

(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2015-529685

(P2015-529685A)

(43) 公表日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(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	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-532145 (P2015-532145)	(71) 出願人	515072554
(86) (22) 出願日	平成25年9月17日 (2013. 9. 17)		ザ・リサーチ・インスティテュート・アット・ネーションワイド・チルドレンズ・ホスピタル
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月13日 (2015. 5. 13)		THE RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/060153		アメリカ合衆国43205オハイオ州コロンバス、チルドレンズ・ドライブ700番
(87) 国際公開番号	W02014/043696	(74) 代理人	100101454
(87) 国際公開日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)		弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	61/702, 030	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成24年9月17日 (2012. 9. 17)		弁理士 青山 稔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症の処置のための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、筋萎縮性側索硬化症の処置のための医薬組成物、キット、方法、および使用に関する。特に、本発明は、患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒の発現を低減すること、または患者の運動ニューロンにおけるMHCクラスIの発現を増加させることによる、筋萎縮性側索硬化症の処置のための医薬組成物、キット、方法、および使用に関する。

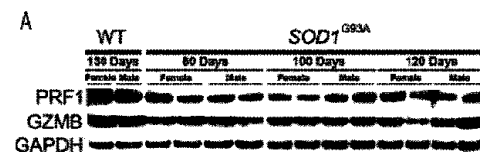


FIG. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒の発現を低減させることにより、筋萎縮性側索硬化症の患者を処置するための方法であって、患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒の発現を低減させる化合物の有効量を含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

細胞質内毒性顆粒がパーフォリンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

パーフォリンがパーフォリン 1 である、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

細胞質内毒性顆粒がグランザイムである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

グランザイムがグランザイム B である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

細胞質内毒性顆粒の減少した発現が、結果として、化合物の投与後の運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮の抑制、および神経突起長の伸張からなる群より選択される患者の運動ニューロンへの効果をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

化合物が核酸である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

核酸が配列番号 1 の配列を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

核酸が配列番号 2 の配列を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

患者の運動ニューロンにおいて発現される MHC クラス I を増加させることによる筋萎縮性側索硬化症の処置のための方法であって、該患者の運動ニューロンにおける MHC クラス I の発現を増加する化合物の有効量を含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。

30

【請求項 12】

MHC クラス I の増加した発現が、結果として、化合物の投与後の運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮の抑制、および神経突起長の伸張からなる群より選択される患者の運動ニューロンへの効果をもたらす、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

化合物が核酸である、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 15】

核酸が、細菌ベクターまたはウイルスベクターを介して患者に送達される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

ベクターがウイルスベクターである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ベクターが、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターからなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

50

核酸が配列番号 3 の配列を有する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

核酸が組織適合遺伝子複合体 H 2 K をコードしている、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

筋萎縮性側索硬化症が散発性筋萎縮性側索硬化症である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年9月17日に出願された米国仮特許出願第61/702,030号に基づいて、米国特許法第119条(e)に規定される優先権の利益を主張し、その開示は、引用により明示的に本明細書に包含される。

【0 0 0 2】

政府の権利

本発明は、米国国立衛生研究所(NIH)から、助成金番号NRSAF31NS058224号、同ROI NS644912-1A1号および同RC2 NS69476-01号により助成を受けて行った。米国政府は、本発明に一定の権利を保有する。

【0 0 0 3】

技術分野

本発明は、筋萎縮性側索硬化症の処置のための組成物、キット、方法および使用に関する。特に、本発明は、患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒(cytoplasmic toxic granule)の発現を低減させること、または患者の運動ニューロン(MN)におけるMH CクラスIの発現を増加させることによる、筋萎縮性側索硬化症の処置のための組成物、キット、方法および使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

背景および概要

筋萎縮性側索硬化症は、俗に、ルー・ゲーリッグ病と言われ、運動皮質、脳幹および脊髄における運動ニューロンの選択的な早期の変性および細胞死により特徴付けられる。運動ニューロンの喪失は、呼吸器不全から最終的に死に至る進行性の筋肉の麻痺の原因となる。全ての筋萎縮性側索硬化症のおよそ90%は、家族性疾患ではない散発性筋萎縮性側索硬化症であり、残り約10%は、家族性筋萎縮性側索硬化症である。危険因子および潜在的な感受性遺伝子を同定するための多大な努力にも関わらず、散発性筋萎縮性側索硬化症の病因は、ほとんど未知のままである。

【0 0 0 5】

家族性筋萎縮性側索硬化症の約20%の原因である、ヒトのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)の優性突然変異を有する多数のげっ歯動物モデルが、筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロン毒性のモデルとして有用となっている。これらのモデルは、運動ニューロンのみではなく、ミクログリアおよびアストロサイトを含む非神経細胞もまた、疾患の発症および進行に重要な役割を果たすことが証明されている。近年の研究は、未知の細胞毒性機構により筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロン死のメディエーターとして、アストロサイトを同定している。筋萎縮性側索硬化症のアストロサイトによる毒性機能の獲得に関する考察が、筋萎縮性側索硬化症の治療法の開発成功に関係している。

【発明の概要】

【0 0 0 6】

すなわち、本発明者らは、筋萎縮性側索硬化症のアストロサイトによるこの毒性機能の獲得機序を発見し、この知見を筋萎縮性側索硬化症の治療法の開発に用いた。本明細書に記載の医薬組成物、方法および使用、ならびにキットは、散発性または家族性筋萎縮性側索硬化症の処置に使用することができる。

【0 0 0 7】

本発明のいくつかの態様は、以下に列挙される項目に記載される。

1. 患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒(toxic granule)の発現を低減させることにより、筋萎縮性側索硬化症を有する患者を処置するための方法であって、患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒の発現を低減させる化合物の有効量を含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。

2. 細胞質内毒性顆粒がパーフォリンである、項目1に記載の方法。

3. パーフォリンがパーフォリン1である、項目2に記載の方法。

4. 細胞質内毒性顆粒がグランザイムである、項目1に記載の方法。

5. グランザイムがグランザイムBである、項目4に記載の方法。

【0008】

6. 細胞質内毒性顆粒の減少した発現が、化合物の投与後に、運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮の抑制、および神経突起長の伸張からなる群より選択される、患者の運動ニューロンへの作用効果をもたらす、項目1から5もいずれかに記載の方法。

7. 化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目1から6のいずれかに記載の方法。

8. 化合物が核酸である、項目7に記載の方法。

9. 核酸がRNA干渉により機能するか、またはアンチセンスRNA分子である、項目8に記載の方法。

10. 核酸が、siRNA、miRNA、およびshRNAから成る群より選択される、項目8に記載の方法。

11. 核酸がshRNAである、項目10に記載の方法。

【0009】

12. 核酸が、細菌ベクターまたはウイルスベクターを介して患者に送達される、項目8に記載の方法。

13. 核酸が配列番号1の配列を有する、項目8に記載の方法。

14. 核酸が配列番号2の配列を有する、項目8に記載の方法。

15. 筋萎縮性側索硬化症が、散発性筋萎縮性側索硬化症である、項目1から14のいずれかに記載の方法。

16. 筋萎縮性側索硬化症が、家族性筋萎縮性側索硬化症である、項目1から14のいずれかに記載の方法。

17. 化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約1mgの範囲である、項目1から16のいずれかに記載の方法。

【0010】

18. 化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約500ngの範囲である、項目1から17のいずれかに記載の方法。

19. 化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約100ngの範囲である、項目1から17のいずれかに記載の方法。

20. 組成物が、担体、添加剤、もしくは希釈剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目1から19のいずれかに記載の方法。

21. 組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目20に記載の方法。

22. 液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目21に記載の方法。

23. 組成物が、単回用量または複数回用量レジメンで投与される、項目1から22のいずれかに記載の方法。

【0011】

24. 患者の運動ニューロンにおいて発現されるMHCクラスIを増加させることによる筋萎縮性側索硬化症の処置のための方法であって、該患者の運動ニューロンにおけるMHCクラスIの発現を増加する化合物の有効量を含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。

10

20

30

40

50

25. MHCクラスIの増加した発現が、化合物の投与後の運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮の抑制、および神経突起長の伸張からなる群より選択される患者の運動ニューロンへの作用効果をもたらす、項目24に記載の方法。

26. 化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目24または25に記載の方法。

27. 化合物が核酸である、項目26に記載の方法。

28. 核酸が、細菌ベクターまたはウイルスベクターを介して患者に送達される、項目27に記載の方法。

29. ベクターがウイルスベクターである、項目28に記載の方法。

30. ベクターが、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターからなる群より選択される、項目29に記載の方法。 10

【0012】

31. 核酸が配列番号3の配列を有する、項目30に記載の方法。

32. 核酸が組織適合遺伝子複合体H2Kをコードしている、項目31に記載の方法。

33. 筋萎縮性側索硬化症が散発性筋萎縮性側索硬化症である、項目24から32のいずれかに記載の方法。

34. 筋萎縮性側索硬化症が家族性筋萎縮性側索硬化症である、項目24から32のいずれかに記載の方法。

35. 化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約1mgの範囲である、項目24から34のいずれかに記載の方法。 20

36. 化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約500ngの範囲である、項目24から35のいずれかに記載の方法。

37. 化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約100ngの範囲である、項目24から36のいずれかに記載の方法。

38. 組成物が、担体、添加剤、もしくは希釈剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目24から37のいずれかに記載の方法。

39. 組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目38に記載の方法。

【0013】

40. 液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目39に記載の方法。 30

41. 組成物が、単回用量または複数回用量レジメンで投与される、項目24から40のいずれかに記載の方法。

42. 筋萎縮性側索硬化症を有する患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒(toxic granule)の発現を低減させるのに有効な、化合物の投与量形態を含む、医薬組成物。

43. 化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目42に記載の組成物。

44. 化合物が核酸である、項目43に記載の組成物。

45. 核酸が、siRNA、miRNA、およびshRNAから成る群より選択される、項目44に記載の組成物。 40

46. 化合物がアンチセンスRNA分子である、項目44に記載の組成物。

47. 核酸がshRNAである、項目45に記載の組成物。

48. 核酸が配列番号1の配列を有する、項目44に記載の組成物。

49. 核酸が配列番号2の配列を有する、項目44に記載の組成物。

50. 組成物が、1つまたはそれ以上の担体、添加剤、もしくは希釈剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目42から49のいずれかに記載の組成物。

【0014】

51. 組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目50に記載の組成物。

52. 液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミ 50

ド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 5 1 に記載の組成物。

5 3 . 化合物の純度が、重量 % に基づき少なくとも 9 8 % である、項目 4 2 から 5 2 のいずれかに記載の組成物。

5 4 . 組成物が、アンプルまたは密封バイアル中に存在する、項目 4 2 から 5 3 のいずれかに記載の組成物。

5 5 . 再構成可能な凍結乾燥形態である、項目 4 2 から 5 0 および 5 3 から 5 4 のいずれかに記載の組成物。

5 6 . 筋萎縮性側索硬化症を有する患者の運動ニューロンにおける M H C クラス I の発現を増加させるのに有効な、化合物の投与量形態を含む、医薬組成物。

5 7 . 化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目 5 6 に記載の組成物。

10

5 8 . 化合物が核酸である、項目 5 6 に記載の組成物。

【 0 0 1 5 】

5 9 . 核酸が配列番号 3 の配列を有する、項目 5 8 に記載の組成物。

6 0 . 組成物が、1 つまたはそれ以上の担体、希釈剤、もしくは添加剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目 5 6 から 5 9 のいずれかに記載の組成物。

6 1 . 組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目 6 0 に記載の組成物。

6 2 . 液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 6 1 に記載の組成物。

20

6 3 . 化合物の純度が、重量 % に基づき少なくとも 9 8 % である、項目 5 6 から 6 2 のいずれかに記載の組成物。

6 4 . 組成物がアンプルまたは密封バイアル中に存在する、項目 5 6 から 6 3 のいずれかに記載の組成物。

6 5 . 再構成可能な凍結乾燥形態である、項目 5 6 から 6 0 および 6 3 から 6 4 のいずれかに記載の組成物。

6 6 . 組成物が、吸入投与量形態、経口投与量形態、および非経腸投与量形態からなる群より選択される投与量形態である、項目 1 から 6 5 のいずれかに記載の方法または医薬組成物。

6 7 . 非経腸投与量形態が、皮内投与量形態、皮下投与量形態、筋肉内投与量形態、腹腔内投与量形態、静脈内投与量形態、および髄腔内投与量形態からなる群より選択される、項目 6 6 に記載の方法または医薬組成物。

30

6 8 . 凍結乾燥形態である、項目 5 5 または 6 5 に記載の組成物。

6 9 . 固体形態である、項目 4 2 から 5 0 、 5 3 から 6 0 および 6 3 から 6 5 のいずれかに記載の組成物。

【 0 0 1 6 】

7 0 . 滅菌バイアル、項目 5 6 から 6 9 のいずれかに記載の組成物、および筋萎縮性側索硬化症を有する患者の処置のための組成物の使用を説明する指示書を含む、キット。

7 1 . 化合物または組成物が、再構成可能な凍結乾燥形態である、項目 7 0 に記載のキット。

40

7 2 . 化合物の用量が、患者の体重 1 k g 当たり、1 から 5 μ g の範囲である、項目 7 0 または 7 1 に記載のキット。

7 3 . 化合物の純度が、重量 % に基づき少なくとも 9 8 % である、項目 7 0 から 7 2 のいずれかに記載のキット。

7 4 . 化合物または組成物が非経腸投与量形態である、項目 7 0 から 7 3 のいずれかに記載のキット。

7 5 . 非経腸投与量形態が、皮内投与量形態、皮下投与量形態、筋肉内投与量形態、腹腔内投与量形態、静脈内投与量形態、および髄腔内投与量形態からなる群より選択される、項目 7 4 に記載のキット。

7 6 . 組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、項目 7 0 から 7 5 のいずれかに記

50

載のキット。

77. 薬学的に許容される担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される液体担体である、項目76に記載のキット。

【0017】

78. 筋萎縮性側索硬化症の処置のための医薬の製造を目的とする、項目42から69のいずれかに記載の組成物の使用。

79. 筋萎縮性側索硬化症の処置に使用するための、項目42から69のいずれかに記載の医薬組成物。

80. 細胞質中毒性顆粒がSOD1ではない、項目1から23のいずれかに記載の方法。

81. 細胞質中毒性顆粒が、抗酸化性細胞質中毒性顆粒ではない、項目1から23のいずれかに記載の方法。

82. 細胞質中毒性顆粒がSOD1ではない、項目42から55のいずれかに記載の組成物。

83. 細胞質中毒性顆粒が、抗酸化性細胞質中毒性顆粒ではない、項目42から55のいずれかに記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1：(A)ウェスタンブロット分析は、野生型(WT)およびSod1^{G93A}マウスの脊髄におけるパーフォリン(PRFI)およびグランザイムB(GZMB)の発現を示す。(B)PRFIおよびGZMBの両方の発現が、アストロサイトで観察されたが、ミクログリアでは観察されなかった。(C) Sod1^{G93A} アストロサイトを運動ニューロン(MN)と共に培養することにより、PRFIおよびGZMBの共局在が増大した。スケールバーは、5 μmである。(D) Sod1^{G93A} アストロサイトをSod1^{G93A} マウス由来の脊髄細胞と共に培養することにより、PRFIおよびGZMBの共局在が増大した。スケールバーは、200 μmである。(E) ウェスタンブロット分析は、ヒトALS患者および対照患者の死後の神経前駆細胞(NPC)由来のアストロサイトにおけるPRFIおよびGZMBの両方の発現を示す。(F) PRFIおよびGZMBの共局在が、ALS患者の脊髄でのみ検出された。スケールバーは、200 μmを示す。この図において、PRFIを赤色で示し、GZMBを緑色で示し、GFAPを青色で示す。DAPIを核の可視化に用いた。(G) PrfiおよびGzmb RNAの発現が、野生型およびSOD1^{G93A} マウスの両方の脊髄において見出された。(H) 初代およびNPC由来の両方のアストロサイトが、PrfiおよびGzmb RNAを発現するが、ミクログリアはGzmbのみを発現した。(I) 脾臓細胞のPRFIおよびGZMBの免疫染色は、両細胞傷害性タンパク質の強い特異的なシグナルを明らかにした。灰色は、核のDAPI染色を示す。(J) PRFIおよびGZMBの連続染色プロトコルは、(I)と同様のものを用いた。青色は、アストロサイトマーカーであるGFAPを示す。スケールバーは、5 μmを示す。

【図2】図2：(A) PRFIおよびGZMBは、SOD1^{G93A} アストロサイトと共に培養することにより早ければ24時間でMN中に見出される。PRFIおよびGZMBは、SOD1^{G93A} アストロサイトと共に培養したMN中、時間経過と共に徐々に増えるが、野生型アストロサイトと共に培養したMN中には存在しない。PRFIを赤色で示し、GZMBを緑色で示し、Hb9-GFPを青色で示す。p<0.001。スケールバーは5 μmを示す。(B) 図2Aから作成した3次元共焦点画像は、Sod1^{G93A} アストロサイトの表面からMNの細胞質に伸びた多数のパーフォリン穿孔様の構造を示す。PRFIを、赤色で示し、Hb9-GFP⁺を緑色で示し、EAAT2を青色で示す。(C) Sod1^{G93A} マウスにおいて、PRFIおよびGZMBは通常見出される。PRFIを赤色で示し、GZMBを緑色で示し、ChATを青色で示す。スケールバーは、50 μmを示す。(D) Sod1^{G93A} マウスにおいて、PRFIおよびGZMBは、MN中に検出され得る。PRFIを赤色で示し、GZMBを緑色で示し、ChATを青色で示す。(E) リソソーム関連膜タンパク質であるCD107Aの発現により評価される脱顆粒(degranularization)レベルは、Sod1^{G93A} マウスの脊髄における疾患の進行に伴い増加する。CD107Aを赤色で示し、EAAT2を緑色で示し、ChATを青色で示す。(F) リソソーム関連膜タンパク質であるCD107Aの発現により評価される脱

顆粒レベルは、Sod1^{G93A} マウスのMNを取り囲むアストロサイトに見出される。CD107Aを赤色で示し、EAAT2を緑色で示し、ChATを青色で示す。スケールバーは、200 μmである。(G - H) (A)に示される野生型またはSOD1^{G93A} アストロサイトと共に培養したMN中、異なる時間点で見出されるPRFI (G) および GZMB (H)のレベル。(I) SOD1^{G93A} またはA4V 変異タンパク質を過剰発現する非ALS対照アストロサイト (1800) は、MN中にPRFIおよびGZMBを放出するが、PRFIおよびGZMBは、非ALS対照アストロサイトと共に120時間培養したMN中には存在しない。PRFIを赤色で示し、GZMBを緑色で示し、Hb9 - GFPを青色で示す。スケールバーは、5 μmを示す。(J)野生型アストロサイトと共培養したMNにおけるPRFI染色 (赤色) の欠失を示す共焦点顕微鏡から得られた三次元画像を示す。アストロサイト表面マーカーであるEAAT2 (青色)を用いて、アストロサイトの膜を可視化した; Hb9 - GFP (緑色)を用いてMNを可視化した。スケールバーは100 μmを示す。(K) ウェスタンブロット分析は、初代およびNPC由来のSOD1^{G93A} アストロサイトの両方が、野生型アストロサイトと比較して、細胞傷害性タンパク質の脱顆粒の指標である、CD107Aの高レベル発現を明らかにした。(L) アストロサイトと共培養したMNの免疫蛍光染色は、CD107A 発現が、MNを取り囲むSOD1^{G93A} アストロサイトに見出されることを示した。CD107A を赤色で示し、Hb9 - GFPを緑色で示し、EAAT2 を青色で示した。スケールバーは100 μmを示す。

10

【0019】

【図3】図3 : (A) 3,3' - ジアミノベンジジン(DAB)免疫染色によるアッセイの通り、MN中のPRFIおよびGZMBの検出は、ヒトALSの脊髄に見出された。(B) PRFI陽性運動ニューロンの数の定量は、図3Aに示す通りである。スケールバーは、20 μmを示す。(C) GZM陽性運動ニューロンの数の定量は、図3Aに示す通りである。スケールバーは、20 μmを示す。

20

【図4】図4 : (A) Sod1^{G93A} アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、MNとの共培養により回復する。(B) Sod1^{G93A} アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、全HB9 - GFP⁺細胞数を回復させる。(C) Sod1^{G93A} アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、MNの細胞体の萎縮を阻止する。(D) Sod1^{G93A} アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、神経突起の短化を阻止する。(E) FALSおよびSALS アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、MNとの共培養により回復する。(F) FALSおよびSALS アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、全HB9 - GFP⁺細胞数を回復させる。(G - H) FALSおよびSALS アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、MNの細胞体の萎縮を阻止する。(I - J) FALSおよびSALS アストロサイトにおけるPrfiおよびGzmB発現のノックダウンは、神経突起の短化を阻止する。(* = p < 0.05 ; * * = p < 0.01 ; * * * = p < 0.001 ; ns = 有意でない ; Scr = スクランプル)。(K - L) ウェスタンブロット分析は、Prfi shRNA (K) およびGzmb shRNA (L)を用いてレンチウイルスによる形質転換を行ったマウスSOD1^{G93A} アストロサイトにおけるPRFIおよびGZMBの発現の減少を示す。(M) Prfi shRNAおよびGzmb shRNAsは、用いた全てのヒトアストロサイトにおけるPRFIおよびGZMB発現を抑制した。GAPDH をローディングコントロールとして用い、'a' は、スクランブル shRNAで形質転換したアストロサイトを示し、'b' は、Prfi shRNA およびGzmb shRNAで形質転換したアストロサイトを示す。Scr は、スクランブルshRNAを示す。

30

40

【図5】図5 : (A) ナチュラルキラー (NK) 細胞と同様に、Sod1^{G93A} アストロサイトは、CD56およびCD57を発現する。スケールバーは、100 μmを示す。(B) NK細胞と同様に、Sod1^{G93A} アストロサイトは、NK細胞と通常関係のあるマーカーの上方制御を示す。(C)インビトロでのLY49CおよびLY49Iのロバスト発現から明らかなように、Sod1^{G93A} アストロサイトは、MHCクラスI受容体を発現する。LY49C+Iを赤色で示す。GFAPを緑色で示す。スケールバーは、200 μmを示す。(D) Sod1^{G93A} マウスの脊髄における終末期の疾患での、インビボにおけるLY49CおよびLY49Iのロバスト発現から明らかなように、Sod1^{G93A} アストロサイトは、MHCクラスI受容体を発現する。LY49C+Iを赤色で示

50

す。GFAPを緑色で示す。スケールバーは、500 μ m および200 μ m (挿入)を示す。(E) M H C クラス I 受容体であるKIR3DL2が、FALSおよびSALSアストロサイトで発現される。スケールバーは、200 μ mを示す。(F)ヒトM H C クラス I 受容体変異体のRT - PCRによるスクリーニングは、KIR3DL2が、インビトロにおけるFALSおよびSALSアストロサイトで高度に、一般的に発現されることを見出した。スケールバーは、200 μ m および5 μ m (挿入)を示す。(G)ヒトM H C クラス I 受容体変異体のRT - PCRによるスクリーニングは、KIR3DL2が、インビボにおけるFALSおよびSALS アストロサイトで高度に、一般的に発現されることを見出した。(H) Ingenuity 社がモデル化した経路分析の倍数変化を、マウスのナチュラルキラー細胞96 StellerARayを用いて野生型とSOD1^{G93A} アストロサイトで比較観察した。赤色で示す分子は、上方制御された転写産物を示す。緑色で示す分子は、下方制御された転写産物を示す。色合いの異なる陰は、高い(>4)から低い(<3)の異なる変化比を示す。白色の分子は、顕著な変化比を示さなかったもので、他方、黒色の分子は、アレイに含まれず、さらに調査されなかった遺伝子を示す。

【0020】

【図6】図6：(A) M H C クラス I の経時的下方制御は、Sod1^{G93A} アストロサイトとの共培養によるMN中でのH2K 発現の強度から明らかである。スケールバーは、10 μ mを示す。(B) Sod1^{G93A} アストロサイトは、GABA作動性ニューロンにおけるM H C クラス I 下方制御をもたらさない。スケールバーは、5 μ mを示す。(C) Sod1^{G93A}マウスの疾患末期における、MNにおけるM H C クラス I の発現の減少。H2Kを赤色で示す。ChATを緑色で示す。ALSパネルのアスタリスクは、MNを示す。スケールバーは、2mmおよび10 μ m (挿入)を示す。(D) ALS患者の脊髄における、終末期疾患のMNにおける、M H C クラス I の減少した発現。M H C クラス I は、3,3' - ジアミノベンジジン(DAB)染色により可視化される。ALSパネルにおけるアスタリスクは、MNを示す。スケールバーは、20 μ mを示す。(E)ヒト脊髄のMN中のM H C クラス I 発現の定量化を、図6Dに示す。(F - G) MNにおけるM H C クラス I の過剰発現は、HB9 - GFP⁺細胞数から明らかな通り(パネル6G参照)、細胞死(パネル6F参照)を阻止する。スケールバーは、100 μ mを示す。(H) レンチウイルスでの形質転換後のSod1^{G93A} アストロサイトとの共培養により、MN中のM H C クラス I 発現が維持された。H2Kを赤色で示す。Hb9を緑色で示す。(I) M H C クラス I 過剰発現は、MN細胞体の萎縮を阻止する。(J) M H C クラス I の過剰発現は、神経突起を短化する。* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001; ns = 有意ではない。(K) SOD1^{G93A} アストロサイトとの共培養により、表面のM H C クラス I 染色は、Lv - RFPで形質転換したMNでのM H C クラス I の減少した発現を示すが、Lv - H2Kで形質転換したMN上のM H C クラス I の発現は維持された。スケールバーは、20 μ mを示す。

【図7】図7：細胞傷害性リンパ球におけるFas / FasL活性の阻害に有効であることが公知のKp7 - 6濃度は、MNに対してSOD1^{G93A} アストロサイト由来の細胞傷害性を変化させなかった。p<0.001。

【図8】図8：ShRNA - prf / GFPおよび対照マウスの平均生存率を分析した。結果を、時間(日)に対する生存割合で示す。

【図9】図9：ShRNA - prf / GFPおよび対照マウスの後肢握り締め強度を分析した。結果を、月齢(日)に対する力(g)として示す。

【図10】図10：MNを、SOD1アストロサイト馴化培地の存在下で培養したとき、SOD1アストロサイトにおけるPrflおよびGzmb発現のノックダウンは、MNの生存性を増加させ(A - B)(B;全てのグループについて、n=3、各nはトリプリケートで行った)神経突起伸張を阻止し(C)、細胞体サイズ(D)の退縮が一般的に観察された(C、D;全てのグループについて、n=100)。(E - F) SOD1アストロサイト馴化培地の存在下、PRFIおよびGZMBは、MNの細胞体で検出された。(G) MN生存性の用量依存的増加が、SOD1アストロサイト馴化培地に添加したPRFIおよびGZMBを中和する抗体の存在において観察された。抗体添加のないSOD1アストロサイト馴化培地を、統計分析の参照グループとして用いた。点線は、50%度数を示す(C、D)。スケールバーは、200 μ m (A)、5 μ m (E)を示す。エラーバーは、標準誤差(s.e.m)で示す。* * P<0.01、* * * * P<0.0001。n.s、有

10

20

30

40

50

意ではない。Scr、スクランブルshRNA。

【図 1 1】図 1 1 : (A - C) H2 - K1のShRNAノックダウンは、RNA (A)および タンパク質発現 (B - C)により示されるとおり、GABA作動性ニューロンにおけるH2 - K1発現の効率的な下方制御をもたらす。(D) GABA作動性ニューロンにおけるH2 - K1の抑制は、SODI アストロサイトと共培養することによりPRFI および GZMBの発現を増加させる。(E - G) SODI アストロサイトと共に 1 2 0 時間培養後、H2 - K1 shRNAで処理したGABAニューロンは、SODI 仲介性アストロサイト細胞傷害性に増加した感受性を示し、細胞生存性が減少し(E、F)、細胞体サイズおよび神経突起長が減少した (F; 全ての群についてn=3、各nは、トリプリケートで行った)。点線は、5 0 % 頻度を示す (G)。スケールバーは、5 μ m (B、D)、100 μ mを示す(E)。エラーバーは、標準誤差で示す。* * P<0.01、* * * * P<0.0001。Scr、スクランブルshRNA。

10

【 0 0 2 1 】

【図 1 2】図 1 2 : (A) ウェスタンブロット分析は、SODI アストロサイトにおけるPRFI および GZMB shRNAの発現と、同様のレベルのヒト SODIを示した。(B) 炎症性遺伝子アレイは、PRFIおよびGZMBのノックダウンによるSODI アストロサイトの炎症性プロファイルにおける明らかな変化は示さなかった。ヒートマップは、個別に集めたサンプルを用いる 2 つの遺伝子アレイの平均倍数変化を示す。

【図 1 3】図 1 3 : (A) ウイルスベクターによるshRNA送達によってSODI アストロサイトで達成されるヒト SODI発現ノックダウンのレベルを、ELISA (A; 全ての群について、n=2)および ウェスタン分析(B)で示す。(C - H) SODI shRNA 発現により、PRFIおよびGZMBの共局在のレベルは、細胞当たりの個々の顆粒の全数に影響を与えることなく(D、G)、インビトロ (C - E)およびインビボ (F - H)の両方で有意に減少した。白色の矢印は、P R F 1 および G Z M B の共局在する顆粒を示す。スケールバーは、5 μ mを示す。エラーバーは、標準偏差で示す。* * * * P<0.0001。n.s、有意ではない。Scr、スクランブル shRNA。

20

【図 1 4】図 1 4 : (A - B) S O D 1 アストロサイトは、半定量的RT - PCR(A) および定量的RT - PCR (B; 全ての群について、n=2)で示す通り、高レベルのGzmb発現を示すが、Gzmaは低レベルである。Gzmbレベルはまた、野生型アストロサイトと比較してS O D 1 アストロサイトで高かった(A - B)。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

例示的態様の詳細な説明

本発明のいくつかの態様は、以下の列举される項目によって記載され、本明細書の詳細な説明部分に記載される各態様は、以下の各態様に適用される。

1 . 患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒(toxic granule)の発現を低減させることにより、筋萎縮性側索硬化症を有する患者を処置するための方法であって、患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒の発現を低減させる化合物の有効量を含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。

2 . 細胞質内毒性顆粒がパーフォリンである、項目 1 に記載の方法。

3 . パーフォリンがパーフォリン 1 である、項目 2 に記載の方法。

40

4 . 細胞質内毒性顆粒がグランザイムである、項目 1 に記載の方法。

5 . グランザイムがグランザイム B である、項目 4 に記載の方法。

【 0 0 2 3 】

6 . 細胞質内毒性顆粒の減少した発現が、化合物の投与後に、運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮の抑制、および神経突起長の伸張からなる群より選択される、患者の運動ニューロンへの作用効果をもたらす、項目 1 から 5 もいずれかに記載の方法

7 . 化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

8 . 化合物が核酸である、項目 7 に記載の方法。

9 . 核酸がRNA干渉により機能するか、またはアンチセンスRNA分子である、項目 8

50

に記載の方法。

10．核酸が、s i R N A、m i R N A、およびs h R N Aから成る群より選択される、項目8に記載の方法。

11．核酸がs h R N Aである、項目10に記載の方法。

【0024】

12．核酸が、細菌ベクターまたはウイルスベクターを介して患者に送達される、項目8に記載の方法。

13．核酸が配列番号1の配列を有する、項目8に記載の方法。

14．核酸が配列番号2の配列を有する、項目8に記載の方法。

15．筋萎縮性側索硬化症が、散発性筋萎縮性側索硬化症である、項目1から14のいずれかに記載の方法。 10

16．筋萎縮性側索硬化症が、家族性筋萎縮性側索硬化症である、項目1から14のいずれかに記載の方法。

17．化合物の量が、患者の体重1 k g当たり、約1 n gから約1 m gの範囲である、項目1から16のいずれかに記載の方法。

【0025】

18．化合物の量が、患者の体重1 k g当たり、約1 n gから約500 n gの範囲である、項目1から17のいずれかに記載の方法。

19．化合物の量が、患者の体重1 k g当たり、約1 n gから約100 n gの範囲である、項目1から17のいずれかに記載の方法。 20

20．組成物が、担体、添加剤、もしくは希釈剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目1から19のいずれかに記載の方法。

21．組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目20に記載の方法。

22．液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目21に記載の方法。

23．組成物が、単回用量または複数回用量レジメンで投与される、項目1から22のいずれかに記載の方法。

【0026】

24．患者の運動ニューロンにて発現されるM H CクラスIを増大させることによる筋萎縮性側索硬化症の処置のための方法であって、該患者の運動ニューロンにおけるM H CクラスIの発現を増加する化合物の有効量を含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。 30

25．M H CクラスIの増加した発現が、化合物の投与後に、運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮の抑制、および神経突起長の伸張からなる群より選択される患者の運動ニューロンへの作用効果をもたらす、項目24に記載の方法。

26．化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目24または25に記載の方法。

27．化合物が核酸である、項目26に記載の方法。

28．核酸が、細菌ベクターまたはウイルスベクターを介して患者に送達される、項目27に記載の方法。 40

29．ベクターがウイルスベクターである、項目28に記載の方法。

30．ベクターが、レンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルス(A A V)ベクターからなる群より選択される、項目29に記載の方法。

【0027】

31．核酸が配列番号3の配列を有する、項目30に記載の方法。

32．核酸が組織適合遺伝子複合体H 2 Kをコードしている、項目31に記載の方法。

33．筋萎縮性側索硬化症が散発性筋萎縮性側索硬化症である、項目24から32のいずれかに記載の方法。

34．筋萎縮性側索硬化症が家族性筋萎縮性側索硬化症である、項目24から32のいずれ 50

れかに記載の方法。

35．化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約1mgの範囲である、項目24から34のいずれかに記載の方法。

36．化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約500ngの範囲である、項目24から35のいずれかに記載の方法。

37．化合物の量が、患者の体重1kg当たり、約1ngから約100ngの範囲である、項目24から36のいずれかに記載の方法。

38．組成物が、担体、添加剤、もしくは希釈剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目24から37のいずれかに記載の方法。

39．組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目38に記載の方法。

【0028】

40．液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目39に記載の方法。

41．組成物が、単回用量または複数回用量レジメンで投与される、項目24から40のいずれかに記載の方法。

42．筋萎縮性側索硬化症を有する患者のアストロサイトにおける細胞質内毒性顆粒(toxic granule)の発現を低減させるのに有効な、化合物の投与量形態を含む、医薬組成物。

43．化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目42に記載の組成物。

44．化合物が核酸である、項目43に記載の組成物。

45．核酸が、siRNA、miRNA、およびshRNAから成る群より選択される、項目44に記載の組成物。

46．化合物がアンチセンスRNA分子である、項目44に記載の組成物。

47．核酸がshRNAである、項目45に記載の組成物。

48．核酸が配列番号1の配列を有する、項目44に記載の組成物。

49．核酸が配列番号2の配列を有する、項目44に記載の組成物。

50．組成物が、1つまたはそれ以上の担体、添加剤、もしくは希釈剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目42から49のいずれかに記載の組成物。

【0029】

51．組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目50に記載の組成物。

52．液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目51に記載の組成物。

53．化合物の純度が、重量%に基づき少なくとも98%である、項目42から52のいずれかに記載の組成物。

54．組成物が、アンプルまたは密封バイアル中に存在する、項目42から53のいずれかに記載の組成物。

55．再構成可能な凍結乾燥形態である、項目42から50および53から54のいずれかに記載の組成物。

56．筋萎縮性側索硬化症を有する患者の運動ニューロンにおけるMHCKラスIの発現を増加させるのに有効な、化合物の投与量形態を含む、医薬組成物。

57．化合物が、薬物、ペプチドおよび核酸からなる群より選択される、項目56に記載の組成物。

58．化合物が核酸である、項目56に記載の組成物。

【0030】

59．核酸が配列番号3の配列を有する、項目58に記載の組成物。

60．組成物が、1つまたはそれ以上の担体、希釈剤、もしくは添加剤、またはそれらの組み合わせをさらに含む、項目56から59のいずれかに記載の組成物。

61．組成物が、液体担体である薬学的に許容される担体を含む、項目60に記載の組成

10

20

30

40

50

物。

62．液体担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目61に記載の組成物。

63．化合物の純度が、重量%に基づき少なくとも98%である、項目56から62のいずれかに記載の組成物。

64．組成物がアンプルまたは密封バイアル中に存在する、項目56から63のいずれかに記載の組成物。

65．再構成可能な凍結乾燥形態である、項目56から60および63から64のいずれかに記載の組成物。

66．組成物が、吸入投与量形態、経口投与量形態、および非経腸投与量形態からなる群より選択される投与量形態である、項目1から65のいずれかに記載の方法または医薬組成物。

67．非経腸投与量形態が、皮内投与量形態、皮下投与量形態、筋肉内投与量形態、腹腔内投与量形態、静脈内投与量形態、および髄腔内投与量形態からなる群より選択される、項目66に記載の方法または医薬組成物。

68．凍結乾燥形態である、項目55または65に記載の組成物。

69．固体形態である、項目42から50、53から60および63から65のいずれかに記載の組成物。

【0031】

70．滅菌バイアル、項目56から69のいずれかに記載の組成物、および筋萎縮性側索硬化症を有する患者の処置のための組成物の使用を説明する指示書を含む、キット。

71．化合物または組成物が、再構成可能な凍結乾燥形態である、項目70に記載のキット。

72．化合物の用量が、患者の体重1kg当たり、1から5μgの範囲である、項目70または71に記載のキット。

73．化合物の純度が、重量%に基づき少なくとも98%である、項目70から72のいずれかに記載のキット。

74．化合物または組成物が非経腸投与量形態である、項目70から73のいずれかに記載のキット。

75．非経腸投与量形態が、皮内投与量形態、皮下投与量形態、筋肉内投与量形態、腹腔内投与量形態、静脈内投与量形態、および髄腔内投与量形態からなる群より選択される、項目74に記載のキット。

76．組成物が薬学的に許容される担体をさらに含む、項目70から75のいずれかに記載のキット。

77．薬学的に許容される担体が、生理食塩水、グルコース、アルコール、グリコール、エステル、アミド、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される液体担体である、項目76に記載のキット。

【0032】

78．筋萎縮性側索硬化症の処置のための医薬の製造を目的とする、項目42から69のいずれかに記載の組成物の使用。

79．筋萎縮性側索硬化症の処置に使用するための、項目42から69のいずれかに記載の医薬組成物。

【0033】

本明細書に記載の種々の態様のいずれにおいても、適用可能なとき以下の特徴が存在してよく、本発明のさらなる態様を提供する。すべての態様について、態様の任意の適用可能な組み合わせもまた、企図される。列挙された項目において上記の態様の任意の適用可能な組み合わせもまた、本発明に従っていると考えられる。

【0034】

一態様では、患者のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の発現を減少させることにより、筋萎縮性側索硬化症の患者を処置するための方法を提供する。この方法は、患者

10

20

30

40

50

のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の発現を低下させる化合物の有効量を含む組成物を患者に投与する工程を含む。1つの例示的態様において、細胞質中毒性顆粒はSOD1ではない。別の例示的態様において、細胞質中毒性顆粒は、抗酸化性細胞質中毒性顆粒ではない。

【0035】

別の態様において、患者の運動ニューロンにおけるMHCクラスI発現を増大させることにより筋萎縮性側索硬化症を処置するための方法が提供される。この方法は、患者の運動ニューロンにおけるMHCクラスIの発現を増大する化合物の有効量を含む組成物を患者に投与する工程を含む。これらの方法の態様、または任意の対応する使用のいずれかに
10
において、患者のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の減少した発現、または患者の運動ニューロンにおけるMHCクラスIの増大した発現が、化合物の投与後の、運動ニューロン数の増加、細胞体萎縮(soma atrophy)の低減、および神経突起長の伸張からなる群より選択されるが、これらに限定されない、患者の運動ニューロンへの影響をもたらす。種々の態様において、運動ニューロンは、患者の運動皮質、脳幹もしくは脊髄、またはそれらの組み合わせであってもよい。

【0036】

別の例示的面において、筋萎縮性側索硬化症の患者のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の発現を減少させるのに有効な化合物の投与量形態を含む医薬組成物が提供される。さらに別の例示的態様において、筋萎縮性側索硬化症の患者の運動ニューロンにおいてMHCクラスIの発現を増加させるのに有効な化合物の投与量形態を含む医薬組成物が
20
提供される。これらの医薬組成物を含むキットもまた提供される。他の面において、筋萎縮性側索硬化症を処置するための医薬の製造を目的とする、これらの医薬組成物の使用が提供される。さらに他の態様において、これらの医薬組成物は、筋萎縮性側索硬化症の処置における使用のために提供される。

【0037】

本明細書に記載の方法、キット、使用、および医薬組成物は、散発性または家族性筋萎縮性側索硬化症のいずれかの処置のために使用され得て、ヒトの臨床医薬および動物用薬剤の両方に使用され得る。一態様において、散発性または家族性筋萎縮性側索硬化症の処置に使用され得る本明細書に記載の化合物は、筋萎縮性側索硬化症の患者のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の発現を減少させるか、またはその活性を低減させるのに有効な化合物である。別の態様において、散発性または家族性筋萎縮性側索硬化症の処置に
30
使用され得る本明細書に記載の化合物は、筋萎縮性側索硬化症の患者の運動ニューロンにおけるMHCクラスIの発現を増加させるのに有効な化合物である。化合物は、薬物、ペプチド、および核酸、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0038】

標的とされる細胞質中毒性顆粒は、運動ニューロンに対して毒性の任意のアストロサイト細胞質中毒性顆粒であり得て、パーフォリン類(例えば、パーフォリン1)およびグランザイム類(例えば、グランザイムB)が含まれるが、これに限定されない。一態様において、グランザイムはグランザイムAではない。パーフォリン類およびグランザイム類の発現または活性は、患者を、筋萎縮性側索硬化症の患者のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の発現または活性を低減させる薬物、ペプチドもしくは核酸、またはそれらの組み合わせで処置することにより低減され得る。例えば、パーフォリンのような細胞質中毒性顆粒の活性を低減する化合物には、 Ca^{2+} 錯化剤が含まれる。別の態様において、筋萎縮性側索硬化症の患者のアストロサイトにおける細胞質中毒性顆粒の発現は、細胞質中毒性顆粒の発現を阻害する、アンチセンスRNA分子、siRNA、shRNAまたはmiRNAのような核酸を含む医薬組成物、例えばパーフォリンまたはグランザイムを用いて患者を処置することにより低減され得る。パーフォリン発現または活性の阻害剤にはまた、コンカナマイシンA(液胞型H(+)-ATPase(V-ATPase)阻害剤)、バフィロマイシンA1(液胞型H(+)-ATPase(V-ATPase)阻害剤)、デストラキシンE(液胞型H(+)-ATPase(V-ATPase)阻害剤)、プロジギオシン25-C(液胞型H(+)-ATPase(V-ATPase)阻害剤)、サイトカ
40
50

ラシン D (アクチン重合の阻害剤)、アンチマイシン A およびオリゴマイシン A (呼吸阻害剤)、カルフォスチン C (タンパク質キナーゼ阻害剤)、ハービマイシン A (タンパク質キナーゼ阻害剤)、K252a (タンパク質キナーゼ阻害剤)、スタウロスポリン (タンパク質キナーゼ阻害剤)、ジヒドロフロ[3,4 - c]ピリジノン類、1 - アミノ - 2, 4 - ジシアノピリド[1,2 - a]ベンゾイミダゾール類、イソベンゾフラン - 1 (3 H) - オン類 (パーフォリン誘導性溶解の小分子阻害剤)。アポリポタンパク質 B (ヒト血清中のパーフォリン阻害剤タンパク質)、スラミン、およびグリコサミノグリカン類 (その受容体への LDL の結合をなくして、パーフォリンの溶解作用を阻害する) も含まれる。グランザイム B 発現の阻害剤にはまた、グランザイム B 阻害剤 I (Z - AAD - CMK、C19H24C1N3O7、ヒトおよびマウスグランザイム B の弱い阻害剤)、グランザイム B 阻害剤 I I (Ac - IETD - CHO、C21H34N4O10、グランザイム B およびカスパーゼ - 8 の強力な可逆的阻害剤)、細胞透過性のグランザイム B 阻害剤 I I (Ac - AAVALLPAVLLALLAP - IETD - CHO、C95H162N20O26、カスパーゼ - 8 およびグランザイム B の強力な細胞透過性の可逆的阻害剤)、グランザイム B 阻害剤 I I I (Z - IE(OMe)TD(OMe) - FMK、C30H43FN4O11、カスパーゼ - 8 およびグランザイム B の強力な細胞透過性の可逆的阻害剤)、グランザイム B 阻害剤 I V (Ac - IEPD - CHO、C22H34N4O9、グランザイム B およびカスパーゼ - 8 の可逆的阻害剤)、グランザイム B 阻害剤 (Ac - ESMD - CHO、C19H30N4O1 OS、グランザイム B およびカスパーゼ - 8 の可逆的阻害剤)、ヒトプロテイナーゼ阻害剤 9 (PI - 9) (8 - 10)、ならびにセリンプロテアーゼ阻害剤 6 (Sip6) が含まれる。

10

【 0 0 3 9 】

20

患者へのアンチセンス R N A 分子、siRNA、shRNA、または miRNA の好適な送達方法には、細菌またはウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターが含まれる。かかる R N A 分子の例は、本明細書に記載の配列番号 1 および配列番号 2 の核酸であって、家族性または散発性筋萎縮性側索硬化症の患者由来の S O D 1^{G93A} アストロサイトまたはアストロサイトにおける、パーフォリン 1 またはグランザイム B それぞれの発現を効率的に低減させ、アストロサイトに暴露された運動ニューロンにおける運動ニューロン毒性の効果的な抑制をもたらす (実施例 4 を参照のこと)。

【 0 0 4 0 】

別の態様において、筋萎縮性側索硬化症の処置に使用され得る本明細書に記載の化合物は、筋萎縮性側索硬化症の患者の運動ニューロンにおける M H C クラス I の発現を増加させるのに有効な化合物である。該化合物は、薬物、ペプチド、および核酸、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。1 つの例示的態様において、運動ニューロンにおける M H C クラス I の持続的な発現をもたらす、S O D 1^{G93A} アストロサイトの毒性作用から運動ニューロンを保護すること (実施例 6 を参照のこと) が本明細書に記載される組織適合複合体 H 2 K をコードする配列番号 3 の核酸は、筋萎縮性側索硬化症を処置するために使用され得る。

30

【 0 0 4 1 】

これらの態様に従い、医薬組成物は、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 の配列を含むか、またはそれからなる精製された核酸を含んで提供される (表 1 参照)。精製された核酸はまた、provided comprising 配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 の相補鎖、または配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 からなる配列の相補鎖に高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含んで提供される。本発明によれば、" 高度にストリンジェントな条件 " とは、5 X S S P E および 5 0 % ホルムアミド中、6 5 にてハイブリダイゼーションさせ、6 5 にて 0 . 5 X S S P E 中で洗浄することを意味する。高度、低度、および中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、Sambrook et al., " Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) に記載されており、それは引用により本明細書に包含される。いくつかの例示的面において、ハイブリダイゼーションは、核酸の全長に亘って起こる。

40

【表 1】

表 1

配列番号 1 ACCTGAATCATGGCCACCTAA
配列番号 2 CATTGTCTCCTATGGACGAAA
配列番号 3 実施例 25 に記載の、下線を付した A T G および T G A の間であって、両端を含む配列

【0042】

本発明は、単離されたか、または実質的に精製された核酸を含む。“単離された”または“精製された”核酸分子は、化学的に合成されたとき、化学的前駆体または他の化合物を実質的に含まないか、または組み換え DNA 技術により作製されたとき、細胞物質を実質的に含まない。本明細書に記載の種々の態様において、本明細書に記載の方法、組成物およびキットに使用するための核酸は、二本鎖（例えば、アンチセンス RNA）または一本鎖であってよいが、核酸は典型的に、一本鎖である。

10

【0043】

本明細書に記載の方法、使用、医薬組成物およびキットにおける使用のための核酸は、置換、欠失、切断（truncation）により修飾されて得て、および / または他の核酸分子と融合して、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 の核酸の相補鎖に高度にストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズする核酸を生じ得て、該修飾された核酸は、本明細書に記載の方法または使用に有用である。ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ホスホラミデート、およびメチルホスホネート誘導体のような誘導体もまた製造され得る (Goodchild, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:4143 - 4146 (1986)、引用により本明細書に包含される)。

20

【0044】

別の態様において、核酸分子は、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 に、約 60 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、または約 99 % の相同性を有して提供される。配列間の同一または類似度の決定は、例えば、GAP プログラム (Genetics Computer Group、ソフトウェア；現在、Accelrys により利用可能。http://www.accelrys.com) を用いることにより実施可能であり、アライメントは、例えば、ClustalW アルゴリズム (VNTI ソフトウェア、Informax Inc.) を用いて行うことができる。配列データベースは、目的の核酸配列を用いて検索することができる。データベース検索のためのアルゴリズムは、典型的には、BLAST ソフトウェアに基づく (Altschul et al., 1990)。いくつかの態様において、同一性パーセントは、核酸の全長に沿って決定され得る。

30

【0045】

本明細書に記載の核酸、例えば配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3、またはそれらのフラグメントの核酸の合成技術は、当技術分野で公知であり、化学合成法が含まれる。かかる方法は、Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) に記載されており、引用により本明細書中に包含される。本明細書に記載の方法に使用するための核酸は、商業的に作製されてよい。本明細書に記載の核酸の精製または単離方法は、当技術分野で公知である。かかる方法は、Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) に記載されており、引用により本明細書中に包含される。

40

【0046】

一態様において、アストロサイトにおけるパーフォリン類またはグランザイム類の発現を低減させるか、または運動ニューロンにおける MHC クラス I の発現を誘導するための本明細書に記載の化合物（すなわち、薬物、ペプチド、または核酸）は、1 つまたはそれ以上の薬学的に許容される担体と共に製剤として投与され得る。担体は、添加剤であり得る

50

。担体の選択は、特定の投与方法、溶解性および安定性に対する担体の効果、ならびに投与量形態の特性などの因子に大きく依存し得る。化合物の送達に好適な医薬組成物、または化合物と共に投与されるべきさらなる治療剤、およびそれらの製造方法は、当業者に容易になされ得る。かかる組成物およびそれらの製造方法は、例えば、Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 21st Edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2005)に見出され得て、引用により本明細書中に包含される。

【0047】

一態様において、薬学的に許容される担体は、生理学的に適合する、任意かつ全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等から選択され得る。いくつかの態様において、担体は、非経腸投与に適する。薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の製造のための滅菌粉末を含む。補助的に活性化する化合物もまた、本発明の医薬組成物に組み込まれ得る。

10

【0048】

種々の態様において、液体製剤は、懸濁液および溶液を含み得る。かかる製剤は、担体、例えば、水、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、メチルセルロース、または好適な油、および1種またはそれ以上の乳化剤および/または懸濁化剤を含み得る。液体製剤はまた、固体の、例えば凍結乾燥物の再構成により製造され得る。従って、一態様において、凍結乾燥物は、再構成可能な凍結乾燥製物であり得る。

【0049】

1つの例示的面において、懸濁水溶液は、活性物質を適当な添加剤と混合して含み得る。かかる添加剤は、懸濁化剤であり、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガムおよびアカシアガム；天然のフォスファチド、例えばレシチンであってよい、分散剤または湿潤剤；アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合物、例えばポリオキシエチレンステアレート；エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合物、例えばヘプタデカエチレン-オキシセタノール；エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール由来の部分エステルとの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート；または、エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物由来の部分エステルとの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートである。懸濁液はまた、1つもしくはそれ以上の防腐剤、例えば、アスコルビン酸、エチル、n-プロピル、またはp-ヒドロキシ安息香酸塩；または1つもしくはそれ以上の着色剤を含んでいてよい。他の態様において、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール類、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムは、医薬組成物に包含され得る。

20

30

【0050】

1つの態様において、添加剤はバッファーを含む。一態様において、バッファーのpHは、約5.0から約8.0である。バッファーは、記載のpH範囲および生理的に適合性の許容されるバッファーであり得る。さらに、バッファーは、安定化剤としてもさらに作用し得る。一態様において、バッファーは、アスコルビン酸バッファー、ソルベートバッファー、ギ酸バッファー、乳酸バッファー、フマル酸バッファー、酒石酸バッファー、グルタミン酸バッファー、酢酸バッファー、クエン酸バッファー、グルコン酸バッファー、ヒスチジンバッファー、リンゴ酸バッファー、リン酸バッファーまたはコハク酸バッファーを含む。

40

【0051】

一面において、本明細書に記載の化合物(すなわち、薬物、ペプチド、または核酸)、またはさらなる治療剤は、血液、筋肉、または組織内に直接投与され得る。非経腸投与に好適な経路は、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、硬膜外、脳室内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、および皮下送達を含む。好適な非経腸投与のための経路は、注射(極微針を含む)、無針注射および点滴技術を含む。非経腸投与量形態の例は、等張食塩水中の活性剤、グルコース(例えば、5%グルコース溶液)、または他の公知の薬学的に許容される液体担体、

50

例えば液体アルコール、グリコール、エステル、およびアミドの水溶液を含む。注射可能組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって実現し得る。

【0052】

本発明は、本明細書に記載の医薬組成物を含むキットもまた意図する。別の態様において、滅菌バイアル、上記の態様のいずれか1つの医薬組成物、および筋萎縮性側索硬化症の患者を処置するための組成物の使用を記載する使用のための指示書を含むキットが記載される。

【0053】

別の態様において、化合物または組成物が再構成可能な凍結乾燥物である上記の態様のキットが記載される。

別の態様において、医薬組成物中の化合物の用量が1から5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である、上記のキットの態様のいずれかが記載される。

別の態様において、医薬組成物中の化合物の用量が1から3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ である、上記のキットの態様のいずれかが記載される。

【0054】

別の態様において、化合物の純度が少なくとも90重量%である、上記のキットの態様のいずれかのキットが記載される。別の態様において、化合物の純度が少なくとも95重量%である、上記の態様のいずれかのキットが記載される。別の態様において、化合物の純度が少なくとも98重量%である、上記のキットの態様のいずれかのキットが記載される。別の態様において、化合物の純度が少なくとも99重量%である、上記のキットの態様のいずれかのキットが記載される。

【0055】

別の例示的側面において、化合物または組成物が非経腸投与量形態である、上記のキットの態様のいずれかのキットが記載される。非経腸投与量形態は、皮内投与量形態、皮下投与量形態、筋肉内投与量形態、腹腔内投与量形態、静脈内投与量形態、および髄腔内投与量形態からなる群より選択され得る。さらに別の態様において、キットは組成物を含んでいてよく、組成物は薬学的に許容される担体をさらに含んでいてよい。薬学的に許容される担体は、生理食塩水、グルコース、アルコール類、グリコール類、エステル類、アミド類、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される液体担体であり得る。

【0056】

化合物を投与するための効果的なレジメンが用いられ得る。例えば、化合物は、単回用量で投与され得るか、または一日複数用量のレジメンとして分割して投与され得る。さらに、例えば、1週間に1日から5日だけ投与するような変則的な(staggered)レジメンが毎日の処置の代わりに用いられることもあり、本明細書に記載の医薬組成物、キット、方法、および使用の目的に関して、かかる間欠的または変則的レジメンは、毎日の処置と均等であるとみなされ、考慮される。1つの例示的態様において、疾患状態(すなわち、筋萎縮性側索硬化症)を排除するため、または疾患の症状の軽減もしくは安定化のために、化合物の複数回注射で処置される。一態様において、患者は、複数回(好ましくは、約2回から約50回まで)、例えば、12~72時間または48~72時間の間隔をあけて注射される。さらなる化合物の注射は、最初の注射の数日または数ヶ月後に患者に投与され得て、このような処置は、疾患の再発を防止するか、または疾患の症状の重症度の悪化を防止し得る。

【0057】

化合物の一日単一投与量は、患者の状態、処置されるべき疾患状態、化合物の純度およびその投与経路および組織分布、ならびに他の治療処置剤の共投与の可能性によって顕著に代わり得る。患者に投与されるべき有効量は、体表面積、質量、および患者状態の医者による評価に基づく。有効用量は、例えば、約1 ng/kg から約1 mg/kg 、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、および約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であり得る。これらの用量は、患者の平均体重が約70 kg に基づいており、該 kg は、

患者の体重(質量)についてのkgである。一態様において、化合物または医薬組成物は複数回用量形態である。別の態様において、化合物または医薬組成物は、単回用量形態(すなわち、単一用量形態または投与量形態)である。

【0058】

一態様において、化合物は、約1.0ng/kgから約1000μg/kg、約10ng/kgから約1000μg/kg、約50ng/kgから約1000g/kg、約100ng/kgから約1000g/kg、約500ng/kgから約1000g/kg、約1ng/kgから約500g/kg、約1ng/kgから約100g/kg、約1g/kgから約50g/kg、約1μg/kgから約10g/kg、約5μg/kgから約500μg/kg、約10μg/kgから約100μg/kg、約20μg/kgから約200g/kg、約10g/kgから約500g/kg、または約50g/kgから約500μg/kgの用量で投与され得る。全用量は、単回または分割用量で投与されてよく、医師の判断で、本明細書に記載の一般的範囲外でもよい。これらの投与量は、平均的な患者の体重 約70kgに基づいており、該kgは患者の体重についてのキログラムである。医師は、重量がこの範囲から外れている対象(例えば、乳幼児および高齢者)に対する用量を容易に決定することができる。

10

【0059】

別の態様において、化合物は、約1μg/m²から約500mg/m²、約1μg/m²から約300mg/m²、または約100μg/m²から約200mg/m²の用量で投与され得る。他の態様において、化合物は、約1mg/m²から約500mg/m²、約1mg/m²から約300mg/m²、約1mg/m²から約200mg/m²、約1mg/m²から約100mg/m²、約1mg/m²から約50mg/m²、または約1mg/m²から約600mg/m²の用量で投与され得る。全用量は、単回用量または分割用量で投与されてもよく、医師の裁量で本明細書に記載の典型的な範囲から外れていてもよい。これらの投与量は体表面積(m²)に基づく。

20

【0060】

別の態様において、医薬組成物および/または投与のための化合物の投与量形態は、少なくとも約90%、または約95%、または約96%、または約97%、または約98%、または約99%、または約99.5%の純度の化合物から製造される。別の態様において、医薬組成物および/または投与のための化合物の投与量形態は、少なくとも90%、または95%、または96%、または97%、または98%、または99%、または99.5%の純度の化合物から製造される。化合物の純度は、種々のクロマトグラフィーまたは分光学的技法、例えば、高圧もしくは高速液体クロマトグラフィー、核磁気共鳴分光法、TLC、UV吸光分光法、蛍光分光法などを含むいずれかの従来技法を用いて測定され得る。

30

【0061】

本明細書で用いる通り、純度決定は、重量パーセント、モルパーセントなどに基づいてよい。加えて、純度決定は、ある特定の所定の成分の不存在または実質的な不存在に基づいてよい。また、該純度決定は本明細書に記載の方法により製造された化合物および組成物の溶液に適用可能であると理解される。そのような場合、純度測定(重量パーセントおよびモルパーセント測定を含む)は、溶媒を除く溶液の成分に係する。別の態様において、化合物または医薬組成物は滅菌容器(例えば、バイアル)またはパッケージ、例えばアンプルもしくは密封バイアルで提供される。

40

【0062】

別の態様において、本明細書に記載の方法、医薬組成物、使用、およびキットは、以下の実施例を含む。該実施例は、本明細書に記載の本発明の種々の態様のさらなる特徴をさらに説明する。しかしながら、実施例は例示のためのものであって、本明細書に記載の本発明の他の態様を制限すると解釈されるものではないと理解されるべきである。加えて、実施例の他のバリエーションが本明細書に記載の本発明の各種態様に含まれると解されるべきである。

50

【実施例】

【0063】

実施例

実施例 1 . A L S アストロサイトは、細胞質中毒性顆粒であるパーフォリンおよびグランザイムを発現し、その増加した共局在を示す。

顆粒エキソサイトーシス経路の細胞質の中毒性顆粒は、細胞毒性活性を有する構造的に
関係のあるセリンプロテアーゼファミリーである、膜破壊タンパク質であるパーフォリン
(例えば、P R F 1)、およびグランザイムを含み、グランザイム B (G Z M B) は、その一
例であり、強力なアポトーシス促進因子として同定されている。本実施例は、顆粒細胞死
経路の細胞傷害性化合物が脊髄の細胞で発現されるかどうかを分析した。図 1 A に示す通り、
P R F 1 および G Z M B タンパク質は両方とも、野生型および S O D 1^{G93A} マウス (筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の許容された動物モデル) の脊髄においてウェスタンブロット分析により容易に検出され、転写物の存在が R T - P C R により確認された。P R F 1 または G Z M B の全般的発現レベルは、S O D 1^{G93A} マウスの疾患の進捗に伴って変化しなかった (図 1 A)。

10

【0064】

アストロサイトおよびミクログリアの両方は、運動ニューロン (M N) に対する細胞毒性を示し、G Z M B および P R F 1 の細胞型特異的発現が決定された。ミクログリアは G Z M B を発現したが、P R F 1 を発現しなかった。しかしながら、両タンパク質の共発現がアストロサイトで検出され、R T - P C R 分析により、これらの発見が転写レベルで確認された (図 1 B 参照)。R N A 分析は、アストロサイトにおける P R F 1 および G z m b の両方の発現を明らかにしたが、ミクログリアでは P R F 1 は発現されなかった。P R F 1 および G z m b の発現は、野生型および S O D 1^{G93A} マウスの両方の脊髄において見出された (図 1 G 参照)。初代および N P C 由来の両方のアストロサイトは P R F 1 および G z m b を発現するが、一方、ミクログリアは、G z m b のみを発現した (図 1 H 参照)。驚くべきことに、P R F 1 および G Z M B は、S O D 1^{G93A} アストロサイトの細胞質において共局在するが、野生型アストロサイトでは共局在しなかった (図 1 C 参照)。P R F 1 および G Z M B の細胞質共局在は、細胞内ビークルにおける両細胞傷害性因子の貯蔵を示し、能動的顆粒エキソサイトーシス経路の前提条件が、両因子の相乗作用による顆粒放出に依存することを示唆する。

20

30

【0065】

P R F 1 および G Z M B の増加レベルはまた、S O D 1^{G93A} マウスの脊髄に存在するアストロサイトにおいてインビボで観察され、これらの 2 つのタンパク質は実質的に共局在している (図 1 D 参照)。脾臓細胞の P R F 1 および G Z M B の免疫染色は、両細胞傷害性タンパク質のロバストかつ特異的なシグナルを明らかにした (図 1 I 参照)。P R F 1 および G Z M B の連続染色プロトコルは、S O D 1^{G93A} アストロサイトにおけるこれらの 2 つの細胞傷害性タンパク質の検出を可能にした (図 1 J 参照)。両抗体、P R F 1 および G Z M B は、ウサギに免役して得られたため、連続染色は、これらの 2 つの抗体が組み合わされて、かつ特異的に検出されるのを可能にする。

40

【0066】

重要なことには、M N に毒性を伝える公知の能力を有する A L S 患者由来のアストロサイトを含む、対照および A L S 患者からのヒト死後 N P C 由来のアストロサイトは、P R F 1 および G Z M B を発現することが示された (図 1 E 参照)。S O D 1^{G93A} マウスからのアストロサイトと同様に、A L S 患者の脊髄におけるアストロサイトは、細胞質顆粒と一致するパターンで P R F 1 および G Z M B を含むが、両タンパク質は、非罹患対照では実質的に存在しなかった (図 1 F 参照)。まとめると、本実施例は、マウスおよびヒトアストロサイトが、細胞傷害性タンパク質 P R F 1 および G Z M B を能動的顆粒細胞死経路と一致する細胞内局在パターンで含むことを実証する。

【0067】

さらに、アストロサイトにおける G z m a および G z m b の発現レベルを分析した。S

50

OD 1 アストロサイトは、G z m b を高レベルで発現したが、半定量的 R T - P C R (図 1 4 A) および定量的 R T - P C R (図 1 4 B ; 全ての群について n = 2) により示される通り、G z m a は低レベルであった。G z m b レベルはまた、W T アストロサイトと比べて S O D 1 アストロサイトで高かった(図 1 4 A および B)。

【 0 0 6 8 】

実施例 2 . A L S アストロサイトは、パーフォリンおよびグランザイム B を運動ニューロン中に放出する。

本実施例は、S O D 1 ^{G93A} アストロサイトが、P R F 1 および G Z M B を M N 中に放出する能力を有するかどうかを、インビトロ培養システムを用いてアストロサイトの共培養した M N に対する毒性を調べることににより調査した。M N は、M N およびアストロサイトの共培養における視覚的な差異を可能にする、運動ニューロン特異的な H B 9 プロモーターの制御下に G F P を発現する m E S 細胞に由来した。S O D 1 ^{G93A} マウスから単離されたアストロサイトの融合層上に培養した M N において、細胞質型および膜結合型 P R F 1 および G Z M B タンパク質は、プレーティング後 2 4 時間より早く可視化されるが、一方、野生型アストロサイトと共培養した M N は、この時点で如何なるシグナルも示さなかった。この差異は、共培養の時間経過に亘って維持されて、培養の 1 2 0 時間後、S O D 1 ^{G93A} アストロサイト上で培養した M N における P R F 1 および G Z M B タンパク質の実質的な蓄積をもたらすが、一方、両タンパク質は、野生型アストロサイト上で培養した M N には本質的に存在しないままであった(図 2 A 参照)。P R F 1 (図 2 G) および G Z M B (図 2 H) のレベルを、図 2 A に示す通り、野生型または S O D 1 ^{G93A} アストロサイトと共培養された M N において異なる時間点で分析した。

【 0 0 6 9 】

S O D 1 変異体を過剰発現する非 A L S 対照アストロサイトは、P R F 1 および G Z M B を運動ニューロン中に放出する。M N に毒性を伝えることが示されている、S O D 1 ^{G93A} または A 4 V 変異タンパク質を過剰発現する非 A L S 対照アストロサイト(1800)は、P R F 1 および G Z M B を M N に放出する。P R F 1 および G Z M B は、培養の 1 2 0 時間後、非 A L S 対照アストロサイトと共培養した M N に存在しないままである(図 2 1 参照)。

【 0 0 7 0 】

エフェクターから標的細胞への G Z M B のパーフォリン仲介性移動は、標的細胞の膜に膜孔様構造を形成することを伴うと考えられる。故に、S O D 1 ^{G93A} アストロサイトと M N の相互作用を、3 次元撮像能を有する共焦点顕微鏡技術を用いて調べた。

【 0 0 7 1 】

図 2 B に示す通り、P R F 1 染色は、S O D 1 ^{G93A} アストロサイトと標的 M N との間の細胞間空間の膜孔様構造と共局在した。野生型アストロサイトと M N の共培養において、かかる構造は存在しなかった。脊髄切片において、P R F 1 および G Z M B は、S O D 1 ^{G93A} の M N 内に存在するが、野生型マウスの M N には存在せず、故に、インビボでの発見が確認された(図 2 C および 2 D 参照)。3 次元画像は、共焦点顕微鏡を用いて得られ、野生型アストロサイトと共培養することにより M N における P R F 1 染色の欠如を示した(図 2 J 参照)。

【 0 0 7 2 】

A L S アストロサイトによる P R F 1 および G Z M B の能動的エキソサイトーシスを確認するために、リソソーム関連膜糖タンパク質 LAMP - 1 / CD107A (すなわち、細胞傷害性リンパ球における、この方法のプロトタイプのマーカー)の発現を決定した。LAMP - 1 / CD107A は、野生型細胞と比較して S O D 1 ^{G93A} 脊髄細胞において実質的に上方制御され、故に、急速な脱顆粒が示唆される(図 2 E 参照)。この観察と一致して、CD107A レベルは、S O D 1 ^{G93A} マウスにおける疾患の進行に伴い増加した。重要なことには、細胞表面 CD107A は、インビトロおよびインビボの両方において、S O D 1 ^{G93A} アストロサイトでのみ増加し、野生型細胞では増加しなかった(図 2 F 参照)。増加した脱顆粒は、運動ニューロンとの共培養時に S O D 1 ^{G93A} アストロサイトで観察された。ウェスタンブロット分

析は、初代およびNPC由来のSOD1^{G93A} アストロサイトの両方が、野生型アストロサイトと比較して、細胞傷害性タンパク質の脱顆粒の指標である、高レベルのCD107A発現を示すことを明らかにした(図2K参照)。アストロサイトと共培養したMNの免疫蛍光染色は、CD107A発現がMNの周囲のSOD1^{G93A} アストロサイトに顕著であることを示した(図2L参照)。

【0073】

実施例3．パーフォリンおよびグランザイムBは、ヒトALS脊髄の運動ニューロンに見出される。

マウスモデルにおける結果と一致して、PRF1およびGZMBの実質的な量は、FALS及びSALS患者の脊髄のMNにおいて検出されたが、罹患していない対照では検出されなかった(図3A参照)。ヒト脊髄におけるPRF1またはGZMBについて陽性のMN数の定量分析は、FALSおよびSALSの両方におけるMNの高陽性率を示し、いくつかのサンプルにおいて最大100%の細胞が両タンパク質を含んだ(図3Bおよび3C参照)。ALSアストロサイトとMNのインビトロにおける共培養システムならびにマウスおよびヒトの両方のALS脊髄から得られたこれらの観察は、ALSアストロサイトが積極的にPRF1およびGZMBを脱顆粒し、次いで、これらの細胞のパーフォリンにより仲介されるMNへの取り込みを示唆する。

【0074】

実施例4．ALSアストロサイトは、パーフォリンおよびグランザイムBを運動ニューロンを殺すために利用する。

本実施例において、ALSアストロサイト仲介性MN毒性におけるPRF1/GZMB経路の機能的な重要性を決定した。まず、アストロサイトにおけるPRF1およびGZMBの発現を効率的に排除することが可能なshRNAを同定した。SOD1^{G93A} アストロサイトにおけるPRF1およびGZMB発現の排除は、共培養中のMNのほぼ完全な保護をもたらした(図4AおよびB参照)。この保護作用は、より多くの生存MN数(図4B参照)、細胞体萎縮(soma atrophy)の減少(図4C参照)、および伸張した神経長(図4D参照)により明らかである。この保護作用の特異性は、スクランブルshRNA対照で処理したSOD1^{G93A} アストロサイトの不変のMN数に対する毒性により確認され、共培養の20時間以内にMNの80%の細胞死がもたらされた。

【0075】

パーフォリンおよびグランザイムBのShRNAノックダウンは、アストロサイトで検出された。ウェスタンブロット分析は、PRF1 shRNA(図4K)およびGZMB shRNA(図4L)でのレンチウイルスを用いた形質導入によるマウスSOD1^{G93A} アストロサイトにおけるPRF1およびGZMBタンパク質の発現の減少を示した。PRF1 shRNAおよびGZMB shRNAは、用いた全てのヒトアストロサイトにおいて、PRF1およびGZMB発現を抑制した(図4M)。

【0076】

さらに、FALSおよびSALS患者由来のアストロサイトにおける、shRNA-仲介性のPRF1およびGZMB発現の排除は、共培養で効果的にMNを保護し、細胞体萎縮(soma atrophy)に顕著な効果を示し、神経突起の短縮をもたらした(図4E~4J参照)。まとめると、これらの結果は、マウスおよびヒトの両方のFALSおよびSALSアストロサイトは、細胞傷害性タンパク質であるPRF1およびGZMBを利用してMNを殺すことを示唆する。これらのタンパク質のアストロサイトにおける発現を抑制することは、ALSアストロサイトによるMN毒性を弱毒化させる。

【0077】

さらに、ALSアストロサイト馴化培地中のPRF1およびGZMBは、MNに対して毒性である。PRF1およびGZMB発現のSOD1アストロサイトにおけるノックダウンは、MNの生存を増加させ(図10Aおよび10B)(B;全ての群についてn=3、各nをトリPLICATEで行った)、SOD1アストロサイト馴化培地の存在下で培養されたとき通常観察される、神経突起(図10C)および細胞体サイズ(図10D)の退縮を阻止

10

20

30

40

50

した(図10CおよびD;全ての群について $n = 100$)。SOD1 アストロサイト馴化培地の存在下、PRF1およびGZMBは、MNの細胞体で容易に検出された(図10E - F)。MNの生存率の用量依存的増加が、SOD1 アストロサイト馴化培地に添加したPRF1およびGZMB中和抗体の存在下で観察された(図10G)。抗体補充なしのSOD1 アストロサイト馴化培地を、統計分析用の参照群として用いた。点線は、50%度数を示す(図10CおよびD)。スケールバーは、200 μm (図10A)、5 μm (図10E)である。エラーバーは、標準誤差を示す。 $**P < 0.01$ 、 $****P < 0.0001$ 。n.s、有意ではない。Scr、スクランブルshRNA。

【0078】

さらに、アストロサイトにおけるPRF1およびGZMBレベルの下方制御は、ヒトSOD1のレベルもSOD1 アストロサイトで観察される炎症性プロファイルも変化させなかった。ウェスタンブロット分析は、SOD1アストロサイトにおけるPRF1およびGZMB shRNAの発現により、同レベルのヒトSOD1を示した(図12A)。炎症性遺伝子アレイは、PRF1およびGZMBのノックダウンによるSOD1アストロサイトの炎症性プロファイルの明白な変化を示さなかった(図12B)。ヒートマップは、独立して収集されたサンプルを用いて2つの遺伝子アレイの平均倍数変化を示す。

【0079】

また、SOD1^{G93A} アストロサイトにターゲティングしたヒトSOD1は、PRF1およびGZMBの共局在の減少レベルをもたらした。ウイルスベクターによるshRNA送達によりSOD1 アストロサイトにおいてヒトSOD1発現のノックダウンレベルが、ELLISA(図13A;全ての群について $n = 2$)およびウェスタン分析(図13B)により示された。SOD1 shRNA発現により、PRF1およびGZMBの共局在レベルは、細胞あたりの個々の顆粒の数に影響を与えることなく(図13DおよびG)、インビトロ(図13C - E)およびインビボ(図13F - H)の両方で有意に減少した。白色矢先は、PRF1およびGZMBの共局在顆粒を示す。スケールバーは、5 μm である。エラーバーは、標準誤差を示す。 $****P < 0.0001$ 。n.s、有意ではない。Scr、スクランブルshRNA。

【0080】

実施例5. ALSアストロサイトは、NK様の細胞特性を示す。

PRF1/GZMB細胞死経路の積極的使用により、ALSアストロサイトはNK細胞の機能的特性を採用している。細胞表現型におけるこの明らかな変化の程度を特徴付けるために、本実施例は、ALSアストロサイトにおけるNK細胞関連マーカーの大規模シリーズの発現レベルを評価した。SOD1^{G93A} アストロサイトは、2つのプロトタイプのNKマーカーである、CD56およびCD57をロバストレベルで発現し、それらは、野生型アストロサイトでは最小限に発現されている(図5A参照)。さらに、NK活性化に関与することが知られている受容体、リガンド、および仲介シグナル伝達タンパク質を含む大規模な遺伝子セットの定量的RT-PCR分析は、SOD1^{G93A} アストロサイトにおけるこれらの遺伝子の大部分の上方制御を明らかにしたが、野生型対照では上方制御されなかった(図5B参照)。

【0081】

NK細胞は、非感染細胞から感染細胞を同定する能力を必要とする、ウイルス感染に対する宿主防御機構を効率的に媒介する特定の機序を進化させてきた。通常、NK細胞表面上の阻害受容体と、内生細胞により提示される主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI抗原の相互作用は、NK細胞活性の抑制をもたらす。しかしながら、単純ヘルペスウイルス(HSV)などの特定のウイルスによる感染は、NK細胞毒性を誘発する、感染細胞の表面上のMHCクラスI抗原の提示を抑制する。ALSアストロサイトが、MHCクラスI抗原と相互作用する能力を含む、同様の特性を獲得したかどうかを決定するために、MHCクラスI阻害受容体LY49CおよびLY49Iの存在を評価した。両受容体は、インビトロで培養したSOD1^{G93A} アストロサイトにおいて高度に発現されるが、野生型アストロサイトには存在しなかった(図5C参照)。遺伝子発現分析は、SOD1^{G93A} アストロサイトにおけるNK細胞関連マーカー細胞シグナル伝達経路の活性化を明らかにした(図

10

20

30

40

50

5 H 参照)。

【 0 0 8 2 】

タンパク質および転写レベルの両方のインビボ分析は、脊髄および S O D 1^{G93A} マウスのアストロサイトにおけるLY49CおよびLY49Iの実質的な発現を確認したが、対照マウスのこれらの組織には存在しなかった(図 5 D 参照)。M H C クラス I 受容体は、FALSおよびSALS患者由来の死後サンプルから得られたN P C 由来のアストロサイトに存在した(図 5 E および 5 F 参照)。ヒト A L S アストロサイトにおける 1 4 種の M H C クラス I 受容体の発現を評価した。キラー細胞の免疫グロブリン様受容体 3DL2(KIR3DL2)、M H C クラス I 阻害受容体は、評価された全てのFALSおよびSALSアストロサイト株において特異的かつ高度に発現されていたが、正常な対照細胞では発現されなかった(図 5 F 参照)。免疫染色は、A L S 患者の脊髄内のアストロサイトにおけるKIR3DL2の高度なレベルを確認したが、健常対照では確認されなかった。これらの結果は、A L S アストロサイトが、N K 細胞と同様にパーフォリン/グランザイム細胞死経路を活性化するだけでなく、M H C クラス I 阻害受容体の発現を含む多くの他の N K 細胞特性を採用することを示唆する。

10

【 0 0 8 3 】

実施例 6 . M H C クラス I の下方制御は、運動ニューロン死と関係している。

A L S アストロサイトの表面上に発現する M H C クラス I 阻害受容体は、N K 細胞様の標的細胞との相互作用を、M N 誘発性 A L S アストロサイト毒性による M H C クラス I の低減した提示と共に仲介し得る。まず、M H C クラス I 受容体の M N 表面上のレベルを、アストロサイトと共培養することにより測定した。野生型アストロサイト上に培養した M N は、1 2 0 時間以上、ロバストな M H C クラス I 発現を維持したが、S O D 1^{G93A} アストロサイトと共培養した M N は、M H C クラス I 抗原の迅速かつ顕著な減少を示した(図 6 A 参照)。この減少は、共培養 2 4 時間の時点で有意であり、より長時間の共培養でより顕著となり、共培養の 1 2 0 時間の時点で最低の M H C クラス I 発現であった(図 6 A 参照)。S O D 1^{G93A} アストロサイトと共培養した M N 上の M H C クラス I 発現の減少は、M N 内の P R F 1 / G Z M B レベルの観察された増加に逆相関した(図 2 A 参照)。

20

【 0 0 8 4 】

A L S アストロサイトは、主に M N に対して毒性を発揮するが、G A B A 作動性ニューロンのような他の神経細胞型には毒性を発揮しないため、G A B A 作動性ニューロン表面上の M H C クラス I のレベルを評価した。M N にて観察された発現変化とは対照的に、G A B A 作動性ニューロン中の M H C クラス I 抗原レベルは、野生型および S O D 1^{G93A} アストロサイトとの長時間の共培養中、一定であった(図 6 B 参照)。これらの発見は、N K 細胞と同様に、A L S アストロサイトが M H C クラス I 発現のレベルを潜在的標的細胞により認識することを示唆する。さらに、A L S アストロサイトとの接触は、M H C クラス I 受容体の下方制御を M N に特異的に引き起こすが、他の神経細胞型には引き起こさないことを明らかにし、これらの細胞が、A L S におけるアストロサイト仲介性細胞毒性に対する主要な標的細胞であることを示す。

30

【 0 0 8 5 】

第二に、M N における M H C クラス I 発現のこの特定の減少のインビボでの確認を、マウスおよびヒト脊髄標本の両方で調べた。インビトロでの結果と一致して、M H C クラス I 染色は、A L S 患者または S O D 1^{G93A} マウスの脊髄においてのみ、M N における M H C クラス I 発現の広範かつ実質的な減少を明らかにし、正常組織では見られなかった(図 6 C および 6 D)。M N における M H C クラス I の劇的な下方制御は、FALSおよびSALS患者の脊髄サンプルにおいても同様に検出され、サンプル中 M N の 8 0 から 1 0 0 % で M H C クラス I 受容体が不存在であった(図 6 E)。

40

【 0 0 8 6 】

A L S アストロサイトとの共培養により M N において観察される M H C クラス I の減少が、シグナル誘発性のアストロサイトに由来する毒性であったとき、M H C クラス I 発現が維持され得れば、M N は該毒性を免れるはずである。この仮説を、組織適合性複合体(H 2 K)のレンチウイルス送達による M N における M H C クラス I 受容体の過剰発現により調

50

査した。MNにおけるMHCクラスIの維持された発現は、生存率が野生型アストロサイトと共培養したMNと相違しないように、SOD1^{G93A}アストロサイトの毒性作用からこれらを保護した(図6F-6H参照)。SOD1^{G93A}アストロサイトとの共培養により、表面のMHCクラスI染色は、Lv-RFPで形質導入されたMN上のMHCクラスIの発現低下を示すが、Lv-H2Kで形質導入したMN上でのMHCクラスIの発現を維持した(図6K参照)。回復は、SOD1^{G93A}アストロサイトと共培養したMNの変化しない細胞体サイズおよび神経突起長から明らかであった(図6Iおよび6J参照)。MNにおけるコントロール導入遺伝子である赤色蛍光タンパク質(RFP)の持続的発現は、MNに対するSOD1^{G93A}アストロサイト仲介性毒性を変化させず、共培養の120時間後にMNの80%の細胞死をもたらした。これらの結果は、MNにおけるMHCクラスI受容体の構成的発現が、ALSアストロサイトにより誘導される細胞毒性作用からの保護を提供することを示唆する。

【0087】

さらに、MHC I発現の下方制御によるSOD1アストロサイト仲介毒性に対するGABAニューロンの増加した感受性が示された。H2-K1のShRNAノックダウンは、RNA(図11A)およびタンパク質発現(図11BおよびC)により示される通り、GABA作動性ニューロンにおけるH2-K1発現の効率的な下方制御をもたらした。GABA作動性ニューロンにおけるH2-K1の抑制は、SOD1アストロサイトとの共培養によるPRF1およびGZMBの発現率増加をもたらした(図11D)。SOD1アストロサイトとの共培養の120時間後、H2-K1 shRNAで処理したGABAニューロンは、細胞生存率の減少(図11EおよびF)、細胞体サイズおよび神経突起長の減少(図11G;全ての群についてn=3、各nをトリプリケートで行った)により示される通り、SOD1仲介性アストロサイト毒性に対する感受性の増加を示した。点線は、50%度数を示す(図11G)。スケールバーは、5μm(図11BおよびD)、100μm(図11E)であった。エラーバーは、標準誤差を示す。*P<0.01、***P<0.0001。Scr、スクランブル shRNA。

【0088】

実施例7 . Fas およびFasL シグナル伝達の選択的障害は、運動ニューロンに対するSOD1^{G93A}アストロサイト毒性を阻止しない。

Kp7-6を、それがMNに対するアストロサイト毒性を阻止するかどうかを決定するために分析した。Kp7-6は、Fas/FasL-により仲介されるアポトーシスを特異的に障害する。Kp7-6を、MNの共培養の24時間前にSOD1^{G93A}アストロサイトに添加し、共培養の全ての時点で維持した。細胞傷害性リンパ球においてFas/FasL 活性の障害に有効であることが知られているKp7-6濃度では、MNに対するSOD1^{G93A}アストロサイト由来の毒性は変化しなかった(図7参照) p<0.001。

【0089】

実施例8 . 動物

変異SOD1を発現したトランスジェニックマウス(B6SJL-Tg SOD1^{G93A})は、ジャクソン研究所(Bar Harbor, ME)から入手した。動物を、明/暗(12:12時間)サイクル下、餌および水の自由摂取下で飼育した。各世代において、SOD1導入遺伝子コピー数およびSOD1タンパク質発現レベルを、それぞれPCRおよびウェスタンブロット分析により確認した。全ての手順は、NIHガイドラインに従って実施され、全国小児病院施設内動物管理使用委員会により承認を受けた。

【0090】

実施例9 . アストロサイトのマウス脊髄からの単離

アストロサイトを、110から130日齢のSOD1^{G93A}および野生型B6SJLマウスから単離した。アストロサイト培養物を、上記の通りに微細な改変をして行った。簡単には、脊髄を、酵素パパイン(2.5 U/ml; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ)、デイスパーゼグレードII(1 U/ml; Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN)およびDnアーゼI(250 U/ml; Worthington Biochemical)の混合物で約20分間処理して単一細胞に分離させた。70μMのナイロンメッシュを用いて濾過後、細胞をペレ

ット状にし、10%胎仔ウシ血清(FBS、Invitrogen)および0.2%N2サプリメント (Invitrogen)を添加したDMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA)中に再懸濁し、75cm組織培養フラスコ状に播種した。細胞は、2~3週間以内にコンフルエント状態になり、この時点で、潜在ミクログリア細胞を除去するために、プレートを一晚振盪した。接着状態のコンフルエントなアストロサイトを、シトシンアラビノース (20 μ M、Sigma - Aldrich, St. Louis, MO)で48時間処理して、分割中の細胞を迅速に死滅させた。分析前に、アストロサイト調製物を、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)およびナチュラルキラー(NK)細胞の存在について試験し、これらの細胞型を欠くことが見出された。

【0091】

実施例10. マウス脊髄からのミクログリアの単離

ミクログリアを、110から130日齢のSOD1^{G93A} および野生型B6SJL マウスから、上記のプロトコルに従い単離した。簡単には、全脊髄をハンクス平衡塩溶液(HBSS)、pH 7.4中でホモジナイズした。得られたホモジネートを70 μ mのナイロン製セルストレーナーに通して濾過し、400gで6分間遠心した。上清を除去し、細胞ペレットを70%の等張パーコール液 (GE Healthcare, Waukesha, WI)中に室温で再懸濁した。不連続パーコール密度勾配を、70%、50%、35%、および0%の等張パーコール液のように設定した。勾配液を、2000gで20分間遠心し、ミクログリアを70%と50%のパーコール層の間の層から集めた。細胞を洗浄し、次いで、HBSS中に懸濁し、RNAまたはタンパク質の単離に用いた。分析前に、ミクログリア調製物を、CTLおよびNK細胞の存在について試験し、これらの細胞型を欠くことが見出された。

【0092】

実施例11. マウスNPCの単離およびアストロサイトへの分化

NPCを、SOD1^{G93A} および野生型B6SJL マウスの脊髄から、上記の方法に従い単離した。簡単には、脊髄を、酵素パパイニン(2.5 U/ml; Worthington Biochemical)、ディスパーゼグレード II (1 U/ml; Boehringer Mannheim Corporation)およびDnアーゼ I (250 U/ml; Worthington Biochemical)の混合物で約20から30分間処理して単一細胞に分離させた。70 μ Mのナイロンメッシュを用いて濾過後、細胞をペレット状にし、10%FBSを添加したDMEM (Invitrogen)中に再懸濁した。細胞懸濁液を、等量の等張パーコール液(GE Healthcare)と混合し、20,000gで30分間、室温にて遠心した。低浮遊画分(赤血球層上の5-10ml)から細胞を集め、D-PBS/PSF (Invitrogen)で完全に洗浄し、60mmのコーティングされていないプレートに播種した。細胞を、1% N2サプリメント (Invitrogen)、20 ng/mlの線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2、Peprrotech, Rocky Hill, NJ)および20 ng/mlの内皮増殖因子(EGF、Peprrotech)を添加した増殖培地 (DMEM/F12、Invitrogen)中で増殖させた。プレートに付着した細胞の増殖性クラスターは、約10から15日目に出現し始めた。70~80%コンフルエントにて、細胞を、ポリオルニチン-ラミニン(P/L)でコーティングしたプレート上に播種した。これらの増殖条件では、マウスNPC培養は、アストロサイト、ミクログリア、CTLおよびNK細胞の混入がないことを確認した。培養を確立した後は、野生型およびSOD1^{G93A} マウス由来のNPCを、明細書に記載の実験のためのアストロサイトを区別するために用いた。NPC由来のアストロサイトを、増殖因子を除き、10%FBS (Invitrogen)を添加した培地を添加して得た。培地を3日毎に交換した。アストロサイトは、実験に用いる前に10%FBS中で7日間成熟させた。高度に濃縮されたアストロサイトを、この方法に従い、ミクログリア、CTLまたはNK細胞の混入が検出されないレベルで得た。

【0093】

実施例12. ヒトの死後のNPC由来のアストロサイト

この実験に用いるヒトNPC由来のアストロサイトは、上記の通りである。ヒト組織の受取は、全国小児病院施設内倫理委員会(IRB08-00402、筋萎縮性側索硬化症におけるグリアの役割を調査)により承認を受け、全てのヒトサンプルの使用は、その承認されたプロトコルに従った。死後の脊髄または脳を、死後24時間から72時間以内に処理し、N

10

20

30

40

50

P C の単離のために用いた。N P C を滅菌条件下で維持し、組織をダイスカットして、単一細胞懸濁液を、37 にて30から40分間、2.5 U/ml のパパイン (Worthington Biochemical)、250 U/ml の D N a s e I (Worthington Biochemical) および 1 U/ml の中性プロテアーゼ (Roche) を用いて組織を酵素的に解離することにより得た。解離後、細胞ペレットを 10 % F B S (Invitrogen) を添加した D M E M / F 1 2 (Invitrogen) に再懸濁し、70 μ M フィルターに通して遠心した。細胞ペレットを 10 % F B S (Invitrogen) を添加した D M E M / F 1 2 (Invitrogen) に再懸濁し、パーコール (GE Healthcare) と 1 : 1 で混合した。細胞 / パーコール混合物を、20 にて、20,000 g で 30 分間遠心し、赤血球細胞層上の低浮力画分 (10 ml) を集めた。細胞を洗浄し、10 % F B S (Invitrogen)、10 % B I T 9 5 0 0 (Stem Cell Technologies)、1 % N 2 サプリメント (Invitrogen)、20 ng/ml の F G F - 2 (Peprotech)、20 ng/ml の E G F (Peprotech) および 20 ng/ml の P D G F - A B (Peprotech) を添加した D M E M / F 1 2 (Invitrogen) を含む N P C 培地に再懸濁した。N P C を、フィブロネクチン (Chemicon) でコーティングしたプレート上で培養し、24 時間後、培地を血清不含有 N P C 培地に置き換えた。その後、培地の半量を 2 日毎に交換した。約 3 から 4 週間後に 60 - 70 % のコンフルエンスに達したとき、N P C を継代した。増殖条件において、本発明者らは、ヒト N P C 培養は、アストロサイト、ミクログリア、C T L および N K 細胞の混入がないことを確認した。N P C 培養が確立された後、アストロサイトの分化を、増殖因子を除去し、かつ 10 % F B S (Invitrogen) を含む培地を添加することにより誘導した。これらの条件において、アストロサイトは容易に作製され、20 回以上の継代で維持され得た。培養物が 80 % コンフルエンスに達したときにアストロサイトをアストロサイトを 3 日ごとに継代し、ラミニンでコーティングしたプレート上で維持した。N P C 由来のアストロサイトに関するデモグラフィック情報のまとめを、表 4 に示す。

【 0 0 9 4 】

【表 2】

表 4. N P C 由来のアストロサイトに関するデモグラフィック情報

ID	診断	年齢(歳)	性別	診断から死亡までの期間
1800	ALSではない	< 1	N/A	N/A
031300HC	ALSではない	52	女性	N/A
HD01 1296-5	ALSではない	61	男性	N/A
E6C2-2				
63358	ALSではない	87	男性	N/A
4944MA	家族性 A L S*	57	男性	8ヶ月
090322	散发性 ALS	70	男性	20ヶ月
9J003	散发性 ALS	55	男性	14ヶ月
64391	散发性 ALS	64	男性	14ヶ月
91095	散发性 ALS	70	女性	60ヶ月
64089	散发性 ALS	67	男性	9ヶ月

N/Aは、不明；*は、配列決定の結果、SOD1 領域にA4V変異が確認される。

【 0 0 9 5 】

実施例 13 . 胚性幹細胞からの運動ニューロンの分化

Hb9 プロモーター により駆動される緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するマウス胚性幹細胞 (mES 細胞) (HBG3 細胞) を用いた。E S 細胞を、不活性化されたマウス線維芽細胞 (Millipore, Billerica, MA) の上で培養した。M N の分化を、2 μ M のレチノイン酸 (Sigma - Aldrich) および 2 μ M のプルモルファミン (Calbiochem, Billerica, MA) の存在下で、10 cm ディッシュ当たり 1 ~ 2 $\times 10^6$ の mES 細胞を播種することにより誘導した。分化の 5 日後に、胚体を分離し、FACS Vantage / DiVa ソーター (BD Biosciences, Ro

ckville, MD)を用いて、GFPのレベルに基づいて選別した。

【0096】

実施例14．GABA作動性ニューロンへのNPCの分化

マウスのNPCを、0.1% FBS (Invitrogen)、レチノイン酸 (1 μ M、Sigma - Aldrich)、およびフォルスコリン (5 μ M、Sigma - Aldrich)を含む増殖培地を補充することにより、GABA作動性ニューロンに分化するように誘導した。培地を毎日交換した。培養物を実験に使用する前に7日間分化させた。

【0097】

実施例15．アストロサイトとMNの共培養

マウスアストロサイトおよびMNの共培養実験について、アストロサイトを、ラミニンでコーティングした96ウェルプレートに、1ウェル当たり40,000個の細胞密度で播種した。48時間後、FACS選別したGFP⁺ MNを、1ウェル当たり2,000個の細胞密度でアストロサイト単層の上に播種した。共培養を、5%ウマ血清 (Equitech Bio、Kerrville, TX)、2% N2 サプリメント (Invitrogen)、2% B27 サプリメント (Invitrogen)、10 ng/mlのGDNF (Invitrogen)、10 ng/ml BDNF (Invitrogen)、10 ng/ml CNTF (Invitrogen)を添加したDMEM/F12 (Invitrogen)を含むMN培地中で行った。培地の半量を毎日交換して、新鮮な増殖因子を添加した。ヒトアストロサイトおよびMNの共培養について、アストロサイトを、ラミニンでコーティングした96ウェルプレートに1ウェル当たり10,000個の細胞密度で播種した。48時間後、GFP⁺ MNを、1ウェル当たり10,000個の細胞密度でアストロサイトの上に播種した。MN播種の24時間後、シトシンアラビノース (1 μ M、Sigma - Aldrich)を、残りの分化中のアストロサイトまたは未分化の胚性肝細胞を排除するために48時間の間、添加した。培地を毎日交換し、増殖因子を添加した。

【0098】

実施例16．RNA単離およびRT-PCR

RNAを、RT² q-PCR-grade RNA アイソレーションキット (Qiagen, Frederick, MD)を用いて採取し、全RNAを、RT² ファーストストランドキット (Qiagen)を製造業者の指示書に従って用いて逆転写した。半定量的RT-PCRのために、転写物を、以下の遺伝子特異的プライマーを用いて増幅した。PRF1 - F: 5' - GTCACGTGAAGTACTTGGTG - 3' ; PRF1 - R: 5' - ATGGCTGATAGCCTGTCTCAG - 3' ; gzmb - F: 5' - CC TGCCACGGCGCAATGTCA - 3' ; gzmb - R: 5' - TGGTCTTTGGGTCCCCCGCA - 3' ; Ly49c - F: 5' - TCCACGATGAGTGAGCCA - 3' ; Ly49c - R: 5' - TACCTTTAACTCTAGTTGGAA - 3' ; Ly49i - F: 5' - GATGAATGAGCCGAGGTC - 3' ; Ly49i - R: 5' - TTTCACTGTTCCATCTGTCCT - 3' ; actb - F: 5' - GTGGGCCGCCCTAGGCACCA - 3' ; actb - R: 5' - CTCTTTGATGTCACGC ACGATTTC - 3'。ヒトのキラー細胞免疫グロブリン様受容体転写物 (KIR)の検出を、上記のプライマーセットを用いて定量的RT-PCRにより決定した (Thompson et al., Immuno genetics, Nov 2006, 58, 865)。ナチュラルキラー細胞マーカーを、SOD1^{G93A} および野生型由来のアストロサイトにおいて、マウス ナチュラルキラー細胞96 Stellaray (Lonza, Hopkinton, MA)を利用して定量的RT-PCRによりアッセイした。このStellarayは、細胞表面受容体、リガンド、シグナル伝達分子、接着分子、細胞毒性の媒介物質、サイトカインおよびサイトカイン受容体を含む、NK細胞生物学の多くの面に関連する遺伝子の発現を測定する。定量的RT-PCR反応は、ABI プリズム 7000 (Applied biosystems, Carlsband, CA)を付したRT² リアルタイム SYBR Green / Rox PCR マスターミックス (Qiagen)を用いてデュプリケートで行った。

【0099】

実施例17．免疫細胞化学

細胞、マウス脊髄またはパラフィン包埋されたヒト脊髄サンプルにおいて種々の抗原を可視化するために使用される免疫蛍光染色は、表2に記載の抗体およびそれぞれの希釈率で行われた。ほとんどの抗原に関して、サンプルを、0.1% トライトン-X および10% ロバ血清を含むTBS中、最初に室温で1時間インキュベートし、次いで4 に

10

20

30

40

50

て48～72時間、一次抗体と共にインキュベートした。種々の蛍光色素に結合した二次抗体での標識化を、室温で2時間行った。パラフィン包埋されたヒト組織におけるPRF1とGZMBの検出は、ABCおよびVectorRedキットプロトコル (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて、ビオチニル化二次抗体を用いて達成された。組織を、簡単に、ヘマトキシリンQS溶液 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて対比染色した。MHCクラスI染色を、上記のプロトコルに従って、軽微な変更を加えて行った。簡単には、細胞透過は、マウス脊髄サンプルについて0.05%のトリトンX、およびヒト脊髄サンプルについて0.1%のサポニンを用いて達成された。一次および二次抗体とのインキュベーションを、任意の界面活性剤を用いることなく、10%のロバ血清中で行った。インビトロでの表面標識のために、カバースリップ上に細胞を固定し、最初に透過処理せずに、ブロッキングし、室温で1時間、一次抗体と共にインキュベートした。膜の完全性を検証するために、各サンプルを、細胞内タンパク質TUJ1について染色した。TUJ1染色の欠失は、無傷の膜を確認し、陽性のTUJ1染色を有するMNを、分析から除外した。免疫染色に用いたヒト脊髄組織に関連するデモグラフィック情報のまとめを表3に示す。

10

【0100】

【表 3】

表 2. 抗体および各希釈率

抗原	会社	カタログ番号	宿主	使用した希釈率	適用
マウス種					
P R F 1	Cell Signaling	3693	ウサギ	1 : 200	ICC
P R F 1	Cell Signaling	3693	ウサギ	1 : 500	ウェスタン
GZMB	Cell Signaling	4275	ウサギ	1 : 200	ICC
GZMB	Cell Signaling	4275	ウサギ	1 : 500	ウェスタン
CD107A	Abeam	ab25245	ラット	1 : 500	ICC
CD107A	Abeam	ab25245	ラット	1 : 500	ウェスタン
CD56	Millipore	ab5032	ウサギ	1 : 200	ICC
CD57	Novus Biological	nbpl - 19788	ウサギ	1 : 100	ICC
LY49C/I	BD Pharmingen	553273	マウス	1 : 50	ICC
MHCクラス I	AbD Serotec	mca2398	ラット	1 : 100	ICC
GFAP	Abeam	ab4674	ニワトリ	1 : 500	ICC
EAAT2	Dr. Jeffrey Rothsteinから頂戴した		ウサギ	1 : 200	ICC
ChAT	Millipore	ab144p	ヤギ	1 : 200	ICC
GAD67	Millipore	MAB5406	マウス	1 : 200	ICC
GAPDH	Millipore	MAB374	マウス	1 : 500	ウェスタン
ヒト種					
P R F 1	Abeam	ab75573	マウス	1 : 50	ICC、IHC
P R F 1	Abeam	ab75573	マウス	1 : 100	ウェスタン
GZMB	Abeam	ab4059	ウサギ	1 : 50	ICC、IHC
GZMB	Cell Signaling	4275	ウサギ	1 : 500	ウェスタン
KIR3DL2	Abeam	ab95303	ウサギ	1 : 200	ICC
HLA	Abeam	ab70328	マウス	1 : 50	IHC
GFAP	Abeam	ab4674	ニワトリ	1 : 500	ICC

10

20

30

40

【表 4】

表 3. ヒト脊髄組織に関連するデモグラフィック情報

ID	診断	年齢(歳)	性別	診断から死亡までの期間	脊髄の部分
63628	Non-ALS	67	男性	N/A	胸部
E09-170	Non-ALS	88	女性	N/A	腰部
4944MA	家族性ALS*	57	男性	8ヶ月	胸部
E10-83	家族性ALS*	65	女性	4ヶ月	腰部
57746	散発性ALS	61	男性	3週間	腰部
ALS1989	散発性ALS	N/A	N/A	N/A	胸部
63470	散発性ALS	67	男性	1. 2ヶ月	腰部
60897	散発性ALS	62	女性	N/A	頸部
E08-67	散発性ALS	49	女性	2. 5年	腰部
E08-86	散発性ALS	71	男性	6ヶ月	腰部
E08-125	散発性ALS	55	女性	1年	胸部

N/Aは、不明；*は、配列決定の結果、SOD 1 領域にA4V変異が確認される。

【0101】

実施例 18. 共焦点顕微鏡および 3 次元画像再構成

全ての画像は、レーザー走査型共焦点顕微鏡(Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY)を用いて得て、3次元再構成は、LSM 510 ソフトウェア(Carl Zeiss)を用いて得た。

【0102】

実施例 19. MN 細胞生存率

アストロサイトと MN の共培養における種々の時点にて、MN の細胞生存性、神経突起長および細胞体サイズを、完全自動化 IN CELL 6000 セルイメージャー(GE Healthcare)を用いて記録した。画像を、開発および分析ソフトウェアパッケージ (GE Healthcare)を用いて処理した。

【0103】

実施例 20. ウイルスベクター

アストロサイトにおける P R F 1 および G Z M B レベルをノックダウンするために、R N A i のコンソーシアムレンチウイルスの shRNA ライブラリーからの配列をスクリーニングし、関連するプラスミドを Open Biosystems 社から購入した。クローン TRCN0000077206 (C CACTCCAAGGTAGCCAATTT) および TRCN0000032742 (CCTATGGATATAAGGATGGTT) をそれぞれ、マウスのアストロサイトにおいて P R F 1 および G Z M B を標的とするために用いた。クローン TRCN0000007942 (ACCTGAATCATGGCCACCTAA) および TRCN0000006448 (CATTGTCTCCTA TGGACGAAA) をそれぞれ、ヒトのアストロサイトにおいて P R F 1 および G Z M B をノックダウンするために用いた。スクランブル shRNA を、P R F 1 (GGCACTACCCGATCTATTACA) および G Z M B (GACCGATACTCGCGATATATT) についてのコントロールとして用いた。これらの配列は、文献に記載の通り、超遠心分離により上清から収集した 293 細胞およびウイルスの CaCl₂ 媒介性の一過性トランスフェクションにより製造されたレンチウイルス粒子により送達された (Tiscornia et al., Nat Protoc, 2006, 1, 241)。簡単には、ウイルス粒子は、ヘルパープラスミド、VSV - G、MDL および REV の存在下での 293 細胞の一過性トランスフェクションにより製造された。トランスフェクションは、10 分間の CaCl₂ 沈殿、その後のさらに 20 時間の培地インキュベーションにより得られた。ウイルス上清を、その後 96 時間の間、24 時間毎に集め、ウイルス粒子を、50,000 g で 2 時間の超遠心分離によりペレットとして得た。ウイルス粒子を等分し、使用するまで -80 で凍結保存した。アストロサイトに添加する前に、ウイルス力価を、Quick - titer レンチウイルス定量キットを製造業者の指示に従って用いて得た (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA)。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 4 】

H2K cDNA (Mm24845) を、Genecopia (Rockville, MD) から購入し、レンチウイルスベクターの送達を介して MN へ送達された。H2K cDNA を、CMV プロモーター下にクローニングした。RFP 発現もまた、レンチウイルス構築物中の IRES の存在により得た。運動ニューロンは、最初に、1 個の運動ニューロン当たり、20 個のウイルス粒子を含むレンチ-H2K で感染させた。H2K 発現を、アストロサイト播種の 48 時間前に生じさせた。アストロサイト-運動ニューロンの共培養を、さらに 120 時間継続した。アッセイを、20,000 および 60,000 個の運動ニューロンおよびアストロサイトのそれぞれを 96 ウェルに播種することにより行った。

【 0 1 0 5 】

実施例 21 . P R F 1 および G Z M B shRNA 配列のスクリーニング

アストロサイトにおける P R F 1 および G Z M B 発現をノックダウンするために、RNAi のコンソシアムレンチウイルスの shRNA ライブラリーからの配列 (TRC - Mm1.0 および TRC - Hs1.0) をスクリーニングし、Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。以下の配列をスクリーニングした。

【 0 1 0 6 】

スクリーニングした P R F 1 配列 :

マウス : TRCN0000077203 (CTATGCATAGAGAGGCCACTA) ; TRCN0000077204 (GCCCATTTGGTGGT AAGC AAT) ; TRCN0000077205 (CGGTGTCGTGTGGAAC AATAA) ; TRCN0000077206 (CCACTCCAAGGT AGCCAATTT) ; TRCN0000077207 (AGGGTGAAATTCTCTACCAT)。

ヒト : TRCN000007938 (CCAACACAATTCTTCTTCCAA) ; TRCN000007939 (GCCTATGTGAAGCTCT TCTTT) ; TRCN000007940 (CCTCAGGCTTATCTCCAATA) ; TRCN000007941 (TGCCGCTTCTACAGT TTCCAT) ; TRCN000007942 (ACCTGAATCATGGCCACCTAA)。

【 0 1 0 7 】

スクリーニングした G Z M B 配列 :

マウス : TRCN0000032739 (CGAGAATGTTATCTAATGCTA) ; TRCN0000032740 (CGAGTTTCTTATCC TGGATAA) ; TRCN0000032741 (GCCTTACTTTTCGATCAAGGAT) ; TRCN0000032742 (CCTATGGATATAA GGATGGTT) ; TRCN0000032743 (CAGACTATAATCCTAAGACAT)。

ヒト : TRCN000006445 (CGAATCTGACTTACGCCATTA) ; TRCN000006446 (GCTTATCTTATGATCT GGGAT) ; TRCN000006447 (AATGGTACTGTCGTAATAATG) ; TRCN000006448 (CATTGTCTCTATGG ACGAAA) ; TRCN000006449 (GCTTCCTGATACAAGACGACT)。

【 0 1 0 8 】

ウェスタンブロット分析により評価されたノックダウン効率のレベルに基づき、クローン TRCN0000077206 (CCACTCCAAGGTAGCCAATTT) および TRCN000007942 (ACCTGAATCATGGCCAC CTAA) を、それぞれマウスおよびヒト アストロサイトにおいて P R F 1 を標的とするように選択した。G Z M B を標的とするために、TRCN0000032742 (CCTATGGATATAAGGATGGTT) および TRCN000006448 (CATTGTCTCTATGGACGAAA) を、それぞれマウスおよびヒトアストロサイトで用いた。ShRNA 配列は、293 細胞の CaCl₂ 一過性トランスフェクションにより作製され、超遠心分離により濃縮されたウイルスベクターにより送達された。アストロサイトは、1 細胞当たり 20 個のウイルス粒子を用いて 24 時間に亘って感染させた。ShRNA を、運動ニューロンとの共培養の前に 96 時間、アストロサイトにて発現させた。

【 0 1 0 9 】

実施例 22 . MN 感染および培養

MN において MHC クラス I を発現するために、野生型アストロサイトを、ラミニンでコーティングしたトランスウェル (Corning, Lowell, MA) 上に MN 培地を用いて播種した。24 時間後、分別された GF P⁺ の MN を、別々のラミニンでコーティングした 96 ウェルプレートに野生型アストロサイトで馴化した培地中に播種した。4 時間後、野生型アストロサイトを含むトランスウェルを、全ての MN が完全に付着し、神経突起伸張を示し始めたことが確認された後、MN プレートに移した。1 日後、野生型アストロサイトのトランスウェルを除去し、MN に、H2K cDNA 発現構築物をコード化するレンチウイルス (

10

20

30

40

50

M N 当たり 40 ウイルス粒子)を感染させた。感染の 12 時間後、トランスウェルによる野生型アストロサイトとの共培養を再開した。72 時間後、トランスウェルを除去し、共培養実験を開始した。

【0110】

実施例 23 . ウェスタンブロット

粗タンパク質細胞溶解物を、製造者の推奨に従って組織タンパク質抽出試薬 (Pierce, Rockford, IL)を用いて得た。レーン当たり、20 μ gのタンパク質を、NuPAGE 4 ~ 12 %のBis - Tris ゲル(Invitrogen)上にローディングした。タンパク質を、150 Vで1時間、電気泳動により分離し、その後、Invitrolon PVDF膜(Invitrogen)に移した。該膜をTBS中5%脱脂乳、0.1% トゥイーン - 20で1時間ブロッキングし、次いで、一次抗体と共に一晩インキュベートした。結合した一次抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、次いで、ECLTMウェスタンブロッティング検出試薬(GE Healthcare)を用いる化学発光により検出した。

【0111】

実施例 24 . 生存率および後肢握力

動物。変異SOD1^{G93A}導入遺伝子を高レベルで発現したトランスジェニックのオスおよびメス同腹仔マウスを、グループ間で均等に分けた。SOD1遺伝子コピー数およびSOD1タンパク質発現を、PCRおよびウェスタンブロット分析により確認した。動物を、明暗(12:12時間)サイクル下で、餌および水を自由に摂取できる状況下で飼育した。全ての方法は、全国小児病院施設内動物管理使用委員会により承認を受けたプロトコルを用いて行った。

【0112】

パーフォリンのアデノ随伴ウイルス(AAV)抑制：パーフォリンに対するshRNAまたはスクランブルshRNAをコード化するAAV9ウイルスを作製し、SOD1^{G93A}動物の尾静脈に、3週令にて、 3×10^{11} DNase 耐性粒子/mlの力価で送達した。動物を毎日モニタリングし、正常姿勢を取る(right themselves)能力を評価した。動物を仰向けにした後、該動物が30秒以内にもはや正常姿勢を取れないとき、“死亡”が入力された。“死亡”判断は、評価の時点で処理を知らされていない2人によって行われた。後肢握力の試験は握力計を用いて行われ、毎週試験された。簡単には、動物を自分の後脚でプラットフォーム上に踏ん張らせておき、該動物がプラットフォームから手を放すまでそれを引っ張り、生じた最大力を記録する。図8および9に示す通り、パーフォリンに対するshRNAで処理されたSOD1^{G93A}マウスは、対照に対して経時的に増加した生存率および増加した後肢の握力を示した。

【0113】

実施例 25 . H2K ORF 配列

AGTGTCCGCGCGACGCTGGATATAAAGTCCACGCAGCCCGCAGAACTCAGAAGTCGCGAATCGCCGACAGGTGCGAT
GGTACCGTGACGCTGCTCCTGCTGTTGGCGGCCGCCCTGGCTCCGACTCAGACCCGCGCGGGCCACACTCGCTGAGGT
ATTTCGTCACCGCCGTGTCCCGGCCCGCCCTCGGGGAGCCCCGGTACATGGAAGTCGGCTACGTGGACGACACGGAGTTC
GTGCGCTTCGACAGCGACGCGGAGAATCCGAGATATGAGCCGCGGGCGCGGTGGATGGAGCAGGAGGGGGCCGAGTATTG
GGAGCGGGAGACACAGAAAGCCAAGGGCAATGAGCAGAGTTTCCGAGTGGACCTGAGGACCCTGCTCGGCTACTACAACC
AGAGCAAGGGCGGCTCTCACACTATTCAGGTGATCTCTGGCTGTGAAGTGGGGTCCGACGGGCGACTCCTCCGCGGGTAC
CAGCAGTACGCCTACGACGGCTGCGATTACATCGCCCTGAACGAAGACCTGAAAACGTGGACGGCGGGCGGACATGGCGGC
GCTGATCACAAACACAAGTGGGAGCAGGCTGGTGAAGCAGAGAGACTCAGGGCTACCTGGAGGGCAGGTGCGTGAGT
GGCTCCGCAGATACCTGAAGAACGGGAACGCGACGCTGCTGCGCACAGATTCCCCAAAGGCCCATGTGACCCATCACAGC
AGACCTGAAGATAAAGTCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCTGACATCACCTGACCTGGCAGTTGAA
TGGGGAGGAGCTGATCCAGGACATGGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCATCTG
TGGTGGTGCCTCTTGGGAAGGAGCAGTATTACACATGCCATGTGTACCATCAGGGGCTGCCTGAGCCCCCTACCCTGAGA
TGGGAGCCTCCTCCATCCACTGTCTCAACATGGCGACCGTTGCTGTTCTGTTGCTTGGAGCTGCAATAGTCACTGG
AGCTGTGGTGGCTTTTGTGATGAAGATGAGAAGGAGAAACACAGGTGAAAAAGGAGGGGACTATGCTCTGGCTCCAGGCT
CCCAGACCTCTGATCTGTCTCTCCAGATTGTAAAGTGATGGTTCATGACCCTCATTCTCTAGCGTGAAGACAGCTGCCT

GGAGTGGACTTGGTGACAGACAATGTCTTCTCATATCTCCTGTGACATCCAGAGCCCTCAGTTCTCTTTAGTCAAGTGTC
 TGATGTTCCCTGTGAGCCTATGGACTCAATGTGAAGAACTGTGGAGCCCAGTCCACCCCTCTACACCAGGACCCTGTCCC
 TGCACTGCTCTGTCTTCCCTTCCACAGCCAACCTTGCTGGTTCAGCCAAACACTGAGGGACATCTGTAGCCTGTCAGCTC
 CATGCTACCCTGACCTGCAACTCCTCACTTCCACACTGAGAATAATAATTTGAATGTAACCTTGATTGTTATCATCTTGA
 CCTAGGGCTGATTTCTTGTTAATTTTCATGGATTGAGAATGCTTAGAGGTTTTGTTTGTTTGTTTGATTGATTTGTTTTTT
 TGAAGAAATAAATGATAGATGAATAAACTTCCAGAATCTGGGTCACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA。

【 0 1 1 4 】

実施例 2 6 . 統計分析

全ての統計的試験は、群間の平均誤差のBonferroniの事後解析に続く分散多方向分析により行った(GraphPad Prism, San Diego, CA)。各実験は、3または4回繰り返し、各々トリPLICATEを使用した。

10

【 図 2 B 】

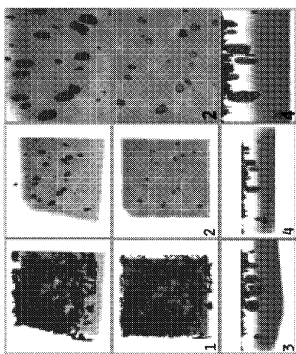
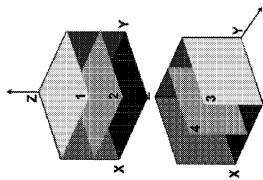


FIG. 2B



B

【 図 2 D 】

D

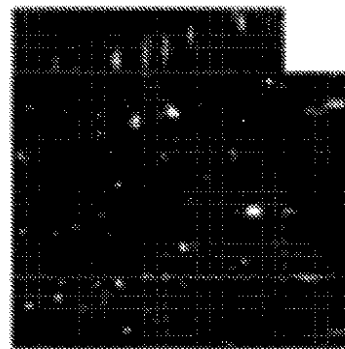


FIG. 2D

【 図 2 J 】

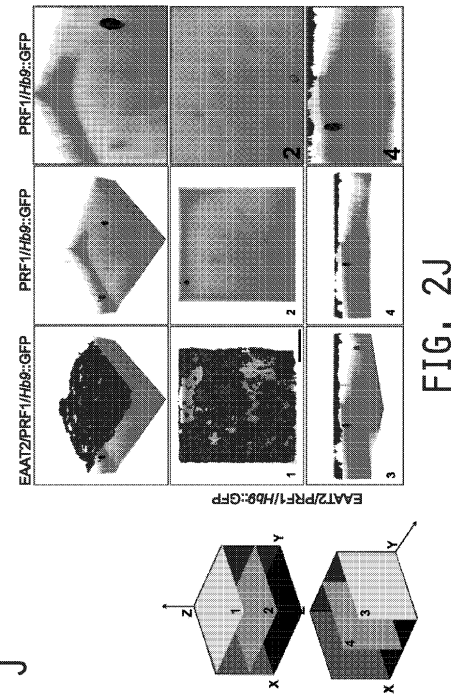


FIG. 2J

【 図 8 】

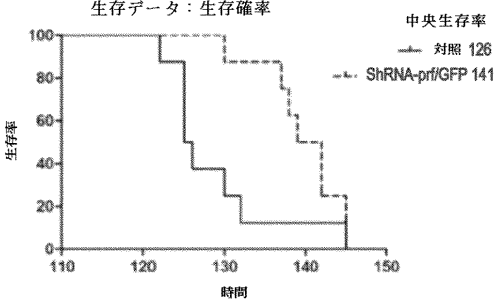


FIG. 8



FIG. 1A

【図 1 B】

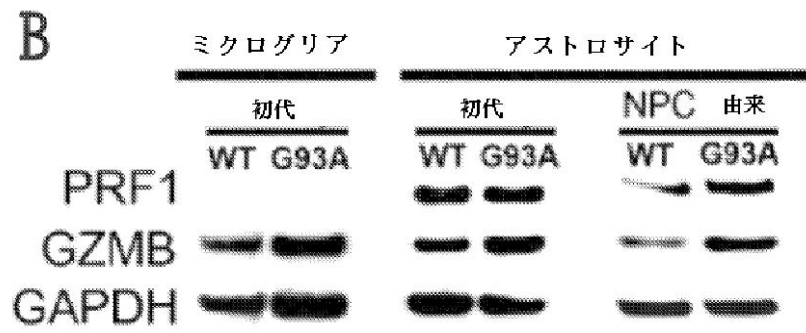


FIG. 1B

【図 1 C】

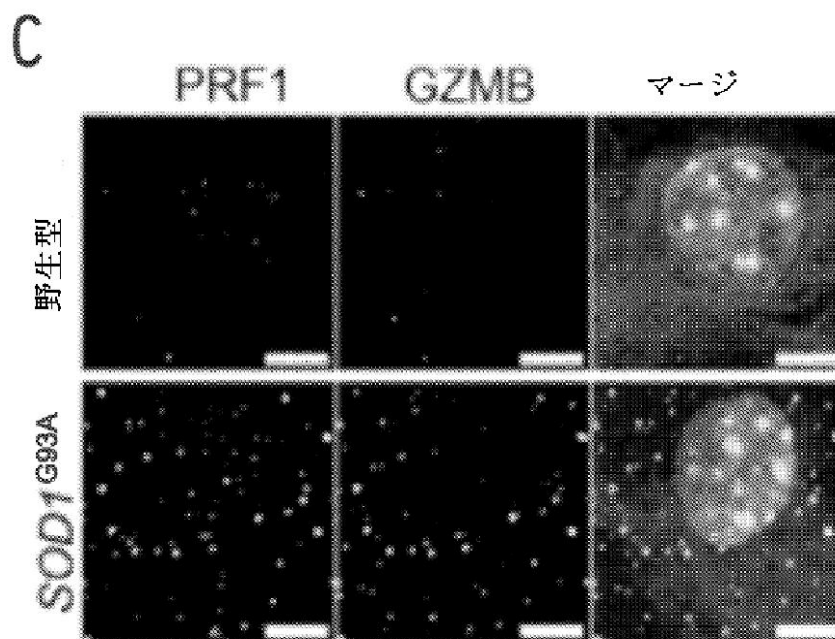


FIG. 1C

【図 1 D】

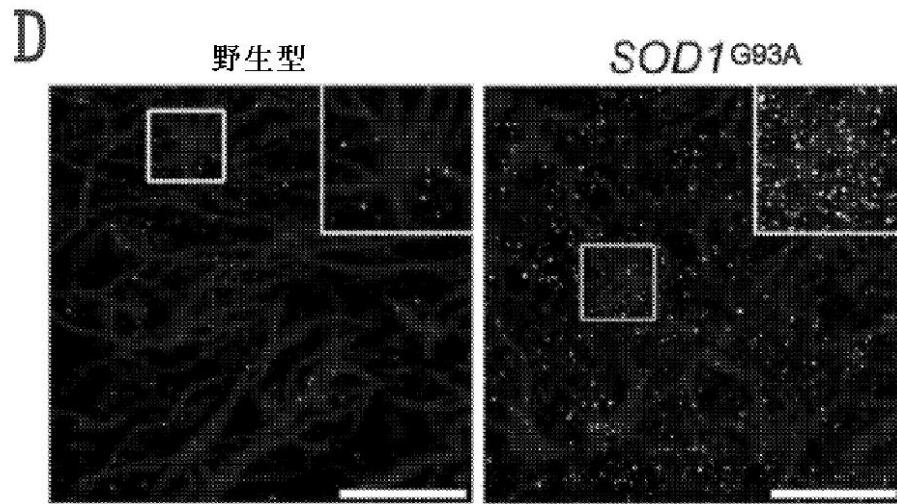


FIG. 1D

【図 1 E】

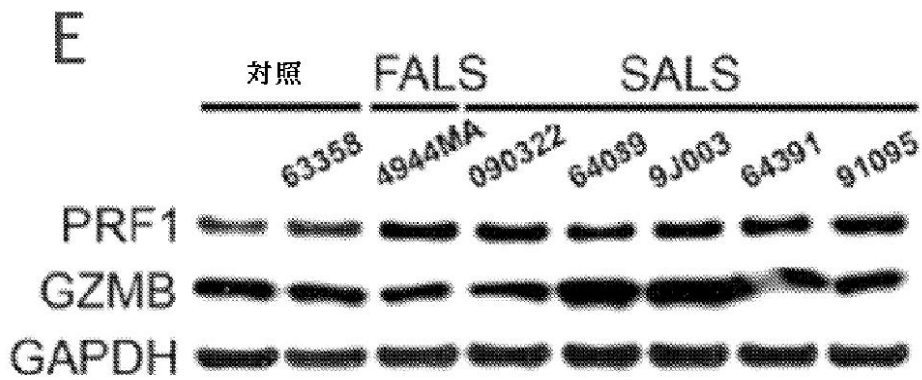


FIG. 1E

【 図 1 F 】

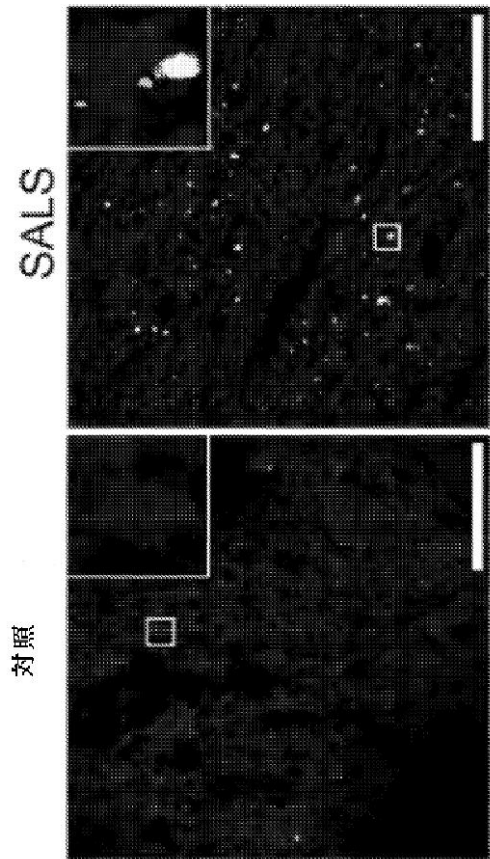


FIG. 1F

F

【 図 1 G 】

G

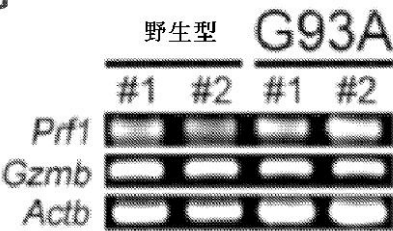


FIG. 1G

【図 1 H】

H

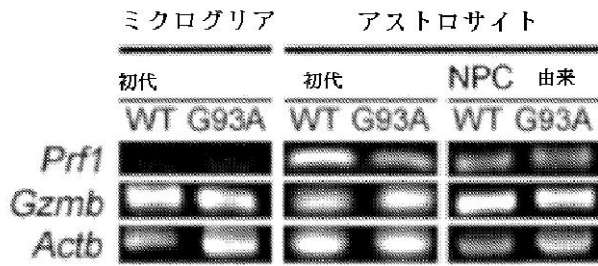


FIG. 1H

【図 1 I】

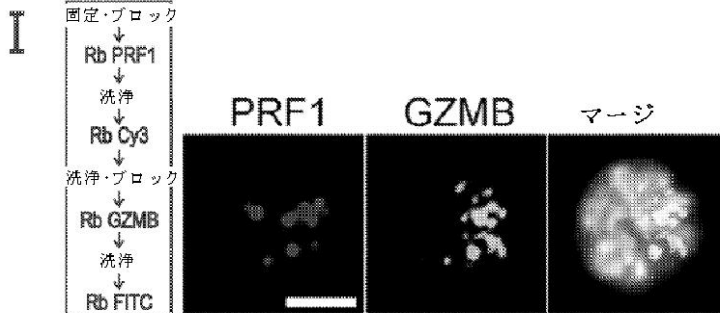


FIG. 1I

【図 1 J】

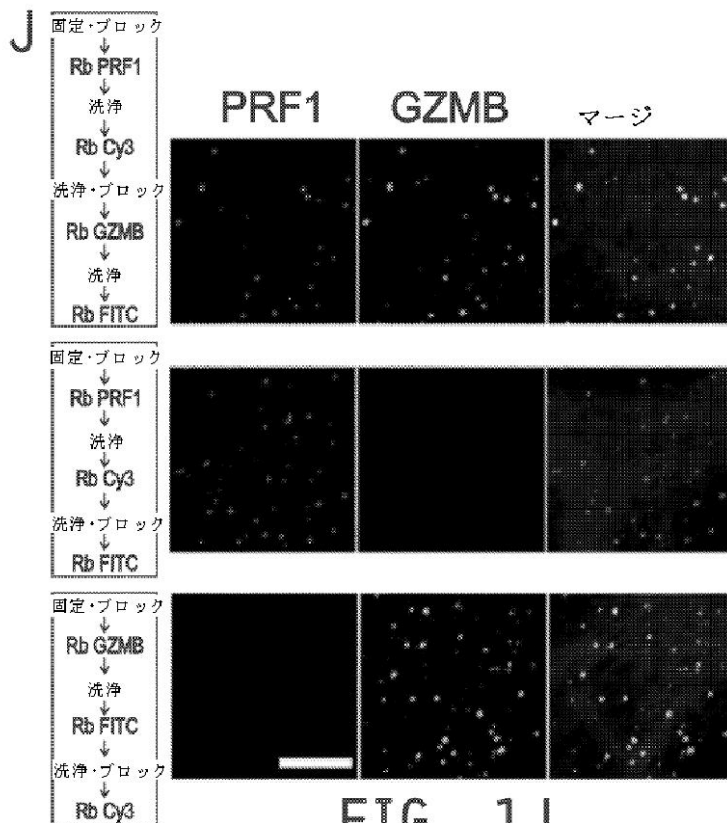


FIG. 1J

【図 2 A】

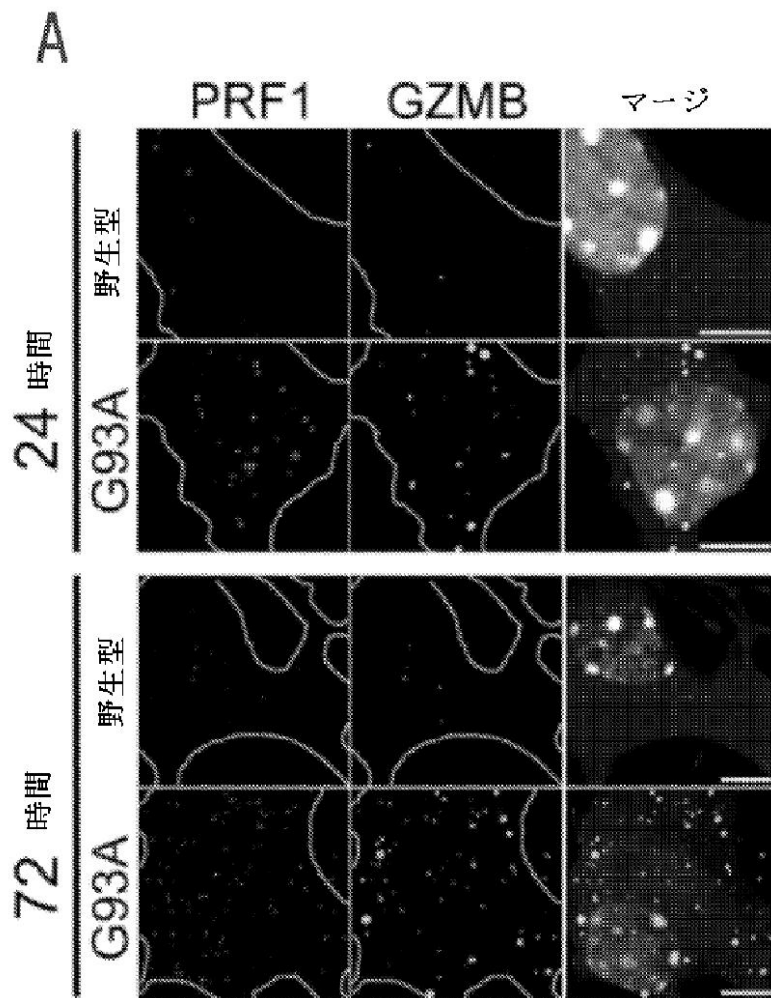


FIG. 2A

【図 2 C】

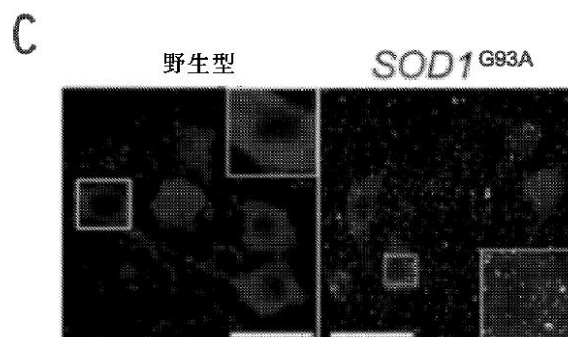
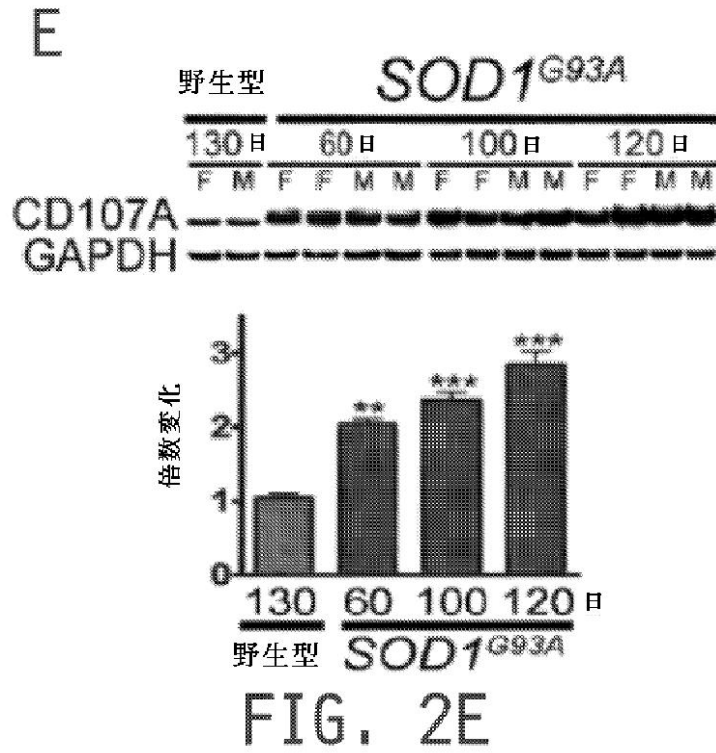
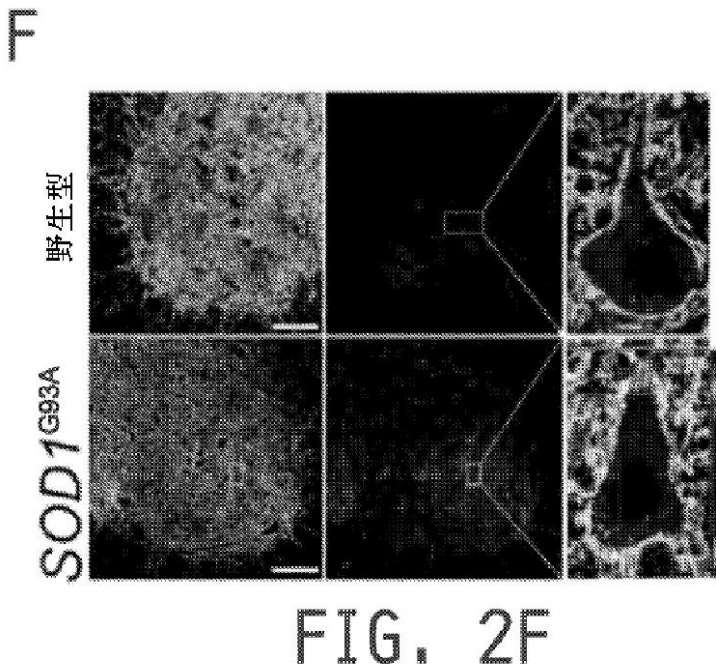


FIG. 2C

【図 2 E】



【図 2 F】



【図 2 G】

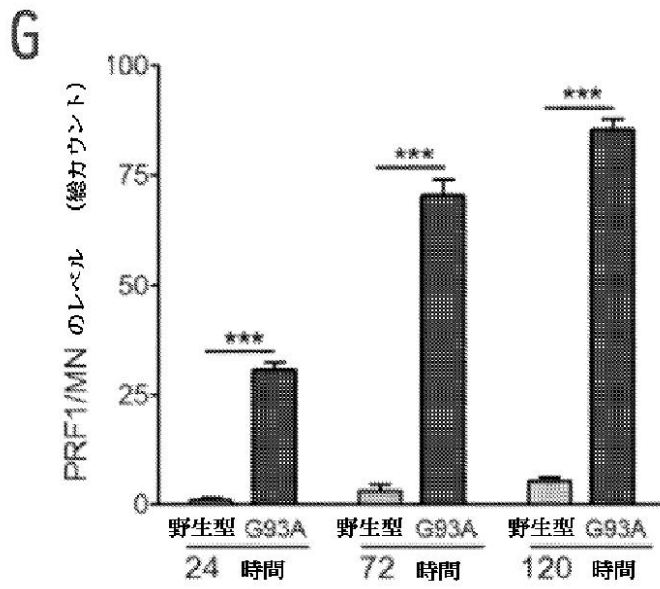


FIG. 2G

【図 2 H】

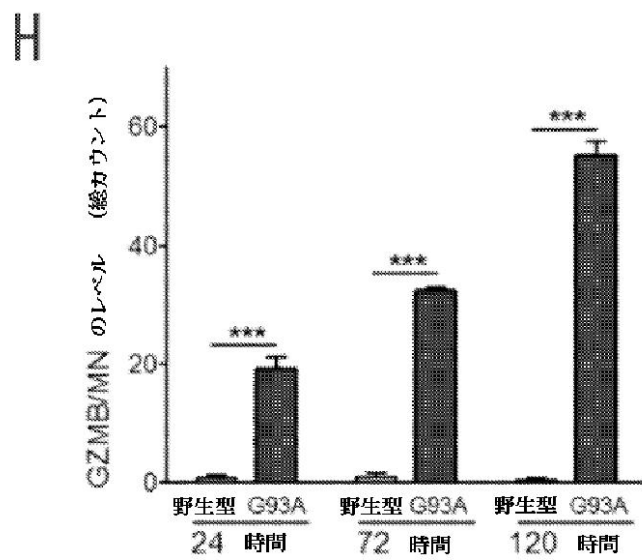


FIG. 2H

【図 2 I】

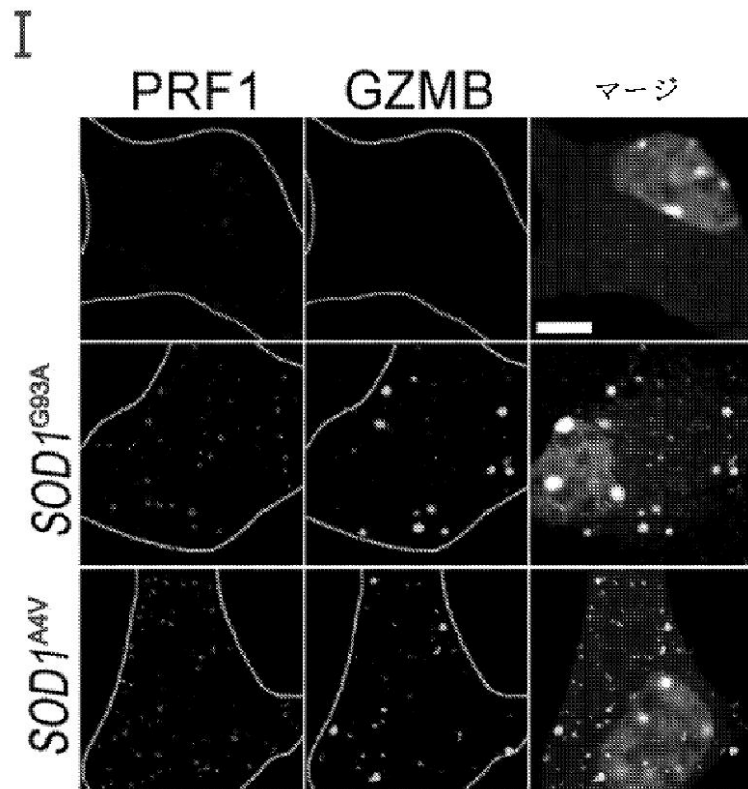


FIG. 2I

【図 2 K】

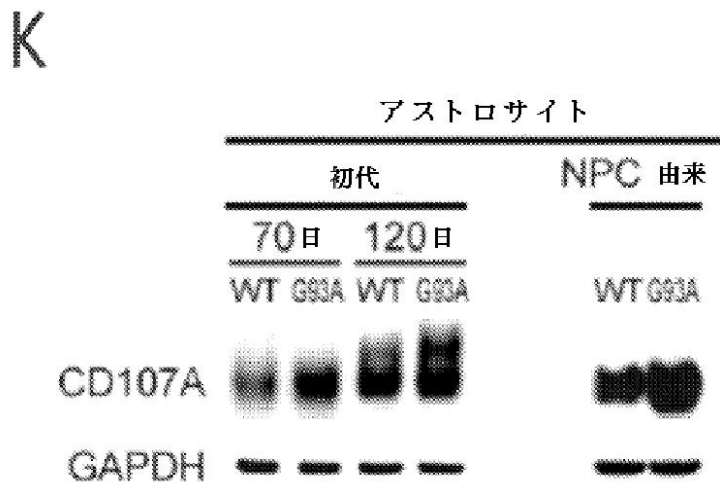


FIG. 2K

【図 2 L】

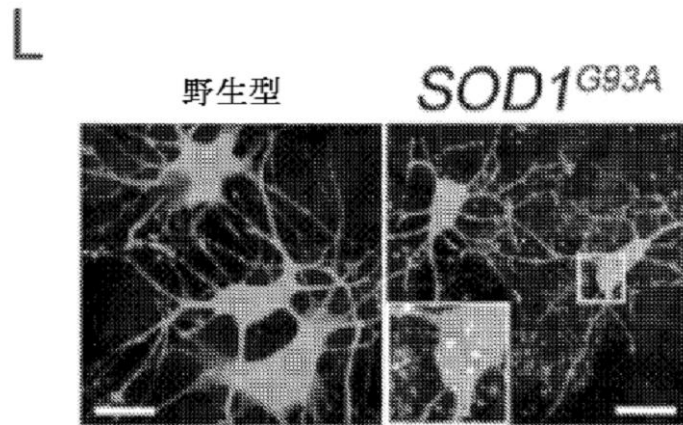


FIG. 2L

【図 3 A】

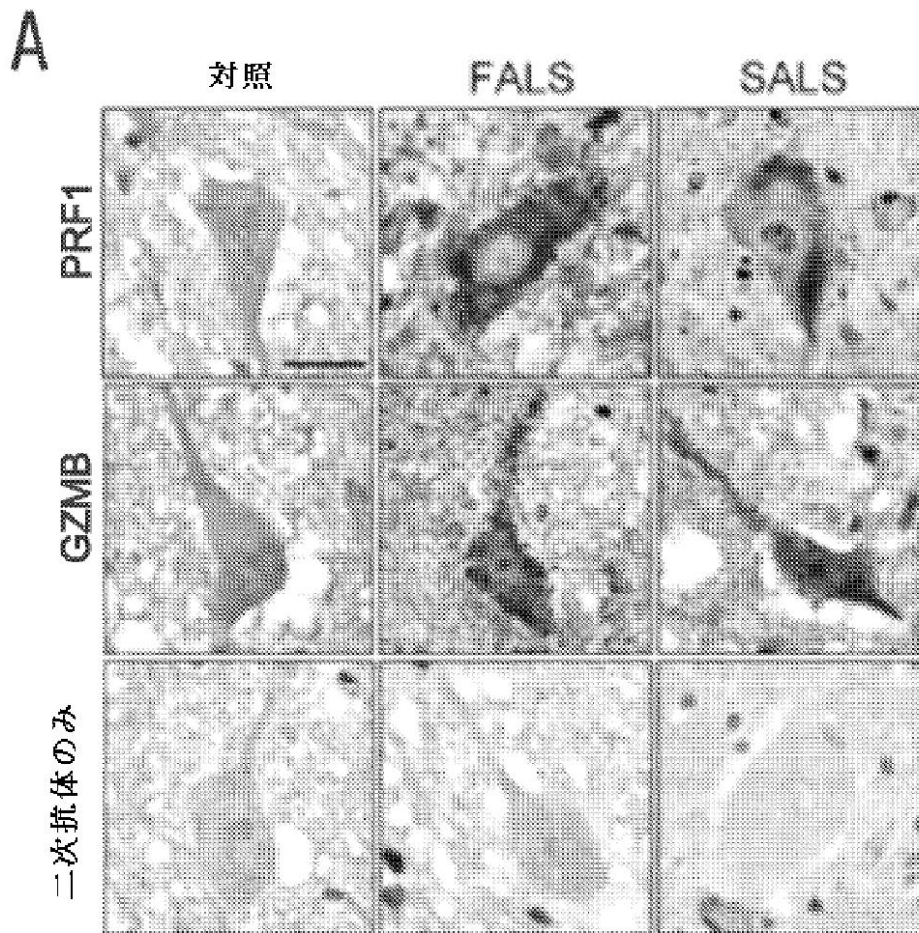


FIG. 3A

【図 3 B】

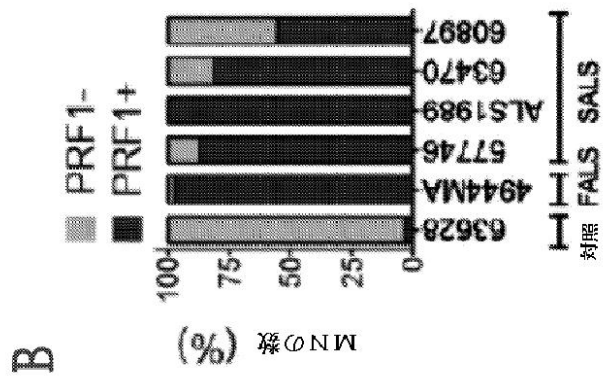


FIG. 3B

【図 3 C】

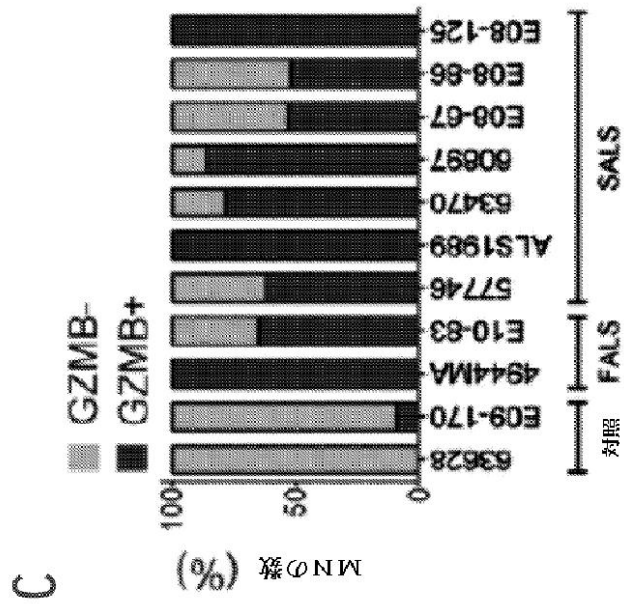


FIG. 3C

【図 4 A】

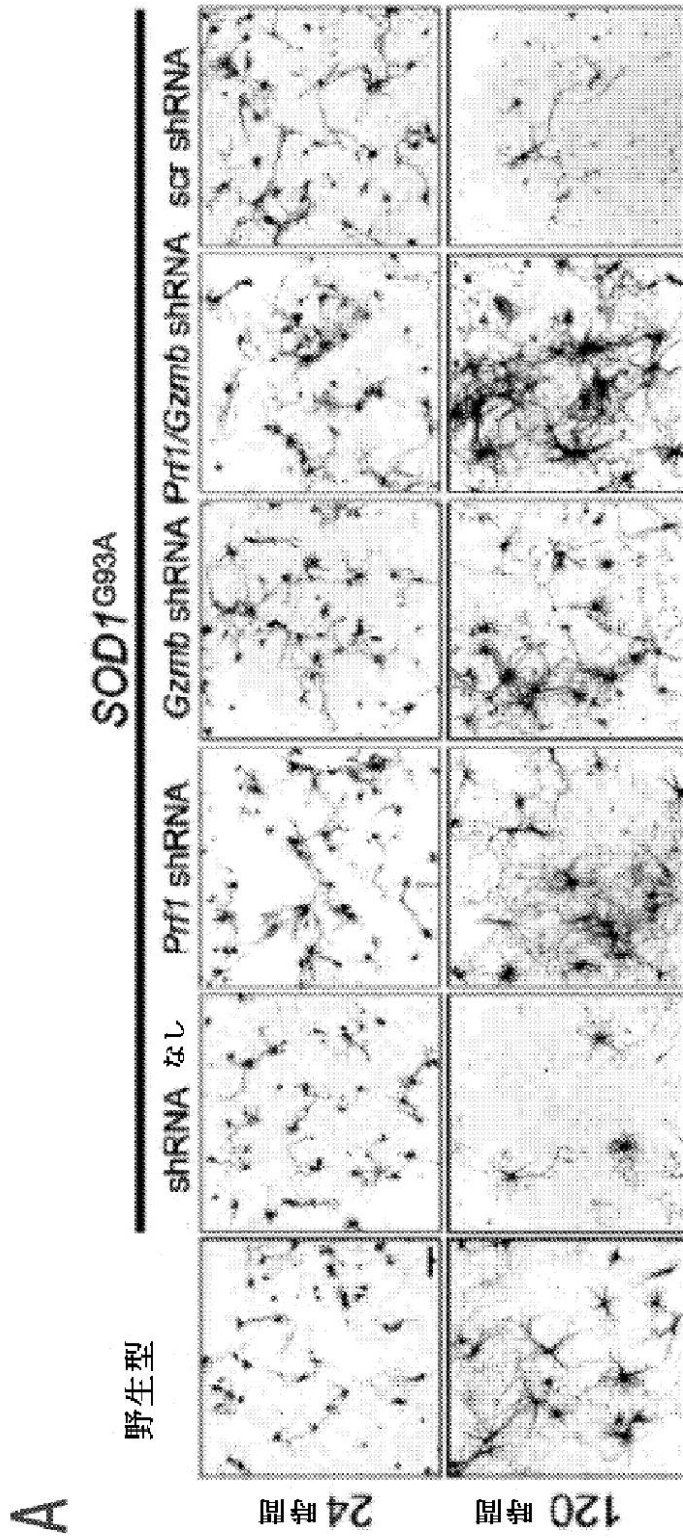


FIG. 4A

【 図 4 B 】

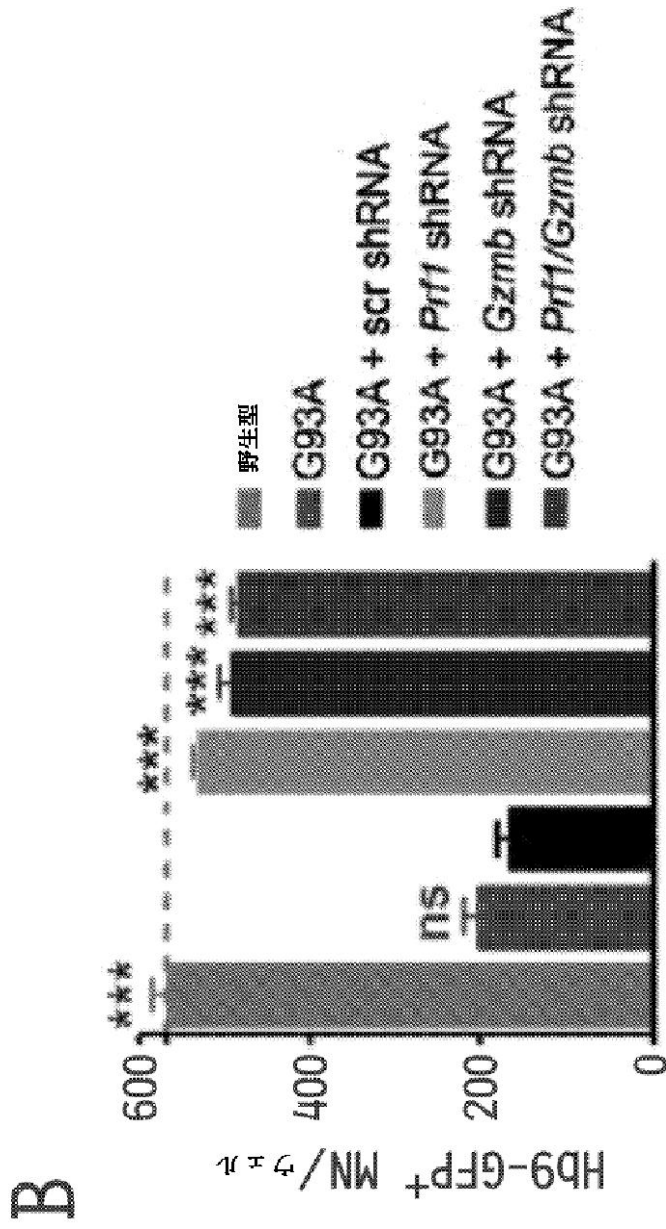
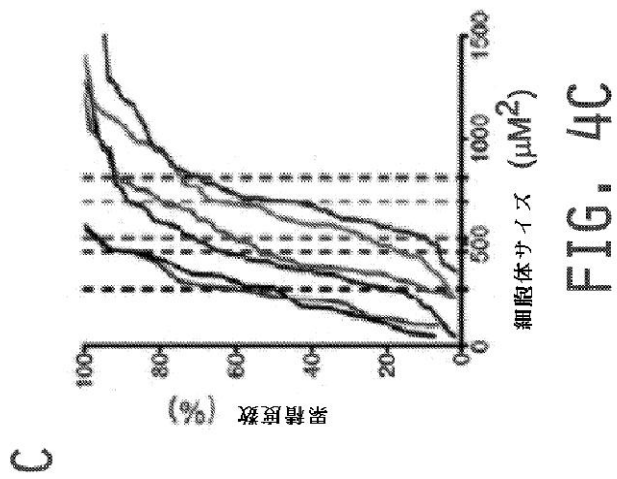


FIG. 4B

【 図 4 C 】



【図 4 D】

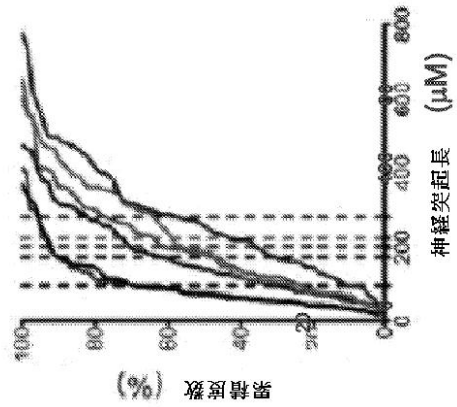


FIG. 4D

【図 4 E】

E

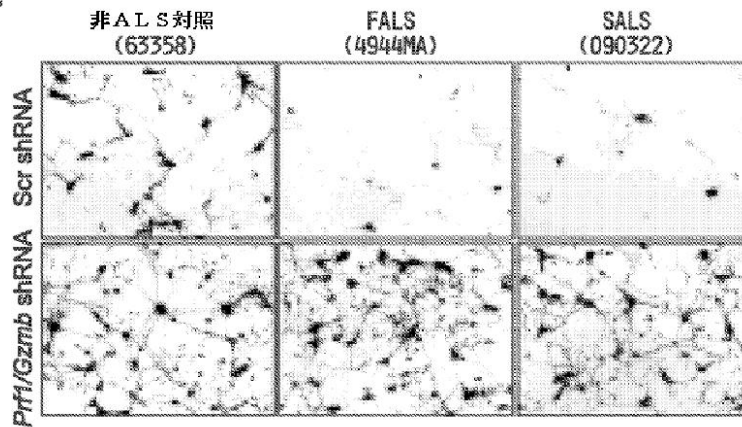


FIG. 4E

【図 4 F】

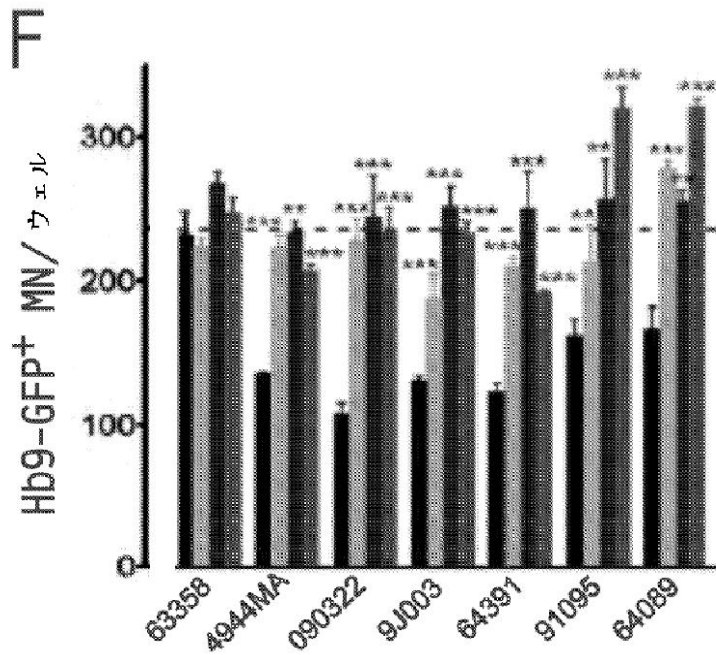
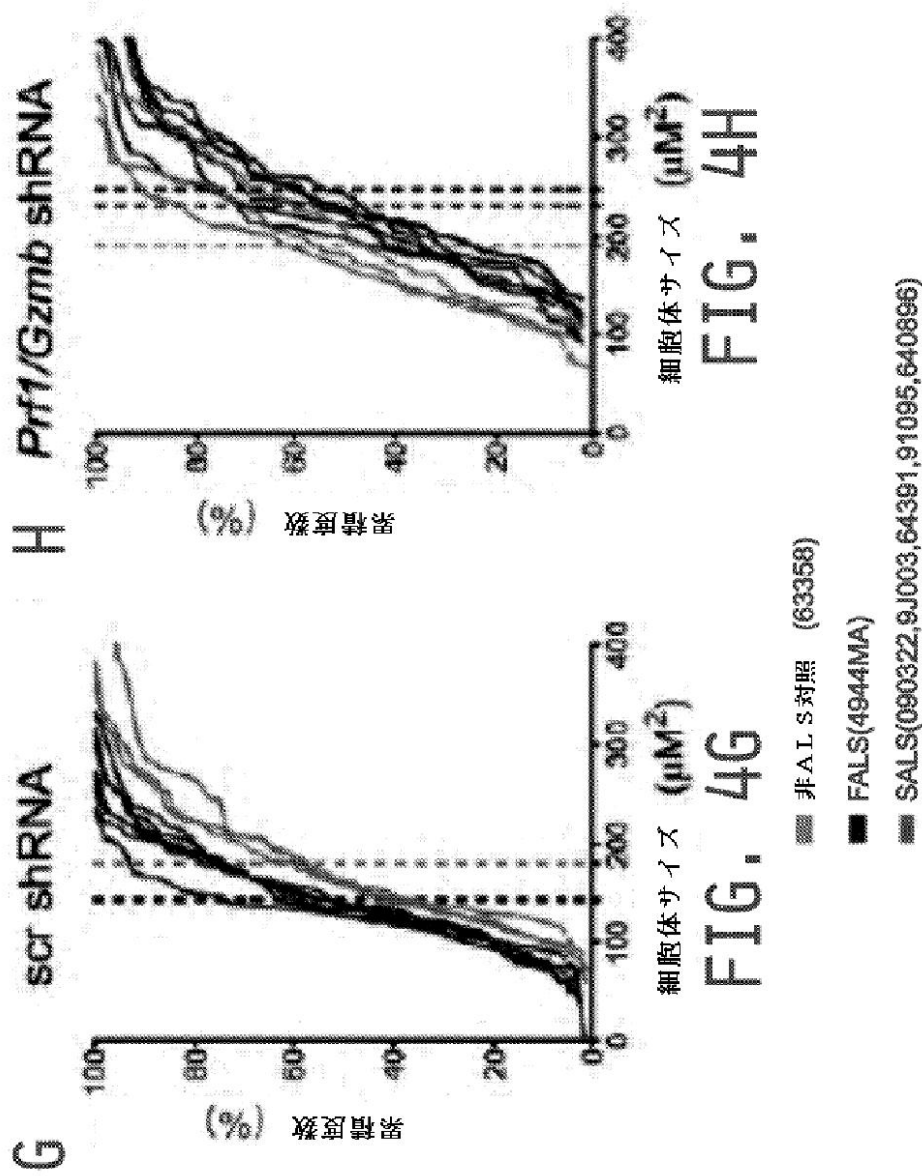


FIG. 4F

【図 4 G - H】



【図 4 I - J】

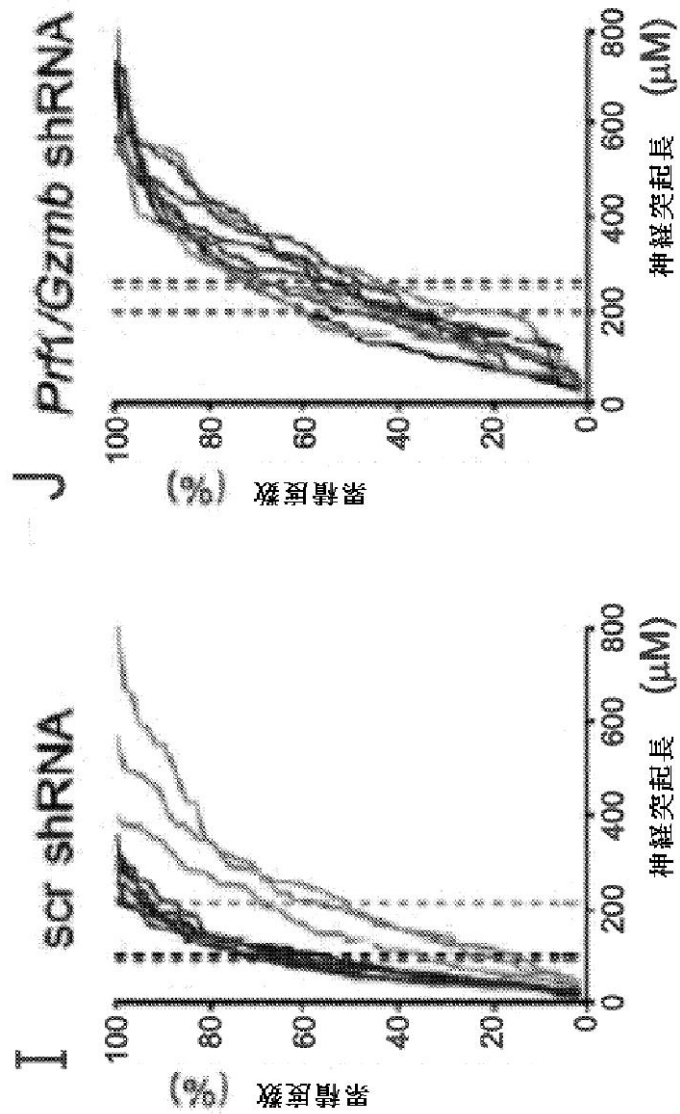


FIG. 4I

FIG. 4J

【図 4 K】

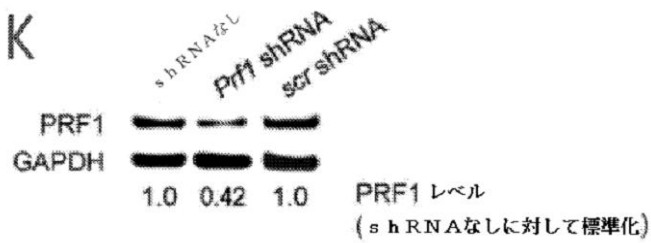


FIG. 4K

【図 4 L】

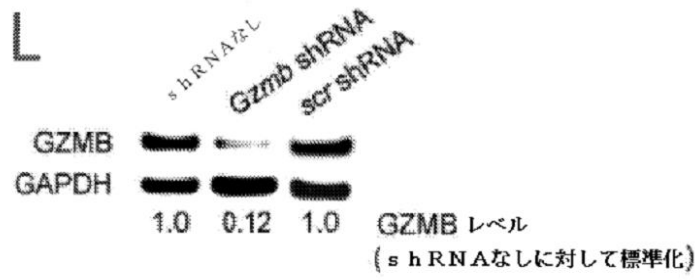


FIG. 4L

【図 4 M】

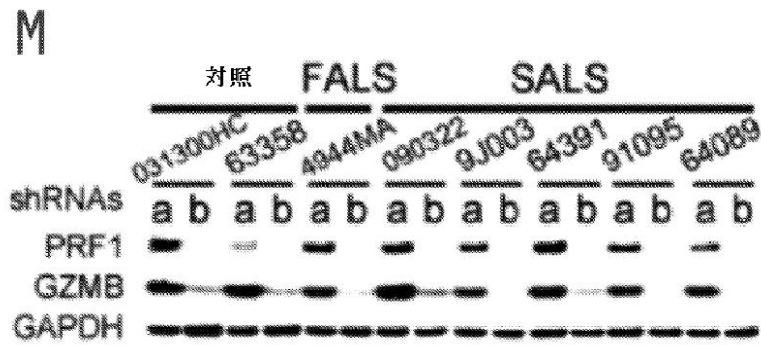


FIG. 4M

【図 5 A】

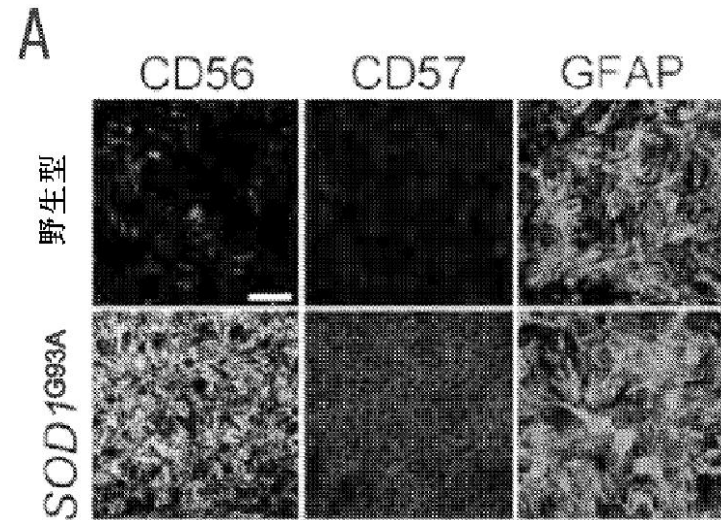


FIG. 5A

【図 5 B】

B

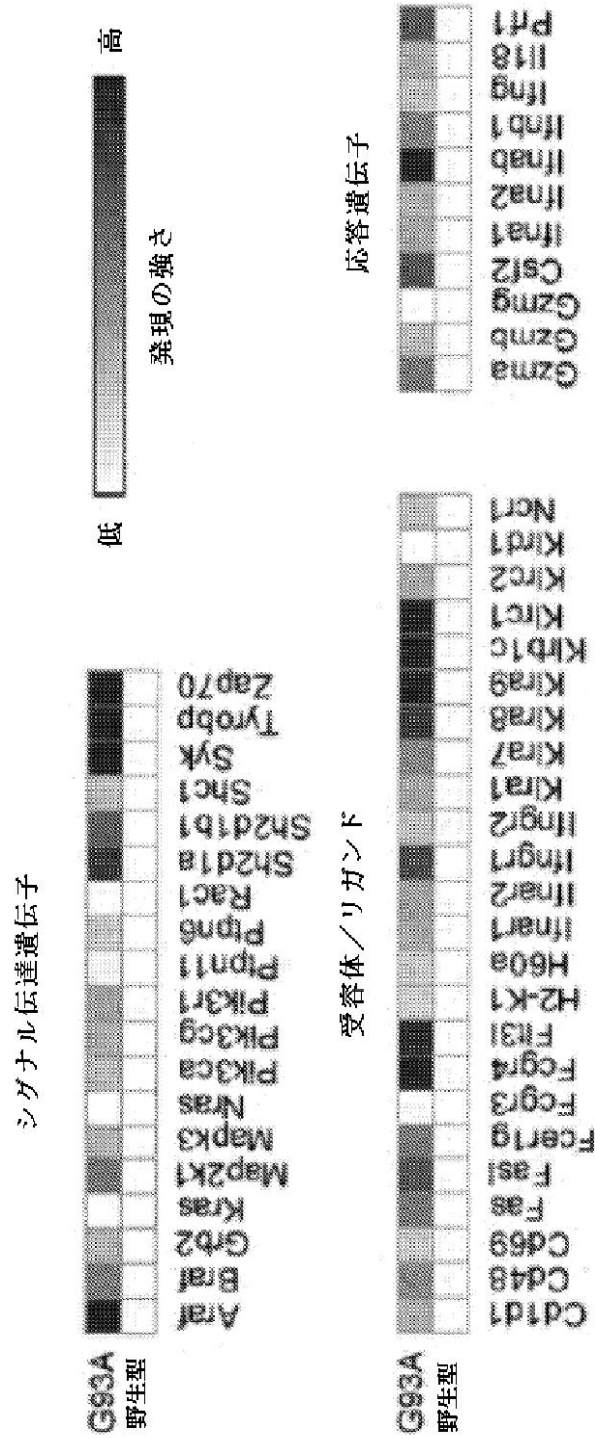


FIG. 5B

【図 5 C】

C

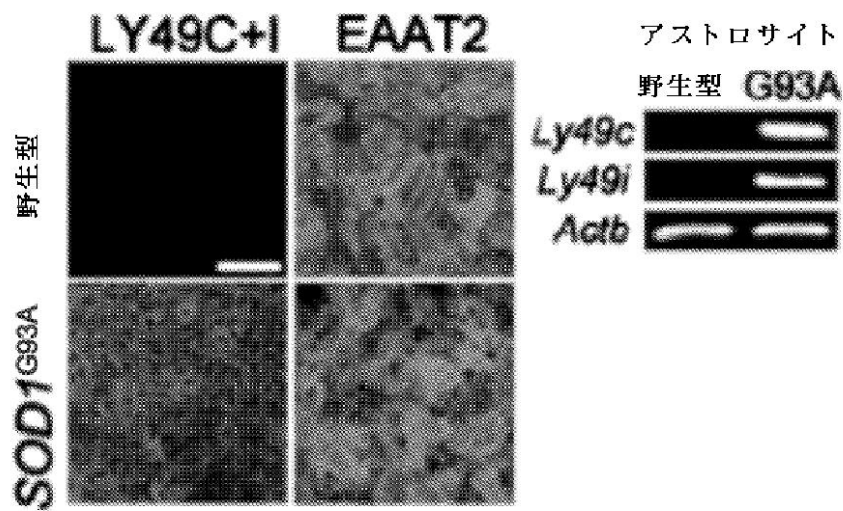


FIG. 5C

【図 5 D】

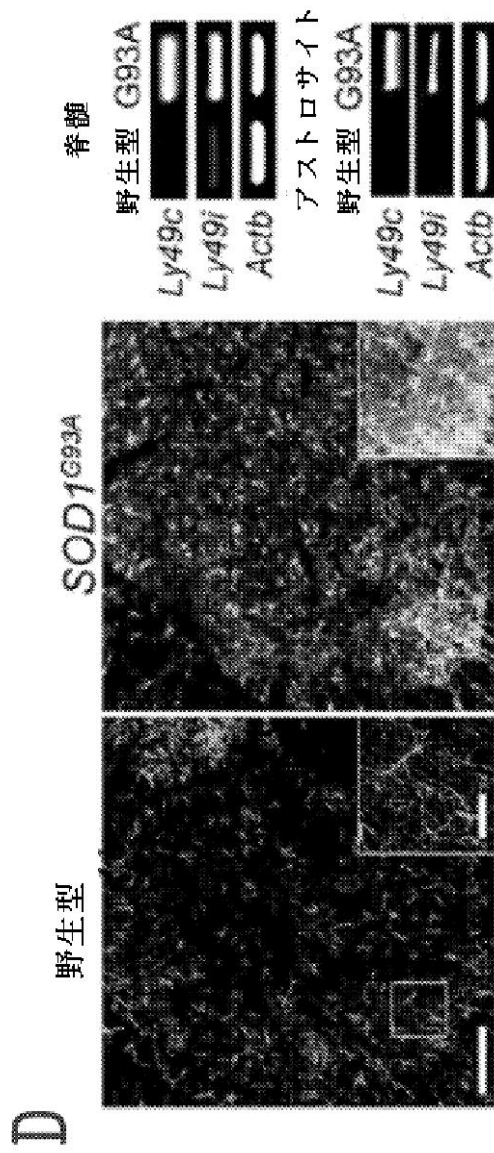
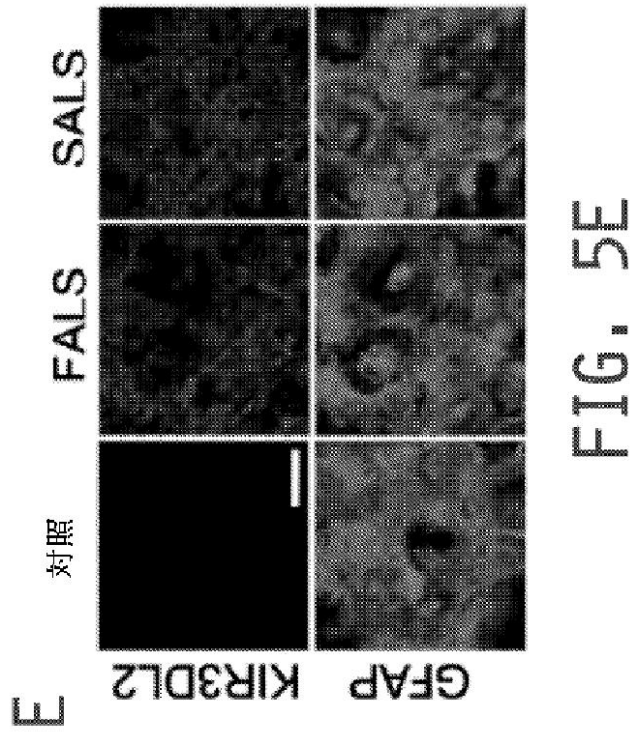
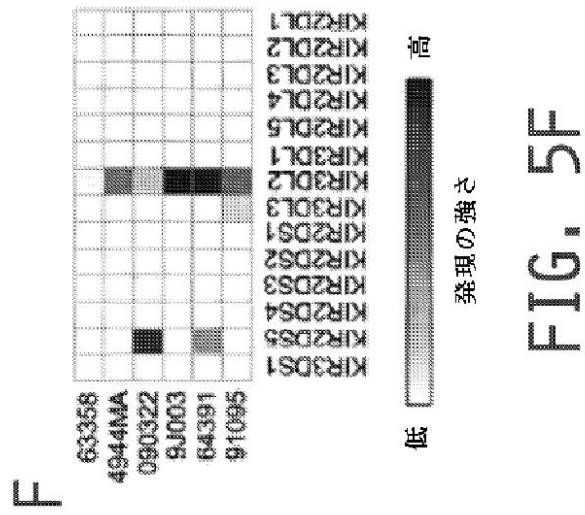


FIG. 5D

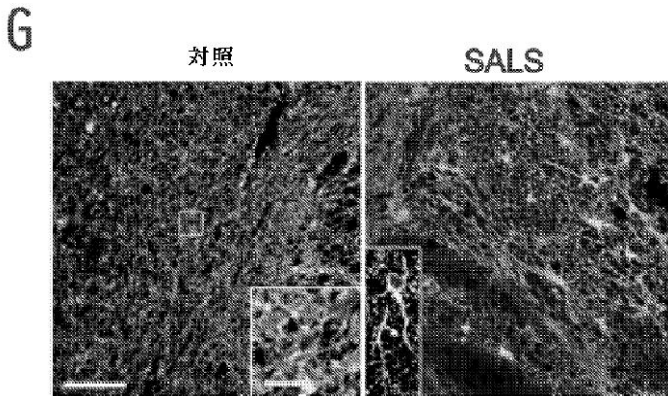
【図 5 E】



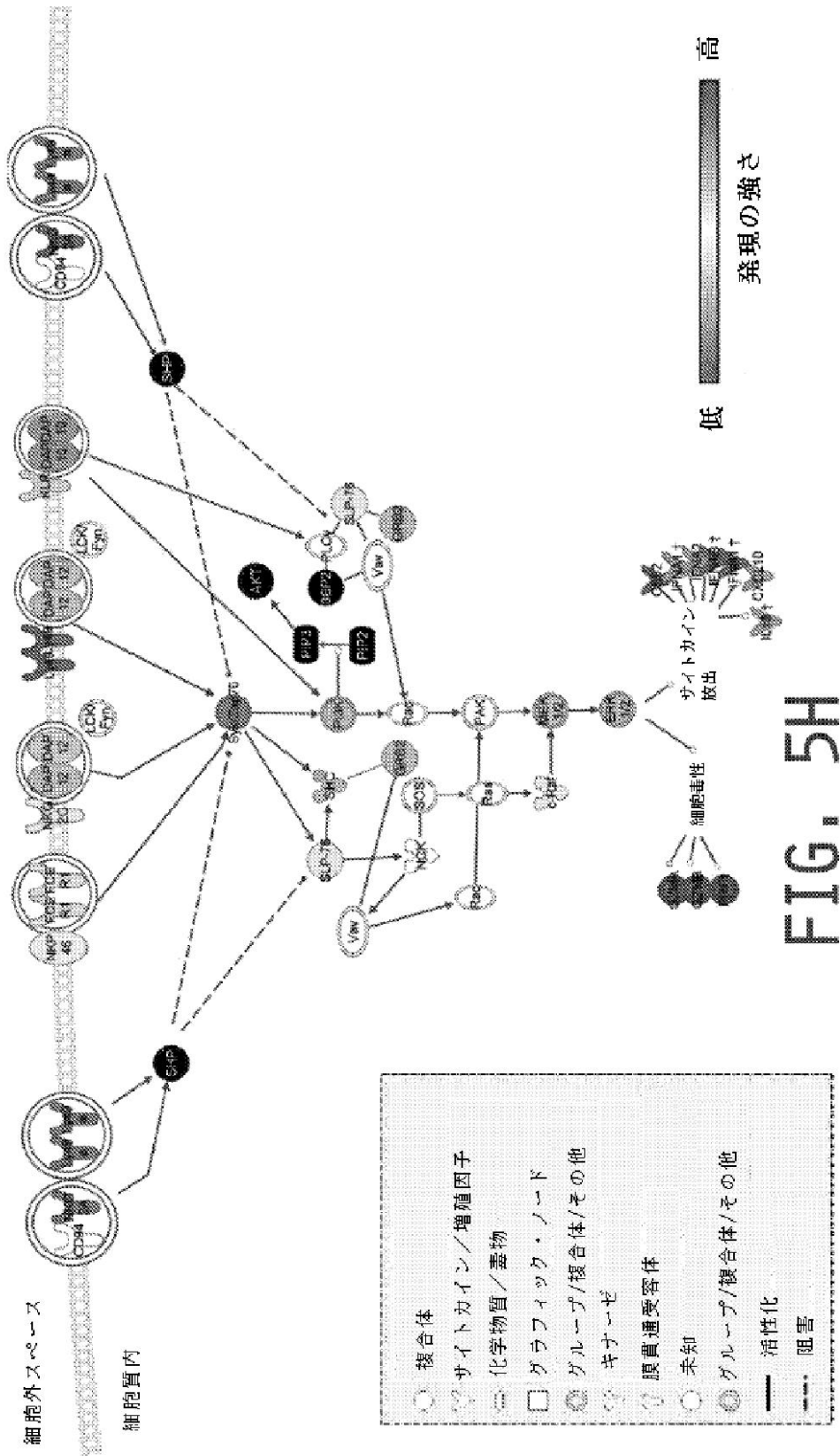
【図 5 F】



【図 5 G】



【図 5 H】



【図 6 A】

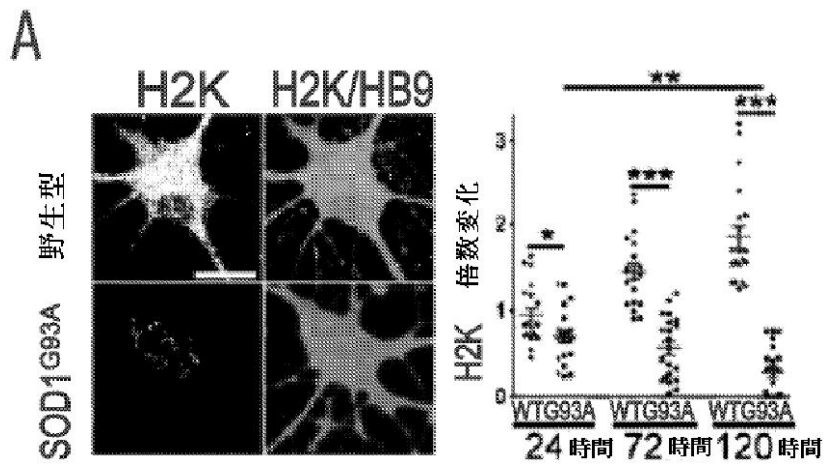


FIG. 6A

【図 6 B】

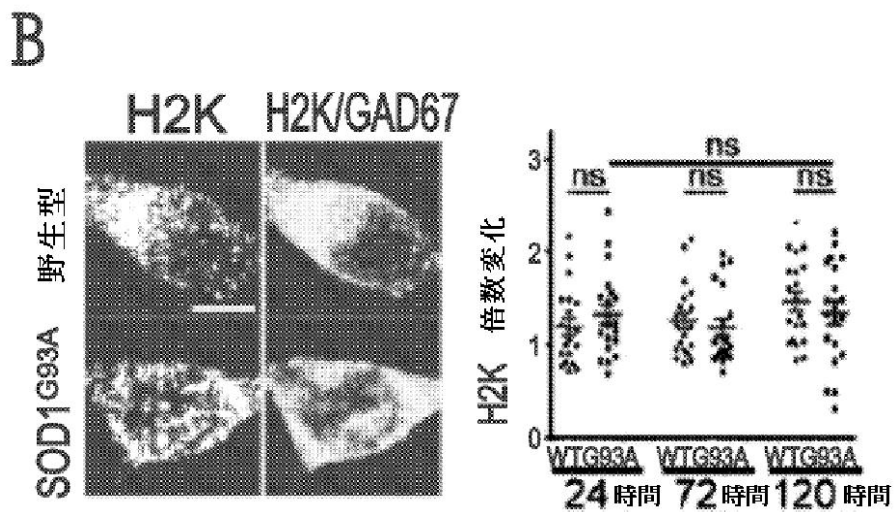


FIG. 6B

【図 6 C】

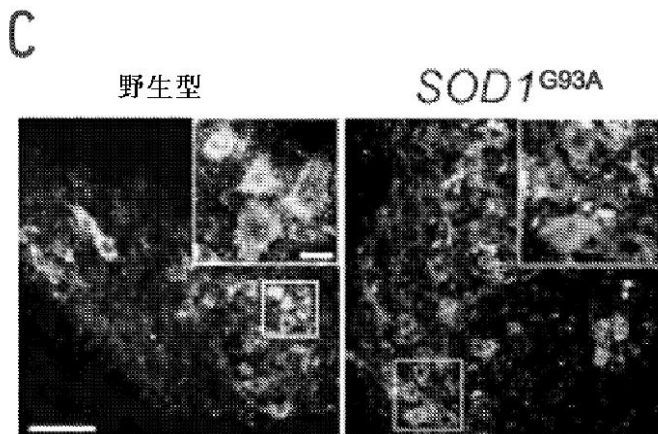


FIG. 6C

【図 6 D】

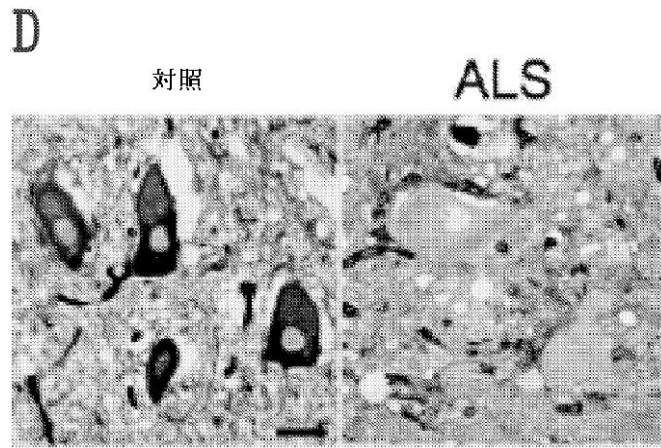


FIG. 6D

【図 6 E】

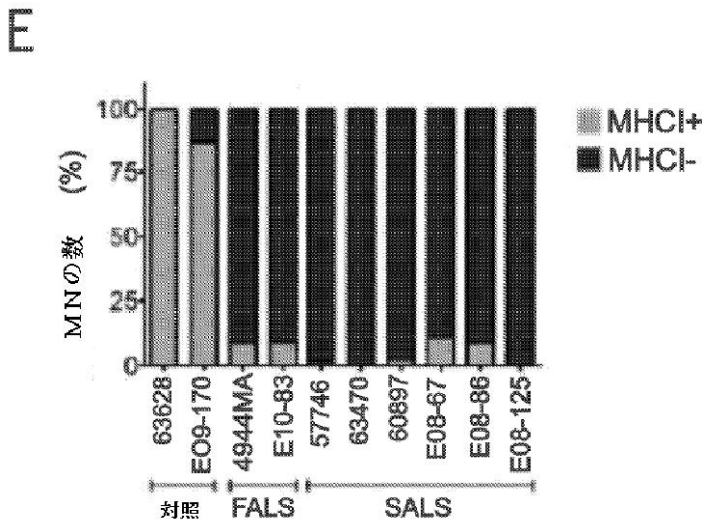


FIG. 6E

【図 6 F】

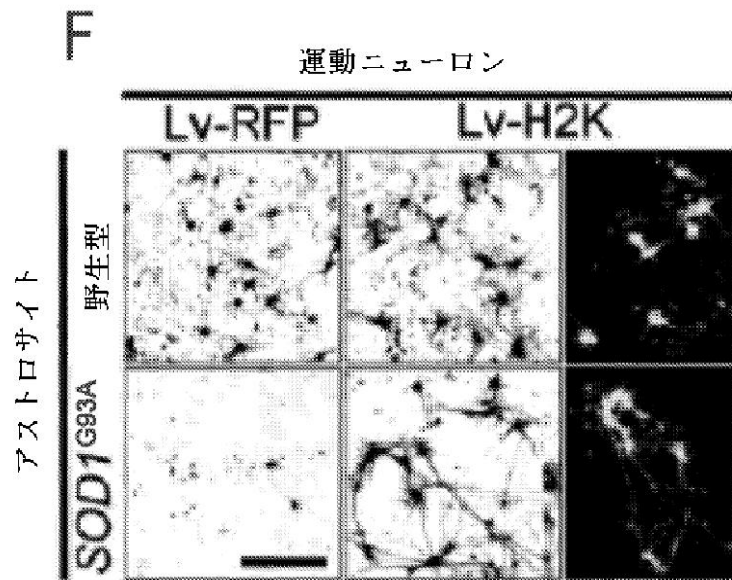


FIG. 6F

【図 6 G】

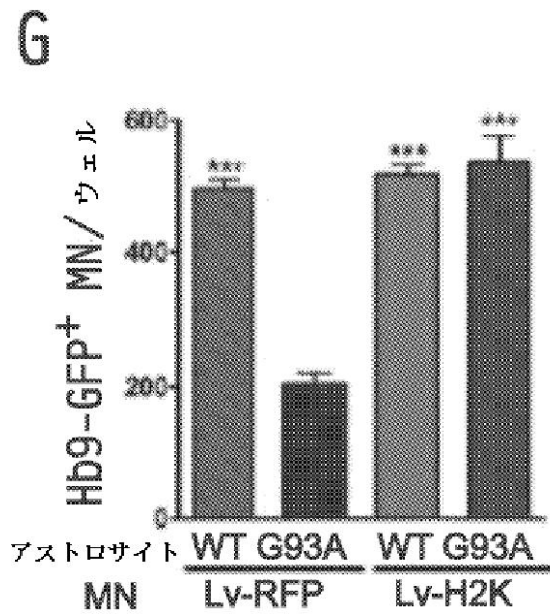


FIG. 6G

【図 6 H】

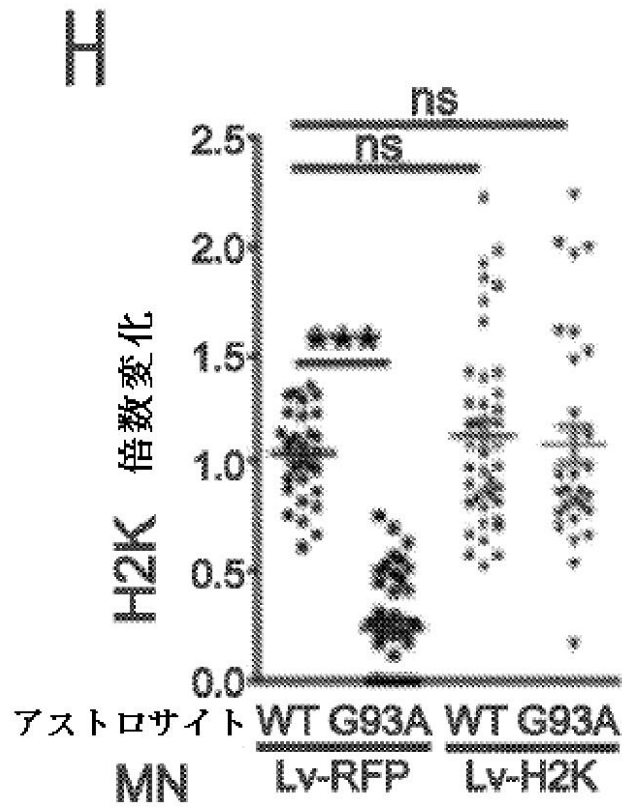


FIG. 6H

【図 6 I】

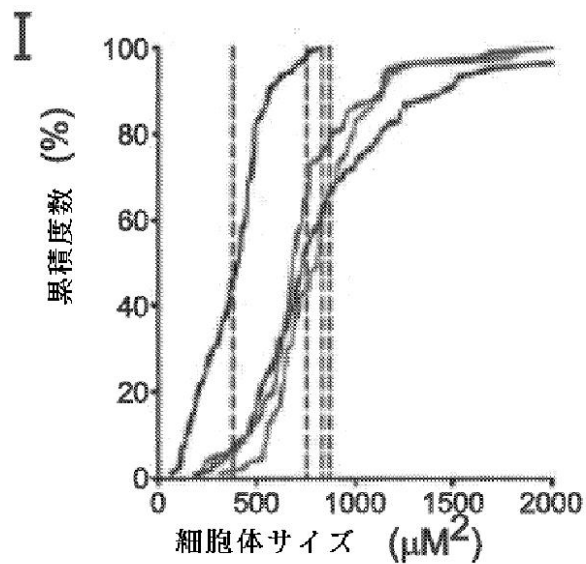


FIG. 6I

【図 6 J】

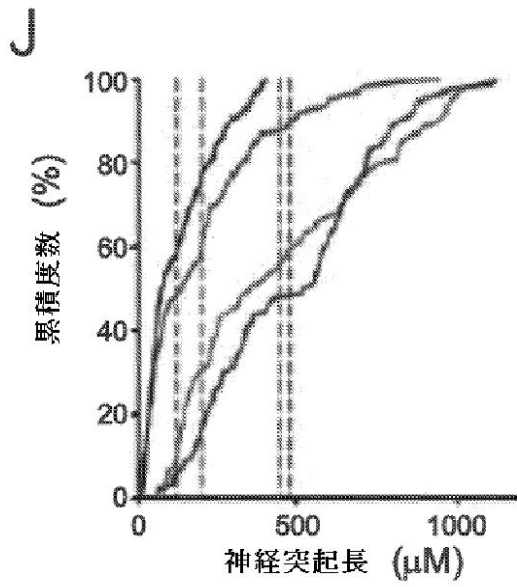


FIG. 6J

【図 6 K】

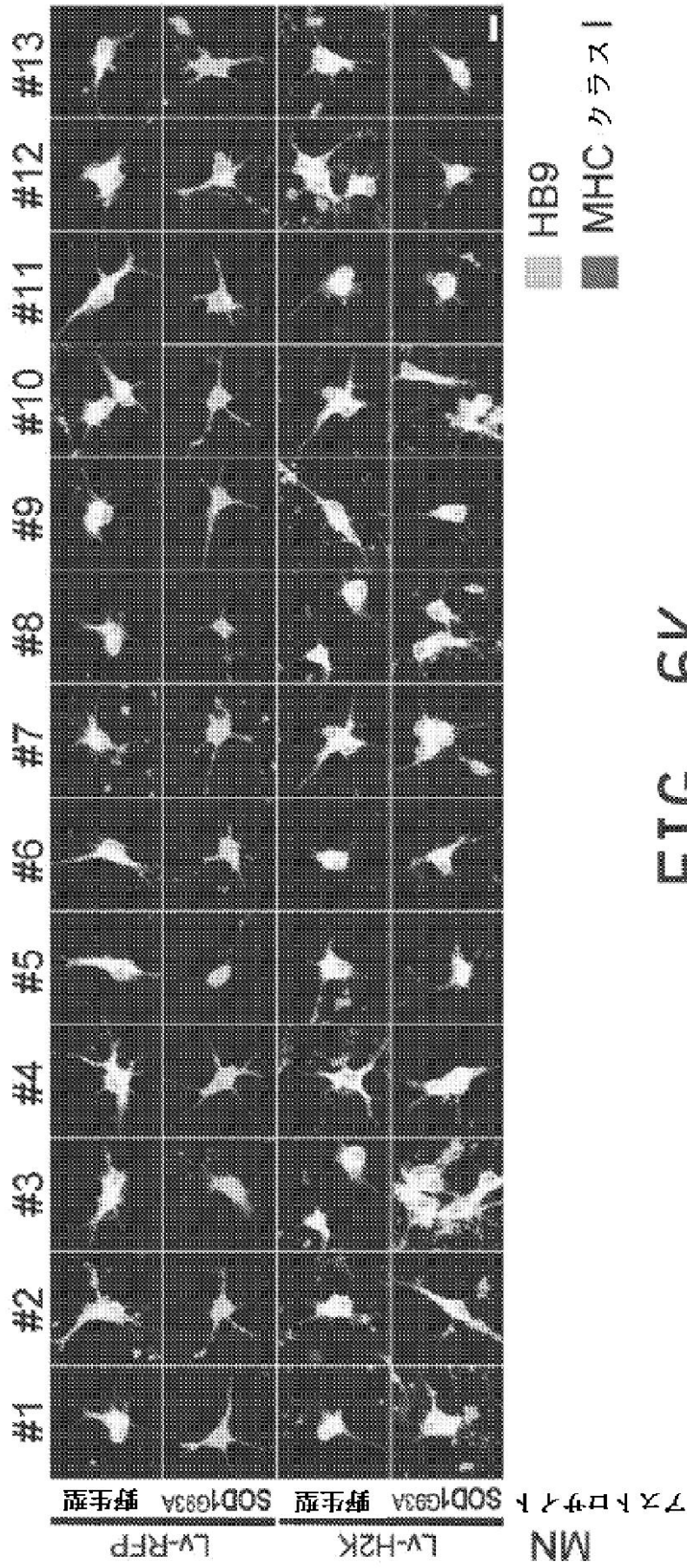


FIG. 6K

【図 7】

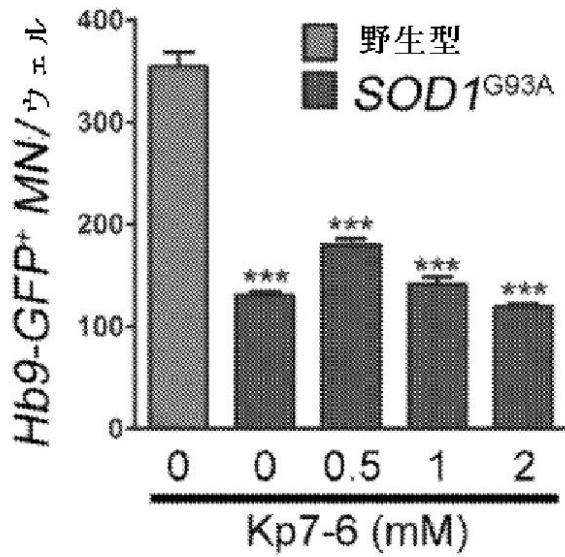


FIG. 7

【図 9】

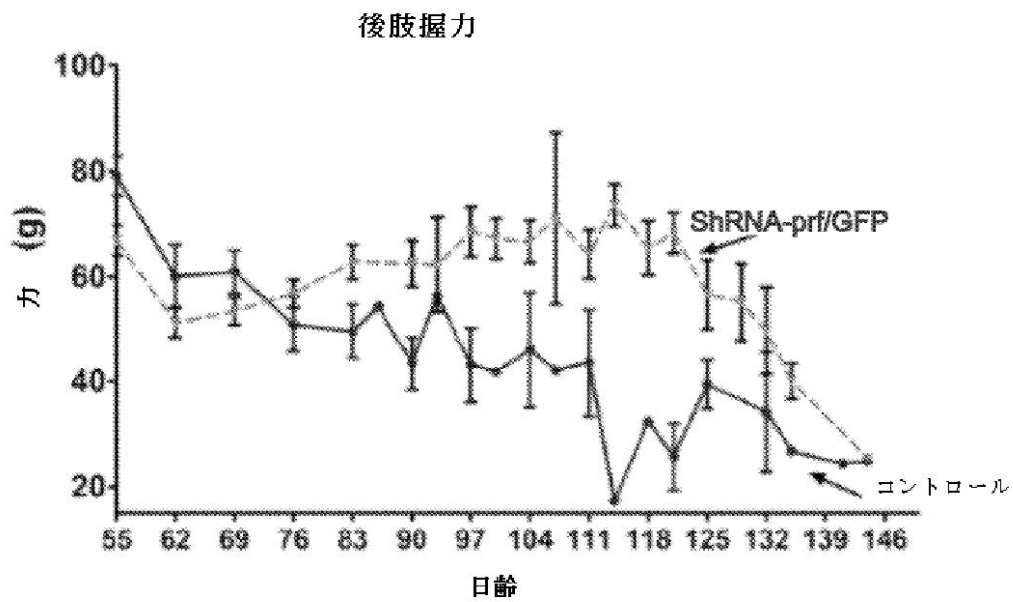
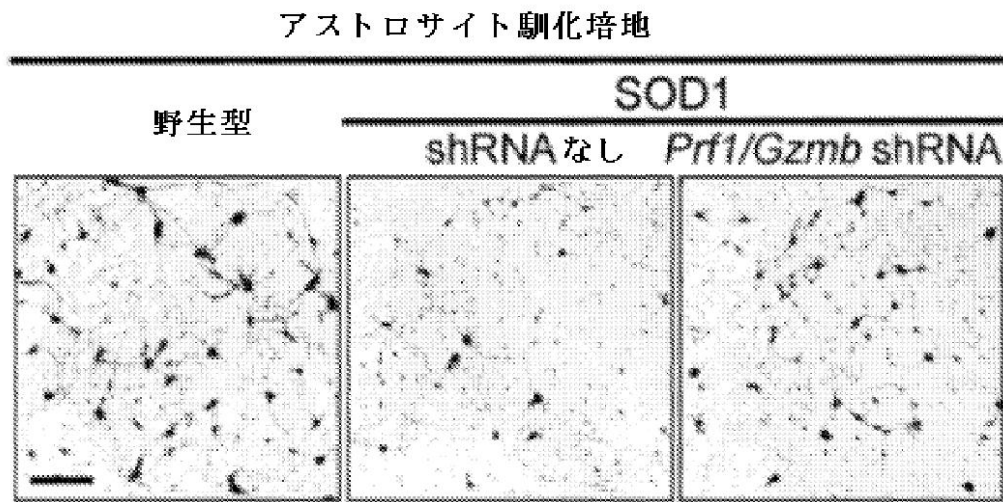
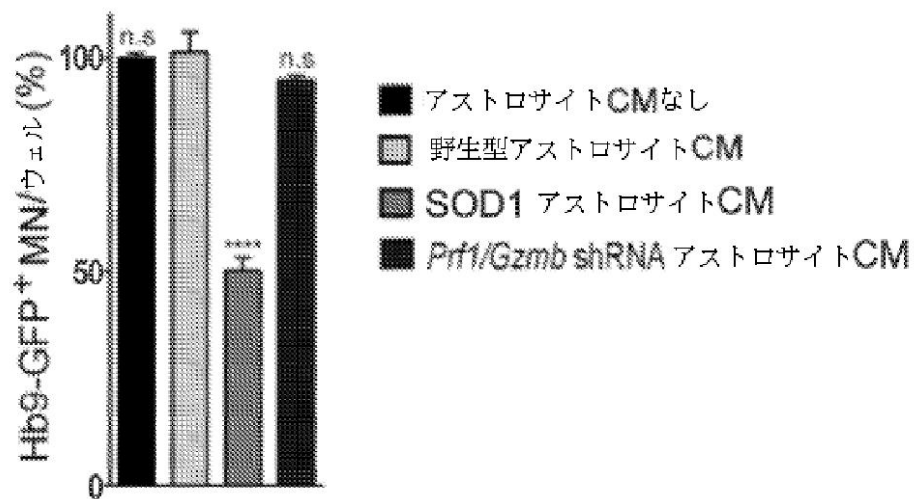
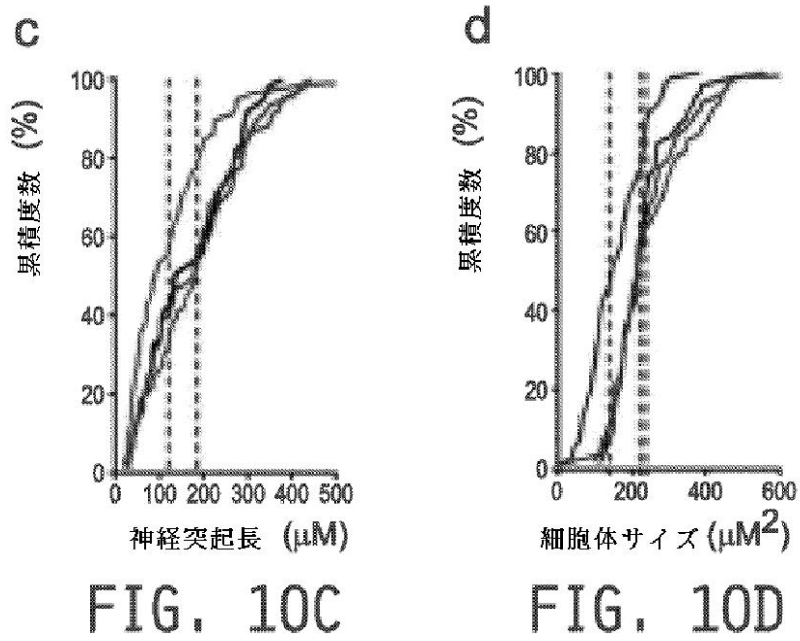


FIG. 9

【図 10 A - B】

a**FIG. 10A****b****FIG. 10B**

【図 10 C - D】



【図 10 E】

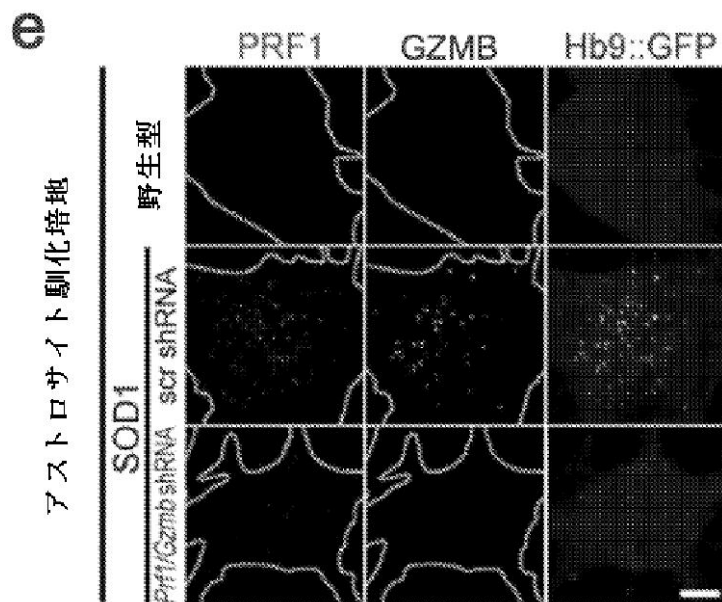


FIG. 10E

【図 10 F】

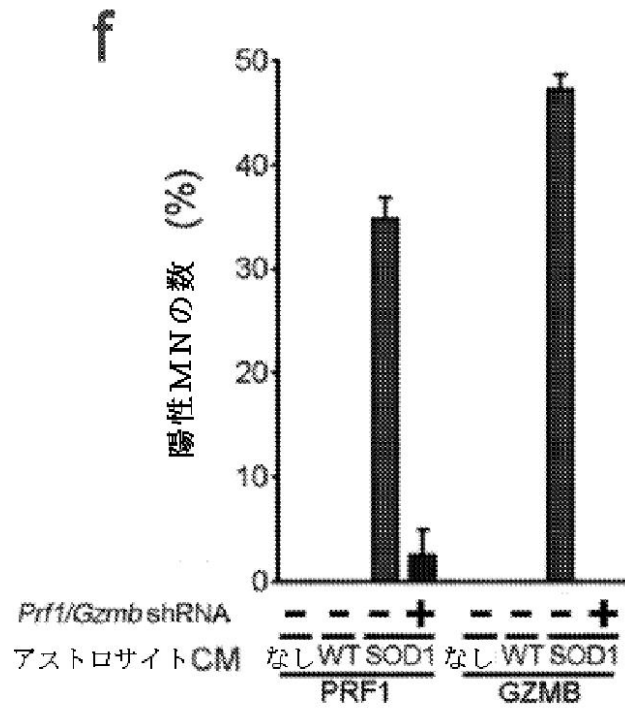


FIG. 10F

【図 10 G】

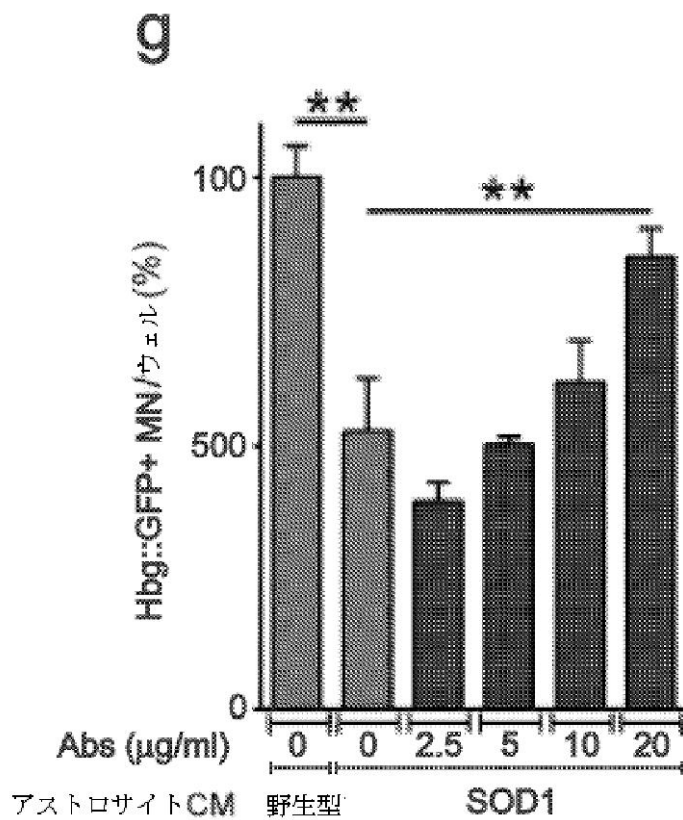


FIG. 10G

【図 11A - D】

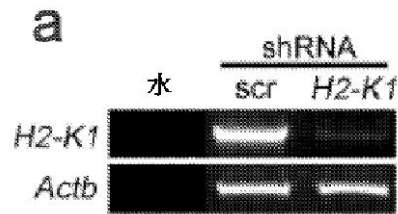


FIG. 11A

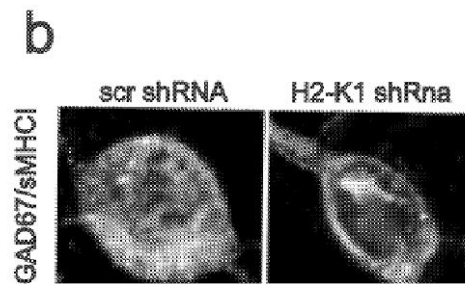


FIG. 11B

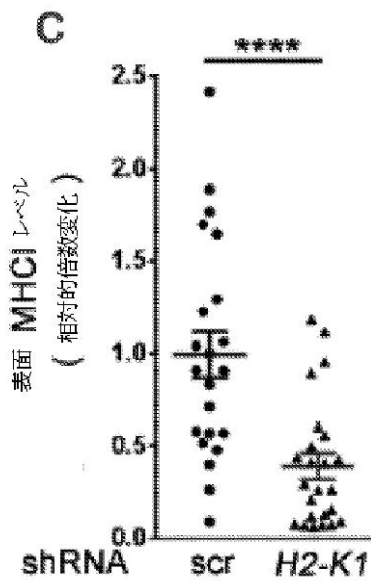


FIG. 11C

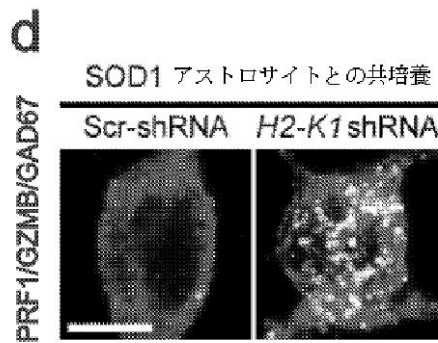


FIG. 11D

【図 11E - G】

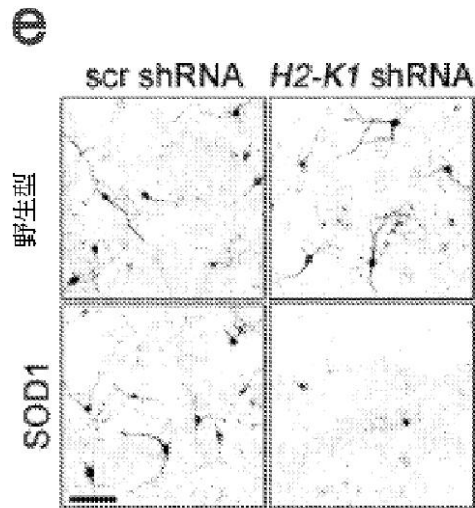


FIG. 11E

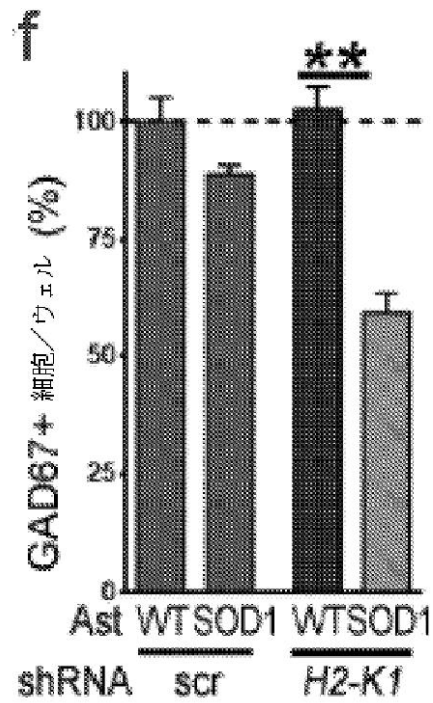


FIG. 11F

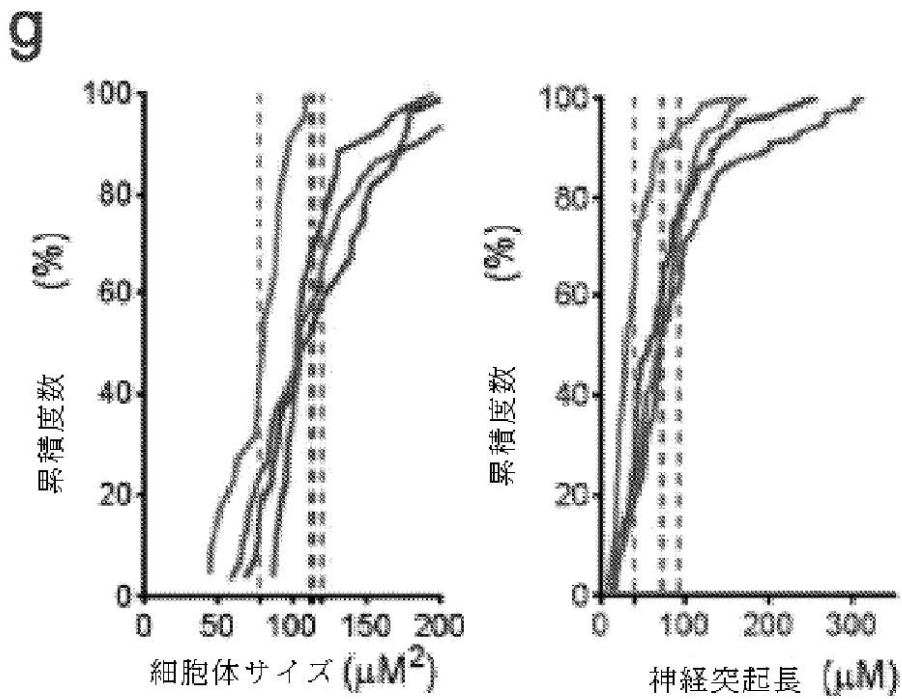
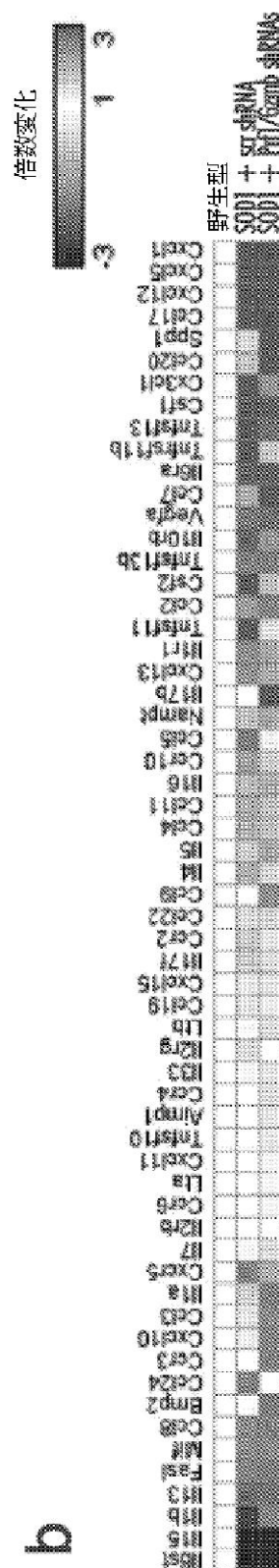
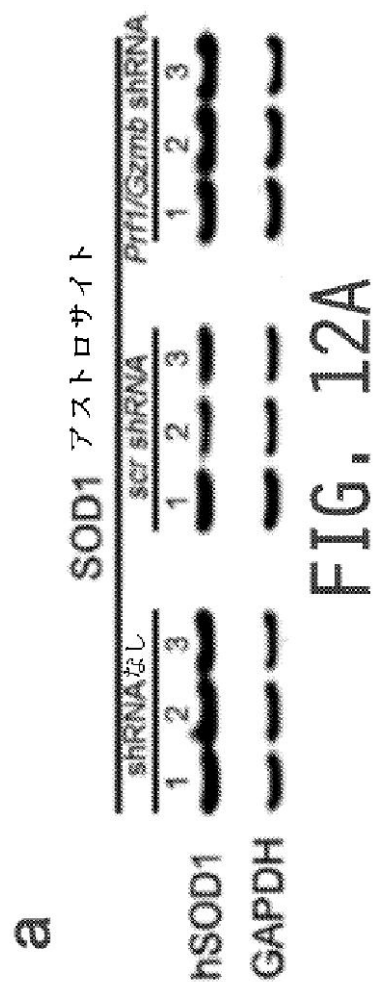


FIG. 11G

【 ㊦ 1 2 A - B 】



【図 13 A - D】

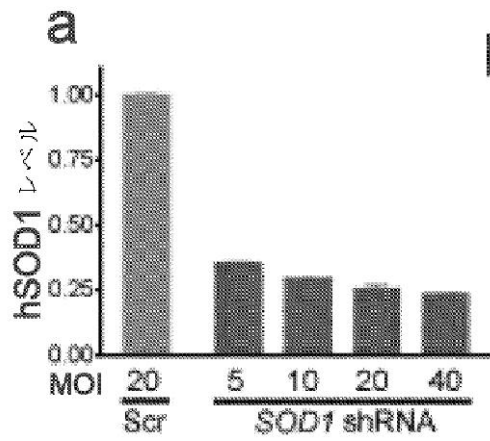


FIG. 13A

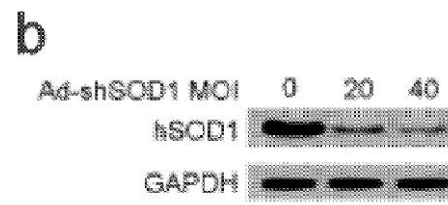


FIG. 13B

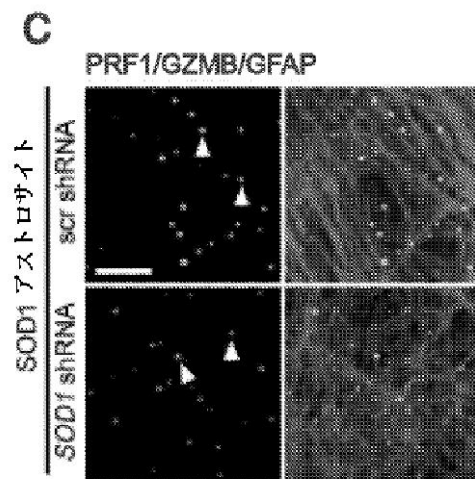


FIG. 13C

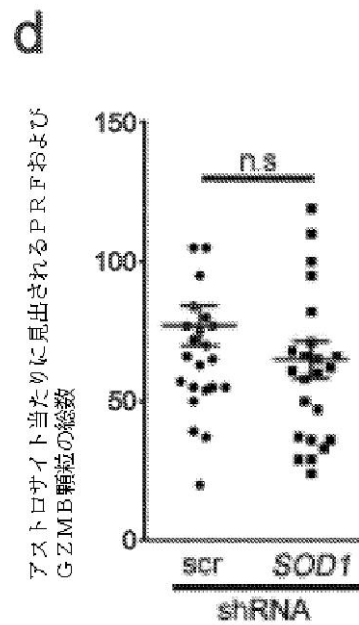


FIG. 13D

【図 13 E - H】

e

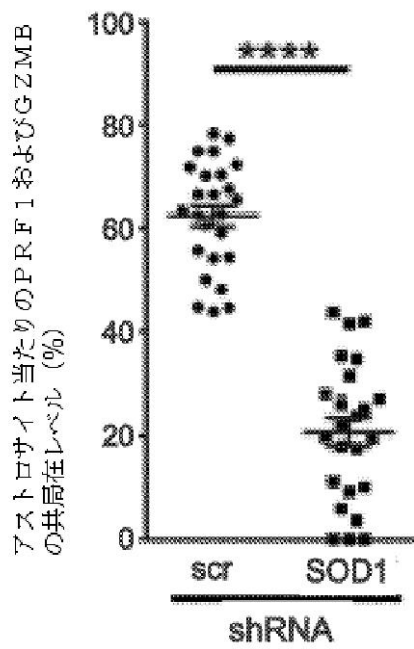


FIG. 13E

f

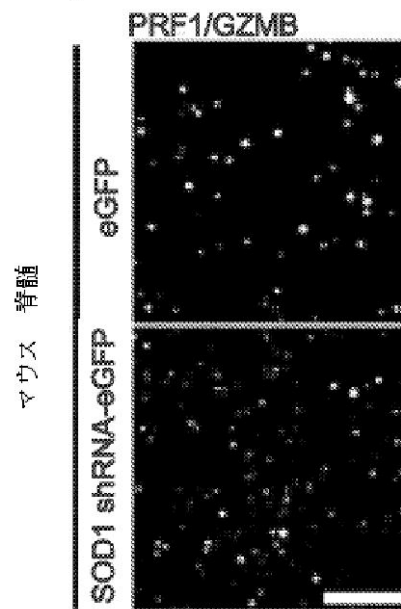


FIG. 13F

g

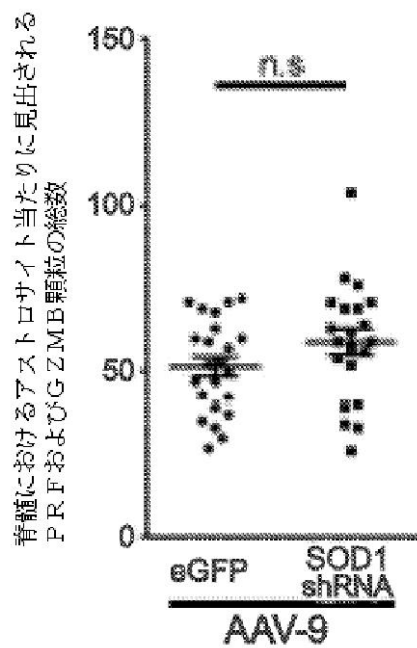


FIG. 13G

h

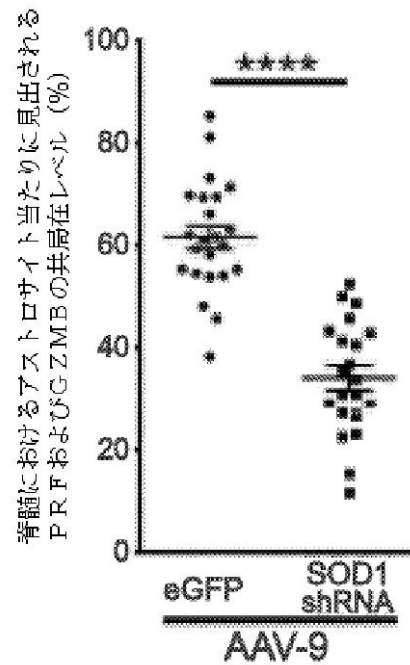


FIG. 13H

【図 14 A】



FIG. 14A

【図 14 B】

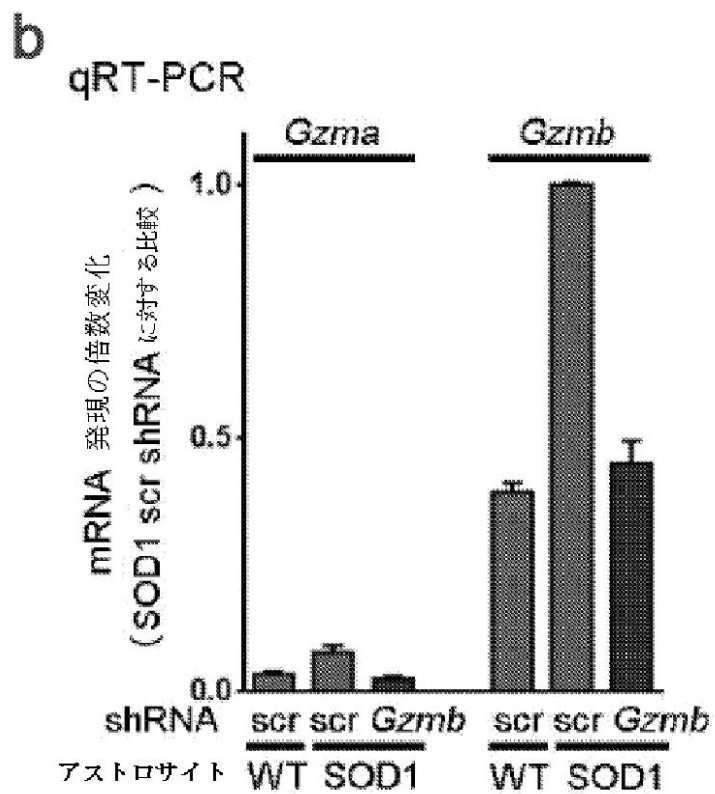


FIG. 14B

【配列表】

2015529685000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月6日(2015.8.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2015529685000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/60153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/11, A61P 21/00 (2014.01) USPC - 514/44A According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N15/11, A61P21/00 (2014.01) USPC: 514/44A Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/44R, 424/93.6, 536/24.5, 536/24.5 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: amyotrophic lateral sclerosis, sporadic ALS, treat* or therap* administer*, expression, nucleic acid, drug, peptide, astrocyte, cytoplasmic granule toxin perforin 1 granzyme B, shRNA, si RNA, astrocytes increase neurite length, decrease soma atrophy, ALS astrocyte antisense		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/0177605 A1 (KASPAR et al.) 12 July 2012 (12.07.2012) abstract, para [0018], [0027], [0037], [0105]	1-10, 20
Y	GASQUE et al., Identification of an Astrocyte Cell Population from Human Brain that Expresses Perforin, a Cytotoxic Protein Implicated in Immune Defense. J Exp Med, 16 February 1998, vol 187, no 4, pp 451-460; especially pg 451, col 1, para 1, pg 455, col 1, para 3, pg 457, col 2, para 2-3, pg 459, col 2, para 2	1-10, 20
Y	ILZECKA, Granzymes A and B levels in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Clinical Biochemistry. June 2011, vol 44, nos 8-9, Pages 650-653; especially abstract, pg 653, col 1, para 3	4, 5, 10
Y	HAIDET-PHILLIPS et al., Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. Nature Biotechnology September 2011 (Published online 10 August 2011), vol 29, no 9, pp 824-828; especially abstract, pg 824, col 2, para 3	6, 20
Y	US 2010/0152053 A1 (RUSSWURM) 17 June 2010 (27.06.2010) para [0001], [0012], Table 10	9
Y	US 2004/0009479 A1 (WOHLGEMUTH et al.) 15 January 2004 (15.01.2004) para [0007], [0029], [0793]	10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 April 2014 (03.04.2014)		Date of mailing of the international search report 25 APR 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/60153

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GenBank: M28393.1 'Human perforin mRNA, complete cds' [retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M28393 on 03 April 2014] 07 January 1995; whole doc.	1
A	Marchetto et al. 'Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells' Cell Stem Cell 3, 6497657, December 4, 2008; whole doc.	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/60153

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-10 and 20, drawn to a method of treating a patient with amyotrophic lateral sclerosis by decreasing the expression of a cytoplasmic granule toxin in astrocytes of the patient

Group II: Claims 11-19, drawn to a method for treating amyotrophic lateral sclerosis by increasing MHC class I expression in motor neurons of a patient

—please see continuation on extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10 and 20

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application no.

PCT/US 13/60153

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I requires a compound that decreases the expression of the cytoplasmic granule toxin in the astrocytes of a patient, which is not required by Group II.

Group II requires a compound that increases the expression of MHC class I in the motor neurons of a patient, which is not required by Group I.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I and II is a method for treating a patient with amyotrophic lateral sclerosis by modulating the expression of a molecule in a cell of the patient, the method comprising the step of administering to the patient a composition comprising an effective amount of a compound that modulates the expression of a molecule in a cell of the patient.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by US 6,723,315 B1 to Mallet et al. (hereinafter "Mallet"). Mallet discloses a method for treating a patient with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (col 1, ln 4-11) by modulating the expression of a molecule in a cell of the patient (col 1, ln 4-11 - "vectors and pharmaceutical compositions allowing the prolonged expression of therapeutic factors, utilizable for the treatment of ALS"; col 3, ln 9-33 - "... mammalian cell, preferably human cell."), the method comprising the step of administering to the patient a composition comprising an effective amount of a compound that modulates the expression of a molecule in a cell of the patient (col 2, ln 33-47 - "method of treatment of ALS comprising the systemic administration of a nucleic acid coding for a neurotrophic factor ... vectors allowing the expression of therapeutically effective quantities, in relation to ALS, of trophic factors."). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, TZ, UA, UG, US, UZ

(72)発明者 ブライアン・キャスパー

アメリカ合衆国 4 3 0 5 4 オハイオ州ニュー・オールバニー、カルバートン・スクエア 7 8 8 3 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 CA20 DA02 EA02 HA17
 4C084 AA02 AA13 AA17 NA14 ZA942 ZB212
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA94 ZB21
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA94 ZB21