳類成体脳においても神経幹細胞や神経前駆細胞が絶対数は少ないものの存在し、脳の領域によっては神経新生を行っていることが明らかになってきている。しかし、成体脳の神経幹細胞の大部分は静止状態であり増殖能やニューロン産生能は低い。この増殖能やニューロン産生能は加齢とともにさらに低くなるため、老化脳で新たに生まれるニューロン（新生ニューロン）はほとんど存在しない。新生ニューロンの著しい減少は認知症といった脳機能低下や、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患の原因とも考えられている。

[0003] そのような状況下、成体脳にわずかに存在する神経幹細胞、神経前駆細胞を、成長因子等の刺激により増幅、分化させ、機能回復を促そうとする試みが行われている（非特許文献1参照）。しかし、その効果は十分とは言えない。また、胎児脳やES細胞及びiPS細胞由来の神経幹細胞、神経前駆細胞を用いた細胞移植治療モデルの研究も盛んに行われているが、脳における細胞移植治療は、正常な神経回路網の再構築が可能かどうかは明らかではなく、副作用のリスクも大きい。さらに、これまで成体脳における新生ニューロン数を増やす多くの試みがなされてきたが、その効果はまだ限定的である（非特許文献1～5参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Nagahara AH et al. (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease, Nat.Med., vol.15(3), pp.331-337.

非特許文献2 : Henriette van Praag et al., Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, J Neurosci., 2005 Sep 21;25(38):8680-5

非特許文献3 : Benedetta Artegiani et al., Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain. J Exp Med. 2011 May 9;208(5):937-48

非特許文献4 : Benraiss, A. et al. (2013) Mobilization of endogenous progenitor cells regenerates functionally-integrated medium spiny striopallidal projection neurons and delays disease progression in a transgenic model of Huntington's disease. Cell Stem Cell 12, 787-799

非特許文献5 : Berdugo-Vega, G. et al. (2020). Increasing neurogenesis refines hippocampal activity rejuvenating navigational learning strategies and contextual memory throughout life. Nat. Commun. 11, 135

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、成体脳において新生ニューロン数を増やす新規の方法を提供すること、また、この方法に用いられるポリヌクレオチド、ベクター、形質転換細胞、医薬組成物、及び成体脳において新生ニューロン数を増やす物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] このような状況の中、本発明者らが鋭意研究した結果、特定の遺伝子セットをレンチウイルスで老齢マウス脳に導入することによって、内在する神経幹細胞が効率良く活性化されて増殖し、多数のニューロンを生み出すことを見出した。老齢期の神経幹細胞が青年期かそれ以上に若い時期の状態に戻り、多数のニューロンが生み出され、記憶や学習能力が改善した。また、アル

ツハイマー病モデルマウスの脳に導入した場合でも内在する神経幹細胞が効率良く活性化して多数のニューロンを生み出し、記憶・学習能力が改善した。即ち、本発明の要旨は以下のとおりである。

- [0007] [1] (A) Plagl2遺伝子の核酸配列、
(B) Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列、及び
(C) 上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。
- [2] 上記Plagl2遺伝子及びDyrk1a遺伝子が、哺乳類の遺伝子である、[1]に記載のポリヌクレオチド。
- [3] 上記プロモーターが、Hes5プロモーター、GFAPプロモーター、Sox2プロモーター及びLfngプロモーターから成る群より選択されるプロモーターである、[1]又は[2]に記載のポリヌクレオチド。
- [4] [1] から [3] のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [5] 上記ベクターが、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はプラスミドベクターである、[4]に記載のベクター。
- [6] [4] 又は [5] に記載のベクターを含有する医薬組成物。
- [7] (a) Plagl2遺伝子の核酸配列、及び上記Plagl2遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むベクター、並びに
(b) Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列、及び上記miR-shRNAの核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むベクター、又はDyrk1a遺伝子に対するsiRNA若しくはmiRNAを含有する医薬組成物。
- [8] [4] 又は [5] に記載のベクターにより形質転換された細胞。
- [9] [8] に記載の細胞を含有する医薬組成物。

[10] 神経変性疾患又は内耳疾患の治療のために用いられる、[6]、[7] 又は [9] に記載の医薬組成物。

[11] 脳室内注射、髄腔内のボラス注射又は注入、神経節内注射、神経内注射、皮下注射、または鼓室内注射によって対象に投与される、[10] に記載の医薬組成物。

[12] (1) 神経幹細胞又は内耳支持細胞に被験物質を作用させ、Plagl2 遺伝子及びDyrk1a遺伝子の発現を測定する工程、並びに

(2-1) 上記工程(1)の結果から、Plagl2遺伝子発現増強能及びDyrk1a 遺伝子発現抑制能を有する被験物質を選定する工程、又は

(2-2) 上記工程(1)の結果から、Plagl2遺伝子発現増強能を有する被験物質と、Dyrk1a遺伝子の発現抑制能を有する被験物質とを選定する工程を含む、神経変性疾患又は内耳疾患の治療用物質のスクリーニング方法。

発明の効果

[0008] 本発明によると、特定の遺伝子セットを成体脳、老齢脳に導入することによって内在する神経幹細胞を効率良く活性化して増殖させ、多数のニューロンを生み出すことが可能である。老齢脳における神経幹細胞を青年期かそれ以上に若い時期の状態に戻すことができ、多数のニューロンを生み出し、記憶や学習能力を改善することが可能である。また、アルツハイマー病等の神経変性疾患への治療効果も期待でき、内在する神経幹細胞が効率良く活性化して多数のニューロンを生み出し、記憶・学習能力を改善することができる。さらに、本発明の特定の遺伝子セットは、脳の神経幹細胞だけでなく内耳においても支持細胞を有毛細胞に分化させることができ、内耳疾患の治療においても有効であることが示唆された。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、NSC(神経幹細胞)の活性化に寄与する遺伝子のスクリーニング工程を示す図である。

[図2]図2は、胚高発現遺伝子の過剰発現によるNSC活性化遺伝子のin vitro スクリーニングの結果を示す図である。

[図3]図3は、胚高発現遺伝子の過剰発現によるNSC活性化遺伝子のin vivoスクリーニングの結果を示す図である。

[図4-1]図4-1は、成体高発現遺伝子のノックダウンによるNSC活性化遺伝子のin vitroスクリーニングの結果を示す図である。

[図4-2]図4-2は、成体高発現遺伝子のノックダウンによるNSC活性化遺伝子のin vitroスクリーニングの結果を示す図である。

[図5]図5は、NSC活性化遺伝子のin vivoスクリーニングの結果を示す図である。

[図6]図6は、NSC活性化遺伝子のin vivoスクリーニングの結果を示す図である。

[図7]図7は、iPaDによるマウス老齢脳における神経新生の長期的活性化を示す図である。なお、Plagl2過剰発現とDyrk1aノックダウンの併用を「iPaD(inducing Plagl2 and anti-Dyrk1a)」と名付けた。

[図8]図8は、iPaDによるマウス老齢脳における神経新生の長期的活性化を示す図である。

[図9-1]図9-1は、加齢に伴う神経新生能の低下を示す図である（野生型海馬）。

[図9-2]図9-2は、加齢に伴う神経新生能の低下と、iPaDによる高齢化NSCの若返りを示す図である。

[図10-1]図10-1は、バーンズ迷路試験のスケジュールを示す図である。

[図10-2]図10-2は、iPaDによる加齢マウスの認知機能改善効果を示す図である（バーンズ迷路試験）。

[図10-3]図10-3は、iPaDによる加齢マウスの認知機能改善効果を示す図である（バーンズ迷路試験）。

[図11]図11は、アルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）及び正常マウス（野生型同腹仔マウス）の海馬歯状回におけるMCM2陽性細胞数の月齢による変化を示す図である。

[図12]図12は、アルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）及び正常

マウス（野生型同腹仔マウス）の海馬歯状回におけるDCX陽性細胞数の月齢による変化を示す図である。

[図13]図13は、アルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）の海馬歯状回におけるアミロイドβプラーク数の加齢による増加を示す図である。

[図14]図14は、アルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）と正常マウス（野生型同腹仔マウス）の認知機能の比較結果を示す図である（バーンズ円形迷路試験）。

[図15]図15は、アルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）と正常マウス（野生型同腹仔マウス）の認知機能の比較結果を示す図である（文脈恐怖条件付け試験）。

[図16]iPaDによるアルツハイマー病の改善効果を示す図である（MCM2陽性細胞数）。

[図17]iPaDによるアルツハイマー病の改善効果を示す図である（DCX陽性細胞数）。

[図18]iPaDによるアルツハイマー病の改善効果を示す図である（アミロイドβプラーク数）。

[図19]図19は、iPaDによるアルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）の認知機能の改善効果を示す図である（バーンズ円形迷路試験）。

[図20]図20は、iPaDによるアルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）の認知機能の改善効果を示す図である（文脈恐怖条件付け試験）。

[図21]図21は、iPaDによる内耳の支持細胞の活性化及び有毛細胞の再生を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明について詳細に説明する。なお、本明細書において、分子生物学的手法は、特に明記しない限り当業者に公知の一般的実験書に記載の方法又はそれに準じた方法により行うことができる。また、本明細書中で使用される用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で解釈される。

[0011] 本開示によると、ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞において、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子を強制発現させ、かつ胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制することで、これらの細胞を効率良く活性化して増殖させることができる。即ち、本出願においては成体脳、加齢脳、疾患脳等に内在する神経幹細胞等を効率良く活性化して増殖させ、多数のニューロンを生み出すことができる、特定の遺伝子セット含むポリヌクレオチド、ベクター、形質転換細胞、これらを含む医薬組成物、これらを使用する神経変性疾患等の治療方法等が提供される。

[0012] <ポリヌクレオチド>

本開示のポリヌクレオチドの第1の実施形態は、ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞に導入する（A）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、（B）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列)、及び（C）上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドである。

[0013] 本開示のポリヌクレオチドの第2の実施形態は、ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞に導入する（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドと、（b1）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列)、及び上記遺伝子発現を抑制する核酸配列（例えばmiR-shRNAの核酸配列）に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドとの組み合わせである。

[0014] 本開示のポリヌクレオチドの第3の実施形態は、ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞に導入する（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現

である遺伝子の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドと、(b2)胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列(例えば、上記遺伝子に対するsiRNA若しくはmiRNAのポリヌクレオチド)の組み合わせである。

[0015] 本明細書において「ポリヌクレオチド」は、「核酸」、「遺伝子」又は「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体を意味する。本明細書において、用語「ヌクレオチド配列」は、「核酸配列」又は「塩基配列」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド(A、G、C及びTと省略される)の配列として示される。例えば、「配列番号1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド又はそのフラグメント」といった場合には、配列番号1の各デオキシヌクレオチドA、G、C及び/又はTによって示される配列を含むポリヌクレオチド又はその断片部分を意味する。

[0016] 本開示のポリヌクレオチドを導入するターゲットとなる細胞としては、神経幹細胞、内耳支持細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、骨格筋幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、網膜ミュラーグリア細胞、組織前駆細胞等が挙げられ、これらのうちの本開示のポリヌクレオチドを導入することで活性化、増殖が促進されるという観点から、神経幹細胞、内耳支持細胞が好ましい。

[0017] (第1の実施形態について)

ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞に導入する本開示のポリヌクレオチドの第1の実施形態は、(A)胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、(B)胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列(例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA)の核酸配列)、及び(C)上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドである。

[0018] [(A)胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配

列]

(A) 核酸配列としては、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列であれば特に限定されないが、中でも成体神経幹細胞に過剰発現させることで、成体神経幹細胞の増殖、活性化を促す遺伝子の核酸配列であることが好ましく、具体例として、Gsx2、Dmrt3、Cdk4、Plagl2、Sox21、Ascl1、Tgif2、Plagl1、Hmga2等の核酸配列が挙げられる。これらのうち、成体神経幹細胞の増殖、活性化能により優れるという観点から、Plagl2遺伝子の核酸配列がより好ましい。Plagl2遺伝子(Pleomorphic adenoma gene like-2)は、C2H2ジンクフィンガー領域を有する転写因子PLAGL2をコードする遺伝子である。ZNF900とも呼ばれる。PLAGL2は転写のポジティブレギュレーターとして機能し核に局在することが知られている。実施例で詳細に説明しているとおり、本開示においては、E14マウス胚の神経節隆起及び背側皮質由来のG1/G0 NSCのトランスクリプトーム(DDBJ BioProject Accession: PRJDB9010)を、2～3か月齢マウスのLV-SVZ(SAMD00192826)及びDG-SGZ(SAMD00192827)由来の大部分が静止状態であるNSCと比較して、発現に差が見られる核因子の1つとして見出された。

[0019] 本開示において、Plagl2遺伝子等の、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の由来は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、モルモット等の哺乳類であり、中でもヒト、サル、マウス由来であることが好ましく、ヒト由来であることがより好ましい。

[0020] 本開示においてPlagl2遺伝子等の、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列は、上記遺伝子のmRNA配列内のコーディング領域(CDS)を含む。上記遺伝子の核酸配列としては、上記の哺乳類由来の各遺伝子のmRNA配列のコーディング領域(CDS)として既知の配列を採用することができ、例えばGenBankの塩基配列データベース等に登録されている塩基配列を使用できる。本開示におけるPlagl2遺伝子の核酸配列としては、GenBankの塩基配列データベース等に登録されている塩基配列と同一(配列番号1)

、又は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、且つコードするペプチドがPLAGL2としての転写因子活性を有するものである。本開示におけるPlagl2遺伝子の最も好ましい核酸配列としては、配列番号1の配列が挙げられる。

[0021] [(B) 胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列

(B) 核酸配列としては、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列であれば特に限定されないが、このような、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子としては、ノックダウンすることで静止状態の神経幹細胞を効率的に活性化できる遺伝子であることが好ましく、例えば、Cdkn1a、Prkcz、Dyrk1a、Zbtb7a、Dusp22、Cidea、Rasd1、Nr4a1、Nfe2l2、Stat6、Tsc22d3等が挙げられ、中でもCdkn1a、Prkcz、Dyrk1a、Zbtb7aがより好ましく、Dyrk1aが更に好ましい。このDyrk1a遺伝子は、セリン／スレオニン及びチロシンをリン酸化する酵素をコードしており、21番染色体のトリソミーが原因で起きるダウン症の発症に関与している可能性が考えられている遺伝子である。実施例で詳細に説明しているとおり、本開示においては、ターゲットとする神経幹細胞において、ノックダウンすることで静止状態のNSCを効率的に活性化した上記11の遺伝子のうちの1つとして見出された。

[0022] 本開示においてDyrk1a遺伝子等の胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の由来は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウシ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、モルモット等の哺乳類であり、中でもヒト、サル、マウス由来であることが好ましく、ヒト由来であることがより好ましい。

[0023] 本開示においてDyrk1a遺伝子等の胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の核酸配列は、上記遺伝子のmRNA配列内のコーディング領域(CDS)を含む。上記遺伝子の核酸配列としては、上記の哺乳類由来の各遺伝子のmRNA配列のコーディング領域(CDS)として既知の配列を採用すること

ができ、例えばGenBankの塩基配列データベース等に登録されている塩基配列を使用できる。本開示におけるDyrk1a遺伝子の核酸配列としては、GenBankの塩基配列データベース等に登録されている塩基配列と同一（配列番号2）、又は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、且つコードするペプチドがDyrk1aとしての酵素活性を有するものである。本開示におけるDyrk1a遺伝子の最も好ましい核酸配列としては、配列番号2の配列が挙げられる。

[0024] 本開示において、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列は、従来公知の方法により上記遺伝子の発現を抑制することができる核酸配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) が挙げられる。上記遺伝子に対するmiR-shRNAは、上記遺伝子の発現を抑制することができるshRNA (RNA干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられるヘアピン型のRNA配列) である。上記遺伝子の発現を抑制することができる核酸配列を有するものであれば特に限定されず、上記遺伝子の配列に合わせて適宜設計することができる。このようなshRNAの核酸配列としては、例えば、Dyrk1aに対するmiR-shRNAの核酸配列である配列番号3の核酸配列が好ましいものとして挙げられるが、配列番号3の核酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、且つ上記Dyrk1a遺伝子の発現を抑制することができる核酸配列も本開示のDyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列として採用できる。

[0025] [(C) 上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列]

本開示においては、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA (mi

croRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列) が、(C) プロモーター配列と作動可能に連結されている。本実施形態における(C) プロモーター配列としては、神経幹細胞、内耳支持細胞等の神経系細胞内で機能するプロモーター配列を採用できる。このようなプロモーター配列としては、例えば神経幹細胞で機能するHes5プロモーター(配列番号4)、GFAPプロモーター、内耳支持細胞で機能するSox2プロモーター、Lfngプロモーター等が挙げられる。

[0026] ここで「作動可能に連結されている」とは、記載される成分が、その意図された方式で機能することを可能にする関係にある並置を指す。一実施形態では、この用語は、核酸発現制御配列(例えば、プロモーター及び/又はエンハンサー)と目的のポリヌクレオチド配列との間の機能的連結を指し、直接連結、間接連結(間に別のポリヌクレオチド配列が介在する場合)でもよい。本開示においては、プロモーター配列が、連結した目的のポリヌクレオチドの転写を導く。

[0027] 本実施形態の(A)胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、(B)胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列(例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA(microRNA adapted short hairpin RNA)の核酸配列)、及び(C)上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドとしては、(A)Plagl2遺伝子の核酸配列、(B)Dyrk1a遺伝子発現を抑制する核酸配列(例えば、Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA(microRNA adapted short hairpin RNA)の核酸配列)、及び(C)上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドが好ましく、例えば配列番号5のポリヌクレオチド、及び配列番号5のポリヌクレオチドに1個以上(例えば、1~50個、1~40個、1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個、1個等)のヌクレオチドの欠失、置換、挿入及び/又は付加を有するポリヌクレオチドであって、ベクターに導

入してターゲット細胞を形質転換するとPlagl2遺伝子を強制発現し、Dyrk1a遺伝子をノックダウンすることができるポリヌクレオチドがより好ましいものとして挙げられる。これら欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上の組合せを同時に含んでもよい。上記ヌクレオチドの欠失、置換、挿入及び／又は付加の数は、一般的に小さい程好ましい。また、本願発明において好ましいポリヌクレオチドは、例えば、配列番号5のその相補配列にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを含む。

[0028] ここで、「ストリンジエントな条件」は、低ストリンジエントな条件、中ストリンジエントな条件及び高ストリンジエントな条件のいずれでもよい。「低ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、32℃の条件である。また、「中ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、42℃の条件である。「高ストリンジエントな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、50℃の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0029] 本実施形態のポリヌクレオチドは、さらに、mRNAの転写、タンパク質への翻訳などを補助するエンハンサー配列、Kozak配列、適切なポリアデニル化シグナル配列などの公知の配列を含んでもよい。

[0030] 本実施形態のポリヌクレオチドをターゲット細胞に導入する方法は特に限定されず、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体等のベクターを用いて、又はリポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション等の手法を挙げることができる。本実施形態のポリヌクレオチドをターゲットであ

る神経幹細胞等に導入して形質転換させると、Plagl2遺伝子等の胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子を強制発現し、Dyrk1a遺伝子等の胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子をノックダウンすることができる。このように形質転換されたターゲット細胞（神経幹細胞等）は、活性化して増殖し、多数のニューロンを生み出す等、細胞の機能を十分発揮するように分化することができる。本実施形態のポリヌクレオチドは、成体脳、加齢脳、疾患脳等に内在する神経幹細胞、内耳に存在する支持細胞等に対して好適に使用され得る。

[0031] （第2の実施形態について）

ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞に導入する本開示のポリヌクレオチドの第2の実施形態は、（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドと、（b1）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA（microRNA adapted short hairpin RNA）の核酸配列）、及び上記遺伝子の発現を抑制する核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドの組み合わせである。本実施形態のポリヌクレオチドの組み合わせは、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子と、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA）とをそれぞれ別のベクターに導入する等して、ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞を別々に形質転換するために用いられる。

[0032] 本実施形態における（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列については、上述の第1の実施形態における（A）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列の説明をそのまま適用できる。また、上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列についても、第1の実施形態における（C）上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列の説明を適用でき、具体例として

、例えば神経幹細胞で機能するHes5プロモーター（配列番号4）、GFAPプロモーター、内耳支持細胞で機能するSox2プロモーター、Lfngプロモーター等が挙げられる。

[0033] 本実施形態における（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドとしては、（a）Plagl2遺伝子の核酸配列、及び上記Plagl2遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドが好ましく、配列番号6の核酸配列を含むものをより好ましい例として挙げることができる。このポリヌクレオチドは、さらに、mRNAの転写、タンパク質への翻訳などを補助するエンハンサー配列、Kozak配列、適切なポリアデニル化シグナル配列などの公知の配列を含んでもよい。

[0034] 本実施形態における（b1）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列) については、上述の第1の実施形態における（B）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列の説明をそのまま適用できる。また、上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列としては、第1の実施形態における（C）上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列の説明を適用でき、具体例として、例えば神経幹細胞で機能するHes5プロモーター（配列番号4）、GFAPプロモーター、内耳支持細胞で機能するSox2プロモーター、Lfngプロモーター等が挙げられる。

[0035] 本実施形態における（b1）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子の発現を抑制する核酸配列（例えば、Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列)、及び上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドとしては、（b1）Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列、及び上記miR-shRNAの核酸配列に作動可能に連

結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドが好ましく、配列番号7の核酸配列を含むものをより好ましい例として挙げることができる。このポリヌクレオチドは、さらに、mRNAの転写、タンパク質への翻訳などを補助するエンハンサー配列、Kozak配列、適切なポリアデニル化シグナル配列などの公知の配列を含んでもよい。

[0036] 本実施形態のポリヌクレオチドをターゲット細胞に導入する方法は特に限定されず、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体等のベクターを用いて、又はリポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション等の手法を挙げることができる。本実施形態のポリヌクレオチド2種は、それぞれ独立にターゲット細胞に導入することができる。例えば、それぞれを別々のベクターに組み込み、ターゲットである神経幹細胞等に導入して形質転換させると、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子を強制発現し、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子をノックダウンすることができる。このように形質転換されたターゲット細胞（神経幹細胞等）は、活性化して増殖し、多数のニューロンを生み出す等、細胞の機能を十分に発揮することができる。本実施形態のポリヌクレオチドは、成体脳、加齢脳、疾患脳等に内在する神経幹細胞、内耳に存在する支持細胞等に対して好適に用いられ得る。

[0037] （第3の実施形態について）

ターゲットとなる神経幹細胞等の細胞に導入する本開示のポリヌクレオチドの第3の実施形態は、（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドと、（b2）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子に対するsiRNA若しくはmiRNAのポリヌクレオチドの組み合わせである。本実施形態では、（a）ポリヌクレオチドはベクターに導入して、（b2）ポリヌクレオチド（siRNA若しくはmiRNA）はトランスフェクション用の試薬等と共にターゲット細胞の形質転換に用いられる。

- [0038] 本実施形態における（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列については、上述の第1の実施形態における（A）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列の説明をそのまま適用できる。また、上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列については、第1の実施形態における（C）上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列の説明を適用でき、具体例として、例えば神経幹細胞で機能するHes5プロモーター（配列番号4）、GFAPプロモーター、内耳支持細胞で機能するSox2プロモーター、Lfngプロモーター等が挙げられる。
- [0039] 本実施形態における（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドとしては、（a）Plagl2遺伝子の核酸配列、及び上記Plagl2遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むポリヌクレオチドが好ましく、配列番号6の核酸配列を含むものをより好ましい例として挙げる事ができる。
- [0040] 本実施形態における（b2）ポリヌクレオチドとしては、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子のsiRNA若しくはmiRNAであって、上記遺伝子の発現を抑制（ノックダウン）できる配列のものであれば特に限定されない。上記遺伝子のsiRNA若しくはmiRNAは、上記遺伝子の配列から設計可能である。例えば、Dyrk1a遺伝子のsiRNA若しくはmiRNAは、Dyrk1a遺伝子の配列から設計可能であり、具体的には、配列番号8のポリヌクレオチドが挙げられる。
- [0041] 本実施形態のポリヌクレオチドをターゲット細胞に導入する方法は特に限定されず、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体等のベクターを用いて、又はリポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション等の手法を挙げる事ができる。例えば、本実施形態の（a）ポリヌクレオチドを導入したベクターでターゲット細胞（神経幹細胞等）を形質転換してPlagl2遺伝子等を強制発現させ、さらに（b2）ポリヌクレオチドとしてのDyrk1a

遺伝子等のsiRNA若しくはmiRNAをターゲット細胞にトランスフェクションしてDyrk1a遺伝子等の発現を抑制することができる。トランスフェクションの方法は、当業者に従来公知の方法を使用することができる。このようにして形質転換されたターゲット細胞（神経幹細胞等）は、活性化して増殖し、多数のニューロンを生み出す等、細胞の機能を十分に発揮することができる。本実施形態のポリヌクレオチドは、成体脳、加齢脳、疾患脳等に内在する神経幹細胞、内耳に存在する支持細胞等に対して好適に用いられ得る。

[0042] <ベクター>

本開示には、上述の本開示のポリヌクレオチドを含むベクターも含まれる。本開示のベクターが含む本開示のポリヌクレオチドについては、上述のポリヌクレオチドの項の説明をそのまま適用できる。

[0043] 本開示において、ターゲット細胞の胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の強制発現、及び／又は胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現の抑制（ノックダウン）のために用いられるベクターとしては、ターゲット細胞（神経幹細胞、内耳支持細胞等）に効率的に遺伝子を送達できるベクターであれば特に限定されない。このようなベクターとしては、例えば、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター（例えば、単純ヘルペスウイルスベクター）、ポックスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、パポバウイルスベクター（例えば、SV40）等のウイルスベクター；プラスミドベクター；ファージミドベクター；コスミドベクター；ラムダファージ、M13ファージ等のバクテリオファージ等が挙げられる。これらのうち、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、プラスミドベクターが好ましく、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターがより好ましく、レンチウイルスベクターがさらに好ましい。

[0044] 具体的な発現ベクターの例としては、哺乳動物細胞でのレンチウイルス媒

介性遺伝子導入及び発現用のpLenti4/V5-DEST（商標）、pLenti6/V5-DEST（商標）及びpLenti6.2/V5-GW/lacZ（Invitrogen）；哺乳動物細胞での発現用のpCIneoベクター（Promega）等が挙げられる。

[0045] ベクターには、目的の遺伝子が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイト等の制御配列を含むことができる。また、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子等の選択マーカー配列、mCherry（赤色蛍光タンパク質）、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β グルクロニダーゼ(GUS)、FLAG等のレポーター遺伝子配列等を含むことができる。

[0046] <医薬組成物>

本開示は、上述した本開示のベクターを含有する医薬組成物も含む。また、（a）胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の核酸配列、及び上記遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むベクター、並びに（b）胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現を抑制する核酸配列（例えば、上記遺伝子に対するmiR-shRNA（microRNA adapted short hairpin RNA）の核酸配列）、及び上記遺伝子発現を抑制する核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むベクター、又は上記遺伝子に対するsiRNA若しくはmiRNAを含有する医薬組成物も含む。さらに、本開示の形質転換された細胞を含有する医薬組成物も含む。上記本開示の医薬組成物は、医薬上許容される補助剤、賦形剤、担体及び希釈剤から成る群より選択される少なくとも1種を含有してもよい。なお、本開示のベクター、形質転換細胞については、それぞれの項の説明を適用できる。これらの本開示の医薬組成物は、神経変性疾患又は内耳疾患の治療のために用いられる。

[0047] 本開示はまた、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の発現増強能及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で

高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現抑制能を有する化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経変性疾患又は内耳疾患治療のための医薬組成物も含む。さらに、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の発現増強能を有する化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩、及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現抑制能を有する化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する神経変性疾患又は内耳疾患治療のための医薬組成物も含む。

[0048] 上記胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の発現及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現は、神経幹細胞又は内耳支持細胞における各遺伝子の発現であることが好ましい。また、上記化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩は、低分子化合物、中分子化合物、高分子化合物のいずれであってもよい。

[0049] 本開示の医薬組成物は、脳室内注射、髄腔内のボラス注射又は注入、神経節内注射、神経内注射、皮下注射、または鼓室内注射によって対象に投与される。

[0050] 本開示の医薬組成物の投与量は特に限定されず、疾患の種類、患者の年齢や症状、投与経路、治療の目的、併用薬剤の有無等の種々の条件に応じて適切な投与量を選択することが可能である。

[0051] <治療方法>

本開示は、神経幹細胞において胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）を強制発現させ、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現を抑制することを特徴とする、神経変性疾患の治療方法も含まれる。また、内耳支持細胞において胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）を強制発現させ、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現で

ある遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現を抑制することを特徴とする、内耳疾患の治療方法も含まれる。神経幹細胞、内耳支持細胞等のターゲット細胞において胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）を強制発現させ、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現を抑制するための方法としては、本開示のポリヌクレオチド、ベクター、形質転換細胞、医薬組成物を用いる方法が挙げられ、それぞれについての具体的な説明は、上述のポリヌクレオチド、ベクター、医薬組成物の項の説明を適用できる。

[0052] <形質転換細胞>

本開示は、上述の本開示のポリヌクレオチドが導入されたターゲット細胞も含む。例えば、上述の本開示のベクターによって形質転換された細胞や、本開示のベクターによる形質転換及び本開示のポリヌクレオチドをトランスフェクションすること等による形質転換によって得られた細胞も本開示に含まれる。本開示の形質転換細胞は、*in vitro*で調製され、治療を必要とする被験者に投与され得る。その際、本開示の形質転換細胞は、医薬上許容される補助剤、賦形剤、担体、希釈剤と共に医薬組成物として投与され得る。

さらに、本開示は、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の発現増強能及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現抑制能を有する化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩で処理して形質転換された細胞、並びに胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子（Plagl2遺伝子等）の発現増強能を有する化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩、及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子（Dyrk1a遺伝子等）の発現抑制能を有する化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩で処理して形質転換された細胞も含む。このような細胞としては、神経幹細胞又は内耳支持細胞が上記形質転換された細胞であることが好ましく、また、上記化合物、若しくはそのプロドラッグ又はその製薬上許容される塩は、低分子化合物、中分子

化合物、高分子化合物のいずれであってもよい。

[0053] <神経変性疾患又は内耳疾患の治療用物質のスクリーニング方法>

本開示は、(1) 神経幹細胞又は内耳支持細胞に被験物質を作用させ、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子 (Plagl2遺伝子等) 及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子 (Dyrk1a遺伝子等) の発現を測定する工程、並びに

(2-1) 上記工程(1)の結果から、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子 (Plagl2遺伝子等) の発現増強能及び胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子 (Dyrk1a遺伝子等) の発現抑制能を有する被験物質を選定する工程、又は

(2-2) 上記工程(1)の結果から、胚で高発現であり、成体神経幹細胞で低発現である遺伝子 (Plagl2遺伝子等) の発現増強能を有する被験物質と、胚で低発現であり、成体神経幹細胞で高発現である遺伝子 (Dyrk1a遺伝子等) の発現抑制能を有する被験物質とを選定する工程

を含む、神経変性疾患又は内耳疾患の治療用物質のスクリーニング方法も含む。

[0054] 本開示のスクリーニング方法によって選定された物質は、神経幹細胞を効率良く活性化して増殖させ、多数のニューロンを生み出すことが可能である。そのため、老齢脳における神経幹細胞を青年期かそれ以上に若い時期の状態に戻すことができ、多数のニューロンを生み出し、記憶や学習能力を改善することが期待できる。また、アルツハイマー病等の神経変性疾患への治療効果も期待でき、内在する神経幹細胞が効率良く活性化して多数のニューロンを生み出し、記憶・学習能力を改善することができる。さらに、本開示のスクリーニング方法によって選定された物質は、脳の神経幹細胞だけでなく内耳においても支持細胞を有毛細胞に分化させることができ、内耳疾患の治療においても有効であることが期待される。

実施例

[0055] 以下の実施例にて本開示を具体的に説明するが、本開示はこれらの実施例

によって限定的に解釈されるものではない。

[0056] 1. 神経幹細胞 (Neural Stem Cell: NSC) 活性化遺伝子のスクリーニング

本開示者らは、老化したNSCを活性化して増殖させるためには、複数の遺伝子の発現を変化させる必要があると推論した。そこで、成体NSCの大部分が静止状態であることから、E14マウス胚の神経節隆起及び背側皮質由来のG1/G0 NSCのトランスクリプトーム(DDBJ BioProject Accession: PRJDB9010)を、2～3か月齢マウスのLV - SVZ(SAMD00192826)及びDG - SGZ(SAMD00192827)由来の大部分が静止状態であるNSCと比較して、発現に差が見られる核因子及びそれらの既知のモジュレーターを同定した。

[0057] まず、胚で高レベルに発現し、成体NSCで発現が低い遺伝子（「embryonic-high」）を同定した。次に、bFGFとBMPにより静止状態（EdU）に維持したNSCに、それらの遺伝子をin vitroで過剰発現させた（図1）。2日後に、EdUを取り込んだ増殖細胞の割合を測定し、NSCを増殖、活性化できる遺伝子を同定した。本試験では、胚で高レベルに発現する遺伝子の上位80のそれぞれを静止状態のNSCにin vitroで過剰発現させ、NSCの増殖、活性化をモニターした。結果を図2に示した。試験した遺伝子の中で、Gsx2、Dmrt3、Cdk4、Plagl2、Sox21、Ascl1、Tgif2、Plagl1、及びHmga2は静止状態のNSCを効率的に活性化した。

[0058] Gsx2、Dmrt3、Cdk4、Plagl2、Sox21、Ascl1、Tgif2、Plagl1、及びHmga2についてさらにin vivoの試験を行った。これらの9つの遺伝子を、NSC及びアストロサイトで特異的に作動するHes5プロモーター（配列番号9）の制御下、レンチウイルスに個別にクローニングした。各レンチウイルスを6ヶ月齢マウスの海馬歯状回に注入し、1週間後に脳切片を調べた（図3）。Cdk4とサイクリンD1の組み合わせ(D1K4)は成体脳のNSCを活性化することが知られていることから、これらを陽性対照とした。試験した遺伝子の中で、Plagl2（配列番号10、Hes5プロモーターとPlagl2とを連結した配列は配列番号11）は、対照マウスと比較して、6か月齢マウスの海馬歯状回におけるMCM2⁺有糸分裂細胞（活性化NSC、中間前駆細胞である可能性が高い細胞）の数を最も

効率的に増加させた。

[0059] 次に、発現を抑制することでNSCを増殖、活性化できる遺伝子を同定するために、胚で発現が低く、成体NSCで発現が高い遺伝子を対象遺伝子とした。静止状態のNSCに標的とする対象遺伝子のsiRNAを導入することにより、成体NSCにおいて高いレベルで発現する遺伝子（「adult-high」）及びそのモジュレーターの遺伝子のノックダウンを実施した。in vitroのノックダウンスクリーニングの結果を図4-1、図4-2に示す。試験した124の遺伝子の中から、ノックダウンすることで静止状態のNSCを効率的に活性化した11の遺伝子を選択した。

[0060] レンチウイルスを用い、Hes5プロモーター（配列番号9）の制御下でPlagl2と共に上記選択した11の遺伝子のshRNAをin vivoで発現誘導した。それぞれのレンチウイルスを6ヶ月、18ヶ月又は20ヶ月齢のマウスの海馬歯状回に注射し、2または4週間後に脳切片を調べた。その結果、Cdkn1a、Prkcz、Dyrk1aのshRNAは18ヶ月齢マウスにおいてMCM2⁺活性型NSC/IPC数を増加させた（図5上）。なお、図5の「control」は、Hes5プロモーターにmCherryのみを繋いだもの、「Scramble」はHes5プロモーターにmCherry、Plagl2とランダム配列を繋いだものの結果を示している。MCM2⁺活性型NSC/IPC数の増減の判断は、「Scramble」との比較による。また、Dyrk1a（配列番号12）のshRNA（配列番号13）は6ヶ月齢及び19ヶ月齢（18ヶ月+4週）のマウスにおいてDCX⁺樹状突起⁺の細胞数を他と比較して効率的に増加させた（図5中、図5下、図6）。なお、図5中及び図5下には、MCM2⁺活性型NSC/IPC数が増加傾向であったPrkcz、Dyrk1a、Zbtb7aのshRNAを発現誘導した6ヶ月齢及び19ヶ月齢（18ヶ月+4週）のマウスのDCX⁺樹状突起⁺の細胞数について示している。上記IPCは中間型前駆細胞（Intermediate progenitor cell）である。

[0061] これらのデータから、Plagl2過剰発現とDyrk1aノックダウンの併用は、6ヶ月齢、19ヶ月齢マウスともに海馬歯状回の神経新生を最も効率よく活性化することが示され、この2つの遺伝子発現の併用をiPaD（Plagl2と抗Dyrk1

a活性を誘導)と名付けた。この2つの遺伝子発現の組合せであるiPaD(配列番号14)は、Sox2⁺ GFAP⁺ BrdU⁺活性化NSCと、DCX⁺樹状突起⁺BrdU⁺未成熟ニューロンを含むMCM2⁺及び/又はBrdU取り込み細胞の個数を増加させた。この結果は、成体脳、老齢脳等において、内在する神経幹細胞のPlagl2過剰発現とDyrk1aノックダウンによってこの神経幹細胞を効率良く活性化して増殖させ、多数のニューロンを生み出し、記憶・学習能力を改善する可能性を示唆するものである。

[0062] 2. 神経発生に対するiPaDの長期効果

iPaDレンチウイルスが老齢脳の神経新生に及ぼす長期効果を調べるために、18ヶ月齢マウスの海馬歯状回にiPaDレンチウイルスを導入した。この月齢のマウスでは、活動化NSC(MCM2⁺;DCX⁻)、IPC(MCM2⁺;DCX^{+/-})、未成熟ニューロン(MCM2⁻;DCX⁺;dendrite⁺)は、この領域にほんのわずかしが存在せず、コントロールのレンチウイルスはその数に影響を与えなかった(図7 Control/8wpi)。一方、iPaDレンチウイルスはNSCを効率的に活性化し、感染1ヶ月後(19ヶ月齢)にIPC及び未熟ニューロンの形成を誘導した(図7 iPaD/4wpi)。同様の効果が感染後8週目と12週目(それぞれ20ヶ月齢と21ヶ月齢)でも認められたことから(図7 iPaD/8wpi, iPaD/12wpi)、高齢脳ではiPaDレンチウイルスによる内在性神経幹細胞のPlagl2過剰発現とDyrk1aノックダウンによって神経新生が持続的に活性化されていることが示唆された。なお、Plagl2単独でも神経新生を活性化したが、iPaDレンチウイルスほど効率的ではなかった(図8)。Plagl2過剰発現にDyrk1aノックダウンを組み合わせることによって、神経幹細胞の活性化及びニューロン形成において顕著な効果が得られた。これらの結果は、iPaDレンチウイルスによって活性化されたNSCが連続的に増殖し、3ヶ月後でも消耗しないことを示唆した。野生型海馬では、MCM2⁺あるいはDCX⁺細胞数は加齢に伴い有意に減少し、18ヶ月齢でほとんど消失した(図9-1)。しかし、iPaDレンチウイルスは、老齢脳(19ヶ月齢)の海馬歯状回におけるこれらの細胞数を、9ヶ月齢あるいはさらに若齢の野生型マウスと同程度のレベルまで増加させたことから(図9-2)、

老齡脳における神経新生は、iPaDレンチウイルスによって効果的に再活性化され得ることが示唆された。

[0063] iPaDレンチウイルスのアルツハイマー病に対する治療効果を奏するか否かを確認するために、アルツハイマーモデルマウスの海馬歯状回にiPaDレンチウイルスを導入し、上記と同様の解析を行った。その結果、iPaDレンチウイルスはアルツハイマーモデルマウスのNSCを効率的に活性化し、IPC及び未熟ニューロンの形成を誘導した。また、アミロイド β の沈着が抑制され、恐怖条件付け実験において記憶改善が観察された。詳細については、以下の「4. iPaDによるアルツハイマー病の治療効果」の項に記載した。

[0064] また、iPaDレンチウイルスが非NSCを活性化できるかどうかを調べるために、神経幹細胞が存在しない脳領域に注入した。Hes5プロモーターは星状膠細胞でも活性を示すが、いずれもMCM2やDCXを発現しなかったことから、iPaDレンチウイルスによって誘導される活性化はNSCに特異的であることが示唆される。

[0065] 3. iPaDによる認知機能の向上（バーンズ迷路試験）

活性化された神経新生が、高齢マウスの認知機能を向上させるかどうかを調べるために、空間学習と記憶をバーンズ迷路試験 (Barnes maze test) で解析した。このテストを用いて、空間学習と記憶は海馬歯状回の神経新生に依存していることが以前に示されており (Imayoshi, I., et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11, 1153–1161 (2008))、高齢マウスは若いマウスに比べて、トレーニングセッションで目標の穴に到達するために長い距離と潜時を必要とし、より悪いパフォーマンスを示すことが示されていた (Shoji, H. & Miyakawa, T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol. Rep.* 39, 100–118 (2019))。

[0066] 19ヶ月齢のマウスを2群に分け、1ヶ月前に対照レンチウイルスとiPaD

レンチウイルスを注射した（図10-1）。これらのマウスに対して、バーンズ迷路試験を、以下のように実施した。即ち、各行動解析には、1群あたり10～12匹の雄マウスを用いた。マウスの自動追跡は、ANY迷路ソフトウェア（Stoellting社製）を用いて、複数の体点を検出して行った。ウイルス注入の1日前に、手術のダメージを回復させるために、P7C3-A20（MedKoo）10mg/kgを1日1回、犠牲になるまで腹腔内注射で投与した。P7C3-A20は、5%デキストロース、3%DMSO、10%クレマフォEL（ナカライ）溶液に溶解した。空間記憶は、バーンズ円形迷路（直径9.2cm、12穴、ブレインサイエンスイデア社製）を用いて測定した。行動テスト空間を黒いカーテンで囲み、代表的な4つのCueを迷路の端から30cm以上離して配置した。1つの脱出穴で5分間のハビチュエーションを行った。習慣化段階の1日後、各マウスは、マウス間ではランダム化されているが個々のマウス毎に固定した1個の脱出穴の位置を記憶するために、1日に2回の訓練を行った。トレーニングの最初に、マウスを迷路の中央にある白い円柱の中に30秒間入れ、記録を開始すると円柱が外れるようにした。各記録は、マウスが脱出穴に入るか、脱出穴の周りを10秒間ホバリングした後、最大5分後に自動的に停止した。5分間の訓練中にマウスが逃げ穴を見つけられなかった場合は、実験者がマウスを優しく誘導して逃げ穴まで誘導した。脱出穴に入ってから60秒間は、マウスは脱出穴の中で乱れることなく放置された。トレーニング終了後、1日間隔で1回目のプローブテストを3分間実施した。トレーニングでは、迷路の真上に設置されたカメラで、総距離、正解穴と誤解穴の周りを回った回数、ゴール穴に入るまでの待ち時間を記録した。プローブテストでは、正解穴と誤解穴周辺の総距離、訪問回数、滞在時間を記録した。光の強さは、訓練1日目に100ルクスとし、1日30ルクス程度強化した。迷路は70%エタノール溶液で徹底的に洗浄し、試験のたびに乾燥させた。

[0067] その結果、iPaDレンチウイルスを注入したマウスは、対照レンチウイルスを注入したマウスに比べて、より短い距離で目的の穴に到達し、エラーが少

なく、待ち時間が短いことがわかった（図10-2）。最初のプローブテスト（訓練後1日後）では、iPaDマウスは対照マウスよりも標的穴に長く滞在していた（図10-3）。これらのデータは、iPaDレンチウイルスを注入することで、バーンズ迷路試験における高齢マウスの認知機能が向上したことを示している。

[0068] 4. アルツハイマー病モデルマウスと正常マウスの比較

(1) 海馬歯状回におけるMCM2陽性細胞数及びDCX陽性細胞数、並びにアミロイドβ沈着の比較

アルツハイマー病モデルマウスとして、5×FADマウスを使用した。5×FADマウスは、変異型ヒトアミロイド前駆体タンパク質（APP）（スウェーデン変異：K670N, M671L; フロリダ変異：I716V; ロンドン変異：V717I）遺伝子、変異型ヒトプレセニン1（PS1）（M146L ; L286V）遺伝子をマウスThy1プロモーター制御下で導入した（Tg6799ライン）マウスである。このマウスでは、脳領域にアミロイドβが沈着してニューロン新生も低下し、記憶や学習能力が悪くなる。5×FADマウス（B6/SJL遺伝的背景）はJackson Laboratoryから購入し、C57BL/6J野生型マウスと2世代以上交配して用いた。野生型同腹仔マウスを対照動物として使用した。全てのマウスは「京都大学における動物実験の実施に関する規定」に従って取り扱った。実験プロトコルは京都大学ウイルス・再生医科学研究所動物実験委員会の承認を得た。

[0069] 4ヶ月齢、6ヶ月齢並びに8ヶ月齢のアルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）及び正常マウス（野生型同腹仔マウス）について、海馬歯状回の切片を作成し、免疫染色によりMCM2陽性細胞数、DCX陽性細胞数を計数して、月齢による変化を確認した。結果を図11（MCM2陽性細胞）、図12（DCX陽性細胞）に示す。なお、標識細胞の定量的評価については、「標識細胞の定量的評価」の項に記載した方法にしたがった。また、4ヶ月齢、6ヶ月齢及び8ヶ月齢のアルツハイマー病モデルマウス（5×FADマウス）について海馬歯状回の切片を作成し、アミロイドβ沈着の月齢による変化も確認した。結果を図13に示す。なお、アミロイドβ沈着の定量的評価については、「ア

ミロイド β 沈着の定量的評価」の項に記載した方法にしたがった。

[0070] (標識細胞の定量的評価)

各実験で3匹以上のマウスの海馬歯状回を解析に用いた。各動物について、iPaDレンチウイルス注入点より前方の海馬歯状回の $50\mu\text{m}$ 厚の連続切片を作製し、7枚目ごとに評価した。損傷切片を除く全ての切片を免疫染色に用いた。免疫染色後、共焦点顕微鏡 (LSM780) により、10倍または20倍の対物レンズを用いてz-stack画像を取得した。染色細胞をImarisソフトウェア (Bitplane) またはImageJを用いて数え、海馬歯状回の 1mm^3 あたりの細胞数として定量した。

[0071] (アミロイド β 沈着の定量的評価)

各マウスの7枚目の脳切片ごとに、マウス抗 β -アミロイド一次抗体 (Clone 6E10; 1:500; BioLegend 9320) で標識し、蛍光標識した二次抗体で検出した。免疫染色後、共焦点顕微鏡 (LSM780) により10倍対物レンズでz-stack画像を取得した。 $A\beta$ プラークの数は、十分な閾値処理とノイズ除去の後、ImageJを用いて定量化した。結果は、海馬歯状回の 1mm^3 あたりのプラーク数として表した。

[0072] 図11に示すとおり、活性型NSCのマーカーであるMCM2が陽性である細胞数は、4ヶ月齢の正常マウスでは約 $1000\text{細胞}/\text{mm}^3$ であったところ、月齢が進むと減少し、6ヶ月齢では約 $700\text{細胞}/\text{mm}^3$ となり、8ヶ月齢では約 $680\text{細胞}/\text{mm}^3$ となった。一方、アルツハイマー病モデルマウス (5 \times FADマウス) では、4ヶ月齢でもMCM2陽性細胞数は約 $350\text{細胞}/\text{mm}^3$ と少なく、月齢が進んでも大きな変化はなく少ないままであった。

[0073] 図12に示すとおり、未分化神経マーカーであるDCXが陽性である細胞数は、4ヶ月齢の正常マウスでは約 $2700\text{細胞}/\text{mm}^3$ であったところ、月齢が進むと減少し、6ヶ月齢では約 $1500\text{細胞}/\text{mm}^3$ となり、8ヶ月齢では約 $800\text{細胞}/\text{mm}^3$ となった。一方、アルツハイマー病モデルマウス (5 \times FADマウス) では、4ヶ月齢でもDCX陽性細胞数は約 $1200\text{細胞}/\text{mm}^3$ と少なく、月齢が進むとさらに減少し、6ヶ月齢では約 $800\text{細胞}/\text{mm}^3$ となり、

8ヶ月齢では約150細胞/mm³となった。

[0074] 図13に示すとおり、アルツハイマー病モデルマウス(5×FADマウス)においては、月齢が進むとアミロイドβ沈着(アミロイドβプラーク)が顕著に増加し、4ヶ月齢では約1000プラーク/mm³であったところ、6ヶ月齢では約2400細胞/mm³となり、8ヶ月齢では約3700細胞/mm³となった。

[0075] (2) 行動試験

アルツハイマー病モデルマウス(5×FADマウス)と正常マウス(野生型同腹仔マウス)に対して以下に記載する方法に従って行動試験(バーンズ円形迷路試験、文脈恐怖条件付け試験)を行った。結果を図14(バーンズ円形迷路試験)、図15(文脈恐怖条件付け試験)に示す。

[0076] 各行動解析には、1群あたり8~12匹の雄マウスを使用した。マウスの自動追跡は、ANY-mazeソフトウェア(Stoelting社製)を用いて、複数の身体点を検出するように行った。なお、ウイルス注入を行う試験の場合は、P7C3-A20(MedKoo社製)10mg/kgを、ウイルス注入の1日前から1週間、1日1回腹腔内投与し、手術ダメージの回復を図った。P7C3-A20は、5%デキストロース、3%DMSO、10%クレマフォーEL(ナカライ)溶液に溶解させた。

[0077] 空間記憶は、上記「3. iPADによる認知機能の向上(バーンズ迷路試験)」の項と同様のバーンズ迷路試験によって確認した。

[0078] 文脈記憶は、過去の報告に記載されたプロトコルを部分修正し、文脈恐怖条件付け試験により評価した(Walgrave, H. et al., Cell Stem Cell 28, 1805-1821.e1808, doi:10.1016/j.stem.2021.05.001 (2021))。電気ショック発生器に配線された24本のステンレス製の棒を、チャンバー(17×10×10cm)の床に取り付け、60dBのバックグラウンドホワイトノイズを有する音響減衰キュービクル内で試験を行った。1日目に、各マウスをチャンバー(コンテクトA、床:ステンレス棒、壁:無色透明)内に入れ、3分間探索させた。その後、80mAの2秒間のfoot shockを与えた。マウ

スはさらに1分間チャンバー内に留ませた。チャンバーは各動物ごとに70%エタノールで消毒し、乾燥させた。24、48時間後、マウスを再びコンテクトAに入れ、1日目と同じ手順を繰り返した。TimeFZ2 (O'HARA & C O., LTD, Japan) を用いて、最初の3分間の恐怖反応を測定した。

[0079] なお、本実施例において、データは平均値±標準誤差(SEM)で表した。統計解析はRソフトウェアを用いて行った。統計的差異は、一元配置分散分析、または、二元配置分散分析を用いて検討し、更に、事後検定として、Tukey-Kramer法、または、Bonferroni法を用いた。P値<0.05は有意とみなした。

[0080] 図14及び15に示すとおり、アルツハイマー病モデルマウス(5×FADマウス)は正常マウスと比較して空間記憶能力、文脈記憶能力共に劣っていることがわかる。

[0081] 5. iPADによるアルツハイマー病の治療効果

iPADレンチウイルスがアルツハイマー病の治療効果を有するか否かを調べるために、5ヶ月齢の5×FADマウスの海馬歯状回に対照レンチウイルス又はiPADレンチウイルスを導入した。4週間後(6ヶ月齢)、12週間後(8ヶ月齢)にレンチウイルス注入点より前方の海馬歯状回の50µm厚の連続切片を作製し、を7枚目ごとにMCM2陽性細胞数、DCX陽性細胞数、アミロイドβ沈着を確認し評価した。また、iPADレンチウイルス導入後4週間経ってから行動試験(バーンズ円形迷路試験及び文脈恐怖条件付け試験)も行った。結果を図16(MCM2陽性細胞)、図17(DCX陽性細胞)、図18(アミロイドβ沈着)、図19(バーンズ円形迷路試験)、図20(文脈恐怖条件付け試験)に示す。なお、標識細胞の定量的評価については、上記「標識細胞の定量的評価」の項に記載した方法、アミロイドβ沈着の定量的評価については、上記「アミロイドβ沈着の定量的評価」の項に記載した方法、バーンズ円形迷路試験については、上記「3. iPADによる認知機能の向上(バーンズ迷路試験)」の項に記載した方法、文脈恐怖条件付け試験については、上記「4. アルツハイマー病モデルマウスと正常マウスの比較」の項の「(2) 行動

試験」中に記載の方法にしたがって行った。

[0082] 図16に示すとおり、iPaDレンチウイルスを導入したマウスでは、活性型N SCのマーカであるMCM2が陽性である細胞数は、投与後4週目において顕著に増加した。投与後12週目では4週目よりは減少したものの、コントロールより有意に多かった。

[0083] 図17に示すとおり、iPaDレンチウイルスを導入したマウスでは、未分化神経マーカであるDCXが陽性である細胞数は、投与後4週目において顕著に増加した。投与後12週目では4週目よりは減少したものの、コントロールより有意に多かった。

[0084] 図18に示すとおり、アミロイドβ沈着については、iPaDレンチウイルスを導入後4週目では、対照レンチウイルスを導入したコントロールとの差が見られなかったものの、導入後12週目では、顕著な抑制効果が確認できた。即ち、コントロールではアミロイドβのプラーク数が4週目と比較して2倍以上に増加していたのに対し、iPaDレンチウイルスを導入したマウスでは、1.2倍程度の増加に抑えられていた。

[0085] 図19及び図20に示すとおり、iPaDレンチウイルスを導入したマウスでは、空間記憶及び文脈記憶が、それぞれ図14及び図15に示す正常マウスのレベルまで回復した。

[0086] 以上のとおり、iPaDレンチウイルスの導入によりアルツハイマー病の症状が顕著に改善し、優れた治療効果が得られることがわかった。

[0087] 6. iPaDによる内耳支持細胞から有毛細胞への分化誘導

生後1ヶ月齢の若いマウスの内耳の支持細胞(Hensen cell)でiPaDを2週間発現させた。多くの場合は数個のBrdU+細胞からなる集団を形成していた(1個の支持細胞が数個の細胞に分裂したと考えられる)が、この図で示した集団は11個のBrdU+細胞からなっていた(図21)。1個の支持細胞が11個の細胞に分裂したと考えられる。この中で3個の細胞がmCherry+であった(2、3、7番)。Hes5プロモーターは内耳では支持細胞でのみ弱く働くがその他の細胞では働かないため、mCherry陰性の8個の細胞は支持細胞から他の

細胞種に変化している可能性が示唆された。このうち1個の細胞（11番）はMyosin6陽性になっており、有毛細胞に分化していると考えられた。この時期の支持細胞は細胞増殖能を既に失っていることから、iPaDによって効率良く増殖能が復活して少なくとも一部は有毛細胞に分化しうる可能性が示唆された。

産業上の利用可能性

[0088] 本開示によると、特定の遺伝子セットを成体脳、老齢脳に導入することによって内在する神経幹細胞を効率良く活性化して増殖させ、多数のニューロンを生み出すことが可能である。老齢脳における神経幹細胞を青年期かそれ以上に若い時期の状態に戻すことができ、多数のニューロンを生み出し、記憶や学習能力を改善することが可能である。また、アルツハイマー病等の神経変性疾患への治療効果も期待でき、内在する神経幹細胞が効率良く活性化して多数のニューロンを生み出し、記憶・学習能力を改善することができる。さらに、本開示の特定の遺伝子セットは、脳の神経幹細胞だけでなく内耳においても支持細胞を有毛細胞に分化させることができ、内耳疾患の治療においても有効であることが示唆された。

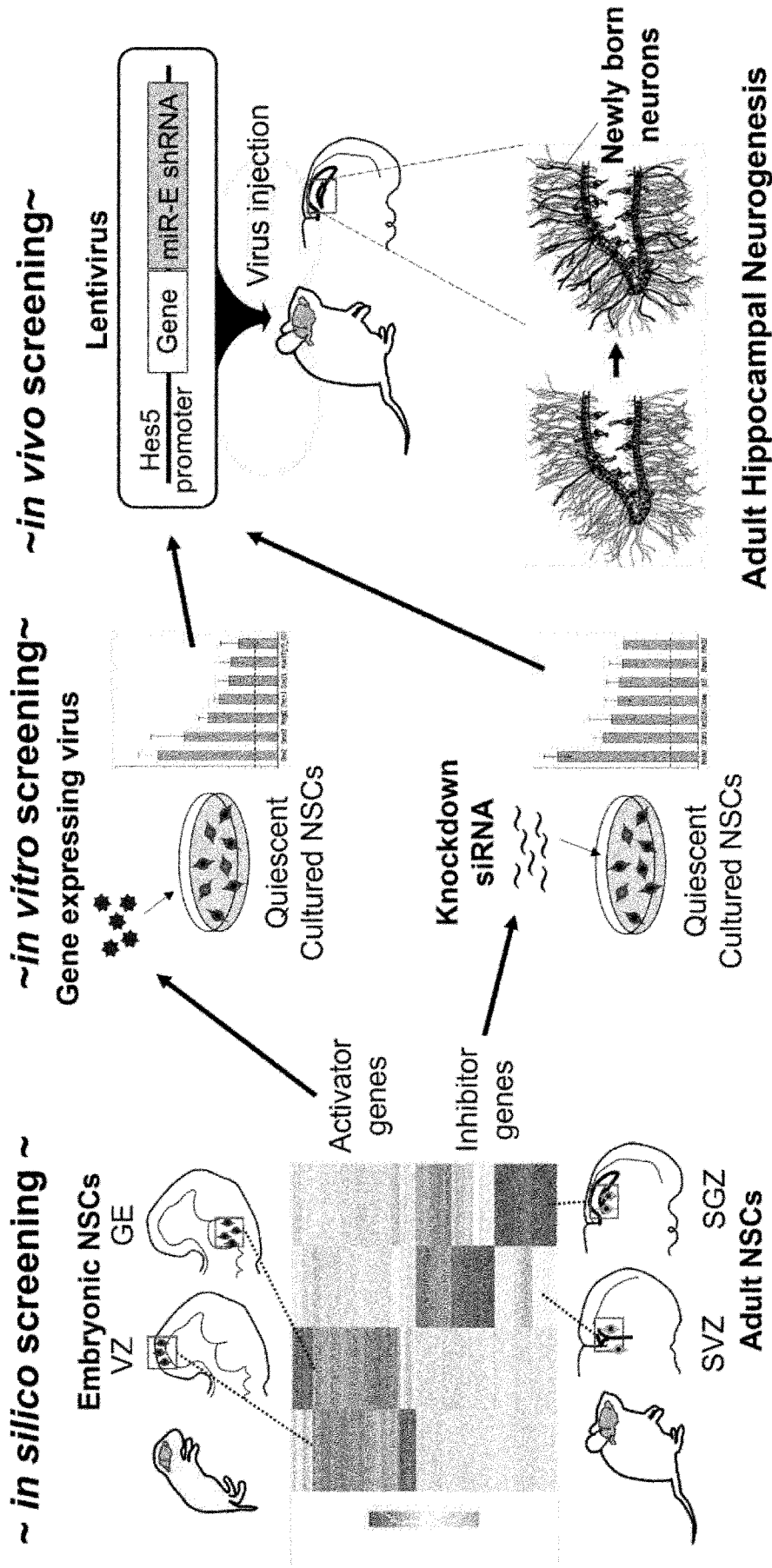
請求の範囲

- [請求項1] (A) Plagl2遺伝子の核酸配列、
(B) Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列、及び
(C) 上記核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。
- [請求項2] 上記Plagl2遺伝子及びDyrk1a遺伝子が、哺乳類の遺伝子である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項3] 上記プロモーターが、Hes5プロモーター、GFAPプロモーター、Sox2プロモーター及びLfngプロモーターから成る群より選択されるプロモーターである、請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項4] 請求項1から3のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項5] 上記ベクターが、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、又はプラスミドベクターである、請求項4に記載のベクター。
- [請求項6] 請求項4又は5に記載のベクターを含有する医薬組成物。
- [請求項7] (a) Plagl2遺伝子の核酸配列、及び上記Plagl2遺伝子の核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むベクター、並びに
(b) Dyrk1a遺伝子に対するmiR-shRNA (microRNA adapted short hairpin RNA) の核酸配列、及び上記miR-shRNAの核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含むベクター、又はDyrk1a遺伝子に対するsiRNA若しくはmiRNAを含有する医薬組成物。
- [請求項8] 請求項4又は5に記載のベクターにより形質転換された細胞。
- [請求項9] 請求項8に記載の細胞を含有する医薬組成物。
- [請求項10] 神経変性疾患又は内耳疾患の治療のために用いられる、請求項6、7又は9に記載の医薬組成物。

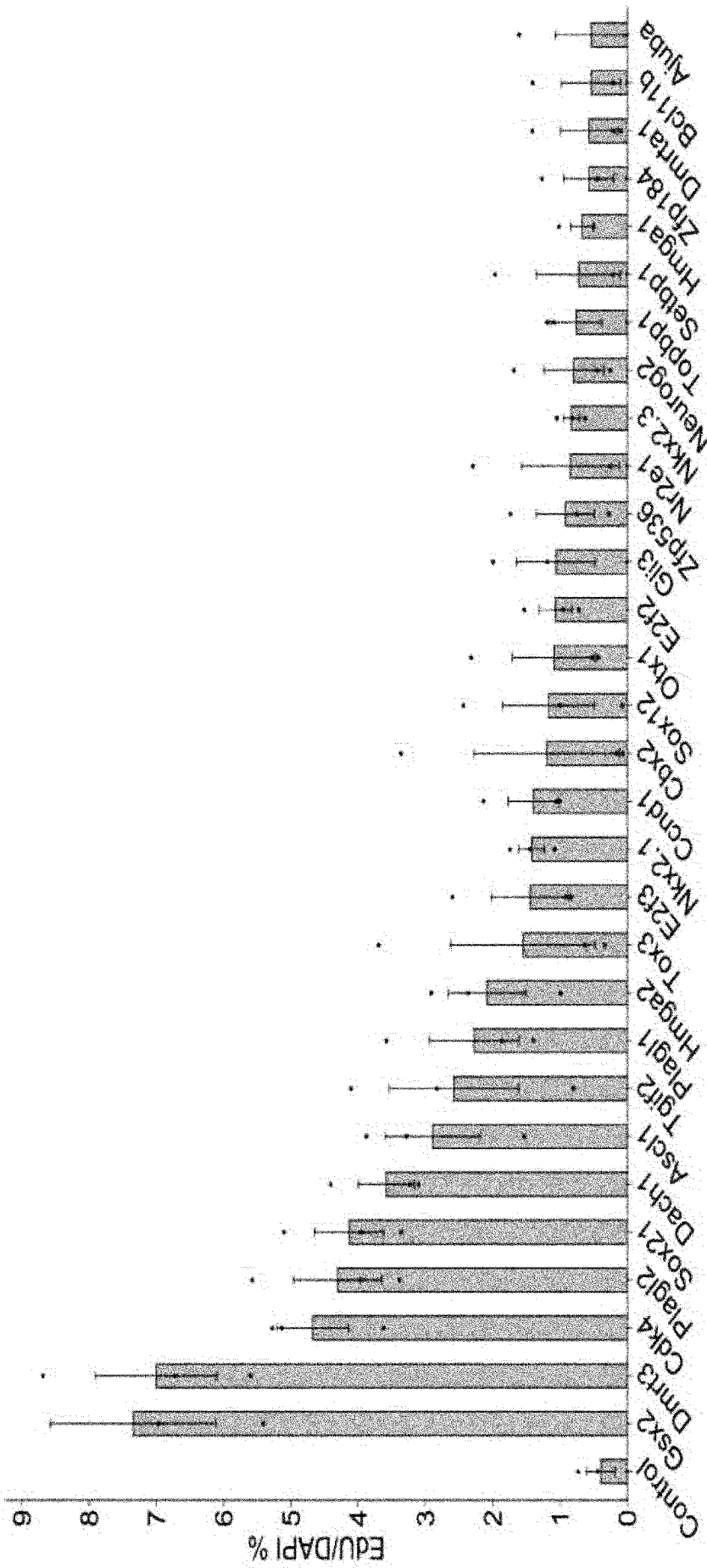
[請求項11] 脳室内注射、髄腔内のボラス注射又は注入、神経節内注射、神経内注射、皮下注射、または鼓室内注射によって対象に投与される、請求項10に記載の医薬組成物。

[請求項12] (1) 神経幹細胞又は内耳支持細胞に被験物質を作用させ、Plagl2遺伝子及びDyrk1a遺伝子の発現を測定する工程、並びに
(2-1) 上記工程(1)の結果から、Plagl2遺伝子発現増強能及びDyrk1a遺伝子発現抑制能を有する被験物質を選定する工程、又は
(2-2) 上記工程(1)の結果から、Plagl2遺伝子発現増強能を有する被験物質と、Dyrk1a遺伝子の発現抑制能を有する被験物質とを選定する工程
を含む、神経変性疾患又は内耳疾患の治療用物質のスクリーニング方法。

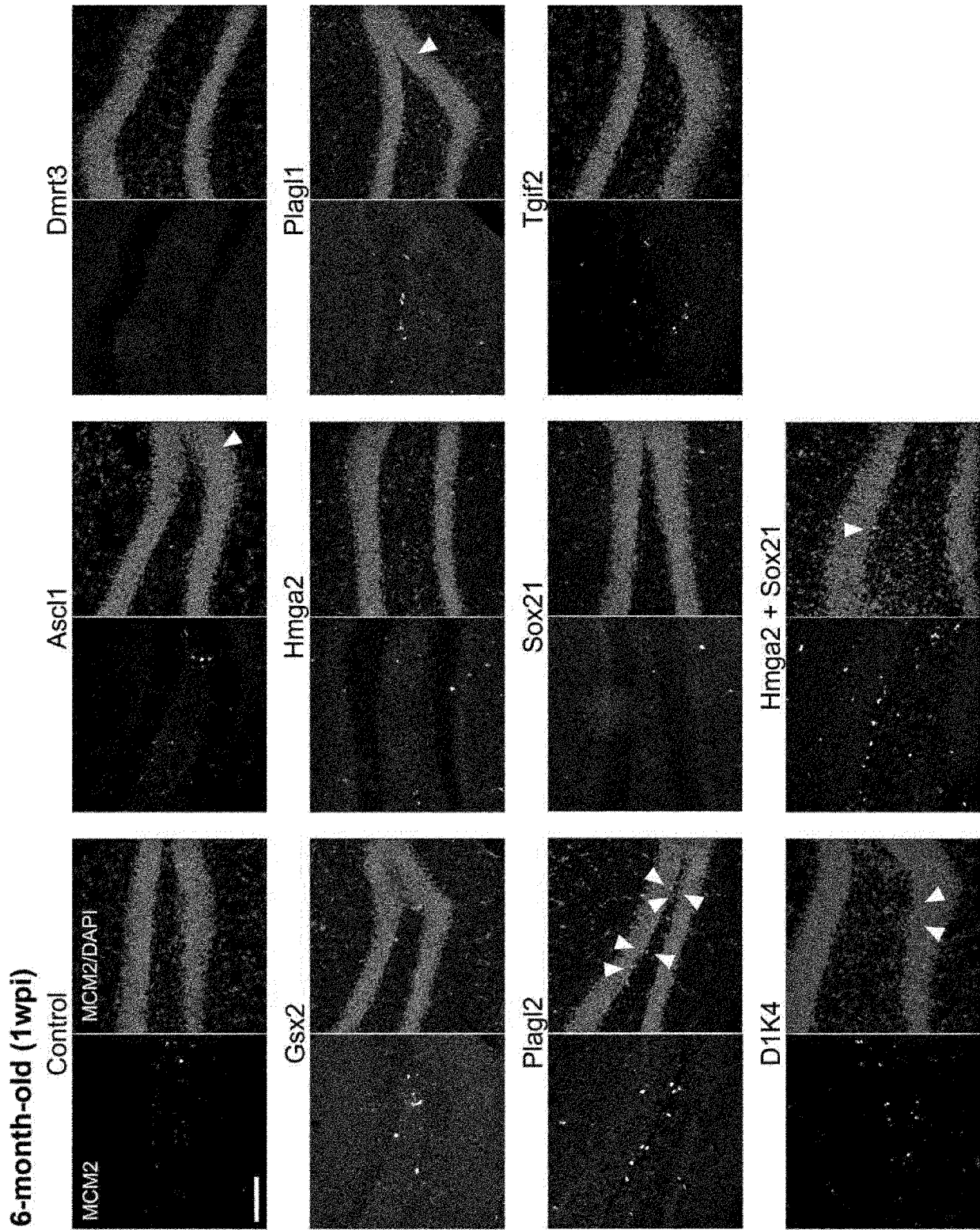
[1]



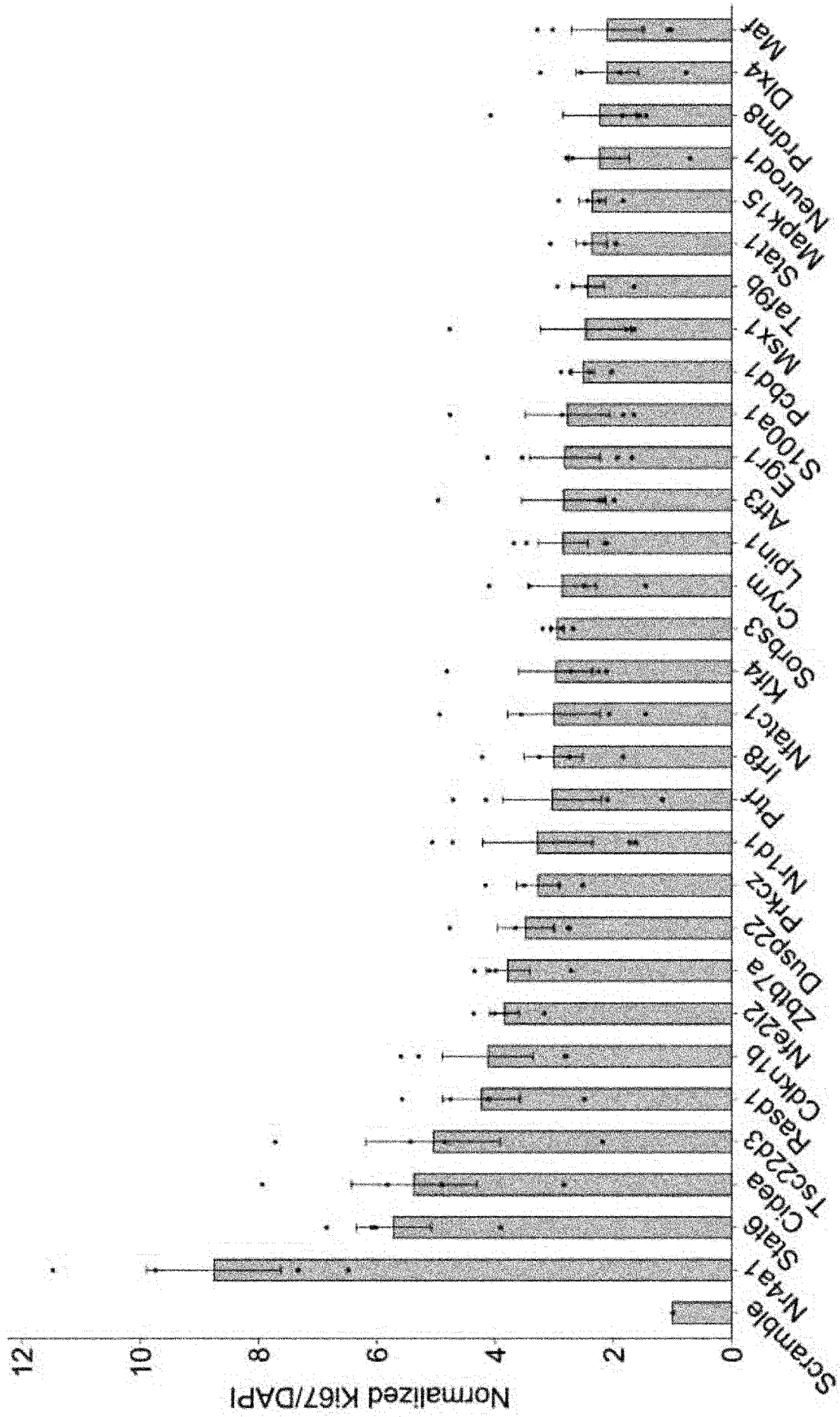
[図2]



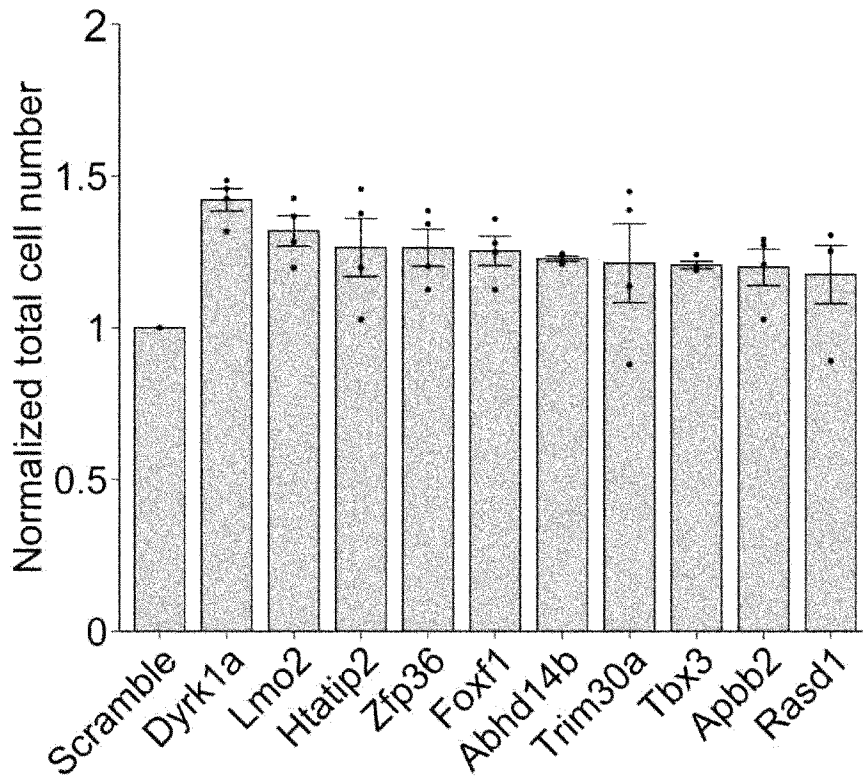
[3]



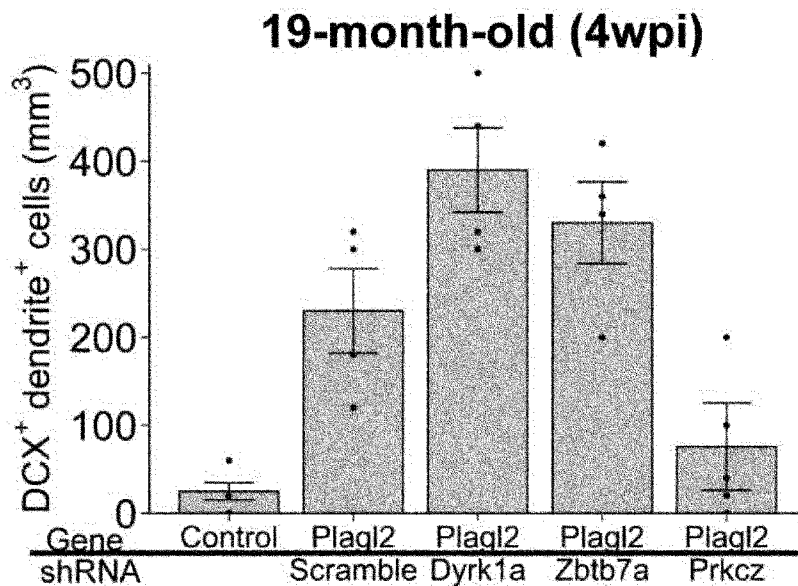
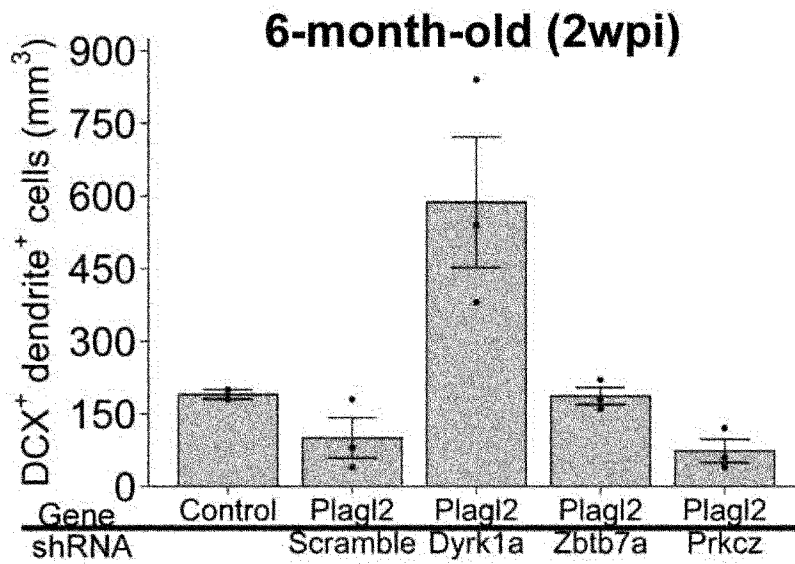
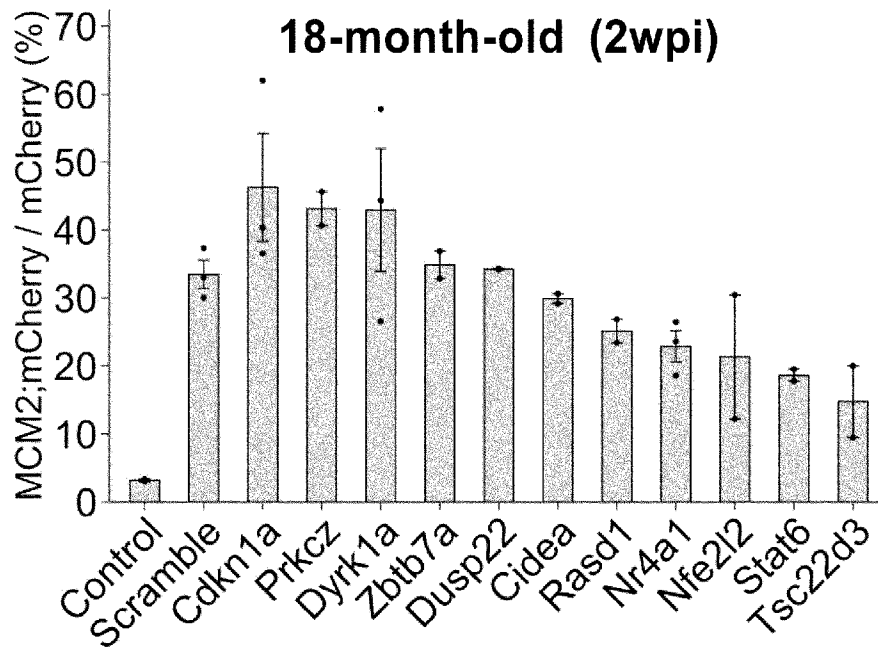
[図4-1]



[圖4-2]

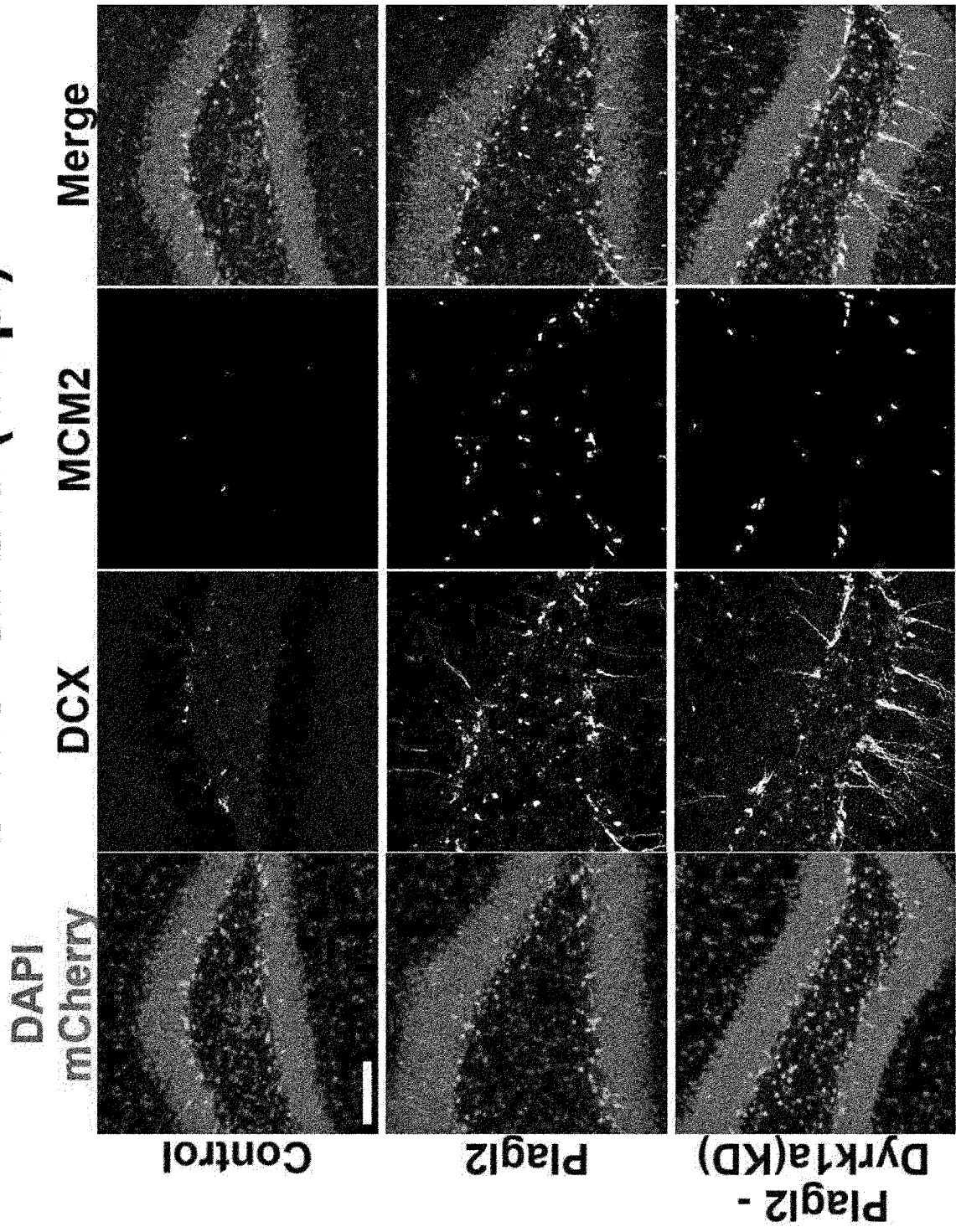


[5]

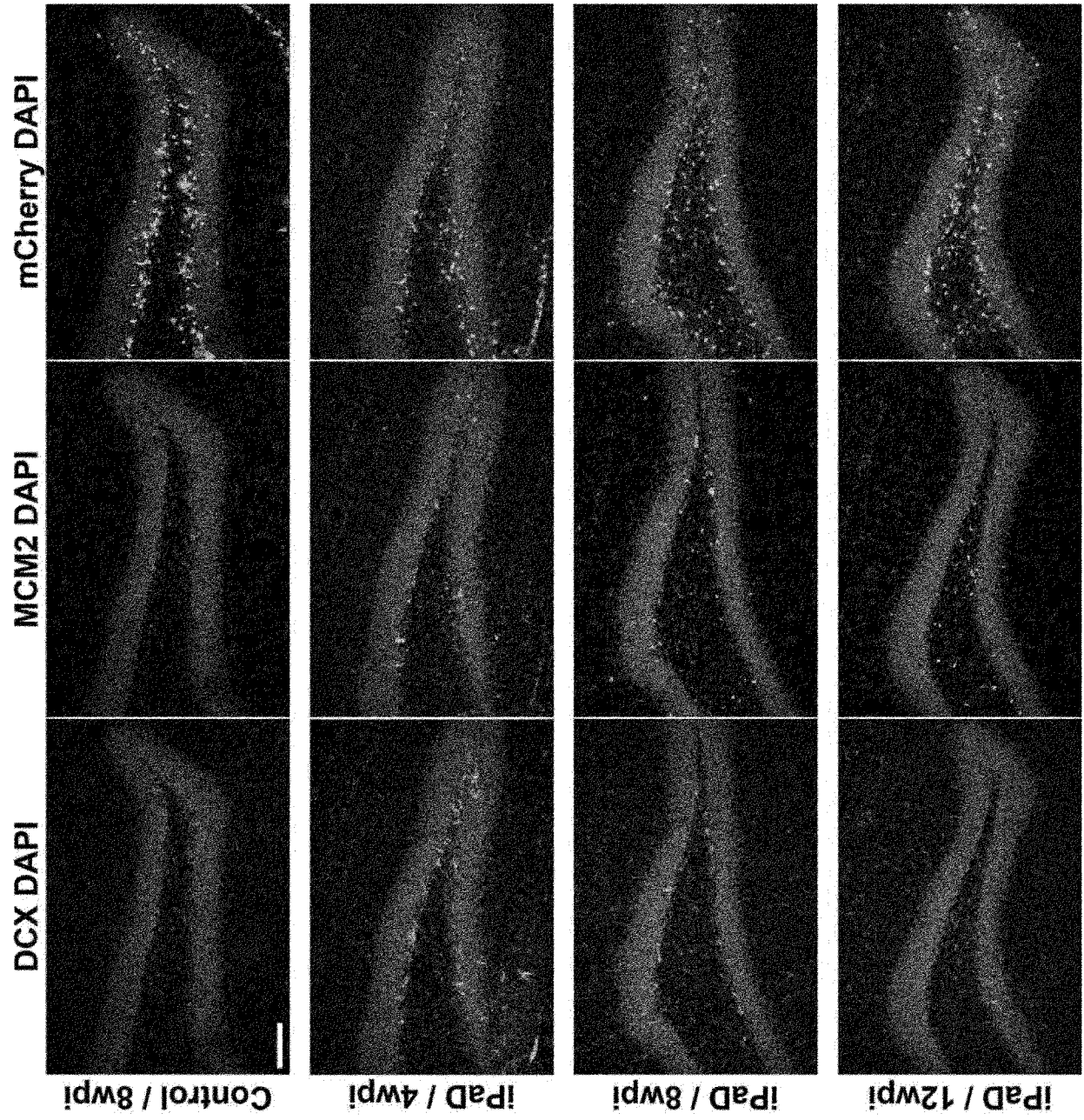


[図6]

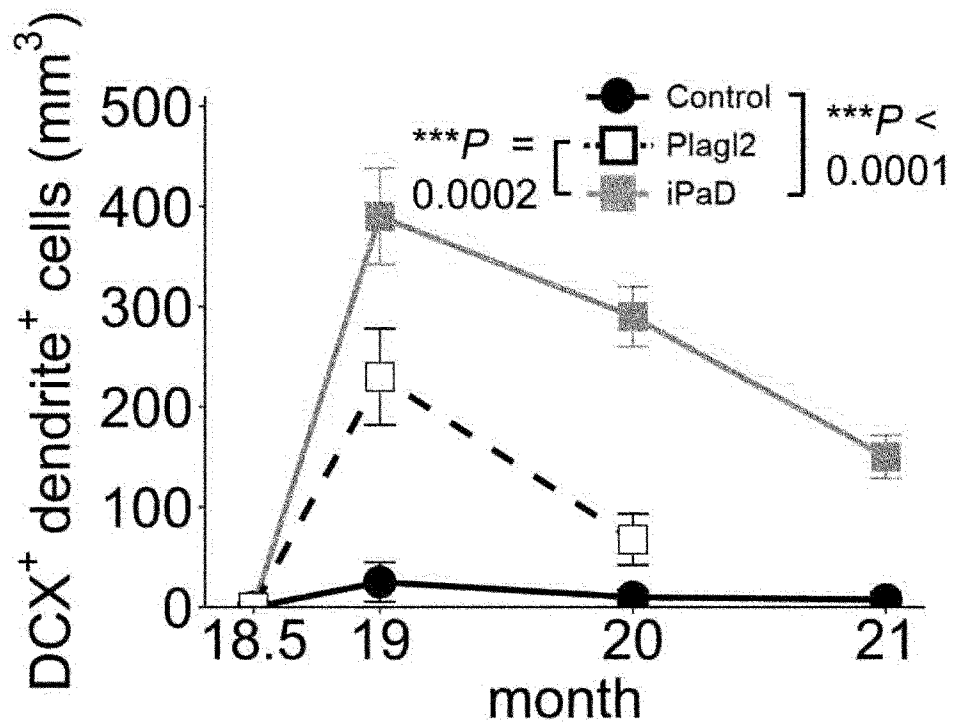
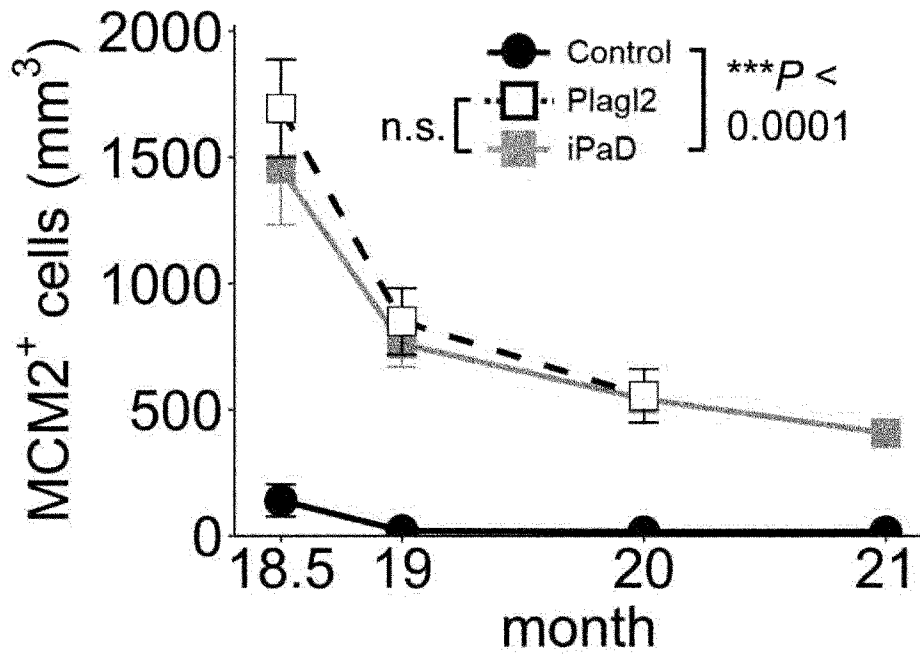
19-month-old (4wpi)



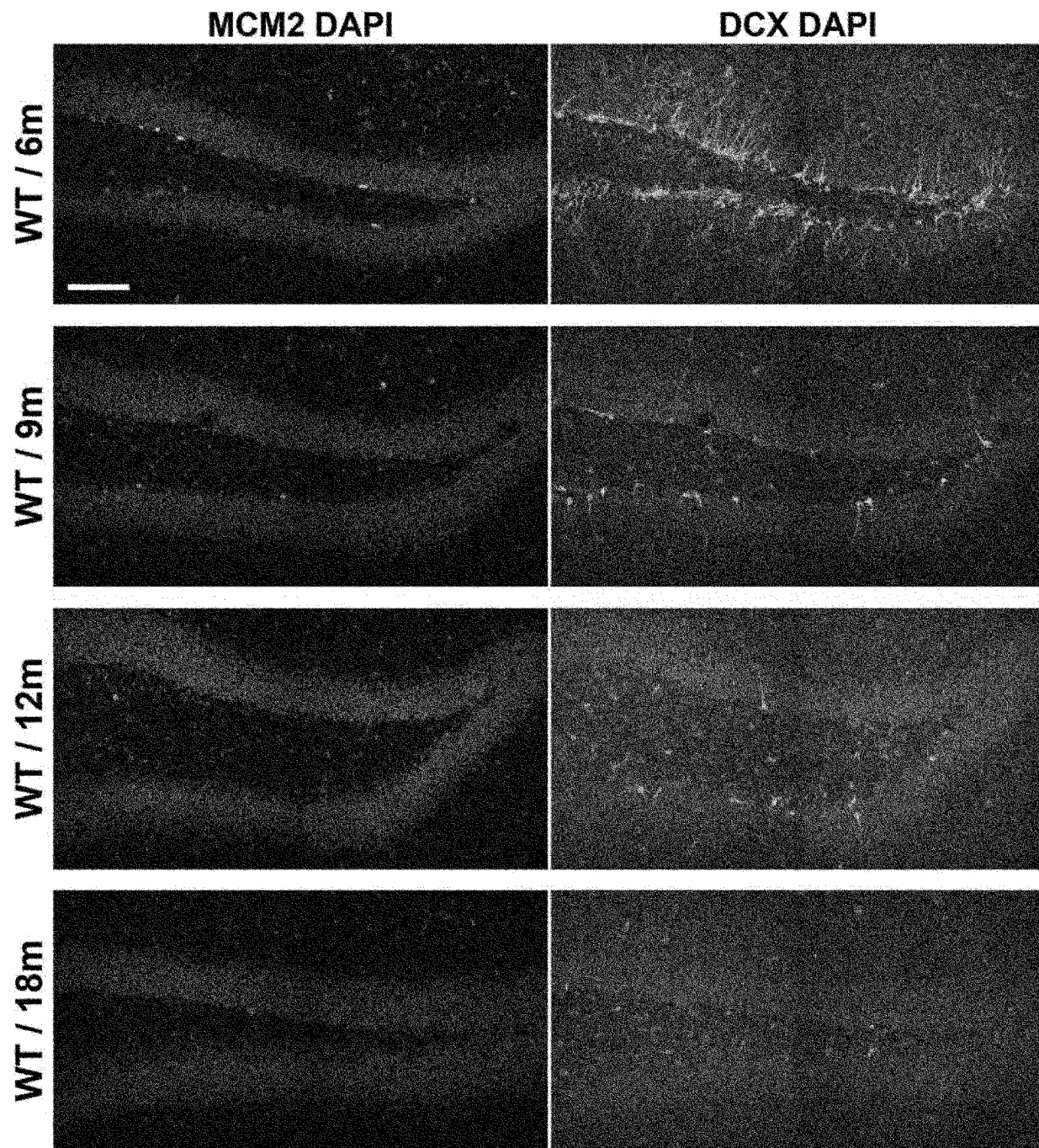
[7]



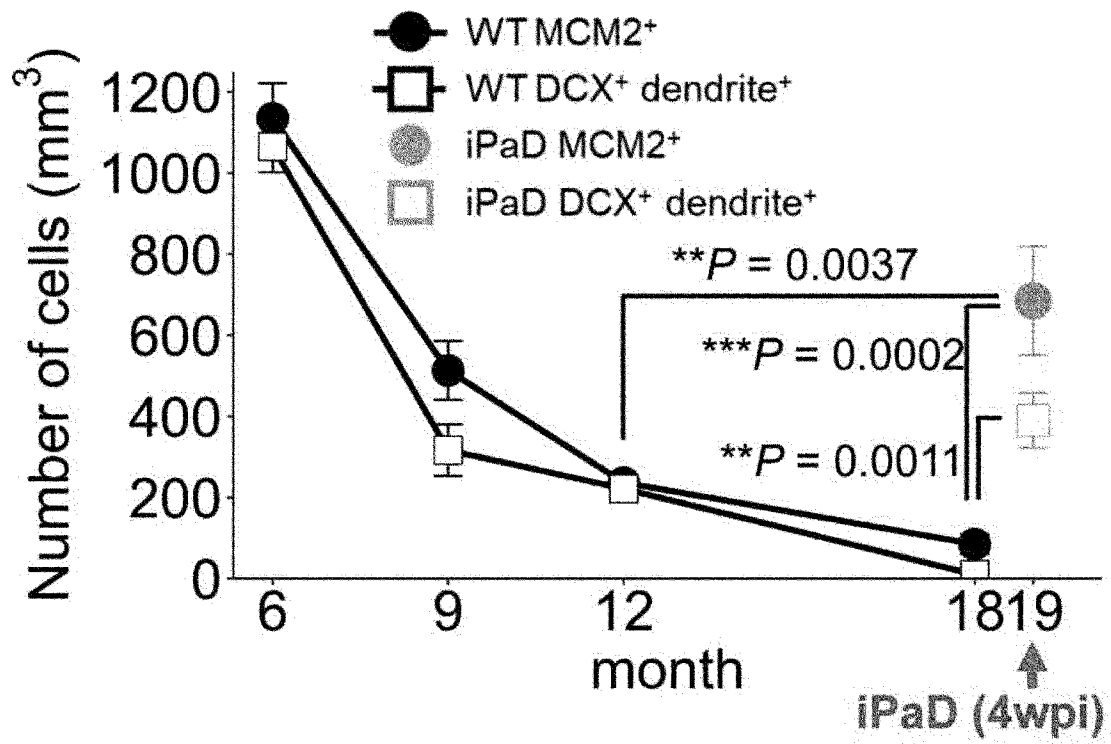
[図8]



[9-1]

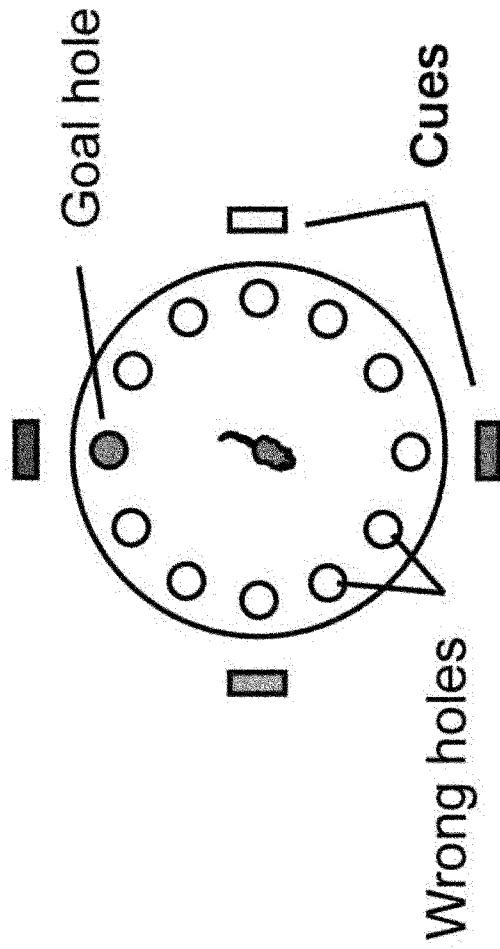
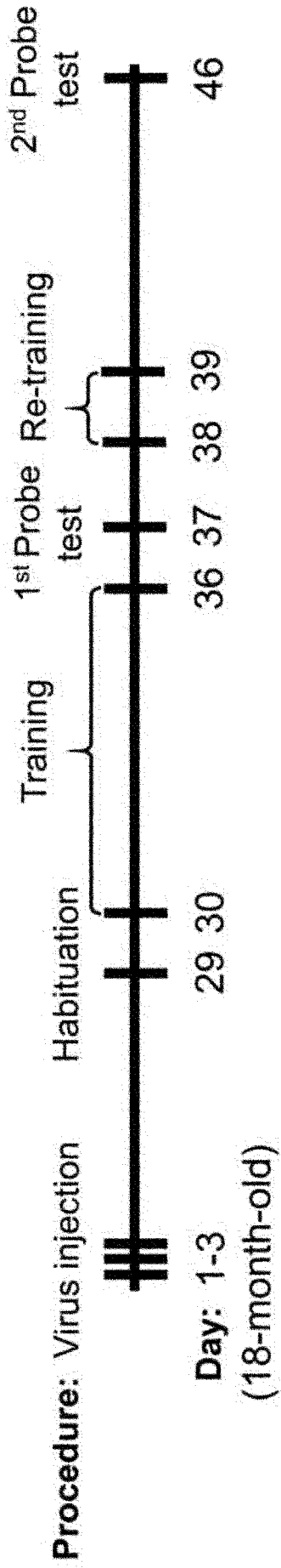


[図9-2]

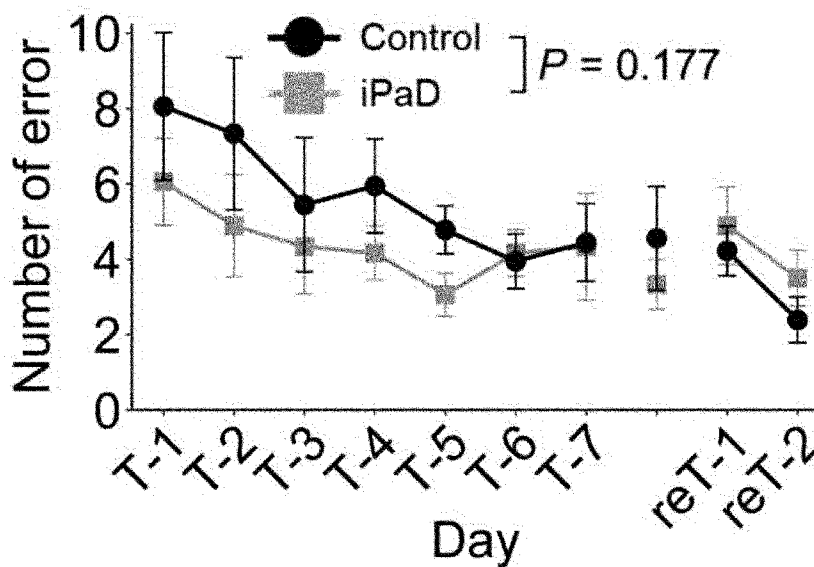
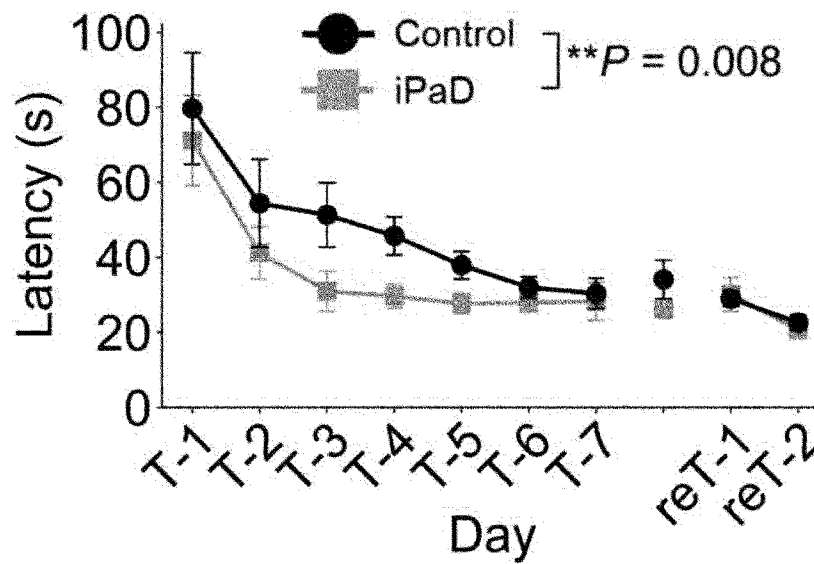
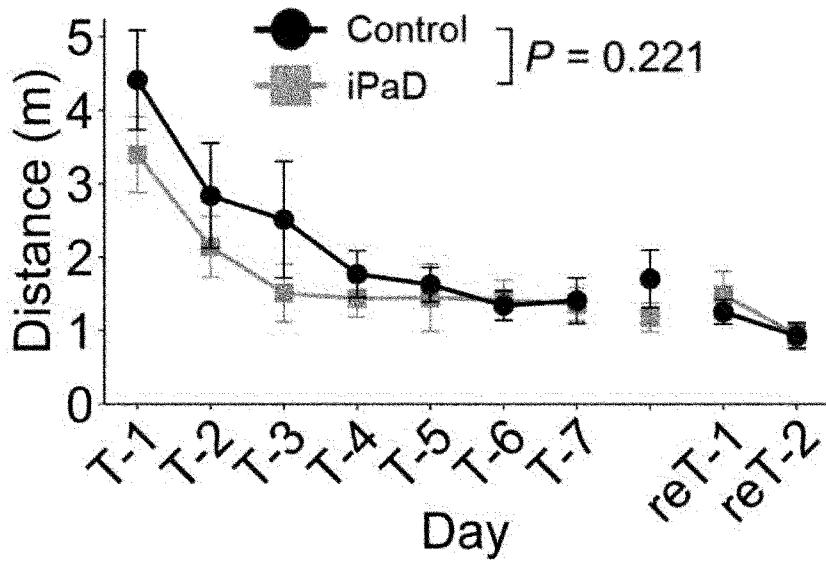


[10-1]

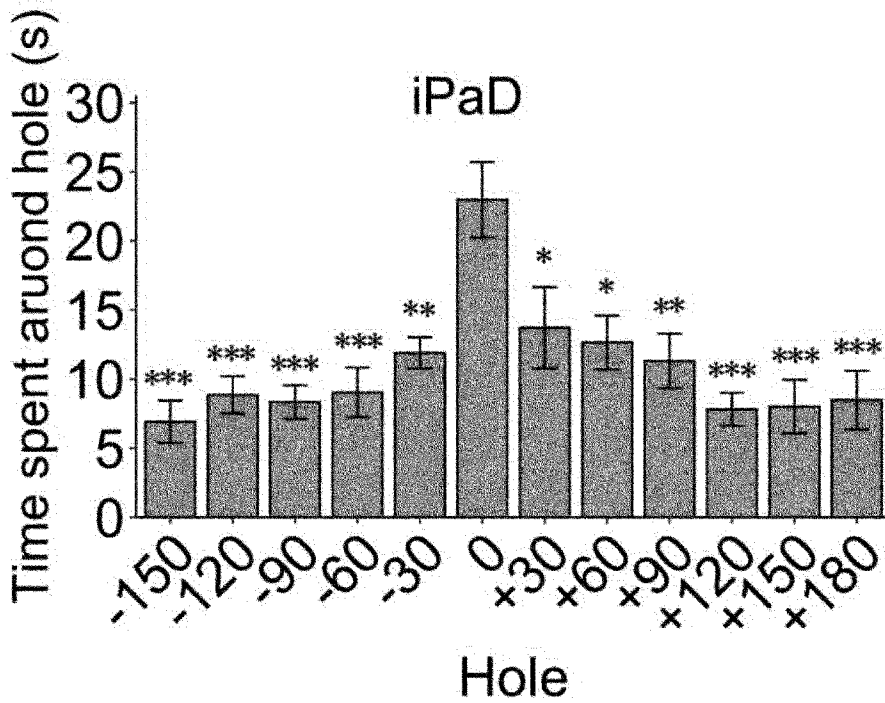
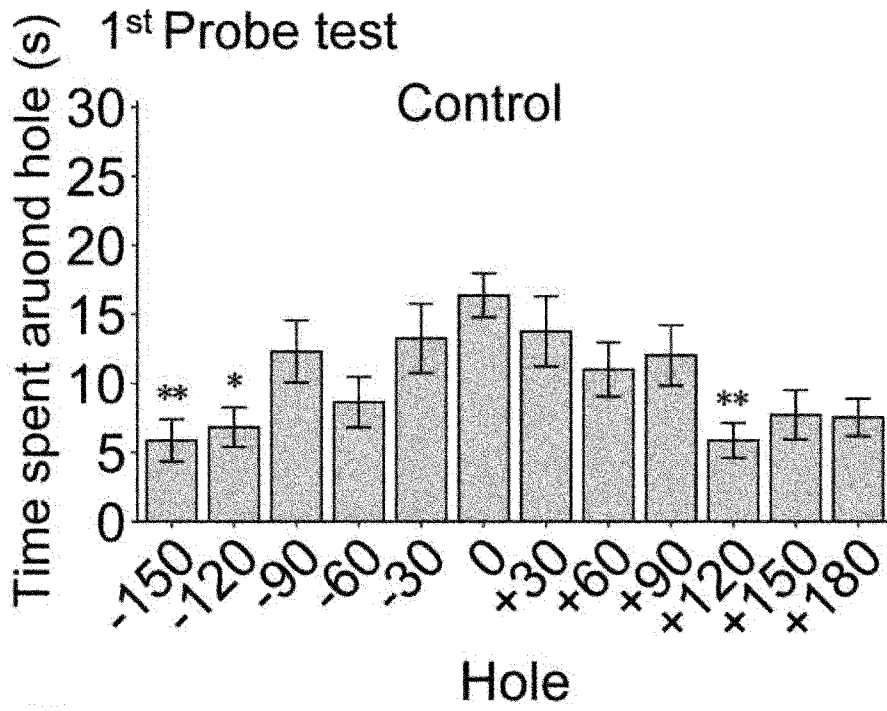
A Barnes maze test



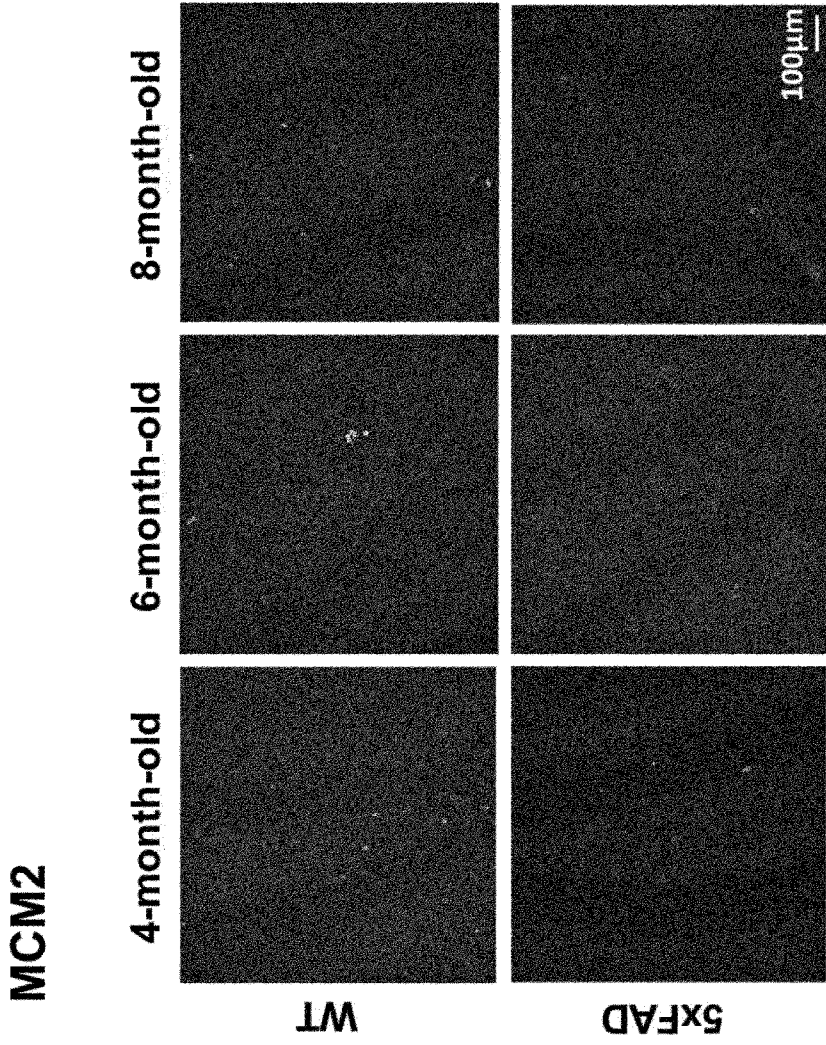
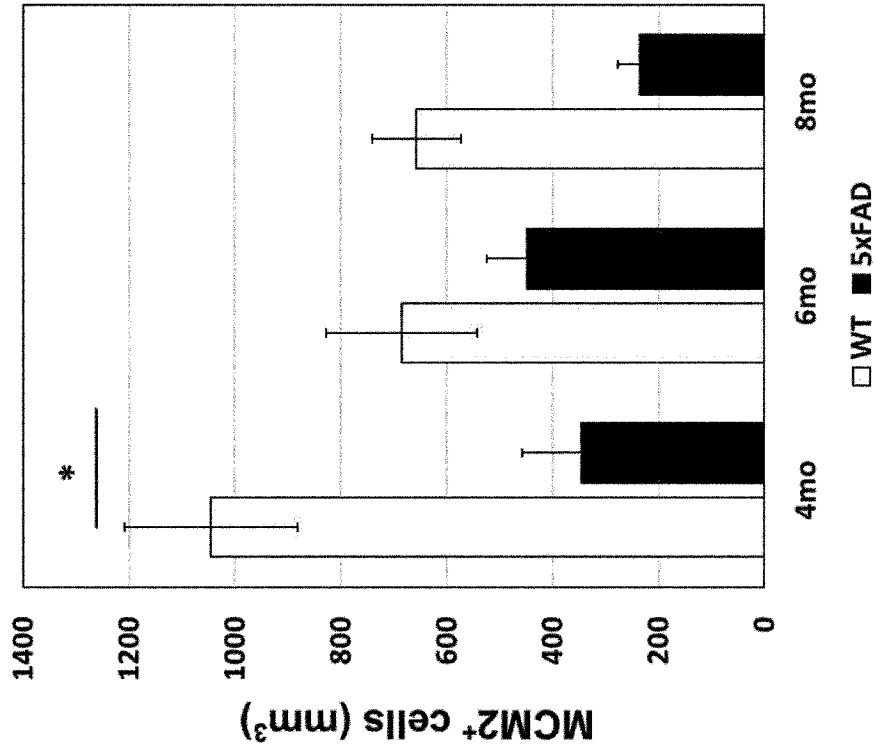
[図10-2]

B

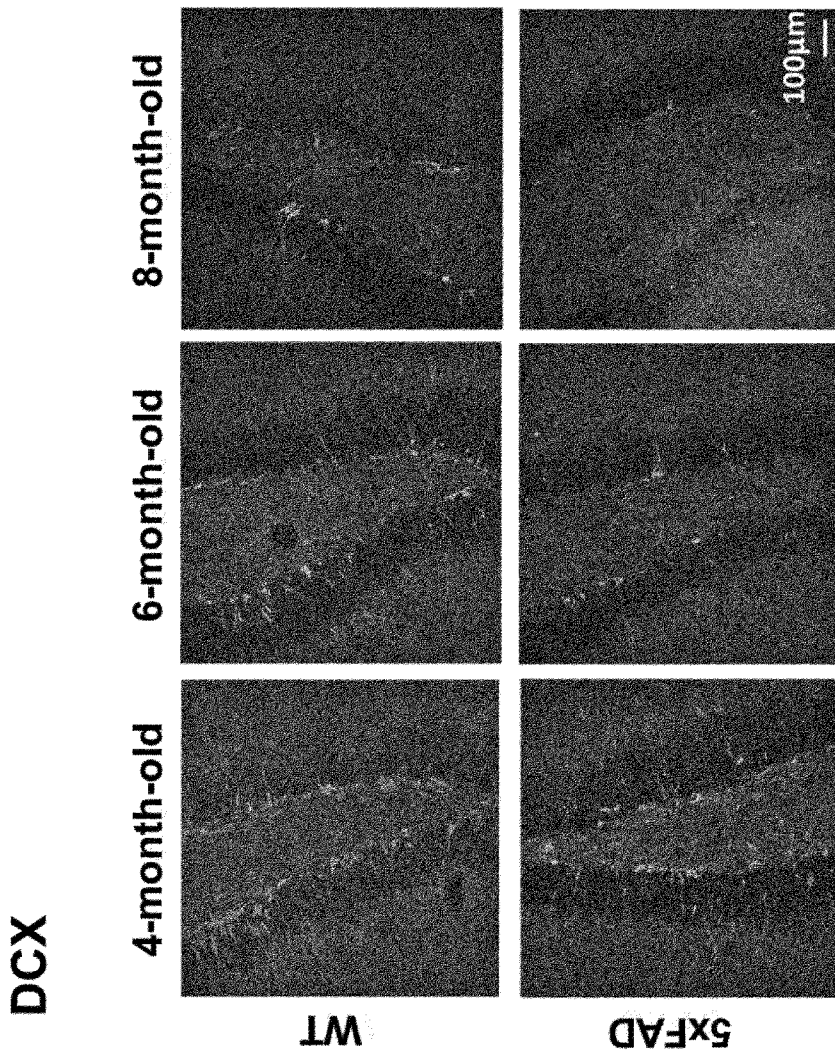
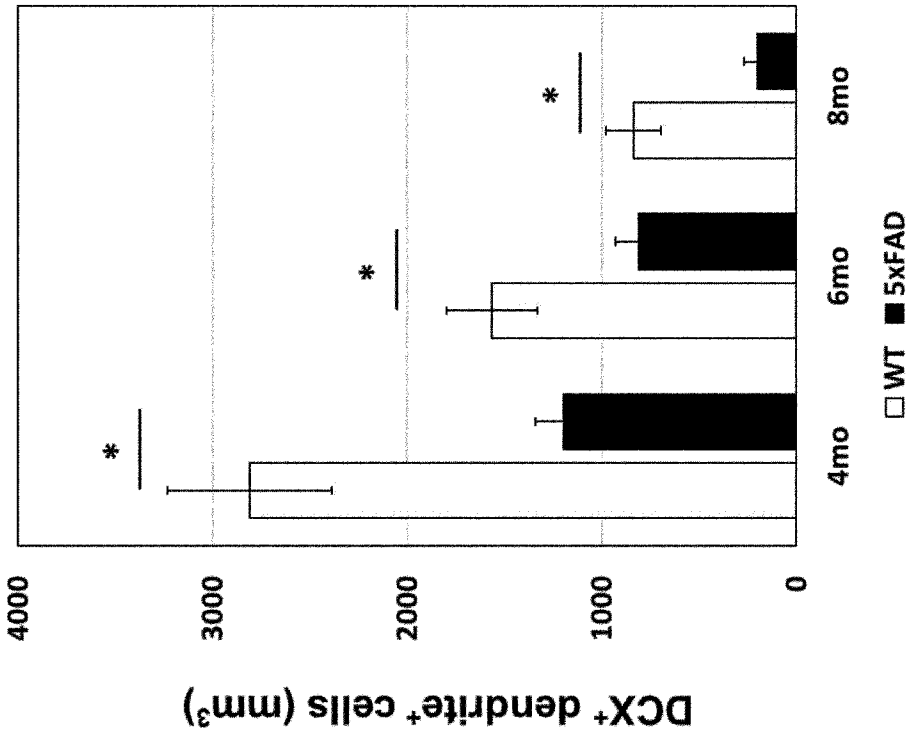
[図10-3]



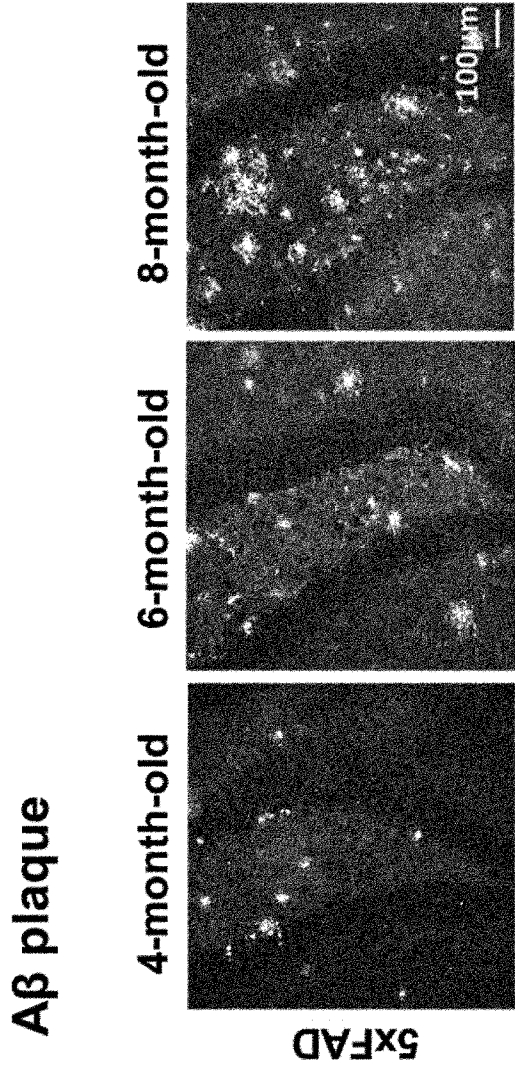
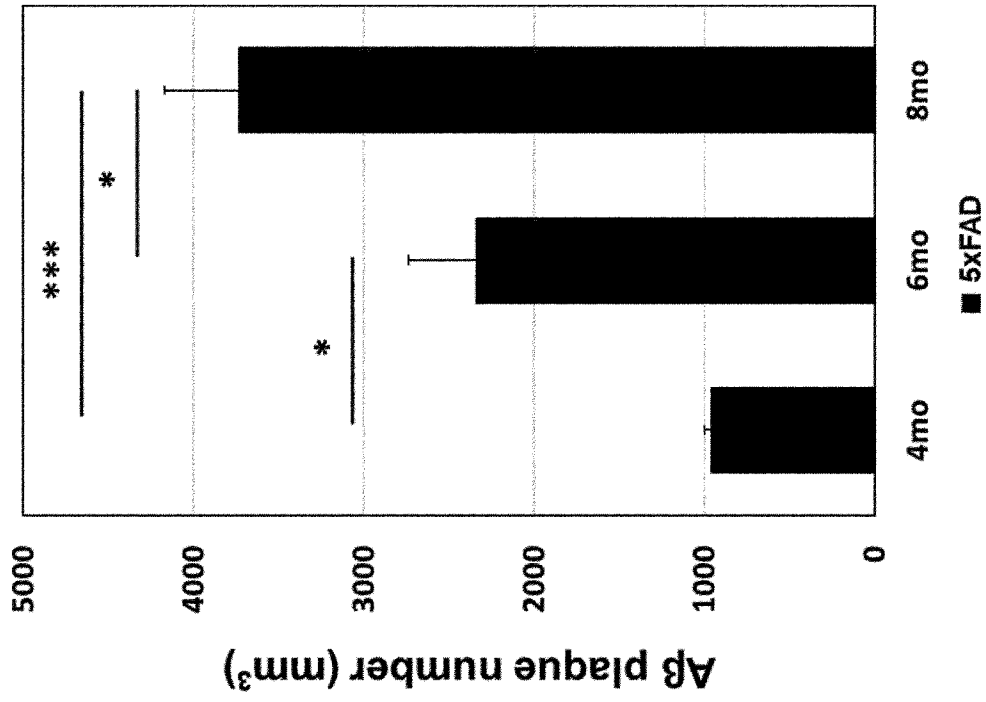
[11]



[Figure 12]

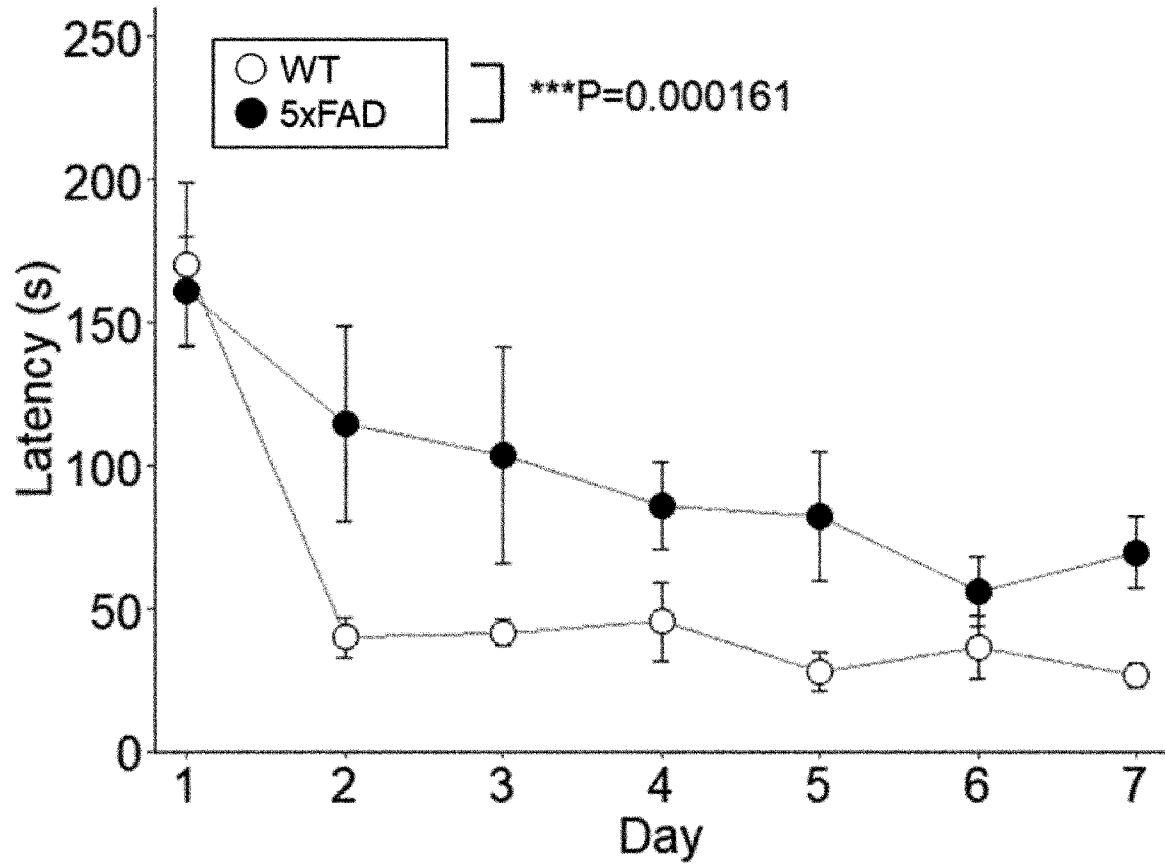


[13]



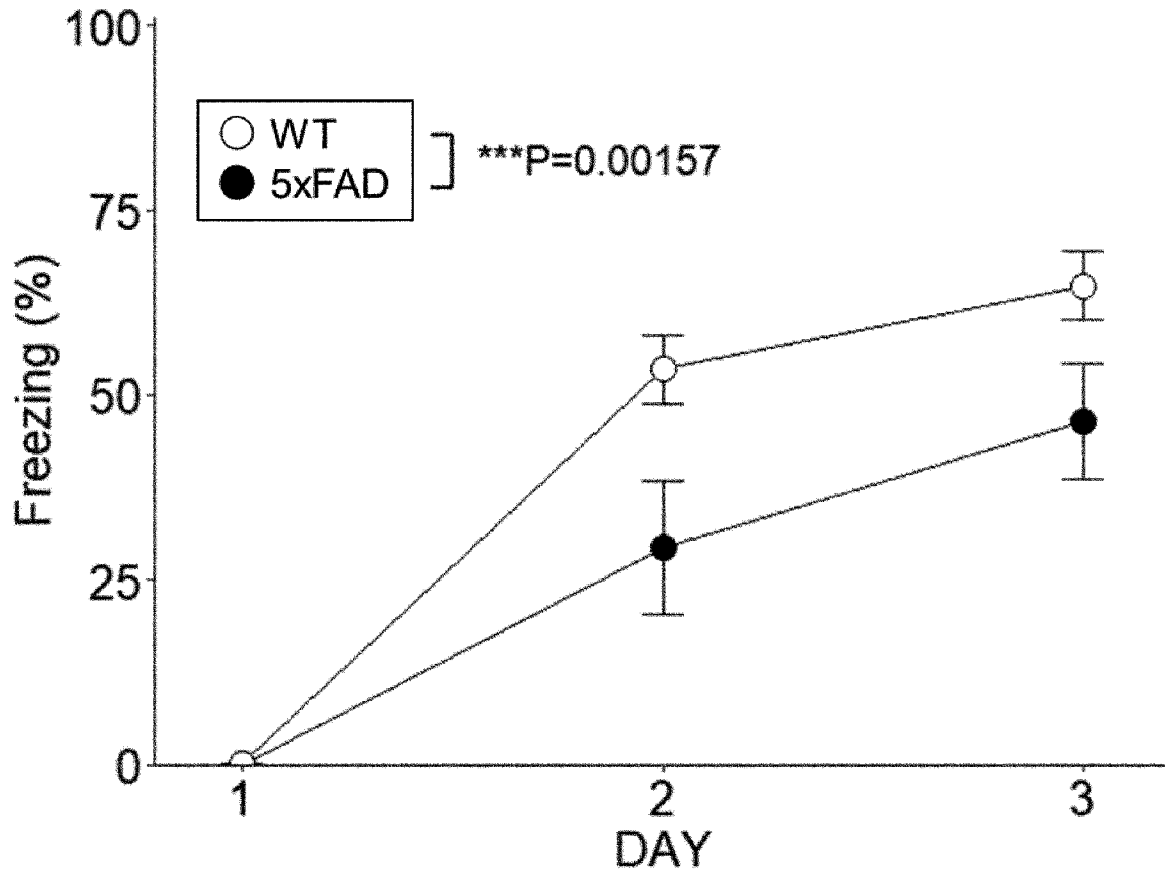
[図14]

Barnes maze test

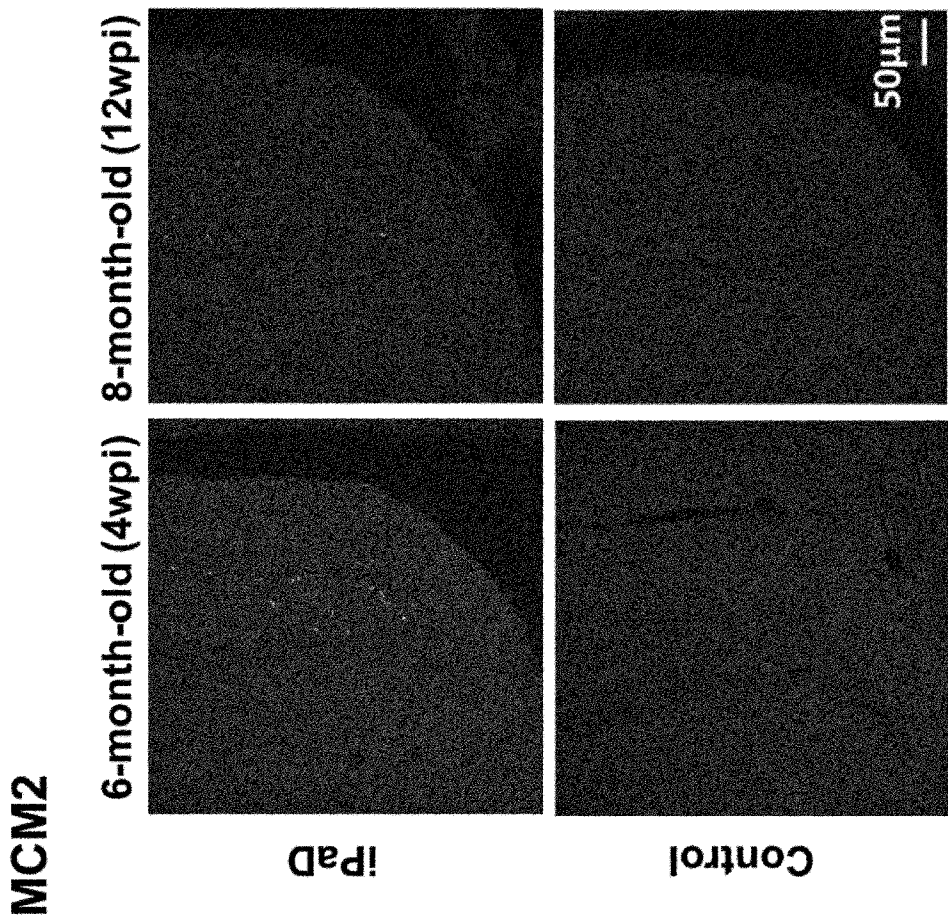
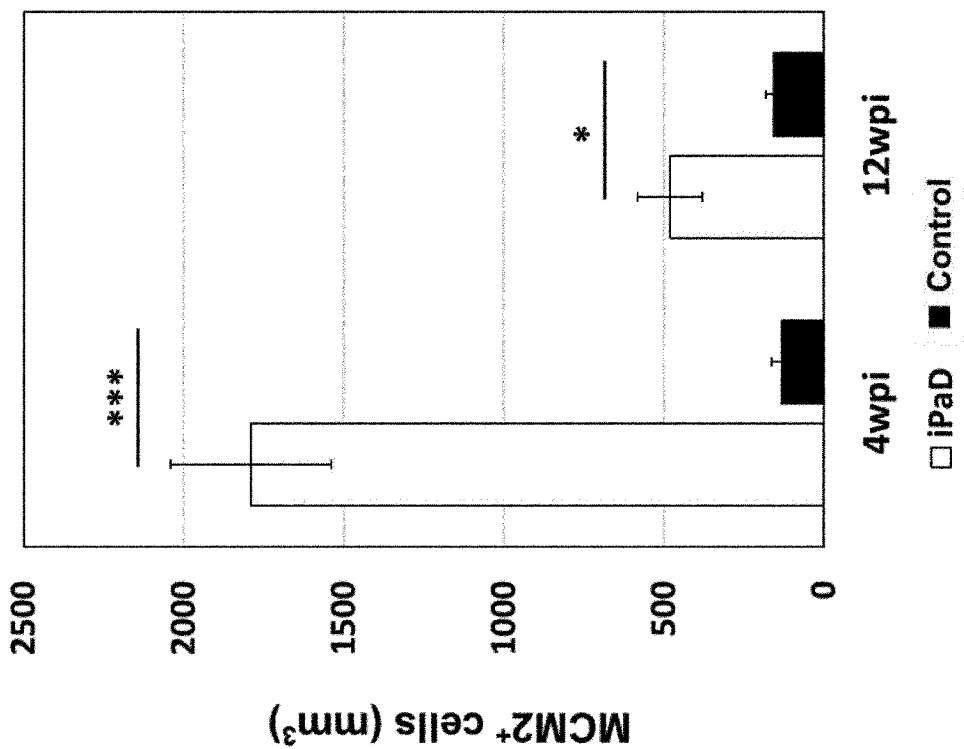


[図15]

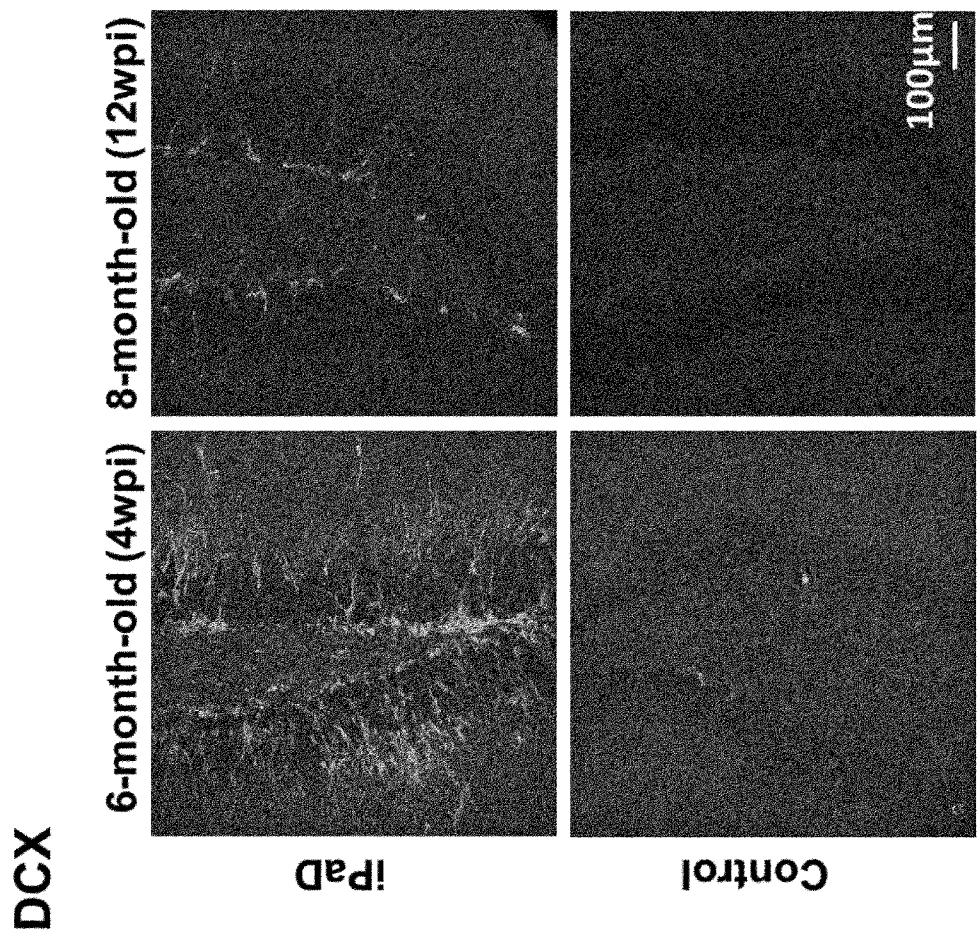
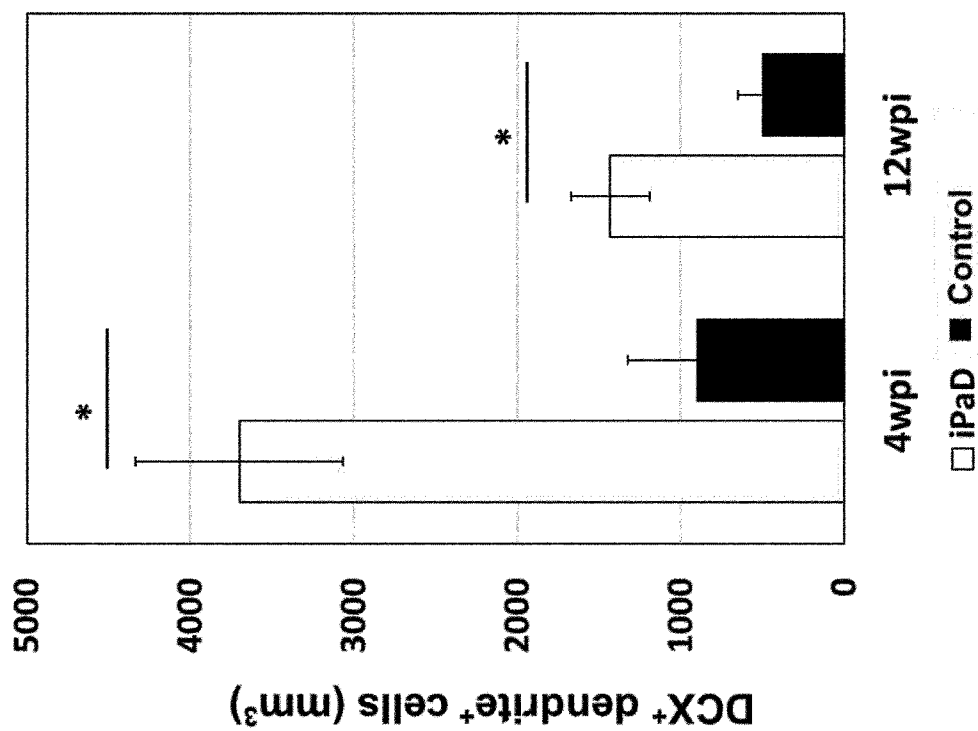
Fear conditioning test



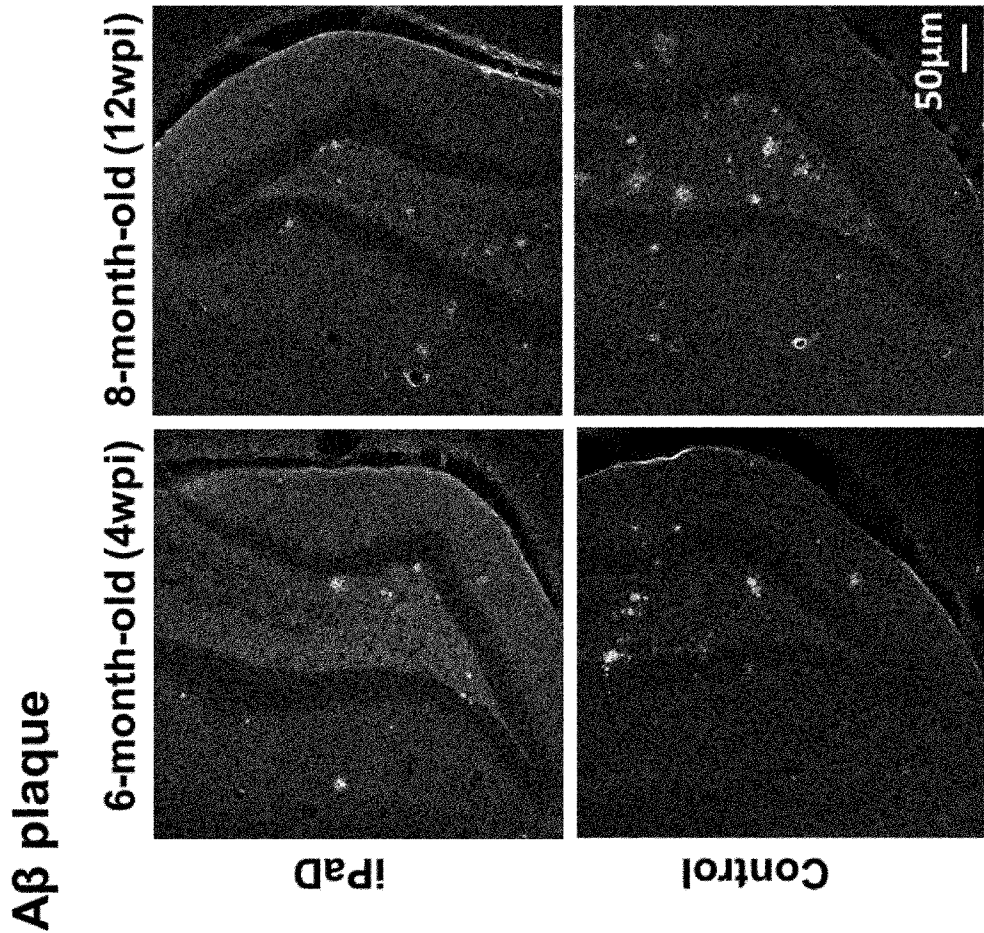
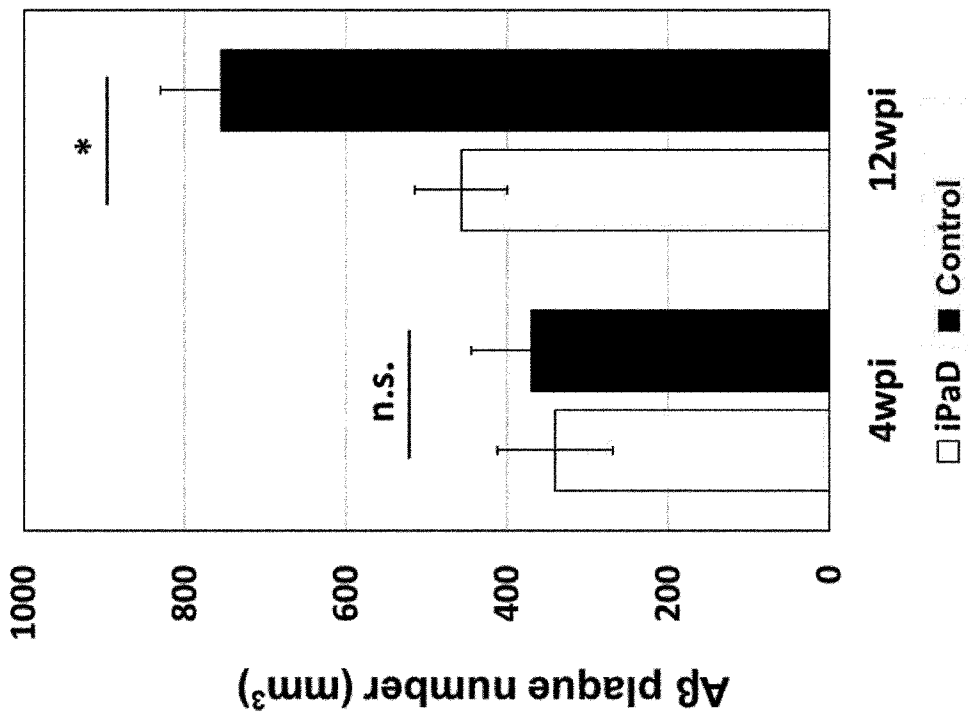
[16]



[17]

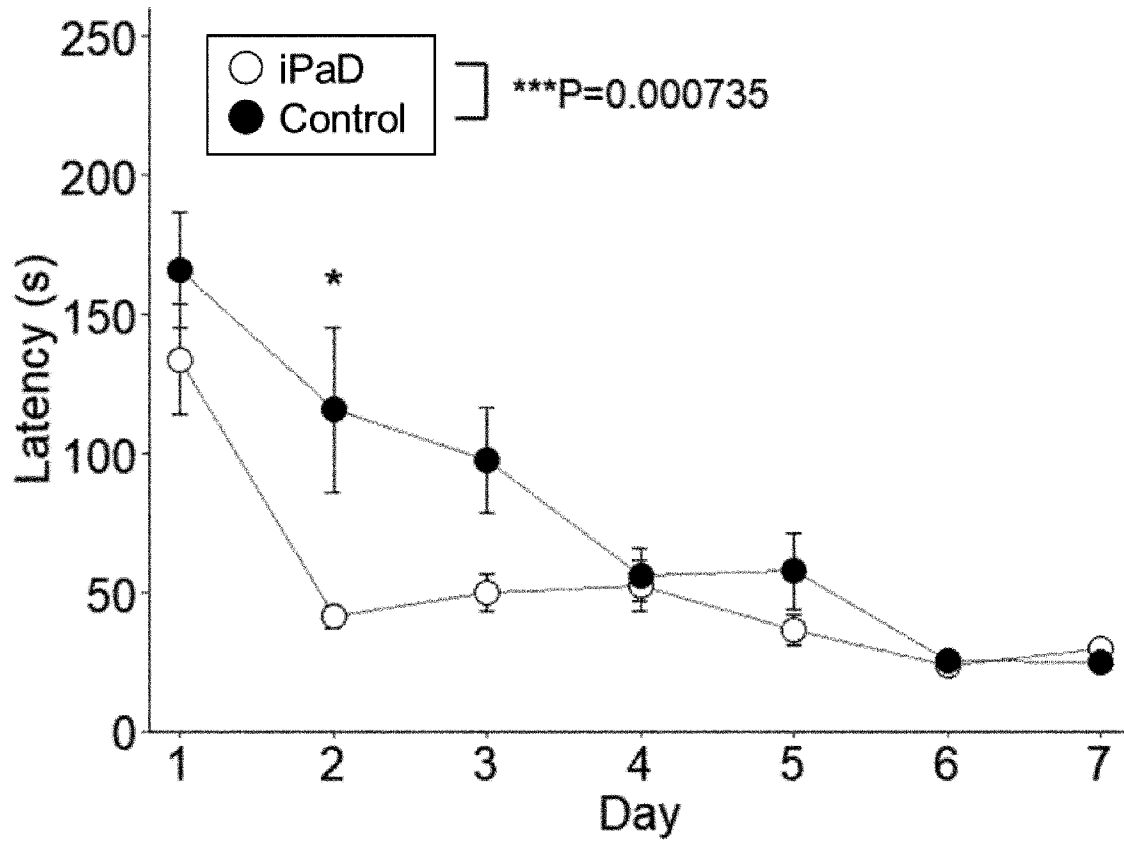


[18]



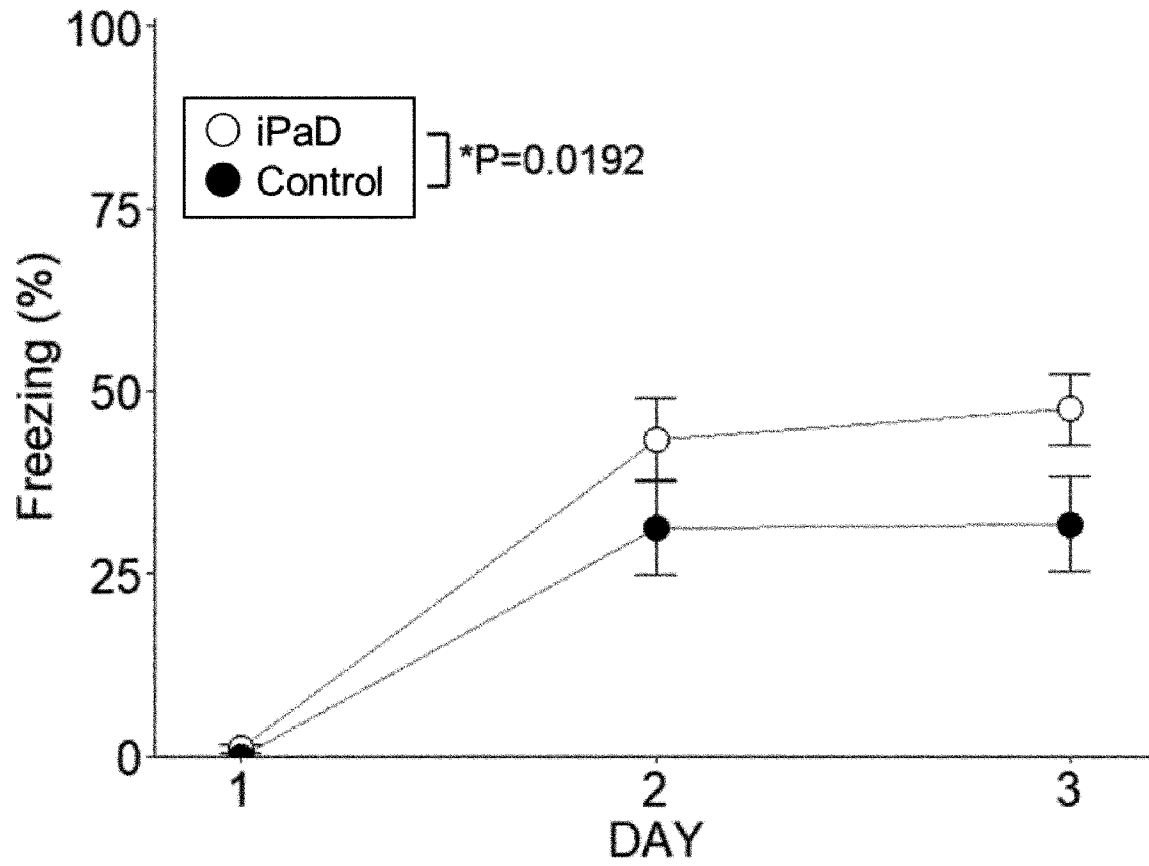
[図19]

Barnes maze test

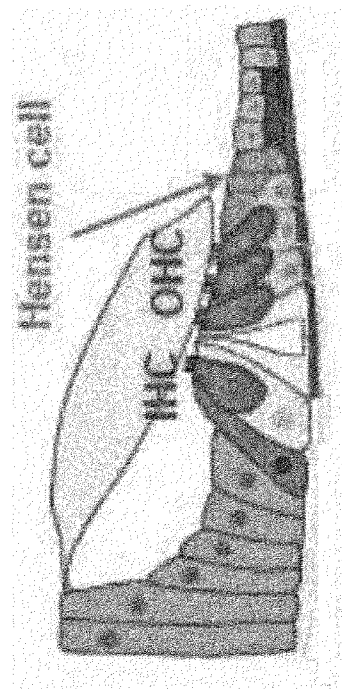
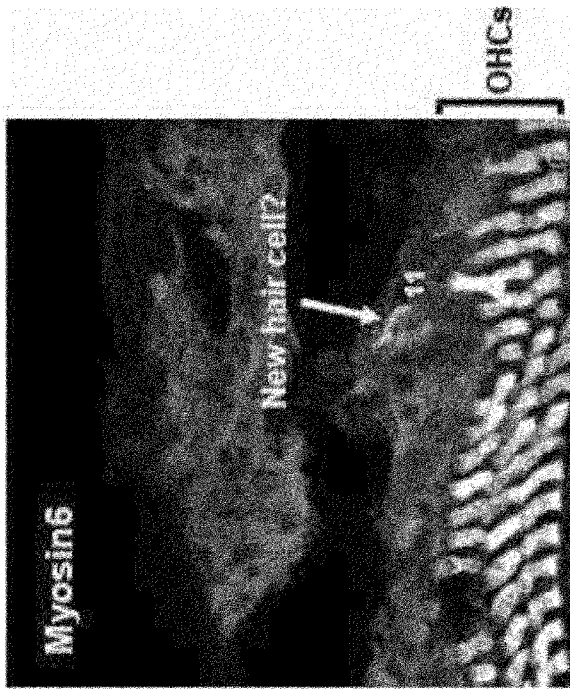


[図20]

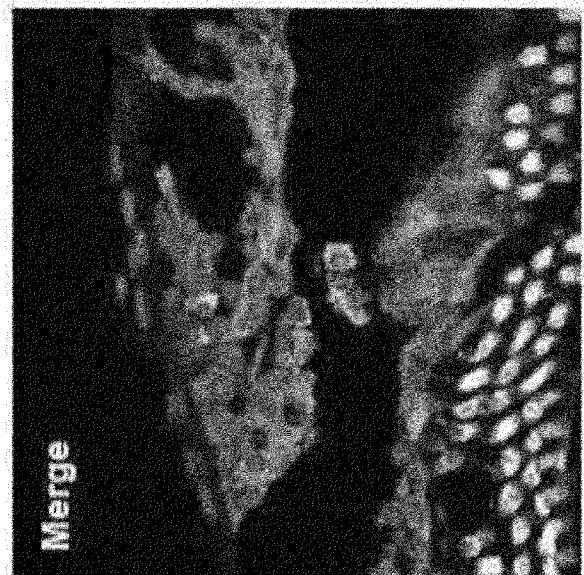
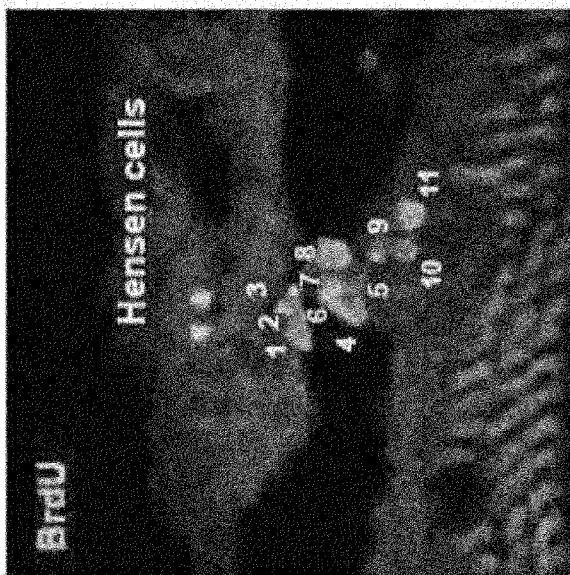
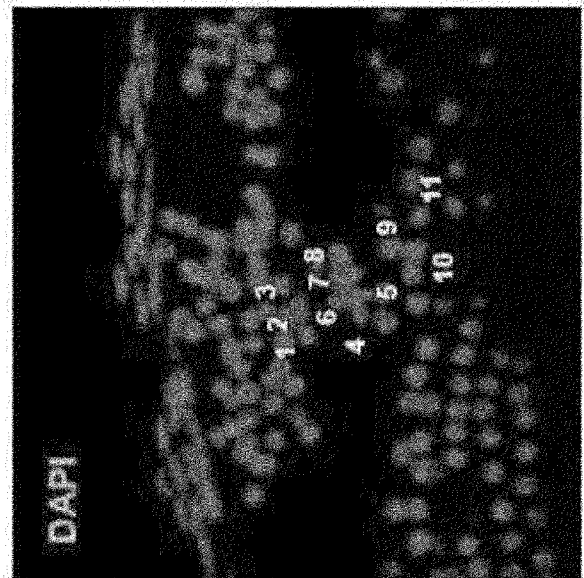
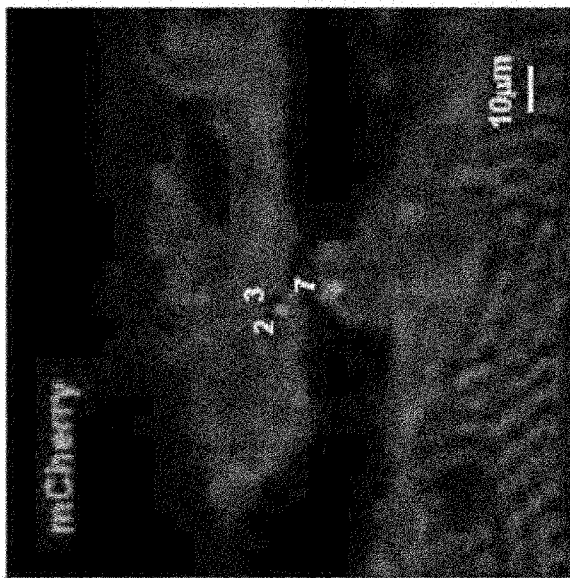
Fear conditioning test



[図21]



OHC : 外有毛細胞
 Hensen cell : 支持細胞の一種



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/008055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/12</i>(2006.01)i; <i>A61K 9/08</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/7105</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/713</i>(2006.01)i; <i>A61K 35/76</i>(2015.01)i; <i>A61K 35/761</i>(2015.01)i; <i>A61K 48/00</i>(2006.01)i; <i>A61P 25/00</i>(2006.01)i; <i>A61P 27/16</i>(2006.01)i; <i>A61P 43/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/11</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/113</i>(2010.01)i; <i>C12N 15/86</i>(2006.01)i; <i>C12Q 1/06</i>(2006.01)i FI: C12N15/12 ZNA; C12N15/86 Z; C12N5/10; C12N15/11 Z; C12N15/113 130Z; C12Q1/06; A61K35/76; A61K35/761; A61K31/713; A61K31/7105; A61K48/00; A61P43/00 121; A61K9/08; A61P25/00; A61P27/16</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N15/12; A61K9/08; A61K31/7105; A61K31/713; A61K35/76; A61K35/761; A61K48/00; A61P25/00; A61P27/16; A61P43/00; C12N5/10; C12N15/11; C12N15/113; C12N15/86; C12Q1/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LECHNER, C. et al. [b]-Annulated Halogen-Substituted Indoles as Potential DYRK1A Inhibitors. <i>Molecules</i> . 13 November 2019, vol. 24, 4090, pp. 1-19, doi:10.3390/molecules24224090 entire text, all drawings	1-12
A	ZHENG, H. et al. PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas. <i>Cancer Cell</i> . 18 May 2010, vol. 17, no. 5, pp. 497-509, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.020 entire text, all drawings	1-12
A	GONCALVES, J. T. et al. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. <i>Cell</i> . 03 November 2016, vol. 167, no. 4, pp. 897-914, doi:10.1016/j.cell.2016.10.021 entire text, all drawings	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 March 2022		05 April 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		
		Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/12(2006.01)i; A61K 9/08(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 35/761(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 27/16(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/12 ZNA; C12N15/86 Z; C12N5/10; C12N15/11 Z; C12N15/113 130Z; C12Q1/06; A61K35/76; A61K35/761; A61K31/713; A61K31/7105; A61K48/00; A61P43/00 121; A61K9/08; A61P25/00; A61P27/16</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/12; A61K9/08; A61K31/7105; A61K31/713; A61K35/76; A61K35/761; A61K48/00; A61P25/00; A61P27/16; A61P43/00; C12N5/10; C12N15/11; C12N15/113; C12N15/86; C12Q1/06</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>LECHNER, C., et al., [b]-Annulated Halogen-Substituted Indoles as Potential DYRK1A Inhibitors, <i>Molecules</i>, 2019.11.13, Vol. 24, 4090, pp. 1-19, doi:10.3390/molecules24224090 全文、全図</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZHENG, H., et al., PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas, <i>Cancer Cell</i>, 2010.05.18, Vol. 17, No. 5, pp. 497-509, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.020 全文、全図</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GONCALVES, J. T., et al., Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior, <i>Cell</i>, 2016.11.03, Vol. 167, No. 4, pp. 897-914, doi:10.1016/j.cell.2016.10.021 全文、全図</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	A	LECHNER, C., et al., [b]-Annulated Halogen-Substituted Indoles as Potential DYRK1A Inhibitors, <i>Molecules</i> , 2019.11.13, Vol. 24, 4090, pp. 1-19, doi:10.3390/molecules24224090 全文、全図	1-12	A	ZHENG, H., et al., PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas, <i>Cancer Cell</i> , 2010.05.18, Vol. 17, No. 5, pp. 497-509, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.020 全文、全図	1-12	A	GONCALVES, J. T., et al., Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior, <i>Cell</i> , 2016.11.03, Vol. 167, No. 4, pp. 897-914, doi:10.1016/j.cell.2016.10.021 全文、全図	1-12
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
A	LECHNER, C., et al., [b]-Annulated Halogen-Substituted Indoles as Potential DYRK1A Inhibitors, <i>Molecules</i> , 2019.11.13, Vol. 24, 4090, pp. 1-19, doi:10.3390/molecules24224090 全文、全図	1-12												
A	ZHENG, H., et al., PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas, <i>Cancer Cell</i> , 2010.05.18, Vol. 17, No. 5, pp. 497-509, doi:10.1016/j.ccr.2010.03.020 全文、全図	1-12												
A	GONCALVES, J. T., et al., Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior, <i>Cell</i> , 2016.11.03, Vol. 167, No. 4, pp. 897-914, doi:10.1016/j.cell.2016.10.021 全文、全図	1-12												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>24.03.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>05.04.2022</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>太田 雄三 4B 3959</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>													

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見: