

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7289033号
(P7289033)

(45)発行日 令和5年6月9日(2023.6.9)

(24)登録日 令和5年6月1日(2023.6.1)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	Z N A	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761		
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00		
請求項の数 6 (全21頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2020-550422(P2020-550422)	(73)特許権者	511288304 宮崎 徹 東京都新宿区河田町8-1 TWIn s 一般社団法人A I M医学研究所内
(86)(22)出願日	令和1年9月30日(2019.9.30)	(74)代理人	100080791 弁理士 高島 一
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/038530	(74)代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
(87)国際公開番号	WO2020/071318	(74)代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87)国際公開日	令和2年4月9日(2020.4.9)	(74)代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
審査請求日	令和4年1月13日(2022.1.13)	(74)代理人	100174296 弁理士 當麻 博文
(31)優先権主張番号	特願2018-186759(P2018-186759)	(74)代理人	100137729
(32)優先日	平成30年10月1日(2018.10.1)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 神経変性疾患治療剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸を含む、神経変性疾患の治療又は予防剤であって、ここで、前記AIMの生物学的活性が、マクロファージへのエンドサイトーシス活性を含む、神経変性疾患の治療又は予防剤。

【請求項2】

AIM又はAIM断片をコードする核酸が、ウイルスベクターに組込まれていることを特徴とする、請求項1記載の治療又は予防剤。

【請求項3】

ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターである、請求項2記載の治療又は予防剤。

【請求項4】

ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスである、請求項3記載の治療又は予防剤。

【請求項5】

アデノ随伴ウイルスが、AAV血清型5(AAV5)又はAAV血清型9(AAV9)である、請求項4記載の治療又は予防剤。

【請求項6】

神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭

型認知症、多系統萎縮症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、海馬硬化症、進行性ミオクローヌステんかん、及び歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症からなる群から選択される、請求項1～5のいずれか一項記載の治療又は予防剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経変性疾患の治療剤等に関し、詳細には、Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)を有効成分とする神経変性疾患の治療剤及びこれを用いた神経変性疾患の治療又は予防方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病や運動ニューロン病等の神経変性疾患は、特定の神経が変性し、脱落することにより、進行性かつ難治性の認知機能障害及び運動機能障害を呈する疾患である。神経変性疾患は種々知られているが、かかる神経変性疾患に共通した病理学的特徴は、異常なタンパク質の蓄積であり、この蓄積が神経変性の中心的な病態であると考えられている。そこで、神経変性疾患の治療又は予防アプローチとして、かかる異常なタンパク質の蓄積を除去又は抑制する手段の構築が検討されている。

【0003】

神経変性疾患に含まれる代表的な疾患の一つとしてアルツハイマー病が挙げられる。アルツハイマー病患者の脳内では、第一にアミロイドのプラーク形成が生じ、次いで、タウタンパク質のアセチル化と凝集やプロリルイソメラーゼPin1の喪失等が生じることが知られている。そこで、該疾患の初期段階におけるアミロイドの蓄積を除去する手段、及び/又は該タンパク質の蓄積を抑制する手段により、アルツハイマー病の治療及び/又は予防が可能となると考えられており、実際、アルツハイマー病の治療剤の候補となる物質が多数報告されている(特許文献1～3)。

20

【0004】

AIM(CD5Lとも称される)は、本発明者らが同定したマクロファージが特異的に産生し、マクロファージ自身のアポトーシスを抑制する因子であり(非特許文献1)、これまでにいくつかの疾患との関連が示唆されている。例えば、AIMは、肥満に伴い血中濃度が上昇し、CD36を介したエンドサイトーシスにより脂肪細胞に取り込まれ、蓄積している中性脂肪の分解(lipolysis)を誘導することから、抗肥満との関係が示唆されている(非特許文献2)。また、AIMは、中性脂肪の分解により脂肪細胞から遊離脂肪酸を放出させ、放出された脂肪酸が、toll様受容体の刺激を介して脂肪組織に慢性炎症を惹起/維持する。メタボリックシンドロームは、肥満に伴うインスリン抵抗性獲得がその基盤となるが、脂肪組織における慢性炎症が重要であることから、AIMがメタボリックシンドロームと関係があるとされている(非特許文献3)。本発明者らもまた、AIMが脂肪前駆細胞の成熟脂肪細胞への分化を抑制し、脂肪細胞における脂肪滴の分解を誘導することを明らかにし、AIMの肥満への適用の可能性を報告した(特許文献4)。さらに、本発明者らは、高カロリー食を負荷した肥満AIM knockout(KO)マウスが、肥満、脂肪肝、肝実質の線維化、発がんというヒトNASH病態に近似した病態を示すことを明らかにし、AIMの肝臓疾患への適用の可能性を報告した(特許文献5)。加えて、本発明者らは、両側性の一過性腎虚血再灌流を行ったAIM KOマウスに急性腎不全が生じ、壊死した尿細管細胞の蓄積とそれともなう腎障害の急速な進行と、全身状態の悪化が生じ、高い頻度の死亡が確認できたことを明らかにした。そして、発明者らは、該AIM KOマウスにAIMを投与したところ、BUN値が改善し、腎機能の急速な改善が認められ、それに伴う全身症状と死亡率の改善が認められることを示し、AIMの補充による急性腎不全の治療及び慢性腎疾患の予防又は治療の可能性を報告した(特許文献6)。しかし、これまでにAIMと神経変性疾患との関係に関する報告はない。

30

40

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0005】

【文献】特許5765857号公報

特許5692073号公報

国際公開第00/24392号

国際公開2010/140531号

国際公開2013/162021号

国際公開2015/119253号

【非特許文献】

【0006】

【文献】Miyazaki, J Exp Med 189:413-422, 1999

Kurokawa, Cell Metab 11:479-492, 2010

Kurokawa, PNAS 108:12072-12077, 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、AIMタンパク質を用いた神経変性疾患の新規治療方法又は予防方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題に対して鋭意検討した結果、(1)脳内のマクロファージであるマイクログリアはAIMを産生しないこと、(2)AIMは血液脳関門(BBB)を透過できないこと、(3)アルツハイマー病の疾患モデルマウス(5XFADマウス)の脳内に、組換えAIMタンパク質をマイクロインジェクションで投与すると、該AIMタンパク質は、アミロイドプラークに集積すること、(4)アデノ随伴ウイルスを用いて、5XFADマウスの海馬領域においてAIMを発現させることにより、アミロイドプラークが顕著に減少すること、(5)In vitroにおいて多量体のアミロイド に組換えAIMタンパク質を結合させると、脳由来のマイクログリアによる多量体のアミロイド の貪食が顕著に促進されること等を見出し、かかる知見に基づいてさらに研究を進めることによって本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

【0009】

[1] Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸を含む、神経変性疾患の治療又は予防剤。

[2] AIM又はAIM断片をコードする核酸が、ウイルスベクターに組込まれていることを特徴とする、[1]記載の治療又は予防剤。

[3] ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターである、[2]記載の治療又は予防剤。

[4] ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルスである、[3]記載の治療又は予防剤。

[5] アデノ随伴ウイルスが、AAV血清型5(AAV5)又はAAV血清型9(AAV9)である、[4]記載の治療又は予防剤。

[6] 神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、多系統萎縮症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、海馬硬化症、進行性ミオクロームステんかん、及び歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症からなる群から選択される、[1]～[5]のいずれか記載の治療又は予防剤。

[7] AIM、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は、該AIM又はAIM断片をコードする核酸を対象に投与することを含む、神経変性疾患の治療又は予防方法。

[8] AIM又はAIM断片をコードする核酸が、ウイルスベクターに組込まれていることを

10

20

30

40

50

特徴とする、[7] 記載の治療又は予防方法。

[9] ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及び、センダイウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターである、[8] 記載の治療又は予防方法。

[10] ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルスである、[8] 記載の治療又は予防方法。

[11] アデノ随伴ウイルスが、AAV血清型5 (AAV5) 又はAAV血清型9 (AAV9) である、[10] 記載の治療又は予防方法。

[12] 神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、多系統萎縮症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、海馬硬化症、進行性ミオクロームスτένかん、及び歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症からなる群から選択される、[7] ~ [11] のいずれか記載の治療又は予防方法。

10

[13] 神経変性疾患の治療又は予防方法における使用のための、Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸。

[14] AIM又はAIM断片をコードする核酸が、ウイルスベクターに組込まれていることを特徴とする、[13] 記載のApoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸。

[15] ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターである、[2] 記載のApoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸。

20

[16] ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルスである、[15] 記載のApoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸。

[17] アデノ随伴ウイルスが、AAV血清型5 (AAV5) 又はAAV血清型9 (AAV9) である、[16] 記載のApoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸。

[18] 神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、多系統萎縮症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、海馬硬化症、進行性ミオクロームスτένかん、及び歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症からなる群から選択される、[13] ~ [17] のいずれか記載のApoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸。

30

[19] 神経変性疾患の治療又は予防用の医薬の製造における、Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸の使用。

[20] AIM又はAIM断片をコードする核酸が、ウイルスベクターに組込まれていることを特徴とする、[19] 記載の使用。

40

[21] ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターである、[20] 記載の使用。

[22] ウイルスペクターが、アデノ随伴ウイルスである、[21] 記載の使用。

[23] アデノ随伴ウイルスが、AAV血清型5 (AAV5) 又はAAV血清型9 (AAV9) である、[22] 記載の使用。

[24] 神経変性疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、多系統萎縮症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄

50

小脳変性症、海馬硬化症、進行性ミオクローヌステんかん、及び歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症からなる群から選択される、[19] ~ [23] のいずれか記載の使用。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、対象の脳における異常タンパク質の蓄積を抑制することが可能となる。その結果、アルツハイマー病をはじめとする異常タンパク質の蓄積に起因する神経変性疾患の治療又は予防が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】脳におけるAIMの発現確認を、マウス脳全体のライセ ートを用いたウエスタンブロットティングによって検討した。野生型C57BL/6マウス (Lane 1: Wild-type)、AIM欠損マウス (Lane 2: AIM-KO) の脳ライセ ート (20 ng/lane) 及びポジティブコントロールとして組換えAIMタンパク質 (50 ng) をSDS-PAGEで分画し、抗AIM抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。野生型マウス、AIM欠損マウスとも、脳にAIMの発現は認められなかった。

10

【図 2】脳におけるAIMの発現確認を、免疫組織化学的に検討した。野生型C57BL/6マウスの脳組織切片 (縦切) を、抗AIM抗体を用い免疫染色を行った。ペルオキシダーゼ反応を用いたDAB発色法にて検出したが、AIMの発現は認められなかった。

【図 3】野生型C57BL/6マウス (WT) の脳全体 (Lane 1)、AIM欠損マウス (AIM-KO) の脳全体 (Lane 2)、WTマウスの肝臓 (ポジティブコントロール、Lane 3)、AIM-KOマウスの肝臓 (Lane 4)、WTマウス新生児脳から単離し増殖させたマイクログリア (Lane 5)、AIM-KOマウス新生児脳から単離し増殖させたマイクログリア (Lane 6)、それぞれからトータルRNAを抽出し、quantitative RT-PCR法によってAIMの発現を肝臓における発現を1としたrelative expressionにて解析した。その結果、脳全体及びマイクログリア単独でもAIMの有意な発現は認められなかった。

20

【図 4】5XFADマウスの右脳の海馬領域に、PBSに溶解した組換えマウスAIM (rAIM) 10 μ g (P B S 10 μ Lに溶解)をマイクロインジェクションし、3時間後に脳組織を単離し、切片にしたあと、AIM (緑) とアミロイドA (赤) に対する抗体を用いて免疫染色法によって共染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。AIMとアミロイドA プラークは共局在している部分が多くみられた (上図：赤と緑が重なって黄色になっている部分、及び赤と緑が同じ部位に見える部分)。また、他の部分を強拡大 (x400) し、AIMとアミロイドA をそれぞれ別個に撮影すると (下図)、その共局在がより明確に示された。

30

【図 5】8週齢の5XFADマウスにマウスAIMを発現するadeno-associated virus (AAV) 血清型5 (AAV5) と空のAAV5 (mock)を、同じウイルス量でマウスの海馬領域にマイクロインジェクションした (n=7~8)。15週間後に脳を摘出し切片を抗アミロイドA 抗体で染色し、海馬全体の面積に対するアミロイドA 陽性部分 (アミロイドプラーク) の面積を%で比較した。AIMを発現するAAVを感染させた個体は、mock AAVを感染させた個体と比較して、有意なアミロイドプラークの減少を認めた (T-test)。

【図 6】N末端をCy5で標識したAb (アミロイド) 42ペプチドを多量体化させ、AIM-KOマウス新生仔脳より単離・培養したマイクログリア細胞を含む細胞集団にrAIM (50 mg/mL)有り (+ rAIM) 無し (+ PBS) の条件で、DMEM培地+ 10% FBS中で37 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。細胞を洗浄した後、抗F4/80抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。F4/80高陽性であるマイクログリアにおける、Cy5の蛍光強度、すなわちAb42多量体の取り込み量を解析したところ、rAIM存在下では、非存在下に比べて、Cy5陽性のマイクログリアが顕著に (16% ~ 84%) 増加した。

40

【図 7】7週齢の、トランスジーンを持たない (Non-TG) 5XFADマウスとTG (+) 5XFADマウスにおける、脳全体に対するA (アミロイド) プラーク面積 (%) を比較したグラフである。

【図 8】7週齢の、Non-TG 5XFADマウス、TG (+) 5XFADマウス、および野生型C57BL/6マウスの海馬領域における、AIMとA プラークの共在を示す写真図である。

50

【図9】ヒトPDGF-B promoter下で脳神経細胞にマウスAIMを発現するトランスジーンのマップを示す図である。それぞれのフラグメントの長さをKb(キロ・ベース)で示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

1. 神経変性疾患の治療又は予防剤

本発明は、AIM、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は該AIM又はAIM断片をコードする核酸を含む、神経変性疾患の治療又は予防剤(以下、「本発明の剤」と称することがある)を提供する。

【0014】

本発明に用いられるAIMは、配列番号1(ヒト由来AIMタンパク質のアミノ酸配列)で表されるアミノ酸配列と同一、又はこれと実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。AIMは、例えば、温血動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジー、トリなど)の免疫細胞であるマクロファージから単離・精製されるタンパク質であってよい。また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成されたタンパク質であってよいし、あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を含む核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質であってよい。本発明に用いられるAIMの由来となる生物種は、神経変性疾患を罹患する対象の生物種と一致させることが好ましい場合がある。例えば、本発明の剤の適用対象がヒトである場合は、ヒトAIMを用いることが好ましい。

【0015】

配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性又は類似性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸及び類似アミノ酸残基の割合(%)を意味する。また、「類似性」とは、2つのアミノ酸配列をアラインメントしたときにその両方の配列に同一又は類似アミノ酸残基が存在する位置の数の全長アミノ酸残基数に対する割合(%)を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸(Phe、Trp、Tyr)、脂肪族アミノ酸(Ala、Leu、Ile、Val)、極性アミノ酸(Gln、Asn)、塩基性アミノ酸(Lys、Arg、His)、酸性アミノ酸(Glu、Asp)、水酸基を有するアミノ酸(Ser、Thr)、側鎖の小さいアミノ酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Met)などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない(即ち、保存的アミノ酸置換である)ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている(例えば、Bowieら、Science, 247: 1306-1310(1990)を参照)。

【0016】

本明細書におけるアミノ酸配列の同一性又は類似性は、同一性又は類似性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。アミノ酸配列の同一性又は類似性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877(1993)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはNBLAST及びXBLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれている(Altschulら、Nucleic Acids Res., 25:3389-3402(1997))、Needlemanら、J. Mol. Biol., 48: 444-453

10

20

30

40

50

(1970)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている]、Myers及びMiller, CABIOS, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはCGC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている]、Pearsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム [該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている] 等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。より好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

10

【0017】

配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質としては、例えば、前記の配列番号1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、且つ、野生型のAIMが有する生物学的活性と実質的に同質の活性を有するタンパク質が挙げられる。野生型のAIMが有する生物学的活性としては、例えば、マクロファージ(マイクログリアを含む)へのエンドサイトーシス活性、マクロファージのアポトーシス抑制活性、動脈硬化の維持/促進活性、脂肪細胞分化抑制活性、脂肪細胞の脂肪滴融解活性、脂肪細胞縮小活性、CD36結合活性、脂肪細胞へのエンドサイトーシス活性、FAS結合活性、FAS機能抑制活性、抗肥満活性、肝疾患(脂肪肝、NASH、肝硬変、肝がん)の予防又は治療活性、腎疾患(急性腎不全、慢性腎炎、慢性腎不全、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症、腎硬化症、IgA腎症、高血圧性腎症、膠原病に伴う腎症又はIgM腎症)の予防又は治療活性などが挙げられるが、本発明においては、特にマクロファージへのエンドサイトーシス活性が好ましい指標となり得る。該活性は、本願の実施例において詳述される、インビトロにおけるマクロファージ(又はマイクログリア)の貪食試験を用いて確認することができるが、これに限定されるものではない。また、本明細書において「実質的に同質」とは、それらの活性が定性的(例えば、生理学的又は薬理的)に同じであることを示す。したがって、前記活性は同等であることが好ましいが、これらの活性の程度(例えば、約0.1~約10倍、好ましくは約0.5~約2倍)やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。前記活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

20

30

【0018】

また、本発明に用いられるAIMには、例えば、(1)配列番号1で表されるアミノ酸配列のうち1又は2個以上(好ましくは、1~100個程度、好ましくは1~50個程度、さらに好ましくは1~10個程度、特に好ましくは1~数(2、3、4もしくは5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号1で表されるアミノ酸配列に1又は2個以上(好ましくは、1~100個程度、好ましくは1~50個程度、さらに好ましくは1~10個程度、特に好ましくは1~数(2、3、4もしくは5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3)配列番号1で表されるアミノ酸配列に1又は2個以上(好ましくは、1~50個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~数(2、3、4もしくは5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号1で表されるアミノ酸配列のうち1又は2個以上(好ましくは、1~50個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは1~数(2、3、4もしくは5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、又は(5)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含むタンパク質なども含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失又は置換されている場合、その挿入、欠失又は置換の位置は、該タンパク質の所望の生物学的活性(例、マクロファージ(マイクログリアを含む)へのエンドサイトーシス活性)が保持される限り特に限定されない。

40

【0019】

本発明のAIMは、好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するヒトAIMタンパク質(GenBankアクセッション番号:AAD01446)、あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ[例えば、GenBankにアクセッション番号:AAD01445として登録され

50

ているマウスホモログ等]であり、より好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるヒトAIMタンパク質である。

【0020】

本明細書において、タンパク質及びペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)で記載される。配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質をはじめとする、本発明に用いられるAIMは、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO-)、アミド(-CONH₂)又はエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基；例えば、フェニル、-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基；-ナフチルメチルなどの-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

【0021】

本発明に用いられるAIMがC末端以外にカルボキシル基(又はカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化又はエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

【0022】

さらに、本発明に用いられるAIMには、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

【0023】

本明細書において「AIM」とは、野生型のAIMのみならず、野生型のAIMの生物学的活性と実質的に同質又は向上した活性を有するこれらの改変体等をも含む概念とする。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。また、「実質的に同質の活性」の測定はAIMの場合と同様に行なうことができる。

【0024】

AIMの改変体の一例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない。

本発明の変異型ヒトAIMは、好ましくは、以下の(1b)から(5b)のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

(1b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号191のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列。

(2b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号300のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列。

(3b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号191のシステインがセリンに置換され、かつ配列番号1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号300のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列。

(4b) (1b)から(3b)のいずれか1つのアミノ酸配列と実質的に同一であって、かつ(1b)から(3b)のいずれか1つのアミノ酸配列に存在するシステインおよび該置換されたセリンは残されている、アミノ酸配列。

(5b) (1b)から(3b)のいずれか1つのアミノ酸配列に存在するシステインおよび該置換されたセリン以外の箇所において、さらに1から数個のアミノ酸を欠失、付加、挿入または置換あるいはその組み合わせを含むアミノ酸配列。

尚、野生型組換えAIMと同等又は向上した機能を有するAIM改変体については、特願20

10

20

30

40

50

17-220733等に掲載されるものを用いることができる。

【0025】

また、本発明の剤の成分としては、AIMのみならず、AIMの生物学的活性を有するAIM断片を用いることもできる。AIM断片が野生型AIMの生物学的活性を有するか否かは、前記した方法により決定すればよい。

【0026】

AIM断片の一例としては、例えば、インタクトなAIMタンパク質は、システインを多く含む3つのSRCR (Scavenger-Receptor Cysteine-Rich) ドメイン含んでいることから、それぞれのSRCRドメインを、野生型AIMが有する生物学的活性と実質的に同質の活性を有するAIM断片の例として挙げる事ができる。より具体的には、例えば、配列番号1
10
で表されるアミノ酸配列のうち、SRCR1ドメイン (配列番号1で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号24~125)、SRCR2ドメイン (配列番号1で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号138~239)、SRCR3ドメイン (配列番号1で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号244~346) をそれぞれ含む部分アミノ酸配列やSRCRドメインの任意の組合せを含む部分アミノ酸配列を有するものなどを、AIM断片として用いることができる。野生型AIMの生物学的活性と実質的に同質の活性を有するAIM断片は、上記の機能ドメインを含む限りそのサイズに特に制限はないが、好ましくは50個以上の部分アミノ酸配列を含むもの、より好ましくは100個以上の部分アミノ酸配列を含むもの、さらに好ましくは200個以上の部分アミノ酸配列を含むものが挙げられる。該部分アミノ酸配列は
20
一個の連続した部分アミノ酸配列であってもよく、あるいは不連続な複数の部分アミノ酸配列が連結されたものであってもよい。

【0027】

また、本発明に用いられるAIM断片は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)又はエステル(-COOR)の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、AIMについて前記したと同様のものが挙げられる。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基 (又はカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化又はエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、C末端のエステルと同様のものなどが用いられる。

【0028】

さらに、本発明に用いられるAIM断片には、上記したAIMと同様に、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適切な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

【0029】

本発明に用いられるAIM (AIM断片を含む) は、塩の形態であってもよい。例えば、生理学的に許容される酸 (例：無機酸、有機酸) や塩基 (例：アルカリ金属塩) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸) との塩、あるいは有機酸 (40
例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸) との塩などが用いられる。

【0030】

AIMは、前述した哺乳動物のマクロファージから自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。具体的には、哺乳動物のマクロファージをホモジナイズし、低速遠心により細胞デブリを除去した後、上清を高速遠心して細胞膜含有画分を沈澱させ、該上清を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー等に付すことによりAIM又はその塩を調製することができる。

【0031】

10

20

30

40

50

AIM (AIM断片を含む) は、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。AIMを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするタンパク質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の(1)及び(2)に記載された方法に従って行われる。

(1)M. Bodanszky及びM. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)

(2)Schroeder及びLuebke, The Peptide, Academic Press, New York(1965年)

【 0 0 3 2 】

このようにして得られたAIMは、公知の精製法により精製単離することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

【 0 0 3 3 】

上記方法で得られるAIMが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にAIMが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体又は他の塩に変換することができる。

【 0 0 3 4 】

さらに、AIMは、それをコードする核酸を含有する形質転換体を培養し、得られる培養物からAIMを分離精製することによって製造することもできる。AIM又はAIM断片をコードする核酸は、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAである。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNA又はDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(即ち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(即ち、非コード鎖)であってもよい。

【 0 0 3 5 】

AIM (AIM断片を含む) をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、温血動物(例えば、ヒト、ウシ、サル、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ハムスター、トリなど)のマクロファージ由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。AIM又はAIM断片をコードするゲノムDNAであれば、前記動物のあらゆる細胞[例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、臍細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、又はこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など]もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織[例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、骨髄、副腎、皮膚、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織(例、褐色脂肪組織、白色脂肪組織)、骨格筋など]より調製したゲノムDNA画分を鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction(以下、「PCR法」と略称する)によって直接増幅することができる。AIM又はAIM断片をコードするcDNAであれば、マクロファージより調製した全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、PCR法及びReverse Transcriptase-PCR(以下、「RT-PCR法」と略称する)によって直接増幅することもできる。あるいは、AIM又はそのペプチド断片をコードするゲノムDNA及びcDNAは、上記したゲノムDNA及び全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリー及びcDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション法又はPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリ

10

20

30

40

50

ーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。

【0036】

AIMをコードする核酸としては、例えば、配列番号2で表される塩基配列と同一又は実質的に同一な塩基配列を含む核酸などが挙げられる。配列番号2で表される塩基配列と実質的に同一な塩基配列を含む核酸としては、例えば、配列番号2で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の同一性又は類似性を有する塩基配列を含有し、前記したAIMと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする核酸などを用いることができる。一態様において、配列番号2で表される塩基配列と実質的に同一な塩基配列を含む核酸は、配列番号2で表される塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の同一性を有する塩基配列を含有し、且つ、前記したAIMと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする核酸である。AIMをコードする核酸には、適用対象となる生物での発現効率を高める目的で、コドン最適化を行った核酸配列等も含まれる。

10

【0037】

本明細書における塩基配列の同一性又は類似性は、同一性又は類似性計算アルゴリズムNCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;フィルタリング=ON;マッチスコア=1;ミスマッチスコア=-3)にて計算することができる。塩基配列の同一性又は類似性を決定するための他のアルゴリズムとしては、上記したアミノ酸配列の相同性計算アルゴリズムが同様に好ましく例示される。

20

【0038】

AIMをコードする核酸は、好ましくは配列番号2で表される塩基配列で示されるヒトAIMタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸(GenBankアクセッション番号:AF011429)あるいは他の哺乳動物におけるそのホモログ[例えば、GenBankにアクセッション番号:AF011428として登録されているマウスホモログ等]である。

【0039】

さらに、本発明の剤の成分としては、AIM、又はAIMの生物学的活性を有するAIM断片をコードする核酸を用いることもできる。

30

【0040】

本発明に用いられるAIM又はAIM断片をコードする核酸は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むペプチドをコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。具体的には、AIM断片をコードする核酸としては、例えば、(1)配列番号2で表される塩基配列の部分塩基配列を含む核酸、又は(2)配列番号2で表される塩基配列の部分塩基配列を含む核酸と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の同一性又は類似性を有する塩基配列を含み、前記したAIMと実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする核酸などが用いられる。

【0041】

AIM又はAIM断片をコードする核酸は、該AIM又はAIM断片をコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、又は適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、AIMの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジентな条件に従って行なうことができる。

40

50

【 0 0 4 2 】

ハイストリンジェントな条件としては、例えば、6×SSC (sodium chloride/sodium citrate) 中45 でのハイブリダイゼーション反応の後、0.2×SSC/0.1%SDS中65 での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【 0 0 4 3 】

AIM又はAIM断片をコードする核酸は、脳特異的に発現するプロモーターを有する発現ベクター等に機能的に連結させてもよい。AIM又はAIM断片をコードする核酸を含む発現ベクターを脳内に送達することで、脳特異的にAIM又はAIM断片を発現させることができる。脳特異的なプロモーターには、SCG10、GFAPプロモーター、synapsin 1プロモーター、tubulin 1プロモーター、calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIプロモーター、neuron-specific enolaseプロモーター、PDGF(platelet-derived growth factor beta)- chainプロモーター等が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 4 】

また、好ましい一態様において、AIM又はAIM断片をコードする核酸をウイルスベクターに搭載してもよい。好適なウイルスベクターとしては、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びセンダイウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療における利用を考慮すれば、導入遺伝子を長期にわたり発現させられる点や非病原性ウイルス由来で安全性が高い等の理由から、アデノ随伴ウイルスが好ましい。また、アデノ随伴ウイルスの血清型としては、本発明の所望の効果が得られる限りは、特に限定されず、血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のいずれを用いてもよい。特に神経組織で発現効率が高いことを考慮すると、血清型1、2、5、9、又は10が好ましく(AAVの多様な血清型に関してはWO2005/033321を参照)、さらに、高い発現効率の観点からAAV5が、血管脳関門を効率よく透過する特性を備える観点から、血清型9(AAV9)がより好ましい(Iwata N et al, Sci Rep. 2013;3:1472)。なお、本発明に用いられるウイルスベクターには、その派生物も含まれる。ウイルスベクターの派生物とは、カプシドを改変したものなどが公知であり、特にAAVの派生物としては例えば、WO2012/057363等が開示されるものが例示されるがこれらに限定されない。

【 0 0 4 5 】

ウイルスベクターにAIM又はAIM断片をコードする核酸を搭載する際に、AIM又はAIM断片が目的とする脳内において特異的に発現させる目的で、AIM又はAIM断片をコードする核酸の発現を制御するプロモーターとして、脳特異的なプロモーターを用いることが好ましい。かかる脳特異的なプロモーターには、SCG10、GFAPプロモーター、synapsin 1プロモーター、tubulin 1プロモーター、calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIプロモーター、neuron-specific enolaseプロモーター、PDGF(platelet-derived growth factor beta)- chainプロモーター等が含まれるが、これらに限定されない。また、プロモーターに加えて、Poly A付加シグナル、Kozakコンセンサス配列、タグ配列、リンカー配列、及びNLS等の公知の配列を、目的に応じて適宜AIM又はAIM断片をコードする核酸と合わせてウイルスベクターに搭載してもよい。

【 0 0 4 6 】

AIM又はAIM断片をコードする核酸を含むウイルスベクターは、公知の方法により調製することができる。簡潔には、AIM又はAIM断片をコードする核酸と、必要に応じて、所望の機能を有する核酸(例、脳特異的なプロモーター等)を挿入したウイルス発現用プラスミドベクターを調製し、これを適切な宿主細胞にトランスフェクトし、本発明のポリヌクレオチドを含むウイルスベクターを一過性に産生させ、これを回収すればよい。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

例えばAAVベクターを調製する場合、まず、野生型のAAVのゲノム配列のうち両端のITRを残し、それ以外のRepタンパク質及びカプシドタンパク質をコードするDNAの代わりに、AIM又はAIM断片をコードする核酸を挿入したベクタープラスミドを作成する。一方で、ウイルス粒子の形成に必要とされるRepタンパク質及びカプシドタンパク質をコードするDNAは、別のプラスミドに挿入する。さらに、AAVの増殖に必要なアデノウイルスのヘルパー作用を担う遺伝子(E1A、E1B、E2A、VA、及びE4orf6)を含むプラスミドを、アデノウイルスヘルパープラスミドとして作成する。これら3種のプラスミドを、宿主細胞にコトランスフェクションすることにより、該細胞内において組換えAAV(即ち、AAVベクター)が産生されるようになる。宿主細胞としては、前記ヘルパー作用を担う遺伝子の遺伝子産物(タンパク質)のうちの一部を供給し得る細胞(例えば、293細胞等)を用いることが好ましく、そのような細胞を用いる場合には、該宿主細胞より供給され得るタンパク質をコードする遺伝子を、前記アデノウイルスヘルパープラスミドに搭載する必要がない。産生されたAAVベクターは核内に存在するため、宿主細胞を凍結融解して回収し、塩化セシウムを用いた密度勾配超遠心法やカラム法等により、分離及び精製を行うことにより、所望のAAVベクターが調製される。

10

【0048】

本発明の剤を用いて対象の神経変性疾患を治療又は予防する場合、その投与経路は有効成分となるAIMタンパク質の脳内への送達が実現される限り特に限定されない。一態様において、本発明の剤に含有される成分がAIMタンパク質である場合は、AIMタンパク質が血管脳関門(Blood-Brain Barrier、BBB)を透過しないことを考慮して、対象の頭蓋骨にピンホールを開け、脳組織に本発明の剤をマイクロインジェクション等の自体公知の方法により直接導入してもよい。或いは、血管脳関門を透過可能に改変されたりリポソーム中にAIMタンパク質を封入し、これを静脈投与等により対象に投与することによっても、AIMタンパク質を脳内へ送達することができる。また、本発明の剤に含有される成分がAIMタンパク質をコードする核酸である場合も、対象の頭蓋骨に設けたピンホールから直接本発明の剤を導入する方法や前述のリポソームを用いた方法等により脳内にAIMタンパク質をコードする核酸を送達することができる。

20

【0049】

本発明の剤の成分が、AIMをコードする核酸を搭載したウイルスベクターである場合は、対象の頭蓋骨にピンホールを設け、該ピンホール経路で脳組織に本発明の剤をマイクロインジェクション等の自体公知の方法により直接導入することができる。また、上述の通り、AAV9を用いれば、対象の頭蓋骨にピンホールを設けることなく、本発明の剤を循環血に注入するのみでAIMを対象の脳内特異的に発現させることができるため、非常に好ましい。即ち、リポソームやAAV9等の血管脳関門を透過し得る手段を用いた態様においては、本発明の剤は、非経口に投与され、例えば、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、腹腔内投与することができる。

30

【0050】

本発明の剤が非経口投与用に製剤化される場合、例えば、注射剤、坐剤等として製剤化できる。注射剤は、静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、AIM、AIMをコードする核酸、及び/又はAIMをコードする核酸を搭載したウイルス等の成分を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50(polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンフルに充填されることが好ましい。

40

50

【 0 0 5 1 】

本発明の剤により治療又は予防され得る神経変性疾患は、脳内における異常タンパク質の蓄積に起因するものであれば特に限定されない。尚、本明細書における「異常タンパク質」とは、遺伝子変異や化学修飾等に起因する立体構造変化等により本来の生物学的機能が失われ、低減し、亢進し、又は変化した結果、疾患の原因となり得るタンパク質を含み、また、個としては正常なタンパク質と同一であっても、異常に凝集又は蓄積し、全体として異常なタンパク質凝集体となり、結果として疾患の原因となり得るタンパク質凝集体も含む。本発明の剤を用いて治療又は予防され得る神経変性疾患には、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症、多系統萎縮症、ピック病、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、海馬硬化症、進行性ミオクローヌステんかん、及び歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症が含まれるが、これらに限定されない。一態様において、本発明の剤の適用疾患は、アルツハイマー病である。

10

【 0 0 5 2 】

本発明の剤の対象への投与量は、治療及び/又は予防有効量である限り特に限定されず、有効成分の種類及び形態、対象の年齢及び体重、投与スケジュール、並びに投与方法等に応じて適宜最適化すればよい。

【 0 0 5 3 】

本発明の剤を神経変性疾患を罹患する対象に適用することにより、AIM又はAIM断片が、対象の脳内に送達され、又は、対象の脳内において発現する。脳内のAIM又はAIM断片は、脳内に存在する異常タンパク質に結合し、該タンパク質を除去対象としてマーキングする。該マーキングされた異常タンパク質は、マイクログリアによる貪食により、速やかに脳内より除去される。その結果、対象における神経変性疾患を治療及び/又は予防することが可能となる。

20

【 0 0 5 4 】

尚、本明細書における疾患の「治療」には、疾患の治癒のみならず、疾患の寛解および疾患の程度の改善も含まれ得る。

【 0 0 5 5 】

また、本明細書における疾患の「予防」には、疾患の発症を防ぐことに加えて、疾患の発症を遅らせることが含まれる。加えて、本明細書における疾患の「予防」には、治療後の該疾患の再発を防ぐこと、または治療後の該疾患の再発を遅らせることも含まれ得る。

30

【 0 0 5 6 】

2. 神経変性疾患の治療又は予防方法

本発明はまた、AIM、AIMの生物学的活性を有するAIM断片、又は、該AIM又はAIM断片をコードする核酸を対象に投与することを含む、神経変性疾患の治療又は予防方法（以下、「本発明の方法」と称することがある）を提供する。

【 0 0 5 7 】

本発明の方法における、有効成分として用いられるAIM等、各成分毎の投与手段等については、「1. 神経変性疾患の治療又は予防剤」で説明したものと同様である。

【 0 0 5 8 】

本発明の方法を適用する対象には、神経変性疾患を罹患し得るあらゆる生物が含まれ得、具体的には、ヒト、ウシ、サル、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ハムスター、トリなどの温血動物が例示される。なお、上述した通り、適用対象と投与されるAIM等の由来とは一致させておくことが好ましい。

40

【 0 0 5 9 】

本発明の好ましい一態様において、AIMをコードする核酸を搭載したウイルスベクターとすることもできる。用い得るウイルスベクター等については、「1. 神経変性疾患の治療又は予防剤」で説明したものと同様である。

【 0 0 6 0 】

また、本発明の方法により治療又は予防される神経変性疾患もまた「1. 神経変性疾患

50

の治療又は予防剤」で説明したものと同様である。

【0061】

本発明の方法におけるAIM等の各成分の対象への投与量は、治療及び/又は予防有効量である限り特に限定されず、有効成分の種類及び形態、対象の年齢及び体重、投与スケジュール、並びに投与方法等に応じて適宜最適化すればよい。

【0062】

以下の実施例において本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの例によってなんら限定されるものではない。

【実施例】

【0063】

[実施例1]野生型マウスの脳におけるAIMタンパク質の発現の確認

野生型C57BL/6マウス (Lane 1: Wild-type)、AIM欠損マウス (Lane 2: AIM-KO) の脳全体をLysis Buffer中でhomogenizeしてライセートを作製し、タンパク質分量にして20 ngを、ポジティブコントロールのrAIMタンパク質 (50 ng) とともにSDS-PAGE上で分画した後、polyvinylidene fluoride (PDVF)膜に転写し抗AIM抗体 (ウサギ抗マウスAIM抗血清) を用いウエスタンブロッティングを行った。

【0064】

結果を図1に示す。図1に示される通り、野生型マウス、AIM欠損マウスとも、脳においてAIMの発現は認められなかった。

【0065】

[実施例2]野生型マウスの脳の免疫染色

野生型C57BL/6マウスの脳組織を4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィンブロック化した後、脳の主要な部位を包括する4 μm厚の切片を作製した。脱パラフィン処理をしたのち、抗AIM抗体 (ウサギ抗マウスAIM抗血清: 免疫染色に使用した実績のある抗体) を用いて免疫染色を行い、ペルオキシダーゼ反応を用いたDAB発色法にて検出を試みた。

【0066】

結果を図2に示す。図2に示される通り、野生型マウスの脳全体において、AIMの発現は認められなかった。

【0067】

[実施例3]野生型マウスの脳におけるAIM mRNAの確認

野生型C57BL/6マウス (WT) の脳全体 (Lane 1)、AIM欠損マウス (AIM-KO) の脳全体 (Lane 2)、WTマウスの肝臓 (ポジティブコントロール、Lane 3)、AIM-KOマウスの肝臓 (Lane 4)、WTマウス新生児脳から単離し増殖させたマイクログリア (Lane 5)、同AIM-KOのマイクログリア (Lane 6)、それぞれからRNAを抽出し、quantitative RT-PCR法によってAIMの発現を解析した。肝臓における発現を1とし、各検体における発現をrelative expressionとして数値化した。

【0068】

結果を図3に示す。図3に示される通り、野生型マウスの脳全体、及び脳内のマイクログリアのいずれにおいてもAIMのmRNAの転写は認められなかった。

【0069】

実施例1~3の結果をまとめると、脳においてはAIM遺伝子は転写されておらず、また、AIMタンパク質は血管脳関門(BBB)でブロックされ、脳内には移行しないと考えられる。

【0070】

[実施例4]AIMの脳内への導入とアミロイドプラークとの局在

麻酔下で頭頂部頭蓋骨を露出したアルツハイマー病のモデルマウスである5XFADマウスをステレオタキック (または定位固定装置) にて固定し、右脳の海馬領域に実体顕微鏡下で組換えマウスAIM (rAIM、配列番号4) 10 μg (PBS 10 μLに溶解) をマイクロインジェクションした。3時間後に脳組織を単離し4%パラホルムアルデヒド固定を施した後、凍結切片を作製し、AIM (緑) とアミロイドベータ (Aβ: 赤) に対する抗体を用いて免疫

10

20

30

40

50

染色法によって共染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

【0071】

結果を図4に示す。図4に示される通り、5XFADマウスの海馬領域に導入された組換えAIMは、アミロイドプラークと共局在していることが示された。

【0072】

[実施例5]脳内でのAIMの発現によるアミロイドプラークの減少

ステレオタキシク（または定位固定装置）にて固定した8週齢の5XFADマウスの脳海馬領域に、マウスAIMを発現するadeno-associated virus 血清型5(AAV-AIM)と空のAAV5 (AAV-mock)を同じウイルス量、マイクロインジェクションした(n=7~8)。15週間後に脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定しパラフィン切片を抗Ab抗体で染色し、A陽性部分(アミロイドプラーク)の面積をNIHImageJソフトウェアを用いて計測した。海馬全体の面積に対するアミロイドプラークの面積を%で表し、AAV-AIMを感染させたマウスとAAV-mockを感染させたマウスとで、比較した。

10

【0073】

結果を図5に示す。図5に示される通り、AIMを発現するアデノ随伴ウイルスを感染させた個体は、mock AAVを感染させた個体と比較して、顕著にアミロイドプラークが減少していた(n=7~8、P=0.00048、T-test)。本結果から、AIMタンパク質を脳内に送達することにより、脳内の異常タンパク質を効率よく減少させることができることが示された。

【0074】

[実施例6]AIMの結合による多量体アミロイドの除去

N末端をCy5で標識したAb(アミロイド)42ペプチド(Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile - Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala:配列番号3)を多量体化させ、AIM-KOマウス新生児脳より単離、培養したマイクログリア細胞集団にマウスrAIM(50 mg/mL)有り(+ rAIM)無し(+ PBS)の条件で、DMEMメディウム+ 10% FBS中で37 1時間反応させた。細胞を洗浄した後、抗F4/80抗体で染色しフローサイトメーターで解析した。

20

【0075】

結果を図6に示す。F4/80高陽性であるマイクログリアにおける、Cy5の蛍光強度、すなわち多量体Ab42の取り込み度を解析したところ、rAIM存在下では、非存在下に比べて、Cy5陽性のマイクログリアが顕著に(16% 84%)増加していた。すなわち、AIMにより異常タンパク質である多量体Ab42をマーキングすることにより、マイクログリアによる多量体Ab42の取り込みが著しく亢進したことが示された。

30

【0076】

理論に拘束されることを望むものではないが、以上の結果は次のようなメカニズムを意味するものと考えられる。即ち、通常は脳にはAIMは存在しない。従って、アルツハイマー病の原因となる多量体アミロイドが蓄積しても、マイクログリアはそれを効率よく除去することができない。しかし、何らかの方法を用いてAIMを脳内に送達又は脳内で発現させると、AIMは多量体アミロイドを異常タンパク質としてマーキングする。これにより、マイクログリアが効率よく多量体アミロイドを除去することが可能となり、結果としてアルツハイマー病の治療又は予防が達成される。

40

【0077】

[実施例7]AIMの発現によるA (アミロイド)プラーク面積の減少

5xFADマウスと、ヒトPDGF-B promoter下で脳神経細胞にマウスAIMを発現するトランスジェニックマウス(TG)を掛け合わせ、トランスジーンを持たない(Non-TG)5xFADマウスとトランスジーンを有する(TG(+))5xFADマウスを作成した。尚、ヒトPDGF-B promoter下で脳神経細胞にマウスAIMを発現するトランスジェニックマウス(TG)の作製に用いたトランスジーンのマッピングを図9に示す。尚、ヒトPDGF-B promoter配列(Xba I - Hind III)(配列番号6)は、「PDGF B-chain in neurons of the central nervous

50

system, posterior pituitary, and in a transgenic model. Sasahara M, Fries JW, Raines EW, Gown AM, Westrum LE, Frosch MP, Bonthon DT, Ross R, Collins T. Cell. 1991 Jan 11;64(1):217-227.」に詳述される)。

【0078】

7週齢の時点で、これらのマウスにおける脳全体に対するA β （アミロイド）プラーク面積(%)を比較した。その結果を図7に示す。図7に示される通り、TG(+) $5\times$ FADマウスで有意なプラークの減少を認めた(T-検定)。

【0079】

【実施例8】脳組織におけるAIMとA β （アミロイド）プラークの共局在

7週齢の、Non-TG $5\times$ FADマウス、TG(+) $5\times$ FADマウス、および野生型C57BL/6マウスの脳組織を単離して切片を作成した。AIM（赤）とA β （緑）に対する抗体を用いた免疫染色法によりAIMとA β の共染色を行い、これらのタンパク質の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。結果を図8に示す。図8に示される通り、TG(+) $5\times$ FADマウスにおいてはAIMとA β プラークは共局在している部分が多くみられた（上図：赤と緑が重なって黄色になっている部分、および赤と緑が同じ部位に見える部分）。尚、写真は海馬領域であるが、脳全体でこのようなAIMとA β プラークの共局在が確認された。

【産業上の利用可能性】

【0080】

本発明によれば、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患を治療及び/又は予防できるため、医療分野において極めて有用である。

【0081】

本出願は、日本で出願された特願2018-186759（出願日：2018年10月1日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

10

20

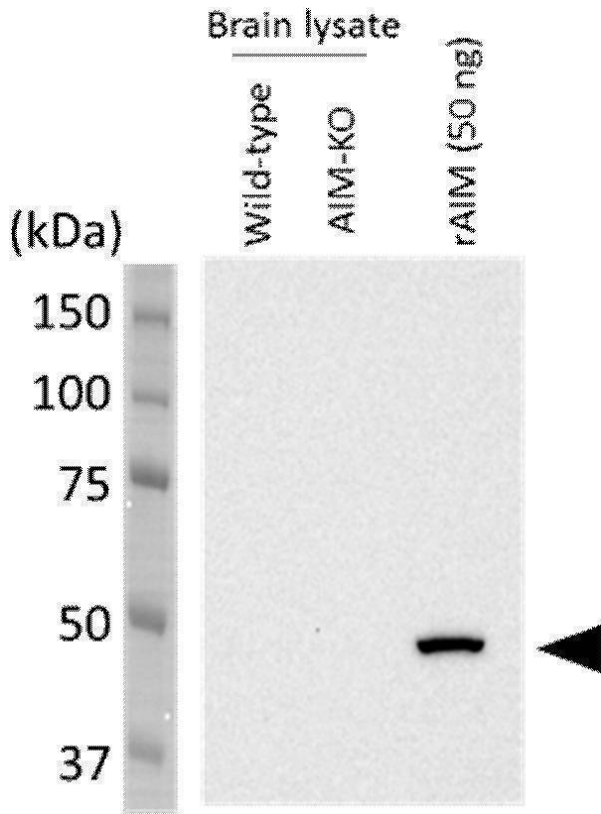
30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】



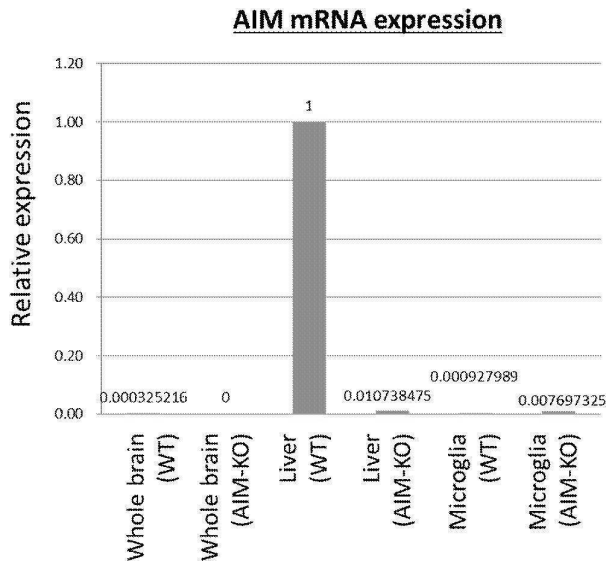
【 図 2 】



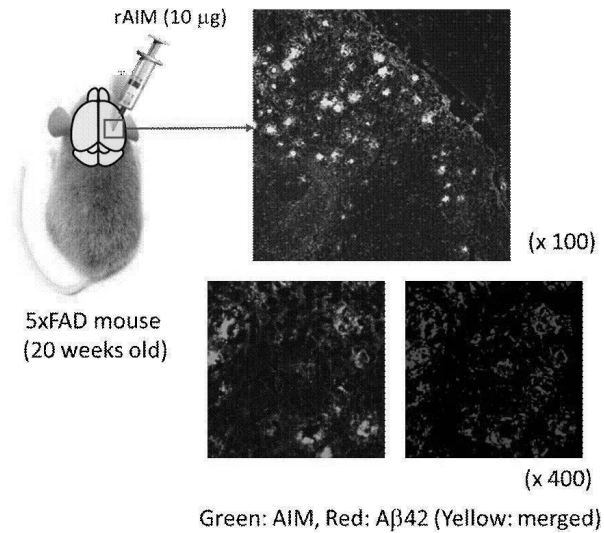
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

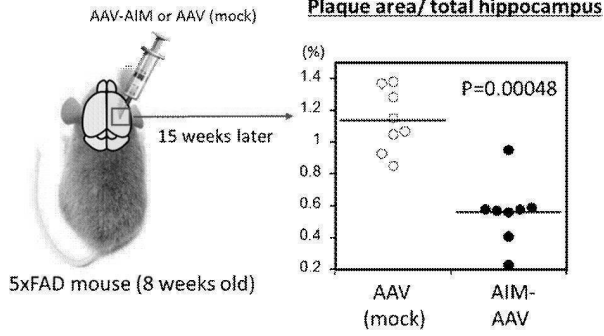


30

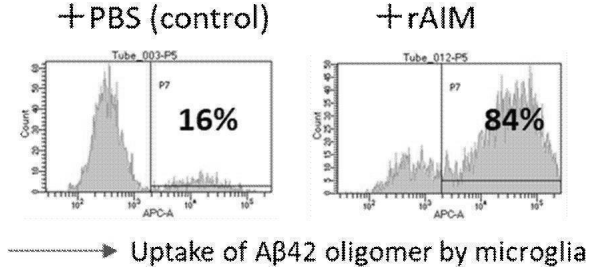
40

50

【 5 】

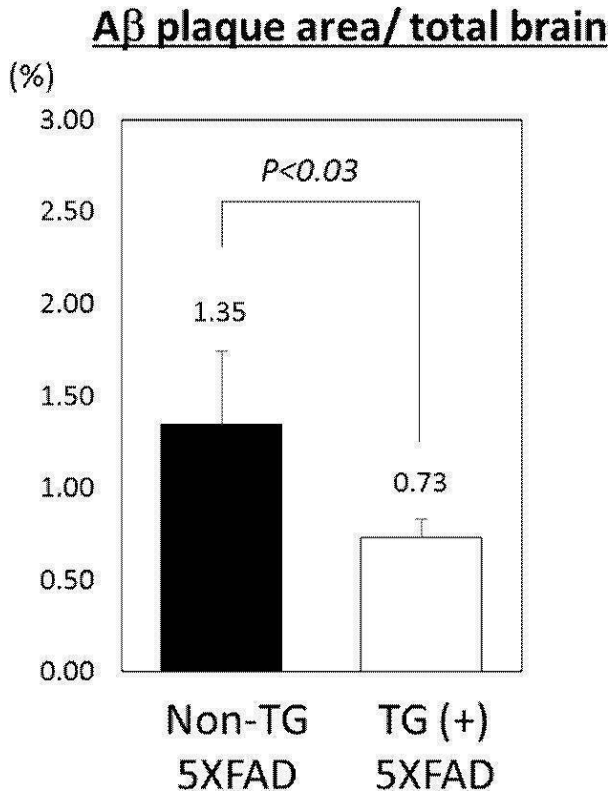


【 6 】

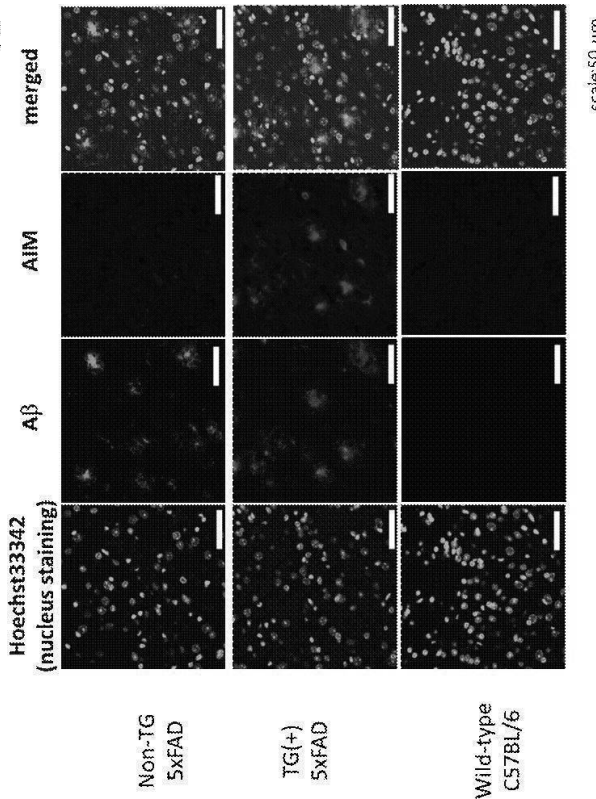


10

【 7 】



【 8 】



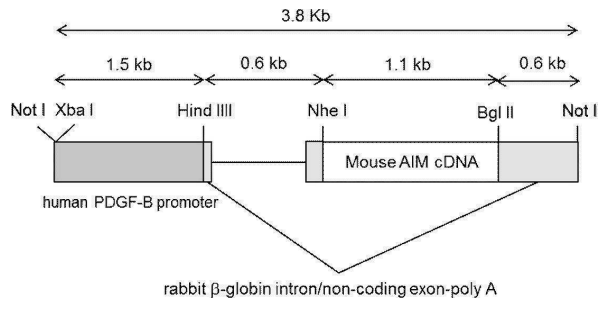
20

30

40

50

【 図 9 】



10

【 配列表 】

0007289033000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P	25/08	(2006.01)	F I	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	25/14	(2006.01)		A 6 1 P	25/14
A 6 1 P	25/28	(2006.01)		A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/16	(2006.01)		A 6 1 P	25/16

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 宮崎 徹

東京都文京区春日 2 - 1 2 - 1 2 - 1 0 0 4

審査官 柴原 直司

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 1 / 1 4 5 7 2 5 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 1 4 0 5 3 1 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 1 9 2 5 3 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 6 2 0 2 1 (W O , A 1)

ドクターサロン, (2014), 58, [7], p.33-37

Nat.Med., (2016), 22, [2], p.183-193

Cell, (2015), 163, [6], p.1413-1427

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 P 2 5 / 0 0 - 2 5 / 3 6

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)