

(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2021-502977

(P2021-502977A)

(43) 公表日 令和3年2月4日(2021.2.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 B O 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-526445 (P2020-526445)
 (86) (22) 出願日 平成30年11月15日 (2018.11.15)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年7月9日 (2020.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2018/051452
 (87) 国際公開番号 W02019/095064
 (87) 国際公開日 令和1年5月23日 (2019.5.23)
 (31) 優先権主張番号 62/586,567
 (32) 優先日 平成29年11月15日 (2017.11.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 516151612
 ユニバルシテ ラバル
 カナダ国 ジー1ブイ Oエー6 ケベック,
 ケベック シティ, リュ ドゥ
 リユニバルシテ 2325
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100162352
 弁理士 酒巻 順一郎
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経学的状態、がん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び／又は予防のための S R S F 3 作用剤の使用

(57) 【要約】

本明細書は、神経学的状態、がん、細菌性感染症及びウイルス性感染症を治療するための、骨髄細胞、例えば、ミクログリア細胞及び／又は単球の機能を制御するための S R S F 3 作用剤の使用であって、S R S F 3 作用剤が、S R S F 3 の発現又は機能を阻害する、使用に関する。

【選択図】 図 1

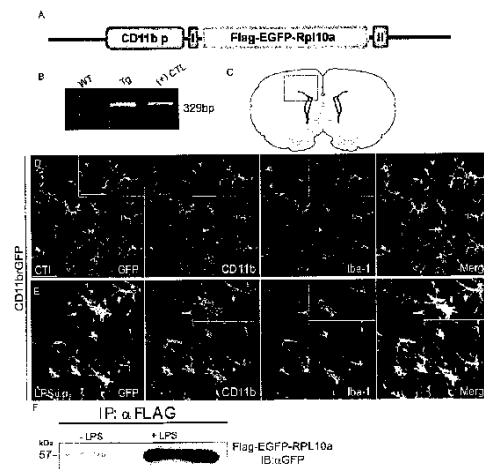


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨髄細胞の自然免疫機能を制御するための S R S F 3 作用剤の使用であって、前記 S R S F 3 作用剤が、S R S F 3 の発現又は機能を阻害する、使用。

【請求項 2】

細胞が、ミクログリア細胞である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

細胞が、単球である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

S R S F 3 作用剤が、リン酸化されている S R S F 3 の活性又は機能を阻害する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。 10

【請求項 5】

S R S F 3 作用剤が、抗体、核酸、ポリペプチド、低分子量化合物又は遺伝子編集系である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

S R S F 3 作用剤が、抗体、アンチセンス、干渉 RNA 分子、C R I S P R 系 (C R I S P R / C a s 9)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系 (Z F N)、又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ系 (T A L E N) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

S R S F 3 作用剤が、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、少なくとも 1 つの m R N A の翻訳を増加させる、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の使用。 20

【請求項 8】

S R S F 3 作用剤が、S R S F 3 と、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの m R N A との間の結合を阻害する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 9】

S R S F 3 作用剤が、S R S F 3 と、少なくとも 1 つの m R N A の少なくとも 1 つの 3 ' U T R S R S F 3 結合部位との間の結合を阻害する、請求項 8 に記載の使用。 30

【請求項 10】

S R S F 3 作用剤が、S R S F 3 の少なくとも 1 つの R R M 部位と、少なくとも 1 つの m R N A の少なくとも 1 つの 3 ' U T R S R S F 3 結合部位との間の結合を阻害する、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドが、S A A 3、L C N 2、L I L R B 4、C C L 5、I R F 7、C C L 3、G M 7 6 7 6、C L E C 7 A、C H 2 5 H、G P N M B、C S T 7、C T L A 2 B、C D 6 8、E I F 4 A 2、T R E M 2 又は A P O E である、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 12】

a . 神経学的状態 (例えば、血管性認知症、前頭側頭葉変性症 (F T D)、アルツハイマー、運動ニューロン疾患 (例えば、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、進行性球麻痺 (P B P)、原発性側索硬化症 (P L S) 又はケネディ病) 又はパーキンソン病) の治療及び / 又は予防、
b . 中枢神経系のがん (例えば、神経膠腫) の増殖の阻害、或いは
c . ウイルス性又は細菌性感染症 (例えば、H I V) の治療及び / 又は予防
のための S R S F 3 作用剤の、これを必要とする患者における使用であって、前記 S R S F 3 作用剤が、S R S F 3 の発現又は機能を阻害する、使用。 40

【請求項 13】

a . 神経学的状態 (例えば、血管性認知症、前頭側頭葉変性症 (F T D)、アルツハイ 50

マー、運動ニューロン疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、進行性球麻痺（PBP）、原発性側索硬化症（PLS）又はケネディ病）又はパーキンソン病）の治療及び／又は予防、

b．中枢神経系のがん（例えば、神経膠腫）の増殖の阻害、

c．ウイルス性又は細菌性感染症（例えば、HIV）の治療及び／又は予防、

d．脳損傷（例えば、脳虚血、低酸素、脳卒中、虚血後の炎症）の治療

のためのSRSF3作用剤の、これを必要とする患者における使用であって、前記SRSF3作用剤が、SRSF3の発現又は機能を阻害する、使用。

【請求項14】

SRSF3作用剤が、リン酸化されているSRSF3の活性又は機能を阻害する、請求項12又は13に記載の使用。 10

【請求項15】

SRSF3作用剤が、抗体、核酸、ポリペプチド、低分子量化合物又は遺伝子編集系である、請求項12～14のいずれか一項に記載の使用。

【請求項16】

SRSF3作用剤が、抗体、アンチセンス、干渉RNA分子、CRISPR系（CRISPR/Cas9）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系（ZFN）、又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ系（TALEN）である、請求項12～15のいずれか一項に記載の使用。

【請求項17】

SRSF3作用剤が、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、少なくとも1つのmRNAの翻訳を増加させる、請求項12～16のいずれか一項に記載の使用。 20

【請求項18】

SRSF3作用剤が、SRSF3と、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする少なくとも1つのmRNAとの間の結合を阻害する、請求項12～17のいずれか一項に記載の使用。

【請求項19】

SRSF3作用剤が、SRSF3と、少なくとも1つのmRNAの少なくとも1つの3'UTR-SRSF3結合部位との間の結合を阻害する、請求項18に記載の使用。 30

【請求項20】

SRSF3作用剤が、SRSF3のRRM部位と、少なくとも1つのmRNAの少なくとも1つの3'UTR-SRSF3結合部位との間の結合を阻害する、請求項19に記載の使用。

【請求項21】

自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドが、SAA3、LCN2、CCL5、IRF7、CCL3、GM7676、CLEC7A、CH25H、GPNMB、CST7、CTLA2B、CD68、EIF4A2、TREM2又はAPOEである、請求項12～20のいずれか一項に記載の使用。

【請求項22】

FTD又はALSの治療及び／又は予防のための、請求項12～21のいずれか一項に記載の使用。 40

【請求項23】

星状細胞腫又は神経膠芽腫である、中枢神経系のがんの増殖を阻害するための、請求項22に記載の使用。

【請求項24】

SRSF3作用剤が、SRSF3を標的とする10～30個の長さの連続するヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチドの連続する配列が、ヒトSRSF3 mRNA前駆配列5'UTR（配列番号19）の領域に対して少なくとも90%相補性である、請求項1～23のいずれか一項に記載の使用。 50

- 【請求項 25】
オリゴヌクレオチドの連続するヌクレオチド配列が、配列番号 19 に対して少なくとも 90% 相補性である、請求項 24 に記載の使用。
- 【請求項 26】
オリゴヌクレオチドの連続するヌクレオチド配列が、配列番号 19 に対して少なくとも 100% 相補性である、請求項 24 に記載の使用。
- 【請求項 27】
アンチセンスオリゴヌクレオチドが、SRSF3 mRNA の 5' UTR とハイブリダイズし、SRSF3 の翻訳を阻害又は減少させる、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の使用。 10
- 【請求項 28】
アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列：5' - C C A A T G G A C A G G A A T C A C G A T G C A T - 3' (配列番号 17) を含む、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 29】
アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列：5' - C C A A T G G A C A G G A A T C A C G A T G C A T - 3' (配列番号 17) からなる、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 30】
請求項 24 ~ 29 のいずれか一項に定義するアンチセンス。 20
- 【請求項 31】
SRSF3 作用剤が、抗体である、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 32】
抗体が、モノクローナル抗体、単鎖変異断片 (s c F v)、単鎖変異 F c 断片 (s c F v - F c)、ミニボディ、ダイアボディ、F a b 断片、F (a b')₂ 断片、又は F v 断片である、請求項 31 に記載の使用。
- 【請求項 33】
抗体が、ヒト化抗体である、請求項 31 又は 32 に記載の使用。
- 【請求項 34】
抗体が、RRMドメイン (配列番号 13) の少なくとも一部分を含む SRSF3 の領域を特異的に結合させる、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の使用。 30
- 【請求項 35】
抗体が、少なくとも SRSF3 リン酸化部位、及び SRSF3 の RSドメイン (配列番号 14) の少なくとも一部分を含む、SRSF3 の領域を特異的に結合させる、請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 36】
抗体が、配列番号 20 を含む SRSF3 の領域に特異的に結合する、請求項 30 ~ 34 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 37】
請求項 31 ~ 36 のいずれか一項に定義する抗体。 40
- 【請求項 38】
対象の生体試料における SRSF3 及び pSRSF3 又はこれらの断片のレベルを判定するステップ
を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っている対象の診断のための方法であって、前記生体試料における SRSF3 又はこの断片のレベルの、SRSF3 又はこの断片の基準レベルと比べた上昇を観察すると、前記対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症の素因を有するか、又はこれが疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症 50

を患っていることが示される、方法。

【請求項 39】

対象の生体試料における上方制御された翻訳されていない mRNA のプロファイルを同定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っている対象の診断のための方法であって、ミクログリア細胞の自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、上方制御された翻訳されていない mRNA のプロファイルを観察すると、前記対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症の素因を有する

10

【請求項 40】

方法が、対象の生体試料における SRSF3 / pSRSF3 又はこの断片のレベルを判定するステップをさらに含み、前記生体試料における SRSF3、pSRSF3 又はこれらの断片のレベルの、SRSF3 又はこの断片の基準レベルと比べた上昇を観察すると、前記対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症の素因を有するか、又はこれが疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っていることが示される、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 41】

a) SRSF3 又はこの断片を含む生体系に候補化合物を接触させるステップ、
b) SRSF3 発現又は機能を阻害する前記候補化合物の能力を測定するステップ、
c) 前記候補化合物が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び / 又は予防において有用であるかどうかを、ステップ b) の結果に基づいて判定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び / 又は予防において有用な候補化合物を同定するための方法。

【請求項 42】

a) SRSF3 又はこの断片、及び少なくとも 1 つの SRSF3 結合部位を含む、ミクログリア細胞の自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする mRNA の少なくとも 1 つの 3' UTR を含む生体系に候補化合物を接触させるステップ、

30

b) SRSF3 又はこの断片と、前記 mRNA の少なくとも 1 つの 3' UTR SRSF3 結合部位との間の結合を阻害する前記候補化合物の能力を測定するステップ、

c) 前記候補化合物が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び / 又は予防において有用であるかどうかを、ステップ b) の結果に基づいて判定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び / 又は予防において有用な候補化合物を同定するための方法。

【請求項 43】

対象の生体試料における SRSF3 / pSRSF3 又はこの断片のレベルを判定するステップ

40

を含む、対象における神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の進行又は退行を監視するための方法であって、SRSF3 又はこの断片のレベルの上昇を観察すると、前記神経学的状態の進行が示され、SRSF3 又はこの断片のレベルの低下を観察すると、前記神経学的状態、前記中枢神経系のがん、前記細菌性感染症又は前記ウイルス性感染症の退行が示される、方法。

【請求項 44】

対象における神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の進行又は退行を監視するための生化学マーカーとしての、生体試料における SRSF3 又

50

はこの断片のレベルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経学的状態、がん又はウイルス性感染症の治療、予後診断及び診断のための方法、このような方法に関するキット、並びに神経学的状態、がん又はウイルス性感染症を予防及び治療するための候補化合物を同定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ミクログリアは、脳の主要な免疫細胞である。生理学的条件下では、ミクログリア細胞は、脳組織の恒常性の維持に必須であるが (Tremblayら、2011)、疾患及び/又は傷害の文脈では、ミクログリア細胞が、脳における炎症応答の開始及び制御において中心的役割を有することが、ますます明らかとなっている (Hanisch及びKettenmann、2007)。今日の共通認識では、ミクログリアは、活性化されると、古典的炎症促進性に偏った表現型から選択的な抗炎症性のものまでの範囲にわたる、免疫プロファイルの広範なレパートリーを獲得し得るということである (David及びKroner、2011; Kierdorf及びPrinz、2013; Ransohoff及びBrown、2012)。過去10年にわたって、ミクログリア細胞の最適でタイムリーな活性化が、中枢神経系 (CNS) に対する炎症誘発性の損傷の制御において役立つことが示された (Chen及びTrapp、2016; Gravelら、2016; Lalancette-Hebertら、2007; Lalancette-Hebertら、2009; Schwartz及びShechter、2010)。しかし、現時点で、ミクログリアの偏りのプロファイルの制御に關与する分子機構は、まだ理解されていない。

【発明の概要】

【0003】

本明細書は、骨髄細胞の自然免疫機能を制御するためのSRSF3作用剤の使用であって、SRSF3作用剤が、SRSF3又はこの断片の発現又は機能を阻害する、使用に関する。

【0004】

本明細書は、
 神経学的状態 (例えば、血管性認知症、前頭側頭葉変性症 (FTD)、アルツハイマー、運動ニューロン疾患 (例えば、孤発性又は家族性ALSを含む筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、進行性球麻痺 (PBP)、原発性側索硬化症 (PLS) 又はケネディ病) 又はパーキンソン病) の治療及び/又は予防、
 中枢神経系のがん (例えば、神経膠腫) の増殖の阻害、或いは
 ウイルス性又は細菌性感染症 (例えば、HIV) の治療及び/又は予防
 のためのSRSF3作用剤の、これを必要とする患者における使用であって、SRSF3作用剤が、SRSF3又はこの断片の発現又は機能を阻害する、使用に関する。

【0005】

本明細書は、有効量 (例えば、治療有効量) の少なくとも1つのSRSF3作用剤を、これを必要とする患者に投与するステップを含む、
 神経学的状態 (例えば、血管性認知症、前頭側頭葉変性症 (FTD)、アルツハイマー、運動ニューロン疾患 (例えば、孤発性又は家族性ALSを含む筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、進行性球麻痺 (PBP)、原発性側索硬化症 (PLS) 又はケネディ病) 又はパーキンソン病) の治療及び/又は予防、
 中枢神経系のがん (例えば、神経膠腫) の増殖の阻害、或いは
 ウイルス性又は細菌性感染症 (例えば、HIV) の治療及び/又は予防
 のための方法であって、SRSF3作用剤が、SRSF3又はこの断片の発現又は機能を阻害する、方法に関する。

10

20

30

40

50

【0006】

本明細書は、

対象の生体試料におけるSRSF3又はこの断片のレベルを判定するステップ、及び有効量（例えば、治療有効量）の少なくとも1つのSRSF3作用剤を対象に投与するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っている対象の診断及び治療のための方法であって、生体試料におけるSRSF3又はこの断片のレベルの、SRSF3又はこの断片の基準レベルと比べた上昇を観察すると、対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っていることが示される、方法に関する。

10

【0007】

本明細書は、

対象の生体試料におけるSRSF3又はこの断片のレベルを判定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っている対象の診断のための方法であって、生体試料におけるSRSF3又はこの断片のレベルの、SRSF3又はこの断片の基準レベルと比べた上昇を観察すると、対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症の素因を有するか、又はこれが疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っていることが示される、方法に関する。

20

【0008】

本明細書は、

対象の生体試料における上方制御された翻訳されていないmRNAのプロファイルを設定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っている対象の診断のための方法であって、ミクログリア細胞の自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、上方制御された翻訳されていないmRNAのプロファイルを観察すると、対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症の素因を有するか、又はこれが疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っていることが示される、方法に関する。

30

【0009】

本明細書は、

対象の生体試料における上方制御された翻訳されていないmRNAのプロファイルを設定するステップ、及び

有効量（例えば、治療有効量）の少なくとも1つのSRSF3作用剤を対象に投与するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っている対象の診断及び治療のための方法であって、ミクログリア細胞の自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、上方制御された翻訳されていないmRNAのプロファイルを観察すると、対象が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症の素因を有するか、又はこれが疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症若しくはウイルス性感染症を患っていることが示される、方法に関する。

40

50

【0010】

本明細書は、

- a) S R S F 3 又はこの断片を含む生体系に候補化合物を接触させるステップ、
- b) S R S F 3 発現又は機能を阻害する候補化合物の能力を測定するステップ、
- c) 候補化合物が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び/又は予防において有用であるかどうかを、ステップb)の結果に基づいて判定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び/又は予防において有用な候補化合物を同定するための方法に関する。

【0011】

本明細書は、

- a) S R S F 3 又はこの断片、及び少なくとも1つのS R S F 3 結合部位を含む、ミクログリア細胞の自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードするmRNAの少なくとも1つの3'UTRを含む生体系に候補化合物を接触させるステップ、
- b) S R S F 3 又はこの断片と、mRNAの少なくとも1つの3'UTR S R S F 3 結合部位との間の結合を阻害する候補化合物の能力を測定するステップ、
- c) 候補化合物が、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び/又は予防において有用であるかどうかを、ステップb)の結果に基づいて判定するステップ

を含む、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の治療及び/又は予防において有用な候補化合物を同定する方法に関する。

【0012】

本明細書は、

対象の生体試料におけるS R S F 3 又はこの断片のレベルを判定するステップ

を含む、対象における神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の進行又は退行を監視するための方法であって、S R S F 3 又はこの断片のレベルの上昇を観察すると、神経学的状態の進行が示され、S R S F 3 又はこの断片のレベルの低下を観察すると、神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の退行が示される、方法に関する。

【0013】

本明細書は、対象における神経学的状態、中枢神経系のがん、細菌性感染症又はウイルス性感染症の進行又は退行を監視するための生化学マーカーとしての、生体試料におけるS R S F 3 又はこの断片のレベルの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】CD11b r GFP 遺伝子導入マウスの特性評価を示す図である。(A) CD11b プロモーター制御下のFlag / EGFP タグ化マウス Rpl 10a 構築物の模式図。I: 介在配列 (IVS); II: SV40 ポリA (配列番号1)。(B) WTではなく遺伝子導入マウス (Tg) のみからEGFP 遺伝子329bpを増幅するオリゴヌクレオチドを使用したPCRによる導入遺伝子の可視化。(C) 脳の冠状切片の模式図。赤色の四角形は、(D)及び(E)において撮像した領域を位置づける。(D及びE)対照(D)又はLPS注入後24時間のマウス(E)の脳切片におけるEGFP発現。CD11b (青色)及びIba1 (赤色)と共同在化したGFP免疫染色。(F) Flag / EGFP - Rpl 10a 導入遺伝子のFlag ピーズによる免疫結合を実証する、ミクログリア1次培養ライセートの免疫沈降後のエスタンプロット。スケールバーは25及び50µmである。

【図2-1】高度に上方制御された免疫遺伝子が、翻訳されていないことを示す図である。(A) 遺伝子導入マウス脳からのリボソーム親和性精製方法の模式図。(B) Affymetrix 2.0 STチップにより解析したミクログリアのヒートマップ及び階層的クラスタリング。実験は、3つの生物学的反復により行う(n=5マウス/条件)。(

10

20

30

40

50

C) トランスクリプトミクス及びプロテオミクスデータ分析間の差。クラスター1 (ズーム1) 及びクラスター2 (ズーム2) に示される上方制御されたすべての免疫遺伝子は、配列決定されたペプチドのリストにおいて観察されなかった (表はクラスター1のみを示す)。Cap2及びYwhazを対照として使用する。(D) ポリソーム免疫沈降後の免疫プロットによるプロテオミクス結果の検証。CAP2及びアクチンを内部対照として使用した。全脳抽出物をインプットとして使用した。(E) LPSで処置又は無処置のマウスの全脳抽出物の定量的ウエスタンプロット解析 (データは、平均±SEM; n=3; SAA3: p=0.3224; LCN2: * p=0.0297; CCL5: p=0.3709; CAP2: p=0.8280である)。

【図2-2】高度に上方制御された免疫遺伝子が、翻訳されていないことを示す図である。(A) 遺伝子導入マウス脳からのリボソーム親和性精製方法の模式図。(B) Affymetrix 2.0 STチップにより解析したマイクログリアのヒートマップ及び階層的クラスタリング。実験は、3つの生物学的反復により行う (n=5マウス/条件)。(C) トランスクリプトミクス及びプロテオミクスデータ分析間の差。クラスター1 (ズーム1) 及びクラスター2 (ズーム2) に示される上方制御されたすべての免疫遺伝子は、配列決定されたペプチドのリストにおいて観察されなかった (表はクラスター1のみを示す)。Cap2及びYwhazを対照として使用する。(D) ポリソーム免疫沈降後の免疫プロットによるプロテオミクス結果の検証。CAP2及びアクチンを内部対照として使用した。全脳抽出物をインプットとして使用した。(E) LPSで処置又は無処置のマウスの全脳抽出物の定量的ウエスタンプロット解析 (データは、平均±SEM; n=3; SAA3: p=0.3224; LCN2: * p=0.0297; CCL5: p=0.3709; CAP2: p=0.8280である)。

【図3-1】活性化マイクログリアにおけるmRNA及びタンパク質ネットワークの分岐を示す図である。ClueGoにより可視化した、上方又は下方制御された(A) 転写物又は(B) ペプチドの生物学的役割。同一のタームと関連する転写物/ペプチドは、ノードにより表す。上方制御された転写物/ペプチドの大多数についてのタームは、赤色で示す。下方制御された転写物/ペプチドの大多数についてのタームは、緑色で示す。灰色のノードは、等しい割合の上方及び下方制御された転写物/ペプチドを含む。ノードのサイズは、遺伝子/ターム対クラスターの数に反映する。色のグラデーションは、タームのエンリッチメントの有意性を示す。エッジは、転写物/ペプチドのタームとの関連性を示す。エッジの濃さは、関連性の有意性を反映した。(C) 上方制御された転写物の上位10種の生物学的機能。(D) 上方制御されたペプチドの上位10種の生物学的機能。

【図3-2】活性化マイクログリアにおけるmRNA及びタンパク質ネットワークの分岐を示す図である。ClueGoにより可視化した、上方又は下方制御された(A) 転写物又は(B) ペプチドの生物学的役割。同一のタームと関連する転写物/ペプチドは、ノードにより表す。上方制御された転写物/ペプチドの大多数についてのタームは、赤色で示す。下方制御された転写物/ペプチドの大多数についてのタームは、緑色で示す。灰色のノードは、等しい割合の上方及び下方制御された転写物/ペプチドを含む。ノードのサイズは、遺伝子/ターム対クラスターの数に反映する。色のグラデーションは、タームのエンリッチメントの有意性を示す。エッジは、転写物/ペプチドのタームとの関連性を示す。エッジの濃さは、関連性の有意性を反映した。(C) 上方制御された転写物の上位10種の生物学的機能。(D) 上方制御されたペプチドの上位10種の生物学的機能。

【図4-1】Saa3-3'UTRによるルシフェラーゼレポーター遺伝子活性の阻害を示す図である。(A) ルシフェラーゼアッセイに使用する、pGL3プロモーター(pGL3) (GenBank受託番号U47298)、pGL3プロモーターSaa3-3'UTR-wt (配列番号2) (pGL3-Saa3-3'UTR) 及びpGL3プロモーターSCRAMBLE (配列番号3) (pGL3-SCRAMBLE) の模式図。ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子 (茶色の箱形)、Saa3-3'UTR配列 (オレンジの円) 及びSV40ポリA領域 (明灰色の箱形) を示す。(B) HEK293細胞に各構築物をトランスフェクトし、48時間後にルシフェラーゼ活性について試験した。データ

10

20

30

40

50

は、3つ組で行った3回の独立した実験の平均±SEMを表す(n.s.: p > 0.05; *** p < 0.001)。(C) pGL3ベクター又はpGL3-Saa3-3'UTR-wtベクターをトランスフェクトしたF/EGFP-Rpl 10aプラスミドを安定に発現する、BV2細胞のRT-qPCRにより測定した、相対ホタルルシフェラーゼmRNAレベル。トランスフェクションの48時間後にTRAPプロトコルを使用してリボソーム会合mRNAを抽出した。データは、3回の個別の実験を表し、それぞれ1回が技術的反復により行われる(n = 6; 平均±SEM; n.s.: p = 0.5676)。(D) 高ストリンジェンシーレベルのRNA結合タンパク質(RBP)マップによる、Saa3-3'UTRセグメントに沿ったRBPの推定位置。各円は、1つのRBP結合部位を表す。LPS注入後に質量分析計による解析によって同定されたRBPは、青色で囲む。(E) Saa3-3'UTR欠失(配列番号4~7)の模式図。Saa3-3'UTRは、3つのセグメント:A、B及びCに分けた。(F) HEK293は、各構築物をトランスフェクトし、トランスフェクション後48時間にルシフェラーゼアッセイについて試験した。データは、3つ組で行った2回の個別の実験を表す(平均±SEM、n = 6; pGL3に対する比較: * p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001; pGL3-Saa3-3'UTR-wtに対する比較: n.s.: p > 0.05、## p < 0.01、### p < 0.001; pGL3-Saa3-3'UTR-DelB+C対pGL3-Saa3-3'UTR-DelB: & p < 0.05)。

【図4-2】Saa3-3'UTRによるルシフェラーゼレポーター遺伝子活性の阻害を示す図である。(A) ルシフェラーゼアッセイに使用する、pGL3プロモーター(pGL3)(GenBank受託番号U47298)、pGL3プロモーターSaa3-3'UTR-wt(配列番号2)(pGL3-Saa3-3'UTR)及びpGL3プロモーターSCRAMBLE(配列番号3)(pGL3-SCRAMBLE)の模式図。ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子(茶色の箱形)、Saa3-3'UTR配列(オレンジの円)及びSV40ポリA領域(明灰色の箱形)を示す。(B) HEK293細胞に各構築物をトランスフェクトし、48時間後にルシフェラーゼ活性について試験した。データは、3つ組で行った3回の独立した実験の平均±SEMを表す(n.s.: p > 0.05; *** p < 0.001)。(C) pGL3ベクター又はpGL3-Saa3-3'UTR-wtベクターをトランスフェクトしたF/EGFP-Rpl 10aプラスミドを安定に発現する、BV2細胞のRT-qPCRにより測定した、相対ホタルルシフェラーゼmRNAレベル。トランスフェクションの48時間後にTRAPプロトコルを使用してリボソーム会合mRNAを抽出した。データは、3回の個別の実験を表し、それぞれ1回が技術的反復により行われる(n = 6; 平均±SEM; n.s.: p = 0.5676)。(D) 高ストリンジェンシーレベルのRNA結合タンパク質(RBP)マップによる、Saa3-3'UTRセグメントに沿ったRBPの推定位置。各円は、1つのRBP結合部位を表す。LPS注入後に質量分析計による解析によって同定されたRBPは、青色で囲む。(E) Saa3-3'UTR欠失(配列番号4~7)の模式図。Saa3-3'UTRは、3つのセグメント:A、B及びCに分けた。(F) HEK293は、各構築物をトランスフェクトし、トランスフェクション後48時間にルシフェラーゼアッセイについて試験した。データは、3つ組で行った2回の個別の実験を表す(平均±SEM、n = 6; pGL3に対する比較: * p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001; pGL3-Saa3-3'UTR-wtに対する比較: n.s.: p > 0.05、## p < 0.01、### p < 0.001; pGL3-Saa3-3'UTR-DelB+C対pGL3-Saa3-3'UTR-DelB: & p < 0.05)。

【図4-3】Saa3-3'UTRによるルシフェラーゼレポーター遺伝子活性の阻害を示す図である。(A) ルシフェラーゼアッセイに使用する、pGL3プロモーター(pGL3)(GenBank受託番号U47298)、pGL3プロモーターSaa3-3'UTR-wt(配列番号2)(pGL3-Saa3-3'UTR)及びpGL3プロモーターSCRAMBLE(配列番号3)(pGL3-SCRAMBLE)の模式図。ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子(茶色の箱形)、Saa3-3'UTR配列(オレンジ

10

20

30

40

50

の円)及びSV40ポリA領域(明灰色の箱形)を示す。(B)HEK293細胞に各構築物をトランスフェクトし、48時間後にルシフェラーゼ活性について試験した。データは、3つ組で行った3回の独立した実験の平均±SEMを表す(n.s.: $p > 0.05$; *** $p < 0.001$)。(C)pGL3ベクター又はpGL3-Saa3-3'UTR-wtベクターをトランスフェクトしたF/EGFP-Rpl 10aプラスミドを安定に発現する、BV2細胞のRT-qPCRにより測定した、相対ホタルルシフェラーゼmRNAレベル。トランスフェクションの48時間後にTRAPプロトコルを使用してリボソーム会合mRNAを抽出した。データは、3回の個別の実験を表し、それぞれ1回が技術的反復により行われる($n = 6$; 平均±SEM; n.s.: $p = 0.5676$)。(D)高ストリンジェンシーレベルのRNA結合タンパク質(RBP)マップによる、Saa3-3'UTRセグメントに沿ったRBPの推定位置。各円は、1つのRBP結合部位を表す。LPS注入後に質量分析計による解析によって同定されたRBPは、青色で囲む。(E)Saa3-3'UTR欠失(配列番号4~7)の模式図。Saa3-3'UTRは、3つのセグメント:A、B及びCに分けた。(F)HEK293は、各構築物をトランスフェクトし、トランスフェクション後48時間にルシフェラーゼアッセイについて試験した。データは、3つ組で行った2回の個別の実験を表す(平均±SEM、 $n = 6$; pGL3に対する比較:* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$; pGL3-Saa3-3'UTR-wtに対する比較:n.s.: $p > 0.05$ 、## $p < 0.01$ 、### $p < 0.001$; pGL3-Saa3-3'UTR-DelB+C対pGL3-Saa3-3'UTR-DelB:& $p < 0.05$)。

【図5-1】SRSF3により3'UTRを介して炎症遺伝子発現が制御されることを示す図である。(A)LPS処理後24時間のBV2細胞におけるリン酸化SRSF3(pSRSF3)発現のウエスタンブロット。(B)pSRSF3についての定量的ウエスタンブロット解析(データは、平均±SEM、 $n = 4$; *** $p < 0.001$ である)。(C)LPS後24時間のウエスタンブロットにより解析した総SRSF3(tSRSF3)発現。(D)tSRSF3の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析(データは、平均±SEM、 $n = 3$; $p > 0.05$ である)。(E)対照siRNA(CTL siRNA)又はSRSF3に対するsiRNA(100nM又は300nM)(配列番号8~11)をトランスフェクトしたLPS処理BV2細胞のウエスタンブロット解析。(F)siRNAトランスフェクション後48時間の内在性SRSF3の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析(データは、平均±SEM、 $n = 3$; n.s.: $p > 0.05$; * $p < 0.05$ である)。(G)ルシフェラーゼレポーター(pGL3及びpGL3-Saa3-3'UTR-wt)を、CTL siRNA又はSRSF3 siRNA(300nM)(配列番号8~11)と、LPS処理BV2細胞において共トランスフェクトした。トランスフェクション後48時間にルシフェラーゼ活性を測定した。データは、2回の独立した実験の平均±SEMを表す($n = 6$; n.s.: $p > 0.05$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)。(H)LPS曝露後24時間のBV2細胞におけるSAA3発現のウエスタンブロット。(I)SRSF3ノックダウン後の内在性SAA3の発現レベルを示したウエスタンブロット解析(データは、平均±SEM、 $n = 3$; n.s.: $p > 0.05$; ** $p < 0.01$ である)。(J)Lcn2、Ccl5及びCcl3それぞれの3'UTRに沿ったSRSF3の推定位置の模式図。(K)SRSF3に対するsiRNAをトランスフェクトし、24時間LPSで処理したBV2細胞におけるLCN2、CCL5及びCCL3発現のウエスタンブロット解析。(L)SRSF3ノックダウン及びLPSによる処理後の内在性LCN2、CCL5及びCCL3レベルを示したウエスタンブロットの定量分析($n = 3$; n.s.: $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

【図5-2】SRSF3により3'UTRを介して炎症遺伝子発現が制御されることを示す図である。(A)LPS処理後24時間のBV2細胞におけるリン酸化SRSF3(pSRSF3)発現のウエスタンブロット。(B)pSRSF3についての定量的ウエスタンブロット解析(データは、平均±SEM、 $n = 4$; *** $p < 0.001$ である)。(

10

20

30

40

50

C) LPS 後 24 時間のウエスタンブロットにより解析した総 SRSF3 (tSRSF3) 発現。(D) tSRSF3 の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析(データは、平均 ± SEM、n = 3; p > 0.05 である)。(E) 対照 siRNA (CTL siRNA) 又は SRSF3 に対する siRNA (100 nM 又は 300 nM) (配列番号 8 ~ 11) をトランスフェクトした LPS 処理 BV2 細胞のウエスタンブロット解析。(F) siRNA トランスフェクション後 48 時間の内在性 SRSF3 の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析(データは、平均 ± SEM、n = 3; n.s.: p > 0.05; * p < 0.05 である)。(G) ルシフェラーゼレポーター (pGL3 及び pGL3-Saa3-3' UTR-wt) を、CTL siRNA 又は SRSF3 siRNA (300 nM) (配列番号 8 ~ 11) と、LPS 処理 BV2 細胞において共トランスフェクトした。トランスフェクション後 48 時間にルシフェラーゼ活性を測定した。データは、2 回の独立した実験の平均 ± SEM を表す (n = 6; n.s.: p > 0.05; * p < 0.05; *** p < 0.001)。(H) LPS 曝露後 24 時間の BV2 細胞における SAA3 発現のウエスタンブロット。(I) SRSF3 ノックダウン後の内在性 SAA3 の発現レベルを示したウエスタンブロット解析(データは、平均 ± SEM、n = 3; n.s.: p > 0.05; ** p < 0.01 である)。(J) Lcn2、Ccl5 及び Ccl3 それぞれの 3' UTR に沿った SRSF3 の推定位置の模式図。(K) SRSF3 に対する siRNA をトランスフェクトし、24 時間 LPS で処理した BV2 細胞における LCN2、CCL5 及び CCL3 発現のウエスタンブロット解析。(L) SRSF3 ノックダウン及び LPS による処理後の内在性 LCN2、CCL5 及び CCL3 レベルを示したウエスタンブロットの定量分析 (n = 3; n.s.: p > 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)。

【図 6 - 1】 SRSF3 が炎症遺伝子の翻訳制御因子であることを *in vivo* で示す図である。(A) LPS 注入後の TLR2 誘導の *in vivo* での撮像; LPS 注入後 24 時間の代表的写真。右側の色補正は、光子数である。(B) CCD カメラにより検出された光子を示す頭部の 3D 像。(C) LPS の *i.p.* による注入後 24 時間の生物発光シグナルの 3D 再構築。(D) 光子放出の測定により得られたデータのプロット。黒色の線は、LPS 後 24 ~ 72 時間の TLR2 シグナル誘導を示す(データは、平均 ± SEM、ベースライン: n = 5、LPS 24 時間 n = 5; LPS 48 時間: n = 4; LPS 72 時間: n = 4; ベースライン対 LPS 24 時間: ** p < 0.01; ベースライン対 LPS 48 時間及びベースライン対 LPS 72 時間: p > 0.05; LPS 24 時間対 LPS 48 時間及び LPS 24 時間対 LPS 72 時間: ** p < 0.01 である)。(E) TLR2-luc-GFP マウスの LPS 後 24 時間の脳切片における TLR2 駆動 GFP 導入遺伝子発現 (Lalancette-Hebertら、2009)。CD11b (赤色) と共局在化した GFP 免疫染色 (緑色)。スケールバーは 50 μm である。(F) スクランブル siRNA 又は SRSF3-siRNA (配列番号 8 ~ 11) の鼻腔内投与後の全脳抽出物のウエスタンブロット解析。(G) siRNA 投与後 48 時間の内在性 SRSF3 の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析(データは、平均 ± SEM、n = 3; p *** < 0.001 である)。(H) 実験タイムラインの模式図。(I) LPS 条件下 (5 mg / kg) でのスクランブル siRNA (J) 又は SRSF3-siRNA (K) の鼻腔内送達前 (ベースライン) 及び後の TLR2 シグナルの生物発光撮像。(L) SRSF3-siRNA 又はスクランブル siRNA の投与を受けた TLR2-luc-GFP マウスにおける、ベースラインに対する変化倍率により表される、脳による総光子放出の長期定量分析。すべてのマウスに LPS (5 mg / kg) を *i.p.* で 24 時間注入した(データは、平均 ± SEM、スクランブル siRNA + LPS - 24 時間: n = 5; SRSF3-siRNA + LPS - 24 時間: n = 7; LPS - 24 時間: n = 5; n.s.: p > 0.05; p ** < 0.01; p *** < 0.001 である)。(M) スクランブル siRNA 又は SRSF3-siRNA 由来の Iba1 染色脳切片の代表的顕微鏡写真。(N) LPS 曝露後の状態。スケールバーは 50 μm である。(O) Iba-1 染色の光学濃度の定量 (n = 3; p *** < 0.001)。(P

）精製したマイクログリアにおけるLPS後のSAA3、LCN2、CCL5及びCCL3タンパク質発現のウエスタンブロット解析。（Q）スクランブル/SRSF3-siRNA投与後のマイクログリアSAA3、LCN2、CCL5及びCCL3タンパク質の発現のウエスタンブロットの定量分析。データは、平均±SEM（ $n=3$ ； $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ ）を表す。

【図6-2】SRSF3が炎症遺伝子の翻訳制御因子であることを*in vivo*で示す図である。（A）LPS注入後のTLR2誘導の*in vivo*での撮像；LPS注入後24時間の代表的写真。右側の色補正は、光子数である。（B）CCDカメラにより検出された光子を示す頭部の3D像。（C）LPSの*i.p.*による注入後24時間の生物発光シグナルの3D再構築。（D）光子放出の測定により得られたデータのプロット。黒色の線は、LPS後24～72時間のTLR2シグナル誘導を示す（データは、平均±SEM、ベースライン： $n=5$ 、LPS 24時間： $n=5$ ；LPS 48時間： $n=4$ ；LPS 72時間： $n=4$ ；ベースライン対LPS 24時間： $**p<0.01$ ；ベースライン対LPS 48時間及びベースライン対LPS 72時間： $p>0.05$ ；LPS 24時間対LPS 48時間及びLPS 24時間対LPS 72時間： $**p<0.01$ である）。（E）TLR2-luc-GFPマウスのLPS後24時間の脳切片におけるTLR2駆動GFP導入遺伝子発現（Lalancette-Hebertら、2009）。（F）スクランブルsiRNA又はSRSF3-siRNA（配列番号8～11）の鼻腔内投与後の全脳抽出物のウエスタンブロット解析。（G）siRNA投与後48時間の内在性SRSF3の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析（データは、平均±SEM、 $n=3$ ； $p***<0.001$ である）。（H）実験タイムラインの模式図。（I）LPS条件下（5mg/kg）でのスクランブルsiRNA（J）又はSRSF3-siRNA（K）の鼻腔内送達前（ベースライン）及び後のTLR2シグナルの生物発光撮像。（L）SRSF3-siRNA又はスクランブルsiRNAの投与を受けたTLR2-luc-GFPマウスにおける、ベースラインに対する変化倍率により表される、脳による総光子放出の長期定量分析。すべてのマウスにLPS（5mg/kg）を*i.p.*で24時間注入した（データは、平均±SEM、スクランブルsiRNA+LPS-24時間： $n=5$ ；SRSF3-siRNA+LPS-24時間： $n=7$ ；LPS-24時間： $n=5$ ； $n.s.$ ： $p>0.05$ ； $**p<0.01$ ； $***p<0.001$ である）。（M）スクランブルsiRNA又はSRSF3-siRNA由来のIba1染色脳切片の代表的顕微鏡写真。（N）LPS曝露後の状態。スケールバーは50µmである。（O）Iba-1染色の光学濃度の定量（ $n=3$ ； $p***<0.001$ ）。（P）精製したマイクログリアにおけるLPS後のSAA3、LCN2、CCL5及びCCL3タンパク質発現のウエスタンブロット解析。（Q）スクランブル/SRSF3-siRNA投与後のマイクログリアSAA3、LCN2、CCL5及びCCL3タンパク質の発現のウエスタンブロットの定量分析。データは、平均±SEM（ $n=3$ ； $*p<0.05$ 、 $*p<0.01$ 、 $***p<0.001$ ）を表す。

【図7-1】LPS曝露後のマイクログリアNF- κ Bネットワークにおける、高度に上方制御されたmRNA及び非制御タンパク質を示す図である。LPS注入後にClueGoにより可視化された炎症及び免疫応答に関するターム。（A）mRNA解析において、炎症及び免疫応答に関するすべてのタームは、上方制御されたタームであり、赤色で示す。上方制御された転写物の上位50種の大多数は、このようなタームと関連する。炎症及び免疫応答ネットワークは、より良い可視化のために明るくした；非制御転写物は示さない。上方制御されたmRNAの上位3つ（赤色の四角形により強調）を、さらなる検証に使用した。（B）プロテオミクス解析において、炎症及び免疫応答に関するすべてのタームは、このようなタームに関連するペプチドの大多数が制御されないため、灰色で現れる。炎症及び免疫応答のタームに関する4つのタンパク質のみが、制御される：Ppm1b及びElm02が上方制御され、Hsp90ab1及びFbxw11が下方制御される。炎症及び免疫応答に関する、すべての上方制御された転写物が、プロテオミクス解析により

10

20

30

40

50

検出されるとは限らない。両パネルにおいて、ノードのサイズは、遺伝子ノターム対クラスターの数を反映した。

【図7-2】LPS曝露後のマイクログリアNF- κ Bネットワークにおける、高度に上方制御されたmRNA及び非制御タンパク質を示す図である。LPS注入後にClueGoにより可視化された炎症及び免疫応答に関するターム。(A)mRNA解析において、炎症及び免疫応答に関するすべてのタームは、上方制御されたタームであり、赤色で示す。上方制御された転写物の上位50種の大多数は、このようなタームと関連する。炎症及び免疫応答ネットワークは、より良い可視化のために明るくした；非制御転写物は示さない。上方制御されたmRNAの上位3つ(赤色の四角形により強調)を、さらなる検証に使用した。(B)プロテオミクス解析において、炎症及び免疫応答に関するすべてのタームは、このようなタームに関連するペプチドの大多数が制御されないため、灰色で現れる。炎症及び免疫応答のタームに関する4つのタンパク質のみが、制御される：Ppm1b及びElm02が上方制御され、Hsp90ab1及びFbxw11が下方制御される。炎症及び免疫応答に関する、すべての上方制御された転写物が、プロテオミクス解析により検出されるとは限らない。両パネルにおいて、ノードのサイズは、遺伝子ノターム対クラスターの数を反映した。

10

【図8】脳の種々の領域におけるsiGLOの分布を示す図である。(A)脳の1：皮質；2：脳梁付近の線条体；3：皮質におけるsiGLOの分布を可視化する、3つの選択された領域の模式図。(B、C及びD)鼻腔内送達後の3つの選択された領域におけるsiGLO分布(赤色の点)。siGLOをスクランブルsiRNA又はSRSF3-siRNAと共トランスフェクトして、脳へのsiRNA取込みの視覚的評価を行った。スケールバーは10及び50 μ mである。(E~P)Iba1(緑色)陽性細胞(E、I及びM)の核(青色)(G、K及びO)に完全に局在化したsiGLOの赤色の点(F、J及びN)。シグナルの核局在化は、良好なトランスフェクションの明白なシグナルである。統合画像(H、L及びP)は、蛍光オリゴヌクレオチドが、ほとんどすべてのIba1陽性マイクログリア細胞の核に局在化したことを示した。

20

【図9】SRSF3が、SOD1変異マウスの脊髄においてpSRSF3のレベルが経時的に上昇する場合、ALSに関係づけられることを示す図である。高度に上方制御されたmRNAは、翻訳されず、鍵となるmRNAは、複数の推定SRSF3結合部位を3'UTRに有する。(A)SRSF3レベルのウエスタンブロット解析では、ALS前駆症状において有意に上昇し(SOD1変異マウス)、一方、リン酸化レベルは、疾患進行とともに顕著に上昇する。(B)(n=3；独立t検定；*p<0.05、**p<0.001)。(C)腰髄マイクログリア(158日のSOD1G93A)における最も上方制御されたmRNA 10種のリスト。黄色にマークされた転写物は、AD/ALS及びプリオン病の可能性のあるバイオマーカーを有すると報告される。列挙した高度に上方制御されたmRNAは、タンパク質レベルでは制御されない。生物情報解析により、Clec7a、Cst7の3'UTRは、SRSF3結合部位が高度にエンリッチされていることが明らかとなった。

30

【図10】正常加齢マウスモデル及び前頭側頭型認知症のマウスモデル(TDP-43^{G348C})における総SRSF3及びpSRSF3のレベルの上昇を示す図である。全脳抽出物のウエスタンブロット解析。

40

【図11】pSRSF3レベルが、孤発性ALS患者11の脳脊髄液(CSF)において上昇することを示す図である。pSRSF3が、ヒト脊髄、脳脊髄液(CSF)及び血漿において検出される。pSR免疫組織化学的検査を、ALS患者(B、C)及び対照対象(A)由来のパラフィンに包埋した死後ヒト脊髄切片について実施した。(D)ALS患者及び対照対象由来の血漿のウエスタンブロット解析。(E)対照対象と比較した場合の、ALS患者におけるpSRSF3レベルの上昇を示したウエスタンブロットの定量分析。データは、平均 \pm SEMである(n=4；*p<0.01)。(F)ALS患者及び対照対象由来のCSFのウエスタンブロット解析。*は、高曝露において観察された微弱なバンドを示す。(G)対照対象と比較した場合の、ALS患者におけるpSRSF3レベ

50

ルの上昇を示したウエスタンブロットの定量分析。データは、平均±SEMである ($n = 5$; ** $p < 0.01$)。

【図12】サイトゾルにおける抗SRSF3モルホリノ機構の模式図である。抗SRSF3モルホリノは、SRSF3 mRNAの5'UTRを標的とする25核酸塩基の単鎖である。これらは、相補RNAに結合し、RNAse H非依存的機構を介して作用して、サイトゾルにおいてSRSF3の翻訳開始を遮断する。抗ハツカネズミ (*mus musculus*) SRSF3モルホリノの配列は、5'-CCAAGGGACAGGAATCACGATGCAT-3' (配列番号15) である。mRNA標的の周囲に括弧を挿入して、SRSF3のハツカネズミ配列におけるこの位置を示している [以下に示す]。括弧は、センス鎖5'-ggtgggcctgtcggagcgttaggatttgagc
ttgggccttttgaaccaggaatctcgaat(atg)catcgt
gattcctgtcccttgg]-3' (配列番号16) に配置されることに留意されたい。抗ヒトSRSF3モルホリノの配列は、5'-CCAATGGACAGGAATCACGATGCAT-3' (配列番号17) である。mRNA標的の周囲に括弧を挿入して、SRSF3のヒト配列におけるこの位置を示している [以下に示す]。括弧は、センス鎖5'-gccgccgcattttttaaccctagatctcgaat(atg)catcgtgattcctgtccattgg]-3' (配列番号18) に配置されることに留意されたい。

【図13】SRSF3のノックダウン後のタンパク質の新規合成を示す図である。(A) 50 μ gの抗SRSF3モルホリノ又は生理食塩水をくも膜下腔内に送達後のSOD1G93A遺伝子導入マウス由来の全腰髄ホモジネートのウエスタンブロット解析。(B) 抗SRSF3モルホリノ投与後の内在性総SRSF3 (tSRSF3) 及びホスホSRSF3 (pSRSF3) の発現レベルを示したウエスタンブロットの定量分析。データは、平均±SEMである ($n = 3$; tSRSF3: 生理食塩水対抗SRSF3モルホリノ、** $p < 0.01$; pSRSF3: 生理食塩水対抗SRSF3モルホリノ、* $p < 0.05$)。(C) SOD1G93Aマウスにおける、50 μ gの抗SRSF3モルホリノ又は生理食塩水のくも膜下腔内送達後の全腰髄抽出物のウエスタンブロット解析。(D) SRSF3のノックダウン後の内在性CST7、GPNMB及びTLR2タンパク質の発現レベルの上昇を示したウエスタンブロットの定量分析。データは、平均±SEMを表す ($n = 3$; ** $p < 0.01$)。アクチンをローディングコントロールとして使用する。

【図14】麻痺発症後に開始した抗SRSF3モルホリノ治療により、SOD1G93A遺伝子導入マウスの生存が向上し、これらの運動機能が向上したことを示す図である。(A) 実験タイムラインの模式図。(B) 抗SRSF3モルホリノ又は生理食塩水のi.p.による注入後の、フィコールを加えた精製マウス血液細胞のウエスタンブロット解析。(C) モルホリノ投与後6日の内在性SRSF3の発現レベルの低下を示したウエスタンブロットの定量分析 (データは、平均±SEM、 $n = 3$; * $p < 0.05$ である)。アクチンをローディングコントロールとして使用する。(D) 抗SRSF3モルホリノ又は対照処置SOD1G93A遺伝子導入マウスのKaplan-Meier生存曲線。SOD1G93A遺伝子導入マウスに、抗SRSF3モルホリノ (25 mg/kgを1週間に1回、 $n = 8$ 、赤色の線) 又は対照モルホリノ (スクランブル、 $n = 9$ 、青色の線) を腹腔内に処置した。Kaplan-Meier分析のログランク検定に従って、対照処置群と比較した場合、モルホリノ処置群の生存率において統計学的有意差が存在した (モルホリノについては $p < 0.0386$)。(E) 運動機能のロータロッド試験を、モルホリノ (25 mg/kgを1週間に1回、データは、平均±SEM、 $n = 8$ 、赤色の線を表す) 又は対照モルホリノ (スクランブル、25 mg/kgを1週間に1回、データは、平均±SEM、 $n = 9$ 、青色の線を表す) を腹腔内に注入した遺伝子導入SOD1G93Aマウスの処置により実施した。野生型マウス (WT) は、処置せず、対照として使用した (データは、平均±SEM、 $n = 4$ 、黒色の線を表す)。

【図15】抗SRSF3モルホリノで処置すると、SOD1G93Aマウスにおける脾臓及び筋肉の萎縮が回復することを示す図である。(A) SOD1G93ATgマウス及び

10

20

30

40

50

WTの同腹仔由来の脾臓の形態及びサイズ。症候性SOD1^{G93A}遺伝子導入マウス(25mg/kgを1週間に1回)において開始した抗SRSF3モルホリンによる腹腔内処置によって、対照(スクランブル、25mg/kgを1週間に1回)と比較した場合、脾臓萎縮が回復する。(B)SOD1^{G93A}Tgマウス及びWTの同腹仔由来の筋肉の形態及びサイズ。症候性SOD1^{G93A}マウスにおいて開始した抗SRSF3モルホリン治療による腹腔内処置(25mg/kgを1週間に1回)によって、対照(スクランブル、25mg/kgを1週間に1回)と比較した場合、筋萎縮が回復した。(C)前脛骨(TA)筋の平均重量を、抗SRSF3モルホリン又はスクランブルモルホリンで処置したSOD1^{G93A}間で比較した。野生型マウス(WT)を対照として使用した(データは、平均±SEM、n=3マウス/群、***p<0.001を表す)。(D)NFH染色TA筋(緑色)の代表的顕微鏡写真。スケールバーは1mmである。

10

【図16】抗SRSF3モルホリンで処置すると、SOD1^{G93A}マウスの脊髄において、運動ニューロンが維持され、ミクログリア活性化が向上することを示す図である。(A)抗SRSF3モルホリン又はスクランブルを注入した後期症候性SOD1^{G93A}遺伝子導入マウス由来の、ChAT及びNeuN染色腰髄切片の代表的顕微鏡写真。野生型(WT)マウスを対照として使用した(1群あたりn=3)。(B)抗SRSF3モルホリン又は生理食塩水を注入した後期症候性SOD1^{G93A}遺伝子導入マウス由来のIba1染色腰髄切片の代表的顕微鏡写真。野生型(WT)マウスを対照として使用した(1群あたりn=3)。

【図17】SRSF3のRNA結合ドメイン(RRMドメイン)を標的とするMAB121の産生及び検証を示す図である。(A)SRSF3タンパク質の配列。RRMドメインの配列(配列番号13)を緑色で示し、RSドメインの配列(配列番号14)を橙色で示す。ユニークな免疫原性配列(GNNGNKTELEAFGYGPLRSV)(配列番号20)を太字で示す。(B)SRSF3作用の遮断におけるMAB121抗体の関与を示す模式図。(C)ELISA及び(D)ルシフェラーゼアッセイによる免疫化動物血清の試験及び解析。I SRSF3のこの標的mRNAとの相互作用を破壊しルシフェラーゼ活性を増強する、抗体MAB121の効率を確認する、ルシフェラーゼアッセイ解析の模式図。図4に示すルシフェラーゼレポーター系を、この実験に使用する。

20

【図18】免疫原として合成ペプチド、又はBSAを使用した(A)ELISAによる、異なるラット血清の親和性の解析を示す図である。BSA又は合成ペプチドを、MAB121抗体を含む血清、又は予備免疫血清(p)でインキュベートした。データは、平均±SEM(n=3;****p<0.0001)を、又は(B)ルシフェラーゼアッセイにより表す。HEK293細胞は、pGL3プロモーター(pGL3)(GenBank受託番号U47298)、pGL3プロモーターSaa3-3'UTR-wt(配列番号2)(pGL3-Saa3-3'UTR)及びpGL3プロモーターSCRAMBLE(pGL3スクランブル)構築物をトランスフェクトした。pGL3-Saa3-3'UTRをトランスフェクトしたHEK293細胞を、種々の免疫化動物由来の血清で処理し(各動物由来の予備免疫血清を対照として使用した)、48時間後にルシフェラーゼ活性について試験した。データは、平均±SEMを表す(n=3;pGL3プロモーター対pGL3-Saa3-3'UTR:***p<0.001;pGL3-Saa3-3'UTR対pGL3スクランブル:***p<0.001;pGL3-Saa3-3'UTR対pGL3-Saa3-3'UTR+ラット#155(155):*p<0.05;pGL3-Saa3-3'UTR+ラット#155の予備免疫血清(155p)対pGL3-Saa3-3'UTR+ラット#155:*p<0.05;pGL3-Saa3-3'UTR対pGL3-Saa3-3'UTR+ラット#158(158):*p<0.05)。

30

40

【図19】SRSF3が、脳卒中後のミクログリア活性化の調節に関係づけられることを示す図である。(A)非脳卒中对照(CTL)と比較した場合、80分の中大脳動脈閉塞術(MCAO)後24時間の発現レベルが有意に上昇し、一方、tSRSF3は低下することを明らかにした、pSRSF3のウエスタンブロット解析。(B)ウエスタンブロットの定量分析。データは、平均±SEMを表す(n=4;pSRSF3-MCAO対pS

50

R S F 3 - C T L : * * * $p < 0 . 0 0 1$; t S R S F 3 - M C A O 対 t S R S F 3 - C T L : * $p < 0 . 0 5$)。アクチンをローディングコントロールとして使用する。(C) C T L 及び M C A O における l b a 1 (赤色) 及び p S R S F 3 (緑色) の代表的 2 重免疫蛍光画像。

【図 2 0】M C A O における、s i R N A により媒介される S R S F 3 ノックダウン後のミクログリア活性化の上昇を示す図である。(A) 実験タイムラインの模式図。(B) M C A O 条件下でのスクランブル s i R N A 又は S R S F 3 - s i R N A の鼻腔内投与後の全脳抽出物のウエスタンブロット解析。(C) s i R N A 投与後の S R S F 3 レベルの低下を示したウエスタンブロットの定量分析。データは、平均 \pm S E M を表す ($n = 4$; スクランブル対 S R S F 3 s i R N A * * * $p < 0 . 0 0 1$)。アクチンをローディングコントロールとして使用した。(D) M C A O 誘導の前 (ベースライン) 及び 2、3、5 及び 7 日後の生物発光シグナルの 2 D 再構築。I M C A O 誘導後 2 4 時間に S R S F 3 - s i R N A 又はスクランブル s i R N A の投与を受けた T L R 2 - l u c - G F P マウスにおける光子放出により表される脳からの総光子放出の長期定量分析 (データは、平均 \pm S E M、M C A O 群 : $n = 5$; スクランブル s i R N A + M C A O : $n = 6$; S R S F 3 - s i R N A + M C A O : $n = 7$; スクランブル s i R N A + M C A O 対 S R S F 3 - s i R N A + M C A O : * $p < 0 . 0 5$ である)。

【図 2 1】脳卒中後 2 4 時間の s i R N A の鼻腔内送達により、脳卒中後の虚血病変のサイズが有意に縮小したことを示す図である。(A) M C A O 後 7 日のスクランブル又は S R S F 3 - s i R N A 処置マウスにおける梗塞体積を示した脳切片的クレシルバイオレット染色。(B) S R S F 3 - s i R N A 投与後、スクランブル s i R N A と比較した場合の脳卒中体積の有意な減少を示した梗塞体積の定量 (データは、平均 \pm S E M、* * * $p < 0 . 0 0 1$ である)。(C) S R S F 3 - s i R N A 投与後、スクランブル s i R N A と比較した場合の C C L 3、C C L 5、T I M P 1 及び G M - C S F の発現の有意な増加を示した、M C A O 後 3 日の脳卒中領域のサイトカインアレイ解析 (データは、平均 \pm S E M、C C L 3 : * * * $p < 0 . 0 0 1$; C C L 5 : * $p < 0 . 0 5$; T I M P 1 : * * $p < 0 . 0 1$; G M - C S F : * * $p < 0 . 0 1$ である)。

【図 2 2】S R S F 3 が、アミロイド前駆タンパク質 (A P P) 遺伝子導入マウスの脳において p S R S F 3 レベルが経時的に上昇する場合、A D 病態形成に関係づけられることを示す図である。(A) A P P マウス 3 ~ 5 カ月 (m o)、A P P 7 ~ 9 m o 及び A P P 1 7 ~ 2 0 m o の全脳抽出物におけるリン酸化形態の S R S F 3 タンパク質 (p S R S F 3) のウエスタンブロット解析。(B) S R S F 3 のリン酸化が、A P P マウスにおける疾患発症 / 認知障害発症の時点から始まり有意に増加することを示した定量分析。データは、平均 \pm S E M を表す ($n = 3$ * $p < 0 . 0 5$)。G A P D H をローディングコントロールとして使用した。(C) S R S F 3 のリン酸化が疾患を越えて増加し、7 ~ 9 カ月から始まることを示した A P P 遺伝子導入脳切片の代表的顕微鏡写真。活性化ミクログリアにおいて C D 1 1 b マーカーと共局在化した抗 p S R S F 3 タンパク質染色。W T マウスを陰性対照として使用した。画像は、海馬領域から撮像した。コンゴレッドを使用して、A P P マウス 1 7 ~ 2 0 m o におけるアミロイド斑を染色し、W T マウスと比較した。

【図 2 3】高度に上方制御された m R N A が、A P P マウスモデルにおいて翻訳されていないことを示す図である。(A) W T 又は A P P マウス 1 7 ~ 2 0 m o 由来の全脳抽出物における G F A P タンパク質発現のウエスタンブロット解析。G F A P を、A P P 遺伝子導入マウスモデルにおける疾患進行の陽性対照として使用した。(B) 同齢の W T マウスと比較した場合の A P P マウス 1 7 ~ 2 0 m o における G F A P アイソフォーム発現の有意な増加を示したウエスタンブロットの定量分析。データは、平均 \pm S E M ; * $p < 0 . 0 5$ を表す。アクチンをローディングコントロールとして使用した。(C) A P P 遺伝子導入マウス (3 ~ 5 m o 及び 1 7 ~ 2 0 m o) の全脳抽出物における C L E C 7 a、T L R 2、C S T 7、C D 6 8 及び G P N M B 発現のウエスタンブロット解析。(D) 発明者らが A P P - 1 7 ~ 2 0 m o におけるその発現レベルの上昇を観察した C L E C 7 a を除

10

20

30

40

50

いて、TLR2、CST7、CD68及びGPNMB発現レベルに疾患を越えて有意差がないことを示した定量分析。データは、平均±SEMを表す(n=3 * p<0.05)。GAPDHをローディングコントロールとして使用した。

【図24】SRSF3 mRNAに対するモルホリン(50 µg)の鼻腔内送達後の総SRSF3のノックダウンを示す図である。(A) Srsf3 mRNAを標的とするモルホリンの鼻腔内送達後3日及び1週間の総SRSF3ノックダウンのウエスタンブロット解析。(B) 全脳抽出物から得たウエスタンブロットの濃度測定分析。データは、平均±SEMを表す(n=3 CTL対72時間: * p<0.05、CTL対1週間; ** p<0.01、72時間対1週間: # p<0.05)。アクチンをローディングコントロールとして使用した。

【図25】症候性SOD1G93Aマウスの脊髄に由来する初代成熟ミクログリア細胞を10 µMの抗SRSF3モルホリンで処理すると、異常ALSミクログリアと関連するマーカーのうちの一つであるGal3の発現が減少することを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書は、高度に制御されたLPS遺伝子の翻訳を遮断することにより、SRSF3(セリン/アルギニン-リッチスプライシング因子3(SRSF3/SRp20/SFRS3))が、常在ミクログリアにおける自然免疫応答の主要制御因子として作用するという驚くべき知見に関する。

【0016】

*in vivo*でのミクログリア活性化の分子機構を解読するために、本発明書らは、Flag/EGFPを大サブユニットリボソームタンパク質L10aのN末端に融合し、骨髄特異的遺伝子プロモーター(配列番号1)の転写制御下で発現させた、遺伝子導入モデルを作製した。リボソームに結合したmRNAとペプチドの両方を単離することにより、本発明者らは、動的翻訳状態のミクログリアリボソームのスナップショットを、インプットとしてのmRNA及びアウトプットとしての新規に合成したペプチドとともに入手した。この戦略を使用して、ミクログリア活性化と関連する、mRNA及びタンパク質の特性を同定した。リボソーム結合ペプチドの平行分析により、最も高度に上方制御されたmRNAは、翻訳されていないことが明らかとなった。高度に上方制御された炎症促進性mRNAに反して、鍵となる免疫NF- κ Bインタラクトームを形成するペプチドを含む、配列決定されたペプチドの大多数は、下方制御及び/又は上方制御のいずれかがなされた。リボソームに基づくチェックポイント/制御: 高度に発現し、リボソームに結合し、「活発に翻訳される」mRNAの選択的3'UTR媒介翻訳抑制を同定した。高度に制御された遺伝子の翻訳抑制が、Saa3の3'UTRのすべてのドメインにおいて複数の推定結合部位を有する、RBPセリン/アルギニン-リッチスプライシング因子3(SRSF3/SRp20/SFRS3)及び他の高度に制御されたLPS遺伝子により編成されたことが見出された。

【0017】

自然免疫曝露に応答したミクログリア活性化の分子パターンを調査することにより、ミクログリアmRNA及びタンパク質分子の特性の顕著な解離を発見した。最も著しい相違は、鍵となる免疫NF- κ Bネットワークにおいて観察され、このネットワークでは、高度に上方制御されLPSにより誘導されリボソーム会合mRNAのクラスターが、翻訳されていなかったことが見出された。高度に制御されたLPS誘導mRNAのかなり選択的なこの翻訳制御により、2つの明確に異なるミクログリア分子特性: i) 高度に特殊化された免疫性及び炎症促進性mRNA特性、並びにii) より免疫調節性の恒常性タンパク質特性の形成が生じた。注目すべきことには、観察された翻訳抑制は、高度に上方制御されたLPS誘導遺伝子のクラスターに制限され、一方、非制御の転写物は、正常に翻訳され、質量分析及びウエスタンブロット解析により、予想されたレベルで検出された。次いで、3'UTR領域が、高度に上方制御されリボソームに結合した免疫転写物の翻訳制御において、鍵となる役割を担うことが見出された。その上、RNA結合タンパク質SR

10

20

30

40

50

F3を、ミクログリア細胞における自然免疫遺伝子翻訳の主要制御因子として同定した。また、SRSF3が、上方制御された、いくつかの自然免疫遺伝子に推定結合部位を有することが見出された。加えて、LPS曝露の文脈においてsiRNAによる内在性SRSF3の選択的ノックダウンにより、高度に制御された、いくつかの自然免疫遺伝子の翻訳制御が軽減され、これにより、SAA3、CCl5及びCCl3を含む免疫媒介物質のタンパク質合成の安定した増加が生じる。SRSF3により媒介される、タンパク質生成の抑制が、リボソーム結合mRNAを標的とすることを考慮すると、これは、タンパク質合成の開始後に機能し、ミクログリア活性化を制御する免疫遺伝子翻訳の制御機構/チェックポイントの存在を強力に示唆する。

【0018】

生理学的条件下では、ミクログリア細胞は、脳の恒常性を維持するのに役立つが、制御されずに長期活性化されたミクログリア細胞は、ニューロンに対して有害である(Prinz及びPriller、2014)。したがって、ミクログリア活性化に関する分子機構の理解への関心がますます高まっている。公表された研究では、文脈依存的ミクログリア免疫転写物の同定/説明に注目しているが(Beutnerら、2013; Butovskyら、2014; Hickmanら、2013; Zhangら、2014)、in vivoでのミクログリアプロテオミクス及び関連する制御機構は、それほど明確ではない。最初の包括的成体マウス脳プロテオームは、Sharmaらにより示されている(Sharmaら、2015)。しかし、解析は、接着分子Lsamp、並びに脳及び種々の細胞型にわたるこの発現パターンに制限されていた。ミクログリア活性化の分子機構のより良い理解における限定要因の1つは、適切なin vivoモデルの欠如であった。ミクログリアリボソームの翻訳動態を研究することによって、LPS曝露後のmRNA及びタンパク質分子の特性に顕著な相違が見出された。自然免疫応答におけるmRNAのタンパク質への翻訳は、高度に制御されたプロセスであり、転写物の安定性を標的とする、いくつかの転写後機構が、これまでに記載されている(Anderson、2010; Carpenterら、2014; Minoら、2015)。しかし、本明細書に記載する結果は、mRNAの制御が、翻訳開始後に生じることを明らかにした。記載のプロセスは、高度に制御された自然免疫mRNAに対して選択的であり、一方、非制御の転写物は、正常に翻訳され、定量的質量分析により、予想されたレベルで検出された。重要なことには、標的mRNAの3'UTR領域は、RBP SRSF3の推定結合部位が高度にエンリッチされていた。したがって、LPS曝露後のmRNA及びタンパク質応答の観察された相違は、SRSF3によってもたらされる3'UTR媒介阻害作用により、ある程度説明することができる。

【0019】

加えて、SRSF3が、ALS誘導SOD1モデル変異マウスの脊髄において(図9)及び孤発性ALS患者の脳脊髄液(CSF)において(図11)上方制御されることも見出された。本明細書に記載するように、SRSF3が、正常加齢マウスモデルにおいて及び前頭側頭型認知症(FTD)のマウスモデルにおいて(TDP-43^{G348C})上方制御されることも見出された。特定のいかなる理論にも拘束されずに、本発明者らは、LPS曝露ミクログリア細胞において観察されるものと類似の機構が、神経学的状態、中枢神経系のがん、抗ウイルス性及び細菌性感染症(特には、免疫細胞を標的とする感染症)において存在すると考える。本発明者らは、SRSF3、又はリン酸化SRSF3により機能する翻訳抑制が、翻訳抑制がなかったなら神経学的状態、中枢神経系のがん及び感染症の制御及び治療に適切であり得る、骨髄細胞における免疫機能を抑制し得ると考える。

【0020】

神経炎症及びミクログリアの活性化は、多くの脳病理の特徴である。ALS並びに他の神経変性障害では、疾患の過程を通じて、ミクログリア細胞は、はじめは有益な細胞から、任意の治療介入(従来抗炎症方法を含む)に耐性の高度に神経毒性及び異常な細胞へと、その表現型を変化させる。この上、ますます増加するエビデンスは、ALS及び/又はADにおける慢性脳炎症が、末梢における自然免疫の顕著な脱制御と関連し得ることを

10

20

30

40

50

示唆する (Zangら 2005、2009、2013)。最近の発明者らの一連の実験により、SRSF3 活性 (例えば、この発現レベルの変化及び/又はリン酸化) の変化により、脳及び末梢における自然免疫応答が制御され得ることが明らかとなった。実際、本発明者らは、内毒素 LPS の全身注入に対するミクログリア応答 (感染症に対する急性自然免疫応答のモデル) における SRSF3 の役割を明らかとした。siRNA 方法による内在性 SRSF3 の標的ノックダウンは、SRSF3 により調節される免疫遺伝子の翻訳停止を軽減することを示し、タンパク質の新規合成を伴った。

【0021】

一態様では、SRSF3 を、骨髄細胞 (例えば、ミクログリア又は単球細胞) の表現型の制御/正常化の標的として使用して、種々の病態における免疫機能を回復させることができる。

10

【0022】

一態様では、SRSF3 作用剤は、脳血管発作 (CVA)、例えば、血管の閉塞により引き起こされる虚血性脳卒中、又は血管の破裂により引き起こされる出血性脳卒中の治療に使用する。虚血性炎症後の解析により、SRSF3 が、脳卒中後のミクログリア活性化の調節に関与していることが明らかとなった。図 19A に示すように、pSRSF3 のレベルは、脳卒中後に有意に増加した。2重免疫蛍光分析により、脳卒中後の pSRSF3 の発現が、Iba1 陽性活性化ミクログリアに制限されることが明らかとなった。脳卒中後 24 時間の、SRSF3 を標的とする siRNA の鼻腔内送達により、内在性タンパク質の有意なノックダウンが誘導された (図 20A~C)。治療方法としての siRNA の鼻腔内送達を、本明細書において記載する。治療は、脳卒中後の免疫応答の遅延/再生促進期を一過的にリプログラミングし得る、単一用量としてデザインした。内在性 SRSF3 の siRNA 媒介ノックダウンは、脳卒中後 3~5 日に自然免疫応答の顕著な増加を誘導し、これを、TLR2 レポーターマウスを使用して *in vivo* で可視化した。重要なことには、自然免疫応答/ミクログリア活性化の遅延的誘発は、虚血病変のサイズの有意な減少、並びに SRSF3 により制御されることが知られているある特定の免疫分子、例えば、CCL3、CCL5 及び関連遺伝子の発現レベル (タンパク質) の遅延的増加と関連した。したがって、脳卒中後 24 時間に開始された SRSF3 の標的ノックダウンにより、脳卒中後に遅延的炎症応答が増加し、虚血病変が減少する (図 21)。

20

【0023】

要約すれば、本発明者らは、骨髄細胞の分子制御 (例えば、ミクログリア活性化) に関与する、リボソームに基づく機構/チェックポイントを発見した。また、本発明者らは、RNA 結合タンパク質 SRSF3 が、高度に上方制御された自然免疫遺伝子翻訳の主要制御因子として作用し、これにより、自然免疫応答の制御において中心的役割を担うことを示した。これは、骨髄細胞 (例えば、ミクログリア活性化) 及び自然免疫応答の標的治療制御の道を開く。

30

【0024】

配列表

【0025】

【表1】

表1:

配列番号:	名称	
1	CD11b p-I-Flag-EGFP-Rpl10a-II	
2	Saa3-3'UTR-wt (pGL3-プロモーター)	
3	スクランブル(pGL3-プロモーター)	
4	Saa3-3'UTR-DelC	
5	Saa3-3'UTR-DelB+C	
6	Saa3-3'UTR-DelA	10
7	Saa3-3'UTR-DelB	
8	siRNA-1 GAAAGGCACCUGAGAAUUAU (配列番号8)	
9	siRNA-2 CCAGAUGAGAUUUAGGUUAU (配列番号9)	
10	siRNA-3 CUAGCAUAAUUGUGUAGUA (配列番号10)	
11	siRNA-4 CUAGAAGGUUCCAACAUGA (配列番号11)	
12	SRSF3	
13	SRSF3のRRMドメイン	
14	SRSF3のRSドメイン	
15	マウスアンチセンス(5'-3')(図12)	20
16	mRNAマウス5'UTR標的配列(図12)	
17	ヒトアンチセンス(5'-3')(図12)	
18	mRNAヒト5'UTR標的配列(図12)	
19	mRNA前駆5'UTRヒトSRSF3 ttccaggtcacctgaccggtctccttctgctgctcgccgccaagtcctgcaagttgcttgagagac gagaaaccagcaagagttgggcaaactttccaaa ccaggcttttctcagtggtgaatctagggcgccacagctctggtgccagctgggtcacaaca gctccgtgacctgtttgtaaacgcgatgctcttagt tccagactaaccgctcacaagggtgaagcacttaattaattcatcttcttaattctgttaggggcca acggctcctattagtggtgagcgtgacggcgac gggtgctgttatgaagccctagcctattggaggtgaggaagaggagctgtgggtaacctgga ggtcgacagaccgggaggaacgctcgagggagcacc aggcctgttacaacgagcgcgccgacgcacgtctccaccacccggcgcaaccgccag agcgcgctcccagcaaccgcggtctcgctgctgctgttag ccatagtcacggcctcttctgctctcattgggggagcccgtccaatcatgtgattccagtagggc gtataaataaaggcgaggagaaggcggtggtcc gccatttcgtggacgccgggtgagtgagagagttggtggtggtggccggaggaaagcggg aagactcatcgagcgtgtgattgagccgccgatt tttaaccctagatctcgaa (配列番号19)	30
20	免疫原性SRSF3配列	40

【0026】

定義

用語「対象」は、神経学的状態、中枢神経系のがん、ウイルス性感染症又は細菌性感染症を思いやすいか、又は患っている、任意の対象を指す。詳細には、このような対象は、ヒト、動物（例えば、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ等）であり得るが、これらに制限されない。より詳細には、対象は、ヒトからなる。

【0027】

用語「素因を有する」及び「疑われる」は、神経学的状態、中枢神経系のがん、ウイルス性感染症又は細菌性感染症の病態又は症候を未だ経験又は呈示していないが、神経学的

状態、中枢神経系のがん、ウイルス性感染症又は細菌性感染症を発症する、確立の上昇又はリスクの上昇を有し得る、対象を指す。

【0028】

用語「mRNA」又は「遺伝子転写物」は、mRNA前駆転写物（複数可）、転写プロセス中間体及び翻訳可能な状態の成熟mRNA（複数可）を指す。転写プロセスは、スプライシング、編集及び分解を含み得る。

【0029】

用語「上方制御されたmRNA」は、神経学的状態、中枢神経系のがん、ウイルス性感染症若しくは細菌性感染症を発症する素因を有するか、又はこれを発症すると疑われるか、或いは神経学的状態、中枢神経系のがん、ウイルス性感染症若しくは細菌性感染症を患っている対象由来の試料において、同一の特定のポリペプチドをコードするmRNAの、健常対象由来の試料における基準レベルと比較して、検出可能に上昇する、特定のポリペプチドをコードするmRNAのレベルを指す。

10

【0030】

本明細書において使用する場合、「自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードするmRNA」は、例えば、LPS曝露の後に、上方制御されるが、翻訳されない、免疫機能に関係づけられるポリペプチド、例えば、SAA3、LCN2、CCL5、IRF7、CCL3、IFI44、IRGM1、GBP2、PLIN4、CP、GPR84、OASL2、IFIT1、USP18、GBP7、GM7676、CLEC7A、OLFR110、CH25H、LILRB4、GPNMB、CST7、OLFR111、CTLA2B、CD68、EIF4A2、TREM2又はAPOEをコードする遺伝子由来のmRNAを含む。

20

【0031】

自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドは、例えば、LPS曝露の後に、上方制御されるが、翻訳されないポリペプチド、例えば、SAA3、LCN2、CCL5、IRF7、CCL3、IFI44、IRGM1、GBP2、PLIN4、CP、GPR84、OASL2、IFIT1、USP18、GBP7、GM7676、CLEC7A、OLFR110、CH25H、LILRB4、GPNMB、CST7、OLFR111、CTLA2B、CD68、EIF4A2、TREM2又はAPOEを含む。

30

【0032】

自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードするmRNAはまた、本明細書に記載の（例えば、実施例2に記載のマウスモデルにおける）、以下の表1に記載のもののような、LPS注入後に上方制御されたmRNAを含む。

【0033】

【表2】

表2: LPS注入後に上方制御されたmRNAの3'UTR上の相対SRSF3結合部位

	遺伝子記号	名称	mRNA 変化倍 率	3'UTR 長(bp)	相対SR SF3結合 部位
クラス ター1					
	<i>Saa3</i>	血清アミロイドA3	29.52	128	24
	<i>Lcn2</i>	リポカリン2	23.71	224	32
	<i>Ccl5</i>	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガ ンド5	15.93	198	16
	<i>Irf7</i>	インターフェロン制御因子7	7.8	41	3
	<i>Ccl3</i>	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガ ンド3	5.19	428	29
クラス ター2					
	<i>Ifi44</i>	インターフェロン誘導タンパク 質44	7.15	1458	173
	<i>Irgm1</i>	免疫関連GTPaseファミリーM メンバー1	6.17	552	83
	<i>Gbp2</i>	グアニル酸結合タンパク質2	5.01	515	91
	<i>Plin4</i>	ペリリピン4	4.8	1416	60
	<i>Cp</i>	セルロプラスミン	4.35	411	82
	<i>Gpr84</i>	Gタンパク質共役受容体84	3.69	213	8
	<i>Oasl2</i>	2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素 様2	3.69	878	166
	<i>Ifit1</i>	テトラトリコペプチド反復配列 1を有するインターフェロン誘 導タンパク質	3.42	1152	38
	<i>Usp18</i>	ユビキチン特異性ペプチダーゼ 18	3.21	400	17
	<i>Gbp7</i>	グアニル酸結合タンパク質7	3.04	3577	367

【0034】

自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードするmRNAはまた、以下の表2
に示すmRNAを含む。

【0035】

【表3】

表3: 疾患の進行期に(ALSマウスモデルにおいて)高発現し、ミクログリア免疫機能に関係づけられる、プロテオミクス解析において検出されないmRNA

記号	名称	変化倍率	p 値	3'UTR における Srsf3 結合部位の数
<i>Clec7a</i>	C 型レクチンドメインファミリー7メンバーA	38,04	0,024969	16
<i>Olf110</i>	嗅覚受容体	22,33	0,019223	?
<i>Ch25h</i>	コレステロール 25 ヒドロキシラーゼ	18,26	0,001887	11
<i>Lilrb4</i>	白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー4	16,57	0,000155	41
<i>Gpnmb</i>	膜貫通糖タンパク質 NMB	16,52	0,001199	17
<i>Cst7</i>	シスタチン F	14,16	0,009823	19
<i>Olf111</i>	嗅覚受容体	13,3	0,00493	?
<i>Ctla2b</i>	タンパク質 CTLA-2 ベータ	13,2	0,017815	8
<i>Cd68</i>	マクロシアリン	12,81	0,00005	5
<i>Eif4a2</i>	真核生物翻訳開始因子 4A-II	12,41	0,02398	17
<i>Trem2</i>	骨髄細胞に発現するトリガー受容体 2	7,4	0,0064	21
<i>ApoE</i>	アポリポタンパク質 E	1,78	0,04	6

10

20

【0036】

「核酸」又は「核酸配列」の表現は、天然に存在する塩基、糖及び糖間（骨格）結合からなる、ヌクレオシド又はヌクレオチド単量体の配列を指す。この用語はまた、天然に存在しない単量体又はこの部分を含む、修飾又は置換した配列を含む。本開示の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）又はリボ核酸配列（RNA）であることがあり、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン及びウラシルを含む、天然に存在する塩基を含むことがある。この配列はまた、修飾した塩基を含み得る。

30

【0037】

「3'UTR」の表現は、成熟 mRNA の配列に対応する 3' 非翻訳領域を指し、これは、タンパク質コード領域の終止コドンに近接した 3' に、好ましくは、タンパク質コード領域の終止コドンに隣接した 3' に位置し、ポリ（A）配列の 5' 側まで、好ましくは、ポリ（A）配列に隣接した 5' のヌクレオチドまで伸長する。

40

【0038】

「3'UTR 結合部位」の表現は、配列に結合可能なポリペプチドと特異的に結合可能な mRNA の 3' UTR 配列に含まれる、核酸配列を指す。核酸配列は、長さが増加し得る。単一 3' UTR 配列は、複数の 3' UTR 結合部位を含み得る。

【0039】

「神経学的状態」の表現は、ニューロンの構造又は機能の進行性消失に關与する状態を指す。神経学的状態は、血管性認知症、前頭側頭葉変性症（FTD）、アルツハイマー、運動ニューロン疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、進行性球麻痺（PBP）、原発性側索硬化症（PLS）又はケネディ病）及びパーキンソン病を含む。

【0040】

50

中枢神経系のがんの表現は、星状細胞腫、神経膠芽腫又は乏突起膠腫を含む。

【0041】

「ウイルス性感染症」の表現は、ウイルスに起因する感染症を指す。この感染症は、臨床的に明らかとなるかどうかは、わからない。ウイルス性感染症のすべての形態は、HIV、デングウイルス、インフルエンザウイルス、EBウイルス等による感染症を含む、この定義に含まれる。

【0042】

「細菌性感染症」の表現は、細菌に起因する感染症を指す。この感染症は、臨床的に明らかとなるかどうかは、わからない。細菌のすべての形態は、球菌、桿菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、プロトプラスト等を含む、この定義に含まれる。グラム陰性又はグラム陽性の原核生物もまた、この用語に含まれる。

10

【0043】

「ポリペプチド又はこの断片」の表現は、ペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質を指す。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾を除外しない。例えば、グリコシル基、アセチル基、脂質基等の共有結合を含むポリペプチドは、用語ポリペプチドにより包含される。用語「この断片」は、本明細書において使用する場合、完全長基準ポリペプチドのポリペプチド配列を、例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上含み得る、ポリペプチドを指す。一態様では、断片は、機能性（例えば、完全ポリペプチド又はポリヌクレオチドの活性を保持する）の断片である。

【0044】

SRSF3 (SFRS3又はSRP20としても知られる)は、セリン及びアルギニンリッチスプライシング因子3として知られるタンパク質である(配列番号12)。SRSF3は、当技術分野において周知である。例えば、GenBank NM_003017.4又はUniProt P84103を参照されたい。一態様では、SRSF3は、本明細書において使用する場合、完全長のSRSF3又はこの断片を指す。一態様では、SRSF3は、少なくとも1つのRRM(RNA認識モチーフ)結合ドメイン(配列番号13)を含む。さらなる態様では、SRSF3は、RS(セリン-アルギニンジペプチド反復配列)ドメイン(配列番号14)を含む。一態様では、SRSF3は、少なくとも1つのRRM(RNA認識モチーフ)結合ドメイン(配列番号13)、少なくとも1つのRS(セリン-アルギニンジペプチド反復配列)ドメイン(配列番号14)を含む。一態様では、SRSF3は、リン酸化される。

20

30

【0045】

さらなる態様では、SRSF3は、GenBank NM_003017.4若しくはUniProt P84103又はこの機能性断片のSRSF3タンパク質の天然配列を含む。一実施形態では、SRSF3ポリペプチドは、配列番号12、GenBank NM_003017.4又はUniProt P84103に示す配列の部分又はすべてと、少なくとも65%~95%同一、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%同一、又は少なくとも95%同一の配列を含む。

【0046】

一実施形態では、SRSF3ポリヌクレオチドは、本明細書に定義するSRSF3ポリペプチドをコードする配列を含む。一実施形態では、SRSF3ポリヌクレオチドは、GenBank NM_003017.4若しくはUniProt P84103又はこの断片に示す配列の部分又はすべてと、少なくとも65%~95%同一、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%同一、又は少なくとも95%同一のポリヌクレオチドを含む。

40

【0047】

「リン酸化SRSF3」の表現は、本明細書において使用する場合、リン酸化により翻訳後修飾されているSRSF3のすべての形態を指す。特に、スレオニン、セリン、ヒドロプロリン(hydroproline)、ヒドロキシリジン、チロシン、及び/又は他の任意の非天然ヒドロキシアミノ酸の側鎖のヒドロキシ基が、リン酸基によりエステル

50

化される場合、この表現は、SRSF3を指す。SRSF3は、少なくとも1つのリン酸化部位を含む。用語「リン酸化部位」は、リン酸化又は脱リン酸化の目的のために、キナーゼ又はホスファターゼによりそれぞれ認識される、アミノ酸又はアミノ酸配列を指す。

【0048】

「SRSF3作用剤」の表現は、SRSF3の機能又は発現を修飾可能な作用剤を指す。一態様では、SRSF3作用剤は、SRSF3翻訳抑制活性を阻害することができる。さらなる態様では、作用剤は、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、少なくとも1つのmRNAの3'UTRに結合する、SRSF3の能力を阻害することができる。SRSF3翻訳抑制活性を修飾することにより、SRSF3作用剤は、mRNA翻訳を完全又は部分的に回復させることがあり、次いで、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、少なくとも1つのmRNAの翻訳の増加を生じさせることがある。

10

【0049】

「SRSF3作用剤」は、SRSF3の発現又は機能を阻害可能なSRSF3作用剤を含む。一態様では、SRSF3作用剤は、リン酸化されているSRSF3の活性又は機能を阻害する。さらなる態様では、SRSF3作用剤は、SRSF3特異抗体（例えば、モノクローナル抗体、単鎖抗体（単鎖変異断片）、ヒト化抗体、及び/又はリン酸化SRSF3に特異性の抗体）、核酸（例えば、アンチセンス、干渉RNA分子、siRNA、又はmiRNA）、ポリペプチド、低分子量化合物又は遺伝子編集系である。

20

【0050】

さらなる態様では、遺伝子編集系は、CRISPR系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系（ZFN）、又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ系（TALEN）を含む。一態様では、SRSF3作用剤は、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする、少なくとも1つのmRNAの翻訳を増加させる。さらなる態様では、SRSF3作用剤は、SRSF3（例えば、少なくとも1つのRRM部位）と、自然免疫応答に関係づけられるポリペプチドをコードする少なくとも1つのmRNA（例えば、少なくとも1つの3'UTR SRSF3結合部位）との間の結合を阻害する。

【0051】

「CRISPR系」の表現は、RNAガイド鎖と組み合わせたエンドヌクレアーゼを指す。エンドヌクレアーゼは、I型CRISPRエンドヌクレアーゼ、II型CRISPRエンドヌクレアーゼ、III型CRISPRエンドヌクレアーゼ、IV型CRISPRエンドヌクレアーゼ、V型CRISPRエンドヌクレアーゼ、VI型CRISPRエンドヌクレアーゼ、CRISPR関連タンパク質9（Cas9）、Cpf1、CasX又はCasYであり得るが、これらに制限されない。

30

【0052】

「ガイドRNA」（本明細書において「DNA標的RNA」とも呼ばれる）の表現は、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9又はこのヌクレアーゼ変異体）に結合し、標的DNAの特異的位置を標的としてヌクレアーゼを送ることが可能な、RNA分子又はRNA分子の群を指す。ガイドRNAは、「DNA標的セグメント」と「タンパク質結合セグメント」の2つのセグメントを含む。これらの2つのセグメントは同じRNA分子上にあっても、2つ又はそれを超える別個のRNA分子上にあってもよい。DNA標的セグメントは、標的DNAの鎖の特異配列に相補性のヌクレオチド配列（すなわち、標的DNAの相補鎖）を含む。タンパク質結合セグメントは、ヌクレアーゼ、例えば、Cas9又はCas9関連ポリペプチドと相互作用する。上記のように、Cas9の場合では、標的DNAの部位特異的切断は、(i) DNA標的セグメントと標的DNAとの間の塩基対相補性、及び(ii) 標的DNAにおける、PAM配列と呼ばれる短いモチーフの両方により決定された位置で発生する。ガイドRNAは、修飾した塩基又は骨格を含み得る。

40

【0053】

「結合を阻害する」の表現は、特定の核酸配列との物理的接触を特異的に開始するSRSF3の能力を予防又は破壊する作用剤の能力を指す。阻害は、SRSF3の2次又は3

50

次構造における構造変化の誘導、SRSF3の結合ドメイン及び/又は核酸配列の結合部位の妨害、SRSF3リン酸化の阻止、SRSF3の脱リン酸化、SRSF3のタンパク質分解、競合結合、SRSF3 mRNA前駆体の選択的スプライシング、SRSF3 mRNA翻訳の阻止、SRSF3遺伝子の変異、細胞のゲノムからのSRSF3遺伝子の欠失、或いは特定の核酸配列と特異的に会合するSRSF3の能力を阻害する他の任意の機構により発生し得る。

【0054】

「ポリペプチドのレベルの上昇」の表現は、試料において、対照と比較して検出可能に増加する、mRNAから翻訳されたポリペプチド（例えば、上方制御されるが翻訳されないポリペプチド）のレベルを指す。試料は、SRSF3作用剤により治療された対象由来であり得る。対照は、無治療対象において同一のmRNAから翻訳された基準レベルのポリペプチドであり得る。

10

【0055】

「SRSF3特異抗体」及び「リン酸化SRSF3特異抗体」の表現は、SRSF3又はリン酸化形態のSRSS3の1つ又は複数のエピトープにそれぞれ結合するが、抗原分子の混合集団を含む試料における他の分子を、実質的には認識及び結合しない抗体を指す。一実施形態では、SRSF3特異抗体は、SRSF3のRRMドメイン（配列番号13）の少なくとも一部分を含むSRSF3の領域を認識し、一方、リン酸化SRSF3特異抗体は、少なくともSRSF3リン酸化部位、及びSRSF3のRSドメイン（配列番号14）の少なくとも一部分を含む、SRSF3の領域を認識する。

20

【0056】

用語「siRNA」は、小型の阻害性RNA二本鎖を指し、これが細胞において存在すると、結果としてRNA干渉が生じ、siRNAが標的とする転写物の発現の減少が生じる。このような分子は、長さが変化し（一般的に18~30塩基対）、アンチセンス鎖のこれらの標的mRNAに対して様々な程度の相補性を含み得る。すべてではないが一部のsiRNAは、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の5'又は3'末端に不対の突出した塩基を有する。用語「siRNA」は、2つの別々の鎖の二本鎖、並びに二本鎖領域を含むヘアピン構造を形成可能な単鎖を含む。

【0057】

「アンチセンス」の表現により、特定の遺伝子を含むDNAと、又はこの遺伝子のmRNA転写物と生理学的条件下でハイブリダイズし、これにより、この遺伝子の転写及び/又はこのmRNAの翻訳を阻害する、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、修飾オリゴリボヌクレオチド、又は修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドである、オリゴヌクレオチドを説明する。この表現は、天然に存在する核酸塩基、糖、及びヌクレオシド（骨格）間の共有結合からなるオリゴヌクレオチド、並びに同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。このような修飾又は置換オリゴヌクレオチドは、例えば、の細胞取込みの増強、核酸標的に対する親和性の増強、ヌクレアーゼ存在下での安定性の上昇のような所望の特性のため、天然形態よりも好ましいことがある。

30

【0058】

アンチセンスは、本明細書によれば、哺乳動物SRSF3をコードする標的核酸の標的配列に対して相補性である。用語「標的配列」は、本明細書において使用する場合、本明細書によるアンチセンスに対して相補性の核酸配列を含む、標的核酸に存在するヌクレオチドの配列を指す。一部の実施形態では、標的配列は、本明細書によるアンチセンスの連続するヌクレオチド配列に対して相補性である、標的核酸の領域からなる。一部の実施形態では、標的配列は、単一オリゴヌクレオチドの相補配列よりも長く、例えば、本明細書によるいくつかのアンチセンスにより標的とされ得る、標的核酸の好ましい領域に存在し得る。

40

【0059】

第1の態様によれば、アンチセンスは、SRSF3をコードするmRNAの翻訳を阻害

50

する。別の態様によれば、アンチセンスは、SRSF3の5'UTR(「非翻訳転写領域」)、すなわち、開始コドン(ATG)の上流に位置するか、又は上記開始コドンに重複するmRNAの部分を標的とする。この領域に結合することにより、アンチセンスは、転写及び/又は翻訳に干渉し、これによりSRSF3遺伝子を少なくとも部分的に不活化し得る。さらなる態様では、アンチセンスは、ATGの上流に位置する100ヌクレオチドを含む領域を標的とする。さらなる態様では、アンチセンスは、ATGを基準にして+1番目と+25番目との間に位置する領域を標的とする。

【0060】

「低分子量化合物」の表現は、SRSF3の生物学的活性に影響するように作用可能な、ポリペプチド及び核酸以外の、任意の化学物質又は他の成分を含む。低分子は、現在既知であり使用されている任意の数の治療薬を含み得るか、又は生物学的機能(複数可)をスクリーニングする目的のために、このような分子のライブラリーにおいて合成した低分子であり得る。

10

【0061】

「骨髄細胞」の表現は、単球、マクロファージ及びミクログリア細胞を含むが、これらに制限されない、骨髄系細胞を指す。

【0062】

「単球」の表現は、最前線防御機構に關与する白血球の型を指し、樹状細胞又はマクロファージ前駆細胞に分化可能であるように認識される。単球は、通常、血液系を移動する。外部の刺激シグナルに回答して、単球は、多くの免疫制御サイトカインを分泌し、組織における感染部位を移動し、マクロファージに分化する。

20

【0063】

「ミクログリア細胞」又は「ミクログリア」の表現は、中枢神経系における免疫応答の媒介に關与する、ある種のグリア細胞を指す。ミクログリア細胞は、エキソソームを産生可能であり、アメーバ様ミクログリア細胞、分枝型ミクログリア細胞、及び反応性又は「活性化」ミクログリア細胞を含む、ミクログリア細胞の種々の形態をさらに含む。ミクログリア細胞は、反応性ミクログリアを含み、これは、反応性「活性化」マクロファージ状態に形質転換し、脳損傷及び炎症の部位に蓄積して、免疫機能に關与し、組織修復及び神経の再生を支援する、静止状態の分子型ミクログリアと定義される(Kreutzberg, 1996)。ミクログリア免疫活性は、望まない炎症応答を抑制する特化した免疫阻害経路、及び免疫活性化と關連することが多い組織破壊により抑制される。ミクログリア細胞は、脳の保護及び恒常性に必須の安定した表現型を獲得することが多い。

30

【0064】

用語「表現型」は、一般に、細胞又は生物の観察可能な任意の特性を指す。

【0065】

「自然免疫応答」の表現は、細胞又は個体が、病原体及び/又は損傷の存在に対して認識及び応答する、多様な自然耐性機構を指す。本明細書において使用する場合、「自然免疫応答」は、細胞が損傷及び/又は病原体と關連する分子パターン又はシグナルを認識する場合に発生する、細胞内及び細胞間の現象及び反応を含む。ミクログリア細胞は、活性化されると、自然免疫応答を阻害し得る。

40

【0066】

「骨髄系の制御」の表現は、SRSF3作用剤の作用による、骨髄細胞の表現型への修飾又は修飾の阻止を指す。例えば、神経学的状態、がん、細菌性又はウイルス性感染症の文脈では、SRSF3作用剤により、骨髄細胞の免疫応答に關係づけられる、上方制御されたmRNAから翻訳されたポリペプチドのレベルが上昇し、これにより、この表現型を第1の(例えば、異常な)表現型から第2の(例えば、免疫性の)表現型に修飾し得る。

【0067】

「ミクログリア細胞の制御」の表現は、SRSF3作用剤の作用による、ミクログリア細胞の表現型への修飾又は修飾の阻止を指す。例えば、神経学的状態、がん、細菌性又はウイルス性感染症の文脈では、SRSF3作用剤により、ミクログリア細胞の免疫応答に

50

関係づけられる、上方制御された mRNA から翻訳されたポリペプチドのレベルが上昇し、これにより、この表現型を第 1 の（例えば、異常な）表現型から第 2 の（例えば、免疫性の）表現型に修飾し得る。その上、ミクログリア細胞の制御により、例えば、神経学的状態の発症の初期で、異常表現型の発生が阻止され得る。一実施形態では、異常表現型を示すミクログリア細胞は、神経学的状態、がん、細菌性又はウイルス性感染症の文脈において、有効な自然免疫応答を生じることが不可能なミクログリア細胞を指す。一実施形態では、免疫表現型を示すミクログリア細胞は、自然免疫応答機能、例えば、これに制限されないが、食作用を生じることが可能なミクログリア細胞を指す。

【0068】

用語「試料」は、対象から得た多様な試料の種類を指し、診断アッセイにおいて使用することができる。この定義は、血液、尿、脳脊髄液及び生体起源の他の液体試料を包含する。

10

【0069】

定義はまた、固形組織試料、例えば、検体の生検、或いは組織培養物、又はこれに由来する細胞、例えば、皮質ニューロン、ミクログリア細胞、骨髄細胞、若しくは脊髄抽出物を包含する。

【0070】

「候補化合物」の表現は、生物学的標的分子と、特に、タンパク質と、この生物学的活性を修飾するように相互作用可能な、低分子、核酸、抗体又はポリペプチドのような化合物を含む。一実施形態では、候補化合物は、SRSF3 作用剤である。

20

【0071】

「生体系」の表現は、適する生物学的アッセイ又は生物学的モデルを指す。一態様では、生物学的アッセイは、SRSF3（又はRRM結合部位）とmRNA（又はこの3'UTR）との間の相互作用を測定するか、或いはSRSF3の活性若しくは発現を測定する、*in vitro*アッセイであり得る。生物学的モデルは、SRSF3（又はRRM結合部位）とmRNA（又はこの3'UTR）との間の相互作用の評価、或いはSRSF3の活性又は発現の評価を可能とする、適する任意のモデルであり得る。このモデルは、SRSF3を高発現するように修飾されている、生体であり得る。

【0072】

本明細書は、そのような電離形態及び溶媒和化合物が、当技術分野において周知であるために、医薬品を電離形態又は溶媒和化合物形態で投与するのに明示されているかどうかにかかわらず、化合物のすべての薬学的に許容される電離形態（例えば、塩）及び溶媒和化合物（例えば、水和物）を包含することを意図することに留意されたい。特定の立体化学が明示されていない限り、個々の異性体又は異性体の混合物として化合物が存在するかどうかとは無関係に、化合物の列挙が、すべての可能性のある立体異性体（例えば、キラル中心の数に応じて、鏡像異性体又はジアステレオマー）を包含することを意図することに留意されたい。

30

【0073】

「薬学的に許容される塩」の表現は、薬学的に許容される無機及び有機の酸及び塩基に由来するものを指す。適する酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエンpスルホン酸（*toluene p sulphonic (acid)*）、酒石酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン2スルホン酸、及びベンゼンスルホン酸が挙げられる。アミノ酸に由来する塩（例えば、L-アルギニン、L-リジン）もまた含まれる。適切な塩基に由来する塩は、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、リチウム、カリウム）及びアルカリ土類金属（例えば、カルシウム、マグネシウム）を含む。

40

【0074】

薬学的に許容される塩に関しては、Berge's, *Pharmaceutical Salts*, J. of Phar. Sci., vol. 66, no. 1, January

50

1977、1～19頁の表Iに列挙されている、FDA承認の商業的に販売されている塩のリストを参照されたい。

【0075】

化合物が、種々の多形形態で存在し得ることが、当業者により理解され得る。当技術分野において既知のように、多形性は、2つ以上の明確に異なる結晶又は「多形」種として結晶化する化合物の能力である。多形は、固体状態のその化合物分子の、少なくとも2つの異なる配置又は多形形態を有する、化合物の固形の結晶相である。所与の任意の化合物の多形形態は、同一の化学式又は組成により定義され、2つの異なる化合物の結晶構造と同様に化学構造が明確に異なる。

【0076】

治療における使用に必要とされる化合物の量が、選択された特定の化合物によってだけでなく、投与経路、治療を必要とする条件の性質、並びに患者の年齢及び状態によっても変化することがあり、最終的には、主治医の判断次第であり得ることが理解され得る。

【0077】

所望の用量は、単一用量で、又は適切な間隔で、例えば、1日に2回、3回、若しくは4回以上の用量で投与される分割用量として、好都合に提示され得る。治療における使用のために、化合物を化学原料として投与し得ることが可能であるが、活性成分を医薬組成物として提示することが好ましい。したがって、本明細書では、本明細書に記載する化合物の薬学的組合せ又は組成物を、或いはその薬学的に許容される塩を1つ又は複数のその薬学的に許容される担体とともに、並びに任意選択で、他の治療的及び/又は予防的成分をさらに提供する。担体（複数可）は、処方他の成分と適合し、このレシピエントに対して有害でないという意味で「許容され」なければならない。

【0078】

医薬組成物は、経口、直腸内、経鼻、鼻腔内、粘膜、局所（頬側及び舌下を含む）、経皮、腔内又は非経口（筋肉内、皮下及び静脈内を含む）投与に適するもの、或いは吸入又はガス注入による投与に適する形態のものを含む。組成物は、適切な場合、別々の投与単位で好都合に提示されることがあり、薬学的技術分野において周知の方法のいずれかにより調製され得る。すべての方法は、活性成分を、液体担体若しくは微細化した個体担体又は両方と会合させ、次いで、必要に応じて、生成物を所望の組成物に成形するステップを含む。

【0079】

経口投与に適する医薬組成物は、所定量の活性成分を、粉末又は顆粒として、溶液、懸濁液、又は乳濁液としてそれぞれ含む、別々の単位、例えば、カプセル剤、カシェ剤又は錠剤として、好都合に提示され得る。活性成分はまた、ポーラス、舐剤又はペーストとして提示され得る。経口投与のための錠剤及びカプセル剤は、従来賦形剤、例えば、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、又は湿潤剤を含み得る。錠剤は、当技術分野において周知の方法に従ってコーティングされ得る。経口液体製剤は、例えば、水性又は油性の懸濁液、溶液、乳濁液、シロップ又はエリキシル剤の形態であることがあり、水又は他の適する溶媒で使用前に戻すための、乾燥製品として提示され得る。このような液体製剤は、従来の添加剤、例えば、懸濁化剤、乳化剤、非水性溶媒（食用油を含み得る）、又は保存剤を含み得る。

【0080】

化合物はまた、非経口投与（例えば、注入、例えば、ポーラス注入又は持続注入による）のために処方されることがあり、単位用量形態で、アンプル、予め充填したシリンジ、小容量注入により、又は複数用量の容器により、保存剤を加えて提示され得る。組成物は、油性又は水性溶媒中の懸濁液、溶液、又は乳濁液のような形態をとることがあり、調合剤、例えば、懸濁化剤、安定化剤及び/又は分散剤を含み得る。或いは、活性成分は、滅菌固体による無菌的単離により、又は溶液からの凍結乾燥により入手する、適する溶媒、例えば、滅菌、パイロジェンフリーの水で使用前に戻すための、粉末の形態であり得る。

【0081】

10

20

30

40

50

表皮への局所投与では、化合物は、軟膏、クリーム又はローションとして、或いは経皮吸収パッチとして処方され得る。このような経皮吸収パッチは、浸透促進剤、例えば、リナロール、カルバクロール、チモール、シトラル、メントール及びシアネトールを含み得る。軟膏及びクリームは、例えば、水性又は油性の基剤を用いて、適する増粘剤及び/又はゲル化剤を加えることにより処方され得る。ローションは、水性又は油性の基剤を用いて処方されることがあり、一般に、1つ又は複数の乳化剤、安定化剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤、又は着色剤も含み得る。

【0082】

口腔への局所投与に適する組成物は、香味基剤、通常、スクロース及びアラビアゴム又はトラガントに活性成分を含む薬用キャンディー；不活性基剤、例えば、ゼラチン及びグリセリン又はスクロース及びアラビアゴムに活性成分を含むトローチ；並びに適する液体担体に活性成分を含む口腔洗浄液を含む。

10

【0083】

担体が個体の、直腸内投与に適する医薬組成物は、例えば、単位用量の坐剤として提示される。適する担体は、カカオバター及び当技術分野において一般に使用される他の物質を含み、坐剤は、活性化合物を軟化又は融解担体（複数可）と混合した後、冷却及び型で成形することにより好都合に形成され得る。

【0084】

腔内投与に適する組成物は、活性成分に加えて、当技術分野において既知の担体を適するように含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレーとして提示され得る。

20

【0085】

鼻腔内投与では、化合物又は組合せは、液体スプレー又は分散性粉末として、或いは液滴の形態で使用し得る。液滴は、もう1つの分散剤、可溶化剤又は懸濁化剤をまた含む、水性又は非水性の基剤を用いて処方され得る。液体スプレーは、加圧バックから好都合に送達される。

【0086】

吸入による投与では、化合物又は組合せは、注入器、噴霧器又は加圧バック、或いはエアロゾルスプレイを送達する他の便利な手段から好都合に送達される。加圧バックは、適する噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の適する気体を含み得る。加圧エアロゾルの場合では、投与単位は、弁を用意して、定量を送達することにより決定され得る。

30

【0087】

或いは、吸入又はガス注入による投与では、化合物又は組合せは、乾燥粉末組成物、例えば、化合物と適する粉末基剤、例えば、ラクトース又はデンプンとの粉末混合物の形態をとり得る。粉末組成物は、吸入器又は注入器を用いて粉末を投与し得る、単位投与形態で、例えば、カプセル又はカートリッジ、或いは、例えば、ゼラチン又はプリスターパックで提示され得る。

【0088】

本明細書において使用する場合、「許容される担体」の表現は、有害作用なく対象に投与可能な、本明細書に記載の組合せ及び化合物のための溶媒を意味する。当技術分野において既知の適する担体は、金粒子、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロース、又は緩衝液を含むが、これらに制限されない。担体は、これらに制限されないが、希釈剤、安定剤（すなわち、糖及びアミノ酸）、保存剤、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤、増粘添加剤、着色剤等を含む補助剤を含み得る。

40

【0089】

治療における使用に必要とされる化合物の量が、選択された特定の化合物によってだけでなく、投与経路、治療を必要とする条件の性質、並びに患者の年齢及び状態によっても変化することがあり、最終的には、主治医の判断次第であり得ることが理解され得る。しかし、一般には、適する用量は、1日に約0.001~約100mg/kg体重の範囲、

50

例えば、0.01~50 mg/kg/日の範囲、又は例えば、0.1~40 mg/kg/日の範囲であり得る。化合物は、例えば、1単位投与形態あたり1~2000 mg、10~1500 mg、好都合には20~1000 mg、最も好都合には50~700 mgの活性成分を含む、単位投与形態で好都合に投与される。

【0090】

本明細書の別の実施形態では、投与量は、実験モデルの結果に基づいて、任意選択で、本明細書のアッセイの結果と組み合わせて推定し得る。一般には、活性化合物の1日の経口用量は、1日に約0.01 mg/kg~1日に2000 mg/kgであり得る。10~500 mg/kgの範囲の経口用量は、1日に1回又は数回の投与で、適する結果をもたらし得る。特定の対象の応答が、このような容量で不十分である場合には、患者の耐性が許す程度まで、さらに高い用量（又はより限局した異なる送達経路による有効な高用量）を利用し得る。1日に複数用量もまた、組成物の適切な全身レベルを達成する一部の場

10

【0091】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、より容易に理解され得る。このような実施例は、本発明の広範な適用性を説明するものであり、この範囲を制限することを意図していない。この修飾及び変形は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、行うことができる。本明細書に記載のものに類似又は等価のいかなる方法及び材料をも、本発明の試験の実施において使用することができるが、好ましい方法及び材料を記載する。本明細書において引用する、発行された特許、公表された特許出願、及び参考文献は、それぞれを特異的及び個々に示して参照により組み込む場合と同様に、これによって、参照により組み込む。矛盾する場合は、本開示が有効である。

20

【実施例】

【0092】

実施例 1

CD11b r GFP 遺伝子導入マウスの作製及び特性評価

細胞型特異性 mRNA 及びタンパク質プロファイルを *in vivo* で、マイクログリア細胞から同定するために、ヒト CD11b プロモーターの転写制御下で、大サブユニットリポソームタンパク質 L10a (Flag-EGFP-RPL10a) の N 末端と融合した Flag-EGFP を発現する、遺伝子導入マウスモデル (図 1A 及び 1B) を作製した (配列番号 1)。これまでの研究では、ヒト CD11b プロモーターは、マイクログリア導入遺伝子発現を効率的に駆動することが示されてきた (Gowling ら、2006; Lalancette-Hebert ら、2007)。遺伝子導入マウスは、生存可能であり、明白な表現型を発現しない。本実施例では、適切なマイクログリア特異性導入遺伝子発現を示す CD11b r GFP と呼ばれるマウス系統を選択した。Flag/EGFP-RPL10a (F/EGFP-L10a) 導入遺伝子の発現が、マイクログリア細胞に実際に制限されたことを確認するために、一般的に使用される 2 つのマイクログリアマーカーである、EGFP 及び CD11b/lba1 について、2重免疫蛍光分析を実施した。図 1C~1E に示すように、2重免疫蛍光分析により、脳組織において、CD11b により駆動された導入遺伝子 (GFP 染色) が、LPS による刺激後にベースライン条件下で、内在性 CD11b 及び lba1 免疫染色と共局在化することが明らかとなった。これまでに報告されているように (Gravel ら、2016; Lalancette-Hebert ら、2009)、LPS の全身注入により、マイクログリアの形態において顕著な変化が誘導され、GFP 蛍光の発現が増加する (図 1E)。さらなる概念実証対照として、Flag エピトープを使用した、CD11b r GFP 初代マイクログリア培養物由来のマイクログリアリポソームを、選択的に免疫沈降 (IP) した。図 1F に示すように、F/EGFP-L10a 導入遺伝子の Flag ピーズによる免疫結合が、ウエスタンブロット解析によって確認され、これにより、遺伝子導入モデル系がさらに検証された。

30

40

【0093】

実施例 2

50

活性化ミクログリアの翻訳プロファイルにより高度に制御された自然免疫遺伝子のクラスターが明らかとなる

今日までに、免疫遺伝子の厳しい転写及び転写後の制御に関与する多様な制御機構が、提唱されている（総説については（Anderson、2010；Carpenter及びFitzgerald、2015；Carpenterら、2014））。しかし、*in vivo*機構は、まだ理解されていない。*in vivo*でのミクログリア活性化の分子特性を評価するために、急性的自然免疫曝露の後にベースライン条件下で、トランスクリプトーム及びプロテオームの平行分析を実施することにより、CD11b r GFPマウスモデル及び修飾した翻訳親和性精製（TRAP）方法を利用した。実験的パラダイムとして、標準的LPS曝露（Laflammeら、2001；Lalancette-Hebertら、2009）を使用した。重要なことには、全身性LPSは、末梢細胞の浸潤を生じず、したがって、自然免疫応答は、CD11b陽性常在ミクログリアにより媒介される（Chenら、2012）。LPSの全身（*i.p.*）注入により、常在ミクログリア活性化の波が誘導されて、注入後24時間でピークに達することがこれまでに実証されており（Lalancette-Hebertら、2009）、したがってLPS後24時間で、抗Flagアガロース親和性樹脂を使用して、脳組織ホモジネートを免疫沈降し、*i*) mRNA抽出後のAffymetrix Mouse Genome 430解析、又は*ii*) ペプチド抽出後の高解像度無標識プロテオミクス解析のいずれかに、ポリリボソーム複合体を使用した。実験戦略を、図2Aに模式的に提示する。統計解析により、LPSが661種の転写物の発現を対照と比較して有意に変化させたことが明らかとなった。このような中でも、394種の遺伝子は上方制御されたが、267種の遺伝子は下方制御された（1.2倍以上の差）。データ可視化のために、階層的クラスターを、統計学的に有意な（ $p < 0.05$ ）遺伝子により構成した（図2B）。クラスタリングに基づいて、LPS条件が、対照から顕著に解離した、最も上方制御された転写物を含む、2つのクラスター（図2B：ズーム1及びズーム2）を観察した。その上、このような転写物の大多数を、免疫応答に関与するものとして分類した。これまでの研究（Madedduら、2015）と一致して、最も高度に上方制御された転写物は、血清アミロイドA3遺伝子（Saa3）（29.52倍の変化）及びリポカリン2（Lcn2）（23.71倍の変化）であった。両遺伝子は、感染症に対する急性期免疫応答と関連する（Floら、2004；O'Brien及びChait、2006）。3番目の最も上方制御された転写物は、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド5であった（Ccl5/Rantes、15.93倍の上昇）。RANTESは、多数の慢性炎症性及び自己免疫性プロセスに関係づけられるケモカインのC-Cサブファミリーのメンバーである（Danoffら、1994）。表4では、上位50種の上方制御された転写物を集約する。

【0094】

10

20

30

【表4】

表4: 上方制御された転写物の上位50種

転写物クラ スターID	遺伝子 記号	説明	LPS Biweig ht 平均 シグナ ル (log2)	CTL Biweig ht 平均 シグナ ル (log2)	変化倍 率(リニ ア)(LP S 対 CTL)	ANOVA p 値 (LPS 対 CTL)	FDR p 値 (LPS 対 CTL)
17491193	Saa3	血清アミロイド A3	9,26	4,38	29,52	0,009823	0,999886
17383892	Lcn2	リポカリン 2	9,98	5,41	23,71	0,020288	0,999886
17266946	Ccl5	ケモカイン(C-C モチー フ)リガンド 5	9,7	5,71	15,93	0,012908	0,999886
17497813	Irf7	インターフェロン制御 因子 7	9,02	6,06	7,8	0,002712	0,999886
17497718	Ifitm3	インターフェロン誘 導膜貫通タンパク質 3	10,25	7,36	7,39	0,015107	0,999886
17411147	Ifi44	インターフェロン誘導 タンパク質 44	7,69	4,85	7,15	0,000323	0,999886
17262202	Irgm1	免 疫 関 連 GTPase ファミ リー M	7,2	4,57	6,17	0,033453	0,999886
17278328	Serpin a3n	セリン(又はシス 테인)ペプチダ ーゼ阻害物質、ク レード A、メンバ ー 3N	10,49	7,96	5,77	0,004401	0,999886
17266967	Ccl3	ケモカイン(C-C モチー フ)リガンド 3	6,97	4,59	5,19	0,043495	0,999886
17335467	Cdkn1 a	サイクリン依存 性キナーゼ阻害 因子 1A(P21)	10,22	7,9	5,01	0,031101	0,999886
17403268	Gbp2	グアニル酸結合タンパ ク質 2	7,51	5,19	5,01	0,006397	0,999886
17499394	Gm767 6	予測遺伝子 7676	8,34	6,03	4,95	0,033008	0,999886
17346125	Plin4	ペリリピン 4	7,53	5,27	4,8	0,003028	0,999886
17396260	Cp	セルロプラスミン	7,51	5,39	4,35	0,029458	0,999886

10

20

30

40

17362973	Ms4a6d	膜貫通 4 ドメイン、サブファミリーA、メンバー6D	6,29	4,23	4,19	0,002525	0,999886
17254059	Ccl12	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド 12;c-Cモチーフケモカイン 12様	6,13	4,23	3,75	0,005152	0,999886
17322355	Gpr84	Gタンパク質共役受容体 84	6,89	5	3,69	0,012957	0,999886
17441037	Oasl2	2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素様 2	7,67	5,79	3,69	0,001239	0,999886
17358832	Ifit1	テトラトリコペプチド反復配列 1 を有するインターフェロン誘導タンパク質	7,42	5,65	3,42	0,002767	0,999886
17462492	A2m	アルファ 2 マクログロブリン	7,07	5,33	3,34	0,011525	0,999886
17230045	Ifi204	インターフェロン活性化遺伝子 204	3,99	2,3	3,21	0,012104	0,999886
17462437	Usp18	ユビキチン特異性ペプチダーゼ 18	6,76	5,08	3,21	0,006077	0,999886
17450501	Gbp10	グアニル酸結合タンパク質 10	8,07	6,43	3,11	0,014126	0,999886
17403224	Gbp7	グアニル酸結合タンパク質 7	7,16	5,55	3,04	0,000506	0,999886
17329759	Apod	アポリポタンパク質 D	10,87	9,36	2,83	0,010331	0,999886
17324446	Rtp4	受容体輸送タンパク質 4	8,07	6,57	2,81	0,000303	0,999886
17510345	Bst2	骨髄間質細胞抗原	6,87	5,4	2,77	0,001195	0,999886
17403205	Gbp5	グアニル酸結合タンパク質 5	5,12	3,66	2,75	0,043254	0,999886
17219662	Pyhin1	パイリン及び HIN ドメインファミリー、メンバー1	4,34	2,92	2,68	0,007792	0,999886
17249980	Igtp	インターフェロンガンマ誘導 GTPase	6,98	5,58	2,64	0,01158	0,999886

10

20

30

40

17272785	Lgals3bp	レクチン、ガラクトシド結合、可溶性、3 結合タンパク質	8,41	7,01	2,64	0,012358	0,999886
17434023	Isg15	ISG15 ユビキチン様修飾因子	6,17	4,78	2,63	0,001235	0,999886
17254166	Slfn2	シュラーフェン (schlafen)2	6,92	5,54	2,6	0,010334	0,999886
17249977	Gm12250	予測遺伝子 12250	5,79	4,43	2,57	0,008446	0,999886
17549822	Apod	アポリポタンパク質 D	8,5	7,23	2,42	0,00267	0,999886
17354589	Gm4841	予測遺伝子 4841	5,18	3,92	2,4	0,001244	0,999886
17343918	C4b	補体成分 4B(Chido 血液型);補体 C4-B 様	6,75	5,53	2,33	0,000324	0,999886
17549820	Apod	アポリポタンパク質 D	8,68	7,47	2,32	0,002208	0,999886
17313050	Apobec3	アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド 3	6,79	5,59	2,3	0,028469	0,999886
17270354	Gfap	グリア線維酸性タンパク質	9,78	8,59	2,28	0,026052	0,999886
17477331	Klk1b27	カリクレイン 1 関連ペプチダーゼ b27	3,78	2,6	2,27	0,004312	0,999886
17398912	Gm19439	予測遺伝子 19439	7,24	6,07	2,24	0,010813	0,999886
17407363	S100a9	S100 カルシウム結合タンパク質 A9(カルグラニユリン B)	5,19	4,03	2,22	0,013183	0,999886
17252341	Xaf1	XIAP 関連因子 1	6,64	5,51	2,19	0,003502	0,999886
17342868	LOC100862287	未 同 定 LOC100862287;FK506 結合タンパク質 5	7,85	6,72	2,18	0,033627	0,999886
17510200	Arrdc2	アレスチンドメイン含有 2	8,2	7,08	2,18	0,035516	0,999886
17259078	Rnf213	ring フィンガータンパク質 213	6,93	5,81	2,17	0,000476	0,999886
17300591	Irf9	インターフェロン制御因子 9	7,54	6,45	2,13	0,000105	0,999886

10

20

30

40

17232055	Sgk1	血清/グルココルチコイド制御キナーゼ 1	9	7,95	2,06	0,009125	0,999886
17241032	Ddit4	DNA 損傷誘導転写物 4	9,09	8,05	2,06	0,025703	0,999886
17387940	Olf1238	嗅覚受容体 1238	3,25	2,22	2,04	0,011708	0,999886

【 0 0 9 5 】

実施例 3

50

高度に上方制御されたLPS転写物は翻訳されていない

マイクログリアトランスクリプトームを実際の細胞型特異性プロテオームと比較するために、TRAPプロトコールを適応させ、LPS曝露後24時間にリボソーム会合ペプチドを採取し(Cao及びGeballe、1996)、無標識定量的質量分析を実施した。高度に制御されたmRNA/転写物とは対照的に、LPS注入により、100種のタンパク質の発現レベルが変化した。さらに、検出されたタンパク質の68%が、少なくとも1.2倍下方制御されたが、32%が、少なくとも1.2倍有意に上方制御された。クラスター1及び2に存在する高度に上方制御された免疫転写物(図2B及び2C)は、配列決定されたペプチド中に、いずれも検出されなかった。これは、ウエスタンブロット解析により、さらに確認された。はじめに、3つの最も上方制御されたmRNA(Saa3、Lcn2及びCcl5)のタンパク質発現レベルを、細胞型特異的方法で検証し、リボソーム結合マイクログリアペプチドについてのウエスタンブロット解析を、選択されたタンパク質のN末端を認識する抗体を使用して実施した。図2Dに示すように、mRNAレベルで高度に上方制御された上位3つの遺伝子は、タンパク質レベルで、いずれも検出されなかった。対照的に、選択された、上方制御リボソーム結合mRNA、例えば、CAP2及びアクチンは、翻訳され、定量的質量分析及びウエスタンブロット解析により検出された。これは、TRAP溶出ホモジネートについて実施したウエスタンブロット解析により、検証された(図2D)。図2D及び2Eにおいてさらに実証されたように、全脳組織ホモジネートのウエスタンブロット解析により、SAA3及びCCL5タンパク質レベルが、LPS曝露後に、有意には上昇しないことが明らかとなった。上方制御された対照である、CAP2及びアクチンは、翻訳され、予想されたレベルで検出された。例外は、LCN2の発現パターンであった。これは、これまでのエビデンスと一致して、脳のLCN2タンパク質の主な源は、星状膠細胞及び内皮細胞であるが、Lcn2が、mRNAレベルでマイクログリア細胞に存在し得ることを実証する(Florら、2004; Jinら、2014; Leeら、2015)。非制御の転写物が、正常に翻訳され、質量分析により予想されたレベルで検出されたことは、注目に値する(表5及び6)。まとめると、本結果は、観察された翻訳抑制が、マイクログリアNF- κ Bネットワークと直接関連する、高度に上方制御された免疫転写物のクラスターに制限されたことを示唆する(図7)。

【0096】

10

20

【表 5】

表5:上方制御されたペプチドのリスト

タンパク質 ID	記号	Fasta ヘッダー	(LFQ)変化倍率(LPS 対 CTL)	(LFQ)Student 検定(LPS 対 CTL)
P70266	<i>Pfkfb3</i>	6-ホストフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2、6-ビスホスファターゼ 3 スプライス変異体 3	17,04	0,004
Q8BFZ3	<i>Actbl2</i>	ベータ-アクチン様タンパク質 2	3,59	0,000
Q7TPR4	<i>Actn1</i>	アルファ-アクチン 1	2,19	0,000
Q9WUM4	<i>Coro1c</i>	コロニン 1C	2,00	0,000
Q8BP95	<i>Ate1</i>	アルギニル tRNA タンパク質トランスフェラーゼ 1	1,97	0,000
O88587	<i>Comt</i>	カテコール O-メチルトランスフェラーゼ	1,90	0,003
Q8CDN6	<i>Txn1l1</i>	チオレドキシシン様タンパク質 1	1,86	0,002
Q8VDM6	<i>Hnrnpul1</i>	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 U 様タンパク質 1	1,79	0,000
Q9CSH0	<i>Hnrnpil1</i>	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 L 様	1,69	0,033
Q61304	<i>Ank1</i>	赤血球アンキリン(断片)	1,53	0,004
Q99K48	<i>Nono</i>	非 POU ドメイン含有オクタマー結合タンパク質	1,51	0,001
Q3U232	<i>Coro1a</i>	コロニン 1A	1,50	0,010
Q8VIJ6	<i>Sfpq</i>	スプライシング因子、プロリン及びグルタミンリッチ	1,45	0,000
Q3TYS9	<i>Oplah</i>	5-オキソプロリナーゼ	1,44	0,016
Q9CY58	<i>Serbp1</i>	プラスミノージェン活性化阻害因子 1RNA 結合タンパク質	1,41	0,003
Q3ULD5	<i>Mccc2</i>	メチルクロトノイル-コエンザイム A カルボキシラーゼ 2(ベータ)	1,41	0,019
Q99MR8	<i>Mccc1</i>	メチルクロトノイル-CoA カルボキシラーゼサブユニットアルファ、ミトコンドリア	1,40	0,000

10

20

30

40

Q8VI63	<i>Mob2</i>	MOB キナーゼ活性化因子 2	1,38	0,004
P36993	<i>Ppm1b</i>	プロテインホスファターゼ 1B のアイソフォームベータ 4	1,37	0,003
P21107	<i>Tpm3</i>	トロポミオシンアルファ 3 鎖	1,37	0,007
Q9JKB3	<i>Ybx3</i>	Y ボックス結合タンパク質 3 のアイソフォーム 2	1,33	0,019
Q7TSE6	<i>Stk38</i>	セリン/スレオニンプロテインキナーゼ 38 様	1,31	0,002
P61979	<i>Hnrnpk</i>	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 K	1,30	0,000
O88342	<i>Wdr1</i>	WD 反復ドメイン 1	1,28	0,003
Q922P9	<i>Glyr1</i>	推定オキシドレダクターゼ GLYR1	1,27	0,006
P49813	<i>Tmod3</i>	トロポモジュリン 3	1,26	0,007
P70349	<i>Hint1</i>	ヒステジン 3 連構造ヌクレオチド結合タンパク質 1	1,25	0,006
Q9Z2C4	<i>Mtmr1</i>	ミオチューブラリン関連タンパク質 1	1,24	0,008
Q8BHL5	<i>Elmo2</i>	貪食及び細胞運動性タンパク質 2	1,24	0,002
Q6ZPE2	<i>Sbf1</i>	ミオチューブラリン関連タンパク質 5	1,23	0,001
Q8VHK9	<i>Dhx36</i>	ATP 依存性 RNA ヘリカーゼ DHX36	1,22	0,002
Q8R326	<i>Pspc1</i>	パラスペックル成分 1	1,20	0,004

10

20

【 0 0 9 7 】

【表 6】

表6: 炎症及び免疫応答ネットワーク:非制御mRNA及びペプチドのリスト

記号	Fasta ヘッダー	mRNA	ANOVA	(LFQ)	(LFQ)
		変化倍率 (リニア)(LPS 対 CTL)	p 値 (LPS 対 CTL)	ペプチ ド 変化倍 率(LPS 対 CTL)	Student 検定 (LPS 対 CTL)
<i>Acrt2</i>	ARP2 アクチン関連タンパク質 2	-1,02	0,712157	-1,04	0,215
<i>Actb</i>	アクチン、ベータ	-1,05	0,883213	-1,12	0,000
<i>Actg1</i>	アクチン、ガンマ、細胞質 1;アクチン、ガンマ、疑似遺伝子 1	-1,04	0,615592	-1,23	0,005
<i>Arpc1a</i>	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 1A	-1,03	0,946712	1,31	0,060
<i>Arpc2</i>	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 2	1,06	0,925415	1,01	0,963
<i>Arpc4</i>	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体、サブユニット 4	1,03	0,902912	-1,07	0,022
<i>C1qb</i>	補体成分 1、q 小成分、ベータポリペプチド	1,63	0,009647	1,13	0,052
<i>C1qc</i>	補体成分 1、q 小成分、C 鎖	1,02	0,418866	1,10	0,070
<i>C8a</i>	補体成分 8、アルファポリペプチド	-1,05	0,402028	1,04	0,503
<i>C8b</i>	補体成分 8、ベータポリペプチド	1,36	0,250288	1,06	0,452
<i>Calm3</i>	カルモジュリン 3;カルモジュリン 2;カルモジュリン 1	-1,12	0,790495	1,01	0,738
<i>Capza2</i>	キャッピングタンパク質(アクチンフィラメント)筋 Z 線アルファ 2	1,01	0,891642	-1,08	0,147
<i>Cdc42</i>	細胞分裂周期 42	-1,19	0,480546	-1,13	0,191
<i>Cdk5</i>	サイクリン依存性キナーゼ 5	1,01	0,992308	-1,05	0,207
<i>Cfl1</i>	上皮増殖因子含有フィブリン様細胞外基質タンパク質 2;コフィリン 1、非筋	1,04	0,721854	-1,03	0,093
<i>Ctsb</i>	カテプシン B	1,09	0,439574	1,18	0,152
<i>Dhx9</i>	DEAH(Asp-Glu-Ala-His)ボックスポリペプチド 9	-1,39	0,764582	-1,12	0,304
<i>Dnm1</i>	ダイナミン 1	-1	0,525399	-1,19	0,003
<i>Dnm3</i>	ダイナミン 3	1,09	0,91568	-1,10	0,211
<i>Dusp3</i>	2 重特異性ホスファターゼ 3(ワクシニアウイルスホスファターゼ VH1 関連)	-1,2	0,269172	-1,11	0,443

10

20

30

40

<i>Eif4e</i>	真核生物翻訳開始因子 4E; マイクロ RNA1956	1,11	0,154961	-1,12	0,012
<i>Elmo2</i>	貪食及び細胞運動性 2	1,14	0,360978	1,24	0,002
<i>Fbxw11</i>	F ボックス及び WD-40 ドメインタンパク質 11	1,16	0,659338	-1,43	0,001
<i>Gnb2l1</i>	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質)、ベータポリペプチド 2 様 1	1,07	0,991956	1,13	0,002
<i>Hsp90aa1</i>	熱ショックタンパク質 90、アルファ(サイトゾル)、クラス A メンバー 1	-1,18	0,5152	-1,10	0,004
<i>Hsp90ab1</i>	熱ショックタンパク質 90 アルファ(サイトゾル)、クラス B メンバー 1	1,02	0,899416	-1,21	0,000
<i>Hsp90b1</i>	熱ショックタンパク質 90、ベータ (Grp94)、メンバー 1; 予測遺伝子 15344	-1,23	0,33078	-1,16	0,048
<i>Mapk1</i>	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 1	1,03	0,467805	1,02	0,538
<i>Mapt</i>	微小管関連タンパク質タウ	-1,24	0,673261	-1,18	0,004
<i>Pde1b</i>	ホスホジエステラーゼ 1B、Ca ²⁺ カルモジュリン依存性	-1,12	0,022429	-1,34	0,028
<i>Ppm1b</i>	プロテインホスファターゼ 1B、マグネシウム依存性、ベータアイソフォーム	1,34	0,938437	1,37	0,003
<i>Ppp2r2a</i>	プロテインホスファターゼ 2(かつては 2A)、制御性サブユニット B(PR52)、アルファアイソフォーム	-1,08	0,476214	-1,05	0,006
<i>Ppp3ca</i>	プロテインホスファターゼ 3、触媒性サブユニット、アルファアイソフォーム	-1,1	0,584615	1,11	0,005
<i>Ppp3r1</i>	プロテインホスファターゼ 3、制御性サブユニット B、アルファアイソフォーム (カルシニューリン B、I 型); WD 反復ドメイン 92	-1,06	0,57225	1,10	0,114
<i>Prkaca</i>	プロテインキナーゼ、cAMP 依存性、触媒性、アルファ	-1,17	0,578658	1,04	0,522
<i>Prkar2a</i>	プロテインキナーゼ、cAMP 依存制御性、II 型アルファ	1,08	0,779202	1,02	0,772
<i>Prkcg</i>	プロテインキナーゼ C、ガンマ	-1,04	0,966931	1,13	0,012
<i>Rac1</i>	RAS 関連 C3 ボツリヌス基質 1	1,03	0,204101	1,05	0,052
<i>Skp1a</i>	S 期キナーゼ関連タンパク質 1A	1,02	0,809196	1,04	0,430
<i>Txn1</i>	チオレドキシシン 1	1,17	0,853458	1,12	0,009

10

20

30

40

<i>Ube2n</i>	ユビキチン共役酵素 E2N;ユビキチン共役酵素 E2 N 様	-1,05	0,495606	1,06	0,224
<i>Ube2v1</i>	ユビキチン共役酵素 E2 変異体 1;予測疑似遺伝子 8325;予測遺伝子 20431	-1,1	0,84211	1,13	0,021
<i>Ywhab</i>	チロシン 3 モノオキシゲナーゼ/トリプトファン 5-モノオキシゲナーゼ活性化	-1,1	0,854279	-1,05	0,075
<i>Ywhae</i>	チロシン 3 モノオキシゲナーゼ/トリプトファン 5-モノオキシゲナーゼ活性化	-1,1	0,555007	1,05	0,015
<i>Ywhaz</i>	チロシン 3 モノオキシゲナーゼ/トリプトファン 5-モノオキシゲナーゼ活性化	1,03	0,620127	1,01	0,533

10

【 0 0 9 8 】

実施例 4

LPS 活性化ミクログリア細胞は mRNA 及びタンパク質の明確に異なる分子特性を示す次いで、高度に制御された免疫遺伝子の観察された翻訳抑制が、活性化ミクログリアの生物学的機能にどのように影響するかを理解するために調査を実施した。LPS 曝露に対するミクログリア応答の一般の見解を得るために、Cytoscape (Shannon ら、2003) 及び ClueGo クラスタ解析 (Bindea ら、2003; Bindea ら、2009) を使用して、すべての制御された mRNA / タンパク質機能 (図 3 A 及び 3 B) をマッピングした。図 3 A 及び 3 B に示すように、機能アノテーションクラスタリングにより、自然免疫曝露に対するミクログリア mRNA 及びタンパク質応答の際立った差が明らかとなった。LPS 制御転写物のネットワークでは、上方制御されたターム / 機能が高度にエンリッチされ (赤色のノード)、一方、LPS 制御ペプチドのネットワークでは、下方制御されたターム / 機能が高度にエンリッチされる (緑色のノード)。顕著な相違はまた、上位の生物学的機能に反映された。図 3 C に示すように、上方制御された転写物と関連する上位 10 種の生物学的機能を同定した。このような機能の大多数は、炎症及び免疫応答に関連し、このため、NF- κ B シグナル伝達の活性化を生じる、LPS 曝露により引き起こされる、炎症カスケードを徹底的に集約する (Medzhitov 及び Horng、2009)。高度に特殊化された免疫 mRNA 応答とは対照的に、上方制御されたタンパク質の上位 10 種の生物学的機能は、細胞骨格、RNA 代謝及びハウスキーピング機能に制限された (図 3 D)。したがって、この結果により、リボソームに結合し、高度に制御された自然免疫遺伝子の選択的翻訳抑制が、活性化ミクログリアにおいて、明確に異なる / 分岐した mRNA 及びタンパク質分子の特性の形成に寄与していることが明らかとなった。

20

30

【 0 0 9 9 】

実施例 5

自然免疫応答における遺伝子発現の翻訳抑制

真核生物では、翻訳開始は、制御の標的とされることが多い、翻訳の律速ステップであると考えられるが (Gao 及び Roux、2015; Sonenberg 及び Hinnebusch、2009)、結果により、mRNA の制御が、翻訳開始後にリボソームにおいても発生することが明らかとなった。これは、リボソームに基づく機構により高度に制御された自然免疫遺伝子の制御 / チェックポイントのさらなる層を示唆する。ほとんどの転写後制御機構では、標的転写物の発現を抑制及び / 又は活性化するのに mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) を標的とすることを考慮すると (Anderson、2010)、高度に上方制御された遺伝子、例えば、Saa3 の 3' UTR は、観察された翻訳抑制の原因となる制御配列を含み得ると仮定する。この仮説に取り組むために、Saa3 転写物の野生型 3' UTR を、SV40 プロモーター / 制御エレメントの制御下のルシフェラーゼからなる pGL3 レポータープラスミドによりクローニングした (図 4 A)。HEK293 細胞株を、pGL3 ベクター (pGL3)、pGL3 - プロモーター - Saa3 - 3' UTR - wt ベクター (pGL3 - Saa3 - 3' UTR - wt) (配列番号 2)

40

50

又は pGL3 - プロモーター - SCRAMBLE ベクター (pGL3 - SCRAMBLE) (配列番号 3) を用いて、それぞれトランスフェクトした。重要なことには、pGL3 - Saa3 - 3' UTR - wt ベクターでトランスフェクトすると、レポーターベクター活性が顕著に低下し (ほぼ 80%)、一方、pGL3 - SCRAMBLE ベクターでトランスフェクトすると、ルシフェラーゼ活性が、対照レベル (pGL3 ベクター) 近くまで回復し (図 4 B)、これにより、Saa3 - 3' UTR における制御エレメントの存在を明らかに実証した。pGL3 - Saa3 - 3' UTR - wt によるトランスフェクション後のルシフェラーゼ活性の消失が、(mRNA 安定性及び / 又は分解の変化によってではなく) 翻訳抑制によって引き起こされることを確認するために、F / EGFP - L10a プラスミドを安定に発現する BV2 細胞を使用した。pGL3 及び pGL3 - Saa3 - 3' UTR - wt ベクターによるトランスフェクション後 48 時間に、TRAP プロトコールを使用して mRNA を精製し、次いで、ルシフェラーゼをコードするリボソーム会合 mRNA を、リアルタイム q - PCR により両条件下で定量した。図 4 C に示すように、解析により、Saa3 - 3' UTR を pGL3 ベクターに追加すると、リボソーム会合ルシフェラーゼ mRNA の有意な変化を引き起こさないことが明らかとなり ($1.84 \times 10^3 \pm 2.7 \times 10^3$ 、pGL3 対 $2.40 \times 10^3 \pm 3.5 \times 10^3$ pGL3 - Saa3 - 3' UTR - wt、n = 6)、これにより、Saa3 3' UTR 媒介機構が、リボソーム結合 mRNA の翻訳を直接阻害することにより作用することが示唆された。

【 0 1 0 0 】

タンパク質発現の制御における Saa3 - 3' UTR の重要な役割が実証されたので、観察された翻訳抑制に関与する特異性 3' UTR 領域を同定することが、求められた。RNA 結合タンパク質 (RBP) 及びマイクロ RNA (miRNA) は、mRNA 発現の制御において重要な役割を担うことが知られている (Glisovic ら、2008 ; Nilsson 及び Assmann、2007)。RBP マップウェブサイトを使用することにより (Paz ら、2014)、Saa3 - 3' UTR における RBP の相対的位置 (図 4 D) をマッピングした。生物情報学ツール (RBP マップ) により、異なる分布を有する Saa3 の 3' UTR に結合する、いくつかの RBP が予想された。このようなすべてのポイントが、Saa3 3' UTR の、3 つのセグメント、A、B 及び C への分割を誘導した (図 4 D)。各セグメントの機能的関連性を調査するために、Saa3 - 3' UTR の種々のセグメントを含むレポータープラスミドを作製した (図 4 E) (配列番号 4 ~ 7)。HEK293 細胞を、示すプラスミドを用いてトランスフェクトし、48 時間後、ルシフェラーゼ活性アッセイに供した。図 4 F に示すように、ドメイン A、C、B 又はドメイン B + C の欠失を含む Saa3 - 3' UTR 構築物により、翻訳阻害が部分的に軽減され、ルシフェラーゼ活性が徐々に上昇した。完全な 3' UTR 配列では、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下したが、試験した欠失変異体では、このルシフェラーゼ活性が徐々に回復し、3 つのドメインのそれぞれが、Saa3 転写物の翻訳の阻害に同程度寄与している、制御エレメントを含むことを示唆した (Ciafre 及び Galardi、2013 ; Jiang 及び Collier、2012)。

【 0 1 0 1 】

実施例 6

セリン / アルギニンリッチスプライシング因子 3 は自然免疫遺伝子翻訳の主要制御因子として作用する

SAA3 タンパク質発現の転写後制御における Saa3 の完全 3' UTR (A、B 及び C ドメイン) の重要性を考慮して、観察された翻訳抑制が、3' UTR の 3 つすべてのドメインに結合する RBP により編成されると仮定した。興味深いことには、この基準を満たした RBP のうちの 1 つは、セリン / アルギニンリッチスプライシング因子 3 (SRSF3 / SRP20) (図 4 D) (配列番号 12) である。実際、SRSF3 が、Saa3 の完全 3' UTR に結合し、20 種を超える推定結合部位を 128 bp の 3' UTR に沿って有ることが見出された。重要なことには、SRSF3 mRNA 及びタンパク質は、トランスクリプトーム / プロテオーム解析において、LPS 曝露後の非制御リボソーム

結合 mRNA / ペプチドであると同定した (mRNA 変化倍率 LPS 対 CTL : 1 . 1 1 ; ANOVA p 値 = 0 . 9 5 3 ; LFQ 変化倍率 LPS 対 CTL : 1 . 0 1、LFQ t - student 検定 = 0 . 8 9 4)。SRSF3 は、セリン - アルギニンリッチ (SR) タンパク質ファミリーに属し、これは 1 2 種の哺乳動物 RNA 結合タンパク質を含み、RNA 代謝における機能的関連性を有する。SR タンパク質は、1 つ又は 2 つの RNA 認識モチーフ (RRM) ドメイン (配列番号 1 3) を N 末端に、及びセリン - アルギニンジペプチド反復 (RS) ドメイン (配列番号 1 4) を C 末端に有する (Manley 及び Krainer、2010)。他の SR タンパク質と同様に、SRSF3 は、選択的スプライシング現象に関与するが、細菌の報告では、転写後制御に関与する機構、例えば、mRNA 輸送、サーベイランス、安定性及び翻訳における、SRSF3 の役割を強調する (Kimら、2014)。エビデンスによって、SR タンパク質の活性が、リン酸化 / 脱リン酸化の周期により制御されることが示唆され (Misteli 及び Specter、1997)、したがって、LPS 曝露によって、SRSF3 のリン酸化レベルが変化するかどうか第 1 に解析された。実際、LPS は、BV2 細胞におけるリン酸化 SRSF3 のレベルは、2 . 5 倍上昇するが (図 5 A 及び 5 B)、総 SRSF3 のレベルは、プロテオミクスにより報告され、ウエスタンブロット解析により確認されるように、有意には変化しない (図 5 C 及び 5 D)。SRSF3 が、SAA3 翻訳抑制に関与する RBP であるかどうかを直接評価するために、内在性 SRSF3 (SRSF3 - siRNA) に対する低分子干渉 RNA (siRNA) (配列番号 8 ~ 11) を使用して、SRSF3 ノックダウンを実施した。上記のように (図 4)、内在性 SRSF3 に対する低分子干渉 RNA (siRNA) (SRSF3 - siRNA) 又は対照 (CTL - siRNA) の存在下で、pGL3 ベクター又は pGL3 - Saa3 - 3' UTR - wt を用いて、BV2 細胞をトランスフェクトした。図 5 E 及び 5 F に示すように、300 nM の siRNA により、SRSF3 が効率的にノックダウンされ、内在性 SRSF3 タンパク質の発現レベルにおける 40% の有意な低下が生じた (図 5 F)。次いで、SRSF3 が、SAA3 の翻訳抑制の直接的原因となるかどうかを調査した。図 5 G に示すように、pGL3 - Saa3 - 3' UTR を、SRSF3 に対する siRNA と共トランスフェクトすると、ルシフェラーゼ活性が回復し、SRSF3 が Saa3 の 3' UTR 媒介翻訳抑制に関与することが明らかとなった。ウエスタンブロット解析によりさらに確認されるように、SRSF3 - siRNA (300 nM) により、ノックダウンが誘導され、LPS 曝露 BV2 細胞において、SAA3 内在性タンパク質レベルが 3 . 0 1 倍の有意な上昇を生じた (図 5 H 及び 5 I)。次いで、SRSF3 媒介翻訳抑制が、高度に制御された免疫遺伝子 / mRNA の翻訳制御に関与する、より一般的な機構を表し得るかどうかを調査した。これに取り組むために、クラスター 1 由来の高度に制御された転写物を選択した (図 2 B ; ズーム 1) : Lcn2、Ccl5 及び Ccl3。すなわち、列挙した遺伝子のすべては、配列決定されたペプチド中に検出されない、高度に上方制御された転写物のクラスターに属する。次いで、生物情報学ツールを使用して、選択された遺伝子の 3' UTR における潜在的 SRSF3 結合部位を検索した。図 5 J に模式的に示すように、潜在的結合部位の広範な分布を、SRSF3 について、Lcn2、Ccl5 及び Ccl3 の 3' UTR に沿ってそれぞれ観察した。SRSF3 が Lcn2、Ccl5 及び Ccl3 mRNA の翻訳抑制に関与するかどうかを調査するために、一連の SRSF3 ノックダウン実験を実施した。これまでに説明したように、実験は、siRNA - SRSF3 又は CTL siRNA (配列番号 8 ~ 11) の存在下の、LPS 曝露 BV2 細胞で実施した。図 5 K 及び 5 L に示すように、CTL siRNA 存在下の LPS により、CCL3 レベルの初期上昇が引き起こされたが、SRSF3 のノックダウンにより、観察される翻訳抑制がさらに消失した。ウエスタンブロット解析により明らかのように、SRSF3 ノックダウンは、対応する対照と比較した場合、LCN2 (4 . 8 9 倍の上昇)、CCL5 (2 . 5 倍の上昇) 及び CCL3 (2 . 1 9 倍の上昇) タンパク質レベルの有意な上方制御と関連し、これにより、クラスター 1 由来の高度に制御された転写物の翻訳抑制における SRSF3 の役割を明らかに示唆した。これまでに示した表 1 においてさらに明らかのように、スクリーニングデータに基づい

て、他のいくつかの高度に制御された転写物の3'UTR領域は、SRSF3の推定結合部位においてエンリッチされ、これにより、SRSF3が自然免疫遺伝子翻訳の主要制御因子として作用し得る可能性が上昇する。

【0102】

実施例7

SRSF3により自然免疫カスケードが*in vivo*で制御される

SRSF3の役割を*in vivo*で評価するために、これまでに作製したTLR2-luc-GFPレポーターマウスを使用した(Lalancette-Hebertら、2009)。この遺伝子導入マウスモデルでは、ルシフェラーゼ及びGFPを、マウスTLR2遺伝子プロモーターの転写制御下で共発現させ、これにより、自然免疫応答/ミクログリア活性化を、高解像度/高感度CCDカメラを使用して、生きているマウスの脳からリアルタイムで可視化することができる(Lalancette-Hebertら、2009; Lalancette-Hebertら、2012)。これまでの報告と一致して、全身性LPSは、活性化ミクログリアにおいて、TLR2シグナルの安定した誘導を引き起こし、刺激後24時間でピークに達した(Gravelら、2016; Lalancette-Hebertら、2009)(図6A~6D)。さらに確認されるように、TLR2駆動導入遺伝子GFPの2重免疫蛍光分析により、GFP免疫染色のミクログリアマーカーCD11bとの完全な共局在性が明らかとなった(図6E)。*in vitro*での実験で得られた結果に基づいて、内在性SRSF3の*siRNA*媒介的ノックダウンは、炎症遺伝子の翻訳抑制を*in vivo*で軽減し、これにより自然免疫応答の強調及び脳TLR2シグナルの増加が生じ得ると仮定した。最初の鼻腔内送達後48時間で、20µgの*siRNA*(配列番号8~11)により効率的ノックダウンが誘導され、内在性SRSF3タンパク質の発現レベルにおいて60%の低下が生じた(図6F及び6G)。プロトコルの模式図を図6Hに提示する。最適なSRSF3ノックダウンが、鼻腔内送達後48時間で得られ、脳におけるTLR2応答のピークが、全身注入後24時間で発生することを考慮して、*in vivo*でのSRSF3ノックダウンの作用を可視化するために、TLR2-luc-GFPマウスに、*siRNA*送達後24時間でLPSを注入(*i.p.*)し、24時間後に撮像した。TLR2応答は、LPS注入前(ベースライン)(図6I)及びLPS注入後24時間に(図6J及び6K)上昇した。図6J及び6Kに示すように、SRSF3の*siRNA*媒介ノックダウンにより、対照(スクランブル*siRNA*)と比較した、TLR2応答の顕著な増加が*in vivo*で誘導された。図6Lにおける、生体光シグナルの定量分析により、SRSF3-*siRNA*+LPS-24時間の実験群において、TLR2シグナル強度が、スクランブル+LPS-24時間又はLPS-24時間のみと比較して、2.18及び3.41倍の有意な増加を示した。図6M及び6Nにおいてさらに明らかのように、SRSF3-*siRNA*+LPS-24時間で処置した動物の脳切片の免疫蛍光分析により、「アメーバ様」形態のミクログリア細胞が、スクランブル+LPS-24時間と比較して、活性化されたことが示される。この定量分析により、SRSF3-*siRNA*+LPS-24時間で処置した動物の脳切片におけるIba1シグナルが、対応する対照と比較して、有意に増加することが明らかとなった(図6O)。重要なことには、ミクログリアへの*siRNA*送達の効率が、*siGL*Oにより確認された(図8A~8P)。このトランスフェクション指標は、良好なトランスフェクションの明白なシグナルとして、核に局在化する。最終的には、新たな脳ホモジネートからCD11b磁気ビーズにより単離した、精製ミクログリアで実施したウエスタンブロット解析により、LPS曝露後のSRSF3のノックダウンにより、炎症遺伝子の翻訳抑制が軽減されることが示された。実際、SAA3(3.91倍の上昇)、LCN2(3.15倍の上昇)、CCl5(5.12倍の上昇)及びCCl3(2.78倍の上昇)の内在性ミクログリアタンパク質レベルの顕著な上方制御が観察された(図6P及び6Q)。全体的に見て、結果は、活性化ミクログリアにおける高度に上方制御された自然免疫遺伝子の翻訳制御において、SRSF3が、鍵となる役割を担うことを*in vivo*で実証する。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 3 】

実施例 8

S O D 1 変異マウスの脊髄において p S R S F 3 のレベルが経時的に上昇する場合、S R S F 3 が A L S に関係づけられる

前駆症状期 (5 0 日)、症候期 (1 3 5 日) 及び進行期 (1 5 8 日) における疾患に関して、全脊髄抽出物を使用して、リン酸化 S R S F 3 のレベルを判定した。各状態を、対照として使用した野生型マウス (1 3 5 日) と比較した。モノクローナル抗体 (抗ホスホエピトープ S R) を 1 : 1 0 0 0 の濃度で使用した。総 S R S F 3 は、ポリクローナル抗 S R S F 3 (1 : 5 0 0 0) を使用して判定した。図 9 は、総 S R S F 3 (A) 及びリン酸化 S R S F 3 (B) についての定量的ウエスタンブロット解析を示す。S R S F 3 のレベルは、A L S 前駆症状 (S O D 1 変異マウス 5 0 日、1 3 5 日、1 5 8 日) において有意に上昇し、一方、リン酸化レベルは、疾患進行とともに顕著に上昇する (S O D 1 変異マウス 5 0 日、1 3 5 日、1 5 8 日)。また、図 9 C は、1 5 8 日の S O D 1 G 9 3 A マウスのトランスクリプトームプロファイルが、本明細書に記載のように、L P S 曝露マウスにおいて観察されたものと類似することを示す。その上、生物情報学により、上方制御された m R N A の一部は (C l e c 7 a、C s t 7)、S R S F 3 結合部位が高度にエンリッチされ得ることが明らかとなった。このような結果の組合せは、高度に上方制御された m R N A の翻訳抑制による、S R S F 3 の A L S における関連性を指し示す。

10

【 0 1 0 4 】

実施例 9

正常加齢マウスモデル及び前頭側頭型認知症マウスモデル (T D P - 4 3 ^{G 3 4 8 C}) における総 S R S F 3 及び p S R S F 3 のレベルの上昇

前頭側頭型認知症 (T D P - 4 3 ^{G 3 4 8 C}) 及び正常加齢のマウスモデルを、全脳抽出物 (皮質) を使用して解析して、前駆症状性 T D P - 4 3 ^{G 3 4 8 C} (2 ~ 3 カ月) 及び症候性 T D P - 4 3 ^{G 3 4 8 C} (1 年) 並びにこれらの対応する野生型対照において、リン酸化 S R S F 3 のレベルを判定した。モノクローナル抗体 (抗ホスホエピトープ S R) を 1 : 1 0 0 0 の濃度で使用した。総 S R S F 3 は、ポリクローナル抗 S R S F 3 (1 : 1 0 0 0) を使用して判定した。図 1 0 は、ウエスタンブロット解析を示し、ここで、総 S R S F 3 及びリン酸化 S R S F 3 のレベルは、T D P - 4 3 ^{G 3 4 8 C} マウスにおいて、これらの対応する対照と比較して上昇する。

20

30

【 0 1 0 5 】

実施例 1 0

孤発性 A L S 患者由来の脳脊髄液

孤発性 A L S 患者及び対照患者由来のヒト脳脊髄液 (C S F) をアセトンで濃縮して使用し、抗ホスホエピトープ S R 抗体 (1 : 2 5 0) 及びポリクローナル抗 S R S F 3 抗体 (1 : 5 0 0) を使用してリン酸化 S R S F 3 及び総 S R S F 3 のレベルをそれぞれ評価した。結果は、図 1 1 A ~ G に示す。

【 0 1 0 6 】

実施例 1 1

S R S F 3 / p S R S F 3 を標的とするアンチセンスモルホリノオリゴヌクレオチドの発

40

生及び検証

A L S における免疫調節性の治療標的として S R S F 3 を検証するために、内在性 S R S F 3 を標的とする抗 S R S F 3 モルホリノ (抗 S R S F 3 A S O M) を生成して試験した。図 1 2 に記載及び模式的に提示するように、A S O M は、2 5 核塩基の単鎖であり、S R S F 3 の 5 ' U T R を標的として相補 m R N A に結合する。機構として、A S O M は、S R S F 3 翻訳の開始を遮断し、内在性タンパク質のノックダウンを最終的に引き起こす。A S O M 配列は、図 1 2 の説明文に示す。治療の有効性を i n v i v o 設定で、A L S のマウスモデル (S O D 1 G 9 3 A マウス) を使用して試験した。図 1 3 において実証するように、抗 S R S F 3 A S O M のくも膜下腔内送達により、A L S マウスの脊髄における内在性 S R S F 3 の効率的なノックダウンが誘導される。S R S F 3 ノックダ

50

ウンは、標的化 mRNA によるタンパク質の新規合成と関連した (SRSF3 により mRNA が制御された、図 9 を参照)。この結果は、内在性 SRSF3 を標的とする ASOM を使用してタンパク質の新規合成を誘導し、これにより、疾患に冒されたミクログリアにおける自然免疫応答を、効率的にリプログラミングすることができることを明白に示す。ASOM の有効性もまた試験して、末梢免疫細胞における SRSF3 及び免疫応答を標的とした。すなわち、pSRSF3 レベルは、ALS 患者及び ALS マウスの血漿において上昇する。ASOM の有効性を、腹腔内 (i.p.) 送達を使用して試験した。図 14 A ~ C に示すように、ASOM の i.p. 送達により、血漿 (マウス単球 / マクロファージ) における内在性 SRSF3 の効率的なノックダウンが誘導される。重要なことには、症候性疾患期に開始した ASOM の i.p. 送達は、ALS の SOD1G93A モデルにおいて優れた治療作用を有した。図 14 A、D、E にさらに記載するように、疾患の進行期 (麻痺の発症後) に開始した ASOM (25 mg / kg 1 x 週) による治療により、ALS マウスの生存が有意に向上する (21 日間)。観察された生存の向上は、ロータロッド試験において評価された、感覚性運動障害の顕著な向上と関連した。その上、ASOM 治療作用の詳細な解析では、抗 SRSF3 ASOM による治療により、筋肉及び脾臓の萎縮が回復し (図 15 A ~ D)、SOD1G93A マウスの脊髄において運動ニューロンが維持されることが明らかとなった。重要なことには、i.p. 送達した ASOM の治療作用は、脊髄におけるミクログリア活性化の上昇と関連した。まとめると、この結果は、SRSF3 が、ALS に冒されたミクログリア / マクロファージ / 単球における免疫応答の制御因子として作用することを明らかに実証する。上記を考慮すると、疾患の進行期において、ASOM による内在性 SRSF3 の標的化は、ALS の治療に有効である。

10

20

【0107】

実施例 12

SRSF3 の RRM ドメインを標的とする抗体

SRSF3 を治療的に調節するさらなる戦略は、標的免疫 mRNA とのこの相互作用を遮断及び / 又は破壊することである。この標的 mRNA との SRSF3 の相互作用を破壊するために、SRSF3 の RRM ドメインを標的とする、ユニークなモノクローナル治療抗体 (Mab121) を作製した。SRSF3 RRM ドメインに特異性の同定された配列 (図 17 A において下線を引く) 及びモノクローナル抗体 (MAB) の有効性を試験する検証戦略を図 17 に示す。免疫手順の後に、MAB の 10 種のクローンを入手し、図 18 A にさらに示すように、SRSF3 ペプチド配列を高親和性で認識する 4 種のクローンを選択した。Saa3 3' UTR を発現する PGL3 ベクターで安定にトランスフェクトした HEK 細胞で実施したルシフェラーゼ検証アッセイ (本明細書において詳細に記載するアッセイ) では、Mab 抗体 (クローン # 155) を含む血清による治療によってルシフェラーゼ活性が回復し、これにより、Saa3 3' UTR に結合する SRSF3 によって引き起こされる翻訳停止が軽減されたことを示す (図 18 B)。ユニークな免疫原性配列は、GNNGNKTELEAFGY YGPLRSV である。

30

【0108】

実施例 13

脳虚血及びアルツハイマー病 (AD) における SRSF3 媒介機構のエビデンス。SRSF3 の標的化は、脳卒中後の保護に有効である。

40

【0109】

虚血後の炎症の解析により、SRSF3 が、脳卒中後のミクログリア活性化の調節に関与することが明らかとなった。図 19 A に示すように、pSRSF3 のレベルは、脳卒中後に有意に上昇し、一方、総 SRSF3 タンパク質の発現は、減少した。2重免疫蛍光分析により、脳卒中後の pSRSF3 の発現が、Iba1 陽性活性化ミクログリアに制限されることが明らかとなった。脳卒中後 24 時間での siRNA の鼻腔内送達により、内在性タンパク質の有意なノックダウンが誘導された (図 20 A ~ C)。治療方法としての siRNA の鼻腔内送達を本明細書に記載する。この治療は、脳卒中後の免疫応答の遅延 / 再生促進期を一過的にリプログラミングし得る、単一用量としてデザインされた。内在性

50

S R S F 3 の s i R N a 媒介ノックダウンにより、脳卒中後 3 ~ 5 日で自然免疫応答の顕著な増加が誘導され、これは、T L R 2 レポーターマウスを使用して *in vivo* で可視化された。重要なことには、自然免疫応答/ミクログリア活性の遅延誘導は、虚血病変のサイズの有意な減少、及び S R S F 3 により制御されることが知られているある特定の免疫分子、例えば、C C L 3、C C L 5 の発現レベル(タンパク質)の遅延的増加と関連した。したがって、脳卒中後 2 4 時間で開始した S R S F 3 の標的ノックダウンにより、脳卒中後の遅延的炎症応答が増加し、虚血病変が減少する(図 2 1)。

【0110】

実施例 1 4

アルツハイマー病(A D)のアミロイド前駆タンパク質(A P P)マウスモデルにおける S R S F 3 発現パターン

A D の A P P マウスモデルの脳における S R S F 3 発現パターンの解析により、7 ~ 9 カ月齢から p S R S F 3 レベルが顕著に上昇することが明らかとなった(B o r c h e l t ら、1 9 9 7)。このマウスモデルでは、この時点(7 ~ 9 カ月齢)は、認知障害の発症と一致する(図 2 2 A、B)。A P P マウスの脳切片の免疫蛍光分析により、p S R S F 3 の発現が、アミロイド斑の周囲の活性化 I b a 1 陽性ミクログリアに制限されることが明らかとなった。対照では、p S R S F 3 免疫反応性は、検出されなかった。図 2 3 A にさらに示すように、神経炎症を検証するために、G F A P の発現レベルを陽性対照として解析した。このタンパク質レベルの上昇、及びそれに伴うアストログリオシスが、A P P マウスモデルにおける炎症応答に關与することが知られているからである。A D に冒されたミクログリアにおいて誘導されることで知られ(K a n g ら 2 0 1 8、K e r e n - S h a u l ら、2 0 1 7)、A L S ミクログリアにも見出される(K e r e n - S h a u l ら、2 0 1 7) 高度に制御され疾患と関連する m R N A のタンパク質発現レベルを解析したところ、S R S F 3 により制御されることがわかった。図 2 3 C に示すように、C L E 7 A 発現レベルの中程度の上昇を除いて、高度に上方制御された他の m R N A は、タンパク質レベルが制御されなかった(図 2 3 C、D)。抗 S R S F 3 A S O M の鼻腔内送達を、A P P マウスにおいて試験した。図 2 4 に示すように、単一用量により、A P P マウスの脳において、内在性 S R S F 3 の効率的なノックダウンが誘導された(1 週間の間を超え持続時間)。増加するエビデンスは、自然免疫応答が、A D において脱制御され、これにより、S R S F 3 アンタゴニストである抗 S R S F 3 A S O M による治療が、A D における治療可能性を有し得ることを示唆する。

【0111】

材料及び方法

D N A 構築物、遺伝子導入マウスの作製及び遺伝子型同定

C D 1 1 b プロモーターを p B l u e s c r i p t K S + (p B S K S - C D 1 1 b) にサブクローニングした。F l a g - E G F P 断片を P C R により、鋳型として p E G F P - N 3 プラスミド(C L O N T E C H 社)を使用して得た。得られた断片を p B S K S - C D 1 1 b プラスミドに導入した。6 0 s リボソームタンパク質 L 1 0 a (R P L 1 0 a) のゲノム D N A に対応する B a m H I / N o t I 断片 2 . 5 K b を p B S K S 組換えベクターに導入した。最終構築物の完全性は、配列決定(配列番号 1)により確認された。X h o l - X h o l D N A 断片 5 . 2 K b をアガロースゲルで単離し、マイクロインジェクションを行った。遺伝子導入マウスは、尾部試料について E G F P 遺伝子の P C R 増幅を実施することにより遺伝子型を同定した。E G F P 断片 3 2 9 b p を F / E G F P - R p l 1 0 a 遺伝子導入マウスから増幅した。この実験は、2 ~ 3 カ月齢の成体雄及び雌マウスに実施した。すべての実験手順は、ラヴァル大学動物福祉倫理委員会(L a v a l U n i v e r s i t y a n i m a l c a r e e t h i c s c o m m i t t e e)により承認され(プロトコル # 1 7 - 0 6 3 - 1 及び 1 4 - 0 9 6 - 4)、カナダ動物保護協議会による実験動物の管理及び使用に関するガイド(The Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal C

are)に従った。

【0112】

TRAPプロトコール

Heimanらにより記載されるTRAPプロトコールを若干の変更を加えて使用した(Heimanら、2008)。簡潔には、脳皮質試料を氷冷の解剖バッファーに入れ、その後、組織溶解バッファーで均質化した(10%wt/vol)。次いで、試料を2000gで10分間、4で遠心分離した。10%のNP-40の試料容量1/9及び300mMのDHPGの試料容量1/9を上清に加えた。次いで、試料を30分間、4のオービタルシェーカーでインキュベートした。20000gで10分間、4の遠心分離により不溶物質を回収した。各上清を2つのアリコートに分けた。(一方のアリコートはmRNA抽出に、他方のアリコートはペプチド溶出に使用する)。核試料は、抗Flagアガロース親和性樹脂に直接加え、4のオービタルシェーカーで一晩インキュベートする。翌日、ビーズを遠心分離により回収し、高塩濃度バッファー(20mMのHepes-KOH pH7.3、200mMのKCl、12mMのMgCl₂、1%のNP-40、0.5mMのDTT、100μg/mlのシクロヘキシミド)で3回洗浄した。ビーズペレットを、mRNA精製又はペプチド精製のいずれかに使用した。

10

【0113】

TRAPプロトコール後のF/EGFP-RPL10aマウスのmRNA精製

最後の洗浄の後、ビーズペレットを、ベータメルカプトエタノールを加えたNanoprep溶解バッファー100μlに再懸濁し、10分、室温でインキュベートした。RNA精製をキット製造者の指示に従って行った(Absolutely RNA Nano prep kit)。各実験について、3つの生物学的反復を実施した。各反復についてn=5である。採取したRNAは、Affymetrixマウス遺伝子チップに供した。

20

【0114】

TRAPプロトコール後のF/EGFP-RPL10aマウスからのペプチドの精製

最後の洗浄の後、すべての残留洗浄バッファーを除去し、ビーズペレットをEDTA溶出バッファー(10mMのHepes-KOH pH7.3、150mMのKCl、5mMのMgCl₂、20mMのEDTA、プロテアーゼ阻害物質)に再懸濁し、30分、室温のオービタルシェーカーでインキュベートした。EDTA溶出バッファーを使用して、リボソームを解離させ、新生鎖ペプチドを遊離させた。7000rpmで15分間、遠心分離することにより溶出液を回収した。採取したリボソーム会合ペプチドを、質量分析により、Orbitrap fusion質量分析計を使用して配列決定した。この実験では、3回の技術的反復を実施した。1条件あたりn=5である。

30

【0115】

in vivoでの生物発光画像撮像

これまでに記載されているように(Gravelら、2011; Lalancette-Hebertら、2007; Lalancette-Hebertら、2009)、IVIS 200 Imaging System(Caliper LS Xenogen社)を使用して画像を収集した。ここで、データは、光強度を示す疑似カラー画像を示した。対象領域は、光子毎秒毎平方センチメートル毎ステラジアンで表す。

40

【0116】

統計学的解析

データは、少なくとも2回の独立した実験による平均±SEMとして表す。試験と対照との間の値の統計学的差異は、Studentのt検定を適用することにより解析した。多重比較では、統計学的差異は、通常のone-way ANOVA(Tukeyの多重比較検定)を適用することにより解析した。データは、有意であると考えられ、p<0.05である場合「*」、p<0.01である場合「**」、p<0.001である場合「***」により示した。統計学的解析は、GraphPad Prismバージョン6.07(GraphPad Software社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)を使用して実施した。

50

【0117】

組織採取及び免疫組織化学

動物を犠死させ、これまでに記載されているように灌流及び処理した (Gravelら、2016; Lalancette-Hebertら、2007; Lalancette-Hebertら、2009)。クリオスタット (25 µm厚) で脳を冠状切片に分割し、-20 で保存した。次いで、脳切片を、1次抗体である1:500ウサギポリクローナル抗Iba1 (Wako社)、1:500マウスモノクローナル抗緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Invitrogen社)、1:500ラットモノクローナル抗CD11b (Serotec社) 中でインキュベートした。次いで、切片を、対応する蛍光ヤギ2次抗血清 (Invitrogen社) 中でインキュベートした。Zeiss LSM 700共焦点顕微鏡を20x対物レンズとともに使用し、1x~2xのスキャンズームを使用して蛍光像を取得し、Zenソフトウェアを用いて解析した。

10

【0118】

ミクログリア1次培養物

これまでに記載されているように、CD11b r GFP 遺伝子導入子犬の脳皮質から1次培養物を調製した (Lalancette-Hebertら、2012)。グリア細胞培養物を、F12を添加したダルベッコ改変イーグル培地に20~25日間維持して、ミクログリア及び星状膠細胞を単離した。グリア細胞培養物をトリプシン処理して、10 cm² のプレートに播種した。細胞をLPS (1 µg/ml) 又は溶媒で処理した。24時間後、1次培養物を採取して免疫沈降に供した。

20

【0119】

Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST

NanoDrop ND-1000分光光度計 (NanoDrop Technologies社、ウィルミントン、DE州、米国) を使用して総RNA濃度を測定した。RNAの質をAgilent BioAnalyzer (Agilent Technologies社) で試験した。DNAマイクロアレイ解析を、Affymetrix Mouse Gene 2.0 STによりAffymetrixの標準プロトコールに従って、1試料あたり総RNA 100 ngを使用して実行した。Affymetrix Expression Console Softwareを使用して、Robust Multiarray Analysis (RMA) の方法を用いて、品質管理、バックグラウンド減算及びプローブセット強度の正規化を実施することにより、画像データを解析した。mRNAは、2つの比較試料間の変化倍率が1.2よりも高く、関連するANOVAのp値が0.05よりも低い場合、変異体であると考えられた。マイクロアレイ解析は、CHU de Quebec Research Center (CHUL) 遺伝子発現プラットフォーム、ケベック、カナダにより実施した。

30

【0120】

質量分析法：試料調製

試料を脱塩カラムAmicon 3kDa (Millipore社) で濃縮し、50 mMの重炭酸アンモニウムで3回洗浄した。タンパク質濃度を比色分析Bradfordアッセイにより判定した。等量のタンパク質を変性バッファーに可溶化した。次いで、試料をDTT及びヨードアセトアミドの溶液中で5分間、95 まで加熱した。最後に、トリプシン1 µgを加え、混合物を37 で一晩インキュベートした。沈殿したデオキシコール酸ナトリウムを10分のRTインキュベーション及び16000 gで5分のRT遠心分離により除去した。上清をC18 Emporeフィルターで脱塩した。ペプチドを80%のACN-0.1%のTFAに溶出し、スピード真空濃縮装置で乾燥させた。

40

【0121】

質量分析法：質量分析

nanoLC/MSMSにより3つ組で試料を解析して統計学的情報を得た。各注入では、ペプチド試料750 ngを注入し、オンラインの逆相 (RP) ナノスケールキャピラリー液体クロマトグラフィー (nanoLC) により分離し、エレクトロスプレー質量分

50

析 (ESI MS/MS) により解析した。ナノエレクトロスプレーイオン源を備える Orbitrap Fusion 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社) に接続した、Dionex Ultimate 3000 nano RSLC クロマトグラフィシステム (Thermo Fisher Scientific 社 / Dionex Softron GmbH 社、ゲルメリング、独国) を用いて実験を実施した。質量スペクトルは、データ依存取得モード (data dependent acquisition mode) を使用し、Thermo XCalibur ソフトウェアのバージョン 3.0.63 を使用して取得した。フルスキャン質量スペクトル (350 ~ 1800 m/z) を orbitrap で、4e5 の AGC 標的、50 ms の最大注入時間及び 120000 の解像度を使用して取得した。各 MS スキャンは、3 秒の総サイクルタイム (トップスピードモード) について、最も強いイオンの断片化 MSMS スペクトルを取得した後に行った。これまでに断片化したペプチドの動的排除 (dynamic exclusion) は、20 秒の期間及び 10 ppm の許容誤差に設定した。質量分光分析は、Eastern Quebec Genomic Center、CHU de Quebec、カナダのプロテオミクスプラットフォームにより実施した。検索するデータベース及び無標識定量スペクトルを、マウスタンパク質データベース (UniProt KB - taxonomy Mus musculus - 84675 配列) に対して、MaxQuant ソフトウェア v. 1.5.0.25 の Andromeda モジュール (Cox 及び Mann、2008) を使用して検索した。ユニークな razor ペプチドのみを使用して定量した。タンパク質は、2 つの比較試料のうちの一つにおいて、少なくとも 2 つの反復値が存在する場合にのみ、定量可能であると考えられた。タンパク質は、2 つの比較試料間の変化倍率が 1.2 よりも高く、関連する p 値が 0.05 よりも低い場合、変異体であると考えられた。

【0122】

ClueGo 解析

遺伝子チップ Affymetrix 又は質量分析によるデータを、ClueGo アプリケーション (バージョン 2.1.6) により、cytoscape 環境 (3.2.1) を使用して解析した。差次的に発現した遺伝子 (変化倍率及び p 値が一致する) を使用し、種々のオントロジーソース、例えば、ジーンオントロジー (Gene Ontology、GO)、京都遺伝子ゲノム百科事典 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes、KEGG)、Reactome 及び WikiPathways を使用して生物学的ネットワークを作成した。GO 区間は、4 (最小レベル) ~ 11 (最大レベル) であった。カップスコアは、0.7 であった。生物学的ターム及び群のエンリッチメントでは、発明者らは、超幾何分布に基づいた両側 (エンリッチメント / 枯渇) 検定を使用した。発明者らは、トランスクリプトーム結果について、統計学的有意性を 0.05 に設定し、発明者らは、ClueGO により作成されたターム及び群について、Bonferroni 補正を使用して p 値を補正した。主要な群のタームは、% 遺伝子 / ターム対クラスターに基づく。

【0123】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

指数関数的に増殖する HEK293 又は BV2 細胞を 24 ウェルの培養皿に播種した。細胞トランスフェクションを、製造者の指示 (jetPRIME、Polyplus 社) に従って実行した。各トランスフェクション実験は、レポーター (pGL3 プロモーター及び修飾 pGL3 プロモーター、Promega 社) 0.125 µg 及び PRL-TK-ウミシイタケベクター (Promega 社) 62.5 ng をトランスフェクション内部対照として含んだ。トランスフェクトした BV2 細胞を、LPS (1 µg/ml) により一晩処理した。2 重ルシフェラーゼ系により製造者の指示 (Promega 社) に従って、ルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションを 3 つ組で実施した。ルミノメーター (Berthold 社、独国) を使用して光シグナルを定量した。ルシフェラーゼ活性をホタルルシフェラーゼ対ウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率として評価した。

【0124】

s i R N A トランスフェクション

BV2細胞を、10%のFBS及びPen/Strepを添加したDMEMに維持した。トランスフェクションの1日前に 3.5×10^4 細胞/ウェルを24ウェルのプレートに播種した。次いで、BV2細胞に、SRSF3 s i R N A (100 nM及び300 nM; ON-TARGET plus Mouse Srsf3 s i R N A - SMART pool: Dharmacon社)又はCTL s i R N Aを、INTERFERin s i R N A トランスフェクション試薬(Polyplus社)を使用して製造者の指示に従ってトランスフェクトした(配列番号8~11)。ウエスタンブロット解析では、トランスフェクションの2日後に、細胞を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のLPS又は溶媒で刺激し、採取してタンパク質測定を行った。ルシフェラーゼレポートアッセイでは、DNAトランスフェクションの1日前に、BV2細胞にs i R N Aをトランスフェクトした。

10

【0125】

定量的逆転写PCR解析(RT-qPCR)

F/EGFP-RPL10aを安定に発現するBV2細胞株に、pGL3又はpGL3-Saa3-3'UTR-wtをトランスフェクトした。トランスフェクション後48時間で、リボソームをTRAPプロトコールに従って免疫精製し、mRNA精製をキット製造者の指示に従って行った(Stratagene Absolutely RNA Nanoprep kit)。

20

【0126】

リボソーム会合mRNAの量を、NanoDrop ND-1000分光光度計(NanoDrop Technologies社、ウィルミントン、DE州、米国)を使用して測定し、総RNA量をAgilent BioAnalyzer 2100(Agilent Technologies社、サンタクララ、CA州、米国)で試験した。総RNA 20 ngに対応するcDNAを使用して、LightCycler 480(Roche Diagnostics社、マンハイム、独国)を使用して、蛍光に基づくリアルタイムPCR定量を実施した。試薬LightCycler 480 SYBR Green I Master(Roche Diagnostics社、インディアナポリス、IN州、米国)を製造者により記載されているように、2%のDMSOとともに使用した。融解曲線法を実施して、非特異性シグナルを評価した。各mRNAのコピー数の算出を、Luu-Theらに従って、2次導関数方法及びCp対量の対数の標準曲線を使用して行った(Luu-Theら、2005)。安定した発現レベルを有する遺伝子であることがわかっている基準遺伝子: ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(Hprt1)及びグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を使用して正規化を実施した(Warringtonら、2000)。定量的リアルタイムPCR測定は、CHU de Quebec Research Center(CHUL)遺伝子発現プラットフォーム、ケベック、カナダにより実施し、MIQEガイドラインに準拠した(Bustinら、2010; Bustinら、2009)。

30

【0127】

SRSF3-s i R N Aの鼻腔内送達

スクランブルs i R N A (20 μg)又はSRSF3-s i R N A (20 μg) (Dharmacon社)を、in vivo jetPEI試薬(Polyplus社)を使用し、製造者のプロトコールに従って、麻酔下のマウスの鼻腔内に投与した。簡潔には、jetPEI及びs i R N Aは、10%のグルコース溶液で別々に希釈した(窒素及びリン酸(N/P)の比率は8に等しい)。次いで、s i R N A及びPEI溶液を混合し、15分間室温でインキュベートして総計50 μl とした。マウスは、各鼻孔に溶液25 μl の投与を受けた。

40

【0128】

SRSF3 AMOSの腹腔内送達

症候性疾患(130/スコア2)から1x週間(25 mg/kg)、疾患の末期まで、

50

SRSF3に対するアンチセンス*in vivo*-morpholinoをSOD1G93Aマウスの腹腔内に(i.p.)注入した。

【0129】

siGLOトランスフェクション

siRNAのCNS細胞への取込みを可視化するために、発明者らは、スクランブルsiRNA又はSRSF3-siRNAをsiGLO Red (20 µg)オリゴヌクレオチド2本鎖(Dharmacon社)と、*in vivo* jetPEI試薬を使用して共トランスフェクトする(N/P=8)。siGLOを使用して、siRNAの送達効率を確認した。このトランスフェクション指標は、細胞を良好にトランスフェクトする場合、核に局在化するように修飾する。

10

【0130】

*in vivo*での生物発光画像撮像

これまでに記載されているように(Lancette-Hebertら、2009)、IVIS 200 Imaging System(CaliperLSXenogen社)を使用して画像を収集した。撮像時間の20分前に、マウスは、ルシフェラーゼ基質であるDルシフェリン(0.9%の生理食塩水中150 mg/kg)(CaliperLS-Xenogen社)の腹腔内(i.p.)投与を受けた。脳の生物発光源の3D再構築を、拡散発光断層撮像(diffuse luminescent imaging tomography、DLIT)アルゴリズム(Living Image 3D Analysis Software、CaliperLS-Xenogen社)を使用することにより達成した。ここで、データは、光強度を示す疑似カラー画像を示した。対象領域は、光子毎秒毎平方センチメートル毎ステラジアンで表す。

20

【0131】

CD11b磁気ビーズによる脳ミクログリアの単離

氷冷PBSによる灌流後、スクランブルsiRNA又はSRSF3-siRNAで処理し、LPSを注入した(24時間; 5 mg/kg; i.p.)マウス由来の脳を解剖し、ディスペーゼII(invitrogen社)により30分、37°Cで酵素的に分解して、15分毎に穏やかに粉碎した。細胞懸濁液を70 µmの細胞濾過器を通過させることにより、壊死組織片を除去した。細胞洗浄後、細胞ペレットを30%のパーコール(GE Healthcare社)に再懸濁し、700 gで10分間遠心分離した。ミエリンを含む上清を除去し、ペレット状の細胞をHBSSで洗浄して、キット製造者の指示(CD11b(ミクログリア)、MicroBeads human and mouse; Miltenyi Biotec社)に従ってCD11b磁気ビーズ分離に供した。採取した細胞をウエスタンブロット解析に供した。

30

【0132】

ウエスタンブロット用試料調製(インプット)

生理食塩水/LPS注入マウス由来の脳、又はCD11b磁気ビーズで精製したミクログリア細胞を、尿素溶解バッファー(6 Mの尿素、1%のSDS、50 mMのTris-HCl pH 7.4、150 mMのNaCl)により溶解、超音波処理し、Bradfordタンパク質アッセイ(Bio-Rad社)を、標準物質としてのウシ血清アルブミンとともに使用して定量した。試料をSDS-PAGEゲルで分離し、PVDF膜(Millipore社)に移した。

40

【0133】

抗体(ウエスタンブロット)

ウサギポリクローナル抗マウスSAA3; 1:1000(Santa Cruz社); 抗SAA3抗体の免疫原は、アミノ酸38~122(総aa:128)由来のタンパク質のほとんどを包含する。ウサギポリクローナル抗マウスLCN2; 1:1000(Abcam社); 抗LCN2抗体では、使用する免疫原は、アミノ酸40(総aa:224)に近い。ウサギポリクローナル抗マウスCCL5; 1:1000(LS-Bio社); ウサギポリクローナル抗体抗CCL5は、アミノ酸24~91(総aa:198)に対して作

50

製する。ウサギポリクローナル抗マウスCAP2；1：1000（Origene社）。ウサギポリクローナル抗マウスCCL3；1：1000（Abcam社）。ウサギポリクローナル抗マウスSRSF3；1：1000（Abcam社）。マウスモノクローナル抗ホスホエピトープSRタンパク質クローン1H4；1：1000（Millipore社）。マウスモノクローナル抗アクチン抗体は、ローディングコントロールとして使用した；1：30000（Millipore社）。

【0134】

参考文献

- Anderson, P. (2010). Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 10, 24-35. 10
- Beutner, C., Linnartz-Gerlach, B., Schmidt, S.V., Beyer, M., Mallmann, M.R., Staratschek-Jox, A., Schultze, J.L., and Neumann, H. (2013). Unique transcriptome signature of mouse microglia. *Glia* 61, 1429-1442.
- Bindea, G., Galon, J., and Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661-663.
- Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S., Olsvik, P.A., Penning, L.C., and Toegel, S. (2010). MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 11, 74. 20
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.H., Pages, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091-1093.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. 1997 Oct;19(4):939-45. 30
- Boutej, H. et al. (2017). Diverging mRNA and Protein Networks in Activated Microglia Reveal SRSF3 Suppresses Translation of Highly Upregulated Innate Immune Transcripts. *Cell Reports* 21, 3220-3233
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglspenger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., et al. (2014). Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature neuroscience* 17, 131-143.
- Cao, J., and Geballe, A.P. (1996). Inhibition of nascent-peptide release at translation termination. *Molecular and cellular biology* 16, 7109-7114. 40
- Carpenter, S., and Fitzgerald, K.A. (2015). Transcription of inflammatory genes: long noncoding RNA and beyond. *J Interferon Cytokine Res* 35, 79-88.
- Carpenter, S., Ricci, E.P., Mercier, B.C., Moore, M.J., and Fitzgerald, K.A. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 14, 361-376.
- Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K.B., Farabaugh, K.T., Dutta, R., Yin, X., Kidd, G.J., Bergmann, C.C., Stohlman, S.A., and Trapp, B.D. (2012). Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci* 32, 11706-11715. 50

- Chen, Z., and Trapp, B.D. (2016). Microglia and neuroprotection. *Journal of neurochemistry* 136 Suppl 1, 10-17.
- Ciafre, S.A., and Galardi, S. (2013). microRNAs and RNA-binding proteins: a complex network of interactions and reciprocal regulations in cancer. *RNA Biol* 10, 935-942.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372.
- Danoff, T.M., Lalley, P.A., Chang, Y.S., Heeger, P.S., and Neilson, E.G. (1994). Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the Scya5 gene encoding the murine chemokine RANTES. *J Immunol* 152, 1182-1189. 10
- David, S., and Kroner, A. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature reviews* 12, 388-399.
- Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., et al. (2008). Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135, 749-762.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917-921. 20
- Gao, B., and Roux, P.P. (2015). Translational control by oncogenic signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1849, 753-765.
- Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* 582, 1977-1986.
- Gowing, G., Vallieres, L., and Julien, J.P. (2006). Mouse model for ablation of proliferating microglia in acute CNS injuries. *Glia* 53, 331-337.
- Gravel, M., Beland, L.C., Soucy, G., Abdelhamid, E., Rahimian, R., Gravel, C., and Kriz, J. (2016). IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1. *J Neurosci* 36, 1031-1048.
- Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10, 1387-1394. 30
- Heiman, M., Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J.D., Day, M., Ramsey, K.E., Suarez-Farinas, M., Schwarz, C., Stephan, D.A., Surmeier, D.J., et al. (2008). A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135, 738-748.
- Hickman, S.E., Kingery, N.D., Ohsumi, T.K., Borowsky, M.L., Wang, L.C., Means, T.K., and El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature neuroscience* 16, 1896-1905.
- Jiang, P., and Coller, H. (2012). Functional interactions between microRNAs and RNA binding proteins. *Microna* 1, 70-79. 40
- Jin, M., Jang, E., and Suk, K. (2014). Lipocalin-2 Acts as a Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-injected Mice. *Exp Neurol* 23, 155-162.
- Kang SS, Ebert MTW, Baker KE, Cook C, Wang X, Sens JP, Kocher Jeanne-Pierre, Petrucci L, Fryer JD. Microglial translational profiling reveals a convergent ApoE pathway from aging, amyloid and tau. *J Exp Med*, Aug. 13, 2018.
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017 Jun 15; 169(7):1276-1290 50

- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):312-8. Review.
- Kierdorf, K., and Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci* 7, 44.
- Kim, J.H., Park, K.W., Lee, E.W., Jang, W.S., Seo, J., Shin, S., Hwang, K.A., and Song, J. (2014). Suppression of PPAR γ through MKRN1-mediated ubiquitination and degradation prevents adipocyte differentiation. *Cell Death Differ* 21, 594-603.
- Laflamme, N., Soucy, G., and Rivest, S. (2001). Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *Journal of neurochemistry* 79, 648-657. 10
- Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., and Kriz, J. (2007). Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27, 2596-2605.
- Lalancette-Hebert, M., Julien, C., Cordeau, P., Bohacek, I., Weng, Y.C., Calon, F., and Kriz, J. (2011). Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain attenuates acute immune response and development of postischemic neuronal damage. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 42, 2903-2909.
- Lalancette-Hebert, M., Phaneuf, D., Soucy, G., Weng, Y.C., and Kriz, J. (2009). Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. *Brain* 132, 940-954. 20
- Lalancette-Hebert, M., Swarup, V., Beaulieu, J.M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y.C., Sato, S., and Kriz, J. (2012). Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J Neurosci* 32, 10383-10395.
- Lee, S., Jha, M.K., and Suk, K. (2015). Lipocalin-2 in the Inflammatory Activation of Brain Astrocytes. *Crit Rev Immunol* 35, 77-84.
- Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E., and Cumps, J. (2005). Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* 38, 287-293. 30
- Madeddu, S., Woods, T.A., Mukherjee, P., Sturdevant, D., Butchi, N.B., and Peterson, K.E. (2015). Identification of Glial Activation Markers by Comparison of Transcriptome Changes between Astrocytes and Microglia following Innate Immune Stimulation. *PLoS one* 10, e0127336.
- Manley, J.L., and Krainer, A.R. (2010). A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes Dev* 24, 1073-1074.
- Medzhitov, R., and Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature reviews. Immunology* 9, 692-703.
- Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Vandenberg, A., Wessels, H.H., Ori, D., Uehata, T., Tartey, S., Akira, S., Suzuki, Y., et al. (2015). Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell* 161, 1058-1073. 40
- Misteli, T., and Spector, D.L. (1997). Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol* 7, 135-138.
- Nilsson, S.E., and Assmann, S.M. (2007). The control of transpiration. *Insights from Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 19-27.
- O'Brien, K.D., and Chait, A. (2006). Serum amyloid A: the "other" inflammatory protein. *Curr Atheroscler Rep* 8, 62-68.
- Paz, I., Kostin, I., Ares, M., Jr., Cline, M., and Mandel-Gutfreund, Y. (2014). RB 50

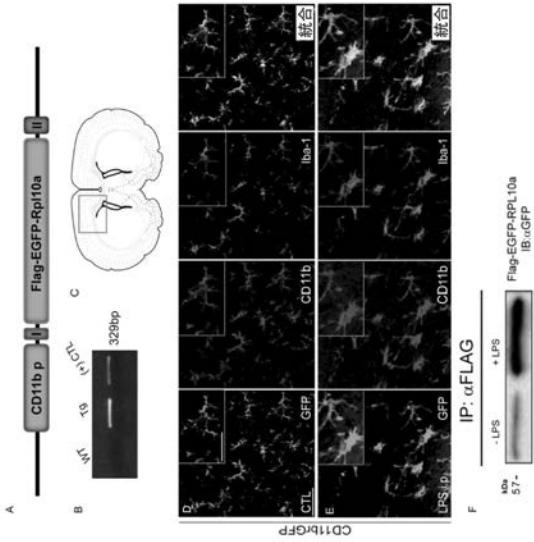
- Pmap: a web server for mapping binding sites of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 42, W361-367.
- Prinz, M., and Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature reviews* 15, 300-312.
- Ransohoff, R.M., and Brown, M.A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation* 122, 1164-1171.
- Schwartz, M., and Shechter, R. (2010). Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6, 405-410.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504.
- Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C.G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., Kongi, K., Cantuti, L., Hanisch, U.K., Philips, M.A., et al. (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nature neuroscience* 18, 1819-1831.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31, 16064-16069.
- Warrington, J.A., Nair, A., Mahadevappa, M., and Tsyganskaya, M. (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2, 143-147.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34, 11929-11947.
- Zhang R, Gascon R, Miller RG, Gelinas DF, Mass J, Hadlock K, Jin X, Reis J, Narvaez A, McGrath MS (2005). Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J. Neuroimmunol* 159: 215-224.
- Zhang R, Miller RG, Gascon R, Champion S, Katz J, Lancero M, Narvaez A, Honrada R, Ruvalcaba D, McGrath MS (2009). Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol* 206: 121-124.
- Zhang R, Miller RG, Madison C, Jin X, Honrada R, Harris W, Katz J, Forshew DA, McGrath MS (2013). Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 256:38-42.

【 0 1 3 5 】

[関連出願]

本出願では、2017年11月15日出願の米国特許仮出願第62 / 586 , 567号の優先権を主張する。 40

【 図 1 】



【 図 2 - 1 】

FIG. 1

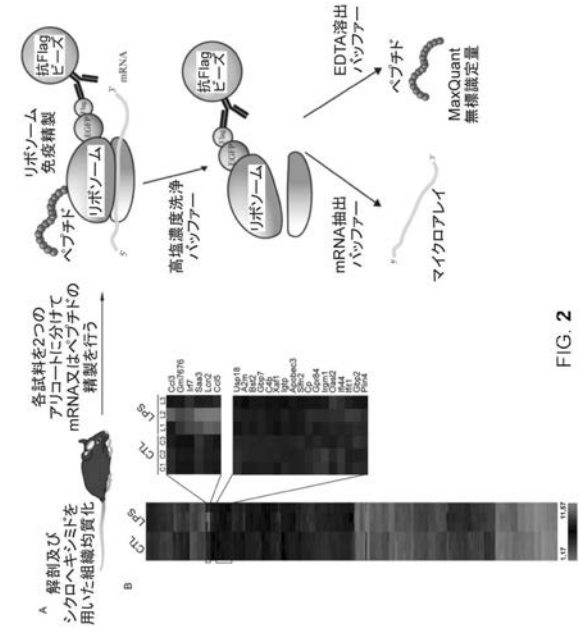


FIG. 2

【 図 2 - 2 】

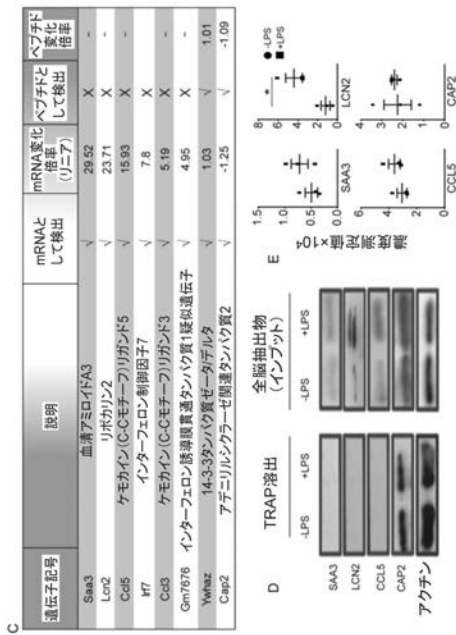


FIG. 2 (cont'd)

【 図 3 - 1 】

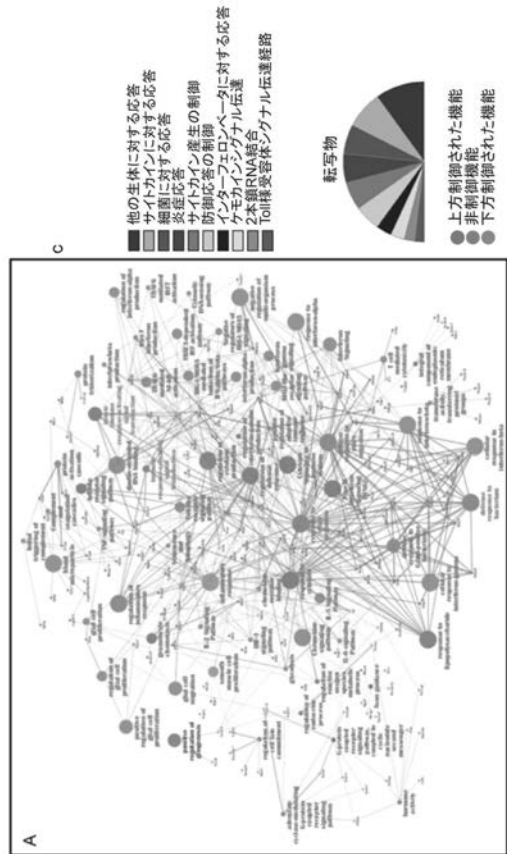


FIG. 3

【 図 5 - 1 】

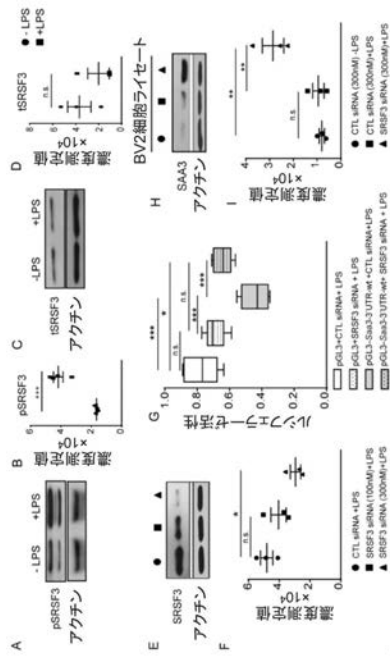


FIG. 5

【 図 5 - 2 】

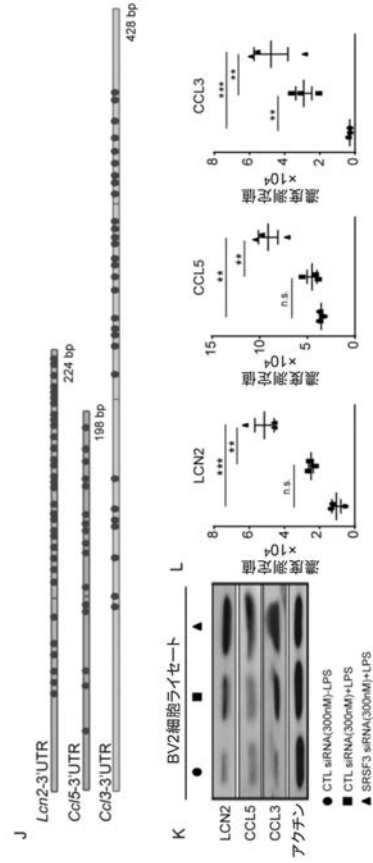


FIG. 5 (cont'd)

【 図 6 - 1 】

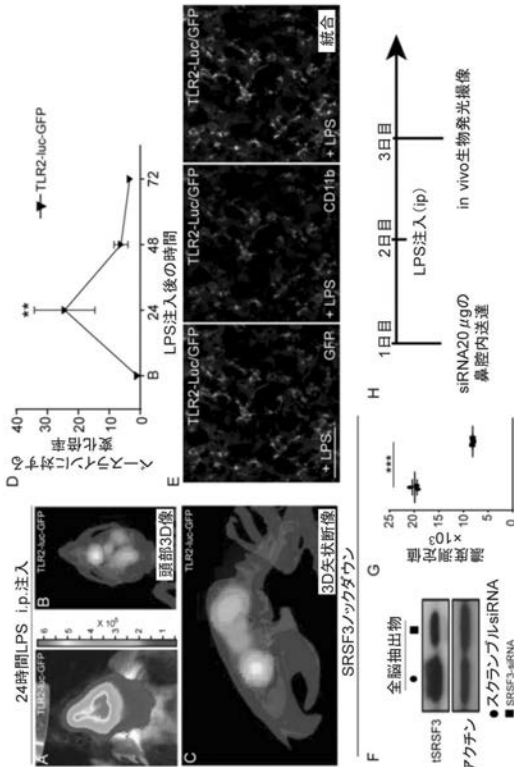


FIG. 6

【 図 6 - 2 】

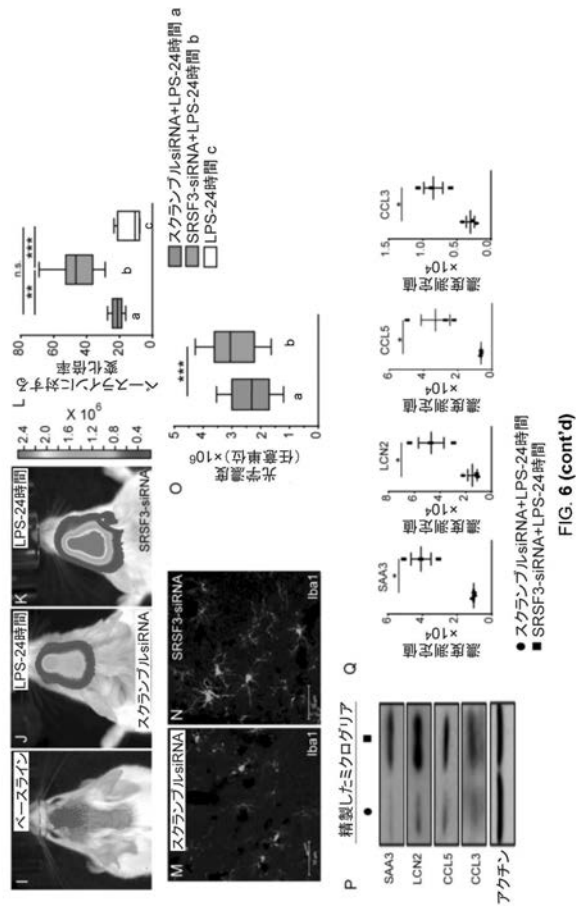


FIG. 6 (cont'd)

【 図 7 - 1 】

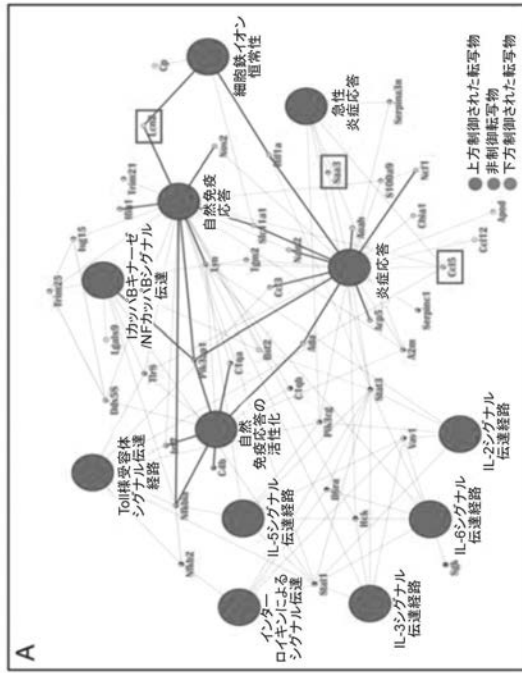


FIG. 7

【 図 7 - 2 】

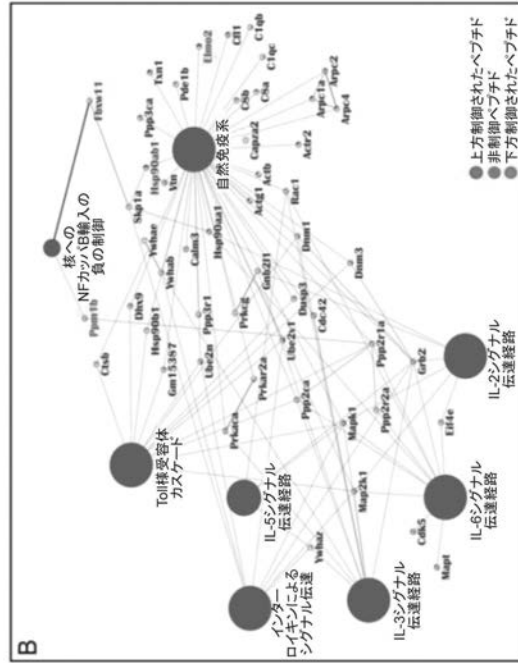


FIG. 7 (cont'd)

【 図 8 】

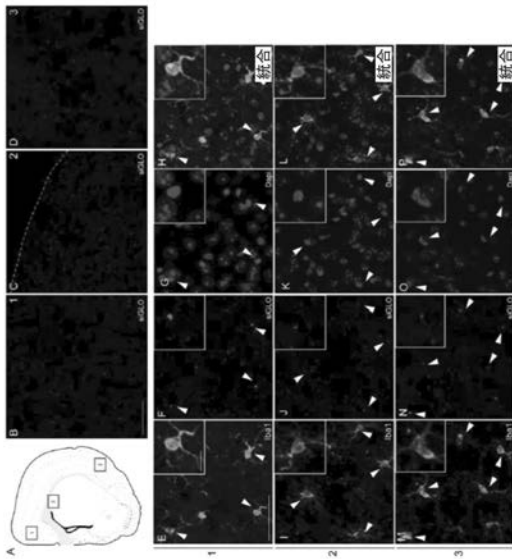


FIG. 8

【 図 9 】

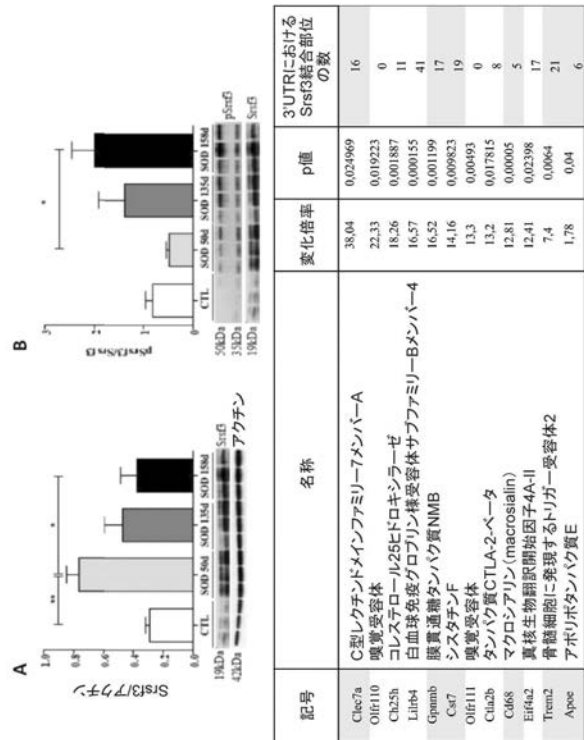


FIG. 9

【 図 1 0 】

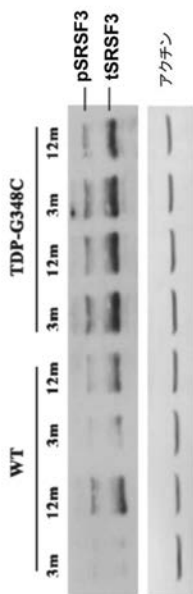


FIG.10

【 図 1 1 】

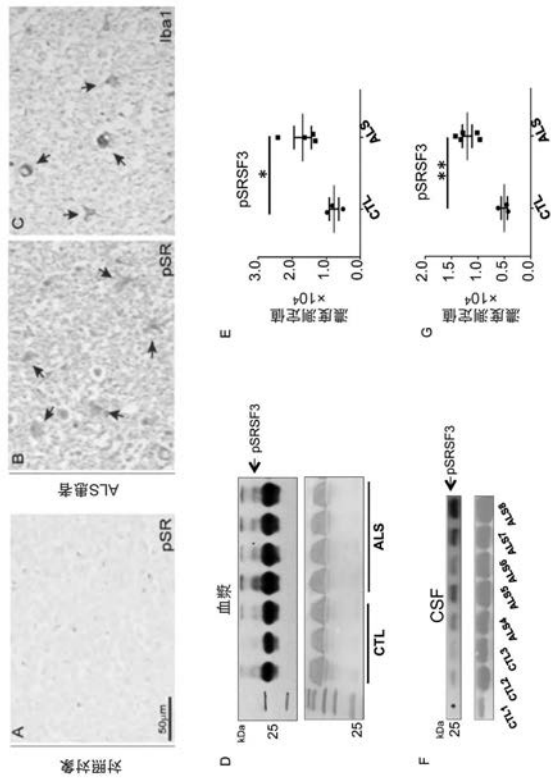
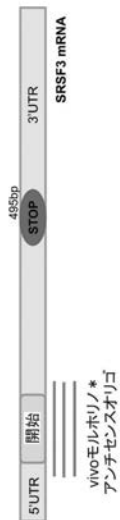


FIG.11

【 図 1 2 】



- 5'UTRを標的とする25核酸塩基の単鎖
- 相補RNAIに結合する
- RNAse H非依存的遮断機構を介して作用する
- 標的タンパク質 (SRSF3)の翻訳開始をサイトソルにおいて遮断する
- SRSF3のノックダウンを誘導する

*オクタグアニンデンドリマーで構成される、共有結合したユニークな送達部分を有するモルホノオリゴ

FIG.12

【 図 1 3 】

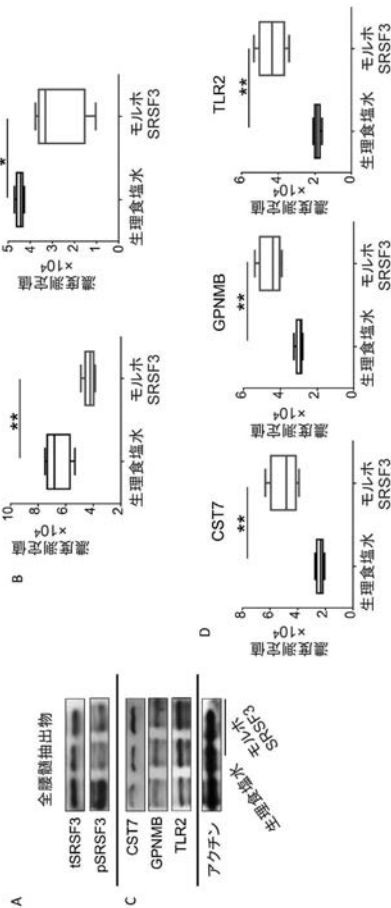


FIG.13

【 図 1 4 】

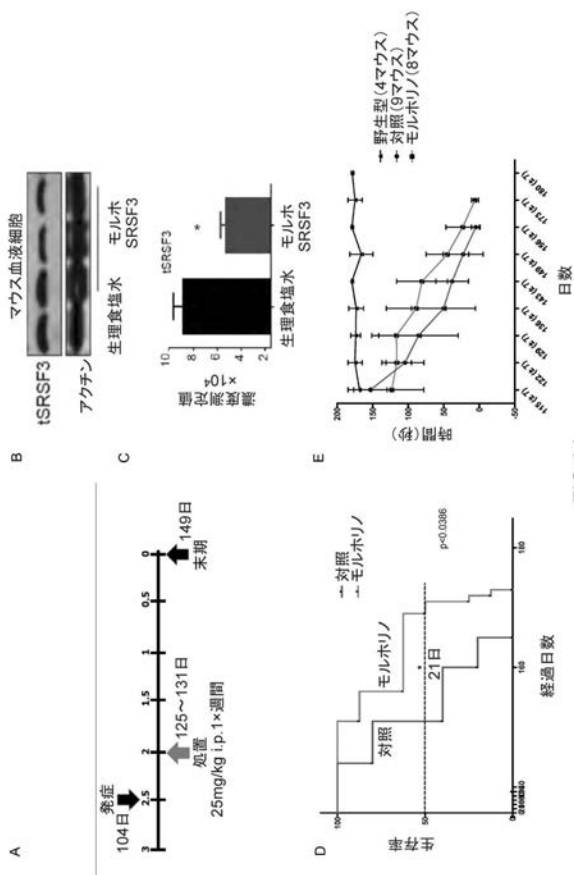


FIG.14

【 図 1 6 】

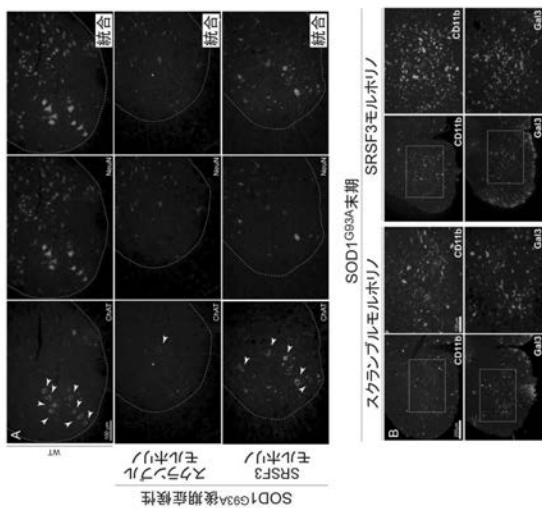


FIG.16

【 図 1 5 】

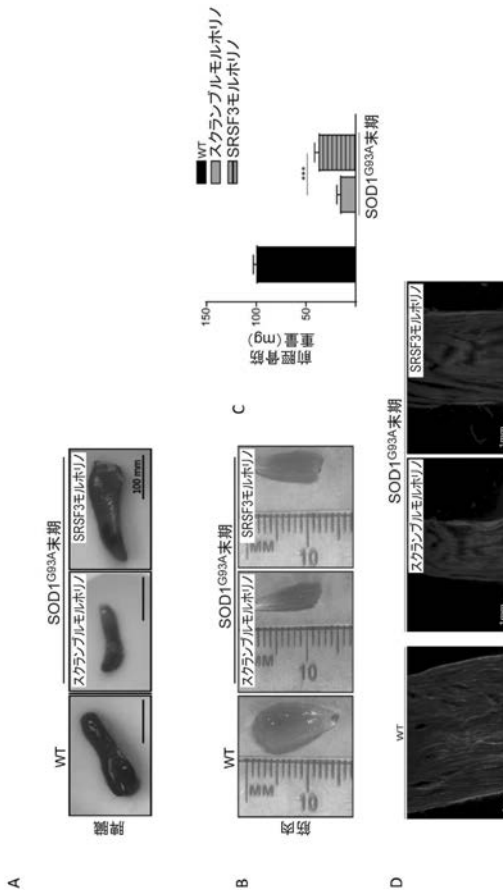


FIG.15

【 図 1 7 】

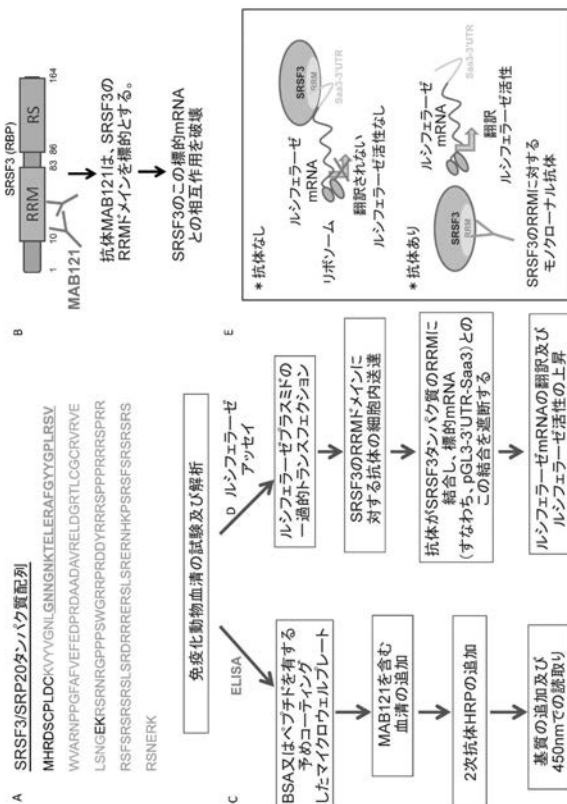


FIG.17

【 図 1 8 】



FIG.18

【 図 1 8 】

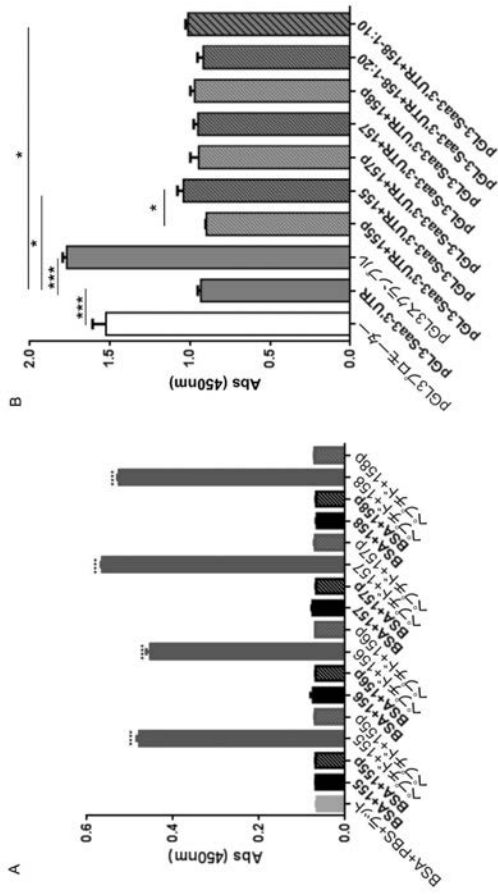


FIG.18

【 図 1 9 】

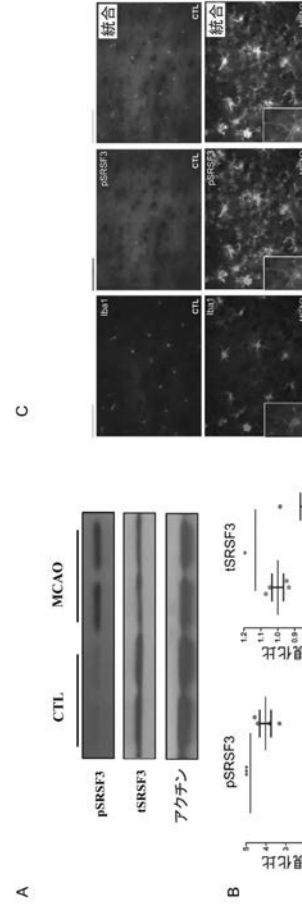


FIG.19

【 図 2 0 】

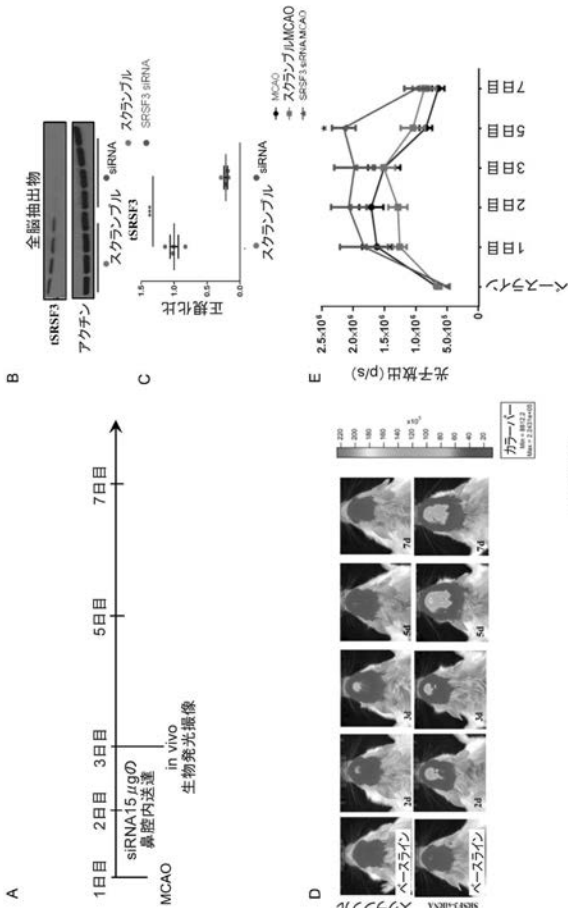


FIG.20

【 図 2 1 】

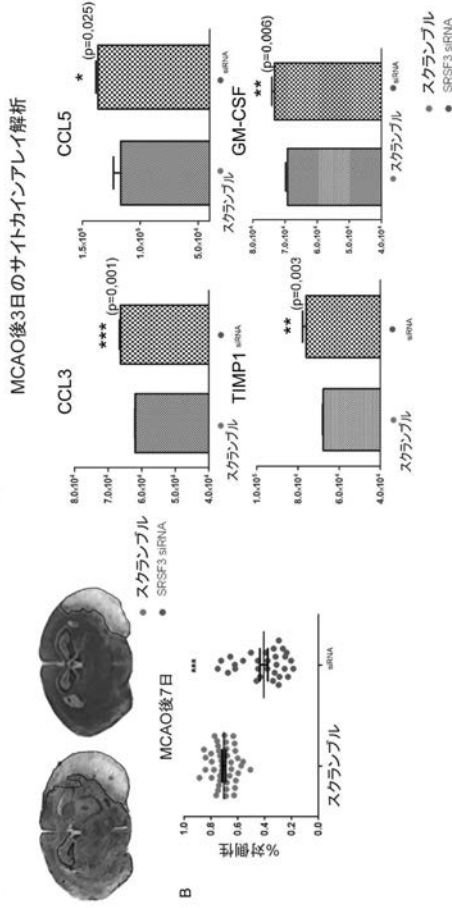


FIG.21

【 図 2 2 】

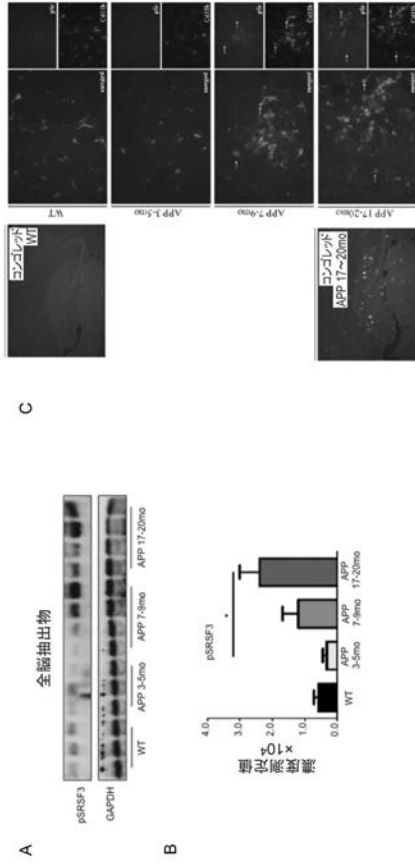


FIG.22

【 図 2 3 】

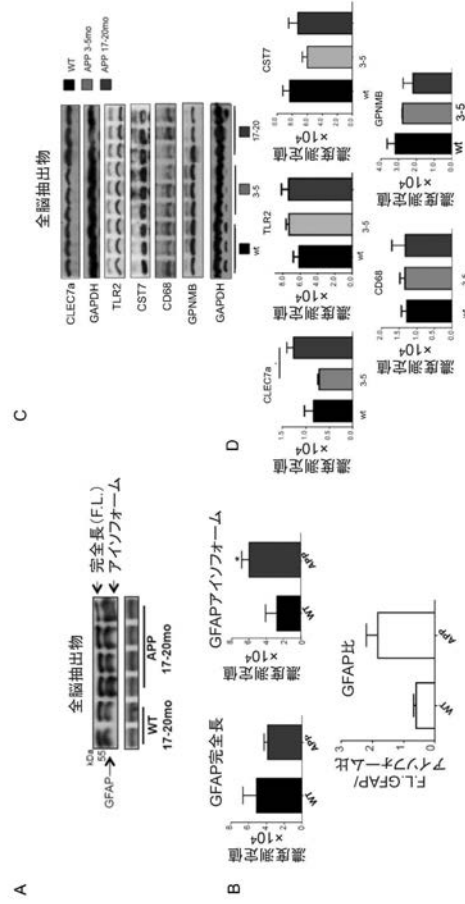


FIG.23

【 図 2 4 】

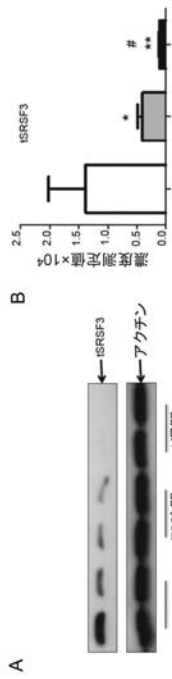


FIG.24

【 図 2 5 】

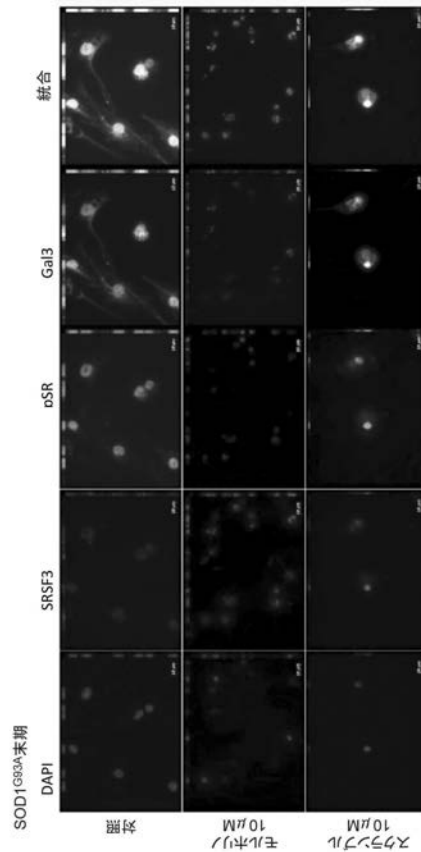


FIG. 25

【配列表】

2021502977000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2018/051452									
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 31/7125</i> (2006.01), <i>A61K 31/7088</i> (2006.01), <i>A61K 31/713</i> (2006.01), <i>A61K 38/17</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 21/00</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Keyword searching across entire IPC</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) FAMPAT; Biosis; CAlplus; Medline; Canadian Patent Database; GenomeQuest (GQ-Pat, Geneseq of SEQ ID NO:17, 19 fragments of 10-30 nucleotides at >90% identity); Keywords: SFRS3, SRp20, SRSF3, innate immunity, treat(-ed, -ment), prevent(-ion), diagnos(-is, -tic), neurology(-ic, -ical), cancer, tumo(u)r, viral, infect(-ed, -ion), ALS, Amyotrophic, Alzheimer('s), brain</p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Category*</th> <th style="text-align: center;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: center;"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X A</td> <td>WO2012/045067 A2 (RUBIN, D. et al) 5 April 2012 (05-04-2012) - the entire document</td> <td style="text-align: center;">12-16, 24-26, 30, 37-41, 43, 44 1-11, 17-23, 27-29, 31-36, 42</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X A</td> <td>HUANG, Y. and STEITZ, J. A., "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA". Molecular Cell, April 2001 (04-2001), Vol. 7(4), pp. 899-905, ISSN 1097-2765 - the entire document</td> <td style="text-align: center;">37 1-36, 38-44</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		X A	WO2012/045067 A2 (RUBIN, D. et al) 5 April 2012 (05-04-2012) - the entire document	12-16, 24-26, 30, 37-41, 43, 44 1-11, 17-23, 27-29, 31-36, 42	X A	HUANG, Y. and STEITZ, J. A., "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA". Molecular Cell, April 2001 (04-2001), Vol. 7(4), pp. 899-905, ISSN 1097-2765 - the entire document	37 1-36, 38-44
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages										
X A	WO2012/045067 A2 (RUBIN, D. et al) 5 April 2012 (05-04-2012) - the entire document	12-16, 24-26, 30, 37-41, 43, 44 1-11, 17-23, 27-29, 31-36, 42									
X A	HUANG, Y. and STEITZ, J. A., "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA". Molecular Cell, April 2001 (04-2001), Vol. 7(4), pp. 899-905, ISSN 1097-2765 - the entire document	37 1-36, 38-44									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.											
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>										
Date of the actual completion of the international search 18 February 2019 (18-02-2019)		Date of mailing of the international search report 26 February 2019 (26-02-2019)									
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Michael W. De Vouge (819) 639-7794									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2018/051452

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US2007/0015172 A1 (ZHANG, H. et al) 18 January 2007 (18-01-2007) - the entire document, particularly Table 3	38-41, 43, 44 1-37, 42
X A	US2015/0233942 A1 (WONG, H. R.) 20 August 2015 (20-08-2015) - the entire document, particularly Table 2	38-41, 43, 44 1-37, 42
X A	US2015/0218640 A1 (BRANDON, R. B. and McHUGH, L.C.) 6 August 2015 (06-08-2015) - the entire document, particularly paragraph 0140	38-41, 43, 44 1-37, 42
P, X P, A	BOUJEL, H. et al, "Diverging mRNA and Protein Networks in Activated Microglia Reveal SRSF3 Suppresses Translation of Highly Upregulated Innate Immune Transcripts". Cell Reports, 12 December 2017 (12-12-2017), Vol. 21(11), pp. 3220-3233, ISSN 2211-1247 [online] [retrieved on 6 February 2019 (06-02-2019)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.058 > - the entire document, cited in the description	1-11, 24-30 12-23, 31-44
A	WONG, R. W. et al, "Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing". PLoS Pathogens, March 2013 (03-2013), Vol. 9(3), pp. e1003241, ISSN 1553-7374 [online] [retrieved on 18 February 2019 (18-02-2019)]. Retrieved from the Internet: < https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003241 >	
A	WONG, J. et AL, "Srp20 regulates TrkB pre-mRNA splicing to generate TrkB-Shc transcripts with implications for Alzheimer's disease". Journal of Neurochemistry, October 2012 (10-2012), Vol. 123(1), pp. 159-171, ISSN 1471-4159 [online] [retrieved on 18 February 2019 (18-02-2019)]. Retrieved from the Internet: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2012.07873.x >	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2018/051452

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2012045067A2	05 April 2012 (05-04-2012)	WO2012045067A3 CN102598592A CN105430059A EP2499787A2 EP2499787A4 EP2499787B1 JP2013511207A JP5711754B2 US2011113142A1 US8650326B2 US2014220690A1 WO2011059770A2 WO2011059770A3	22 November 2012 (22-11-2012) 18 July 2012 (18-07-2012) 23 March 2016 (23-03-2016) 19 September 2012 (19-09-2012) 03 June 2015 (03-06-2015) 13 September 2017 (13-09-2017) 28 March 2013 (28-03-2013) 07 May 2015 (07-05-2015) 12 May 2011 (12-05-2011) 11 February 2014 (11-02-2014) 07 August 2014 (07-08-2014) 19 May 2011 (19-05-2011) 20 October 2011 (20-10-2011)
US2007015172A1	18 January 2007 (18-01-2007)	None	
US2015233942A1	20 August 2015 (20-08-2015)	US10078086B2 CA2882643A1 EP2893354A2 EP2893354A4 EP2893354B1 WO2014036518A2	18 September 2018 (18-09-2018) 06 March 2014 (06-03-2014) 15 July 2015 (15-07-2015) 25 May 2016 (25-05-2016) 10 October 2018 (10-10-2018) 06 March 2014 (06-03-2014)
US2015218640A1	06 August 2015 (06-08-2015)	AU2015213486A1 AU2015213486A9 CA2930925A1 CN105981026A EP3103046A1 EP3103046A4 JP2017512304A US2015259746A1 US2017191129A1 WO2015117204A1 WO2015117204A9	02 June 2016 (02-06-2016) 07 July 2016 (07-07-2016) 13 August 2015 (13-08-2015) 28 September 2016 (28-09-2016) 14 December 2016 (14-12-2016) 23 August 2017 (23-08-2017) 18 May 2017 (18-05-2017) 17 September 2015 (17-09-2015) 06 July 2017 (06-07-2017) 13 August 2015 (13-08-2015) 23 June 2016 (23-06-2016)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2018/051452

A61P 25/28 (2006.01), *A61P 37/02* (2006.01), *C07K 16/18* (2006.01), *C07K 16/46* (2006.01),
C12N 15/113 (2010.01), *C12Q 1/68* (2018.01), *C12Q 1/6809* (2018.01), *G01N 33/48* (2006.01)

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 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	G
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
C 1 2 N 5/0786 (2010.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 5/0786	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/0793	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
	C 0 7 K 16/46	
	C 1 2 Q 1/68	

(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

(72)発明者 クリッツ, ジャスナ
カナダ, ケベック州 ジー1ジェイ 2ジー3, ケベック, ローカル エフ3400, シュマン ドゥ ラ カナルティエール, 2601

(72)発明者 ボウテジ, ヘジェル
カナダ, ケベック州 ジー1ジェイ 2ジー3, ケベック, ローカル エフ3400, シュマン ドゥ ラ カナルティエール, 2601

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA25 AA26 AA28 AA29 AA40 BA13 BA14 BB03
BB20 BB22 BB24 CA11 CA20 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03
CB17 CB21 DA14 DA35 DA36 FA16 FA19 FA34 FB02 FB03
FB12 FB13 FB15 GB01 GB02 GC15 JA01
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ52 QR32 QR35
4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AC20 BD35 BD39 CA23 CA24 CA46
4C084 AA13 AA17 NA14 ZA021 ZA151 ZA161 ZA221 ZA361 ZA941 ZB071

	ZB211	ZB261	ZB331	ZB351	ZC411	ZC551					
4C085	AA13	BB41	BB42	BB43	EE01						
4C086	AA01	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA15	ZA16	ZA22	ZA36	
	ZA94	ZB07	ZB21	ZB26	ZB33	ZB35	ZC41	ZC55			
4H045	AA30	BA10	CA40	DA75	DA76	EA50					