

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-520200  
(P2021-520200A)

(43) 公表日 令和3年8月19日(2021.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)	C 1 2 N 5/0793 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	4 C 0 8 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-554154 (P2020-554154)  
 (86) (22) 出願日 平成31年4月11日 (2019. 4. 11)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月18日 (2020. 11. 18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/027027  
 (87) 国際公開番号 W02019/200129  
 (87) 国際公開日 令和1年10月17日 (2019. 10. 17)  
 (31) 優先権主張番号 62/656, 322  
 (32) 優先日 平成30年4月11日 (2018. 4. 11)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/718, 774  
 (32) 優先日 平成30年8月14日 (2018. 8. 14)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 506115514  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 The Regents of the  
 University of Calif  
 ornia  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94  
 607-5200, オークランド, フラン  
 クリン ストリート 1111, 12番  
 フロア  
 (74) 代理人 110003007  
 特許業務法人謝国際特許商標事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非神経細胞のニューロンへの再プログラミング、及び神経変性疾患または障害を治療するための方法と組成物

(57) 【要約】

本明細書で提供されるのは、非神経細胞をニューロンに再プログラミングする方法である。本開示の態様は、細胞再プログラミング剤を使用して、非神経細胞をニューロンに変換するためにPTBの発現または活性を抑制することに関する。また、in vivoで非神経細胞を機能性ニューロンに再プログラミングすることによって神経変性疾患を治療する方法も本明細書で提供される。

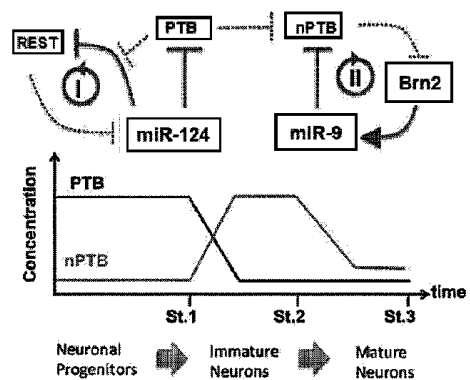


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法であって、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現するヒト非神経細胞を提供すること、及び前記細胞を、前記ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それによって、前記ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む、方法。

**【請求項 2】**

前記ヒト非神経細胞が、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記ヒト非神経細胞が、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも少なくとも10倍高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記ヒト非神経細胞が、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9及びBrn2を発現する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

ヒトグリア細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法であって、再プログラムされる前記ヒトグリア細胞を提供すること、及び前記ヒトグリア細胞を、前記ヒトグリア細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも 1 日間抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それによって、前記ヒトグリア細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む、方法。

20

**【請求項 6】**

前記ヒトグリア細胞が、星状細胞、希突起膠細胞、上皮細胞、シュワン細胞、ミクログリア、及び衛星細胞からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ヒトグリア細胞が、GFAP ( グリア線維性酸性タンパク質 ) またはALDH1L1 ( アルデヒドデヒドロゲナーゼ 1 ファミリーメンバー L1 ) に対して陽性である、請求項 5 または 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法であって、再プログラムされる前記星状細胞を提供すること、及び前記星状細胞を、前記星状細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも 1 日間抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それによって、前記星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む、方法。

30

**【請求項 9】**

前記星状細胞が、マウス星状細胞である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記方法が、複数のマウス星状細胞を再プログラムし、前記マウス星状細胞の少なくとも60%が、Tuj1陽性である成熟ニューロンに変換される、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記方法が、複数のマウス星状細胞を再プログラムし、前記マウス星状細胞の少なくとも40%が、Map2陽性である成熟ニューロンに変換される、請求項 9 または 10 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記星状細胞が、ヒト星状細胞である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記方法が、複数のヒト星状細胞を再プログラムし、前記ヒト星状細胞の少なくとも40%、少なくとも60%、または少なくとも80%が、Tuj1陽性である成熟ニューロンに変換される、請求項 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

50

前記方法が、複数のヒト星状細胞を再プログラムし、前記ヒト星状細胞の少なくとも20%、少なくとも40%、または少なくとも60%が、Map2陽性である成熟ニューロンに変換される、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記組成物が、PTBの発現または活性を特異的に抑制する単一の細胞プログラミング剤を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

ヒトの非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法であって、再プログラムされる前記ヒト非神経細胞を提供すること、及び前記ヒト非神経細胞を、前記ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも3日間抑制する単一の細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それによって、前記ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む、方法。

10

【請求項17】

ヒトの非神経細胞を再プログラミングする方法であって、再プログラムされる前記ヒト非神経細胞を提供すること、及び前記ヒト非神経細胞を、前記ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性の減少、及びPTBの前記発現または活性が減少した後のnPTBの発現または活性の減少をもたらす単一の細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させることを含む、方法。

【請求項18】

PTBの発現または活性が抑制されるにつれて、初期nPTB発現レベルが、高いnPTB発現レベルに増加する、請求項17に記載の方法。

20

【請求項19】

PTBの発現または活性が抑制された後、nPTB発現が、前記高いnPTB発現レベルから、前記初期nPTB発現レベルよりも高い、低いnPTB発現レベルに減少する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記ヒト非神経細胞が、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する、請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記ヒト非神経細胞が、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9及びBrn2を発現する、請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項22】

前記方法が、複数の前記ヒトの非神経細胞、前記ヒトグリア細胞、または前記星状細胞を再プログラムし、前記ヒトの非神経細胞、前記ヒトグリア細胞、または前記星状細胞の少なくとも40%が、NeuN（神経核抗原）、Map2（微小管関連タンパク質2）、NSE（ニューロン特異的エノラーゼ）、160 kDaニューロフィラメント培地、200kDaニューロフィラメントヘビー、PDS-95（シナプス後肥厚タンパク質95）、シナプシンI、シナプトフィジン、GAD67（グルタミン酸デカルボキシラーゼ67）、GAD65（グルタミン酸デカルボキシラーゼ67）、パルプアルブミン、DARPP32（ドーパミン及びcAMP調節ニューロンリンタンパク質32）、vGLUT1（小胞性グルタミン酸トランスポーター1）、vGLUT2（小胞性グルタミン酸トランスポーター2）、アセチルコリン、及びTH（チロシンヒドロキシラーゼ）ならなる群から選択される1つまたは複数のニューロンマーカーの発現を特徴とする、成熟ニューロンに再プログラムされる、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項23】

前記方法が、複数の前記ヒトの非神経細胞、前記ヒトグリア細胞、または前記星状細胞を再プログラムし、前記ヒトの非神経細胞、前記ヒトグリア細胞、または前記星状細胞の少なくとも20%が、それらの活動電位、シナプス結合、シナプス前神経伝達物質の生合成、及び/またはシナプス後応答を確立する能力を特徴とする機能性ニューロンに再プログラムされる、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

50

前記細胞プログラミング剤が、抗PTB阻害剤である、請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記抗PTB阻害剤が、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記抗PTB阻害剤が、抗PTB shRNA、抗PTB miRNA、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチド、抗PTB抗体、PTBの小分子阻害剤、ドミナントネガティブPTB変異体、及びポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチドからなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

10

【請求項27】

前記細胞プログラミング剤が、前記PTBの発現または活性を少なくとも5日間抑制する、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記細胞プログラミング剤が、前記PTBの発現または活性を少なくとも10日間抑制する、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記細胞プログラミング剤が、前記PTBの発現または活性を少なくとも15日間抑制する、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記ヒト非神経細胞、前記ヒトグリア細胞、または前記星状細胞が、培地中で培養される、請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項31】

前記培地が、ALK5の阻害剤、GSK3bの阻害剤、PKAの活性剤、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記ALK5の阻害剤が、SB431542を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記GSK3bの阻害剤が、CHIR99021を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

前記PKAの活性剤が、ジブチリルアデノシン3',5'-サイクリックモノホスフェート(Db-cAMP)を含む、請求項31に記載の方法。

30

【請求項35】

前記細胞プログラミング剤が、レンチウイルスベクターで送達される、請求項30～34に記載のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

In vivoで機能性ニューロンを生成する方法であって、前記中脳の星状細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の脳に投与し、前記星状細胞が前記機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にする方法を含む、方法。

40

【請求項37】

In vivoで機能性ニューロンを生成する方法であって、前記中脳の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の中脳に投与し、前記非神経細胞が前記機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にする方法を含む、方法。

【請求項38】

In vivoでドーパミン作動性ニューロンを生成する方法であって、前記脳の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の脳に投与し、前記非神経細胞が前記ドーパミン作動性ニューロンに再プログラムすることを可能にする方法を含む、方法。

50

## 【請求項 39】

前記ドーパミン作動性ニューロンが、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ドーパミン輸送体 (DAT)、小胞モノアミン輸送体2 (VMAT2)、エングレイルド (engrailed) ホメオボックス1 (En1)、FoxA2、及び/またはLIMホメオボックス転写因子1アルファ (Lmx1a) を発現する、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記方法が、前記脳内の複数の非神経細胞を再プログラムし、前記非神経細胞の少なくとも10%がドーパミン作動性ニューロンに変換される、請求項 38 または 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記方法が、前記脳内の複数の非神経細胞を再プログラムし、前記非神経細胞の少なくとも30%がドーパミン作動性ニューロンに変換される、請求項 38 ~ 40 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンの軸索終末が、前記被験者の線条体に到達する、請求項 37 ~ 41 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンの軸索終末が、前記被験者の尾状被殻、側坐核、中隔核、または嗅結節に到達する、請求項 37 ~ 42 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 44】

前記細胞プログラミング剤が、前記被験者の実質的な黒質に投与される、請求項 37 ~ 43 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 45】

前記被験者が、ヒトである、請求項 36 ~ 44 に記載の方法。

## 【請求項 46】

前記被験者が、非ヒト動物である、請求項 36 ~ 44 に記載の方法。

## 【請求項 47】

In vivoで機能性ニューロンを生成する方法であって、前記脳内の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤をヒト被験者の脳に投与すること、及び前記非神経細胞が前記機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にすることを含む、方法。

## 【請求項 48】

前記非神経細胞が、グリア細胞である、請求項 47 に記載の方法。

## 【請求項 49】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項 48 に記載の方法。

## 【請求項 50】

前記細胞プログラミング剤が、前記ヒト被験者の中脳、皮質、または線条体に投与される、請求項 47 ~ 49 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 51】

前記細胞プログラミング剤が、前記ヒト被験者の実質的な黒質に投与される、請求項 47 ~ 50 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 52】

前記機能性ニューロンが、ドーパミン作動性ニューロンである、請求項 47 ~ 51 のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 53】

前記機能性ニューロンが、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ドーパミン輸送体 (DAT)、小胞モノアミン輸送体2 (VMAT2)、エングレイルド (engrailed) ホメオボックス1 (En1)、FoxA2、及び/またはLIMホメオボックス転写因子1アルファ (Lmx1a) を発現する、請求項 47 ~ 52 のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5 4】

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンが、シナプス前神経伝達物質の生合成を示す、請求項 3 6 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5 5】

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンが、前記脳内の既存のニューロン回路に統合されている、請求項 3 6 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

前記方法が、前記脳内の複数の前記非神経細胞または前記星状細胞を再プログラムし、前記非神経細胞または前記星状細胞の少なくとも30%が、ニューロン核抗原 (NeuN)、微小管関連タンパク質2 (Map2)、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE)、160 kDaニューロフィラメント培地、200kDaニューロフィラメントヘビー、シナプス後肥厚タンパク質95 (PDS-95)、シナプシンI、シナプトフィジン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67 (GAD67)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67 (GAD65)、パルプアルブミン、ドーパミン及びcAMPによって調節される神経細胞リンタンパク質32 (DARPP32)、小胞性グルタミン酸トランスポーター1 (vGLUT1)、小胞グルタミン酸トランスポーター2 (vGLUT2)、アセチルコリン、及びチロシンヒドロキシラーゼ (TH) からなる群から選択される1つまたは複数のニューロンマーカーの発現を特徴とする成熟ニューロンに再プログラムされる、請求項 3 6 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

## 【請求項 5 7】

前記方法が、前記脳内の複数の前記非神経細胞または前記星状細胞を再プログラムし、前記非神経細胞または前記星状細胞の少なくとも20%が、それらの活動電位、シナプス結合、シナプス前神経伝達物質の生合成、及び/またはシナプス後応答を確立する能力を特徴とする機能性ニューロンに再プログラムされる、請求項 3 6 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 5 8】

前記細胞プログラミング剤が、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項 3 6 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

前記細胞プログラミング剤が、抗PTB shRNA、抗PTB miRNA、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチド、抗PTB抗体、PTBの小分子阻害剤、ドミナントネガティブPTB変異体、ポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 3 6 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 6 0】

前記細胞プログラミング剤が、前記PTBの発現または活性を少なくとも5日間抑制する、請求項 3 6 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

前記細胞プログラミング剤が、前記PTBの発現または活性を少なくとも10日間抑制する、請求項 3 6 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

前記細胞プログラミング剤が、前記PTBの発現または活性を少なくとも15日間抑制する、請求項 3 6 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 6 3】

前記細胞プログラミング剤が、AAVベクターで送達される、請求項 3 6 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

脳領域における機能性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療する方法であって、前記脳領域中の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を、それを必要とする被験者の前記脳領域に投与し、前記非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによって、前記脳領域における前記変性機能性ニューロンを補充することを含む、方法。

50

**【請求項 65】**

前記神経学的状態が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症、鬱病、及び薬物中毒からなる群から選択される、請求項 64 に記載の方法。

**【請求項 66】**

脳領域におけるドーパミン作動性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療する方法であって、前記脳領域中の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を、それを必要とする被験者の前記脳領域に投与し、前記非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによって、前記脳領域における前記変性ドーパミン作動性ニューロンを補充することを含む、方法。

10

**【請求項 67】**

正常レベルと比較してドーパミンの量が減少した被験者においてドーパミン生合成を回復させる方法であって、前記脳領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を前記被験者の脳領域に投与し、前記非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによって、前記減少したドーパミンの量の少なくとも50%を回復させることを含む、方法。

**【請求項 68】**

前記非神経細胞が、グリア細胞である、請求項 64 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 69】**

前記非神経細胞が、星状細胞である、請求項 64 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

**【請求項 70】**

前記細胞プログラミング剤が、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項 64 ~ 69 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 71】**

前記単一の細胞プログラミング剤が、抗PTB shRNA、抗PTB miRNA、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチド、抗PTB抗体、PTBの小分子阻害剤、ドミナントネガティブPTB変異体、ポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 64 ~ 70 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 72】**

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンが、前記脳領域の既存のニューロン回路に統合されている、請求項 64 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

**【請求項 73】**

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンが、活動電位、シナプス前神経伝達物質の生合成、及び/またはシナプス後応答を示す、請求項 64 ~ 72 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 74】**

前記細胞プログラミング剤が、前記被験者の中脳、皮質、または線条体に投与される、請求項 64 ~ 73 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 75】**

前記細胞プログラミング剤が、前記被験者の実質的な黒質に投与される、請求項 64 ~ 74 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

**【請求項 76】**

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンの軸索終末が、前記被験者の線条体に到達する、請求項 74 または 75 に記載の方法。

**【請求項 77】**

前記機能性ニューロンまたは前記ドーパミン作動性ニューロンの軸索終末が、前記被験者の尾状被殻、側坐核、中隔核、または嗅結節に到達する、請求項 64 ~ 76 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 78】**

50

前記神経学的状態が、パーキンソン病である、請求項64～77のいずれか1項に記載の方法。

【請求項79】

前記細胞プログラミング剤の前記投与が、パーキンソン病の1つまたは複数の症状を改善する、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

前記パーキンソン病の1つまたは複数の症状が、振戦、こわばり、遅さ、平衡障害、歩行のシャッフル、姿勢の不安定性、嗅覚機能障害、認知障害、鬱病、睡眠障害、自律神経機能障害、痛み、及び倦怠感からなる群から選択される、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記細胞プログラミング剤が、標的細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成された細胞標的部分と接合されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記標的細胞が、前記非神経細胞、前記グリア細胞、または前記星状細胞を含み、前記細胞標的部分が、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを前記標的細胞に送達するように構成される、請求項1～80のいずれか1項に記載の方法。

【請求項82】

前記細胞標的部分が、ペプチドを含む、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

前記細胞プログラミング剤が、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む、請求項1～82のいずれか1項に記載の方法。

【請求項84】

前記非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制することにより、哺乳動物の非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラムするのに有効な量の細胞プログラミング剤を含む、医薬組成物。

【請求項85】

1 注射、吸入、経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、皮内投与、局所投与、または経口投与のために製剤化された、請求項84に記載の医薬組成物。

【請求項86】

非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、注射可能な組成物。

【請求項87】

前記非神経細胞が、グリア細胞である、請求項86に記載の組成物。

【請求項88】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項86に記載の組成物。

【請求項89】

アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む、請求項86～88のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項90】

非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成されたAAV-shRNA構築物を含む、注射可能な組成物。

【請求項91】

前記非神経細胞が、グリア細胞である、請求項90に記載の組成物。

【請求項92】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項91に記載の組成物。

【請求項93】

前記構築物が、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む、請求項90～92のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項94】

10

20

30

40

50

非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成されたレンチウイルス-shRNA構築物を含む、組成物。

【請求項 9 5】

前記非神経細胞が、グリア細胞である、請求項 9 4 に記載の組成物。

【請求項 9 6】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項 9 5 に記載の組成物。

【請求項 9 7】

前記構築物が、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む、請求項 9 4 ~ 9 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9 8】

前記非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成された細胞標的部分と接合したアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、非神経細胞をニューロンに変換するための組成物であって、前記細胞標的部分が、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを前記非神経細胞に送達するように構成される、組成物。

【請求項 9 9】

前記細胞標的部分が、ペプチドを含む、請求項 9 8 に記載の組成物。

【請求項 1 0 0】

前記細胞標的部分が、前記非神経細胞を特異的に標的化するように特異的に構成される、請求項 9 8 または 9 9 に記載の組成物。

【請求項 1 0 1】

前記非神経細胞が、グリア細胞、成体初代線維芽細胞、胚性線維芽細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイト、脂肪細胞、血液細胞、骨髄間質細胞、ランゲルハンス細胞、筋肉細胞、直腸細胞、及び軟骨細胞からなる群から選択される、請求項 9 8 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 0 2】

前記非神経細胞が、神経膠芽細胞腫細胞、ヘラ細胞株、NT2細胞株、ARPE19細胞株、及びN2A細胞株からなる群から選択される細胞株に由来する、請求項 9 8 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 0 3】

前記非神経細胞が、グリア細胞である、請求項 9 8 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 0 4】

前記グリア細胞が、星状細胞、希突起膠細胞、上衣細胞、シュワン細胞、NG2細胞、及び衛星細胞からなる群から選択される、請求項 1 0 3 に記載の組成物。

【請求項 1 0 5】

前記グリア細胞が、星状細胞である、請求項 1 0 3 に記載の組成物。

【請求項 1 0 6】

脳領域における機能性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療するための、請求項 9 8 ~ 1 0 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 0 7】

前記神経学的状態が、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症、鬱病、及び薬物中毒からなる群から選択される、請求項 1 0 6 に記載の組成物。

【請求項 1 0 8】

前記神経学的状態が、パーキンソン病である、請求項 1 0 6 に記載の組成物。。

【請求項 1 0 9】

脳領域に再プログラムされたニューロンを含む、動物であって、前記再プログラムされたニューロンが、請求項 1 ~ 6 2 に記載の方法のいずれか 1 つによって作製される、動物。

【請求項 1 1 0】

前記動物が、哺乳動物である、請求項 1 0 9 に記載の動物。

10

20

30

40

50

- 【請求項 1 1 1】  
前記動物が、ヒトである、請求項 1 1 0 に記載の動物。
- 【請求項 1 1 2】  
前記動物が、マウスである、請求項 1 1 0 に記載の動物。
- 【請求項 1 1 3】  
前記再プログラムされたニューロンを含む、請求項 1 0 9 ~ 1 1 1 のいずれか 1 項に記載の前記動物の脳組織。
- 【請求項 1 1 4】  
請求項 1 ~ 3 5 に記載の方法のいずれか 1 つによって作製された、再プログラムされたニューロン。 10
- 【請求項 1 1 5】  
星状細胞を、ポリピリミジントラクト結合 (PTB) タンパク質の発現を阻害する阻害性核酸分子と接触させることにより、星状細胞を神経細胞に変換することによって生成される神経細胞。
- 【請求項 1 1 6】  
神経変性疾患または障害を治療する方法であって、神経変性疾患または障害を有する被験者の星状細胞を、PTBの発現を阻害する阻害性核酸と接触させ、それによって、星状細胞をニューロンに分化させ、前記神経変性疾患または障害を治療することを含む、方法。
- 【請求項 1 1 7】  
前記阻害性核酸が、前記神経変性疾患または障害に関連する被験者の脳の中樞神経系における部位に送達される、請求項 1 1 6 に記載の方法。 20
- 【請求項 1 1 8】  
前記被験者が、哺乳動物である、請求項 1 1 6 に記載の方法。
- 【請求項 1 1 9】  
前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 1 1 8 に記載の方法。
- 【請求項 1 2 0】  
前記神経変性疾患または障害が、虚血性及び出血性脳卒中、脊髄損傷、脳損傷、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、自閉症、運動失調症、筋萎縮性側索硬化症、ルーゲーリック病、ライム病、髄膜炎、片頭痛、運動ニューロン疾患、神経障害、痛み、脳損傷、脳機能障害、脊髄障害、末梢神経系障害、頭蓋神経障害、自律神経系障害、てんかん等の発作障害、パーキンソン病、睡眠障害、頭痛、腰痛、首の痛み、神経障害性疼痛等の運動障害、アルツハイマー病、めまいとめまい、昏迷と昏睡、頭部外傷、脳卒中、神経系の腫瘍等のせん妄と認知症、多発性硬化症及びその他の脱髄性疾患、脳または脊髄の感染症、及びプリオン病からなる群から選択される、請求項 1 1 6 に記載の方法。 30
- 【請求項 1 2 1】  
神経変性疾患または障害を治療または阻害する活性について薬物または化合物をスクリーニングする方法であって、前記神経変性疾患または障害を有する被験者から星状細胞を取得し、前記星状細胞を、PTB発現を阻害する阻害性核酸と接触させ、前記神経細胞を前記薬物または化合物と接触させることによって、前記星状細胞を神経細胞に分化し、前記薬物または化合物が前記神経変性疾患または障害の疾患マーカーの発現を阻害するかどうかを決定することを含む、方法。 40
- 【発明の詳細な説明】
- 【関連出願の相互参照】
- 【0 0 0 1】  
本願は、米国特許法第35条第119項に基づいて、2018年4月11日に出願された仮出願シリアル番号62/656,322及び2018年8月14日に出願された仮出願シリアル番号62/718,774の優先権を主張し、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。
- 【政府のライセンス権】
- 【0 0 0 2】 50

本発明は、国立衛生研究所により授与された認可番号5R01GM052872及び5R01HG004659の政府援助を受けて行われた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【技術分野】

【0003】

本開示は、非神経細胞を神経細胞に分化するための方法及び組成物、ならびに神経変性疾患または障害を治療するための方法に関する。

【配列表の参照による組み込み】

【0004】

「Sequence\_ST25.txt」と題する配列表が本願に付随している。これは、2019年4月11日に作成され、1,595バイトのデータを有し、IBM-PCのMS-Windows OSでフォーマットされたものである。該配列表は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【背景】

【0005】

再生医療は、細胞喪失の障害に対処するための大きな期待を持っている。1つのアプローチは細胞置換を採用し、別のアプローチは細胞の分化転換を利用する。細胞置換は、造血障害の治療において目覚ましい成功を収めている。しかし、他の疾患では、このアプローチは限られた有効性を示しているか、免疫反応及び/または腫瘍形成を引き起こすリスクに関連している。対照的に、分化転換は、内因性細胞の既存の細胞可塑性を利用して新しい細胞型を生成することができる。課題は、培養だけでなく、より重要なことに、*in vivo*のネイティブコンテキストで細胞をある細胞型から別の細胞型に変換するための効率的な戦略を特定することである。

20

【概要】

【0006】

本開示は、星状細胞を、ポリピリミジントラクト結合 (PTB) タンパク質の発現を阻害する阻害性核酸分子と接触させることにより星状細胞を神経細胞に変換することによって生成される神経細胞を提供する。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記神経細胞は *in vitro* で生成される。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記神経細胞は *in vivo* で生成される。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記阻害性核酸分子は、RNAi 分子である。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記RNAi 分子はshRNAである。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記阻害性核酸分子はアンチセンス分子である。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記阻害性核酸分子は、ウイルスまたはウイルスベクター内にある。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記ウイルスまたはウイルスベクターは、アデノウイルス、AAV、レトロウイルス、またはレンチウイルスである。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記星状細胞はヒト星状細胞である。

30

【0007】

本開示は、神経変性疾患または障害を治療する方法を提供する。これは、神経変性疾患または障害を有する被験者の星状細胞をPTBの発現を阻害する阻害性核酸と接触させ、それによって星状細胞をニューロンに分化させ、神経変性疾患または障害を治療することを含む。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記阻害性核酸は、神経変性疾患または障害に関連する被験者の脳の中樞神経系の部位に送達される。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記被験者は哺乳動物である。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記哺乳動物はヒトである。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記神経変性疾患または障害は、虚血性及び出血性脳卒中、脊髄損傷、脳損傷、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、自閉症、運動失調、筋萎縮性側索硬化症、ルーゲーリック病、ライム病、髄膜炎、片頭痛、運動ニューロン疾患、神経障害、痛み、脳損傷、脳機能障害、脊髄障害、末梢神経系障害、頭蓋神経障害、自律神経系障害、てんかん等の発作障害、パーキンソン病等の運動障害、睡眠障害、頭痛、腰痛、首の痛み、神経障害性疼痛、アルツハイマー病、めまいと回転性めまい、昏迷と昏睡、頭の怪我、脳卒中、神経系の腫瘍、多発性硬化症及びその他の脱髄性疾患、脳または脊髄の感染症、プリオン

40

50

病等のせん妄や認知症からなる群より選択される。

【0008】

また本開示は、神経変性疾患または障害を有する被験者を治療する方法を提供する。これは、星状細胞をニューロンに分化させ、ニューロンを神経変性の部位で被験者に移植することを含む。ここで、前記星状細胞は、PTBの発現を阻害することによってニューロンに変換される。一実施形態またはさらなる実施形態では、前記星状細胞は、神経変性疾患または障害の部位で被験者から得られ、*ex vivo*で分化される。

【0009】

また本開示は、神経変性疾患の治療または阻害における活性を有する、薬物または化合物をスクリーニングする方法を提供する。これは、神経変性疾患を有する被験者から星状細胞を取得し、星状細胞を、PTB発現を阻害する阻害性核酸と接触させることによって星状細胞を神経細胞に分化させ、神経細胞を薬物または化合物と接触させ、薬物または化合物が神経変性疾患または障害の疾患マーカーの発現を阻害するかどうかを測定することを含む。

10

【0010】

一実施形態またはさらなる実施形態では、前記阻害性核酸は、配列番号1または2と少なくとも80~100%同一であり、及び/またはTがUである配列を含む。

【0011】

本開示はまた、アンチセンス分子を提供する。該アンチセンス分子は、配列番号2と少なくとも98%同一であり、PTB発現を阻害し、及び/またはTがUである配列を含む。

20

【0012】

本開示はまた、ベクターを提供する。該ベクターは、配列番号1または2に記載の配列、または前記配列と少なくとも80~99%同一であり、及び/またはTが前記配列（例えば、DNAまたはRNA）においてUである配列を含み、PTB発現を阻害する。

【0013】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法である。いくつかの実施形態では、該方法は、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現するヒト非神経細胞を提供し、該細胞を、ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、前記ヒト非神経細胞は、miR-9またはBrn2を、ヒトの成人線維芽細胞で発現するレベルの少なくとも2倍のレベルで発現する。いくつかの実施形態では、前記ヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞において発現されるレベルよりも少なくとも10倍高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する。いくつかの実施形態では、前記ヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞において発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9及びBrn2を発現する。

【0015】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、ヒトグリア細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法である。該方法は、再プログラムされるヒトグリア細胞を提供し、ヒトグリア細胞を、ヒトグリア細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも1日間抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、ヒトグリア細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

40

【0016】

いくつかの実施形態では、前記ヒトグリア細胞は、星状細胞、希突起膠細胞、上衣細胞、シュワン細胞、ミクログリア、及び衛星細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記ヒトグリア細胞は、GFAP（グリア線維性酸性タンパク質）またはALDH1L1（アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーL1）に対して陽性である。

【0017】

50

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法である。該方法は、再プログラムされる星状細胞を提供し、星状細胞を、星状細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも1日間抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、前記星状細胞は、マウス星状細胞である。いくつかの実施形態では、該方法は、複数のマウス星状細胞を再プログラムし、該マウス星状細胞の少なくとも60%が、Tuj1陽性の成熟ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、該方法は、複数のマウス星状細胞を再プログラムし、該マウス星状細胞の少なくとも40%が、Ma

10

【0019】

いくつかの実施形態では、前記星状細胞は、ヒト星状細胞である。いくつかの実施形態では、該方法は、複数のヒト星状細胞を再プログラムし、該ヒト星状細胞の少なくとも40%、少なくとも60%、または少なくとも80%が、Tuj1陽性の成熟ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、該方法は、複数のヒト星状細胞を再プログラムし、該ヒト星状細胞の少なくとも20%、少なくとも40%、または少なくとも60%が、Map2陽性の成熟ニューロンに変換される。

【0020】

いくつかの実施形態では、前記組成物は、PTBの発現または活性を特異的に抑制する単一の細胞プログラミング剤を含む。

20

【0021】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法である。該方法は、再プログラムされるヒト非神経細胞を提供し、ヒト非神経細胞を、ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも3日間抑制する単一の細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

【0022】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、ヒト非神経細胞を再プログラミングする方法である。該方法は、再プログラムされるヒト非神経細胞を提供し、ヒト非神経細胞をヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を低下し、PTBの発現または活性が低下した後のnPTBの発現または活性を低下する単一細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させることを含む。

30

【0023】

いくつかの実施形態では、初期のnPTB発現レベルは、PTBの発現または活性が抑制されるにつれて、高いnPTB発現レベルに増加する。いくつかの実施形態では、nPTB発現は、PTBの発現または活性が抑制された後、高いnPTB発現レベルから、初期のnPTB発現レベルよりも高い、低いnPTB発現レベルに減少する。いくつかの実施形態では、前記ヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞において発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する。いくつかの実施形態では、前記ヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞に

40

【0024】

いくつかの実施形態では、該方法は、複数のヒト非神経細胞、ヒトグリア細胞、または星状細胞を再プログラムする。ここで、ヒト非神経細胞、ヒトグリア細胞、または星状細胞の少なくとも40%が、NeuN(神経核抗原)、Map2(微小管関連タンパク質2)、NSE(ニューロン特異的エノラーゼ)、160 kDaニューロフィラメント培地、200kDaニューロフィラメントヘビー、PDS-95(シナプス後肥厚タンパク質95)、シナプシンI、シナプトフィジン、GAD67(グルタミン酸デカルボキシラーゼ67)、GAD65(グルタミン酸デカルボキシラーゼ67)、パルプアルブミン、DARPP32(ドーパミン及びcAMP調節ニューロンリンタンパク質32)、vGLUT1(小胞グルタミン酸トランスポーター1)、vGLUT2(小胞グルタメー

50

トランスポーター1)、アセチルコリン、及びTH(チロシンヒドロキシラーゼ)からなる群から選択された1つまたは複数のニューロンマーカーの発現を特徴とする成熟ニューロンに再プログラムされる。

【0025】

いくつかの実施形態では、該方法は、複数のヒト非神経細胞、ヒトグリア細胞、または星状細胞を再プログラムする。ここで、ヒト非神経細胞、ヒトグリア細胞、または星状細胞の少なくとも20%は、活動電位、シナプス結合、シナプス前神経伝達物質放出、及び/またはシナプス後応答を確立する能力を特徴とする機能性ニューロンに再プログラムされる。

【0026】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、抗PTB阻害剤である。いくつかの実施形態では、前記抗PTB阻害剤は、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、前記抗PTB阻害剤は、抗PTB shRNA、抗PTB miRNA、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチド、抗PTB抗体、PTBの小分子阻害剤、ドミナントネガティブPTB変異体、及びポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチドからなる群から選択される。

【0027】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を少なくとも5日間抑制する。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を少なくとも10日間抑制する。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を少なくとも15日間抑制する。

【0028】

いくつかの実施形態では、前記ヒト非神経細胞、ヒトグリア細胞、または星状細胞は、培地中で培養される。いくつかの実施形態では、該培地は、ALK5の阻害剤、GSK3bの阻害剤、PKAの活性化因子、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤を含む。いくつかの実施形態では、前記活性化因子ALK5は、SB431542を含む。いくつかの実施形態では、前記阻害剤GSK3bは、CHIR99021を含む。いくつかの実施形態では、前記PKAの活性化因子は、ジブチリルアデノシン3',5'-サイクリックモノホスフェート(Db-cAMP)を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、レンチウイルスベクターで送達される。

【0029】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、in vivoで機能性ニューロンを生成する方法である。該方法は、脳内の星状細胞におけるPTBの発現または活性を抑制し、星状細胞が機能性ニューロンに再プログラミングできるようにする細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の脳に投与することを含む。

【0030】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、in vivoで機能性ニューロンを生成する方法である。該方法は、中脳の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラミングできるようにする細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の中脳に投与することを含む。

【0031】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、in vivoでドーパミン作動性ニューロンを生成する方法である。該方法は、脳内の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制し、非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラミングできるようにする細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の脳に投与することを含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、前記ドーパミン作動性ニューロンは、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ドーパミントランスポーター(DAT/SLC6A3)、小胞モノアミントランスポーター2(VMAT2)、エンゲイルド(engrailed)ホメオボックス1(En1)、FoxA2、及び/またはLIMホメオボックス転写因子1アルファ(Lmx1a)を発現する。

10

20

30

40

50

## 【0033】

いくつかの実施形態では、該方法は、脳内の複数の非神経細胞を再プログラムする。ここで、前記非神経細胞の少なくとも10%がドーパミン作動性ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、該方法は、脳内の複数の非神経細胞を再プログラムする。ここで、前記非神経細胞の少なくとも30%がドーパミン作動性ニューロンに変換される。

## 【0034】

いくつかの実施形態では、機能性ニューロンまたはドーパミン作動性ニューロンの軸索終末は、被験者の線条体に到達する。

## 【0035】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、被験者の黒質に投与される。

10

## 【0036】

いくつかの実施形態では、前記被験者はヒトである。

## 【0037】

いくつかの実施形態では、前記被験者は非ヒト動物である。

## 【0038】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、*in vivo*で機能性ニューロンを生成する方法である。該方法は、脳内の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラミングできるようにする細胞プログラミング剤をヒト被験者の脳に投与することを含む。

## 【0039】

20

いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞である。いくつかの実施形態では、該グリア細胞は、星状細胞である。

## 【0040】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、ヒト被験者の中脳、線条体、または皮質に投与される。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、ヒト被験者の黒質に投与される。

## 【0041】

いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンは、ドーパミン作動性ニューロンである。いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンは、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ドーパミントランスポーター (DAT)、小胞モノアミントランスポーター2 (VMAT2)、エンゲイルド (engrailed) ホメオボックス1 (En1)、フォークヘッドボックスA2 (FoxA2)、及び/またはLIMホメオボックス転写因子1アルファ (Lmx1a) を発現する。

30

## 【0042】

いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンまたはドーパミン作動性ニューロンは、シナプス前神経伝達物質を示す。いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンまたはドーパミン作動性ニューロンは、脳内の既存のニューロン回路に統合される。

## 【0043】

いくつかの実施形態では、該方法は、脳内の複数の非神経細胞または星状細胞を再プログラムする。ここで、前記非神経細胞または星状細胞の少なくとも30%が、ニューロン核抗原 (NeuN)、微小管関連タンパク質2 (Map2)、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE)、160 kDaニューロフィラメント培地、200kDaニューロフィラメントヘビー、シナプス後肥厚タンパク質95 (PDS-95)、シナプシンI、シナプトフィジン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67 (GAD67)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ65 (GAD65)、バルブアルブミン、ドーパミン及びcAMP調節ニューロンリン酸化タンパク質32 (DARPP32)、小胞グルタミン酸トランスポーター1 (vGLUT1)、小胞グルタミン酸トランスポーター2 (vGLUT2)、アセチルコリン、及びチロシンヒドロキシラーゼ (TH) からなる群から選択された1つまたは複数のニューロンマーカーの発現を特徴とする成熟ニューロンに再プログラムされる。

40

## 【0044】

いくつかの実施形態では、該方法は、脳内の複数の非神経細胞または星状細胞を再プログラムする。ここで、非神経細胞または星状細胞の少なくとも20%が、活動電位、シナプ

50

ス接続、シナプス前神経伝達物質、及び/またはシナプス後応答を確立する能力を特徴とする機能性ニューロンに再プログラムされる。

【0045】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、抗PTB shRNA、抗PTB miRNA、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチド、抗PTB抗体、PTBの小分子阻害剤、ドミナントネガティブPTB変異体、ポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0046】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を少なくとも5日間抑制する。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を少なくとも10日間抑制する。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を少なくとも15日間抑制する。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、AAVベクターで送達される。

10

【0047】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、脳領域の機能性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療する方法。該方法は、脳領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を、それを必要とする被験者の脳領域に投与すること、及び非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによって脳領域の変性した機能性ニューロンを補充することを含む。

20

【0048】

いくつかの実施形態では、前記神経学的状態は、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症、鬱病、及び薬物中毒からなる群から選択される。

【0049】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、脳領域におけるドーパミン作動性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療する方法である。該方法は、必要とする被験者の脳領域に、脳領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与すること、及び非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによって脳領域の変性したドーパミン作動性ニューロンを補充することを含む。

30

【0050】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、正常レベルと比較してドーパミンの量が減少した被験者のドーパミン生合成を回復する方法である。該方法は、被験者の脳領域に、脳領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与すること、及び非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによって、減少した量のドーパミンの少なくとも50%を回復させることを含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞である。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、星状細胞である。

40

【0052】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、前記単一の細胞プログラミング剤は、抗PTB shRNA、抗PTB miRNA、抗PTBアンチセンスオリゴヌクレオチド、抗PTB抗体、PTBの小分子阻害剤、ドミナントネガティブPTB変異体、ポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【0053】

いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンまたはドーパミン作動性ニューロンは、脳領域の既存のニューロン回路に統合されている。

【0054】

50

いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンまたはドーパミン作動性ニューロンは、活動電位、シナプス前神経伝達物質、及び/またはシナプス後応答を示す。

【0055】

いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、被験者の中脳、線条体、または皮質に投与される。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、被験者の黒質に投与される。

【0056】

いくつかの実施形態では、前記機能性ニューロンまたはドーパミン作動性ニューロンの軸索終末は、被験者の線条体に到達する。

【0057】

いくつかの実施形態では、前記神経学的疾患は、パーキンソン病である。いくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤の投与は、パーキンソン病の1つまたは複数の症状を改善する。いくつかの実施形態では、パーキンソン病の1つまたは複数の症状は、振戦、こわばり、遅さ、平衡障害、歩行のシャッフル、姿勢の不安定性、嗅覚機能障害、認知障害、鬱病、睡眠障害、自律神経機能障害、痛み、及び倦怠感からなる群から選択される。

【0058】

本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、標的細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成される細胞標的化部分と結合したアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、前記細胞標的化部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを標的細胞に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、前記標的細胞は、非神経細胞、グリア細胞、または星状細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞標的部分は、ポリペプチドを含む。

【0059】

本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、前記細胞プログラミング剤は、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む。

【0060】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、医薬組成物である。これは、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制することによって、哺乳動物の非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラムするのに有効な量の細胞プログラミング剤を含む。

【0061】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、医薬組成物である。これは、注射、吸入、経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、皮内投与、局所投与、または経口投与のために処方される。

【0062】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、注射可能な組成物である。これは、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞である。いくつかの実施形態では、前記グリア細胞は、星状細胞である。いくつかの実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む。

【0063】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、組成物である。これは、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成されたレンチウイルス-shRNA構築物を含む。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞である。いくつかの実施形態では、前記グリア細胞は、星状細胞である。いくつかの実施形態では、前記構築物は、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む。

【0064】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、注射可能な組成物である。これは、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成されたAAV-shRNA構築物を含む。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞である。いくつかの実施形態では、前記グリア細胞は、星状細胞である。いくつかの実施形態では、前記構築物は、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む。

【0065】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、非神経細胞をニューロンに変換するための組成物である。これは、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制するように構成された細胞標的化部分と結合したアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。ここで、前記細胞標的化部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを非神経細胞に送達するように構成される。

10

【0066】

いくつかの実施形態では、前記細胞標的化部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、前記細胞標的化部分は、非神経細胞を特異的に標的化するように特異的に構成される。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞、成体初代線維芽細胞、胚性線維芽細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイト、脂肪細胞、血球、骨髄間質細胞、ランゲルハンス細胞、筋細胞、直腸細胞、及び軟骨細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、神経膠芽細胞腫細胞、ヘラ細胞株、NT2細胞株、ARPE19細胞株、及びN2A細胞株からなる群から選択される細胞株に由来する。いくつかの実施形態では、前記非神経細胞は、グリア細胞である。いくつかの実施形態では、前記グリア細胞は、星状細胞、希突起膠細胞、上衣細胞、シュワン細胞、NG2細胞、及び衛星細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記グリア細胞は、星状細胞である。いくつかの実施形態では、前記組成物は、脳領域における機能性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療するためのものである。いくつかの実施形態では、前記神経学的状態は、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症、鬱病、及び薬物中毒からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記神経学的状態は、パーキンソン病である。いくつかの実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1または2と少なくとも80%、少なくとも90%、または100%同一である核酸配列を含む。

20

30

【0067】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、脳領域に再プログラムされたニューロンを含む動物であり、該再プログラムされたニューロンは、本明細書に開示される任意の方法によって作製される。いくつかの実施形態では、前記動物は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、前記動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、前記動物は、げっ歯類である。いくつかの実施形態では、前記動物は、ブタである。

【0068】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、本明細書に開示される任意の動物の脳組織である。これは、前記再プログラムされたニューロンを含む。

【0069】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、再プログラムされたニューロンである。これは、本明細書に開示される方法の1つによって作製された。

40

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】ニューロン誘導のためのPTBとニューロン成熟のためのnPTBによって制御される2つの連続した調節ループの概略図である。

【0071】

【図2A-F】は、マウス星状細胞、マウス胚性線維芽細胞(MEF)及びマウスニューロン(図2A、2C及び2E)、ならびにヒト星状細胞、ヒト成人線維芽細胞(HDF)及びヒトニューロン(図2B、2D及び2F)におけるウエスタンブロットによるBrn2及びRT-qPCRによるm

50

iR-124及びmiR-9の発現レベルを示す。統計結果は平均±SEMとして表される。\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、事後テューキー検定を使用したANOVAに基づく(n=3生物学的反復)。

【0072】

【図3A】は、HDF(左)、マウス(中央)、及びヒト星状細胞(右)におけるPTBのダウンレギュレーションにตอบสนองしたウエスタンブロットによるnPTBレベルの経時的分析を示す。

【0073】

【図3B】は、前記データの定量化を示す。

【0074】

【図4】は、分離されたマウスとヒトの星状細胞の特性を示す。培養中のマウス及びヒトの星状細胞の大部分は、神経細胞マーカー(Tuj1、NSE、NeuN、GAD67、VGluT1、TH)、オリゴデンドロサイトマーカー(オリゴデンドロサイト転写因子2、OLIG2)、ミクログリアマーカー(CD11抗原様ファミリーメンバーB、CD11b)、NG2細胞マーカー(神経/グリア抗原2、NG2)、神経前駆細胞マーカー(ネスチン)多能性マーカー(NANOG)及び線維芽細胞マーカー(フィブロネクチン)のネガティブ染色によって示されるように、星状細胞マーカー(GFAP及びALDH1L1)に対して免疫陽性であり、検出可能な他の細胞型はない。スケールバー:30 um

10

【0075】

【図5A】は、マウス星状細胞からのPTBノックダウン誘導ニューロンが汎ニューロンマーカーTuj1(赤)及びMAP2(緑)に対して免疫陽性であったことを示す。コントロールウイルス(shCtrl)に感染したマウス星状細胞は、同じ培養条件下でニューロンマーカーの陽性染色を示さなかった。5つの生物学的反復に基づく正しい定量化。スケールバー:100 um。

20

【0076】

【図5B】は、成熟ニューロンのマーカー(NeuN、NSE)、及びグルタミン酸作動性ニューロン(VGluT1)、GABA作動性ニューロン(GAD67)、ドーパミン作動性ニューロン(TH)のマーカーを含む異なるニューロンサブタイプのマーカーによる誘導ニューロンの特性を示す。スケールバー:30 um。

【0077】

【図5C】は、マウス星状細胞から変換されたニューロンのサブタイプの定量化を示す。4つの生物学的反復からのデータである。

30

【0078】

【図5D】は、マウス星状細胞から誘導されたニューロンの電気生理学的分析を示す。これには、反復活動電位(左、調べた18個の細胞のうち12個が記録された活性を示した)と電位依存性ナトリウム及びカリウムチャンネルの大電流(中央、調べた17個の細胞のうち13個が記録された活性を示した)が示されている。ラット星状細胞との共培養後、自発的なシナプス後電流も記録された(右、15個の検査された細胞のうち10個が記録された活性を示した)。スケールバー:100 um。

【0079】

【図5E】は、ヒト星状細胞におけるPTBノックダウンによるTuj1(赤)及びMAP2(緑)の誘導発現を示す。右のパネルは、4つの生物学的反復からの定量化を示す。

40

【0080】

【図5F】は、成熟ニューロンのマーカー(NeuN、NSE)及び異なる神経サブタイプのマーカー(VGluT1、GAD67、及びTH)を発現するヒト星状細胞から誘導されたニューロンを示す。スケールバー:40 um。

【0081】

【図5G】は、ヒト星状細胞から変換されたニューロンのサブタイプの定量化を示す。5つの生物学的反復からのデータである。

【0082】

【図5H】は、ヒト星状細胞から誘導されたニューロンの電気生理学的分析を示す。これ

50

には、反復活動電位（左、調べた11個の細胞のうち9個が記録された活性を示した）、電位依存性ナトリウム及びカリウムチャンネルの電流（中央、調べた20個の細胞のうち17個が記録された活性を示した）、及び自発的なシナプス後電流（右、調べた14個の細胞のうち13個が記録された活性を示した）が示されている。

【0083】

【図5 I】は、AAV-shPTBでニューロンに変換する前後のマウス皮質星状細胞でRT-qPCRによって測定されたSLC6A3（左）とFoxA2（右）の発現レベルを定量化したグラフを示す。

【0084】

【図5 J - K】は、DAT（J）及びVMAT2（K）の免疫染色を特徴とする誘導ドーパミン作動性ニューロンの例示的な画像を示す。スケールバー：20  $\mu\text{m}$ 。

10

【0085】

【図5 L】は、THと比較したDAP及びVMAT2を発現する変換されたニューロンの百分率の定量化（3つの生物学的反復に基づく）を示す。

【0086】

【図6 A . 6 C】は、PTBノックダウンによって誘発されたニューロン変換後にマウス（図6A）及びヒト（図6C）の星状細胞で検出された自発的な興奮性及び抑制性シナプス後電流をそれぞれ示す。これらはまた、興奮性（NBQX+APV）及び抑制性（PiTX）受容体に対する阻害剤によって順次ブロックされることが実証された。

【0087】

【図6 B . 6 D】は、模擬マウス（図6B）及びヒト星状細胞（図6D）が、活動電位（上）、電位依存性チャンネルの電流（中央）、及びシナプス後イベント（下）等のニューロンの電気生理学的特性をそれぞれ示さなかったことを示す。

20

【0088】

【図6 E】は、中脳由来の星状細胞からのshPTB変換Tuj1陽性ニューロンのTH染色を示す。スケールバー：10  $\mu\text{m}$ 。

【0089】

【図6 F】は、皮質と中脳に由来する星状細胞間のニューロン変換効率の比較を示す。これには、Tuj1陽性ニューロンの割合が同様に高い（左）が、皮質由来の星状細胞と比較して、中脳由来の星状細胞から変換されたドーパミン作動性ニューロンの割合が大幅に高くなっている（右）ことが示されている。3回の生物学的反復に基づく\*\*\* $p < 0.001$ （スチューデントのt検定）。

30

【0090】

【図6 G】は、皮質及び中脳の星状細胞由来ニューロンにおける汎ニューロンマーカー（Tuj1）及びドーパミン作動性ニューロンの2つの特異的マーカー（TH、VMAT2）の発現を示すウエスタンブロットの結果を示す。

【0091】

【図7 A - 7 K】は、マウス中脳におけるPTBのダウンレギュレーションによる星状細胞の機能性ニューロンへの変換を例示する。（A）は、PTBに対するRFP及びshRNAが後に続く停止シグナルを囲む2つのloxP部位を含むAAVベクターの設計の概略図である。（B）には、空のベクターに感染した星状細胞がGFAP陽性染色を示すが、NeuN染色は示さなかった（上のパネル）、対照的に、shPTB発現ベクターに感染した星状細胞のほとんどは感染後10週間でNeuN陽性であった（下のパネル）ことが示されている。マウス3匹からの定量データが右側に示される。スケールバー：30  $\mu\text{m}$ 。（C）には、変換されたニューロンが、Tuj1、MAP2、NSE、PSD95等の複数のニューロンマーカーに対して免疫陽性であったことが示されている。スケールバー：10  $\mu\text{m}$ 。（D）には、中脳の変換されたニューロンの主要な集団がTHを発現したことが示されている。右のパネルは、変換されたドーパミン作動性ニューロンのサブグループの定量化を示している。マウス3匹からのデータであった。スケールバー：20  $\mu\text{m}$ 。（E-G）は、異なる脳領域におけるin situ変換されたドーパミン作動性ニューロンの特異性と効率を示唆する例示的な結果を示している。（E）及び（F）は、中脳、線条体、及び皮質におけるshPTB誘導成熟ニューロン（NeuN）及びドーパミン作動性ニ

40

50

ニューロン (TH) の免疫染色画像を示している。矢印は、RFPとNeuN (A) またはTH (B) の信号が重複しているいくつかの変換された神経細胞体を示している。スケールバー：30  $\mu$ m。(G) は、(E) と (F) における染色結果の定量化を示している。マウス3匹からのデータであった。有意差は、事後テューキー検定を使用したANOVAのp値によって示される。(H) は、変換されたニューロンの例示的なパッチクランプ記録を示している。パッチを当てた細胞は、記録ピペットに充填されたニューロピオチン488によって標識された。パッチ記録後の免疫染色は、追跡された細胞がTH陽性であることを示した。スケールバー：20  $\mu$ m。(I-K) には、脳スライス上の変換されたニューロンの例が、電位依存性ナトリウム及びカリウムチャンネルの電流 (I、調べた12個の細胞のうち11個が記録された活性を示した)、反復活動電位 (J、調べた12個の細胞のうち9個が記録された活性を示した)、及び自発的なシナプス後電流 (K、調べた11個の細胞のうち9個が記録された活性を示した) を示したことが示されている。

10

## 【0092】

【図8A - 8F】は、マウス中脳における例示的なAAV-shPTB誘導ニューロン変換の特性を示す。(A) は、注射されたWTマウスにおけるLoxP-Stop-LoxPAAV発現ユニットの検出できない漏出を示す。同じウイルス注射を受けたGFAP-Creトランスジェニックマウス (右) と比較して、AAV-Empty及びAAV-shPTBウイルスの注射後の野生型マウスの中脳 (左) ではRFP陽性細胞はめったに検出されなかった。スケールバー：150  $\mu$ m。(B) は、RFP陽性細胞が中脳で徐々にニューロンに変換されたことを示す。RFPで標識されたNeuN陽性細胞の割合は、AAV-shPTBの注射後3週間から10週間まで徐々に増加した。スケールバー：50  $\mu$ m。(C) は、(B) のデータの定量化と、マウス3匹に基づいてそれぞれ示されていない他のポイントを示す。(D) は、NG2細胞がRFP陽性細胞の周囲でめったに検出されなかったのに対し (左のパネル)、NG2陽性細胞は一般にAAV-Empty形質導入中脳の同じスライスでRFP陽性細胞に囲まれていなかったことを示す (右のパネル)。スケールバー：15  $\mu$ m。(E) は、グルタミン酸作動性ニューロンマーカー (VGluT2) とGABA作動性ニューロンマーカー (GAD65) の免疫染色を示し、変換されたニューロンの異なるサブタイプを示す。スケールバー：20  $\mu$ m。(F) は、A9ドーパミン作動性ニューロンマーカー-Girk2の免疫染色を示す。矢印は、Girk2とRFP及びTHで染色された信号の共局在を示す。スケールバー：20  $\mu$ m。

20

## 【0093】

【図8G】は、A10ドーパミン作動性ニューロンマーカーであるカルビンジンの免疫染色を示す。矢印は、カルビンジンとRFP及びTH信号の共局在を示す。星印は、カルビンジンに対して陰性に染色された変換されたドーパミン作動性ニューロン (RFP及びTH陽性) を示す。スケールバー：20  $\mu$ m。

30

## 【0094】

【図8H】は、AAV-shPTBを注入した黒質の低倍率ビューを示す。該黒質は、該脳領域のRFP陽性細胞と比較して、THで染色された新たに変換されたニューロンを監視するためのRFPも発現している。スケールバー：100  $\mu$ m。これらのデータは損傷を受けていない脳からのものであり、多数の内因性TH陽性ドーパミン作動性ニューロン (緑色) を示している。RFP陽性細胞は、黒質 (破線で近似) 内及び周辺領域で検出された。

40

## 【0095】

【図8I】は、黒質におけるTH及びRFP陽性細胞体の増幅図を示す。RFPとTHの二重陽性細胞体は、各パネルのメイン画像の右と下に添付されているzスタック画像の直交ビューによって強調表示される。矢印は、THとRFPの両方に陽性のニューロンプロセスを示す。スケールバー：10  $\mu$ m。

## 【0096】

【図8J】は、黒質と周辺領域の両方でRFPとTHの両方を発現する変換されたドーパミン作動性ニューロンと比較した総RFP陽性細胞の定量化を示す。データはマウス3匹からのものである。

## 【0097】

50

【図9A - 9I】は、黒質から線条体への例示的なPTBノックダウン誘発ドーパミン作動性ニューロンの投射の特徴を示す。(A)は、マウス中脳の例示的な変換ニューロンからのRFP陽性線維の概要であり、背側から腹側までの3つの連続切片を示している。上の白い矢印：中隔核；真ん中の黒い矢印：側坐核；下の黄色い矢印：嗅結節。(B)は、DAT(ドーパミントランスポーター)、VMAT2(小胞モノアミントランスポーター2)、En1(エンゲレイルドホメオボックス1)、Lmx1a(LIMホメオボックス転写因子1アルファ)等のドーパミン作動性ニューロンのマーカーの変換細胞の染色を示す。スケールバー：20 um。(C)は、黒質のTH及びRFP陽性細胞体を示す。矢印はRFPとTHの二重陽性細胞を示している。スケールバー：30 um。(D)は、RFP陽性線維の線条体への投射を示す。これらの線維のいくつかは、THに対しても陽性に染色された。スケールバー：20 um(左)；10 um(右)。(E)は、以前にAAV-shPTBで処理されたマウスへの蛍光逆行性軸索追跡ビーズの線条体注射のスキームを示す。(F)は、黒質のTH/RFP陽性細胞を逆行性ビーズで標識したことを示す。矢印はビーズで標識された変換細胞を示し、矢印はビーズで標識された内因性ドーパミン作動性ニューロンを指す(TH陽性、RFP陰性)。スケールバー：20 um。(G)は、RFP陽性の投影によって神経支配された線条の低倍率のビューを示す。スケールバー：300 um。挿入されたパネルは、異なる領域でのRFP陽性の投影の増幅されたビューを示す。CPU：尾状核-被殻；NAc：側坐核；Sept：セプトム；OT：嗅結節。スケールバー：15 um。(H)は、RFP陽性ファイバーの一部の画像がTHとの共染色を示し(矢印)、他のファイバーはTH陰性(矢印)を示す。スケールバー：5 um。(I)は、野生型マウスの脳におけるAAV-shPTBの形質導入後の総RFP陽性線維及びRFP/TH-二重陽性線維の密度の定量化を示す。データはマウス3匹からの画像に基づいている。

10

20

## 【0098】

【図10】は、パーキンソン病のマウスモデルの構築を示す。上のパネルは、マウスの実質的な黒質への6-OHDAの注射と、それに続くマウスの脳の固定及び染色のタイムラインを示す。下の蛍光画像は、6-OHDA注射を受けていないマウスの線条体(左)と6-OHDA注射を受けたマウスの線条体(右)の免疫染色結果を示す。左と右の画像を比較すると、6-OHDA注射後、TH陽性線維束が失われ、病変線維束に沿ってGFAP陽性星状細胞が増加していることが分かる。

## 【0099】

【図11A - 11E】は、化学的に誘発されたマウスPDモデルにおける黒質線条体経路の再構築とPD表現型の救済を例示する。(A)は、黒質(SN)の6-OHDA誘発病変と、それに続くAAV-PTBによる再プログラミング及び行動分析の実験スケジュールの概略図である。(B)は、中脳の6-OHDA誘発病変(上、スケールバー：500 um)及び線条体のTH染色線維束(下、スケールバー：500 um)におけるTH陽性細胞体の片側喪失の誘発を示す。(D)は、GFAP陽性星状細胞の集団が損傷した黒質で劇的に増加したことを示す。スケールバー：50 um。(D)は、コントロール(上)と6-OHDA損傷ニグラ(中央)の比較を示し、AAV-shPTB(下)による変換されたドーパミン作動性ニューロン(黄色、矢印)の増加を示し、星は内因性ドーパミン作動性ニューロン(緑)を示す。スケールバー：50 um。(E)は、線条体の再生されたRFP及びTH陽性線維の例示的な画像を示す。スケールバー：50 um(上)；10 um(下)。

30

40

## 【0100】

【図11F - 11J】は、shPTB変換ニューロンが黒質の失われたドーパミン作動性ニューロンのかなりの部分を補充したことを示す例示的な結果を示す。(F)は、THで染色された損傷を受けていない黒質の低倍率像を示す。スケールバー：80 um。(G)は、6-OHDAで損傷を受け、AAV-shPTBで形質導入されたニグラを示す。スケールバー：80 um。6-OHDAで損傷したが空のウイルスベクターで処理したニグラは、損傷したが未処理のニグラ間で同一に見えた(図示せず)。(H)は、黒質でTHを共発現しているRFP陽性細胞の拡大図を示す。スケールバー：10 um。2つのRFP/TH-ダブルポジティブセルボディは、各パネルのメイン画像の右と下に添付されたzスタック画像の直交ビューによって強調表示される。(I)は、ニグラにおけるRFP/TH-ダブルポジティブプロセス(矢印)またはRFPポジティブ

50

ブ、THネガティブプロセス（矢印）の画像を示す。スケールバー：10  $\mu\text{m}$ 。（J）は、病変側のドーパミン作動性ニューロンの定量化（青）、空のベクターで処理された病変側の内因性ドーパミン作動性ニューロンの残りの集団（緑）、及び病変側の変換されたRFP陽性ドーパミン作動性ニューロン（オレンジ）を示す。データは、AAV-shPTBまたは空のベクターのいずれかで処理されたマウス3匹からの2セットの画像からのものである。

【0101】

【図11K】は、AAV-shPTBによる形質導入後の6-OHDA損傷脳における総RFP陽性線維及びRFP/TH-二重陽性線維の密度を定量化したグラフを示す。データはマウス3匹からの画像に基づいている。

【0102】

【図11L】は、損傷を受けていないマウス及びAAV-shPTBで形質導入された損傷を受けたマウスの線条体における総TH陽性線維の光学密度を定量化するグラフを示し、損傷を受けた脳におけるTH陽性ドーパミン作動性ニューロンの回復を示す。データは、各群のマウス3匹の分析に基づいている。

【0103】

【図12A - 12C】は、6-OHDAで処理されたAAV-shPTBで再プログラムされたマウスのW Tレベルへの行動の回復を示す。（A）は、模擬治療、6-OHDA治療、AAV-shPTB再プログラムマウスの行動の回復を示す。回転は、アンフェタミン（左、6匹のマウスからのデータに基づく）またはアポモルヒネ（右、7匹のマウスからのデータに基づく）によって誘発された。（B）及び（C）は、模擬処理、6-OHDA処理、AAV-shPTB再プログラムマウスにおける行動回復の経時的分析を示す。回転はアポモルヒネ（B）によって誘発され、片側病変マウスの同側接触の割合（C）が記録された。n=各群で分析されたマウス。平均 $\pm$ SEMとして表される統計結果。有意差は、事後チューキー検定を使用したANOVAに基づくp値によって示される。 $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ 。

【0104】

【図13A】は、PTBを標的とする効率的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの選別を示す。PTBレベルは、異なるASOsで処理されたマウス星状細胞のウエスタンブロットによって調べられた。残りの実験ではASO4#を選択した。

【0105】

【図13B】は、Tuj1とMAP2（左）、NSEとNeuN（中央）、及びドーパミン作動性ニューロンマーカーTH（右）で陽性に染色されたマウス星状細胞からの例示的なPTB-ASO誘導ニューロンを示す。GFP-ASOで処理されたマウス星状細胞は、同じ培養条件下でニューロンマーカーのいずれの陽性染色も示さなかった（開示せず）。スケールバー：20  $\mu\text{m}$ 。

【0106】

【図13C】は、GFP-ASOではなくPTB-ASOが、6-OHDA損傷マウスでアポモルヒネによって誘発された回転行動を救済したことを示す。平均 $\pm$ SEMとして表される統計結果；\*不對の学生t検定に基づく $p<0.01$ 。

【0107】

【図14A - 14D】は、例示的なPTB-ASOがマウス中脳において星状細胞のニューロン変換を誘導したことを示す。（A）は、*in vivo*で星状細胞を標識及び追跡するために使用されるトランスジェニックマウスの概略図である。（B）は、ダブルトランスジェニックG FAP-CreERの中脳では、Rosa-tdTomatoマウス、tdTomato標識細胞のいずれもNeuN陽性に染色されなかったことを示す（左）が、タモキシフェンの治療後3週間で、それらのほとんどはGFAP陽性（右）であった。スケールバー：50  $\mu\text{m}$ 。（C）は、tdTomato標識細胞の一部が中脳にPTB-ASOを注射してから8週間後にNeuN陽性になったことを示す。スケールバー：20  $\mu\text{m}$ 。（D）は、例示的なPTB-ASO変換ニューロンがドーパミン作動性ニューロンマーカーTHに対して陽性に染色されたことを示す。スケールバー：15  $\mu\text{m}$ 。

【0108】

【図15A - F】は、AAV-shPTB治療が線条体ドーパミンレベルを有意に回復させたことを示す。（A）は、野生型脳のドーパミンの範囲内で2つの異なる用量の「スパイクイン」

10

20

30

40

50

ドーパミンを添加した後にHPLCによって検出された脳のドーパミンレベルを示すグラフを示す。(B)は、異なるレベルに追加された「スパイクイン」ドーパミンによって生成された標準曲線を示す。(C)及び(D)は、病変のない脳の両側の線条体ドーパミンレベルの比較(C)及び片側の6-OHDA病変に反応した線条体ドーパミンの減少(D)を示す。(E)同側の黒質にAAV-shPTBを注射した後の線条体ドーパミンの有意な回復を示す。(F)は、示されているように、異なる条件下での線条体ドーパミンレベルを定量化するグラフである。n:各群で分析されたマウス数。有意差は、事後テューキー検定を使用したANOVAのp値によって示される。

【0109】

【図16A】は、変換されたニューロンが表現型の回復に直接関与していることを示すための化学発生的アプローチの概略図である。

10

【0110】

【図16B】は、化学発生実験の行動結果を定量化するグラフである。ここで、シリンダー試験を実施し、AAV-hM4Di-shPTBの注射の前後、ならびにCNOによる処理及び薬物離脱の3日後の損傷マウスにおける優先的な同側接触を示した。病変のないマウスを対照として使用した。n=各群で分析されたマウス。

【0111】

【図17A-F】は、変換されたドーパミン作動性ニューロンによる黒質-線条体経路の再構築を示す。(A)は、ニグラから線条体に拡張されたRFP陽性の投影の画像を示す。概略図は、水平断面の背腹レベルを示す。スケールバー:100 µm。CPU、尾状核-被殻;GP、淡蒼球;IC、内包;SN、黒質。(B)-(E)は、異なる脳領域の高倍率ビューを示す。スケールバー:25 µm。(F)は、淡蒼球でTH(矢印先端)と共染色されたRFP陽性線維の一部の画像を示す。矢印は内因性ドーパミン作動性線維を示す。スケールバー:5 µm。

20

【発明の詳細な説明】

【0112】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「1つ」及び「該」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数の指示物を含む。従って、例えば、「1つ阻害剤」への言及は、複数の阻害剤を含み、「該薬剤」への言及は、当業者に知られている1つまたは複数の薬剤及びその同等物への言及等を含む。

【0113】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法及び試薬を、開示される方法及び組成物の実施に使用することができるが、例示的な方法及び材料をここで記載する。

30

【0114】

本明細書に記載のすべての刊行物、特許、及び特許出願は、方法論を説明及び開示する目的で、参照により完全に本明細書に組み込まれる。これらは、本明細書の説明に関連して使用される可能性のある刊行物に記載されており、あたかも個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているかのようである。上記及び本文全体で説明されている刊行物は、本願の出願日より前の開示のためにのみ提供されている。本明細書のいかなるものも、発明者が事前の開示のためにそのような開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。また、本開示で明示的に定義された用語に類似または同一である1つまたは複数の刊行物に提示された用語に関して、本開示で明示的に提供された用語の定義は、すべての点で支配する。

40

【0115】

また、「及び」の使用は、特に明記されていない限り、「及び/または」を意味する。同様に、「含む」、「含んでいる」、「包含する」、及び「包含している」は交換可能であり、限定することを意図するものではない。

【0116】

さらに理解されたいこととして、様々な実施形態の説明が「含む」という用語を使用す

50

る場合、当業者は、いくつかの特定の例では、実施形態が「本質的にならなる」または「からなる」という言葉を用いて代替的に記載できることは理解できる。

【0117】

「星状細胞」は、脳及び脊髄の特徴的な星型グリア細胞を指すことがある。当業者には明らかであろうように、星状細胞は、その星の形、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーL1（ALDH1L1）、興奮性アミノ酸トランスポーター1/グルタミン酸アスパラギン酸トランスポーター（EAAT1/GLAST）、グルタミンシンターゼ、S100ベータ、または興奮性アミノ酸トランスポーター1/グルタミン酸トランスポーター1（EAAT2/GLT-1）、内皮細胞と一緒に血液脳関門の参加、送信機の取り込みと放出、細胞外空間におけるイオン濃度の調節、ニューロン損傷への反応と神経系修復への参加等のマーカーの発現、及び周囲のニューロンの代謝サポートで特徴付けることができる。本開示の特定の実施形態では、星状細胞は、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーL1（ALDH1L1）、またはその両方を発現する神経系における非神経細胞を指す場合がある。特定の実施形態では、星状細胞は、グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）プロモーター駆動導入遺伝子（例えば、赤色蛍光タンパク質（RFP）、Creリコンビナーゼ）を発現する神経系における非神経細胞を指すことができる。

10

【0118】

「BRN2転写因子」または「Brain-2転写因子」は、「POUドメイン、クラス3、転写因子2」（「POU3F2」）または「Oct-7」とも呼ばれる。それらは、クラスIIIのPOU-ドメイン転写因子を指すことができ、約75アミノ酸のN末端POU特異的ドメインと約60アミノ酸のC末端POU-ホメオドメインからなるDNA結合POUドメインを有する。これらは、短い $\alpha$ -ヘリカルフォールドを含むリンカーを介して連結されており、主に中枢神経系で発現することができる。BRN2は中枢神経系で発現することができ、前神経の塩基性ヘリックスループヘリックス転写因子Mash1と相互作用して、神経分化等の神経新生の側面を調節することができる。

20

【0119】

本明細書で使用される場合、本開示の組成物と細胞を「接触」という用語は、「接触」細胞を生成するために細胞に接触することを可能にする位置に組成物（例：化合物、核酸、ウイルスベクター等）を配置することを指す。接触は、任意の適切な方法を使用して達成することができる。例えば、一実施形態では、接触は、細胞の培養物に化合物を加えることによるものである。接触はまた、それを注入するか、または組成物が標的とされる細胞型に「接触」するように、組成物を体内のある場所へ送達することによって達成され得る。

30

【0120】

本明細書で、「分化する」の「分化」、「分化の誘導」の「変換」という用語は、デフォルトの細胞型（遺伝子型及び/または表現型）をデフォルト以外の細胞型（遺伝子型及び/または表現型）に変化させることを指すために交換可能に使用される。従って、「星状細胞における分化の誘導」は、細胞がその形態を星状細胞から神経細胞型（即ち、マイクロアレイ等の遺伝子分析によって決定された遺伝子発現の変化）及び/または表現型（即ち、タンパク質の発現の変化）に変化させるように誘導することを指す。

40

【0121】

本明細書で使用される場合、「グリア細胞」という用語は、一般に、中枢神経系（例えば、脳及び脊髄）及び末梢神経系における一種の支持細胞を指すことができる。いくつかの実施形態では、ニューロンとは異なり、グリア細胞は電気インパルスを伝導せず、または活動電位を示さない。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、シナプス接続または電気信号を介して、互いに、またはニューロンと情報を伝達しない。神経系またはin vitro培養システムでは、グリア細胞がニューロンを取り囲み、ニューロンをサポートし、ニューロン間の絶縁を提供する。グリア細胞の非限定的な例には、オリゴデンドロサイト、星状細胞、上衣細胞、シュワン細胞、マイクログリア、及び衛星細胞が含まれる。

50

## 【 0 1 2 2 】

本明細書で交換可能に使用される用語「iRNA」、「RNAi剤」、「iRNA剤」、「RNA干渉剤」は、RNAを含み、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)経路を介してRNA転写物の標的切断を媒介する剤を指す。iRNAは、RNA干渉(RNAi)として知られるプロセスを通じて、mRNAの配列特異的な分解を指示する。iRNAは、細胞、例えば、哺乳動物被験者等の被験者の細胞におけるPTBの発現を調節し、例えば、阻害する。RNAi剤には、「低分子干渉RNA(siRNA)」、「エンドリボヌクレアーゼで調製されたsiRNA(e-siRNA)」、「ショートヘアピンRNA(shRNA)」、及び「低分子時間調節RNA(stRNA)」、「さいの目に切ったsiRNA(d-siRNA)」、ならびに少なくとも1つのウラシル塩基を含むアプタマー、オリゴヌクレオチド及び他の合成核酸が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、そのようなRNAi剤は、複製欠陥または複製能力のあるウイルスベクター(例えば、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ガンマレトロウイルスベクター等)等のベクターによって送達されるが、これらに限定されない。

10

## 【 0 1 2 3 】

「マイクロRNA」または「miRNA」は、少なくとも部分的に相補的な核酸配列(mRNA)に結合し、転写後レベルで標的mRNAの発現を負に調節する非コード核酸(RNA)配列を指す。マイクロRNAは通常、二本鎖のヘアピンループ構造を持つ「前駆体」miRNAから「成熟した」形態に処理される。通常、成熟したマイクロRNA配列の長さは約19~25ヌクレオチドである。

20

## 【 0 1 2 4 】

「miR-9」は、遺伝子調節に関与し、ショウジョウバエやマウスからヒトまで高度に保存されている短い非コードRNA遺伝子である。成熟した約21ntのmiRNAは、ヘアピン前駆体配列からDicer酵素によって処理される。miR-9は、発達中及び成体の脊椎動物の脳で最も高度に発現するマイクロRNAの1つである。FoxG1、Hes1、Tlx等の主要な転写調節因子は、miR-9の直接の標的となり、これをニューロンの前駆細胞の状態を制御する遺伝子ネットワークのコアに配置する。

## 【 0 1 2 5 】

本明細書で使用される場合、「ニューロン」または「神経細胞」という用語は、当業者が理解するような通常の意味を有することができる。いくつかの実施形態では、ニューロンは、電気信号(例えば、膜電位放電)及び化学信号(例えば、神経伝達物質のシナプス伝達)を介して情報を受信、処理、及び送信することができる電氣的に興奮可能な細胞を指すことができる。当業者が理解するように、ニューロン間で伝達される化学信号(例えば、神経伝達物質の放出及び認識に基づく)は、シナプスと呼ばれる特殊な接続を介して発生する可能性がある。本明細書で使用される場合、「成熟ニューロン」という用語は、分化したニューロンを指すことができる。いくつかの実施形態では、ニューロンは、成熟ニューロンの1つまたは複数のマーカー、例えば、微小管関連タンパク質2(MAP2)及び神経核(NeuN)、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、160 kDaニューロフィラメント培地、200 kDaニューロフィラメント重、シナプス後肥厚タンパク質95(PDS-95)、シナプシンI、シナプトフィジン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67(GAD67)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67(GAD65)、パルプアルブミン、ドーパミン及びcAMPによって調節されるニューロンリン酸化タンパク質32(DARPP32)、小胞性グルタミン酸トランスポーター1(vGLUT1)、小胞性グルタミン酸トランスポーター2(vGLUT2)、アセチルコリン、及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)を発現する場合、成熟ニューロンである。本明細書で使用される場合、「機能性ニューロン」という用語は、化学的または電氣的信号を介して情報を送受信することができるニューロンを指すことができる。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、正常な神経系に存在する成熟ニューロンの1つ以上の機能的特性を示す。該機能的特性には、興奮性(例えば、活動電位を示す能力、例えば、細胞膜を横切る電圧または膜電位の急速な上昇及びその後の低下)、他のニューロンとのシナプス接続の形成、シナプス前神経伝達物質の放出、及びシナプス後反応(例：興奮性シナプス後電流または抑制性シナプス後電流)が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの

30

40

50

実施形態では、機能性ニューロンは、シナプシン、シナプトフィジン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67 (GAD67)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ65 (GAD65)、バルブアルブミン、ドーパミン及びcAMPによって調節される神経細胞リンタンパク質32 (DARPP32)、小胞性グルタミン酸トランスポーター1 (vGLUT1)、小胞性グルタミン酸トランスポーター2 (vGLUT2)、アセチルコリン、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ドーパミン、小胞性GABAトランスポーター (VGAT)、及びガンマアミノ酪酸 (GABA) を含む、機能性ニューロンの1つまたは複数のマーカーの発現を特徴とするが、これらに限定されない。

#### 【0126】

本明細書で使用される場合、「非神経細胞」という用語は、ニューロンではない任意のタイプの細胞を指すことができる。例示的な非神経細胞は、神経系統以外の細胞系統（例えば、造血系統）のものである細胞である。いくつかの実施形態では、非神経細胞は、ニューロン系統の細胞であるが、ニューロン、例えば、グリア細胞ではない。いくつかの実施形態では、非神経細胞は、ニューロンではない体細胞であり、例えば、グリア細胞、成体初代線維芽細胞、胚性線維芽細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイト、脂肪細胞、血液細胞、骨髄間質細胞、ランゲルハンス細胞、筋肉細胞、直腸細胞、または軟骨細胞等であるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、非神経細胞は、神経膠芽細胞腫細胞株、ヘラ細胞株、NT2細胞株、ARPE19細胞株、またはN2A細胞株等の非神経細胞株に由来するが、これらに限定されない。「細胞系統」または「系統」は、受精した胚からの組織または器官の発達履歴を示すことができる。「神経系統」は、神経幹細胞から成熟ニューロンまでの発達履歴を参照できる。これには、神経幹細胞（神経上皮細胞、放射状グリア細胞）、神経前駆細胞（例：中間ニューロン前駆体）、ニューロン、星状細胞、オリゴデンドロサイト、及びミクログリア等、このプロセスに沿った様々な段階（神経新生として知られている）が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0127】

本明細書で互換的に使用される「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド及びそれらのポリマーを指すことができる。この用語は、合成、天然に存在する、及び天然に存在しない、参照核酸と同様の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと同様の方法で代謝される、既知のヌクレオチド類似体または修飾されたバックボーン残基または結合を含む核酸を包含することができる。そのような類似体の例には、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA)、及びペプチド核酸 (PNA) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0128】

「オリゴデンドロサイト」は、中枢神経系の軸索に支持と絶縁を提供するために神経軸索を取り囲むミエリン鞘を作り出すことができるグリア細胞の一種を指すことができる。オリゴデンドロサイトはまた、PDGF受容体アルファ (PDGFR- $\alpha$ )、SOX10、神経/グリア抗原2 (NG2)、オリゴ1、2、及び3、オリゴデンドロサイト特異的タンパク質 (OSP)、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、またはミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) の発現において特徴付けることができる。

#### 【0129】

「ポリピリミジントラクト結合タンパク質」または「PTB」とそのホモログ神経PTB (nPTB) は、どちらも遍在するRNA結合タンパク質である。PTBはポリピリミジントラクト結合タンパク質1とも呼ばれ、ヒトではPTBP1遺伝子によってコードされている。PTBP1遺伝子は、遍在的に発現する異種核リボ核タンパク質 (hnRNP) のサブファミリーに属している。hnRNPはRNA結合タンパク質であり、異種核RNA (hnRNA) と複合体を形成する。これらのタンパク質は、核内のプレmRNAと関連しており、プレmRNAプロセッシング及びmRNA代謝と輸送の他の側面に影響を与えるようである。PTBは、RNAに結合する準RNA認識モチーフ (RRM) ドメインの4つの繰り返しを持つことができる。その広範な表現と一致して、PTBは多数の選択的スプライシングイベントの抑制に寄与することができる。PTBは、UCUUやUCUCU

10

20

30

40

50

等の短いRNAモチーフを認識できる。これらは、ピリミジンが豊富なコンテキスト内にあり、構成エクソンと代替エクソンの両方の3' スプライス部位の上流のポリピリミジントラクトに関連付けられていることがよくある。場合によっては、PTBの結合部位には、エキソン配列や、調節されたエキソンの下流のイントロンの配列も含まれる。PTBによって調節されるほとんどの選択的スプライシングシステムでは、PTBと代替エクソンを取り巻く複数のPTB結合部位との相互作用によって抑制を達成することができる。場合によっては、抑制には単一のPTB結合部位が関与する可能性がある。PTBによるスプライシング抑制は、PTBとU2AF65の間の直接の競合によって発生する可能性があり、その結果、分岐点でのU2snRNPの組み立てが妨げられる可能性がある。場合によっては、PTBによるスプライシング抑制には、代替エクソンの両側にあるPTB結合部位が関与し、RNAをループアウトするPTB分子間の協調的相互作用から生じる可能性があり、それによってスプライス部位がスプライシング機構にアクセスできなくなる。PTBによるスプライシング抑制には、高親和性結合部位からのPTBの多量体化も含まれ、代替エクソンを覆い、その認識を妨げる抑制波を作り出す可能性がある。

#### 【0130】

PTBは非神経細胞で広く発現する可能性があるが、nPTBはニューロンに限定することができる。PTBとnPTBは、ニューロンの分化中にプログラムされたスイッチを受けることができる。例えば、図1に示すように、ニューロンの分化中、PTBはニューロンの誘導段階で徐々にダウンレギュレートされ、偶然または結果として、nPTBレベルはピークレベルまで徐々にアップレギュレートされる。その後、ニューロンの分化がニューロンの成熟段階に入ると、nPTBレベルは最初の上昇後に減少し、細胞が成熟ニューロンに発達するときのニューロンの分化中のピークレベルと比較して比較的低いレベルに戻る。

#### 【0131】

PTBの配列は既知である(例えば、Romanelli et al. (2005) *Gene*, August 15: 356: 1-8; Robinson et al., *PLoS One*. 2008年3月12日;3(3): e1801.doi: 10.1371/journal.pone.0001801; Makeyev et al., *Mol. Cell*, 2007年8月3日;27(3): 435-48)を参照)。従って、当業者は、アンチセンス、miRNA、siRNA分子等を設計及び構築して、例えば、PTBの発現を調節するか、または阻害して本開示の方法を実施することができる。

#### 【0132】

交換可能に使用される「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸ポリマーまたは2つ以上の相互作用または結合したアミノ酸ポリマーのセットを指すことができる。

#### 【0133】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、核酸の転写を指示する一連の核酸制御配列を指すことができる。本明細書で使用される場合、プロモーターは、ポリメラーゼII型プロモーターの場合、TATAエレメント等の、転写の開始部位の近くに必要な核酸配列を含む。プロモーターはまた、任意選択で、転写の開始部位から数千塩基対まで位置することができる遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントを含む。プロモーターには、構成的及び誘導性プロモーターが含まれる。「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境及び発現条件下で活性化することができるプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境または発生の調節下で活性化することができるプロモーターである。「作動可能に連結された」という用語は、核酸発現制御配列(プロモーター、または転写因子結合部位の配列等)と第2の核酸配列との間の機能的連結を指し得、ここで、発現制御配列は、第2の配列に対応する核酸の転写を指示する。

#### 【0134】

本明細書で使用される場合、「再プログラミング」または「分化転換」という用語は、細胞を多能性幹細胞の特徴を示す細胞に脱分化する中間プロセスなしに、異なるタイプの細胞(例えば、線維芽細胞)からの特定の系統の細胞(例えば、神経細胞)の生成を指すことができる。「多能性」とは、細胞が体または体細胞のすべての系統(即ち、適切な胚)を形成する能力を指すことがある。例示的な「多能性幹細胞」には、胚性幹細胞及び人

工多能性幹細胞が含まれ得る。

【0135】

互換的に使用される「被験者」及び「患者」という用語は、示された場合を除き、ヒト及び非ヒト霊長類等の哺乳動物、ならびにウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタ、及び他の哺乳動物種を指すことができる。この用語は、必ずしも被験者が特定の疾患と診断されたことを示すわけではなく、代わりに医学的監督下にある個人を指す場合がある。例えば、開示された方法及び組成物から利益を得る哺乳動物種には、類人猿、チンパンジー、オランウータン、ヒト、サル等の霊長類、犬、猫、モルモット、ハムスター、ベトナムのポットベリーピッグ、ウサギ、フェレット等の飼いなされた動物（ペット等、牛、水牛のバイソン、馬、ロバ、豚、羊、山羊等の家畜、プレーリードッグ、コアラクマ、カンガルーオポッサム、アライグマ、パンダ、ハイエナ、アザラシ、アシカ、ゾウアザラシ、オッター、ネズミイルカ、イルカ、クジラ、クマ、ライオン、トラ、ヒョウ、ゾウ、カバ、サイ、キリンのカモシカ、ナナカマド、ガゼル、シマウマ、ヌー等の動物園で一般的に見られるエキゾチックな動物等が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0136】

「ベクター」は、別の核酸を細胞に輸送することができる核酸である。ベクターは、適切な環境に存在する場合、ベクターによって運ばれる、1つまたは複数の遺伝子によってコードされる1つまたは複数のタンパク質、またはポリヌクレオチドによってコードされるマイクロRNAの発現を指示することができる。

20

【0137】

「ウイルスベクター」は、別の核酸を細胞に輸送することができるウイルス由来の核酸である。ウイルスベクターは、適切な環境に存在する場合、ベクターによって運ばれる、1つまたは複数の遺伝子によってコードされる1つまたは複数のタンパク質、またはポリヌクレオチドによってコードされるマイクロRNAの発現を指示することができる。ウイルスベクターの例には、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0138】

本開示は、ポリピリミジントラクト結合タンパク質（PTB）のノックダウンによって非ニューロン哺乳動物細胞または星状細胞を機能性ニューロンに変換または分化させるための組成物及び方法を提供する。本開示のいくつかの態様は、非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法を提供する。例示的な方法は、非神経細胞を提供し、非神経細胞を、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それによって非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。該方法及び組成物は、*in vitro*で細胞を変換するだけでなく、脳内で直接*in vivo*でも変換する。

40

【0139】

本開示のいくつかの実施形態によれば、ヒト非神経細胞が成人の線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する場合、ヒトの非神経細胞でPTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は非神経細胞を成熟ニューロンに直接変換することができる。本開示のいくつかの実施形態では、単一の細胞プログラミング剤による非神経細胞のニューロンへの直接変換は、非神経細胞のニューロンへの変換が、単一の細胞プログラミング剤と接触すること以外の介入を必要としないことを意味し得る。

50

【0140】

例示的な方法は、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現するヒト非神経細胞を提供すること及び、ヒト非神経細胞を、ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、ヒト非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

【0141】

50

本開示のいくつかの実施形態によれば、ヒトグリア細胞は、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現することができる。別の実施形態では、本開示は、ヒトグリア細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法を提供する。例示的な方法は、再プログラムするヒトグリア細胞を提供すること、及びヒトグリア細胞をヒトグリア細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも1日間抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、ヒトグリア細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

#### 【0142】

別の実施形態では、本開示は、星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする方法を提供する。例示的な方法は、再プログラムされる星状細胞を提供すること、及び星状細胞を星状細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも1日間抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、それにより、星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。いくつかの実施形態では、星状細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、星状細胞をニューロンに直接変換することができる。

#### 【0143】

本開示によれば、場合によっては、PTBの減少は、いくつかの重要なニューロン分化因子を誘発する可能性がある。例えば、特定の理論に拘束されることを望まずに、PTBとnPTBは、ニューロンの分化に重要な2つの別々であるが絡み合ったループに別々に関与することができる。図1に示すように、PTBは、マイクロRNA miR-124が転写抑制因子RE1-Silencing Transcription factor (REST) を阻害できるニューロン誘導ループを抑制できる。これにより、miR-124及び多くのニューロン特異的遺伝子の誘導がブロックされる(ループI)。通常のニューロンの分化過程では、PTBは徐々にダウンレギュレートされる可能性があり、PTBのダウンレギュレーションは、転写活性化因子Brn2及びmiR-9を含むニューロン成熟の2番目のループの一部であるnPTBの発現を誘導する可能性がある(図1、ループII)。図1に示すように、ループIIでは、nPTBはBrn2を抑制でき、その結果、miR-9を抑制でき、miR-9はnPTBを抑制できる。

#### 【0144】

本開示のいくつかの実施形態によれば、非神経細胞におけるmiR-9またはBrn2の発現レベルは、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤による非神経細胞の成熟ニューロンへの変換に影響を与える可能性がある。例えば、ヒト成人線維芽細胞は、miR-9及びBrn2の発現レベルが低い可能性がある。いくつかの実施形態では、ヒト成人線維芽細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する単一の薬剤は、ヒト成人線維芽細胞を誘導してニューロン様細胞、例えば、Tuj1タンパク質の発現に分化させることができるが、成熟ニューロン、例えば、NeuNタンパク質または成熟ニューロンの他のマーカーの発現には分化させない。特定の理論に拘束されることを望まずに、いくつかの実施形態における主題の方法及び組成物は、非神経細胞のニューロンへの変換を指示する分子変化における強化フィードバックループを作成するのに特に効果的である。特定の理論に拘束されることを望まずに、PTBの発現または活性が外因性抗PTB剤によって最初にダウンレギュレートされると、RESTレベルがダウンレギュレートされる可能性があり、それが次にmiR-124レベルのアップレギュレーションにつながる可能性がある。特定の理論に拘束されることを望まずに、図1に示すように、場合によって、miR-124はPTBの発現を標的にして阻害できるため、アップレギュレートされたmiR-124は細胞内のPTBの阻害を強化することができる。そのような正の強化効果は、場合によっては、抗PTB剤、例えば、PTBに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞内に存在し、単に一時的に活性である場合でも、長続きする可能性がある。

#### 【0145】

本開示のいくつかの実施形態によれば、ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、ヒトの非神経細胞がヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する場合、非神経細胞を成熟

10

20

30

40

50

ニューロンに直接変換することができる。本明細書で提供される方法で使用できる例示的なヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する。いくつかの実施形態では、ヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約4.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約5.5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約6.5倍、少なくとも約7倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約8倍、少なくとも約8.5倍、少なくとも約9倍、少なくとも約9.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約11倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、または少なくとも約50倍高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する。いくつかの実施形態では、ヒトの非神経細胞は、ヒトの成人線維芽細胞で発現するレベルよりも約1.2倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.8倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約5.5倍、約6倍、約6.5倍、約7倍、約7.5倍、約8倍、約8.5倍、約9倍、約9.5倍、約10倍、約11倍、約12倍、約15倍、約20倍、または約50倍高いレベルでmiR-9またはBrn2を発現する。

10

**【0146】**

いくつかの実施形態では、ヒトの非神経細胞でPTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、ヒトの非神経細胞がヒト成人線維芽細胞で発現するレベルよりも高いレベルでmiR-9とBrn2の両方を発現する場合、非神経細胞を成熟ニューロンに直接変換できる。本明細書で提供される方法で使用できる例示的なヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞で発現されるレベルよりも少なくとも2倍高いレベルでmiR-9及びBrn2の両方を発現する。いくつかの実施形態では、ヒト非神経細胞は、ヒト成人線維芽細胞において発現されるレベルよりも少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約4.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約5.5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約6.5倍、少なくとも約7倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約8倍、少なくとも約8.5倍、少なくとも約9倍、少なくとも約9.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約11倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、または少なくとも約50倍高いレベルでmiR-9及びBrn2の両方を発現する。

20

**【0147】**

いくつかの実施形態では、ヒトの非神経細胞でPTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、ヒトの非神経細胞がヒト成人線維芽細胞で発現するレベルよりも高いレベルで内因性miR-9または内因性Brn2を発現する場合、非神経細胞を成熟ニューロンに直接変換できる。いくつかの実施形態では、外因性miR-9は、ヒト非神経細胞に導入されない。いくつかの実施形態では、外因性Brn2は、ヒト非神経細胞に導入されない。

30

**【0148】**

いくつかの実施形態では、非神経細胞におけるmiR-9またはBrn2の発現レベルは、当業者が理解するであろう任意の技術によって評価することができる。例えば、細胞内のmiR-9の発現レベルは、逆転写(RT)-ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、miRNAアレイ、RNA配列(RNA-seq)、及びマルチプレックスmiRNAアッセイによって測定できる。miR-9の発現レベルは、in situハイブリダイゼーション等のin situ法でもアッセイできる。タンパク質としてのBrn2の発現レベルは、ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、免疫染色等の従来技術、またはタンパク質マイクロアレイや分光法(例:高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及び液体クロマトグラフィー-質量分析(LC/MS))等の他の技術によってアッセイできるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、細胞または特定の種類の組織/細胞におけるmiR-9の発現レベルに関する情報は、Human MiRNA Expression Database(HMED)、miRgator 3.0、miRmine、及びPhenomiR等、マイクロRNAについて公開されているデータベースを参照することで取得できる。いくつかの実施形態では、細胞または特定の種類の組織/細胞におけるmiR-9の発現レベルに関する情報は、Human Protein Atlas、GeMDBG Proteomics、Human Proteinpedia、Kahn Dynamic Proteomics

40

50

Database等、公的に利用可能なタンパク質発現データベースを参照することで取得できる。

【0149】

本開示の特定の実施形態によれば、例示的な方法は、再プログラムされるヒトの非神経細胞を提供すること及びヒト非神経細胞を、ヒト非神経細胞におけるPTBの発現または活性の低下をもたらす単一の細胞プログラミング剤を含む組成物と接触させ、発現後のnPTBの発現または活性の低下またはPTBの活性が低下することを含む。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、特定のタイプの非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞におけるPTB及びnPTBの発現または活性レベルに関して連続的な事象を引き起こす可能性がある。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤との接触の直接的な効果は、非神経細胞におけるPTBの発現または活性の減少である。いくつかの実施形態では、非神経細胞において、非神経細胞におけるPTBの発現または活性の減少は、非神経細胞におけるnPTB発現レベルの最初の増加を伴う。いくつかの実施形態では、初期のnPTB発現レベルは、PTBの発現または活性が抑制されるにつれて、高いnPTB発現レベルに増加する。いくつかの実施形態では、最初の増加に続いて、nPTB発現は、高いnPTB発現レベルから低いnPTB発現レベルに減少する。いくつかの実施形態では、低いnPTB発現レベルは、PTBの発現または活性が抑制された後でも、最初のnPTB発現レベルよりも高い。いくつかの実施形態では、nPTB発現レベルは、PTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤以外の外部介入なしに、最初の増加後に自発的に減少する。特定の理論に拘束されることなく、PTBの発現または活性後の非神経細胞におけるnPTB発現レベルのその後の減少は、細胞プログラミング剤によって減少し、細胞プログラミング剤による非神経細胞の成熟ニューロンへの直接変換と関連させることができる。いくつかの実施形態によれば、PTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、ヒト成人線維芽細胞において上記のような連続的なイベントを誘発しない。例えば、nPTBは発現レベルの最初の上昇を経験できるが、その後の特定の低レベルへの低下はない。いくつかの実施形態では、ヒト星状細胞では、ヒト星状細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性の即時の減少、nPTBの発現レベルの最初の増加、及びその後のnPTBの発現レベルの減少をもたらす。いくつかの実施形態では、PTBの発現または活性を抑制する単一の細胞プログラミング剤は、ヒト星状細胞を成熟ニューロンに直接変換する。いくつかの実施形態では、非神経細胞におけるmiR-9またはBrn 2の発現レベルは、PTB発現または活性が細胞プログラミング剤によって抑制された後の最初の増加後に非神経細胞におけるnPTB発現レベルが減少するかどうかと関連させることができる。例えば、miR-9またはBrn2がヒト成人線維芽細胞よりも高いレベルで発現しているヒト星状細胞では、PTBの発現または活性が細胞プログラミング剤によって抑制された後、最初の増加後に非ニューロンにおけるnPTB発現レベルが減少する。一方、成人の線維芽細胞では、上記のように、場合によっては、その後のnPTB発現レベルの低下が起こらないことがある。

【0150】

本開示のいくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法で成熟ニューロンに再プログラムすることができる例示的な非神経細胞は、星状細胞、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、シュワン細胞、NG2細胞、及び衛星細胞等であるが、これらに限定されないグリア細胞を含むことができる。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、ヒトグリア細胞、例えば、ヒト星状細胞であり得る。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、マウスグリア細胞であり得る。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、非ヒト霊長類動物、ブタ、イヌ、ロバ、ウマ、ラット、ウサギ、及びラクダ等他の任意の哺乳動物由来のグリア細胞であり得る。これらに限定されない。

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法で使用できるグリア細胞は、脳から単離されたグリア細胞である。いくつかの実施形態では、グリア細胞は、例えば、親グリア細胞から分割された細胞培養物中のグリア細胞である。いくつかの実施形態では、本

10

20

30

40

50

明細書で提供されるグリア細胞は、外部誘導下で異なるタイプの細胞から分化したグリア細胞であり、例えば、分化因子を含む培地中の神経幹細胞から *in vitro* で分化し、または誘導された多能性幹細胞から分化した。いくつかの他の実施形態では、グリア細胞は、神経系のグリア細胞、例えば、脳領域に存在する星状細胞である。

#### 【0152】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法で使用することができる星状細胞は、脳または脊髄において星形であるグリア細胞である。いくつかの実施形態では、星状細胞は、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーL1 (ALDH1L1)、興奮性アミノ酸トランスポーター1/グルタミン酸アスパラギン酸トランスポーター (EAAT1/GLAST)、グルタミンシンテターゼ、S100ベータ、または興奮性アミノ酸トランスポーター1/グルタミン酸トランスポーター1 (EAAT2/GLT-1) を含むがこれらに限定されない、よく認識されている星状細胞マーカーの1つまたは複数を発現する。いくつかの実施形態では、星状細胞は、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリーメンバーL1 (ALDH1L1)、またはその両方を発現する。特定の実施形態では、星状細胞は、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター駆動導入遺伝子 (例えば、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、Creリコンビナーゼ) を発現する神経系の非神経細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の星状細胞は、ニューロンマーカー、例えば、Tuj1、NSE、NeuN、GAD67、VGluT1、またはTHに対して免疫陽性ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される星状細胞は、オリゴデンドロサイトマーカー、例えば、オリゴデンドロサイト転写因子2、OLIG2に対して免疫陽性ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の星状細胞は、ミクログリアマーカー、例えば、膜貫通タンパク質119 (TMEM119)、CD45、イオン化カルシウム結合アダプター分子1 (Iba1)、CD68、CD40、F4/80、またはCD11抗原様ファミリーメンバーB (CD11b) に対して免疫陽性ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の星状細胞は、NG2細胞マーカー (例えば、神経/グリア抗原2、NG2) に対して免疫陽性ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される星状細胞は、神経前駆細胞マーカー、例えば、Nestin、CXCR4、Musashi、Notch-1、SRY-Box 1 (SOX1)、SRY-Box 2 (SOX2)、段階特異的胚性抗原1 (SSEA-1、CD15とも呼ばれる)、またはビメンチンに対して免疫陽性ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の星状細胞は、多能性マーカー、例えば、NANOG、オクタマー結合転写因子4 (Oct-4)、SOX2、Kruppel Like Factor 4 (KLF4)、SSEA-1、またはステージ特異的胚性抗原4 (SSEA-4) に対して免疫陽性ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の星状細胞は、線維芽細胞マーカー (例えば、フィブロネクチン) に対して免疫陽性ではない。

#### 【0153】

星状細胞には、様々なタイプまたは分類が含まれる。開示の方法によると、様々な種類の星状細胞に適用できる。異なるタイプの星状細胞の非限定的な例には、Ran2<sup>+</sup>、GFAP<sup>+</sup>、線維芽細胞成長因子受容体3陽性 (FGFR3<sup>+</sup>)、及びA2B5<sup>-</sup>であり得る1型星状細胞が含まれる。1型星状細胞は、三電位グリア制限前駆細胞 (GRP) から発生する可能性がある。1型星状細胞は、二能性O2A/OPC (オリゴデンドロサイト、2型星状細胞前駆細胞) 細胞からは生じない可能性がある。別の非限定的な例には、A2B5<sup>+</sup>、GFAP<sup>+</sup>、FGFR3<sup>-</sup>、及びRan2<sup>-</sup>であり得る2型星状細胞が含まれる。2型星状細胞は、*in vitro* で三電位GRPまたは二電位O2A細胞から、あるいはこれらの前駆細胞が病変部位に移植されると *in vivo* で発生する可能性がある。本明細書で提供される方法で使用することができる星状細胞は、それらの解剖学的表現型に基づいてさらに分類することができる。例えば、灰白質に見られ、エンドフィートがシナプスを包む多くの分岐過程を持つ原形質星状細胞；灰白質に見られ、ランヴィエ絞輪の端足が節を包む長く細い非分岐突起を持つことができる線維性星状細胞。本明細書で提供される方法で使用できる星状細胞はまた、GluT型及びGluR型を含み得る。GluTタイプの星状細胞は、グルタメートトランスポーター (EAAT1/SLC1A3及びEAAT2/SLC1A2) を発現し、トランスポーター電流によるグルタメートのシナプス放出に応答することができる。一方、GluRタイプの星状細胞は、グルタメート受容体 (主にmGluR及びAMPAタイプ) を

10

20

30

40

50

発現し、チャンネルを介した電流及びIP3依存性のCa<sup>2+</sup>トランジェントによるグルタメートのシナプス放出に応答する。

#### 【0154】

本明細書で提供されるように、細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を内因性または天然レベルの少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%抑制する。本明細書で提供されるように、細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を内因性または天然レベルの約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%抑制する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞プログラミング剤は、PTBの発現レベルを直接抑制し、例えば、PTBの転写、翻訳、またはタンパク質の安定性を抑制する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞プログラミング剤は、PTBの活性を直接抑制し、例えば、PTBのその標的分子への結合を遮断する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞プログラミング剤は、他の細胞シグナル伝達経路に影響を与えることなく、PTBの発現または活性に直接影響を与える。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞プログラミング剤は、別のタンパク質またはマイクロRNA、例えば、miR-124、miR-9、またはBrn2の発現または活性レベルを抑制または上方制御することによって、PTBの発現または活性を抑制しない。

10

20

#### 【0155】

本明細書で提供されるように、PTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤は、PTBのタンパク質発現またはタンパク質活性を抑制または排除する任意のタイプの試薬であり得る。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、小さな化学分子、干渉RNA、ショートヘアピンRNA、マイクロRNA、ドミナントネガティブPTB、スポンジポリヌクレオチド、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、モノクローナル抗体、またはPTBの発現または活性を抑制するように構成されたポリクローナル抗体であり得る。

#### 【0156】

PTBの小さな化学分子阻害剤は、有機または無機の化合物であり得る。本明細書で 사용되는場合、「小分子」は、約3,000ダルトン未満の分子量の小さな有機または無機分子を指すことがある。前記小分子は、天然物または合成製品である可能性がある。PTBの小分子阻害剤は、PTBの活性フラグメントに基づく構造を有することができる。例えば、で知られているコンピュータモデリング法を使用して、PTBの活性フラグメント（RNA結合モチーフ等）に類似した構造を持つ分子を合理的に設計できる（例えば、1、2、3、4、またはそれ以上の異なるRNA結合モチーフ）。

30

#### 【0157】

RNA干渉は、標的遺伝子PTBの発現レベルを低下させるのに役立つ。本明細書で提供されるように、該方法は、非神経細胞におけるPTBの発現を抑制するためのRNA干渉の使用を含むことができる。dsRNA分子は、DICER (Bernstein et al., Nature 409: 363, 2001) と呼ばれるRNase E様酵素による2つの21 nt鎖からなる小さなdsRNA分子へのプロセッシングを受けた後、様々なタイプの細胞でmRNAの配列特異的分解を指示すると考えられ、それぞれが5'リン酸基と3'ヒドロキシルを持ち、他の鎖と正確に相補的な19 nt領域を含むため、2 nt-3'オーバーハングに隣接する19nt二重領域がある。従って、RNAiは短い干渉RNA (siRNA) によって媒介される可能性があり、これは通常、長さが約19ヌクレオチドで各鎖に1~2ヌクレオチドの3'オーバーハングがある二本鎖領域を含み、全長は約21~23ヌクレオチドになる。

40

#### 【0158】

本明細書で提供される方法で使用できる短い干渉RNA (siRNA) は、約19塩基対の長さの

50

RNA二重鎖を含み、オプションで1つまたは2つの一本鎖オーバーハングまたはループをさらに含み、全長が約21及び23ヌクレオチドの間になることがある。siRNAは、一緒にハイブリダイズする2つのRNA鎖を含むことができ、あるいは、自己ハイブリダイズする部分を含む単一のRNA鎖を含むことができる。siRNAは、リン酸基及び/またはヒドロキシル基を含むことができる1つまたは複数の遊離鎖末端を含むことができる。siRNAは通常、ストリンジントな条件下で標的転写産物とハイブリダイズする部分を含むことができる。siRNAの1本の鎖（またはsiRNAの自己ハイブリダイズ部分）は、標的転写物（例えば、PTB mRNA転写物）の領域と正確に相補的であり得、これは、siRNAが単一のミスマッチなしに標的転写物にハイブリダイズすることを意味する。特定の実施形態では、完全な相補性は達成されない。いくつかの実施形態では、ミスマッチは、siRNA末端またはその近くに位置する。

10

**【0159】**

本明細書で使用される場合、siRNAはまた、そのような分子を生成するためにin vivoで処理され得る様々なRNA構造（例えば、短いヘアピンRNA（shRNA））を含む。shRNAは、互いにハイブリダイズしてステム、ループ、及び任意選択でオーバーハング、例えば3'オーバーハングを形成する2つの相補的要素を含むRNA鎖を含むことができる。ステムは約19 bpの長さ、ループは約1~20、例えば約4~10、及び約6~8 ntの長さ、及び/またはオーバーハングは約1~20、例えば約2~15 ntの長さにすることができる。特定の実施形態では、ステムは、最小で19ヌクレオチドの長さであり得、最大で約29ヌクレオチドの長さであり得る。本明細書で提供される古典的なsiRNAは、それらが標的とされるmRNA（例えば、PTB mRNA転写物）の分解を引き起こし、それによってタンパク質合成の速度も低下させる可能性がある。いくつかの実施形態では、PTBmRNA転写産物の3'UTRに結合する特定のsiRNA（例えば、マイクロRNA）は、古典的なRNA干渉に関連するが、それとは異なるメカニズムによって、例えば安定性を低下させるのではなく、転写物の翻訳を低下させることによる、テンプレート転写産物によってコードされるタンパク質の発現を阻害することができる。マイクロRNAは、長さが約20~26ヌクレオチド、例えば22 ntの長さである可能性がある。マイクロRNAは、標的転写物を不安定化及び/またはそれらの翻訳（例えば、PTB発現）をブロックするために使用することができる。

20

**【0160】**

特定の所望のsiRNA配列をコードするDNA配列を含むプラスミドは、トランスフェクションまたはウイルス媒介感染を介して標的細胞に送達される。細胞内に入ると、DNA配列はRNA分子に継続的に転写され、RNA分子はそれ自体でループバックし、分子内の塩基対形成によってヘアピン構造を形成する。これらのヘアピン構造は、細胞によって処理されると、トランスフェクトされたsiRNA分子と同等であり、目的のタンパク質のRNAiを仲介するために細胞によって使用される。shRNAの使用は、前者がタンパク質発現の安定した長期阻害につながる可能性があるため、siRNAトランスフェクションよりも優れている。トランスフェクトされたsiRNAによるタンパク質発現の阻害は、数日より長い期間は発生しない一過性の現象である。

30

いくつかの場合には、これは好ましく、望ましい場合がある。より長期間のタンパク質阻害が必要な場合は、shRNAを介した阻害が望ましい。ショートヘアピンRNA（shRNA）は、5'フランキング領域、siRNA領域セグメント、ループ領域、3'siRNA領域、及び3'フランキング領域を含むように設計できるステムループ構造で構成できる。shRNAは、標的配列を効果的にロックダウンすることができる。

40

**【0161】**

標的RNA転写物（例えば、PTB mRNA転写物）の一部または全部に相補的な塩基配列を有するスポンジポリヌクレオチドは、本明細書で提供される方法でも使用することができる。例えば、スポンジポリヌクレオチドは、ポリピリミジントラクトを含むことができる。スポンジポリヌクレオチドを使用してPTBmRNA転写物を「トラップ」し、それによってそれらが通常スプライシング、翻訳、または輸送されるのをブロックし、PTBタンパク質の発現レベルを低下させることができる。

50

## 【0162】

いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、PTB分子の活性を阻害することができるドミナントネガティブ変異体であり得る。ドミナントネガティブ変異体は、PTB分子の活性を阻害することができるペプチドまたはペプチド模倣物、またはPTBの活性を阻害することができるドミナントネガティブポリペプチドを発現するDNAベクターまたは遺伝子治療ベクターの形態の核酸組成物であり得る。ドミナントネガティブ変異体は、ターゲットRNAまたはPTBのリガンドに結合し、そのターゲット相互作用に影響を与える可能性がある。ドミナントネガティブ分子は、例えば、タンパク質間相互作用またはタンパク質間相互作用をブロックすることによって作用することができる。

## 【0163】

ポリペプチド模倣組成物は、二次構造、例えば、ベータターン、ガンマターン、ベータシート、アルファヘリックスコンフォメーション等を誘導または安定化するために、典型的にはa)天然のアミド結合(「ペプチド結合」)結合以外の残基結合基、b)天然に存在するアミノ酸残基の代わりに非天然残基、またはc)二次構造模倣を誘発する残基、等3つの構造グループに由来する非天然構成成分の任意の組み合わせを含むことができる。個々のペプチド模倣残基は、ペプチド結合、他の化学結合、またはカップリング手段、例えば、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、二官能性マレイミド、N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)またはN、N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)によって結合することができる。従来のアミド結合(「ペプチド結合」)結合の代替となり得る結合基には、例えば、ケトメチレン(例えば、 $-C(=O)-NH-$ の場合、 $-C(=O)-CH_2-$ 、アミノメチレン( $CH_2-NH$ )、エチレン、オレフィン( $CH=CH$ )、エーテル( $CH_2-O$ )、チオエーテル( $CH_2-S$ )、テトラゾール( $CN_4-$ )、チアゾール、レトロアミド、チオアミド、またはエステルが含まれる。

## 【0164】

細胞プログラミング剤の別の非限定的な例は、抗PTB抗体であり得る。抗PTB抗体は、PTBに特異的に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。本明細書で使用される抗PTB抗体は、その活性フラグメントまたは不活性フラグメントでPTBに結合することができる。いくつかの構成では、PTBの活性フラグメントに結合する抗PTB抗体は、PTBがその機能的標的(例えば、標的RNA転写物)またはパートナー(例えば、タンパク質リガンド)と相互作用するのを阻止し、それによってPTBの活性を阻害することができる。他の構成では、PTBの不活性フラグメントに結合する抗PTB抗体は、場合によってはPTB凝集を誘発し、それによって細胞内にPTBを固定化し、標的またはパートナーと相互作用するために再配置するのを防ぎ、場合によっては、抗PTB抗体は、抗体に結合しているため、PTBのタンパク質分解を誘発することもある。

## 【0165】

アンチセンス核酸(例えば、DNA、RNA、修飾DNA、または修飾RNA)は、一般に、標的核酸(例:PTB mRNA転写物)の一部に相補的な一本鎖核酸であり、従って、標的に結合して二本鎖を形成することができる。抗PTBアンチセンスヌクレオチドは、例えば細胞内でのPTBの発現または活性を抑制するように構成することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)は、ターゲットmRNAとペアリングして、RNAを核内酵素RNaseHによる切断の基質にすることができる。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、脳脊髄液への注射後、神経系、例えば、げっ歯類及び非ヒト霊長類神経系において約3ヶ月間、標的mRNA分解を媒介することができる。本明細書で提供されるように、本明細書で提供される方法で使用できるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、長さが15から35ヌクレオチドの範囲であるが、長さが10から約50ヌクレオチドの範囲であることができるオリゴヌクレオチドである。結合は、標的PTB核酸の機能を低下または阻害する可能性がある。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ゲノムDNA(例えば、PTB遺伝子)に結合すると転写をブロックし、mRNA(例えば、PTB mRNA転写物)に結合すると翻訳を阻害し、及び/または核酸の分解をもたらすことができる。PTBの発現の減少は、ポリペプチドをコードするmRNAの配列に相補的な配列を含むアンチセンス核酸またはペプチド

10

20

30

40

50

核酸の投与によって達成することができる。アンチセンス技術及びその応用は当技術分野で周知であり、Phillips, M. I. (ed.) Antisense Technology, Methods Enzymol., 313及び314:2000、及びそこに記載されている参考文献に記載されている。また、Crooke, S. 「ANTISENSED RUG TECHNOLOGY: PRINCIPLES, STRATEGIES, AND APPLICATIONS」(第1版) Marcel Dekker及びそこに引用されている参考文献も参照されたい。

**【0166】**

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ロックされた核酸(LNA)を含むことができる。いくつかの実施形態では、LNAは修飾されたRNAヌクレオチドを指し、リボース部分は2'酸素と4'炭素を接続する追加のブリッジで修飾され、ブリッジは3'-エンド(北)コンフォメーションでリボースを「ロック」する。いくつかの実施形態では、LNAは、必要なときはいつでもオリゴヌクレオチド中のDNAまたはRNA残基と混合され、ワトソン-クリック塩基対形成規則に従ってDNAまたはRNAとハイブリダイズする。ロックされたリボースコンフォメーションは、ベーススタッキングとバックボーンの事前編成を強化できる。本明細書で提供されるようなオリゴヌクレオチドへのLANの包含は、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性(融解温度)を増加させる。場合によっては、LNAを含めると、ターゲットmRNAの翻訳がブロックされるが、ターゲットmRNAの分解は引き起こされない。LNAを使用する例示的な技術及び用途は、PCT/US2013/047157及びCampbell MA et al., Chem. Soc. 改訂版、40(12), 5680-9に見出すことができ、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

**【0167】**

本明細書で提供される細胞プログラミング剤はまた、RNA分子の配列特異的切断を触媒することができるリボザイムまたはデオキシリボザイムを含み得る。切断部位は、RNAまたはDNA酵素のヌクレオチドと標的RNAのヌクレオチド(PTB mRNA転写物等)との相補的なペアリングによって決定される。従って、RNA及びDNA酵素は、PTB mRNA転写物を切断するように設計することができ、それによってその分解速度を増加させる。

**【0168】**

本明細書で提供されるように、非神経細胞と細胞プログラミング剤の接触は、再プログラミングする非神経細胞のタイプ、非神経細胞が存在する環境、細胞プログラミング剤のタイプ、及び望ましい細胞再プログラミングの結果に応じて、任意の適切な方法で実行できる。いくつかの実施形態では、PTBの小分子阻害剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチド等の細胞プログラミング剤は、細胞プログラミング剤自体が細胞膜浸透能力を示すことを前提として、非神経細胞に直接適用される。いくつかの実施形態では、shRNA、抗体、またはドミナントネガティブ変異体等の細胞プログラミング剤は、目的の細胞プログラミング剤を発現する核酸ベクターの形で導入される。これらの構成では、非ウイルストランスフェクション法またはウイルス形質導入法を利用して、細胞プログラミング剤を導入する。非ウイルストランスフェクションとは、ウイルスを介さないすべての細胞トランスフェクション法を指す。非ウイルストランスフェクションの非限定的な例には、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラ等のカチオン性ポリマーとそれに続くポリエチレングリコールによるトランスフェクション、デンドリマーによるトランスフェクション、リボソームを介したトランスフェクション(「リボフェクション」)、微小発射体衝撃(「遺伝子銃」)、fugene、直接音波負荷、細胞圧搾、光学的トランスフェクション、プロトプラスト融合、インバレフェクション、マグネトフェクション、ヌクレオフェクション、及びそれらの任意の組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、細胞プログラミング剤を非神経細胞に送達するための適切な培地としてウイルスベクターを利用する。適切なウイルスベクターの例には、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、またはネズミマロニーベースのウイルスベクターが含まれ得る。いくつかの実施形態では、ベクターはAAVベクターである。本明細書で提供されるように、ウイルスベクター法は、DNAまたはRNAウイルスベクター

30

40

50

のいずれかの使用を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、AAVベクターの形態で投与される。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、レンチウイルスベクターの形態で投与される。例えば、レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルス (AAV) を使用して、PTBに対してshRNAを発現させることにより、細胞プログラミング剤を非神経細胞に送達することができる。

#### 【0169】

本開示のいくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法は、非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングするのに十分な量の細胞プログラミング剤を介して、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制することを含む。当業者が容易に理解するように、十分な量の細胞プログラミング剤を経験的に決定することができる。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤の量は、非神経細胞における細胞プログラミング剤の活性を調べる任意のタイプのアッセイによって決定することができる。例えば、細胞プログラミング剤が非神経細胞におけるPTBの発現を抑制するように構成されている場合、十分な量の細胞プログラミング剤は、薬剤の投与後、例えばウエスタンブロットによって、例示的な非神経細胞におけるPTBの発現レベルを評価することによって決定することができる。いくつかの実施形態では、機能アッセイは、例示的な非神経細胞への細胞プログラミング剤の送達後のPTBの活性を評価するために利用される。いくつかの実施形態では、ニューロンマーカーの免疫染色、ニューロンの機能特性の電氣的記録等、下流のニューロンの特性を調べる他の機能アッセイを使用して、十分な量の細胞プログラミング剤を決定する。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、ウイルスベクターの形態で送達される。ウイルスベクターは、細胞プログラミング剤、例えば、shRNA、マイクロRNA、ドミナントネガティブ変異体、または抗体、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、または100コピーをコードする発現配列の1つまたは複数のコピーを含むことができる。当業者が決定できるように、ウイルスベクターは、投与のために任意の適切な量にいくくり回すことができる。例えば、PCR、RT-PCR、または他の方法によって決定される力価は、少なくとも約 $10^5$ ウイルス粒子/mL、少なくとも約 $10^6$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^7$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^8$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^9$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^{10}$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^{11}$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^{12}$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^{13}$ 粒子/mL、少なくとも約 $10^{14}$ 粒子/mL、または少なくとも約 $10^{15}$ 粒子/mLであり得る。いくつかの実施形態では、投与されるウイルスベクターの力価は、少なくとも約 $10^{10}$ ウイルス粒子/mLである。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤はアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当業者が理解するように、任意の有効量で送達することができる。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも約0.05  $\mu$ g、少なくとも約0.075  $\mu$ g、少なくとも約0.1  $\mu$ g、少なくとも約0.125  $\mu$ g、少なくとも約0.15  $\mu$ g、少なくとも約0.175  $\mu$ g、少なくとも約0.2  $\mu$ g、少なくとも約0.225  $\mu$ g、少なくとも約0.25  $\mu$ g、少なくとも約0.275  $\mu$ g、少なくとも約0.3  $\mu$ g、少なくとも約0.325  $\mu$ g、少なくとも約0.35  $\mu$ g、少なくとも約0.375  $\mu$ g、少なくとも約0.4  $\mu$ g、少なくとも約0.425  $\mu$ g、少なくとも約0.045  $\mu$ g、少なくとも約0.475  $\mu$ g、少なくとも約0.5  $\mu$ g、少なくとも約0.6  $\mu$ g、少なくとも約0.7  $\mu$ g、少なくとも約0.8  $\mu$ g、少なくとも約0.9  $\mu$ g、少なくとも約1.0  $\mu$ g、少なくとも約1.2  $\mu$ g、少なくとも約1.25  $\mu$ g、少なくとも約1.3  $\mu$ g、少なくとも約1.4  $\mu$ g、少なくとも約1.5  $\mu$ g、少なくとも約1.6  $\mu$ g、少なくとも約1.7  $\mu$ g、少なくとも約1.8  $\mu$ g、少なくとも約1.9  $\mu$ g、少なくとも約2.0  $\mu$ g、少なくとも約2.1  $\mu$ g、少なくとも約2.2  $\mu$ g、少なくとも約2.3  $\mu$ g、少なくとも約2.4  $\mu$ g、少なくとも約2.5  $\mu$ g、少なくとも約2.75  $\mu$ g、少なくとも約3  $\mu$ g、少なくとも約4  $\mu$ g、少なくとも約5  $\mu$ g、少なくとも約6  $\mu$ g、少なくとも約7  $\mu$ g、少なくとも約8  $\mu$ g、少なくとも約9  $\mu$ g、または少なくとも約10  $\mu$ g投与される。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約0.05  $\mu$ g、約0.075  $\mu$ g、約0.1  $\mu$ g、約0.125  $\mu$ g、約0.15  $\mu$ g、約0.175  $\mu$ g、約0.2  $\mu$ g、約0.225  $\mu$ g、約0.25  $\mu$ g、約0.275  $\mu$ g、約0.3  $\mu$ g、約0.325  $\mu$ g、約0.35  $\mu$ g、約0.375  $\mu$ g、約0.4  $\mu$ g、約0.425  $\mu$ g、約0.045  $\mu$ g、約0.475  $\mu$ g、約0.5  $\mu$ g、約0.6  $\mu$ g、約0.7  $\mu$ g、

10

20

30

40

50

約0.8  $\mu\text{g}$ 、約0.9  $\mu\text{g}$ 、約1.0  $\mu\text{g}$ 、約1.2  $\mu\text{g}$ 、約1.25  $\mu\text{g}$ 、約1.3  $\mu\text{g}$ 、約1.4  $\mu\text{g}$ 、約1.5  $\mu\text{g}$ 、約1.6  $\mu\text{g}$ 、約1.7  $\mu\text{g}$ 、約1.8  $\mu\text{g}$ 、約1.9  $\mu\text{g}$ 、約2.0  $\mu\text{g}$ 、約2.1  $\mu\text{g}$ 、約2.2  $\mu\text{g}$ 、約2.3  $\mu\text{g}$ 、約2.4  $\mu\text{g}$ 、約2.5  $\mu\text{g}$ 、約2.75  $\mu\text{g}$ 、約3  $\mu\text{g}$ 、約4  $\mu\text{g}$ 、約5  $\mu\text{g}$ 、約6  $\mu\text{g}$ 、約7  $\mu\text{g}$ 、約8  $\mu\text{g}$ 、約9  $\mu\text{g}$ 、または約10  $\mu\text{g}$ 投与される。いくつかの場合では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、*in vitro*で約0.075～約0.325  $\mu\text{g}$ 、約0.1～約0.3  $\mu\text{g}$ 、または約0.125～約0.25  $\mu\text{g}$ 投与される。いくつかの場合では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、*in vivo*で約1～約10  $\mu\text{g}$ 、約1～約5  $\mu\text{g}$ 、約1～約3  $\mu\text{g}$ 、約1.5～約2.5  $\mu\text{g}$ 、または約1.75～約2.25  $\mu\text{g}$ 投与される。

#### 【0170】

本明細書で提供される方法は、非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングするのに十分な一定期間、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制することを含み得る。いくつかの実施形態では、例示的な方法は、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、少なくとも10日、少なくとも11日、少なくとも12日、少なくとも13日、少なくとも14日、少なくとも15日、少なくとも3週間、少なくとも4週間、少なくとも5週間、少なくとも2か月間、少なくとも3か月間、少なくとも4か月間、または少なくとも5ヶ月間抑制する細胞プログラミング剤を含む非神経細胞と接触することを含み、それによって非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングする。いくつかの実施形態では、例示的な方法は、非神経細胞を、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日、約11日、約12日、約13日、約14日、約15日、約3週間、約4週間、約5週間、約2ヶ月間、約3ヶ月間、約4ヶ月間、または約5ヶ月間抑制する細胞プログラミング剤と接触させ、それによって非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。いくつかの実施形態では、例示的な方法は、非神経細胞を、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を最大2日、最大3日、最大4日、最大5日、最大6日、最大7日、最大8日、最大9日、最大10日、最大11日、最大12日、最大13日、最大14日、最大15日、最大3週間、最大4週間、最大5週間、最大2か月間、最大3か月間、最大4か月間、または最大5ヶ月間抑制する細胞プログラミング剤と接触させ、それによって非神経細胞から成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。いくつかの構成では、ここで提供される方法は、細胞プログラミング剤を1回だけ投与することを含み、例えば、細胞プログラミング剤の非神経細胞を含む細胞培養物に加えるか、または細胞プログラミング剤の非神経細胞を含む脳領域に1回だけ送達し、細胞プログラミング剤は、抑制する発現または非神経細胞におけるPTBの活性として所望の時間、例えば、少なくとも1日間、少なくとも2日、少なくとも4日、または最後に10日、活性を維持することができる。例えば、細胞プログラミング剤が抗PTBshRNAを発現するAAVベクターを含む場合、AAVベクターの設計により、長期間転写活性を維持することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、細胞プログラミング剤を2回以上、例えば、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回、少なくとも8回、少なくとも9回、少なくとも10回、少なくとも12回、少なくとも15回、少なくとも20回または20回以上投与することを含む。

#### 【0171】

本明細書で提供されるように、方法は、適切な培養条件下で、*in vitro*で非神経細胞をニューロンに再プログラミングすることを含み得る。当業者は、ニューロンの成長を促進するために適切な細胞培養条件を選択できることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、非神経細胞、再プログラミングを受けている細胞、及び再プログラミングされたニューロンの生存を維持するために、様々な因子を培地に提供することができる。細胞増殖をサポートすることができる任意の既知の培地を使用し、望ましい結果のために最適化することができる。培地には、HEM、DMEM、RPMI、F-12等が含まれる。培地は、グルタミンまたは他のアミノ酸、ビタミン、ミネラル、またはトランスフェリン等の有用なタンパク質等の細胞代謝に重要である可能性があるサプリメントを含むことができる。培地はま

た、酵母、細菌、及びペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン等の真菌による汚染を防ぐための抗生物質を含むことができる。いくつかの場合では、培地は、ウシ、ウマ、ニワトリ等に由来する血清を含むことができる。出発細胞としての星状細胞のための例示的な培地は、DMEM/F12、FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、B27、上皮成長因子(EGF)、及び線維芽細胞成長因子2(FGF2)を含み得る。いくつかの場合では、ニューロン分化培地は、再プログラミング及び/または再プログラミングされたニューロンの維持中に使用される。いくつかの場合では、ニューロン分化培地は、SB431542、A-77-01、ALK5阻害剤II、RepSox、SB525334、GW788388、SD-208、LY215729、またはLY364947等のALK5の阻害剤(TGF $\beta$ 1型受容体キナーゼ)を含む。いくつかの場合では、ニューロン分化培地は、CHIR99021、IM-12、TWS119、BIO、3F8、AR-A014418、AT9283、または2-チオ(3-ヨードベンジル)-5-(1-ピリジル)-[1,3,4]-オキサジアゾール等のGSK3 $\beta$ (グリコーゲンシターゼキナーゼ3 $\beta$ )の阻害剤を含む。いくつかの場合では、ニューロン分化培地は、ジブチリル-cAMP(サイクリックアデノシン-リン酸)、8-プロモ-cAMP、8-CPT-cAMP、タキソール、ベリノスタット、またはSp-cAMP等のPKA(プロテインキナーゼA)の活性化因子を含む。例示的なニューロン分化培地には、N3/基礎培地が含まれる。これは、B27、FBS、ChIR99021、SB431542、及びDb-cAMPが添加されたDMEM/F12、ニューロベサル、インスリン、トランスファー、レナイトナトリウム、プロゲステロン、ブトレシン、及び/またはBDNF、GDNF、NT3及びCNTF等の神経栄養因子を含む。

10

## 【0172】

本開示のいくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法は、複数の非神経細胞を高効率で成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。

20

## 【0173】

いくつかの実施形態では、方法は、マウス星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含み、マウス星状細胞の少なくとも60%が、Tuj1陽性である成熟ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、マウス星状細胞の少なくとも40%は、Map2陽性である成熟ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、マウス星状細胞の少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約42%、少なくとも約44%、少なくとも約46%、少なくとも約48%、少なくとも約50%、少なくとも約52%、少なくとも約54%、少なくとも約56%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約62%、少なくとも約64%、少なくとも約66%、少なくとも約68%、少なくとも約70%、少なくとも約72%、少なくとも約74%、少なくとも約76%、少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%が、Tuj1またはMap2に陽性の成熟ニューロンに変換される。

30

## 【0174】

いくつかの実施形態では、方法は、ヒト星状細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含み、ヒト星状細胞の少なくとも40%、少なくとも60%、または少なくとも80%が、Tuj1陽性である成熟ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、ヒト星状細胞の少なくとも20%、少なくとも40%、または少なくとも60%が、Map2陽性である成熟ニューロンに変換される。いくつかの実施形態では、ヒト星状細胞の少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約42%、少なくとも約44%、少なくとも約46%、少なくとも約48%、少なくとも約50%、少なくとも約52%、少なくとも約54%、少なくとも約56%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約62%、少なくとも約64%、少なくとも約66%、少なくとも約68%、少なくとも約70%、少なくとも約72%、少なくとも約74%、少なくとも約76%、少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%が、Tuj1またはMap2に陽性の成熟ニューロンに変換される。

40

50

## 【0175】

いくつかの実施形態では、ここに提供される方法は、複数の非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞を再プログラミングすることを含み、非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞の少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約42%、少なくとも約44%、少なくとも約46%、少なくとも約48%、少なくとも約50%、少なくとも約52%、少なくとも約54%、少なくとも約56%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約62%、少なくとも約64%、少なくとも約66%、少なくとも約68%、少なくとも約70%、少なくとも約72%、少なくとも約74%、少なくとも約76%、少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%が成熟ニューロンに再プログラミングされる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞の約20%、約25%、約30%、約35%、約38%、約40%、約42%、約44%、約46%、約48%、約50%、約52%、約54%、約56%、約58%、約60%、約62%、約64%、約66%、約68%、約70%、約72%、約74%、約76%、約78%、約80%、約82%、約84%、約86%、約88%、約90%、約92%、約94%、約96%、約98%、約99%、または約100%を成熟ニューロンに再プログラムする。

10

## 【0176】

いくつかの実施形態では、成熟ニューロンは、NeuN（神経核抗原）、Map2（微小管関連タンパク質2）、NSE（ニューロン特異的エノラーゼ）、160 kDaニューロフィラメント培地、200kDaニューロフィラメントヘビー、PDS-95（シナプス後肥厚タンパク質95）、シナプシンI、シナプトフィジン、GAD67（グルタミン酸デカルボキシラーゼ67）、GAD65（グルタミン酸デカルボキシラーゼ65）、パルプアルブミン、DARPP32（ドーパミン及びcAMPによって調節される神経細胞リンタンパク質32）、vGLUT1（小胞性グルタミン酸トランスポーター1）、vGLUT2（小胞性グルタミン酸トランスポーター2）、アセチルコリン、小胞性GABAトランスポーター（VGAT）、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）、及びTH（チロシンヒドロキシラーゼ）からなる群から選択された1つまたは複数のニューロンマーカーの発現によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞の少なくとも40%が、成熟ニューロンに再プログラムされる。

20

30

## 【0177】

当業者が容易に理解するであろうように、上記のすべてのこれらのマーカーの発現は、任意の一般的な技術によって評価することができる。例えば、本明細書に記載の特定の細胞型マーカーに対する抗体を使用する免疫染色は、目的の細胞が対応する細胞型マーカーを発現するかどうかを明らかにすることができる。特定の条件下での免疫染色は、細胞型マーカーの細胞内分布を明らかにすることもできる。これは、目的の細胞の発生段階を決定するためにも重要である。例えば、Map2の発現は、有糸分裂後の成熟ニューロンの様々な神経突起（樹状突起等）に見られるが、ニューロンの軸索には見られない。電位依存性ナトリウムチャンネル（例えば、サブユニットNav1.1-1.9及びサブユニット）の発現は別の例であり、活動電位を開始できる軸索の初期セグメントの成熟ニューロンとラングィエ絞輪にクラスター化することができる。いくつかの実施形態では、フローサイトメトリー、質量分析、in situハイブリダイゼーション、RT-PCR、及びマイクロアレイ等であるがこれらに限定されない他の技術もまた、本明細書に記載される特定の細胞型マーカーの発現を評価するために使用され得る。

40

## 【0178】

本開示の特定の側面は、複数の非神経細胞を再プログラミングすることを含む方法を提供し、非神経細胞の少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約42%、少なくとも約44%

50

、少なくとも約46%、少なくとも約48%、少なくとも約50%、少なくとも約52%、少なくとも約54%、少なくとも約56%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約62%、少なくとも約64%、少なくとも約66%、少なくとも約68%、少なくとも約70%、少なくとも約72%、少なくとも約74%、少なくとも約76%、少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞は、機能性ニューロンに再プログラミングされる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞の少なくとも20%を再プログラムして、機能性ニューロンに再プログラムする。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、非神経細胞、例えば、ヒト非神経細胞、例えば、ヒトグリア細胞、または星状細胞の約20%、約25%、約30%、約35%、約38%、約40%、約42%、約44%、約46%、約48%、約50%、約52%、約54%、約56%、約58%、約60%、約62%、約64%、約66%、約68%、約70%、約72%、約74%、約76%、約78%、約80%、約82%、約84%、約86%、約88%、約90%、約92%、約94%、約96%、約98%、約99%、または約100%を再プログラムして、機能性ニューロンに再プログラムする。

10

#### 【0179】

いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、ニューロンネットワークを形成する能力、ニューロン信号を送受信する能力、またはその両方の能力を特徴とする。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは活動電位を発火させる。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、他のニューロンとのシナプス接続を確立する。例えば、機能性ニューロンは、シナプス内のシナプス後ニューロンであり得、例えば、その樹状突起末端、例えば、樹状突起棘を有し、別のニューロンとのシナプスにおいてシナプス後区画を形成する。例えば、機能性ニューロンは、シナプス内のシナプス前ニューロンであり得、例えば、別のニューロンとのシナプスにおいてシナプス前終末を形成する軸索終末を有する。機能性ニューロンが別のニューロンと形成できるシナプスには、軸索、軸索樹状突起、及び軸索細胞体が含まれるが、これらに限定されない。機能性ニューロンが別のニューロンと形成することができるシナプスは、興奮性（例えば、グルタミン酸作動性）、抑制性（例えば、GABA作動性）、調節性、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンが別のニューロンと形成するシナプスは、グルタミン酸作動性、GABA作動性、コリン作動性、アドレナリン作動性、ドーパミン作動性、または任意の他の適切なタイプである。シナプス前ニューロンとして、機能性ニューロンは、グルタメート、GABA、アセチルコリン、アスパラギン酸、D-セリン、グリシン、一酸化窒素（NO）、一酸化炭素（CO）、硫化水素（H<sub>2</sub>S）、ドーパミン、ノルエピネフリン（ノルアドレナリンとしても知られている）、エピネフリン（アドレナリン）、ヒスタミン、セロトニン、フェネチルアミン、N-メチルフェネチルアミン、チラミン、3-ヨードチロニン、オクトパミン、トリプタミン、ソマトスタチン、サブスタンスP、オピオイドペプチド、アデノシン三リン酸（ATP）、アデノシン、及びアナンダミド等の神経伝達物質を放出することができるが、これらに限定されない。シナプス後ニューロンとして、機能性ニューロンは、シナプス前ニューロンによってシナプス間隙に放出される神経伝達物質に対するシナプス後応答を誘発することができる。本明細書で提供される方法で生成されるシナプス後応答は、機能性ニューロンが発現する神経伝達物質受容体のタイプに応じて、興奮性、抑制性、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、イオン性神経伝達物質受容体、例えば、イオン性グルタミン酸受容体及びイオン性GABA受容体が発現する。イオン性グルタミン酸受容体には、 $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸（AMPA）型グルタミン酸受容体（例えば、GluA1/GRIA1; GluA2/GRIA2; GluA3/GRIA3; GluA4/GRIA4）、デルタ受容体（例えば、GluD1/GRID1; GluD2/GRID2）、カイニン酸受容体（例えば、GluK1/GRIK1; GluK2/GRIK2; GluK3/GRIK3; GluK4/GRIK4; GluK5/GRIK5）、及びN-メチル-D-アスパラギン酸（NM

20

30

40

50

DA) 受容体 (例えば、GluN1/GRIN1; GluN2A/GRIN2A; GluN2B/GRIN2B; GluN2C/GRIN2C; GluN2D/GRIN2D; GluN3A/GRIN3A; GluN3B/GRIN3B) ) が含まれるが、これらに限定されまない。イオン性GABA受容体には、GABA<sub>A</sub>受容体が含まれ得るが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、代謝型神経伝達物質受容体、例えば、代謝型グルタミン酸受容体 (例えば、mGluR<sub>1</sub>、mGluR<sub>5</sub>、mGluR<sub>2</sub>、mGluR<sub>3</sub>、mGluR<sub>4</sub>、mGluR<sub>6</sub>、mGluR<sub>7</sub>、mGluR<sub>8</sub>)、及び代謝性GABA受容体 (例えば、GABA受容体) を発現する。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、D1様ファミリードーパミン受容体 (例えば、D1及びD5受容体 (D1R及びD5R)) またはD2様ファミリードーパミン受容体 (例えば、D2、D3、及びD4受容体 (D2R、D3R、及びD4R)) のいずれかのタイプのドーパミン受容体を発現する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される機能性ニューロンは、別のニューロン (例えば、ギャップ結合) と電気シナプスを形成する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される機能性ニューロンは、オートプスとして知られるように、それ自体と化学的または電氣的シナプスのいずれかを形成する。

10

#### 【0180】

機能性ニューロンの特徴は、当業者が利用できる一般的な技術によって評価することができる。例えば、活動電位の発火や神経伝達物質放出に対するシナプス後反応等の機能性ニューロンの電氣的特性は、パッチクランプ記録 (例えば、電流クランプと電圧クランプの記録)、細胞内記録、細胞外記録 (例えば、四極管記録、単線記録、及びファイルされた潜在的な記録) 等の手法で調べることができる。機能性ニューロン (例えば、イオンチャンネルの発現と静止膜電位) の具体的な特性は、パッチクランプ記録によって調べられることもできる。パッチクランプ記録の様々なバリエーションを、セルアタッチパッチ、インサイドアウトパッチ、アウトサイドアウトパッチ、全セル記録、穴あきパッチ、ルーズパッチ等の様々な目的に適用できる。電氣的方法によるシナプス後応答の評価は、シナプス前ニューロンの電氣刺激、神経伝達物質または受容体アゴニストまたはアンタゴニストの適用のいずれかと組み合わせることができる。いくつかの場合では、AMPA型グルタミン酸受容体を介したシナプス後電流は、AMPA受容体アゴニスト (AMPA等) またはアンタゴニスト (2,3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾキノキサリン (NBQX) または6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン (CNQX)) 等によって評価できる。いくつかの場合では、NMDA型グルタミン酸受容体を介したシナプス後電流は、NMDA受容体アゴニスト、例えば、NMDA及びグリシン、またはアンタゴニスト、例えば、AP5及びケタミンによって評価できる。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、電氣的アプローチ以外の技術によって検査される。例えば、様々な蛍光色素または遺伝的にコード化された蛍光タンパク質の最近の開発及びイメージング技術は、機能性ニューロンによって伝達または伝達される電氣信号を監視するために利用することができる。この文脈では、カルシウム依存性蛍光色素 (例えば、カルシウム指示薬)、例えば、これらに限定されないが、フラ-2、インド-1、フルオロ-3、フルオ-4、及びカルシウムグリーン-1及びカメレオン、FIP-CBSM、ペリカム、GCaMP、TN-L15、TN-humTnC、TN-XL、TN-XXL、Twitch等のカルシウム依存性蛍光タンパク質は、神経細胞膜電位の指標としてカルシウムの流入と流出を追跡するために使用できる。代替的または追加的に、電圧変化に応答してそれらのスペクトル特性を変化させることができる電位感受性色素もまた、ニューロン活動を監視するために使用され得る。

20

30

40

#### 【0181】

神経伝達物質の放出は、機能性ニューロンの重要な側面になる可能性がある。本明細書で提供される方法は、非神経細胞を、特定のタイプの神経伝達物質を放出する機能性ニューロンに再プログラムすることを含むことができる。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、グルタメート、GABA、アセチルコリン、アスパラギン酸、D-セリン、グリシン、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO)、硫化水素 (H<sub>2</sub>S)、ドーパミン、ノルエピネフリン (ノルアドレナリンとしても知られている)、エピネフリン (アドレナリン)、ヒスタミン、セロトニン、フェネチルアミン、N-メチルフェネチルアミン、チラミン、3-ヨードチロナミン、オクトパミン、トリプタミン、ソマトスタチン、サブスタンスP、オピ

50

オイドペプチド、アデノシン三リン酸（ATP）、アデノシン、及びアナンダミド等の神経伝達物質を放出するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、主要な神経伝達物質としてドーパミンを放出する。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、2つ以上のタイプの神経伝達物質を放出する。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、活動電位に応答して神経伝達物質を放出する。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、段階的電位（例えば、活動電位を誘発するための閾値を超えない膜電位変化）に反応して神経伝達物質を放出する。いくつかの実施形態では、機能性ニューロンは、基礎レベルで神経伝達物質放出を示す（例えば、自発的な神経伝達物質放出）。機能性ニューロンからの本明細書に記載の神経伝達物質放出は、当業者に利用可能な様々な技術によって評価することができる。いくつかの実施形態では、イメージングアプローチは、機能性ニューロンの神経伝達物質の放出を特徴づけるために使用できる。例えば、小胞タンパク質を含む遺伝的にコード化された蛍光融合分子を画像化することにより、シナプス小胞がシナプス前膜に融合されるプロセスを監視することができる。代替的または追加的に、特定の神経伝達物質のレベルを直接監視するために他の方法を適用することができる。例えば、HPLCプローブを使用して、機能性ニューロンが軸索を投射する培養皿または脳領域内のドーパミンの量を測定できる。HPLCで検出されたドーパミンのレベルは、機能性ニューロンのシナプス前活動を示している可能性がある。いくつかの実施形態では、そのような評価は、その膜電位を変化させるために、例えば、活動電位を誘発させるために、機能性ニューロンの刺激と組み合わせることができる。

10

20

**【0182】**

一態様では、本開示は、*in vivo*で機能性ニューロンを生成する方法を提供する。例示的な方法は、被験者の神経系の領域、例えば、脳または脊髄に、神経系の領域、例えば、脳または脊髄中の非神経細胞中の細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にすることを含む。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、PTBの発現または活性を抑制する。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、NeuroD1タンパク質、またはNeuroD1をコードする発現構築物を含まない。

**【0183】**

本開示のいくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法は、被験者の神経系、例えば、脳または脊髄の領域への細胞プログラミング剤の直接投与を含む。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、神経系の領域に局所的に送達される。一実施形態では、ウイルスベクター、アンチセンスオリゴヌクレオチド、小分子阻害剤、または発現カセット等であるがこれらに限定されない細胞プログラミング剤を含む組成物は、脳領域への定位的または対流増強送達によって被験者または生物に投与される。定位位置決めシステムを使用して、当業者は、細胞プログラミング剤を含む組成物と共に投与される特定の脳領域を特定することができるであろう。そのような方法及び装置は、本明細書で提供される組成物を被験者または生物に送達するために容易に使用することができる。別の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、被験者または神経系の領域、例えば、脳脊髄液または脳室に送達される、被験者の脳または脊髄に全身的に送達され、該組成物は、神経系の特定の地域または被験者の神経系の細胞の特定のタイプに細胞プログラミング剤を再配置するように構成される1つ以上の薬剤を含む。

30

40

**【0184】**

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるメソッドで使用される細胞プログラミング剤は、抗PTB shRNA、抗PTBマイクロRNA、ドミナントネガティブPTB変異体、またはポリピリミジントラクトを含むスポンジポリリボヌクレオチドを発現するウイルスを含み、該方法は、所望の脳領域へのウイルスの定位注射を含む。いくつかの実施形態では、該ウイルスには、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、またはマウスマロニーベースのウイルスが含まれる。本明細書で提供される方法で使用できるAAVは、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、及びAAV8等であるが、これらに限定されない、任意の適切な血清型のAAVであり得る。いくつかの

50

実施形態では、方法は、神経系、例えば、脳または脊髄の領域における非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する薬剤を発現するAAV2ベースのウイルスベクターを送達することを含む。いくつかの実施形態では、細胞プログラミング剤は、PTBの小分子阻害剤を含む。

【0185】

いくつかの実施形態では、上記のように、本明細書で提供される方法は、様々な非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラミングすることを含む。いくつかの実施形態では、ここで提供される方法は、被験者の神経系の領域、例えば、脳または脊髄に、グリア細胞、例えば、星状細胞、希突起膠細胞、NG2細胞、衛星細胞、または神経系の上皮細胞等であるがこれらに限定されない様々な非神経細胞のPTBの発現または抑制する活性を含む細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にすることを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、被験者の神経系、例えば脳または脊髄の領域内の星状細胞を機能性ニューロンに再プログラミングすることを含む。

10

【0186】

上記のように、本明細書で提供される方法は、特定の脳領域の非神経細胞を機能性ニューロンに再プログラミングすることを含むことができる。本明細書で提供される方法で使用することができる例示的な脳領域は、後脳、中脳、または前脳のいずれかにあり得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、被験者の中脳、線条体、または皮質に、中脳の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にすることを含む。いくつかの実施形態では、ここで提供される方法は、被験者の中脳に、中脳の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にすることを含む。

20

【0187】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、これらに限定されないが、延髄、延髄錐体、オリブ体、下オリブ核、吻側腹外側髄質、尾側腹外側髄質、孤立核、呼吸中枢-呼吸群、背側呼吸群、腹側呼吸群または呼吸中枢、プレベチンガー複合体、ボチンガー複合体、後台形核、疑核、疑核、傍正中網様核、巨大細胞網様核、傍顔面帯、クネエート核、グラシル核、視床下部周囲核、挿入核、前置核、舌下核、最後野、延髄脳神経核、下唾液核、疑核、迷走神経の背側核、低光沢核、中脳、橋、橋核、橋頭蓋神経核、三叉神経感覚核の主核または橋核、三叉神経の運動核(v)、外転神経核(vi)、顔面神経核(vii)、前庭神経核(前庭神経核及び蝸牛神経核)(viii)、上唾液核、橋核、橋排尿中枢(パリントン核)、青斑核、脚橋被蓋核、後背側被蓋核、腹側被蓋網様核、傍小脳脚領域、内側傍小脳脚核、外側傍小脳脚核、傍小脳脚核(kolliker-fuse核)、橋呼吸器群、上オリブ核、内側上オリブ、外側上オリブ、台形体の内側核、傍正中橋網様核、小細胞網様核、尾側橋網様核、小脳脚、上小脳脚、中小脳脚、下小脳脚、第四脳室、小脳、小脳虫部、小脳半球、前葉、後葉、片葉小節葉、小脳核、固定核、介在核、球状核、柱状核、歯状核、中脳(中脳)、蓋、四丘体、下丘、上丘、視蓋前域、被蓋、中脳水道周囲灰白質、内側縦筋束の吻側間質核、中脳網状形成、背側裂孔核、赤核、腹側被蓋野、傍小脳脚色素核、傍黒質核、吻側被蓋核、尾側線形核、縫線の吻側線形核、束間核、黒質緻密部、網様部、脚間核、大脳脚、大脳脚、中脳脳神経核、動眼神経核(iii)、エディンガー・ウェストファル核、滑車神経核(iv)、中脳水道(中脳水道、シルビウス水道)、前脳(前脳)、間脳、視床上部、松果体、手綱核、髄線条、視床ヒモ、第三脳室、交連下器官、視床、前核群、前腹核(別名腹前前核)、前背核、前内側核、内側核群、内側背内側核、正中核グループ、傍テニアル核、結合核、菱形核、層内核グループ、セントロメディアン核、傍束核、傍中心核、中央外側核、外側核群、外側背側核、外側後核、肺、腹側核群、腹側前核、腹側外側核、腹側後核、腹側後外側核、腹側後内側核、視床後部、内側膝状体、外側膝状体、視床網様核、視床下部(大脳辺縁系)(hpa軸)、前部、内側領

30

40

50

域、視索前野の一部、内側視索前野、視交叉上核、室傍核、視索上核（主に）、前視索前野、外側領域、視索前野の一部、外側視索前野、外側視索前野の前部、視索前野の一部、視索前野の他の核、正中視索前核、脳室周囲視索前野、結節、内側領域、背内側視床下部核、腹内側核、弓状核、外側領域、外側核の結節部分、外側結節核、後部、内側領域、乳頭核、後核、外側領域、外側核の後部、視交叉、脳弓下器官、脳室周囲核、下垂体茎、灰白隆起、結核核、隆起乳頭核、結核領域、乳頭体、乳頭核、腹側視床、視床下核、不確帯、下垂体、神経下垂体後葉、中葉（中葉）、下垂体前葉、前頭葉、頭頂葉、後頭葉、側頭葉、小脳、脳幹、半卵円中心、放射冠、内包、外包、最外包、皮質下、海馬、齒状回、アンモニス角膜（CAフィールド）、アンモニス角膜領域1（CA1）、アンモニス角膜領域2（CA2）、アンモニス角膜領域3（CA3）、アンモニス角膜領域4（CA4）、扁桃核、扁桃核の中心核、扁桃核の内側核、扁桃核の皮質及び基底外側核、扁桃核の外側及び基底外側核、拡張扁桃核、分界条、分界条の床核、クローストラム、大脳基底核、線条体、背側線条体、被殻、尾状核、腹側線条体、臀部核、嗅結節、パリダス球、腹側淡蒼球、視床下核、前脳基部、前有孔質、無名質、基底核、プローカ対角帯、中隔核、内側中隔核、終板、終末層の血管器官、嗅脳（古淡蒼球）、嗅球、嗅索、前嗅核、梨状皮質、前交連、海馬鉤、ミグダロイド周囲皮質、大脳皮質、前頭葉、皮質、一次運動野（中心前回、M1）、補助運動野、運動前野、前頭前野、眼窩前頭皮質、背外側前頭皮質、脳回、上前頭回、中前頭回、下前頭回、プロドマン領域4、6、8、9、10、11、12、24、25、32、33、44、45、46、及び47、頭頂葉、皮質、一次体性感覚野（S1）、二次体性感覚野（S2）、後頭頂葉、脳回、中心後回（一次体性感覚野）、楔前部、プロードマンの脳地図1、2、3、5、7、23、26、29、31、39、及び40、後頭葉、皮質、一次視覚野（V1）、v2、v3、v4、v5/mt、脳回、外側後頭回、楔部、プロードマンの脳地図17（V1、一次視覚野）18、及び19、側頭葉、皮質、一次聴覚野（A1）、二次聴覚野（A2）、下側頭回、後部下側頭回、脳回、上側頭回、中側頭回、下側頭回、嗅内皮質、鼻周囲皮質、海馬傍回、紡錘状回、プロードマンの脳地図20、21、22、27、34、35、36、37、38、41、42、内側上部側頭領域（MST）、島皮質、帯状皮質、前帯状回、後帯状回、脳梁膨大後皮質、灰白層、膝下領域25、プロードマンの脳地図23、24、26、29、30（脳梁膨大後部）；31、及び32等の脳領域において非神経細胞を機能性ニューロンに再プログラミングすることを含む。

10

20

【0188】

一態様では、本開示は、*in vivo*でドーパミン作動性ニューロンを生成する方法を提供する。例示的な方法は、被験者の脳に、脳内の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラミングすることを可能にすることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、ドーパミン作動性ニューロンを生成するために、組成物を被験者の中脳に投与することを含む。いくつかの実施形態では、組成物は実質的な黒質（SN）に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は腹側被蓋野（VTA）に投与される。

30

【0189】

いくつかの実施形態では、ここで提供される方法は、被験者の神経系、例えば脳または脊髄の領域に、その領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞がその領域で優勢であるサブタイプの機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にすることを含む。特定の理論に拘束されることなく、本明細書で提供される方法は、非神経細胞を*in vivo*で機能性ニューロンに再プログラミングするときに、領域、例えば特定の脳領域における局所誘導信号を利用することができる。例えば、ドーパミンニューロンは中脳領域、例えば黒質（SN）、腹側被蓋野（VTA）、または後陰部（RRF）に集まっている。局所ニューロン、非神経細胞、例えば、星状細胞、ミクログリア、またはその両方、または中脳の他の局所成分は、細胞プログラミング剤の誘導下で非神経細胞から生成されるニューロンのサブタイプ仕様に与ることができる。

40

【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、複数の脳領域の非神経細胞に

50

おけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の脳領域に投与することを含み、該方法は、非神経細胞の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約42%、少なくとも約44%、少なくとも約46%、少なくとも約48%、少なくとも約50%、少なくとも約52%、少なくとも約54%、少なくとも約56%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約62%、少なくとも約64%、少なくとも約66%、少なくとも約68%、少なくとも約70%、少なくとも約72%、少なくとも約74%、少なくとも約76%、少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%をドーパミン作動性ニューロンに再プログラミングすることをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、被験者の脳領域に、脳領域の複数の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与することを含み、該方法によって生成される機能性ニューロンの少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約38%、少なくとも約40%、少なくとも約42%、少なくとも約44%、少なくとも約46%、少なくとも約48%、少なくとも約50%、少なくとも約52%、少なくとも約54%、少なくとも約56%、少なくとも約58%、少なくとも約60%、少なくとも約62%、少なくとも約64%、少なくとも約66%、少なくとも約68%、少なくとも約70%、少なくとも約72%、少なくとも約74%、少なくとも約76%、少なくとも約78%、少なくとも約80%、少なくとも約82%、少なくとも約84%、少なくとも約86%、少なくとも約88%、少なくとも約90%、少なくとも約92%、少なくとも約94%、少なくとも約96%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%はドーパミン作動性である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法で生成されたドーパミン作動性ニューロンは、ドーパミン、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ドーパミン輸送体 (DAT)、小胞モノアミン輸送体2 (VMAT2)、エンゲイルド (engrailed) ホメオボックス1 (En1)、核内受容体関連-1 (Nurr1)、Gタンパク質調節内向き整流カリウムチャンネル2 (Girk2)、フォークヘッドボックスA2 (FoxA2)、オルソデンティクルホメオボックス2 (OTX2) 及び/または LIMホメオボックス転写因子1アルファ (Lmx1a) を含むがこれらに限定されない、ドーパミン作動性ニューロンの1つまたは複数のマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法で生成されたドーパミンニューロンは、過分極活性化サイクリックヌクレオチド依存性 (HCN) チャンネルによって媒介され得る  $I_h$  電流を示す。 $I_h$  電流は、ゆっくりと活性化する内向き電流として特徴付けることができ、過分極ステップによって活性化することができる。例えば、電圧クランプ下で、保持電位  $V_h$  が -40 mV の場合、ドーパミンニューロンで内向きにゆっくりと活性化する電流がトリガーされ、反転電位は -30 mV に近くなる。本明細書で提供される方法で生成されたドーパミンニューロンに特徴的な  $I_h$  電流の活性化曲線は、-50 ~ -120 mV の範囲であり得、中間活性化点は -84.1 mV である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法で生成されたドーパミン作動性ニューロンは、天然のドーパミン作動性ニューロンと同様の遺伝子発現プロファイルを有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法で生成されたドーパミン作動性ニューロンは、神経伝達物質としてドーパミンを放出する。本明細書で提供される方法で生成されたドーパミン作動性ニューロンCは、A9 (例: Girk2 に対して免疫陽性)、A10 (例えば、カルピンジン-D28k に対して免疫陽性)、A11、A12、A13、A16、Aaq、及び終脳ドーパミンニューロンを含むがこれらに限定されない、ドーパミン作動性ニューロンの任意のサブタイプであり得る。

#### 【0191】

本開示のいくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法は、機能性ニューロンの被験者の神経系、例えば、脳または脊髄の領域における非神経細胞を再プログラミングすることを含む。いくつかの実施形態では、ここで論じられるような機能性ニューロンは、神経系のニューラルネットワークに統合される。本明細書に記載されるように、再プ

10

20

30

40

50

プログラムされた機能性ニューロンは、局所ニューロン、例えば、再プログラムされた機能性ニューロンに隣接するニューロンとシナプス接続を形成することができる。例えば、再プログラムされたニューロンと隣接する一次ニューロン（例えば、グルタミン酸作動性ニューロン）、GABA作動性介在ニューロン、または他の隣接するニューロン（例えば、ドーパミン作動性ニューロン、アドレナリン作動性ニューロン、またはコリン作動性ニューロン）の間のシナプス接続は、再プログラムされたニューロンが *in vivo* で成熟するにつれて形成され得る。局所ニューロンとのこれらのシナプス接続の中で、再プログラムされた機能性ニューロンは、シナプス前ニューロン、シナプス後ニューロン、またはその両方である可能性がある。いくつかの実施形態では、再プログラムされた機能性ニューロンは、軸索投射を遠隔の脳領域に送る。例えば、本明細書のいくつかの実施形態に従って生成される中脳領域のドーパミン作動性ニューロンは、中脳領域からの天然ドーパミン作動性ニューロンの通常の標的である線条体に投射することができる。本明細書のいくつかの実施形態に従って生成される中脳領域のドーパミン作動性ニューロンは、被殻、側坐核、中隔核、嗅結節、またはそれらの任意の組み合わせを尾状核に投射することができる。本明細書のいくつかの実施形態に従って生成される中脳領域のドーパミン作動性ニューロンは、中脳領域の天然のドーパミン作動性ニューロンが投射できる脳領域に投射することができる。いくつかの実施形態では、再プログラムされた機能性ニューロンは、脳または脊髄の1つまたは複数の既存の神経経路に統合できる。例えば、上縦束、弓状束、鉤状束、穿孔経路、視床皮質放射線、脳梁、前交連、アミグダロフガル経路、視床間接着、後交連、手網交連、脳弓、乳頭被蓋束、視床下部経路、大脳脚、内側前脳束、内側縦束、ミオクロニックトライアングル、中皮質経路、中脳辺縁系経路、黒質線条体経路、結核漏斗経路、錐体外路系、錐体路、皮質脊髄路または脳脊髄線維、外側皮質脊髄路、前部皮質脊髄路、皮質橋線維、前頭橋線維、側頭橋線維、皮質延髄路、皮質中脳路、視蓋脊髄路、間質脊髄路、赤核脊髄路、赤核オリブ路、オリブ小脳路、オリブ脊髄路、前庭脊髄路、外側前庭脊髄路、内側前庭脊髄路、網様体脊髄路、外側縫線核脊髄路、後柱-内側毛帯経路、繊細な毛帯、くねくねした毛帯、内側毛帯、脊髄視床路、外側脊髄視床路、前脊髄視床路、脊髄中脳路、脊髄小脳路、脊髄オリブ路、及び脊髄小脳路等であるが、これらに限定されない。特定の理論に拘束されることなく、局所的な細胞環境は、本開示のいくつかの実施形態に従って生成された機能性ニューロンの投射と相関させることができる。例えば、本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態に従って中脳で生成された機能性ニューロンは、中脳の局所環境にある他の細胞、例えば、他のネイティブドーパミン作動性ニューロンの軸索成長のガイダンス信号を放出する細胞、または共通の標的脳領域を投射するネイティブドーパミン作動性ニューロンの影響を受ける可能性がある。

10

20

30

40

50

#### 【0192】

一態様では、本開示は、神経系の領域における機能性ニューロンの変性に関連する神経学的治療の方法を提供する。例示的なものは、それを必要とする被験者の神経系の領域、例えば脳または脊髄に、その領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を投与し、非神経細胞が機能性ニューロンに再プログラムすることを可能にし、それによってその領域に縮退した機能性ニューロンを補充することを含む。

#### 【0193】

本開示のいくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法は、これらに限定されないが、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、統合失調症、鬱病、及び薬物中毒を含む神経学的状態の治療を含む。該当する神経学的状態には、これらに限定されないが、筋萎縮性側索硬化症（ALS）や運動ニューロン疾患等の脊髄のニューロン喪失に関連する障害も含まれる。本明細書で提供される方法はまた、これらに限定されないが、常染色体優性小脳性運動失調、Charlevoix-Saguenayの常染色体劣性痙性運動失調、大脳皮質基底核変性症、大脳皮質基底核症候群、クロイツフェルト・ヤコブ病、脆弱X随伴振戦/運動失調症候群、前頭側頭型認知症、及び染色体17に関連するパーキンソン症候群、Kufor-Rakeb症候群、ライム病、Machado-Joseph病、Niemann-Pick病、橋小脳形成不

全、Refsum病、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損症、サンドホフ病、Shy-Drager症候群、Tay-Sachs病、及びWobblyヘッジホッグ症候群を含む神経変性疾患の1つまたは複数の症状の治療または改善にも使用できる。本明細書で提供されるように、「神経変性」またはその文法上の同等物は、ニューロンの死を含む、ニューロンの構造、機能、または両方の進行性の喪失を指すことができる。神経変性は、あらゆる種類のメカニズムが原因である可能性がある。本明細書で提供される方法が適用可能である神経学的状態は、任意の病因のものであり得る。神経学的状態は、遺伝性または散发性である可能性があり、遺伝子変異、タンパク質のミスフォルディング、酸化ストレス、または環境曝露（例えば、毒素または乱用薬物）が原因である可能性がある。

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、脳領域におけるドーパミン作動性ニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療する。他の実施形態では、本明細書で提供される方法は、これらに限定されないが、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、アドレナリン作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、または神経伝達物質アスパラギン酸を放出する他の適切なタイプのニューロン、D-セリン、グリシン、一酸化窒素（NO）、一酸化炭素（CO）、硫化水素（H<sub>2</sub>S）、ノルエピネフリン（ノルアドレナリンとしても知られている）、ヒスタミン、セロトニン、フェネチルアミン、N-メチルフェネチルアミン、チラミン、3-ヨードチロニン、オクトパミン、トリプタミン、ソマトスタチン、サブスタンスP、オピオイドペプチド、アデノシン三リン酸（ATP）、アデノシン、またはアナンダミド等あらゆるタイプのニューロンの変性に関連する神経学的状態を治療する。本明細書で提供される方法は、中脳領域（例えば、実質的な黒質または腹側被蓋野）、前脳領域、後脳領域、または脊髄等の任意の領域におけるニューロン変性に関連する神経学的状態の治療に使用できる。本明細書で提供される方法は、神経変性に関連する神経学的状態を治療するために、非神経細胞を神経系の任意の適切な領域の機能性ニューロンに再プログラミングすることを含むことができる。

#### 【0195】

本明細書で提供される方法は、パーキンソン病に関連する1つまたは複数の症状を治療または改善するのに使用を見出すことができる。パーキンソン病は、黒質緻密部（SNpc）のドーパミン作動性ニューロンの初期の顕著な機能障害または死を伴う神経変性疾患である。結果として生じる大脳基底核内のドーパミン欠乏は、古典的なパーキンソン症候群の運動症状を特徴とする運動障害につながる可能性がある。パーキンソン病はまた、多くの非運動症状と関連している可能性がある。パーキンソン病の診断の1つの基準は、死後の病理検査でのSNpc変性とレビー小体型認知症の存在である可能性がある。レビー小体型認知症には、レビー小体及びレビー神経突起と呼ばれる $\alpha$ -シヌクレインタンパク質の異常な凝集体が含まれる場合がある。パーキンソン病の患者は、運動症状や非運動症状等、様々な症状を示す可能性がある。本明細書で提供される方法は、パーキンソン病に関連するこれらの運動症状または非運動症状の1つまたは複数进行治疗または改善することができる。パーキンソン病の運動症状（パーキンソン症候群の症状）には、動作緩慢（遅さ）、こわばり、平衡障害、歩行のシャッフル、姿勢の不安定等がある。パーキンソン病患者の運動機能は不均一である可能性があり、これにより疾患のサブタイプを分類する試みが促された。例えば、振戦優性パーキンソン病（他の運動症状が比較的ない）、非振戦優性パーキンソン病（無動無言症候群及び姿勢不安定性歩行障害として説明される表現型を含むことができる）、及び同等の重症度のいくつかの運動症状を伴う混合または不確定な表現型を伴う追加のサブグループ。パーキンソン病の非運動症状には、嗅覚機能障害、認知障害、精神症状（鬱病等）、睡眠障害、自律神経機能障害、痛み、倦怠感等がある。これらの症状は、初期のパーキンソン病によく見られる。非運動機能は、古典的な運動症状の発症前にパーキンソン病に頻繁に存在する可能性がある。この疾患の運動前または前駆期は、嗅覚障害、便秘、鬱病、日中の過度の眠気、及びレム睡眠行動障害を特徴とする可能性がある。

10

20

30

40

50

## 【0196】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、パーキンソン病の進行を軽減または遅らせる。パーキンソン病の進行は、運動機能の悪化を特徴とする可能性がある。病気が進行するにつれて、運動及び非運動の変動、ジスキネジア、精神病等、長期の対症療法に関連する合併症が発生する可能性がある。

## 【0197】

パーキンソン病の病理学的特徴の1つは、実質的な黒質緻密部 (SNpc) 等の実質的な黒質内のドーパミン作動性ニューロンの喪失である可能性がある。いくつかの実施形態によれば、本明細書で提供される方法は、患者の実質的な黒質 (例えば、SNpc) において機能的等パミンニューロンを補充する。パーキンソン病のニューロン喪失は、青斑核、マイネルト基底核、脚橋被蓋核、縫線核、迷走神経の背側運動核、扁桃核、視床下部等、他の多くの脳領域でも発生する可能性がある。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される被験者におけるパーキンソン病の1つまたは複数の症状を治療または改善する方法は、パーキンソン病の患者でニューロン喪失を経験している脳領域の機能的ニューロンに非神経細胞を再プログラミングすることを含む。

10

## 【0198】

本明細書で提供される方法は、様々な病因のパーキンソン病の治療に使用できる。例えば、遺伝子SNCA、LRRK2、VPS35、EIF4G1、DNAJC13、CHCHD2、パーキン、PINK1、DJ-1、ATP13A2、C9ORF72、FBX07、PLA2G6、POLG1、SCA2、SCA3、SYNJ1、RAB39Bの変異、及び22q11.2微小欠失症候群に影響を受ける1つ以上の遺伝子等、1つ以上の遺伝子変異の結果として、パーキンソン病が発生する可能性がある。または、既知の遺伝的特徴のないパーキンソン病が存在する可能性がある。

20

## 【0199】

本明細書で提供されるように、本明細書で提供される方法が改善できるパーキンソン病の1つまたは複数の症状は、上記の運動症状及び非症状だけでなく、他のレベルでの病理学的特徴も含み得る。例えば、パーキンソン病患者の脳におけるドーパミンシグナル伝達の低下は、機能的等パミンニューロンを補充することによって本明細書で提供される方法によって逆転または軽減することができ、これは神経回路に統合され、ドーパミンニューロンの投射を適切な脳領域、例えば線条体に再構築することができる。

30

## 【0200】

一態様では、本開示はまた、正常レベルと比較してドーパミン生合成の量が減少した被験者においてドーパミン放出を回復する方法を提供する。例示的な方法は、被験者の脳領域内の非神経細胞を再プログラミングし、非神経細胞がドーパミン作動性ニューロンに再プログラミングすることを可能にし、それによって減少した量のドーパミンの少なくとも50%を回復することを含む。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、脳領域の非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制する細胞プログラミング剤を含む組成物を被験者の脳領域に投与することによって実行される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、減少した量のドーパミンの少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約98%を回復させる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、減少した量のドーパミンの約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、または約100%を回復させる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、減少した量のドーパミンの少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約98%を回復させる。いくつかの実施形態では、本明細書

40

50

で提供される方法は、減少した量のドーパミンの少なくとも約50%を回復させる。

【0201】

一態様では、本開示は、非神経細胞におけるPTBの発現または活性を抑制することによって、哺乳動物の非神経細胞を成熟ニューロンに再プログラムするのに有効な量の細胞プログラミング剤を含む医薬組成物を提供する。例示的な医薬組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤をさらに含むことができる。上記のように、本明細書で提供されるような細胞プログラミング剤は、小さな化学分子、干渉RNA、ショートヘアピンRNA、マイクロRNA、ドミナントネガティブ変異体、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、タンパク質阻害剤、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ペプチド、または任意の形態の修飾核酸である可能性がある。

10

【0202】

本明細書で提供される医薬組成物は、1つ以上の担体及び賦形剤（緩衝液、炭水化物、マンニトール、タンパク質、ペプチド、またはグリシン、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤、懸濁剤、増粘剤及び/または防腐剤等のアミノ酸を含むが、これらに限定されない。）水、ピーナッツ油等の石油、動物、植物または合成起源のものを含む油、大豆油、鉱油、ごま油等、食塩水、デキストロース及びグリセロール水溶液、香料、着色剤、粘着防止剤及びその他の許容される添加物、または結合剤、pH緩衝剤、張性調整剤、乳化剤、湿潤剤等の生理学的状態を近似するために必要とされる他の薬学的に許容される補助物質を含み得る。賦形剤の例には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が含まれる。別の例では、組成物は実質的に防腐剤を含まない。他の実施形態では、該組成物は少なくとも1つの防腐剤を含む。医薬品剤形に関する一般的な方法論は、Ansel et al, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Md. (1999)) に記載されている。本明細書に記載の医薬組成物を投与するために当業者に知られている任意の適切な担体を使用することができるが、担体のタイプは投与様式に応じて変化し得ることが認識されるであろう。適切な製剤及び追加の担体は、Remington「薬学の科学及び実践」(第20版、Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Md.) に記載されており、その教示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例示的な医薬組成物は、注射、吸入、非経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、皮内投与、局所投与、または経口投与のために処方することができる。当業者が理解するように、医薬組成物は、細胞プログラミング剤のタイプ及び組成物が設計されている投与経路に応じて、任意の適切な担体または賦形剤を含むことができる。例えば、本明細書で提供される細胞プログラミング剤を含む組成物は、非経口投与用に処方することができ、アンプル、プレフィルドシリンジ、少量注入、または防腐剤を添加した複数回投与容器で単位剤形で提示することができる。該組成物は、油性または水性媒体中の懸濁液、溶液、または乳濁液、例えば、ポリエチレングリコール水溶液中の溶液等の形態をとることができる。例えば、注射可能な製剤の場合、媒体は、水溶液または油懸濁液、またはごま油、コーン油、綿実油またはピーナッツ油を含むエマルジョン、ならびにエリキシル剤、マンニトール、デキストロース、または滅菌水溶液、及び同様の医薬用媒体を含む、適切であることが当技術分野で知られているものから選択することができる。該配合物はまた、ポリ(乳酸-コ-グリコール)酸等の生体適合性、生分解性であるポリマー組成物を含み得る。これらの材料は、マイクロスフェアまたはナノスフェアに作成し、薬物をロードし、さらにコーティングまたは誘導体化して、優れた徐放性能を提供することができる。眼周囲または眼内注射に適した媒体には、例えば、注射グレードの水中の活性剤の懸濁液、リボソーム、及び親油性物質及び当技術分野で知られているものに適した媒体が含まれる。本明細書で提供される組成物は、細胞プログラミング剤及び薬学的に許容される担体または賦形剤に加えて、追加の薬剤をさらに含むことができる。例えば、ニューロンの生存目的を促進するために追加の薬剤を提供することができる。代替的または追加的に、薬力学の目的を監視するために追加の薬剤を提供するこ

20

30

40

50

とができる。いくつかの実施形態では、組成物は、浸透促進剤として、または活性成分の持続放出または制御放出のための追加の薬剤、例えば、細胞プログラミング剤を含む。

【0203】

本明細書で提供される組成物は、約0.0005、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL、またはそれ以上の投与量で被験者に投与することができる。該組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の用量経過レジメンとして投与することができる。場合によっては、組成物は、2、3、または4回の用量コースレジメンとして投与することができる。時々、該組成物は、1用量コースレジメンとして投与することができる。

【0204】

2用量コースレジメンの1回目及び2回目の投与は、約0日、1日、2日、5日、7日、14日、21日、30日、2か月、4か月、6か月、9か月、1年、1.5年、2年、3年、4年、5年、10年、20年、またはそれ以上で区切ることができる。本明細書に記載の組成物は、1日1回、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回、1年に1回、1年に2回、1年に3回、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年ごと、またはそれ以上の年ごとに被験者に投与することができる。時々、該組成物は、2、3、4、5、6、7、またはそれ以上の年ごとに被験者に投与され得る。時々、該組成物は被験者に一度投与することができる。

【0205】

本開示のいくつかの実施形態は、細胞または組織移植のための方法及び組成物を提供する。例示的な方法は、非神経細胞を *in vitro* でニューロンに再プログラミングすること、及び再プログラムされたニューロンを被験者の脳領域に移植することを含むことができる。いくつかの実施形態では、*in vitro* での再プログラミングは、本明細書で提供される方法に従って実施することができる。例示的な組成物は、本明細書で提供される方法の任意の実施形態に従って再プログラムされたニューロンを含むことができる。

【0206】

他の実施形態では、本明細書で提供される方法は、非神経細胞を *in vivo* でニューロンに再プログラミングすること、及び再プログラミングされたニューロンを外植することを含む。いくつかの実施形態では、外植片は、再プログラムされたニューロンを含む脳組織を含む。いくつかの実施形態では、外植片は、被験者の脳領域に移植される。本明細書で提供されるように、本明細書で提供される方法に従って再プログラムされたニューロンの移植は、ニューロン喪失に関連する状態に苦しむ被験者において変性ニューロンを補充するために使用され得る。

【0207】

本開示の他のいくつかの態様は、本明細書で提供される方法の任意の実施形態に従って再プログラムされたニューロンを含む動物に関する。本明細書で提供されるように、動物は任意の哺乳動物であり得る。動物は人間になることができる。動物は、アカゲザル、カニクイザル、ベニガオザル、ベニガオザル、リスザル、フクロウサル、ヒヒ、チンパンジー、マーモセット、クモザル等の非ヒト霊長類である可能性があるが、これらに限定されない。動物は、研究動物、遺伝子組み換え動物、またはその他の適切な種類の動物である可能性がある。例えば、本開示の実施形態に従って再プログラムされた1つまたは複数のニューロンを含むマウスまたはラットを提供することができる。本開示の任意の実施形態に従って再プログラムされた1つまたは複数のニューロンを含む動物の脳組織（例えば、外植片）も本明細書で提供される。そのような脳組織は生きている可能性がある。いくつかの実施形態では、脳組織は、任意の適切な固定剤によって固定することができる。脳組織は、移植、医学研究、基礎研究、またはあらゆる種類の目的に使用できる。

【0208】

本開示は、この方法が神経変性の疾患モデルに適用可能であることを示している。例えば、本開示は、星状細胞からニューロンへの変換戦略が、化学物質によって誘発されるパーキンソン病モデルで機能する可能性があることを示している。該方法と組成は、星状細胞をドーパミン作動性、グルタミン酸作動性、GABA作動性ニューロンを含むニューロンに

10

20

30

40

50

変換でき、これらのニューロンは脳内でシナプスを形成することができ、驚くべきことに、変換されたニューロンは損傷した黒質線条体経路を効率的に再構築して、測定可能なパーキンソン病の表現型を修正することができる。該方法の有効性は、培養中の星状細胞（ヒト及びマウス）と、抗PTBASOの単回投与を使用したマウスパーキンソン病モデルの *in vivo* の両方で実証された。それだけでなく、変換されたニューロンはプロセスを線条体に拡張することができる。従って、この戦略はパーキンソン病を治療する可能性があり、パーキンソン病は様々な神経変性疾患（神経機能障害に関連する他の神経疾患等）にも適用できる。いくつかの実施形態では、本開示のアプローチは、PTB抑制によって再プログラムされると成熟ニューロンを漸進的に産生する両方の哺乳動物星状細胞にすでに存在するが潜在的なニューロン成熟プログラムの遺伝的基盤を利用する。これらの発見は、抗PTBASOの単回投与またはsiRNAを含むベクターの送達を使用して、哺乳類の脳の局所星状細胞からニューロンを生成するための臨床的に実行可能なアプローチを提供する。PTBノックダウン誘発ニューロンの表現型は、それらが生成される状況及び/またはそれらが由来する星状細胞の関数である可能性がある。

10

20

30

40

50

#### 【0209】

本開示は、星状細胞のニューロンへの強力な変換を示している（例えば、黒質のドーパミンニューロン、その一部は線条体に投射を送り、黒質線条体ドーパミン経路の再構築の証拠を提供する）。より具体的には、本開示は、化学的に誘発されたマウスパーキンソン病（PD）モデルにおいて、戦略がPD表現型を効率的に修正できることを示し、従って、*in vivo*再プログラミングの5つの要因すべてを満たす。本開示はさらに、PTBに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）がPD表現型を修正するのにも有効であり得ることを示し、PD及びおそらく他の神経変性疾患を治療するための一過性のヒットアンドラン戦略の実現可能性を示唆している。

#### 【0210】

本明細書で提供されるデータは、哺乳動物の脳におけるPTBの減少が星状細胞をニューロン（例えば、新しく変換されたニューロンの黒質内の存在によって判断されるように、黒質線条体経路を再構成することができるドーパミン作動性ニューロン）に変換し、行動障害を逆転させること（例えば、化学的に誘発されたPDモデルにおいて）ができることを示している。

#### 【0211】

本開示の組成物の「治療有効量」は、個体の病状、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する組成物の能力等の要因に応じて変化するであろう。治療上有効な量はまた、組成物の毒性または有害な効果が治療上有益な効果よりも重要である量であり得る。特定の理論に拘束されることを望まずに、ある場合には、本明細書で提供される治療有効量の細胞プログラミング剤は、ニューロン喪失を経験する脳領域の星状細胞の特定の割合を変換する細胞プログラミング剤の量であり得、脳領域におけるそのような割合の星状細胞の機能性ニューロンへの変換は、脳領域におけるニューロン喪失に関連する疾患または状態を改善または治療するのに十分であると考えられる。一方、そのような星状細胞の割合は、例えば、ニューロン変換の直接的な結果として脳領域の星状細胞の数が過度に減少するために、ニューロンの変換によってもたらされる有益な効果を上回る可能性のある嫌悪効果につながる可能性があるしきい値レベルを超えない。

#### 【0212】

以下の例は、開示を説明することを意図しているが、限定するものではない。それらは使用される可能性のあるものの典型であるが、当業者に知られている他の手順を代わりに使用することができる。

#### 【実施例】

#### 【0213】

実施例1．星状細胞におけるmiR-9及びBrn2の発現

#### 【0214】

PTB/nPTBによって調節される遺伝子発現プログラムは、マウスとヒトの初代星状細胞で

試験された。図2C-2Fに示すように、miR-124とmiR-9はどちらもニューロンで高度に発現しているが、線維芽細胞では発現していない。ヒトとマウスの両方の星状細胞で、miR-124が低レベルで存在することがわかった（図2C及び2D）。これは、この非神経細胞型の高いRESTレベルを説明し、星状細胞のタイトなPTB制御ループを示唆している可能性がある。しかし、予期せぬことに、miR-9はマウスとヒトの両方の星状細胞で高度に発現していることが分かった（図2E及び2F）。Brn2はmiR-9と同じ発現パターンに従い、線維芽細胞は少ないが、星状細胞とニューロンの両方が高い（図2A及び2B）。これらの観察結果は、星状細胞とニューロンが共通の前駆細胞を共有している可能性があるという考えと一致している。

#### 【0215】

実施例2. マウス及びヒトの星状細胞におけるPTBのノックダウンは、nPTBの誘導とそれに続くnPTBの低下をもたらした。

#### 【0216】

本開示では、星状細胞がニューロンの成熟に重要である可能性のある因子（例えば、miR-9及びBrn2）をすでに発現していることが認識されており、PTBノックダウン誘導nPTBがmiR-9によって即座に打ち消される可能性について試験した。ヒト線維芽細胞におけるPTB/nPTB発現プロファイルとは対照的に、PTBノックダウンはマウス及びヒト星状細胞におけるnPTB誘導とそれに続くnPTB低下をもたらすことが示された（図3A及び3B）。従って、星状細胞でPTBのみを枯渇させることにより、高レベルのmiR-9は、星状細胞の成熟ニューロンへの安定した再プログラミングを強化することができる。

#### 【0217】

実施例3. PTBをノックダウンすると、in vitroで星状細胞が機能性ニューロンに効率的に変換される。

#### 【0218】

PTBのダウンレギュレーションが星状細胞の成熟ニューロンへの効率的な変換をもたらす可能性を探るために、マウス星状細胞を生後4~5日（P4-5）の子犬の脳皮質から分離し、ヒト胎児星状細胞を商業的供給源（ScienCell）から入手した。両方の供給源からの細胞は、ニューロンまたは神経堤前駆細胞のマーカーがないことによって示されるように、神経細胞の検出可能な汚染なしに、予想される星状細胞マーカーGFAP及びALDH1L1を発現した（図4）。

#### 【0219】

マウス星状細胞は、PTB（shPTB）に対する小さなヘアピンRNAを発現するレンチウイルスベクターに感染した。形質導入の4週間後、小分子のセットを含む標準的なニューロン分化培地で維持されたshPTB処理細胞の約50%は、ニューロンの形態と汎ニューロンマーカーTuj1及びMAP2の陽性染色を示したが、コントロールshRNAで形質導入された細胞は示さなかった（図5A）。shPTB誘導ニューロンは、NeuNやニューロン特異的エノラーゼ（NSE）等の成熟ニューロンのマーカーも発現していた（図5B）。変換されたニューロンのタイプを定義するために、グルタミン酸作動性ニューロン（VGlu1）、GABA作動性ニューロン（GAD67）、ドーパミン作動性ニューロン（チロシンヒドロキシラーゼ、TH）等のマーカーを調べた（図5C）。誘導されたニューロンの大部分はグルタミン酸作動性またはGABA作動性のいずれかであり、少数（1~2%）のTuj-1陽性細胞がドーパミン作動性マーカー（TH）を発現していた（図5C）。RT-qPCRによるSLC6A3やFoxA2、DATやVMAT2等の追加のドーパミン作動性マーカーの発現を免疫染色で調べたところ、それらの誘導は低効率で観察された（図5I-L）。誘導されたニューロンのいずれも、コリンアセチルトランスフェラーゼまたはトリプトファンヒドロキシラーゼを含む、検出可能なコリン作動性またはセロトニン作動性マーカーを発現しなかった。

#### 【0220】

PTBノックダウン変換細胞の機能をテストするために、shPTB発現の5~6週間後にパッチクランプ記録を行った。ほとんどのパッチを当てた細胞は、電位依存性ナトリウム/カリウムチャンネルの電流と反復活動電位発火を示し、これらの変換された細胞の神経活動を

10

20

30

40

50

示している（図5D）。さらに、変換されたニューロンを新たに単離されたGFPマーク付きラット星状細胞と共培養すると、様々な頻度の自発的なシナプス後イベントが検出された（図5D）。2,3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾ[f]キノキサリン-2,3-ジオン（NBQX）、D(-)-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸（APV）（グルタミン酸作動性チャンネル受容体のアンタゴニスト）及びピクロトキシン（PiTX、GABAAチャンネル受容体のアンタゴニスト）が信号を順次ブロックする可能性があるため、これらのニューロン活動はグルタミン酸作動性ニューロンとGABA作動性ニューロンの両方からのシナプス入力への応答を反映している可能性がある（図6A）。コントロールshRNAで形質導入された細胞のパッチクランプ記録では、ニューロンの電気生理学的特性は検出されなかった（図6B）。

#### 【0221】

ヒトの星状細胞は、マウスの星状細胞よりもさらに効率的に再プログラムされているように見えた。shPTBレンチウイルスベクターによる形質導入の4週間後、ほぼ定量的な星状細胞からニューロンへの変換が観察され、Tuj1抗体によって認識されるニューロン特異的-チューブリンによってマークされた細胞の約90%が観察された（図5E）。変換されたニューロンはNeuN及びNSEを発現し（図5F）、マウスの星状細胞と同様に、ヒトの星状細胞は主にグルタミン酸作動性またはGABA作動性ニューロンに変換され、わずかな割合（1~2%）が検出可能なレベルのTHを発現した（図5H）。実験条件下では、マウス星状細胞と比較して、変換効率はヒト星状細胞でより高かったが、GAD67及びVGlut1ニューロンサブタイプの相対的な百分率はより低く、おそらくヒト星状細胞由来ニューロンのより高い多様化を示していることに留意された。電気生理学的研究は、PTBの枯渇後5~6週間でニューロンの大部分で電位依存性チャンネルによって運ばれる電流と反復活動電位を示し、ラット星状細胞と共培養すると、ほとんどのヒト星状細胞変換ニューロンも自発的なシナプス後イベントを示した（図5H）。これらのシナプス後活動は、NBQX + APV及びPiTXを順次ブロックすることができ（図6C）、コントロールshRNAで形質導入された細胞のパッチクランプ記録ではニューロンの電気生理学的特性は検出されなかった（図6D）。これらのデータは、PTBをダウンレギュレートすることにより、マウスとヒトの両方の星状細胞を1つのステップで機能性ニューロンに効率的に変換できることを示している。

#### 【0222】

実施例4.PTBをノックダウンすると、マウス中脳で星状細胞がニューロンに直接変換される。

#### 【0223】

AAVベースの戦略は、AAV血清型2ベクターを使用してin vivoデリバリー用のshPTBを発現させることにより設計された（図7A）。変換されたニューロンの系統追跡を可能にするために、赤色蛍光タンパク質（RFP）遺伝子をshPTBの5'に配置した。LoxP-Stop-LoxPユニットがRFPの5'に挿入され、RFPとshPTBの両方の条件付き表現が可能になった。このAAV-shPTBベクターを野生型（WT）マウスの中脳に注射してから10週間後、RFP陽性細胞は事実上存在しなかった（図8A）。対照的に、同じAAVベクターを星状細胞特異的GFAPプロモーター下でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスの脳に注入した場合、RFPとshPTBの両方が星状細胞で選択的に発現した（以下を参照）。

#### 【0224】

AAV-shPTBは、GFAP-Creマウスの黒質の片側にP30とP40の間に注入された。これは、星状細胞が中脳でニューロスフェアを生成する可能性をすでに失っていることが知られている発達段階である。陰性対照として、RFP（AAV-Empty）のみをエンコードするベクターを使用して同様の注入を実行した。AAV-Emptyを注入した群では、予想どおり、ほとんどのRFP陽性細胞はGFAP陽性であったが、NeuN陰性であり、形質導入された星状細胞がニューロンに変換されなかったことを示している（図7B、左上の2つのパネル）。対照的に、AAV-shPTBの注入後3週間までに、ほとんどの形質導入細胞はGFAP陽性のままで、典型的な星状細胞の形態を持っていたが、RFP陽性細胞の約20%が成熟ニューロンマーカーNeuNを発現し始め、これらのRFP標識NeuN陽性細胞の割合は5週間で劇的に増加した（図8B及び8C）。10週間までに、>80%のRFP陽性細胞がNeuN陽性になり、検出可能なGFAPを発現しなくなっ

10

20

30

40

50

た（図7B、左下の2つのパネル、右で定量化）。これらのデータは、RFP陽性細胞が中脳で徐々にニューロンに変換されたことを示している。

【0225】

変換されたニューロンは、Tuj1、MAP2、NSE、PSD-95等の一連のニューロンマーカーを使用した免疫染色によって調べられた。変換されたニューロンのほとんどは、AAV-shPTB送達の10週間後にこれらのマーカーの4つすべてを発現した（図7C）。シナプス後膜に存在する膜結合型グアニル酸キナーゼであるPSD-95の染色は、NeuN/RFP二重陽性細胞で典型的な点状パターンを示した。特に、*in vitro*での星状細胞からニューロンへの変換の結果（図5Cを参照）とは対照的に、RFP陽性ニューロンのかなりの部分（30～35%）は、ドーパミン作動性ニューロンの典型的なマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ（TH）に対して陽性に染色されたが（図7D）、グルタミン酸作動性及びGABA作動性ニューロンは比較的低いレベルで検出された（図8E）。変換された細胞のほとんどは、A9ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるGirk2も発現したが（図8F）、A10ドーパミン作動性ニューロンのマーカーであるカルビンジン-D28kでは少数の集団が陽性に染色された（図8G）。これらの発見は、星状細胞の異なるニューロンサブタイプへの分化転換における地域特異性を示唆している。

10

【0226】

ニューロンのサブタイプ誘導における領域特異性をさらに調査するために、皮質からの星状細胞の変換を、*in vitro*で中脳と比較した。免疫染色とイムノプロットイングの両方で測定したところ、中脳由来の星状細胞は、皮質由来の星状細胞（わずか1～2%の変換）と比較して、はるかに高い効率（8～10%）でTH陽性ニューロンに変換されることが分かった（図6E-G）。これらのデータは、特定の例では、異なる脳領域からの星状細胞が異なる遺伝子発現プログラムを示す可能性があるという本開示の認識と一致しており、脳内に領域的に異なるタイプの星状細胞が存在することを示唆している。

20

【0227】

次に、マウス脳の様々な部分の星状細胞から変換されたニューロンのサブタイプを調べた。中脳星状細胞は、皮質または線条体からのものではなく、*in vivo*で効率的にTH陽性ニューロンにトランス分化されたが、すべてが同様に高い（～80%）効率でNeuN陽性ニューロンに変換されたことが見出された（図7E-G）。黒質ドーパミン作動性ニューロンの軸索によって神経支配される領域であるため、線条体に星状細胞由来のTH陽性ニューロンがほとんど存在しないことは印象的である。*in vitro*（～10%）と比較して*in vivo*（～35%）で変換された星状細胞由来のTH陽性ニューロンの割合が高いことは、局所的な環境手がかりが変換されたニューロンをさらに増強して、異なる脳領域で特定のサブタイプに発達する可能性があることを示唆している。これらの発見は、他の脳領域ではなく中脳からの星状細胞が神経幹細胞からドーパミン作動性ニューロンへの分化を促進するという本開示の認識と一致している。

30

【0228】

実施例5. 星状細胞 変換ニューロンは、脳スライスで特徴づけられるように機能的であった。

【0229】

星状細胞に変換されたニューロンを*in situ*で機能的に特徴づけるために、AAV-shPTBによる形質導入の5～6週間後に脳スライスで電気生理学的研究を実施した。RFP陽性ニューロンに蛍光色素ニューロピオチン488を注入して、パッチクランプ記録が取得された細胞をマークし、パッチされた細胞のドーパミン作動性サブタイプを記録後のTH染色で確認した（図7H）。Na<sup>+</sup>及びK<sup>+</sup>チャンネルの典型的な電位依存性電流が検出された（図7I）。これらのニューロンはまた、反復活動電位を発火する能力を示し（図7J）、自発的なシナプス後電流を示した（図7K）。これらのデータは、星状細胞に変換されたTH陽性ニューロンが機能していることを示唆しており、それらが神経回路に組み込まれていることを示唆している。

40

【0230】

50

## 実施例6. 中脳星状細胞由来ニューロンの黒質線条体経路への統合

## 【0231】

定量分析により、合計約4000個のRFP陽性細胞が、黒質内に約1300個のTH陽性ニューロンを生じさせることが明らかになった(図8H-J)。これらの再プログラムされたニューロンのサブタイプ特異性は、ドーパミントランスポーター(DAT)、小胞モノアミントランスポーター-2(VMAT2)、及び脳スライス上のエンゲレイルド(engrailed)ホメオボックス1(En1)及びLIMホメオボックス転写因子1アルファ(Lmx1a)等の中脳ドーパミン作動性ニューロンの特定のマーカーの免疫染色によってさらに確認された(図9B)。RFP陽性の細胞体は黒質にのみ存在していたが、マウス中脳に神経幹細胞を移植した初期の研究で観察されたように、RFP陽性線維は、尾状核及び側坐核、中隔、嗅結節(図9A及び9G)を含む他の標的領域で検出された。これらの繊維の一部もTH陽性であった(図9H)。繊維密度の定量化は、RFP/TH-ダブルポジティブプロセスが主に線条体の尾状核-被殻(CPu)及び側坐核(NAc)領域に分布していることを明らかにした(図9I)が、セプタム(Sept)にはより多くの(~3倍)RFPポジティブファイバーが存在する(図9Gも参照)。これらのデータは、黒質線条体経路の環境手がかりが星状細胞変換ニューロンによる神経支配のパターンに影響を与える可能性を裏付けている。

10

## 【0232】

新たに変換されたニューロンの軸索が線条体に伸びたことをさらに実証するために、蛍光逆行性軸索追跡ビーズを、AAV-shPTB送達の10週間後にマウスの尾状被殻に注射した(図9E)。レトロビーズを注入してから1日後、黒質内の内因性TH陽性細胞と変換されたTH/RFP二重陽性細胞の両方が検出され、緑色のビーズで逆行的に標識された(図9Fの矢印)。まとめると、これらのデータは、中脳星状細胞へのAAV-shPTBの注射が、再プログラミング及び機能的等ドーパミン作動性ニューロンへの変換をもたらす可能性があることを示している。

20

## 【0233】

実施例7. 黒質線条体経路で失われたドーパミン作動性ニューロンを補充する。

## 【0234】

ドーパミン作動性ニューロンに変換された星状細胞の数及び線条体へのそれらの軸索の比較的強い成長は、PTB媒介星状細胞変換ニューロンが損傷した黒質線条体経路を再構成できる可能性があることを示唆した。この可能性を探求するために、ドーパミン作動性ニューロンに毒性のあるドーパミン類似体である6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を内側前脳束に片側注射することにより、ドーパミン作動性ニューロンの変性を誘発した(図11A)。予想通り、6-OHDA注射の1か月後、TH陽性細胞体の片側喪失が中脳及び線条体除神経で観察された(図11B)。損傷した黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの喪失に伴い、GFAP陽性星状細胞の集団が劇的に増加し(図11C)、予想される反応性星状細胞応答を示した。

30

## 【0235】

6-OHDAによる片側性病変の1ヶ月後、AAV-shPTBまたはAAV-Emptyが中脳に注入された。AAV-shPTB注射の10週間後の損傷した黒質の検査は、AAV-Emptyではなく、TH陽性ニューロンの数の増加を示し、その一部はRFP陽性でもあった(図11D-I)。ニューロンのカウントにより、病変のない黒質に見られる最初の約4500個のTH陽性神経細胞体が、病変側で90%以上減少(約400個に)したことが明らかになった。重要なことに、AAV-PTBの投与により、約1000個の新しいRFP/TH-double陽性ニューロンが誘導され(図11J)、それによってTH陽性ニューロンが初期数の約1/3に回復した。

40

## 【0236】

かなりの量のRFP陽性線維も線条体及び黒質線条体経路に沿って検出され、その一部はTHにも陽性であった(図11E、図17A-F)。繊維密度の定量分析は、6-OHDAがTH陽性繊維を初期レベルの約15%に減少させ、AAV-PTBがTH陽性繊維を非病変側で検出された野生型レベルの約40%に回復させることを示した(図11L)。異なる線条体領域のRFP陽性及びRFP/TH-二重陽性線維を定量化することにより、尾状核-被殻(CPu)領域がRFP/TH-二重陽性線

50

維の割合が最も高いことが測定された（図11K）。同様の部分的に再構成された黒質線条体経路がマウス脳への幹細胞由来のドーパミン作動性ニューロンの移植で達成されたが、これらのデータは、ニューロンのサブタイプを指定する追加の治療がないと、AAV-shPTBが内因性中脳星状細胞から変換された新しいニューロンを誘導して失われたドーパミン作動性ニューロンを補充できることを示している。

【0237】

実施例8. 中脳での直接的な再プログラミングによるパーキンソン病表現型の逆転

【0238】

再構成された黒質線条体経路が回路機能を回復する能力を決定するために、AAV-shPTB形質導入マウスが片側6-OHDA病変後に運動機能の改善を示すかどうかを調べた。3つの標準的な行動テストが実行された。2つは薬物誘発性の回転に基づいており、3つ目は自発的な運動活動に基づいている。アポモルヒネによって誘発された対側回転とアンフェタミンによって誘発された同側回転の両方が、6-OHDA誘発病変に続いて著しく増加した。注目すべきことに、これらの表現型は両方とも、AAV-shPTB治療の3か月後にほぼ野生型レベルに回復したが、AAV-Empty形質導入マウスでは有意な修正は記録されなかった（図12A）。同じセットのマウスでのアポモルヒネ誘発回転の時間経過は、2~3ヶ月で進行性の表現型の回復を示した（図12B）。

10

【0239】

自発的な運動活動を調べるために、四肢の使用バイアスをスコアリングするためにシリンドertestを実施した。病変のないマウスは比較的等しい頻度で両肢を使用した。片側に病変のあるマウスは優先的な同側の接触を示し、対側の前肢機能が無効になっていることを示した。AAV-shPTB形質導入マウスでは、前肢使用の劇的な時間依存性の改善が観察され、治療後3か月までに野生型レベルのパフォーマンスに達したが、AAV-Empty形質導入マウスでは改善が見られなかった（図12C）。

20

【0240】

再プログラムされたニューロンが正常な運動機能の回復に直接関与しているかどうかをテストするために、変換されたニューロンで抑制性hM4Di受容体（AAV-shPTBベクターのRFPの代わりに）を発現させることによって化学発生アプローチを採用した（図16A）。hM4Di受容体を発現するニューロンの活動電位は、注射後1~2日以内に代謝される薬剤であるクロザピン-N-オキシド（CNO）によって強力に阻害されることが十分に確立されている。シリンドertestで測定した6-OHDA処理マウスの運動能力の回復は、CNOの腹腔内注射後に消失し、注射から40分以内に表現型が再び現れた。損傷を受けていないマウスへのCNOの注射は効果がなかった。注目すべきことに、そして薬物の代謝と関連して、運動表現型は3日以内に再び消えた（図16B）。これらの結果は、星状細胞に変換されたニューロンが運動回復に直接関与している可能性があることを示している。

30

【0241】

実施例9. 再プログラムされた脳における線条体ドーパミンの回復

【0242】

線条体からの抽出物は、AAV-shPTBを介した星状細胞変換の有無にかかわらず、病変側と比較して、両方の非病変側のドーパミンのHPLC分析のために調製された。ドーパミンシグナルを特定するために、正常等ドーパミンレベルの範囲の既知の量を線条体溶解物にスパイクした。シグナルは添加量と直線的に相関していることが示された（図15A及び15B）。次に、ドーパミンのレベルを異なる条件下で線条体で測定し、6-OHDA損傷マウスではドーパミンの効果的な除去を示したが、AAV-shPTB再プログラムマウスではドーパミンの有意な回復を示した（図15C-15F）。3つの独立した実験に基づく結果の定量化は、損傷していない線条体と比較して、ドーパミンのレベルが損傷した線条体の約25%からAAV-shPTB治療時に65%に上昇したことを示した（図6F）。ドーパミン生合成におけるこの約40%の正味の増加は、ニグラのRFP/TH-二重陽性細胞体及び線条体のプロセスの30~35%の回復の範囲内であり、AAV-shPTB再プログラムニューロンが観察された表現型回復の原因である可能性があることを示唆している。

40

50

## 【0243】

実施例10.PTB mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ニューロンの変換を誘発し、化学的に誘発されたパーキンソン病の表現型を救済した。

## 【0244】

ホスホチオエート骨格（全体的な安定性を高め、送達を助けるため）と3'フルオレセイン（注入されたASOの追跡を可能にするため）を含むPTB（PTB-ASO）を標的とする5つの21ヌクレオチド塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を合成した。GFPを標的とするASO（GFP-ASO）も陰性対照として合成された。GFP-ASOではなく3つのPTB-ASOが、単離されたマウス星状細胞へのトランスフェクション時にPTB発現を低下させるのに効果的であった（図13A）。ターゲティング効率が最も高いPTB-ASOのPTB-ASO導入から5週間後（#4）、標準的なニューロン分化培地で培養されたマウス星状細胞は、Tuj1、MAP2、NSE及びNeuNを含む一連のニューロンマーカーの合成を示したが、コントロールASOでトランスフェクトされた星状細胞は合成を示さなかったため（図13B）、変換されたニューロンは少なくとも3か月間（試験した最長期間）健康なニューロン形態を維持した（データは表示されていない）。AAV-shPTBウイルスベクターと同様に、TH染色陽性で示されるように、変換されたニューロンのごく一部がドーパミン作動性であった（図13B）。

10

## 【0245】

PTB-ASOは、GFAP-CreERTM導入遺伝子（タモキシフェンでの処理により誘導）とtdTomatoをコードする導入遺伝子（Rosa26遺伝子座に組み込まれる）の両方を運ぶマウスの中脳でin vivoでニューロン変換を誘導することが示され、その発現はCreリコンビナーゼの作用によって永続的に活性化される。得られた二重トランスジェニックマウスをタモキシフェンで処理すると、Creが誘導され、これらのマウスの星状細胞でTdTomatoが活性化された。Creは生後35日目（P35）に系統的に誘導され（図14A）、3週間後、ASOはこれらのマウスの黒質に一方的に定位注射された。ASOを注入しない場合、すべてのtdTomato標識細胞はNeuN陰性であったが、それらの細胞のほとんどはGFAP陽性であった（図14B）。しかし、PTB-ASO注射後2か月までに、tdTomato標識細胞の一部がNeuN陽性になり（図14C）、そのうちのいくつかはTH陽性でもあった（図14D）。重要なことに、PTB-ASOを注射した6-OHDA治療マウスは、治療後3か月までに劇的に減少したアポモルヒネ誘発回転を示したが、対照GFP-ASOはレスキュー効果を示さなかった（図13C）。これらの発見は、オリゴヌクレオチドベース（ASOまたはRNAi）の治療法で、PDを含む神経変性疾患を治療する可能性

20

30

## 【0246】

実施例11.材料と方法

## 【0247】

本実施例では、実施例1~10で使用されるいくつかの方法について記載する。

## 【0248】

ベクターとウイルス産生

## 【0249】

マウス星状細胞でshPTBを発現するレンチウイルスベクターを構築するために、標的配列（5'-GGGTGAAGATCCTGTTCAATA-3'；配列番号1）をpLKO.1-ハイグロマイシンベクター（Addgene、#24150）にシャトルした。ヒト星状細胞については、標的配列（5'-GCGTGAAGATCCTGTTCAATA-3'；配列番号2）を含む同様のベクターを使用した。ウイルス粒子は、2つのパッケージプラスミドpCMV-VSV-G（Addgene、#8454）及びpCMV-dR8.2 dvpr（Addgene、#8455）とともにLenti-X 293T細胞（Clontech）にパッケージされた。ウイルス粒子は、SW-28ローターを備えたBeckmanXL-90遠心分離機での超遠心分離によって濃縮された。

40

## 【0250】

AAVベクターを構築するために、マウスPTBに対する同じ標的配列を最初にEcoRIサイトとXhoIサイトの間のpTRIPZ-RFPベクターに挿入した。次に、RFPとshRNAを含むセグメントをサブクローニングして、Asc Iを使用してAAV-CMV-LOX-STOP-LOX-mG-CaMP3.0ベクター（Addgene、#50022）のCaMP3.0を置き換えた。コントロールベクターを構築するために、R

50

FPのみを含む同様のセグメントをAAV-CMV-LOX-STOP-LOX-mG-CaMP3.0ベクターにクローニングした。得られたベクターは、AAV-shPTBまたはAAV-Emptyと呼ばれていた。AAV-hm4Di-shPTBベクターは、AAV-shPTBのRFPをpAAV-CBA-DIO-hm4Di-mCherryベクター (Addgene、#81008) からサブクローニングされたhm4DiのcDNAで置き換えることによって構築された。

#### 【0251】

AAV2のウイルス粒子は、他の2つのプラスミド (pAAV-RC及びpAAV-Helper (Agilent Genomics)) とともにトランスフェクトされた293T細胞にパッケージされた。採取後、ウイルス粒子をヘパリンカラム (GE HEALTHCARE BIOSCIENCES) で精製し、Ultra-4遠心フィルターユニット (Amicon、分子量カットオフ100,000) で濃縮した。ウイルス粒子の力価は、qPCRによって $>1 \times 10^{12}$ 粒子/mlであると測定された。

10

#### 【0252】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成

#### 【0253】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Integrated DNATechnologiesから合成された。マウスPTBを標的とするASO (ASO-mPTB) の配列は、5'-GGGTGAAGATCCTGTTCAATA-3' (配列番号1) であった。ターボGFP (5'-GTTGGTGCTCTTCATCTTGTT-3') (配列番号3) を標的とするASOを対照として合成した。すべてのASOのバックボーンには、ホスホロチオエート修飾が含まれている。フルオレセイン (FAM) は、蛍光検出のためにこれらのASOの3'末端に取り付けられた。

#### 【0254】

ウェスタンブロット及びRT-PCR

#### 【0255】

ウェスタンブロットによる分析のために、細胞を1xSDSローディング緩衝液で溶解し、定量化後、プロモフェノールブルーを最終濃度0.1%になるように添加した。25~30ugの総タンパク質を10%Nupage Bis-Trisゲルで分離し、以下の抗体でプローブした：ウサギ抗PTBP1 (ダグラスブラックから提供された、1:3000)、マウス抗PTBP2 (Santa Cruz、sc-376316、1:1000)、マウス抗ベータアクチン (Sigma、A2228、1:10000)、ウサギ抗Tuj1 (Covance、MRB-435P、1:10000)、ウサギ抗Brn2 (Cell Signaling、12137、1:1000)、ニワトリ抗TH (Aves lab、TYH、1:1000) 及びウサギ抗VMAT2 (Proteintech、20873-1-AP、1:500)。

20

30

#### 【0256】

RT-qPCR分析では、RNAをTrizol (Life Technology) で抽出し、10ug/mlのグリコーゲンを使用して低分子RNAの沈殿を促進した。全RNAは最初にDNaseI (Promega) で処理され、続いてmiScript II RT キット (QIAGEN、218160) で逆転写された。RT-qPCRは、miScript SYBR Green PCRキット (QIAGEN、218073) を使用して、step-one plus PCRマシン (Applied Biosystems) で実行した。使用したプライマーは、U6-F: 5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTT-3' (配列番号4)、miR-124-F: 5'-TAAGGCACGCGGTGAA TGCC-3' (配列番号5)、及びmiR-9-F: 5'-GCGCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATG-3' (配列番号6) であった。

#### 【0257】

In vitroでの細胞培養と分化転換

#### 【0258】

マウス星状細胞は出生後 (P4~P5) の子犬から分離された。皮質組織を脳全体から解剖し、トリプシンとインキュベートした後、ポリ-D-リジン (Sigma) でコーティングした皿にプレーティングした。単離された星状細胞は、DMEM (GIBCO) と10%ウシ胎児血清 (FBS) 及びペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO) で培養された。非星状細胞を排除するために、皿を毎日注意深く振とうした。約90%のコンフルエンスに達した後、星状細胞をAccutase (Innovative Cell Technologies) で分離した後、800 rpmで3分間遠心分離し、DMEM/F12 (GIBCO)、10%FBS (GIBCO)、ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO)、B27 (GIBCO)、10 ng/ml表皮成長因子 (EGF、PeproTech)、及び10 ng/ml線維芽細胞成長因子2 (FGF2、PeproTech) を含む培地で培養した。

40

50

## 【0259】

In vitroで分化転換を誘導するために、マウスの星状細胞を、マウスPTBを標的とするレンチウイルスを含む星状細胞培養培地に再懸濁し、Matrigel Matrix (Corning) でコーティングしたカバースリップ (12 mm) に播種した。24時間後、新鮮な星状細胞培養培地中のハイグロマイシンB (100ug/ml、Invitrogen) で72時間細胞を選択した。次に、該培地を、0.4% B27、2% FBS、3つの小分子のカクテル (1uM ChIR99021、10 uMSB431542及び1 mM Db-cAMP)、及び神経栄養因子 (BDNF、GDNF、NT3、CNTF、すべて10ng/ml) を添加したN3/基本培地 (DMEM/F12とNeurobasalの1:1混合、25 µg/ml インスリン、50 µg/ml トランスファー、30 nM 亜セレン酸ナトリウム、20 nM プロゲステロン、100 nM プトレシン、) に切り替えた。該培地は1日おきに半分交換された。シナプス電流を測定するために、6週間後の変換細胞に新鮮なGFP標識ラット星状細胞を添加し、さらに3~4週間の共培養後、パッチクランプ記録を行った。

10

## 【0260】

ヒト星状細胞は商業的供給源 (ScienCell) から購入した。細胞を星状細胞培地 (ScienCell) で増殖させ、約80%のコンフルエンスに達するまで継代培養した。In vitroでの分化転換の場合、培養されたヒト星状細胞は、最初にトリプシンとの結合を解除し、ヒトPTBを標的とするレンチウイルスを含む星状細胞培地に再懸濁し、マトリゲルマトリックスでコーティングされたカバースリップにプレティングした。24時間後、細胞をハイグロマイシンB (100ug/ml、Invitrogen) で72時間選択した。該培地を、0.4% B27、2% FBS、及び神経栄養因子 (BDNF、GDNF、NT3、CNTF、すべて10ng/ml) を添加したN3/基本培地に切り替えた。シナプス電流を測定するために、3週間後の変換細胞に新鮮なGFP標識ラット星状細胞を添加し、さらに2~3週間の共培養後、パッチクランプ記録を行った。

20

## 【0261】

免疫細胞化学

## 【0262】

スライドガラス上で増殖した培養細胞を、4% パラホルムアルデヒド (Affymetrix) 及び室温で15分間固定した後、氷上で15分間PBS中の0.1% TritonX-100で透過処理した。PBSで2回洗浄した後、3% BSAを含むPBS及び室温で細胞を1時間ブロックした。固定した細胞を、3% BSAを含むPBS中、4 °Cで一晩一次抗体とともにインキュベートした。PBSで2回洗浄した後、該細胞をAlexa Fluor 488、Alexa 546、Alexa 594、またはAlexa 647 (1:500、Molecular Probes) に結合した二次抗体と1時間インキュベートした。PBS中の300nM DAPIを細胞に室温で20分間適用して、核を標識した。PBSでさらに3回洗浄した後、Fluoromount-G封入剤をスライドガラスに塗布し、Olympus FluoView FV1000で画像を検査及び記録した。

30

## 【0263】

脳切片を染色するために、マウスをCO<sub>2</sub>で犠牲にし、すぐに灌流した。最初に15~20 mLの生理食塩水 (0.9% NaCl) で、次に15 mLの4% パラホルムアルデヒド (PFA) を含むPBSで組織を固定した。脳全体を抽出し、4% PFA及び4 °Cで一晩固定した後、クリオスタット (Leica) で14~18µmの切片に切断した。染色する前に、脳切片をクエン酸ナトリウム緩衝液 (10 mMクエン酸ナトリウム、0.05% Tween 20、pH6.0) とともに95 °Cで15分間インキュベートし、抗原を回収した。次に、PBS中の5% 正常ロバ血清及び0.3% TritonX-100及び室温でスライドを1時間処理した。残りのステップは、培養細胞と同様に実行された。

40

## 【0264】

以下の一次抗体を使用した: ウサギ抗Tuj1 (Covance、MRB-435P、1:1,000)、マウス抗Tuj1 (Covance、MMS-435P、1:1,000)、マウス抗MAP2 (Milipore、MAB3418、1:1000)、マウス抗NeuN (Milipore、MAB377、1:200)、ニワトリ抗NSE (Aves Lab、NSE、1:1000)、ウサギ抗VGlut1 (Synaptic Systems、135-303、1:200)、ウサギ抗GAD67 (Cell Signaling、63080、1:200)、ニワトリ抗TH (Aves Lab、TYH、1:1000)、ウサギ抗PSD95 (Cell Signaling、3450、1:200)、ウサギ抗DAT (Bioss、bs-1714R、1:100)、ヤギ抗VMAT2 (Everest biotech、EB06558、1:100)、ウサギ抗En1 (Abgent、AP7278a、1:100

50

)、ウサギ抗Lmx1a (ProSci、7087、1:100)、ウサギ抗GFAP (Cell Signaling、12389、1:200)、ニワトリ抗GFAP (Aves lab、GFAP、1:100)、ウサギ抗ALDH1L1 (EnCor Biotechnology、RPCA-ALDH1L1、1:2000)、マウス抗OLIG2 (Santa Cruz、sc-293163、1:100)、ニワトリ抗CD11b (Aves lab、MAC、1:1000)、マウス抗NG2 (Santa Cruz、sc-53389、1:100)、マウス抗ネスチン (Cell Signaling、4760、1:200)、マウス抗NANOG (Santa Cruz、sc-293121、1:100)、マウス抗フィブロネクチン (DSHB、1H9、1:500)、ウサギ抗GAD65 (Cell Signaling、5843、1:50)、ウサギ抗VGlut2 (Bioss、bs-9686R、1:100)、ウサギ抗Girk2 (Proteintech、21647-1-AP、1:100)、ウサギ抗Calbindin D28K (Proteintech、14479-1-AP、1:100)及びマウス抗RFP (ThermoFisher、MA5-15257、1:200)。

10

## 【0265】

神経細胞体と繊維密度の定量化

## 【0266】

TH及びRFPの免疫染色のために、中脳全体の冠状切片を120~140 μmの間隔でサンプリングした。被験者の細胞型の総数(Nt)は、 $Nt = Ns \cdot (St/Ss)$ の式を使用して計算された。ここで、Nsはカウントされたニューロンの数、Stは脳領域のセクションの総数、Ssは前述のようにサンプリングされたセクションの数である。RFP陽性及びRFP/TH二重陽性線維は、以前に公開された方法を使用して定量化された。分析のために、各脳から3つの冠状切片(A/P +1.3、+1.0、及び+0.70)を選択した。選択したセクションごとに、ランダムに選択した3つの領域を、60倍の油浸対物レンズを使用して1 μmの間隔でzスタック画像の1つのセクションからキャプチャした。次に、球(直径:14 μm)をプローブとして生成し、zスタック全体のファイバー密度を測定した。球の表面を横切る各繊維には1つのスコアが与えられた。線条体THファイバーの光学密度は同じセクションから決定された。サンプリングされたセクションのデジタル化された画像は、10倍の対物レンズでキャプチャされ、Image-J 1.47v (Wayne Rasband、Bethesda、MD)によって分析された。

20

## 【0267】

電気生理学

## 【0268】

パッチクランプ記録は、Axopatch-1D増幅器またはAxopatch 200B増幅器(Axon Instruments)をDigidata1440Aインターフェース(Axon Instruments)に接続して実行した。データはpClamp10.0またはIgor4.04ソフトウェアで取得し、MatLabv2009bで分析した。In vitroでのマウス星状細胞からの変換されたニューロンについては、パッチクランプ記録の1週間前に小分子を培地から除去した。培養されたマウスとヒトの両方の細胞は、最初に酸素化(95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>)人工脳脊髄液(150 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mMグルコース、10 mM HEPES、pH7.4)と37 °Cで30分間インキュベートされ、全細胞パッチクランプが選択された細胞で実行された。

30

## 【0269】

In vivoで変換されたニューロンの活動を記録するために、皮質スライス(300 μm)をAAVベクターの注射の6~8週間後に調製した。該スライスを酸素化(95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>)解剖緩衝液(110.0 mM塩化コリン、25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>、1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.5 mM KCl、0.5 mM CaCl<sub>2</sub>、7.0 mM MgCl<sub>2</sub>、25.0 mMグルコース、11.6 mMアスコルビン酸、3.1 mMピルビン酸)中のピプラトームで4 mmで切断し、続いて酸素化ACSF(124 mM NaCl、3 mM KCl、1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、26 mM NaHCO<sub>3</sub>、2.4 mM CaCl<sub>2</sub>、1.3 mM MgSO<sub>4</sub>、10 mMデキストロース、5 mM HEPES; pH7.4)中及び室温で1時間インキュベートしてから実験を行なった。

40

## 【0270】

パッチピペット(5~8MΩ)溶液には、150 mM KCl、5 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mMエチレンジアミン四酢酸(EGTA)-Na、及び10 mM HEPES pH7.2が含まれていた。電圧クランプ実験では、膜電位は通常-75 mVに保持された。以下の濃度のチャンネル遮断薬が使用された: PiTX: 50μM; NBQX: 20μM; APV: 50μM。これらのブロッカーはすべて、濃縮原液から外部溶液に希釈した後、浴に適用した。すべての実験は室温で実施された。

50

## 【0271】

マウスモデルの構築

## 【0272】

GFAP-Creトランスジェニックマウス (B6.Cg-Tg (Gfap-cre) 77.6Mvs/2J) は、AAV-shPTBによって誘発される *in vivo*再プログラミング実験で使用された。In vivoでのASOの効果をテストするために、GFAP-CreER<sup>TM</sup>マウス (B6.Cg-Tg (GFAP-cre/ERT2) 505Fmv/J) を Rosa-tdTomatoマウス (B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sortm14 (CAG-tdTomato) Hze/J) と交配させた。生後35日齢のこれらのダブルGFAP-CreERTM; Rosa-tdTomatoトランスジェニックマウスの子孫に、24時間ごとに合計5日連続、腹腔内注射によりタモキシフェン (コーン油に20 mg/mlの濃度で溶解) を注射した。各注射の用量は75 mg/kgであった。タモキシフェン適用の2週間後、PTB-ASOまたはコントロールASOをこれらのマウスの黒質に注射して、ASOによって誘発される *in vivo*での再プログラミングと行動の利点を調べた。すべてのトランスジェニックマウスはジャクソン研究所から購入した。

10

## 【0273】

6-OHDA及び定位注射による同側病変

## 【0274】

生後40日齢の成体WT及びGFAP-Creマウスを使用して、病変を誘発する手術を行った。動物を最初にケタミン (80-100mg/kg) とキシラジン (8-10mg/kg) の混合物で麻酔し、次に定位固定マウスフレームに入れた。6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA, Sigma) を注射する前に、マウスを最初にデシプラミン (25 mg/kg) とパルギリン (5 mg/kg) の混合物で治療した。6-OHDAを0.02%氷冷アスコルビン酸塩/生理食塩水に15mg/mlの濃度で溶解し、3時間以内に使用した。有毒な溶液は、次の座標 (ブレグマに対して) で内側前脳束 (MFB) に注入された: 前後 (A/P) = -1.2mm; 中外側 (M/L) = -1.3mm及び背腹 (D/V) = -4.75mm (硬膜から)。注射は、33G針を備えた5 ulハミルトンシリンジに0.1ul/minの速度で3分間適用した後、針をゆっくりと取り外した。病変後、創傷の洗浄及び縫合を行った。

20

## 【0275】

AAVベクターまたはASOは、6-OHDA誘発病変の約30日後に黒質に注射された。4ulのAAVベクターまたは2ulのASO (1ug/ul) を、以下の座標で損傷した黒質に注入した:A/P = -3.0mm; M/L = -1.2mm及びD/V = -4.5mm。同じ注射器と針を使用して、0.5ul/minの速度で3分間注射を行った後、針をゆっくりと取り外した。

30

## 【0276】

逆行トレース

## 【0277】

黒質線条体経路の逆行性追跡については、6-OHDA誘発病変を伴うまたは伴わないGFAP-Creマウスに、最初にAAV-shPTBベクターを注射した。AAV配信から3か月後、緑のRetrobeadsix (Lumaf luor, Naple, FL) は、AAV注射の同じ側の線条体に2つの部位で一方向的に注射され、次の2つの座標が使用され:A/P = + 0.5mm、M/L = + 2.0mm、D/V = + 3.0mm及びA/P = + 1.2mm、M/L = + 2.0mm、D/V = + 3.0mm、約2ulのビーズが注入された。24時間後、動物を犠牲にし、すぐに灌流した。彼らの脳は、切片化と免疫染色のために4%PFAで固定された。

40

## 【0278】

線条体ドーパミンの測定

## 【0279】

マウス線条体のドーパミンレベルは、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって測定された。HPLC分析は、Agilent Zorbax SB-C18セミアプレックスカラム (ID 9.4 x 250 mm、5 μm、80 ) を備えたAgilent 1260 Infinity HPLCシステムを使用し、0.1%ギ酸を含む水/メタノールのグラジエントを使用して実施した。各物質は、前述のように、可変波長検出器 (VWD) での保持時間と260 nmの吸光度によって特徴付けられる。線条体サンプルは、脳組織から直接調製された。手短に言えば、線条体解剖は、マウスの安楽死の直後に実施された。スクイーザーを使用して200 μLの0.1M塩酸でホモジナイズした後、サ

50

ンプルを遠心分離した(12,000 x g、10分、4 )。得られた上清を0.2um Nanosep MF遠心分離装置で過し、HPLC分析に適用した。

【0280】

行動テスト

【0281】

すべての行動試験は、6-OHDA誘発病変の21~28日後、またはAAVベクターまたはASOの送達後2、3、及び5か月に実施された。回転試験では、ライブビデオシステム下でアポモルヒネ(Sigma、0.5mg/kg)を腹腔内注射した後、マウスのアポモルヒネ誘発回転を記録した。最終結果を不明瞭にする可能性のある「ウィンドアップ」効果を防ぐことを目的としたローテーションテスト(例えば、テストが金曜日に行われる場合、マウスは最初に月曜日と水曜日に注射される)を実行する前に、2日間に分けてマウスにアポモルヒネ(0.5 mg/kg)を注射した。前述のように、注射の5分後に10分間回転を測定し、全身の回転のみをカウントした。データは、1分あたりの正味の対側ターンとして表される。シリンダーテストでは、マウスを個別にガラスシリンダー(直径19 cm、高さ25 cm)に入れ、説明したように、すべてのタッチを完全に表示するためにミラーを後ろに配置した。マウスをライブビデオシステムで5分間記録した。記録前に、シリンダーへのマウスの馴化は行われなかった。スコアリングには、フレームごとのビデオプレーヤー(KMPlayerバージョン4.0.7.1)が使用された。同側または反対側の前肢と独立して壁に触れるだけを数えた。同時壁タッチ(両方の足で同時に実行されたタッチ)は分析に含まれていなかった。データは、総タッチ数に対する同側タッチの百分率として表される。

10

20

【0282】

化学発生実験では、6-OHDA誘発病変の21~28日後及びAAV-hm4Di-shPTBの送達の2か月後にシリンダー試験を実施した。後のテストでは、回復のベースラインを記録するために、最初に動物に生理食塩水を注射した。その後の記録は、CNO(Biomol International、4 mg/kg)の腹腔内注射の40分後、または薬物代謝の72時間後に実行された。

【0283】

実施例12. タンパク質または核酸配列

表 1. タンパク質または核酸配列

名称	配列(5' から 3' まで)	配列番号
マウス PTB の標的配列	GGGTGAAGATCCTGTCAATA	1
ヒト PTB の標的配列	GCGTGAAGATCCTGTCAATA	2
Turbo GFP を標的とする ASO	GTTGGTCTTTCATCTTGTT	3
U6-F プライマー	ACGCAAATTCGTGAAGCGTT	4
miR-124-F プライマー	TAAGGCACGCGTGAATGCC	5
miR-9-F プライマー	GCGCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATG	6

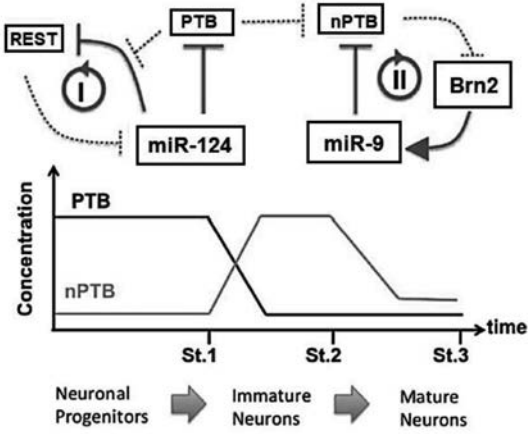
30

【0284】

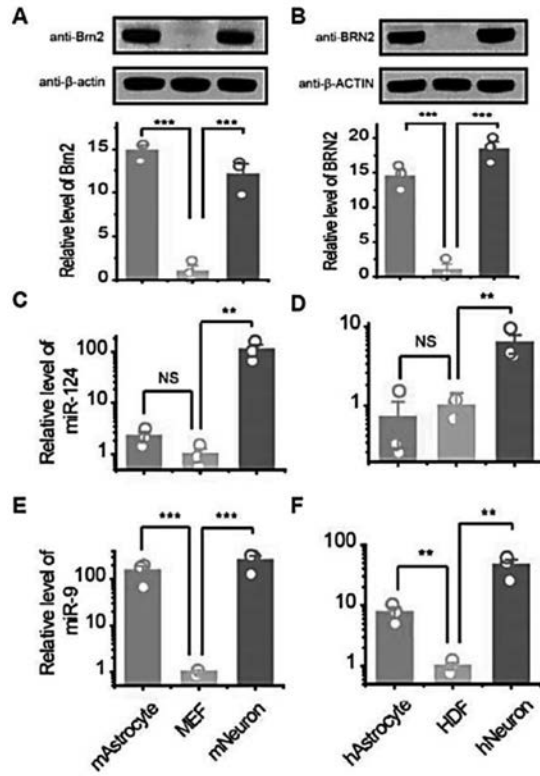
本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され、説明されてきたが、そのような実施形態が例としてのみ提供されることは当業者には明らかであろう。多数の変形、変更、及び置換が、本開示から逸脱することなく、当業者に発生するであろう。本開示の実施形態の様々な代替案が、本開示を実施する際に使用され得ることが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は、本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造、ならびにそれらの同等物は、それによってカバーされることが意図されている。

40

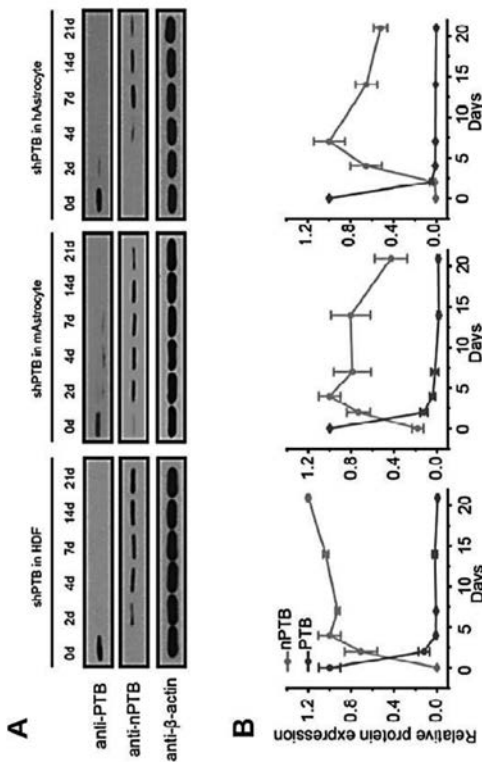
【 図 1 】



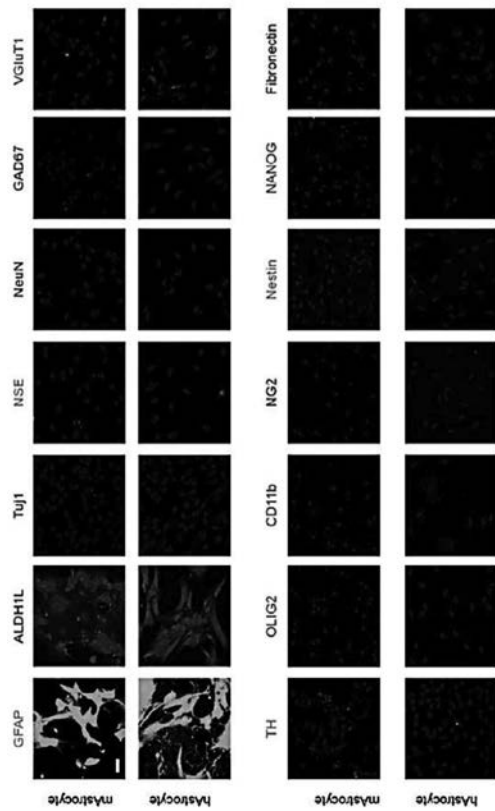
【 図 2 A - F 】



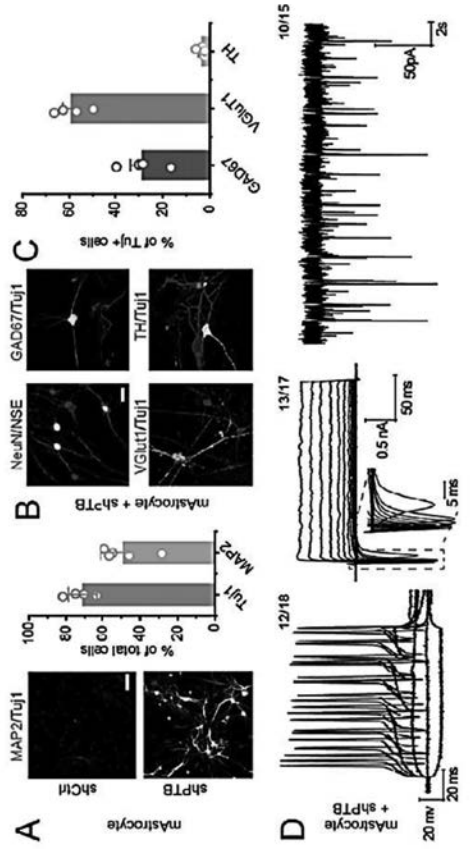
【 図 3 A - B 】



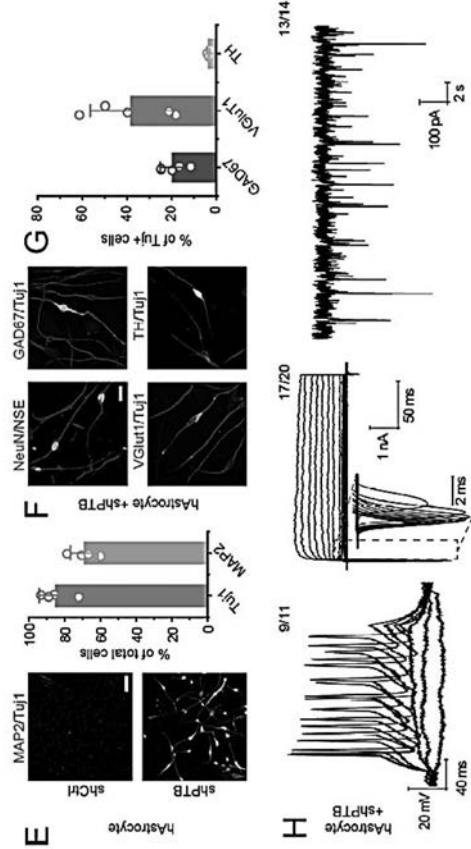
【 図 4 】



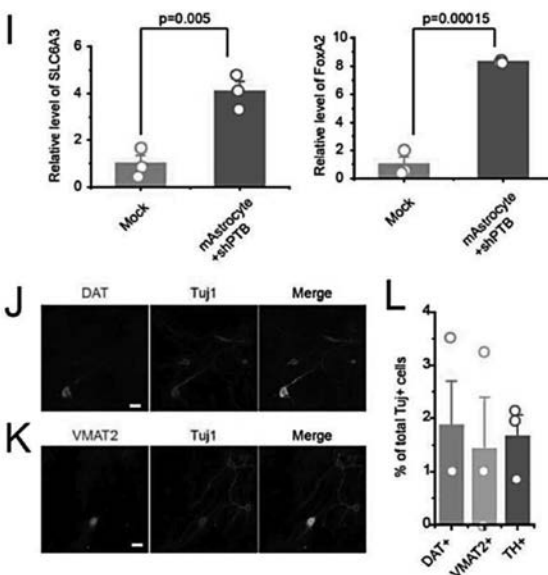
【 5 A - D 】



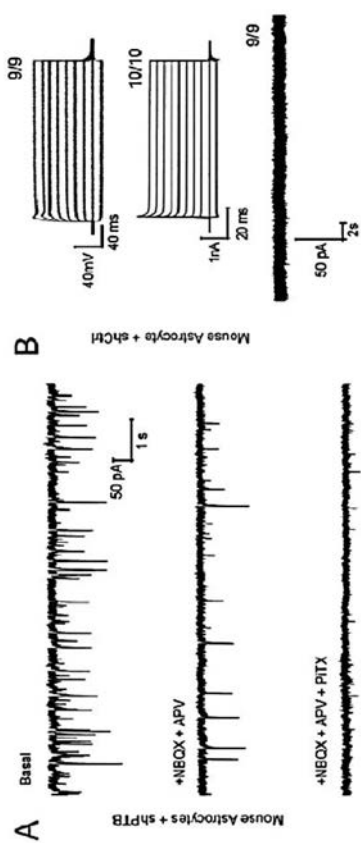
【 5 E - H 】



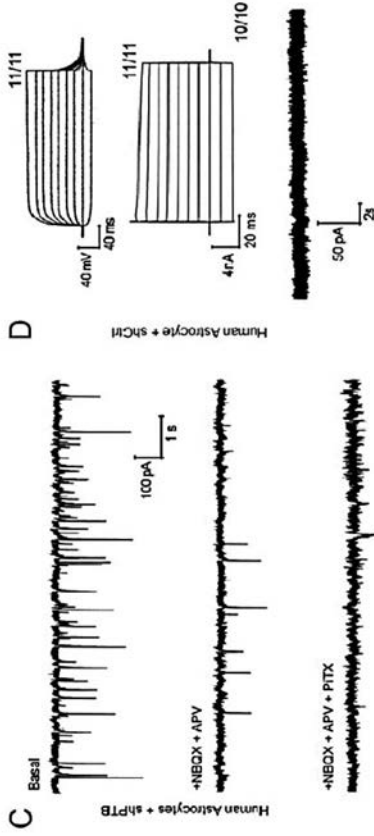
【 5 I - L 】



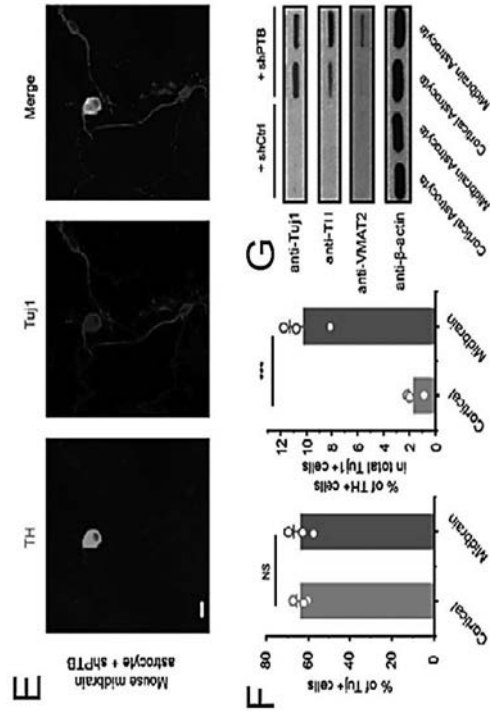
【 6 A - B 】



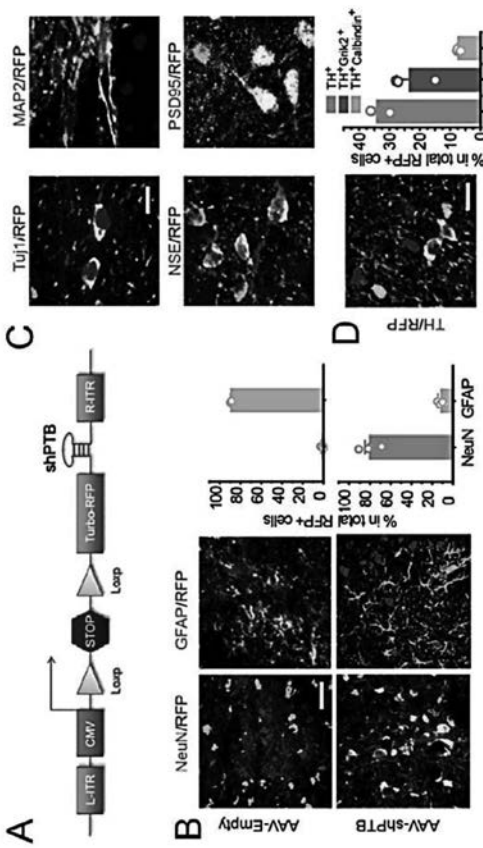
【 6 C - D 】



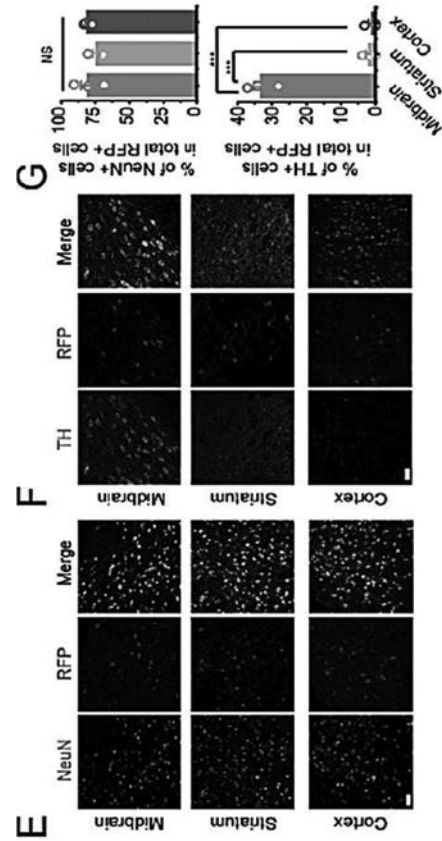
【 6 E - G 】



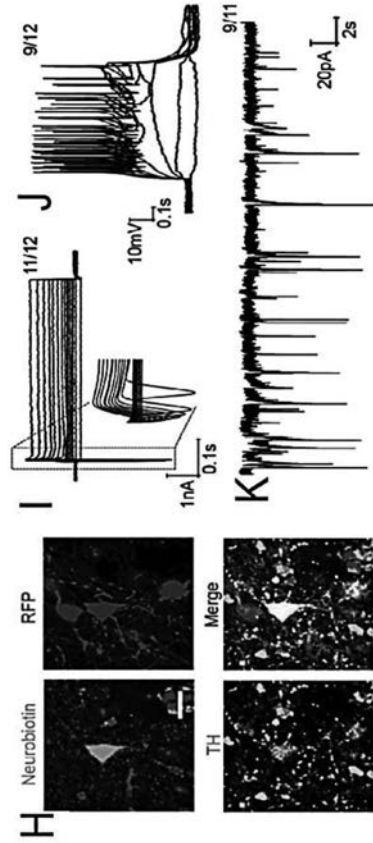
【 7 A - D 】



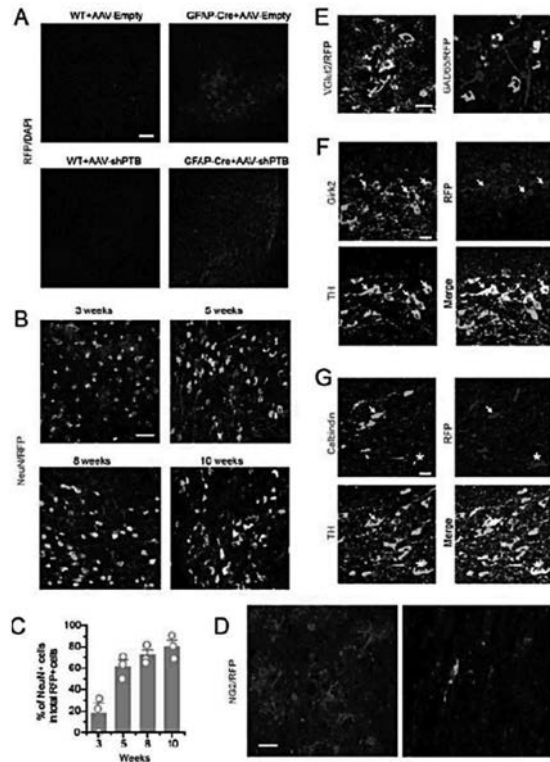
【 7 E - G 】



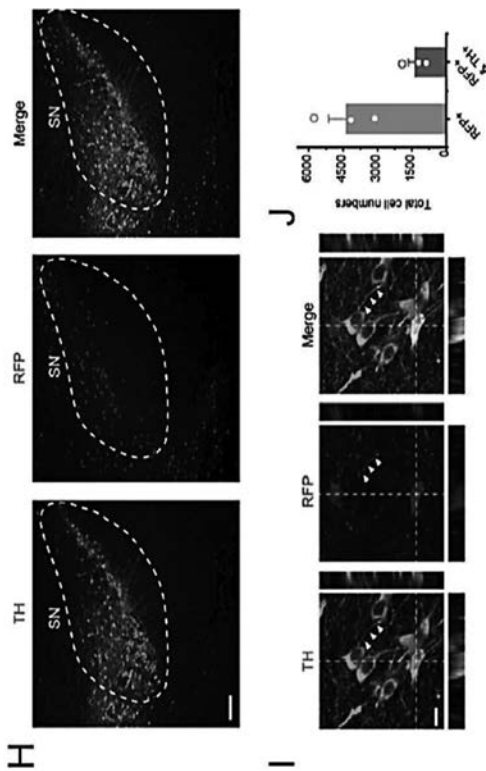
【 7 H - K 】



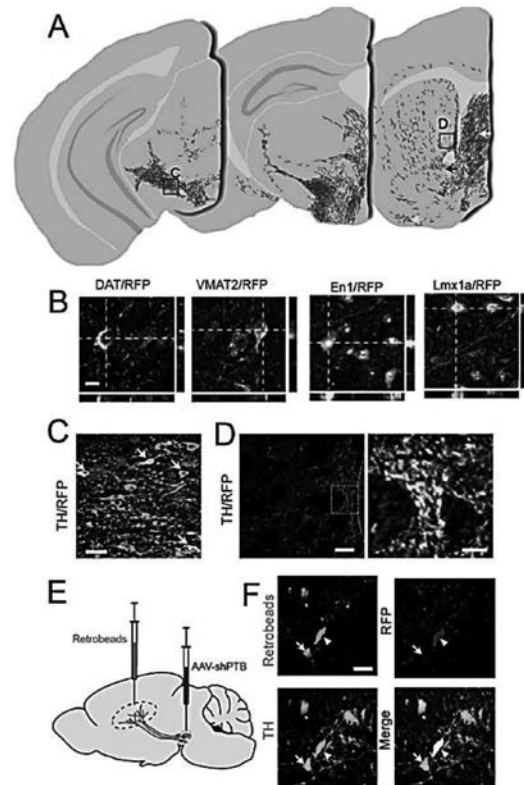
【 8 A - G 】



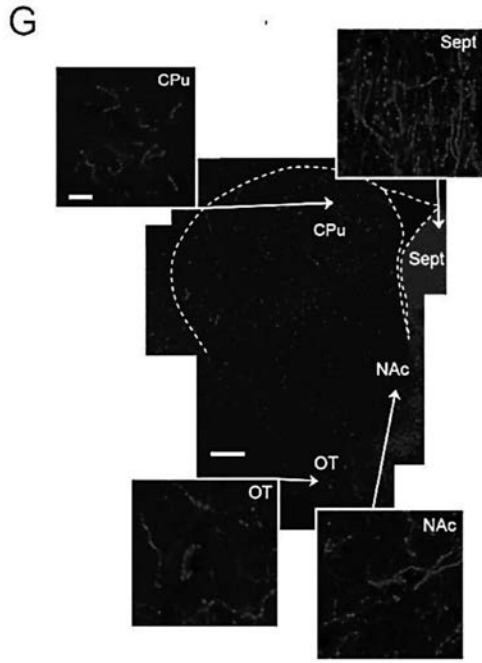
【 8 H - J 】



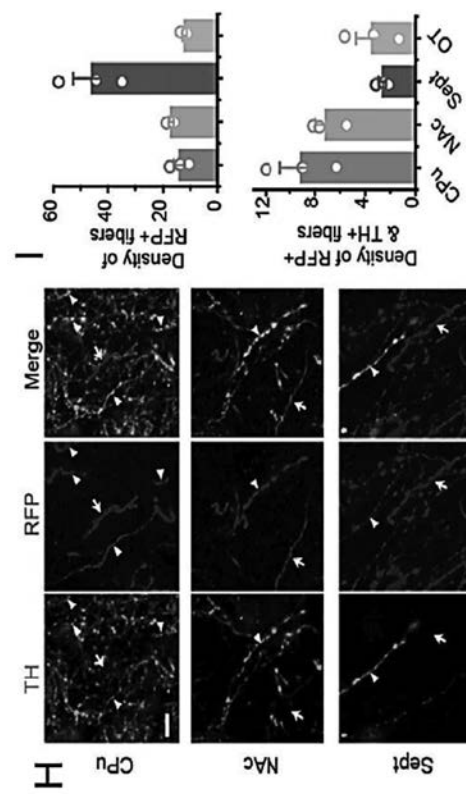
【 9 A - F 】



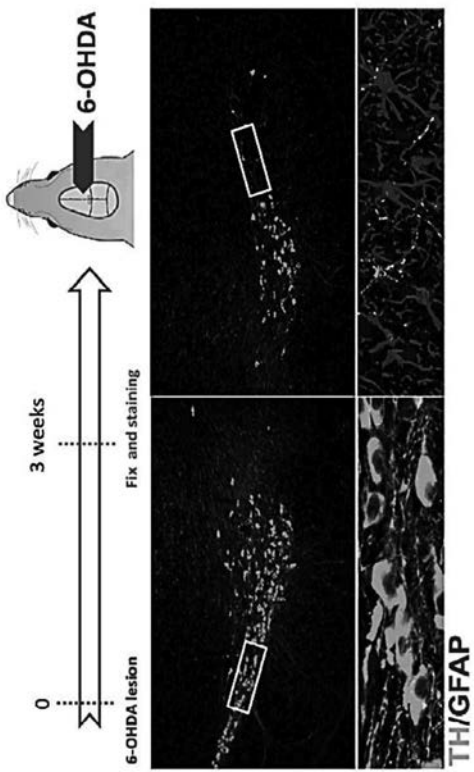
【 9 G 】



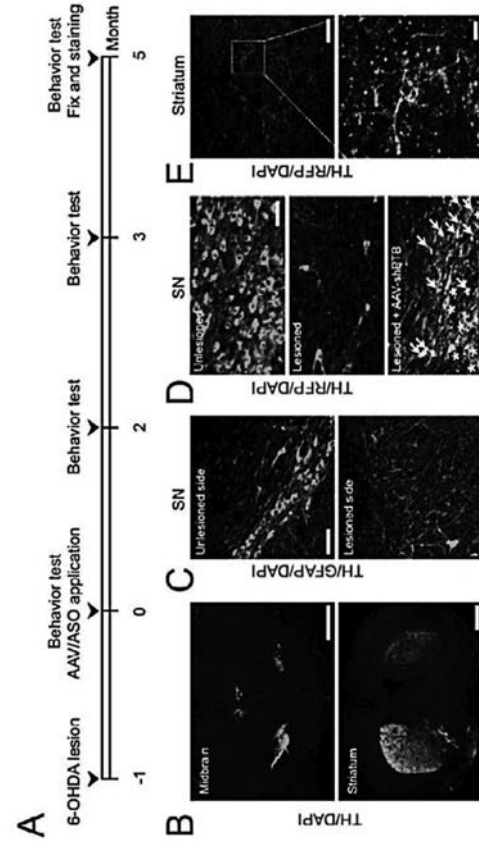
【 9 H - I 】



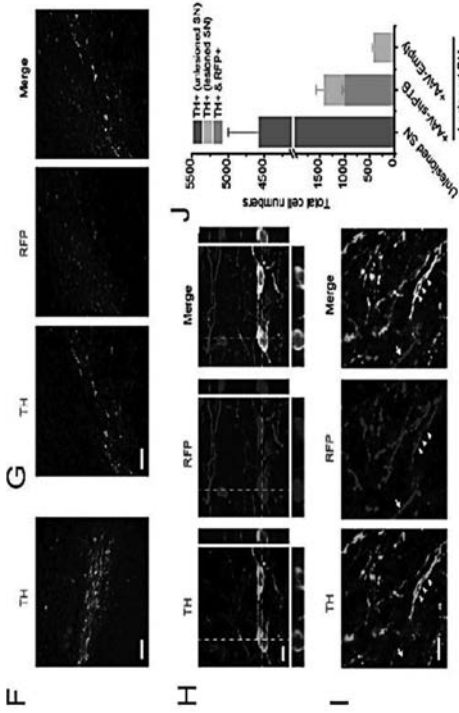
【 1 0 】



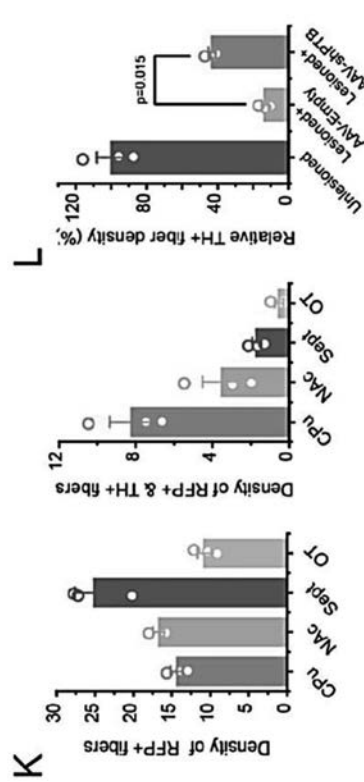
【 1 1 A - E 】



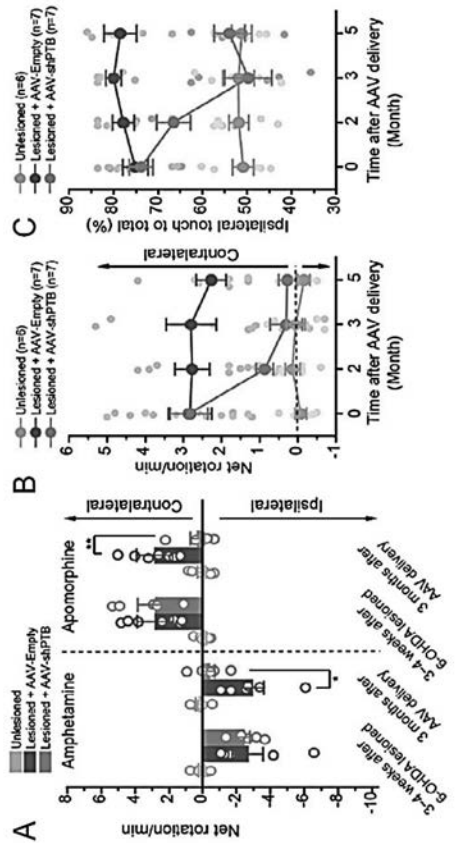
【 1 1 F - J 】



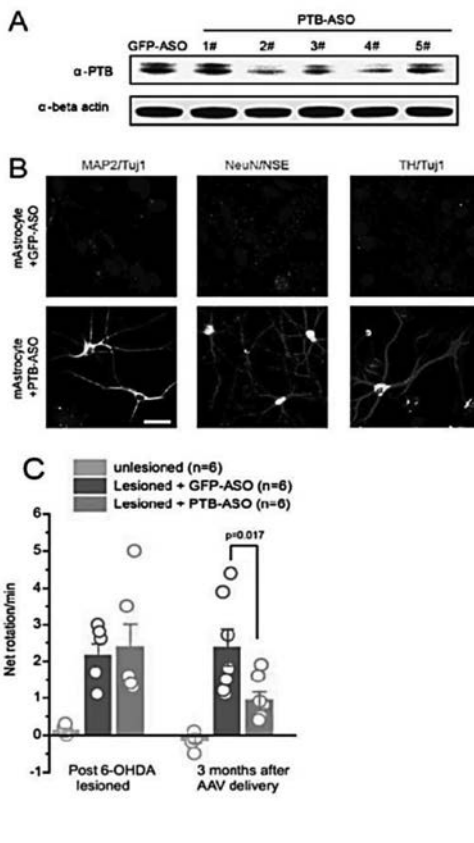
【 1 1 K - L 】



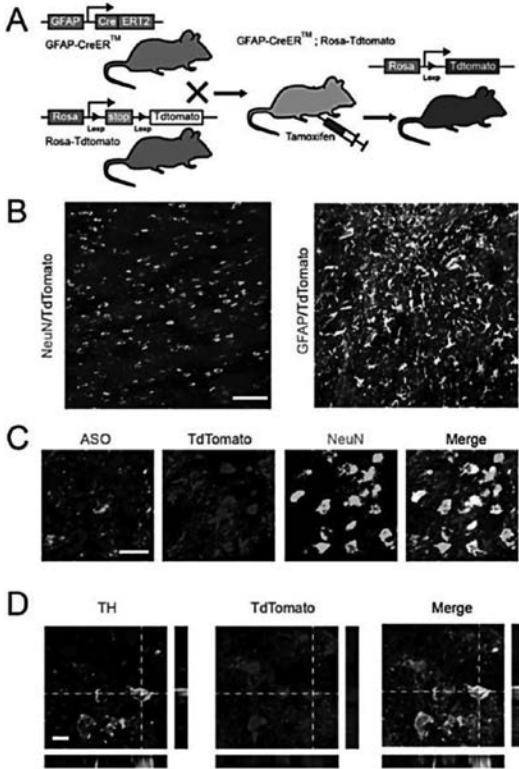
【 1 2 A - C 】



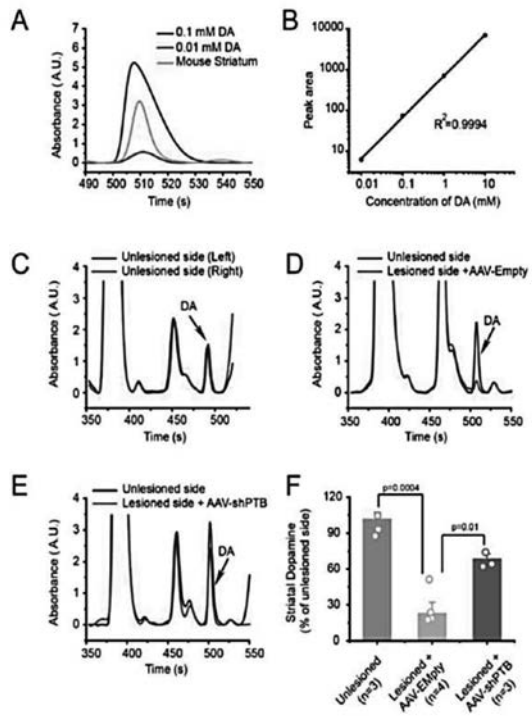
【 1 3 A - C 】



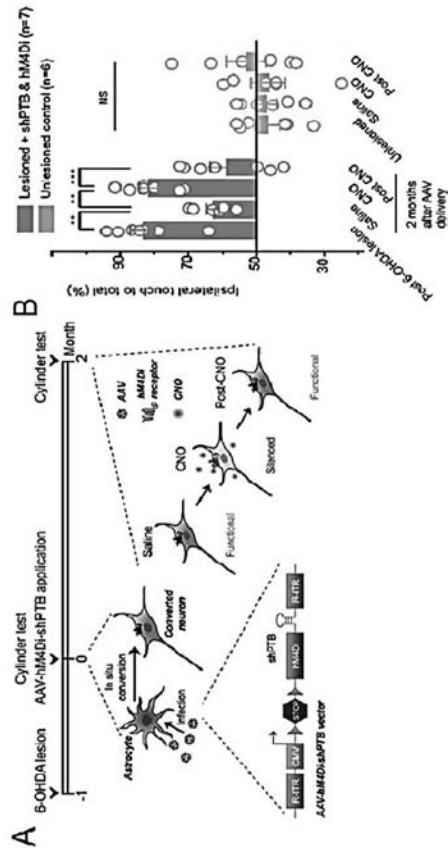
【 14 A - D 】



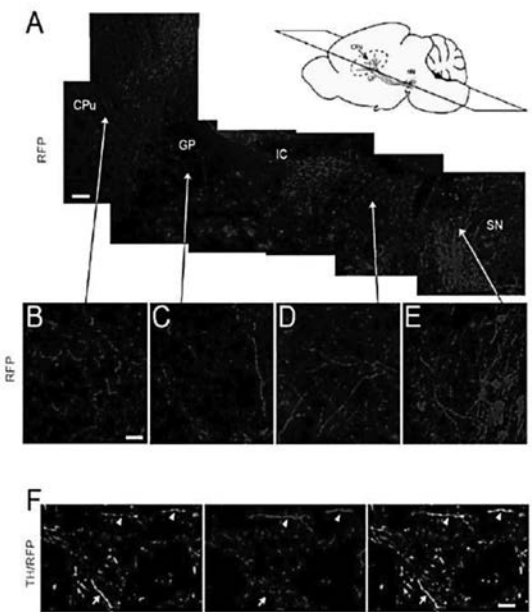
【 15 A - F 】



【 16 A - B 】



【 17 A - F 】



【配列表】

2021520200000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/027027

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 48/00; A61P 25/28; C12N 5/079; C12N 5/0793; C12N 15/11; C12N 15/113 (2019.01) CPC - C12N 5/0619; C12N 15/11; C12N 15/113; C12N 2310/14; C12N 2501/00; C12N 2506/00; C12N 2510/00; G01N 33/5058 (2019.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/4; 435/6; 435/368; 435/375; 435/377; 514/44A; 536/23.1; 536/24.5 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2015/0299698 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 22 October 2015 (22.10.2015) entire document	1, 4-6, 8-14, 16-21, 36, 47-49, 64-66, 68, 72, 84-88, 115-120
X — Y	US 2017/0002317 A1 (KAMATH et al) 05 January 2017 (05.01.2017) entire document	90-92 93
X — Y	WO 2017/079547 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 11 May 2017 (11.05.2017) entire document	94-97 89, 93
Y	XUE et al. "Sequential regulatory loops as key gatekeepers for neuronal reprogramming in human cells," Nat Neurosci, 25 April 2016 (25.04.2016), Vol. 19, Pgs. 807-815. entire document	2, 3
Y	US 2015/0250900 A1 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 10 September 2015 (10.09.2015) entire document	7
Y	DAMIER et al. "The substantia nigra of the human brain: II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease," Brain, 01 August 1999 (01.08.1999), Vol. 122, Pgs. 1437-1448. entire document	37-40, 50, 67
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:    "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 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance    "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date    "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 "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)    "&" document member of the same patent family "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 02 July 2019		Date of mailing of the international search report <b>23 JUL 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-1774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/027027

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 15, 22-35, 41-46, 51-63, 69-71, 73-83, 101-114  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2019/027027
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	— HEFFERNAN et al. "Design and screening of a glial cell-specific, cell penetrating peptide for therapeutic applications in multiple sclerosis" PLoS One, 25 September 2012 (25.09.2012), Vol. 7, e45501, Pgs. 1-12. entire document	98-100
A	— CAIAZZO et al. "Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts," 03 July 2011 (03.07.2011) Nature, Vol. 476, Pgs. 224-7 entire document	1-14, 16-21, 36-40, 47-50, 64-68, 72, 84-100, 115-121
A	US 2013/0203835 A1 (MANLEY et al) 08 August 2013 (08.08.2013) entire document	1-14, 16-21, 36-40, 47-50, 64-68, 72, 84-100, 115-121
A	— SURMEIER et al. "Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease," Nat Rev Neurosci, 20 January 2017 (20.01.2017), Vol. 18, Pgs. 101-113. entire document	1-14, 16-21, 36-40, 47-50, 64-68, 72, 84-100, 115-121
A	— XUE et al. "Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits," Cell, 11 January 2013 (11.01.2013), Vol. 152, Pgs. 82-96. entire document	1-14, 16-21, 36-40, 47-50, 64-68, 72, 84-100, 115-121

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/30	(2006.01)	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7105	(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 29/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/02	
A 6 1 P 25/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/04	(2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 25/20	(2006.01)	A 6 1 P 25/20	
C 1 2 N 15/113	(2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

- 1 . T W E E N
- 2 . T R I T O N

(72)発明者 シアンドン フー

アメリカ合衆国 9 2 0 6 7 カリフォルニア、ランチョサンタフェ、アベニータ・モリノ・ビエホ 1 6 6 0 6、私書箱 3 1 3 5

(72)発明者 ハオ チエン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア、サンディエゴ、リージェンツ ロード 8 1 7 4、アパートメント 1 0 2

Fターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 CA44

4C084 AA17 NA14 ZA02 ZA08 ZA12 ZA15 ZA16 ZA18 ZA36 ZA89

ZB26 ZB31 ZC39

4C086 AA01 AA02 EA16