

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6812368号
(P6812368)

(45) 発行日 令和3年1月13日(2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月18日(2020.12.18)

(51) Int.Cl.	F I		
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	Z N A	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02		
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z	
請求項の数 13 (全 40 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2017-564778 (P2017-564778)	(73) 特許権者	511140770
(86) (22) 出願日	平成28年3月7日(2016.3.7)		マサチューセッツ アイ アンド イヤー インファーマリー
(65) 公表番号	特表2018-511652 (P2018-511652A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 1 4, ポストン, チャールズ スト リート 2 4 3
(43) 公表日	平成30年4月26日(2018.4.26)	(74) 代理人	100092783
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/021226		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開番号	W02016/144892	(74) 代理人	100120134
(87) 国際公開日	平成28年9月15日(2016.9.15)		弁理士 大森 規雄
審査請求日	平成31年2月12日(2019.2.12)	(74) 代理人	100104282
(31) 優先権主張番号	62/129,638		弁理士 鈴木 康仁
(32) 優先日	平成27年3月6日(2015.3.6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/147,307		
(32) 優先日	平成27年4月14日(2015.4.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PRPF31 遺伝子における変異により引き起こされる遺伝性網膜変性に対する遺伝子増強療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト対象において、PRPF31における変異により引き起こされる網膜色素変性を処置するための医薬組成物であって、網膜色素上皮(RPE)細胞における発現を駆動するプロモーターと作動可能に連結した、ヒトPRPF31をコードする配列を含む治療的有効量のアデノ随伴ウイルスタイプ2(AAV2)ベクターを含む医薬組成物。

【請求項2】

前記プロモーターが、CAG、CASI、RPE65またはVMD2プロモーターである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記PRPF31配列がコドン最適化されている、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

網膜下注射による送達のために製剤化された、請求項1～3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

ヒト対象の眼においてPRPF31の発現を増大させるための医薬組成物であって、網膜色素上皮(RPE)細胞における発現を駆動するプロモーターと作動可能に連結した、ヒトPRPF31をコードする配列を含む治療的有効量のアデノ随伴ウイルスタイプ2(AAV2)ベクターを含む医薬組成物。

【請求項6】

前記プロモーターがCAG、CASI、RPE65またはVMD2プロモーターである

、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 P R P F 3 1 配列がコドン最適化されている、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

網膜下注射による送達のために製剤化された、請求項 5 ~ 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

網膜色素上皮 (R P E) 細胞における発現を駆動するプロモーターに作動可能に連結した、ヒト P R P F 3 1 をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルスタイプ 2 (A A V 2) ベクター。

【請求項 10】

前記プロモーターが C A G、C A S I、R P E 6 5 または V M D 2 プロモーターである、請求項 9 に記載のベクター。

10

【請求項 11】

前記 P R P F 3 1 配列がコドン最適化されている、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 12】

ヒト対象の眼において、P R P F 3 1 における変異により引き起こされる網膜色素変性の処置に使用するための、請求項 9 ~ 11 に記載のベクター。

【請求項 13】

ヒト対象の眼において、P R P F 3 1 の発現を増大させることに使用するための、請求項 9 ~ 11 に記載のベクター。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年3月6日出願の米国特許出願第62/129,638号、および2015年4月14日出願の同第62/147,307号の利益を主張する。前述の特許出願の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

30

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含有する。前記 A S C I I のコピーは、2016年3月7日に作成され、00633-0192WO1.txtと命名され、サイズは154KBである。

【0003】

連邦支援の研究または開発

本発明は、アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により授与される助成金番号 E Y 0 2 0 9 0 2 の下に、政府により支援されて行われた。政府は本発明における一定の権利を有する。

【0004】

40

本発明は、m R N A 前駆体プロセッシング因子 3 1 (P R P F 3 1) における変異に関する網膜色素変性の遺伝子療法のための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0005】

m R N A 前駆体プロセッシング因子 3 1 (P R P F 3 1) における変異はヒトにおいて、遺伝性網膜ジストロフィー (I R D) の1つである非症候性網膜色素変性 (R P) を引き起こす。変異が、遍在して発現されるこれらのタンパク質に存在する場合に、どのような機構またはどの組織が影響されているのか、現在のところ不明である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

【0006】

本明細書には、mRNA前駆体プロセシング因子31（PRPF31）における変異に関する網膜色素変性の遺伝子療法のための方法および組成物が記載される。

【0007】

したがって、本明細書では、ヒト対象におけるPRPF31の変異により引き起こされる網膜色素変性を処置するか、またはヒト対象の眼においてPRPF31の発現を増大させる方法が提供される。方法は、網膜色素上皮（RPE）細胞における発現を駆動させるプロモーターと作動可能に連結した、ヒトPRPF31をコードする配列を含む治療的有効量のアデノ随伴ウイルスのベクター、例えば、アデノ随伴ウイルスタイプ2（AAV2）ベクターを対象の眼に送達することを含む。

10

【0008】

プロモーターは、RPEに特異的であってもよく、または他の細胞型においても同様に、例えば、CASIもしくはCAGでも発現を駆動する一般プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターはRPE65またはVMD2プロモーターである。

【0009】

いくつかの実施形態において、PRPF31配列は、例えば、対象がヒトである場合に、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、PRPF31配列は、配列番号34のnts1319～2818と同じタンパク質であるかまたはそれを含まるかまたはコードする。

20

【0010】

いくつかの実施形態において、ベクターは、網膜下注射により送達される。

【0011】

いくつかの実施形態において、ベクターは、国際公開第2015054653号パンフレットに記載されたAAVカプシドポリペプチドを含むか、またはAAVカプシドポリペプチドをコードする配列を含む。

【0012】

網膜色素上皮（RPE）細胞における発現を駆動するプロモーターと作動可能に連結した、ヒトPRPF31をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルスタイプ2（AAV2）ベクターも、本明細書で提供される。プロモーターはRPE特異的であってもよく、または他の細胞型においても同様に、例えば、CASIまたはCAGでも発現を駆動する一般プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、RPE65またはVMD2プロモーターである。いくつかの実施形態において、PRPF31配列は、例えば、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。ベクターを、好ましくは、網膜下注射による送達のために製剤化されたベクターを含む医薬組成物も提供される。

30

【0013】

本明細書に記載された核酸、ベクター、および医薬組成物の使用も、本明細書で提供される。

【0014】

特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野における当業者により共通して理解される同じ意味を有する。方法および材料は、本発明で使用するために本明細書に記載されるが、当技術分野において知られた他の適当な方法および材料も使用することができる。材料、方法および例は、単なる例示であり、限定することは意図されない。全ての公報、特許出願、特許、配列、データベース登録、および本明細書で言及される他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書に従うものとする。

40

【0015】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図から、ならびに特許請求の範囲から明らかであろう。

50

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1-1】図1A~F: Prpf変異マウスにおける食作用の障害を示す図である。網膜色素上皮の(RPE)初代培養を、日齢9~10日のPrpf変異マウスおよびそれらの同腹子対照から確立し、次にFITC標識されたブタ光受容体の外側セグメントでチャレンジし、核はDAPI(青色)で標識した。(A)野生型(WT)またはPrpf3T494M/T494M、Prpf8H2309P/H2309P、Prpf31+/-変異(MUT)マウスからの初代RPE細胞の定性的描写(核の青色DAPI染色)。POS取り込みにおける差が、変異体と対照との間で観察された。

【図1-2】図1A~F: Prpf変異マウスにおける食作用の障害を示す図である。網膜色素上皮の(RPE)初代培養を、日齢9~10日のPrpf変異マウスおよびそれらの同腹子対照から確立し、次にFITC標識されたブタ光受容体の外側セグメントでチャレンジし、核はDAPI(青色)で標識した。(B)食作用の比の定量分析により、示した3種の変異体マウス系統について野生型同腹子(WT)と比較した変異(MUT)マウスにおける食作用の有意の減少が示される(* $P < 0.05$ 、 $N = 3 \sim 5$)。(C)POSの結合および内部移行比を、野生型対照(WT)と比較してPrpf31+/- (MUT)マウス間で比較すると、変異マウスでは、結合(Bind.)では有意の減少を示すが、POS内部移行(Intern.)では有意の変化を示さない(* $P < 0.05$ 、 $N = 2 \sim 5$)。

【図1-3】図1A~F: Prpf変異マウスにおける食作用の障害を示す図である。網膜色素上皮の(RPE)初代培養を、日齢9~10日のPrpf変異マウスおよびそれらの同腹子対照から確立し、次にFITC標識されたブタ光受容体の外側セグメントでチャレンジし、核はDAPI(青色)で標識した。(D)ARPE-19細胞におけるPRPF31のshRNAにより媒介されるノックダウンの安定な系列。POS取り込みにおける差が、対照のshRNAをトランスフェクトされたARPE-19細胞と抗PRPF31 shRNAをトランスフェクトされたARPE-19細胞との間でも観察された。(E)ARPE-19細胞におけるPRPF31-ノックダウンの効果を決めるための細胞生存能力アッセイは、PRPF31のshRNA-ノックダウン後の細胞増殖または生存能力は、非標的対照と比較して有意の差がないことを示す($P > 0.05$ 、 $N = 6$)。(F)ヒトARPE-19細胞系列におけるPRPF31のshRNAにより媒介されるノックダウンは、非標的構造物(NTC)と比較して1細胞当たりのPOSの減少数により示されるように、食作用も有意に障害する(* $P < 0.05$ 、 $N = 3$)。誤差バーは、平均値からの標準偏差を表す。

【図2-1】図2A~C: Prpf変異マウスにおける食作用の日周期的な周期性が乱されることを示す図である。食作用を、光照射開始前2時間(-2)、光照射開始時(0)、および光照射開始後2、4、および6(+2、+4、+6)時間にインビボでアッセイした。(A、B)代表的な写真を光照射開始後+2(食作用のピーク)および+8(食作用のピークの外側)時間で示す。RPE:網膜色素上皮、OS:光受容体外側セグメント、Ch:脈絡膜。(A)Prpf3およびPrpf8変異マウスにおける初期のファゴソームの検出は、電子顕微鏡を使用して、1)RPEの細胞原形質中にある、および2)視認できる層状の構造(黒色矢じり)に含有されるファゴソームを計数して実施した。スケールのバーは2 μm 。(B)Prpf31+/-マウスの日周期的なリズムを、ロドプシンに対する免疫蛍光染色(Ig-AlexaFluor488)および100 μm の完全な網膜全体にわたってRPE細胞層(DAPIで染色された核)に所在するファゴソーム(白色矢じり)の検出を使用して決定した。スケールのバーは20 μm 。

【図2-2】図2A~C: Prpf変異マウスにおける食作用の日周期的な周期性が乱されることを示す図である。食作用を、光照射開始前2時間(-2)、光照射開始時(0)、および光照射開始後2、4、および6(+2、+4、+6)時間にインビボでアッセイした。(C)全ての時点にわたるファゴソームの定量は、全てのPrpf変異マウスにおける食作用のバーストの一貫した有意の乱れを示す(* $P < 0.05$ 、Prpf3およびP

10

20

30

40

50

r p f 8 変異体については $N = 2$ 、ならびに P r p f 3 1 変異マウスについては $N = 3 \sim 5$)。誤差バーは、平均値からの標準偏差を表す。

【図3 - 1】図3 A ~ B : ピーク時点における P r p f 変異マウスにおける網膜接着の変化を示すグラフである。R P E 頂点の微絨毛と P O S との間の接着強度は、神経網膜に接着する R P E 色素またはタンパク質の量を、W T 対照と比較して定量化することにより決定した。(A) メラニン定量化により、接着が3種全ての変異マウスで、光照射開始後3.5時間のピーク時点で減少し、P r p f 8 H 2 3 0 9 P / H 2 3 0 9 P マウスではオフピーク時点で減少することが示される ($* P < 0.05$ 、 $N = 3 \sim 7$)。

【図3 - 2】図3 A ~ B : ピーク時点における P r p f 変異マウスにおける網膜接着の変化を示すグラフである。R P E 頂点の微絨毛と P O S との間の接着強度は、神経網膜に接着する R P E 色素またはタンパク質の量を、W T 対照と比較して定量化することにより決定した。(B) イムノプロット上における R P E 6 5 タンパク質の定量的測定により、3種全ての変異マウスにおいてピーク時点でメラニンが見出されることが確認されるが、P r p f 8 変異マウスでのみオフピーク時点で接着における減少傾向が観察される ($* P < 0.05$ 、 $N = 4 \sim 7$)。誤差バーは平均値からの標準偏差を表す。

【図4 - 1】図4 A ~ C : 若干の接着および食作用マーカーの局在および発現が、P r p f 3 および P r p f 8 変異マウスで妨げられることを示す図である。示される通りの、野生型対照 (W T) ならびに P r p f 3 - および P r p f 8 変異体網膜の凍結切片上における (A) α および β 5 インテグリン受容体サブユニットおよび関連する M f g - E 8 リガンド、(B) F A K 細胞内シグナル伝達タンパク質、ならびに (C) M e r T K 受容体ならびに関連する G a s 6 およびタンパク質 S リガンドの発現および局在の代表的影像。非免疫 I g G (I g G) で探査された切片からの画像が、各抗原について含まれる。R P E : 網膜色素上皮、O S : 光受容体外側セグメント、O N L : 外側の核層。R P E の基底側への α 5 インテグリンの局在が、P r p f 3 および P r p f 8 変異マウスの両方で観察された。それに加えて、F A K は、P r p f 8 変異マウスで R P E の基底側に誤って局在した。目的の各タンパク質を I g - A l e x a F l u o r 4 8 8 で染色して、核は D A P I で染色される。スケールバーは $40 \mu\text{m}$ 。

【図4 - 2】図4 A ~ C : 若干の接着および食作用マーカーの局在および発現が、P r p f 3 および P r p f 8 変異マウスで妨げられることを示す図である。示される通りの、野生型対照 (W T) ならびに P r p f 3 - および P r p f 8 変異体網膜の凍結切片上における (A) α および β 5 インテグリン受容体サブユニットおよび関連する M f g - E 8 リガンド、(B) F A K 細胞内シグナル伝達タンパク質、ならびに (C) M e r T K 受容体ならびに関連する G a s 6 およびタンパク質 S リガンドの発現および局在の代表的影像。非免疫 I g G (I g G) で探査された切片からの画像が、各抗原について含まれる。R P E : 網膜色素上皮、O S : 光受容体外側セグメント、O N L : 外側の核層。R P E の基底側への α 5 インテグリンの局在が、P r p f 3 および P r p f 8 変異マウスの両方で観察された。それに加えて、F A K は、P r p f 8 変異マウスで R P E の基底側に誤って局在した。目的の各タンパク質を I g - A l e x a F l u o r 4 8 8 で染色して、核は D A P I で染色される。スケールバーは $40 \mu\text{m}$ 。

【図4 - 3】図4 A ~ C : 若干の接着および食作用マーカーの局在および発現が、P r p f 3 および P r p f 8 変異マウスで妨げられることを示す図である。示される通りの、野生型対照 (W T) ならびに P r p f 3 - および P r p f 8 変異体網膜の凍結切片上における (A) α および β 5 インテグリン受容体サブユニットおよび関連する M f g - E 8 リガンド、(B) F A K 細胞内シグナル伝達タンパク質、ならびに (C) M e r T K 受容体ならびに関連する G a s 6 およびタンパク質 S リガンドの発現および局在の代表的影像。非免疫 I g G (I g G) で探査された切片からの画像が、各抗原について含まれる。R P E : 網膜色素上皮、O S : 光受容体外側セグメント、O N L : 外側の核層。R P E の基底側への α 5 インテグリンの局在が、P r p f 3 および P r p f 8 変異マウスの両方で観察された。それに加えて、F A K は、P r p f 8 変異マウスで R P E の基底側に誤って局在した。目的の各タンパク質を I g - A l e x a F l u o r 4 8 8 で染色して、核は D A P I

10

20

30

40

50

Iで染色される。スケールバーは40 μm。

【図5-1】図5A~C：若干の接着および食作用マーカーの局在および発現が、Prpf31変異マウスで妨げられることを示す図である。示される通りの、野生型対照(WT)ならびにPrpf31変異体の網膜のパラフィン切片上における(A) vおよび5インテグリン受容体サブユニットおよび関連するMfge8リガンド、(B)FAK細胞内シグナル伝達タンパク質、ならびに(C)MerTK受容体ならびに関連するGas6およびタンパク質Sリガンドの発現および局在、または非免疫IgG(IgG)の代表的画像。RPE：網膜色素上皮、OS：光受容体外側セグメント、ONL：外側核層。Prpf31変異マウスにおける最も顕著な変化は、RPEの基底側への5インテグリンの誤った局在であるが、MerTKの局在も摂動する。目的の各タンパク質をIgG-AlexaFluor488で染色し、核はDAPIで染色される。スケールバーは20 μm。

10

【図5-2】図5A~C：若干の接着および食作用マーカーの局在および発現が、Prpf31変異マウスで妨げられることを示す図である。示される通りの、野生型対照(WT)ならびにPrpf31変異体の網膜のパラフィン切片上における(A) vおよび5インテグリン受容体サブユニットおよび関連するMfge8リガンド、(B)FAK細胞内シグナル伝達タンパク質、ならびに(C)MerTK受容体ならびに関連するGas6およびタンパク質Sリガンドの発現および局在、または非免疫IgG(IgG)の代表的画像。RPE：網膜色素上皮、OS：光受容体外側セグメント、ONL：外側核層。Prpf31変異マウスにおける最も顕著な変化は、RPEの基底側への5インテグリンの誤った局在であるが、MerTKの局在も摂動する。目的の各タンパク質をIgG-AlexaFluor488で染色し、核はDAPIで染色される。スケールバーは20 μm。

20

【図5-3】図5A~C：若干の接着および食作用マーカーの局在および発現が、Prpf31変異マウスで妨げられることを示す図である。示される通りの、野生型対照(WT)ならびにPrpf31変異体の網膜のパラフィン切片上における(A) vおよび5インテグリン受容体サブユニットおよび関連するMfge8リガンド、(B)FAK細胞内シグナル伝達タンパク質、ならびに(C)MerTK受容体ならびに関連するGas6およびタンパク質Sリガンドの発現および局在、または非免疫IgG(IgG)の代表的画像。RPE：網膜色素上皮、OS：光受容体外側セグメント、ONL：外側核層。Prpf31変異マウスにおける最も顕著な変化は、RPEの基底側への5インテグリンの誤った局在であるが、MerTKの局在も摂動する。目的の各タンパク質をIgG-AlexaFluor488で染色し、核はDAPIで染色される。スケールバーは20 μm。

30

【図6】ゲノム編集により生じたPRPF31+/-hiPSCおよびARPE-19細胞系列の配列を示す図である。PRPF31についての遺伝子モデルを上を示し、例となる3種の細胞系列についてエクソン6~7中の配列の詳細を下を示す。ロックアウトhiPSC細胞系列は、ヘテロ接合の4bpの欠失を有し(欠失した塩基は正常配列中で上に罫線を引いて示した)、その結果、フレームシフト(下線を引いたアミノ酸)および未成熟停止が生じる。描かれたロックアウトARPE-19細胞系列は4bpの欠失または単一の塩基の挿入を有し、そのこともフレームのシフトおよびヌル対立遺伝子を生じさせる。

40

【図7】AAV.CAS1.PRPF31で処理した後の相対的POS取り込みを示すグラフである。ゲノム編集されたPRPF31(GE31)ARPE-19細胞に、AAV.CAS1.PRPF31を0, 10, 000, および15, 000のMOIで3日間形質導入した。その後、細胞をFITC-POSと1時間インキュベートして、FITC陽性の細胞をフローサイトメトリーにより計数した。* P < 0.05。

【発明を実施するための形態】

【0017】

RNAスプライシング因子をコードする遺伝子における変異は、盲目にする障害である

50

網膜色素変性 (R P) の主要な形態の 2 番目に多い一般的な原因であり、したがって失明の重要な原因である (Hartong et al., Lancet. 2006; 368: 1795-809; Daiger et al., Archives Ophthalmology. 2007; 125: 151-8; Sullivan et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2013; 54: 6255-61. PMID: 3778873)。変異を受けるスプライシング因子である m R N A 前駆体プロセッシング因子 (P R P F) 3、P R P F 4、P R P F 6、P R P F 8、P R P F 3 1、および S N R N P 2 0 0 は、スプライセオソームの高度に保存された成分であり、スプライセオソームは、新生 R N A 転写物からイントロンを切って成熟 m R N A を生成する複合体である (McKie et al., Human Molecular Genetics. 2001; 10: 1555-62; Vithana et al., Molecular Cell. 2001; 8:375-81; Chakarova et al., Human Molecular Genetics. 2002; 11: 87-92; Keen et al., European Journal of Human Genetics. 2002; 10:245-9; Nilsen, Bioessays. 2003; 25: 1147-9; Sullivan et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2006; 47: 4579-88; Zhao et al., American Journal Human Genetics. 2009; 85: 617-27; Tanackovic et al., American Journal Human Genetics. 2011; 88: 643-9; Chen et al., Human Molecular Genetics. 2014; 23: 2926-39.)。P R P F 3 1 遺伝子における変異は、R N A スプライシング因子 R P の最も一般的な原因であり、米国で 2 4 0 0 から 8 5 0 0 人の影響された人々および世界中で 5 5 , 0 0 0 から 1 9 3 , 0 0 0 人を占めると見積もられている (Daiger et al., Archives Ophthalmology. 2007; 125:151-8; Sullivan et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2013;54: 6255-61. PMID: 3778873)。R N A スプライシングは、全ての細胞で必要とされるので、これらの遍在するタンパク質における変異が、どのようにして網膜特異的疾患をもたらすのかは明らかではない。

【 0 0 1 8 】

R N A スプライシング因子における変異が網膜変性を引き起こす機構 (単数または複数) を理解するために、P r p f 3、P r p f 8 および P r p f 3 1 変異マウスの表現型を検討した。細胞自律性における欠陥を、遺伝子を標的とされるマウスにおける網膜色素上皮の (R P E) 細胞の機能で同定した。しかしながら、マウスモデルとヒトの状態との間の疾患における遺伝的および表現型の差が、マウスで引き出された結論をヒトに置き換えることを困難にする可能性がある。

【 0 0 1 9 】

P R P F 3 1 における変異がハプロ不全による疾患を引き起こすこと、したがって、優性 R P のこの形態は、遺伝子増強療法による処置に対応できるといういくつかの証拠がある。P R P F 3 1 で同定された変異の多くは、大きい染色体の欠失であるか、またはナンセンスおよびフレームシフト変異のいずれかであり、それが未成熟停止コドンをもたらし、それはナンセンス媒介 m R N A 崩壊を経て、ヌル対立遺伝子を生じる (Vithana et al., Molecular Cell. 2001;8:375-81; Sullivan et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2006;47:4579-88.; Wang et al., American Journal Medical Genetics A. 2003;121A:235-9; Xia et al., Molecular Vision. 2004;10:361-5; Sato et al., American Journal Ophthalmology. 2005;140:537-40; Abu-Safieh et al., MolVis. 2006; 12:384-8; Rivolta et al., Human Mutation. 2006;27:644-53; Waseem et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2007;48:1330-4; Rio Frio et al., Human Mutation. 2009;30:1340-7. PMID: 2753193; Rose et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2011;52:6597-603; Saini et al., Experimental Eye Research. 2012;104:82-8)。したがって、P R P F 3 1 が関連する網膜の変性はハプロ不全により引き起こされると考えられる。この仮説と矛盾せずに、野生型対立遺伝子からの P R P F 3 1 発現のレベルは、P R P F 3 1 における変異を有する患者における疾患の重症度と相関する (Rio et al., Journal Clinical Investigation. 2008;118:1519-31; Vithana et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2003;44:4204-9; McGee et al., American Journal Human Genetics. 1997;61:1059-66)。2 通りの機構が、野生型 P R P F 3 1 の対立遺伝子の発現の調節に寄与すると報告されている。第 1 に、C N O T 3 は、P R P F 3 1 発現を転写の抑制により調節する。P R P F 3 1 変異の無症候性の保因者で

は、CNOT3が低レベルで発現され、これが、より高い量の野生型PRPF31転写物が産生されることを可能にし、網膜変性の顕性化を防止する(Venturini et al., PLoS genetics. 2012;8:e1003040. PMID: 3493449; Rose et al., Annals Human Genetics. 2013)。第2に、MSR1が、PRPF31の上流のシス調節エレメントとして同定されている。したがって、ヒトの遺伝的変動は、PRPF31遺伝子発現の増強がこの障害における失明を減少させるかまたは排除することができることの証拠を提供している。

【0020】

本明細書で説明するように、本発明者らは、RPE細胞を、RNAスプライシング因子RPにおいて影響された原発性細胞と同定した。このことが、PRPF31における変異により引き起こされる疾患のための遺伝子増強療法を開発して前進する機会を創り出す(実施例1を参照されたい)。この目標に達するために、ヒトPRPF31を発現するためのAAVベクターが本明細書に記載され、それは、ヒト対象における表現型を向上させるために使用することができる。

10

【0021】

U4/U6小核リボ核タンパク質Prp31としても知られるヒトPRPF31の配列は、GenBankにおいて受託番号NM_015629.3(核酸)およびNP_056444.3(タンパク質)で入手できる。PRPF31における変異と関連するRPを有する対象は、当技術分野において知られた方法により、例えば、PRPF31遺伝子の配列を決定することにより(NG_009759.1、範囲:5001から21361)またはNC_000019.10参照GRCh38.p2 Primary Assembly、範囲:54115376から54131719)、同定することができる。罹患した固体において多数の変異が同定された;例えば、Villanueva et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014; Dong et al. Mol Vis, 2013; Lu F, et al. PLoS One, 2013; Utz et al. Ophthalmic Genet, 2013; およびXu F, et al. Mol Vis, 2012; Saini et al., Exp Eye Res. 2012 Nov;104:82-8; Rose et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Aug 22;52(9):6597-603; Audo et al., BMC Med Genet. 2010 Oct 12;11:145; およびTanackovic and Rivolta, Ophthalmic Genet. 2009 Jun;30(2):76-83を参照されたい。

20

【0022】

したがって、本明細書に記載されたPRPF31ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの、RPE細胞中、例えば、主としてまたは専らRPE細胞中におけるインビボのトランスフェクションおよび発現のための標的とされる発現ベクターが本明細書に記載される。そのような成分の発現構築物は、任意の効果的な担体で、例えば、成分の遺伝子を、インビボで細胞に効果的に送達することができる任意の製剤または組成物中で投与することができる。種々の手法は、組み替えレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、および単純ヘルペスウイルス-1、アルファウイルス、ワクシニアウイルスを含むウイルスベクター、または組み替え細菌のまたは真核細胞のプラスミドに遺伝子を挿入することを含む。好ましいウイルスベクターはアデノ随伴ウイルスのタイプ2(AAV2)である。ウイルスベクターは、細胞に直接形質移入する。プラスミドDNAは、裸で、または例えば、カチオン性リポソーム(リポフェクタミン)の助けで、または誘導体化されて(例えば、抗体とコンジュゲートして)、カチオン性 dendrimer、無機ベクター(例えば、酸化鉄マグネトフェクション)、リポドイド、細胞浸透性ペプチド、シクロデキストリンポリマー(CDP)、ポリリシンコンジュゲート、グラマジンS、人工ウイルスのエンベロープまたは他のそのような細胞内担体、および遺伝子構築物の直接注射またはインビボで実施されるCaPO4沈殿の助けで送達することができる。

30

40

【0023】

核酸を細胞中にインビボで導入する典型的な手法は、核酸、例えば、cDNAを含有するウイルスベクターの使用による。ウイルスベクターによる細胞の感染は、標的とされる細胞の大きい比率が、核酸を受け入れることができるという利点を有する。それに加えて、ウイルスのベクター内で、例えば、ウイルスベクターに含有されるcDNAによりコード

50

された分子が、ウイルスベクターの核酸を取り上げた細胞中で効率的に発現される。

【 0 0 2 4 】

ウイルスベクターは、組み替え遺伝子の送達系として、外因性遺伝子をインビボで、特にヒト中に導入するために使用することができる。これらのベクターは、遺伝子を細胞中に効率的に送達し、いくつかの場合には、導入された核酸は、宿主の染色体DNA中に安定に組み込まれる。組み替えウイルスを産生するための、および細胞にインビトロまたはインビボでそのようなウイルスを感染させるためのプロトコルは、Ausubel, et al., eds., Gene Therapy Protocols Volume 1: Production and In Vivo Applications of Gene Transfer Vectors, Humana Press, (2008), pp. 1-32および他の標準的実験室マニュアルに見出すことができる。

10

【 0 0 2 5 】

核酸の送達のために有用な好ましいウイルスベクター系は、アデノ随伴ウイルス(AAV)である。アデノ随伴ウイルスは、効率的な複製および産生のライフサイクルのためのヘルパーウイルスとして、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどの別のウイルスを必要とする天然に存在する欠損ウイルスである。(総説については、Muzyczka et al., *Curr. Topics in Micro and Immunol.* 158:97-129 (1992)を参照されたい)。AAVベクターは、種々の細胞型に効率的に形質導入して、インビボにおける導入遺伝子の長期発現を生じさせることができる。AAVベクターのゲノムは、細胞内でエピソームとして存続することができるが、ベクターの組み込みが観察されている(例えば、Deyle and Russell, *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug; 11(4): 442-447; Asokan et al., *Mol Ther.* 2012 April; 20(4): 699-708; Flotte et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356 (1992); Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); およびMcLaughlin et al., *J. Virol.* 62:1963-1973 (1989)を参照されたい)。AAVベクター、特にAAV2は、遺伝子増強または置き換えのために広く使用されてきて、広範囲の動物モデルおよびクリニックで治療効果を示してきた。例えば、Mingozzi and High, *Nature Reviews Genetics* 12, 341-355 (2011); Deyle and Russell, *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug; 11(4): 442-447; Asokan et al., *Mol Ther.* 2012 April; 20(4): 699-708を参照されたい。AAVのわずかに300塩基対を含有するAAVベクターがパッケージされ得て、組み替えタンパク質発現を生じさせることができる。外因性DNAのための余地は約4.5kbに限定される。例えば、AAV1、2、4、5、または8ベクターは、DNAをRPE細胞中に導入するために使用することができる(例えば、Maguire et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2240-2248. Maguire et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374: 1597-1605; Bainbridge et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2231-2239; Hauswirth et al. (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19: 979-990; Cideciyan et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15112-15117. Cideciyan et al. (2009). Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 361: 725-727; Simonelli et al. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* 18: 643-650; Acland, et al. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 12: 1072-1082; Le Meur et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotyp 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 14: 292-303; Stieger et al. (2008). Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector

20

30

40

50

in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* 16: 916-923 ; およびVandenberghe et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Sci Transl Med* 3: 88ra54に記載されたものなど)。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、国際公開第2015054653号パンフレットに記載されたAAVカプシドポリペプチド；例えば、国際公開第2015054653号パンフレットの配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、および17、および本明細書に記載されたPRPF31をコードする配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するAAVカプシドポリペプチドを含むウイルス粒子を含む（またはそれをコードする配列を含む）ことができる。いくつかの実施形態において、AAVカプシドポリペプチドは、ここで再掲する国際公開第2015054653号パンフレットの表1に示されている通りである。

10

【0026】

【表1】

ノード	ポリペプチド(配列番号)	核酸(配列番号)
Anc80	1	2
Anc81	3	4
Anc82	5	6
Anc83	7	8
Anc84	9	10
Anc94	11	12
Anc113	13	14
Anc126	15	16
Anc127	17	18

20

【0027】

いくつかの実施形態において、AAVカプシドポリペプチドは、Anc80ポリペプチドであり、例えば、典型的ポリペプチドは、配列番号19 (Anc80L27)；配列番号20 (Anc80L59)；配列番号21 (Anc80L60)；配列番号22 (Anc80L62)；配列番号23 (Anc80L65)；配列番号24 (Anc80L33)；配列番号25 (Anc80L36)；および配列番号26 (Anc80L44)で示される。

30

【0028】

種々の核酸が、異なった細胞型中に、AAVベクターを使用して導入されてきた（例えば、上で挙げた引用文献およびAsokan et al., *Molecular Therapy* (2012); 20 4, 699-708；およびHermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 (1984)；Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1985)；Wondisford et al., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39 (1988)；Tratschin et al., *J. Virol.* 51:611-619 (1984)；およびFlotte et al., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790 (1993)を参照されたい)。

40

【0029】

レトロウイルスも使用することができる。複製欠損レトロウイルスのみを産生する特化された細胞系列（「パッケージング細胞」と称される）の開発により、遺伝子療法のためのレトロウイルスの効用が高まったので、欠損レトロウイルスが、遺伝子療法目的のための遺伝子移入で使用するために特徴づけられる（総説については、Katz et al., *Human Gene Therapy* 24:914 (2013)を参照されたい)。複製欠損レトロウイルスは、ビリオンにパッケージ化することができ、それは、ヘルパーウイルスの使用を通じて標準的技法により標的細胞への感染のために使用することができる。適当なレトロウイルスの例には、当業者に知られたpLJ、pZIP、pWEおよびpEMが含まれる。同種エクトロピクレ

50

トロウイルスおよびアンホトロピックレトロウイルス系の両者を調製するために適当なパッケージングウイルス系列の例には、Crip、Cre、2およびAmが含まれる。レトロウイルスは、種々の遺伝子を、インビトロおよび/またはインビボで上皮細胞を含む多くの異なった細胞型中に導入するために使用されてきた(例えば、Eglitis, et al. (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; 米国特許第4,868,116号明細書; 米国特許第4,980,286号明細書; PCT出願国際公開第89/07136号パンフレット; PCT出願国際公開第89/02468号パンフレット; PCT出願国際公開第89/05345号パンフレット; およびPCT出願国際公開第92/07573号パンフレットを参照されたい)。

【0030】

本発明の方法で有用な別のウイルスの遺伝子送達系は、アデノウイルス誘導ベクターを利用する。アデノウイルスのゲノムは、それが目的の遺伝子産物をコードおよび発現するように操作することができるが、正常な細胞を溶解するウイルスのライフサイクルで複製するその能力に関して不活性化されている。例えば、Berkner et al., BioTechniques 6:616 (1988); Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); およびRosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992)を参照されたい。アデノウイルス系統のAdタイプ5d1324または他の系統のアデノウイルス(例えば、Ad2、Ad3、またはAd7その他)から誘導された適当なアデノウイルスベクターが当業者に知られている。組み替えアデノウイルスは、それらは、非分裂細胞に感染することができず、上皮細胞を含む広範囲の細胞型への感染のために使用することができることで、ある状況では有利であり得る(Rosenfeld et al., (1992)前出)。さらに、ウイルス粒子は比較的安定であり、精製および濃縮に対応できて、上記のように、感染力のスペクトルに影響するように改変することができる。それに加えて、導入されたアデノウイルスDNA(およびその中に含有される外来DNA)は宿主細胞のゲノムに組み込まれず、エピソームにとどまり、それによりその場挿入変異の結果として、導入されたDNAが宿主ゲノムに組み込まれる場合に(例えば、レトロウイルスDNA)起こり得る可能性のある問題を回避する。その上、外来DNAのためのアデノウイルスゲノムの運搬能は、他の遺伝子送達ベクターと比較して大きい(8キロ塩基まで)(Berkner et al., 前出; Haj-Ahmand and Graham, J. Virol. 57:267 (1986))。

【0031】

いくつかの実施形態において、PRPF31をコードする遺伝子は、それらの表面に正電荷を有するリポソーム(例えば、リポフェクチン)に捕捉されており、それは標的組織の細胞表面抗原に対する抗体でタグを付けられる得る(Mizuno et al., No Shinkei Geka 20:547-551 (1992); 国際公開第91/06309号パンフレット; 日本特許出願第1047381号明細書; および欧州特許出願公開第43075号明細書)。

【0032】

臨床環境で、治療遺伝子のための遺伝子送達系は、各々当技術分野でよく知られている多くの方法のいずれかにより対象に導入することができる。他の方法も使用することができるが、いくつかの実施形態において、遺伝子療法ベクターを網膜に送達するために選択される経路は、網膜下注射によるものである。これは、網膜のRPEおよび光受容体細胞への接近を提供する。種々のAAVの血清型が、動物の検討において、網膜下に注射後にこれらの細胞集団に効果的に形質導入することが示された(Vandenberghe et al., PLoS One. 2013;8:e53463. PMID: 3559681; Vandenberghe and Auricchio, Gene Therapy. 20

10

20

30

40

50

12;19:162-8 ; Vandenberghe et al., Science translational medicine. 2011;3:88ra54 ; Dinculescu et al., HumGene Ther. 2005;16:649-63 ; Boye et al., Mol Ther. 2013;21:509-19 ; Alexander and Hauswirth, Adv Exp Med Biol. 2008;613:121-8)。網膜下注射の手法は、R P E 6 5 における変異および C H M 遺伝子の遺伝的疾患により引き起こされる網膜変性のための遺伝子増強療法の現在進行中の臨床試験で使用されている (Maguire et al., New England Journal of Medicine. 2008;358:2240-8 ; Bainbridge et al., New England Journal of Medicine. 2008;358:2231-9 ; Cideciyan et al., Proceedings National Academy Sciences USA. 2008;105:15112-7 ; Maguire et al., Lancet. 2009;374:1597-605 ; Jacobson et al., Archives Ophthalmology. 2012;130:9-24 ; Bennett et al., Science translational medicine. 2012;4:120ra15 ; MacLaren et al., Lancet. 2014;383:1129-37)。網膜下注射は、標準的外科手法を使用して実施することができる (例えば、Maguire et al., 2008 前出 ; Bainbridge et al., 2008 前出 ; Cideciyan et al., 2008 前出 ; MacLaren et al., 2014 前出に記載されたように)。

10

【 0 0 3 3 】

遺伝子療法構築物の医薬製剤は、許容される希釈剤中の遺伝子送達系 (ウイルスベクターおよびヘルパーウイルス、タンパク質、および脂質などの任意の関連する作用物質) から本質的になるか、または遺伝子送達ビヒクルが、包埋された徐放性マトリックスを含むことができる。あるいは、完全な遺伝子送達系が、組み替え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから完全に生成され得る場合には、医薬製剤は、遺伝子送達系を生成する 1 種または複数種の細胞を含むことができる。

20

実施例

【 0 0 3 4 】

本発明を、以下の実施例でさらに説明するが、これらの実施例は、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定しない。

【実施例 1】

【 0 0 3 5 】

m R N A 前駆体プロセッシング因子 3、8 および 3 1 における変異は、網膜色素上皮の機能不全を引き起こす。

序

スプライセオソームは、新生 R N A からイントロンを除去するために必要な、遍在する動的リボ核タンパク質高分子である¹。常染色体の優性の網膜色素変性 (R P) の原因となる変異は、U 4 / U 6 . U 5 トリ - s n R N P² に見出されるタンパク質 (P R P F 3、P R P F 4、P R P F 6、P R P F 8、P R P F 3 1、および S N R N P 2 0 0) をコードする 6 種の遺伝子中で同定された。全体として、これらの遺伝子における変異は、優性の R P の 2 番目に多い一般的な原因である^{3 ~ 5}。R P は進行性の後期発症性の失明により定義され、遺伝性の網膜変性の最も一般的な形態であり、世界中で約 1 : 3 5 0 0 の個体が罹患する⁶。それは遺伝的に不均一であり、メンデル遺伝の 3 通り全ての様式を示す⁷。罹患組織は、神経網膜、網膜色素上皮 (R P E)、および脈絡膜を含む⁴。スプライセオソームの成分は、あらゆる細胞型で普遍的に発現するので、これらのスプライシング因子における変異が、非症候性 R P のみを引き起こす理由は明らかでない。さらに、これらの変異によって罹患した網膜に特異的な細胞型 (単数または複数) は未だ同定されていない。

30

40

【 0 0 3 6 】

本発明者らは、P r p f 3、P r p f 8 および P r p f 3 1 ノックアウトマウス、ならびに P r p f 3 - T 4 9 4 M および P r p f 8 - H 2 3 0 9 P ノックインマウスを含むマウスモデルの P R P F 3、P R P F 8 および P R P F 3 1 遺伝子における変異に基づく R N A スプライシング因子 R P のキャラクタリゼーションを以前に報告した^{8、9}。これらのマウスモデルの検討結果、およびヒトの検討によるデータに基づいて、P R P F 3 および P R P F 8 における変異は、機能獲得または優性ネガティブ機構により優性の疾患を引き起こすが、一方、P R P F 3 1 における変異は、ハプロ不全により疾患を引き起こすと

50

考えられる⁹⁻¹¹。Prpf3-T494MおよびPrpf8-H2309PノックインマウスおよびPrpf31^{+/+}マウスの老化するRPE（神経網膜ではなく）における形態学的変化については、本発明者らは、基底陥入の消失、RPE下における基底沈着物の形成および細胞原形質中の空胞形成を観察し、特に興味深かった。これらのRPEの変性性の変化は、ヘテロ接合のPrpf3^{T494M/+}、Prpf8^{H2309P/+}およびPrpf31^{+/+}マウスで観察され、ホモ接合体のPrpf3^{T494M/T494M}およびPrpf8^{H2309P/H2309P}ノックインマウスにおいてはさらに顕著であった⁸。

【0037】

RPEは、網膜の全体的健康状態にとって極めて重要である¹²。消費された光受容体外側セグメント末端（POS）の日々の脱離は、高度に互いに整合的に作用するプロセスであり、脱落するPOSに対する食作用は、周期的基調で起こる¹³。POS食作用に関係する一部の受容体は、全体的な網膜接着およびその生理学的リズムにも関与する¹⁴。最高の食作用および網膜接着は、光照射開始後それぞれ約2および3.5時間に起こり、およそその10時間後にそれらの最少レベルになる^{13、15、14}。RPEは専門のマクロファージであり、そこで、基質の結合および内部移行は、RPE細胞上の受容体と光受容体間マトリックス中のリガンドとがそれぞれRPE細胞とPOS表面にあるホスファチジルセリンとを架橋することにより調整されている¹⁶。一部の受容体は、食作用および接着の間で共通であるが、それらは異なったリガンドを使用する^{13、14、15、17}。食作用のこれらの重要な成分のいずれかの調節の喪失は、ヒト疾患における失明に結びつき、齧歯目モデルにおいても同様である^{13、18-20}。

【0038】

ここで、本発明者らは、Prpf3^{T494M/T494M}、Prpf8^{H2309P/H2309P}およびPrpf31^{+/+}マウスモデルについて、RPE食作用および接着の検討を報告する。具体的には、本発明者らは、2週齢マウスからの初代RPE培養における食作用を測定した。結果は食作用の欠損を示し、本発明者らは、食作用の欠損を、ヒトRPE細胞系列ARPE-19においてもPRPF31のshRNAにより媒介されるノックダウン後に示す。それに加えて、食作用および接着の日周期的な周期性の消失が、インビボで検出された。興味深いことに、RPE細胞による食作用に関与することが知られている重要な因子の局在が変更されている。本発明者らは、RPEが、RNAスプライシング因子RP中の病原性の主要な部位であるらしいと結論する。

【0039】

材料および方法

動物

動物による研究は、the Massachusetts Eye and Ear Infirmaryのthe Institutional Animal Care and Use Committeesおよびthe Universite Pierre et Marie Curie - Parisからのthe Charles Darwin Animal Experimentation Ethics Committeeにより承認されたプロトコルの下で実施された。同数の雄および雌マウスを以下の実験の各々で使用した。

【0040】

初代RPE細胞培養

日齢9~10日の動物からのRPE細胞を記載したようにして単離した¹³。簡単に説明すると、眼杯を2mg/mlのヒアルロニダーゼ（Sigma）で消化して、神経網膜を眼杯から丁寧に剥離した。1mg/mlのトリプシン（Invitrogen）で消化した後、RPEをBruch膜から剥離して5mmのカバーガラス上に播種した。細胞を、10%FBSを添加したDMEM中において37、5%CO₂でコンフルエントになるまで5~10日間増殖させた。

【0041】

10

20

30

40

50

腹腔マクロファージ細胞の初代培養

腹腔の常在マクロファージを以前に記載したようにして単離した²¹。安楽死させたマウスを解剖台にピンで留めて、水平なフローフード中で毛皮を70%エタノールを使用して湿らせた。ピンセットおよび鉗を使用して、皮膚を腹腔壁から注意深く分離した。5 mLの滅菌PBSを腹部の空洞に注入して、20~30秒間臍を揉むかまたは全身を揺すった。PBSを腹部空洞からゆっくりと集めて、2から3匹の異なる動物からの試料をプールした。細胞を10分間300gでスピンにかけて、10%FBSを添加した1 mLのRPMI中に再懸濁させた。細胞を96ウェルのプレートに1ウェル当たり100,000~200,000細胞で播種して、2時間接着するに任せた。プレートを振盪して、滅菌PBSを使用してウェルを1回すすいだ。細胞を培地中で2~3日の間37、5%CO₂に保った。

10

【0042】

安定なshRNA-PRPF31ノックダウンARPE-19およびJ774.1細胞系列の生成および細胞の生存能力アッセイ

3種のshRNAをヒトPRPF31またはマウスPrpf31に設計して、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むpCAG-mir30ベクター中にクローニングした。これらのshRNAの配列は以下の通りである。ヒトshRNA1-5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGAGCAGATGAGCTCTTAGCTGATTAGTGAAGCCACAGATGTAATCAGCTAAGAGCTCATCTGCCTGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号27)、ヒトshRNA2-5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGAACCCAACTGTCCATCATTTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAATGATGGACAGGTTGGGTGTGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号28)、およびヒトshRNA3-5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGAGCTGAGTTCCTCAAGGTCAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTTGACCTTGAGGAAGCTCAGCCTGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号29);マウスshRNA1-5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGCTCAGTCAAGAGCATTTGCCAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTTGGCAATGCTCTTTGACTGAATGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号30)、マウスshRNA2-5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGACCTGTCTGGCTTCTCTTCTACTAGTGAAGCCACAGATGTAGTAGAAGAGAAGCCAGACAGGGTGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号31)、およびマウスshRNA3-5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGAGCCGAGTTCCTCAAGGTCAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTTGACCTTGAGGAAGCTCGGCTGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号32)。本発明者らは、緑色蛍光タンパク質に対するshRNAをこのベクター中に非標的対照としてクローニングした(5'-TGCTGTTGACAGTGAAGCGCTCTCCGAACGTGTATCACGTTTAGTGAAGCCACAGATGTAACGTGATACACGTTTCGGAGATTGCCTACTGCCTCGGA-3'(配列番号33))。shRNAを含むベクターをPstIで線状化して、Amxa電気穿孔法キットV(Amxa)を使用して、別々のARPE-19(ヒトRPE細胞系列、ATCC)またはJ774A.1(マウスマクロファージ細胞系列、ATCC)培養物にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を6ウェルプレートおよび2 mLの培養培地(1:1DMEM:10%FBS添加F-12)に移した。トランスフェクトされた細胞を、終夜37、5%CO₂で増殖させた。トランスフェクション後24時間に、1 μg/mL(ARPE-19)から1.25(J774A.1) μg/mLのピューロマイシン(Sigma)を添加して、安定な細胞系列を選択した。培地およびピューロマイシンを2日毎に10日間更新した。選択後、4種のARPE-19および4種のJ774A.1ノックダウン系列をコンフルエントになるまで増殖させた。ノックダウンの有効度を決定するために、安定な系列に、ARPE-19細胞中のV5でタグを付けたPRPF31、ま

20

30

40

50

たは Gateway Destinationベクター (Invitrogen) 中にクローニングされた V5 でタグを付けた Prpf31 のいずれかを一過性にトランスフェクトした。ウェスタンブロットを実施して、Odyssey 赤外線撮像装置 (Li-Cor) を使用して V5 でタグを付けた PRPF31 を定量した。細胞生存能力アッセイは、Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を製造業者の推奨に従って使用して実施した。簡単に説明すると、ARPE-19 細胞を、96 ウェルの細胞培養プレート (Corning、カタログ番号 3904) に 1,000 細胞/ウェルの密度で播種した。10% FBS を添加した DMEM 中で、細胞を 37、5% CO₂ で 3 日間増殖させた。この期間の後、細胞の生存能力をルミネッセンスにより測定し、スチューデント t - 検定を使用して統計的有意性を決定した。

10

【0043】

インビトロにおける食作用アッセイ

光受容体外側セグメントを屠殺場から得られた新鮮なブタの眼から単離し、以前に記載したインビトロ食作用アッセイ¹³のために、FITC 染料 (Invitrogen) を用いて共有結合で標識した。コンフルエントに培養された RPE 細胞を、1 細胞当たり約 10 FITC-POS でチャレンジし 1.5 時間置いた。1 mM MgCl₂ および 0.2 mM CaCl₂ を添加した PBS で 3 回洗浄して、非特異的に結合した POS を徹底的に除去した。内在化した POS を測定するために、一部のウェルをトリパンブルーと 10 分間インキュベートして、表面に結合した FITC 標識された POS の蛍光を以前に記載したように²⁶ 消光した。細胞を氷冷メタノールで固定して、核を Hoechst 33258 (Invitrogen) または DAPI (Euromedex) で対比染色した。細胞を、Nikon Ti2 または Leica DM6000 蛍光顕微鏡を 20x で使用して撮像した。RPE 初代培養について、FITC/DAPI 比を、全ての視野で、1 細胞当たりの POS の数に対応して計算した。FITC-POS を 1 細胞基準で 100 細胞について計算して、ARPE-19 について 3 個のウェルで平均を決定した。腹腔マクロファージについて、FITC-POS および DAPI 標識された核を蛍光プレートの読みにより定量した (Infinite M1000、Magellan6 ソフトウェア、Tecan)。結合比は、内部移行ウェル (トリパンブルー処理した) で得られた結果を全食作用 (未処理) ウェルから差し引くことにより計算した。これを、3 から 6 回の独立

20

30

【0044】

食作用に先立って、安定なノックダウン J774A.1 系列のコンフルエント培養物を、Zymosan A Bioparticle Opsonizing 試薬 (Life Technologies) を製造業者のプロトコルに従って使用してオプソニン化した。オプソニン化の後、培養培地中で再構成された 1 μg の Zymosan A Bioparticle を 96 ウェルプレートの各培養ウェルに適用した。培養物を 37、5% CO₂ で 1 時間インキュベートした。固定および食作用レベルの決定は、上で記載したようにして実施した。

40

【0045】

インビボにおける日周期的な周期性のアッセイ

マウスは、光照射開始の 2 時間前 (-2)、光照射開始時 (0)、ならびに光照射開始後 2、4、および 8 時間に (+2、+4、+8) 安楽死させて、電子顕微鏡またはパラフィン包埋のいずれかのために、前に記載したように¹³、¹⁵ 処理した。電子顕微鏡のためには、全ての試薬を、Electron Microscopy Sciences から購入した。マウスを、2% グルタルアルデヒド + 2% パラホルムアルデヒドで灌流して、眼杯を、0.2 M カコジル酸ナトリウム緩衝液を添加した灌流緩衝液に移した。60 から 80 ナノメートルの超薄切片を、クエン酸鉛/酢酸ウラニルで染色して、視神経から 200 nM 離れた初期ファゴソームを計数した。初期ファゴソームは、以下の基準：1) そ

50

れがRPEの細胞原形質内に含有されていること、および2)視認できる層状構造を有すること、に合致する場合に計数する。顕微鏡のためには、眼杯をホルムアルデヒド/エタノール/酢酸中で固定して、Ottix Plus 溶媒代用品 (DiaPath) を使用してパラフィン包埋した。5マイクロメートルの切片に切り、SafeSolV 溶媒代用品を使用してパラフィンを除去した。切片を再水和して、色素を漂白するために、照明下で10分間1×SSC中5% H_2O_2 でインキュベートした。1×TBS中の10%BSAを使用して非特異的シグナル伝達を遮断した後、抗ロドプシン抗体 (Millipore) および抗マウスIgG-AlexaFluor488 (Invitrogen) を用いて切片を染色した。核はDAPIで染色して、(標準の手順に従って調製した) Mowiol を用いてスライドにマウントした。像のスタックは、60×油浸対物レンズを備えたOlympus FV1000 倒立共焦点顕微鏡で、4倍ズームおよび0.41 μm ステップサイズ走査で得て、Adobe Photoshop CS6ソフトウェアを使用して処理した。少なくとも100 μm の連続した網膜/RPEの領域が10回走査のスタックで計数された。各実験シリーズにおいて、ファゴソームの数は、網膜の長さに対して正規化して平均した。有意性は、スチューデントのt-検定を使用して($P < 0.05$)、全ての実験について $N = 2 \sim 5$ で決定した。

10

【0046】

インビボにおける網膜の接着アッセイ

本発明者らは、記載したようにして¹⁴インビボにおける網膜の接着アッセイを実施した。簡単に説明すると、水晶体および角膜を眼杯から取り外して、直ちにカルシウムおよびマグネシウムを添加したHanks生理食塩水緩衝液中で検死解剖する。視神経に放射状の切断を行い、神経網膜を平板化された眼杯から丁寧に剥離した。神経網膜試料を、50mM Tris-HCl (pH7.5)、2mM EDTA、150mM NaCl、1%トリトンX-100、0.1%SDS、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) および1mM PMSFを添加した1%Nonidet P-40中で溶解した。清澄化した上清からのタンパク質を、Bradfordアッセイを使用して定量し、等濃度をRPE65 (AbcamまたはMillipore) およびベータ-アクチン (AbcamまたはSigma) に対してイムノプロットした。メラニン色素を、不溶性の神経網膜のペレットから20%DMSO、2N NaOHを用いて抽出した。試料および市販のメラニン標準 (Sigma) を、吸光度を490nmで測定することにより定量した。異なった組織収率を説明するために、各試料で色素の存在量をタンパク質濃度に対して正規化した。イムノプロットのバンドを、ImageJソフトウェアv1.46rを使用して、全てのプロットに対して参照として共通の試料を使用して定量し、次にシグナルを平均した。有意性は、スチューデントのt-検定を使用して($P < 0.05$)、全ての実験について $N = 3 \sim 6$ で決定した。

20

30

【0047】

免疫蛍光顕微鏡

凍結切片のために、眼杯を2%パラホルムアルデヒド中で固定して、30%スクロース中で終夜4でインキュベートした。眼杯をO.C.T.Compound (Sakura) 中に包埋して、10 μm の切片を切った。切片を個々に、vインテグリン (BD Biosciences)、5インテグリン (Santa Cruz Biotechnology)、MerTK (FabGennix)、Mfg-E8およびGas6 (R&D Systems)、FAKクローン2A7 (Millipore)、およびタンパク質S (Sigma) に対する一次抗体とインキュベートし、続いてIgG-AlexaFluor488 (Invitrogen) とインキュベートした。核は、DAPIで染色して、Fluoromount (Electron Microscopy Sciences) を用いてマウントした。画像は、油浸60×対物レンズを使用するNikon Eclipse Ti 倒立蛍光顕微鏡を用いて撮った。画像をNIS-Elements ARソフトウェア (Nikon) で処理した。

40

【0048】

50

パラフィン切片のためには、動物を食作用のピーク時に屠殺して、眼をDavidson固定剤中で3時間4で固定し、次に水晶体および角膜を取り出した。眼杯をパラフィン中に包埋して5 μ m切片を切った。切片を「インビボにおける日周期的な周期性のアッセイ」の節に記載したように処理して、vインテグリン(Covance)、5インテグリン(Santa Cruz Biotechnology)、Mfg-E8、MERTKおよびGas6(R & D Systems)、FAKクローン2A7(Millipore)、およびタンパク質S(Novus Biologicals)に対する一次抗体と個々にインキュベートして、続いてIgG-AlexaFluor488(Invitrogen)を用い、二次抗体とのインキュベーションを行った。核をDAPIで染色して、Mowiolを用いてスライドにマウントした。画像を、40 \times 油浸対物プリズムを使用するLeica DM6000B落射蛍光顕微鏡を用いて撮った。画像を、ImageJ v1.46rおよびPhotoshop CS6ソフトウェアで処理した。

10

【0049】

結果

RPEの食作用はPrpf変異マウスで低下する

Prpf変異マウスの本発明者らの独自のキャラクタリゼーションで、電子顕微鏡により、1から2歳の変異体における形態学的変化が確認された⁸。ここで、本発明者らは、機能的変化が観察された形態学的変化に先行するかどうかを決定することを企てた。RPEは培養中に食作用活性を維持するので、本発明者らは、日齢9~10日のPrpf3^{T494M/T494M}、Prpf8^{H2309P/H2309P}、Prpf31^{+/-}マウスおよびそれらの対応する同腹子対照から独立の初代RPE培養を確立した。培養物がコンフルエントになったら、本発明者らは、1.5時間のインキュベーション後にFITC標識されたプタPOSを使用して食作用を測定した。図1A(パネル1~3)は、Prpf変異マウスおよびそれらの同腹子対照からのRPE細胞のPOS結合/取り込みを例示して、変異マウスによる食作用における定性的欠損を示す初代培養の代表的画像を示す。3種全ての変異体モデルにおいて、食作用における37~48%の減少が観察された(N=3~5、P<0.05)(図1B)。POSのカバーガラスへの非特異的結合を数えるために、本発明者らは、細胞を含有しないカバーガラス上で食作用のアッセイが実施される陰性対照を実験した。本発明者らは、POSのカバーガラスへのいかなる非特異的接着も観察しなかった(データ掲載せず)。

20

30

【0050】

本発明者らは、結合と内部移行との間の食作用の特異的ステップが、Prpf31^{+/-}RPEの初代培養で優先的に妨げられるかどうかを調べた。1.5時間食作用チャレンジを実施した後、本発明者らは、内在化したPOSのみを定量するために、細胞を処理して表面(結合したPOS)の蛍光を消光した。POSの結合は、変異体細胞で53 \pm 11%有意に減少した(N=2~5、P<0.05)が、野生型と変異体のRPE培養との間におけるPOS内部移行率に有意な差はなかった(図1C)。

【0051】

現在、PRPF31には64通りの知られた病原性変異があり、その多くはフレームのシフトが生じて、ナンセンス媒介崩壊経路を通して分解される^{2, 10, 11, 22}。ARPE-19は、自発的に不死化したヒトRPE細胞系列であり、トランスフェクションを受けやすく食作用能力を保持する²³。スプライシング因子における変異がヒトRPEモデルでも食作用に影響するかどうかを試験するために、本発明者らは、転写物の5'、3'および中部領域に対する3種の別個のshRNAを使用して、PRPF31のshRNAにより媒介されるノックダウンを有する3種の安定なARPE-19細胞系列を創り出した(図1D)。本発明者らは、対照として使用するために緑色蛍光性タンパク質に対するshRNAを有する第4の安定な細胞系列も生成した。3種のPRPF31 shRNA安定な細胞系列の各々で、本発明者らは、約60~95%のPRPF31のノックダウンを達成した(データ掲載せず)。shRNA-ノックダウンおよび非標的とされる対照ARPE-19細胞の細胞生存能力アッセイは、有意の低下が、PRPF31のノック

40

50

ダウンと関連して起こることはないことを示した(図1E)。食作用は試験された各系列で、標的とされない対照shRNA系列と比較して約40%減少した(図1F)。初代RPEに対して実施された食作用のアッセイと同様に、本発明者らは、陰性対照のアッセイも実施し、POSのカバーガラスへのいかなる非特異的接着も観察しなかった(データ掲載せず)。

【0052】

食作用のはたらきの混乱がRPEに特異的な機構であるか、または他の食作用細胞でも観察され得るかを決定するために、本発明者らは、マウスマクロファージ細胞系列、J774A.1において、Prpf31をノックダウンした。ARPE-19細胞系列におけるノックダウンの検討と同様に、3種の別個のshRNAを、転写物の5'-、3'-末端および中部に対するものとした。本発明者らは前の検討と同じ対照shRNAを使用した。安定なPrpf31細胞系列の各々で、本発明者らは、Prpf31の約45~70%ノックダウンを達成した(補足の図1A)。本発明者らは、試験された系列のいずれにおいてもいかなる食作用欠損も観察しなかった(補足の図1B)。本発明者らが非特異的POS接着を観察しなかったことを確かめるために、本発明者らは、以前の実験シリーズに対するように陰性対照のアッセイを実施した(データ掲載せず)。同一の実験を、Prpf31^{+/+}マウスから単離されたマウスの初代腹腔マクロファージで繰り返した。興味深いことに、野生型マクロファージと比較して、Prpf31変異体では、食作用のステップ、すなわち結合または内部移行も、全食作用も、影響されなかった(補足の図1C)。

【0053】

食作用の日周期的な周期性が乱される

光照射開始後2時間でピークになり、その日の残りには比較的不活性にとどまる^{1,3}強い日周期的な、同期されたリズムに従って、脱落したPOSのRPEによる食作用が生じる。本発明者らは、光サイクルを通して5つの時点で、インビボにおける食作用を、電子顕微鏡(図2A、Prpf3およびPrpf8変異体)または免疫蛍光(図2B、Prpf31変異体)のいずれか(両方共、RPEの食作用のリズムを推定する認められた技法^{1,3,15})を使用して、測定した。Prpf3およびPrpf8の対照および変異マウスについて、本発明者らは、電子顕微鏡写真で層状の構造(図2A、挿入された矢じりは層状の構造を示す)を含有する初期のファゴソームを計数した。食作用の周期性は、パラフィン包埋およびロドプシンに対する染色を使用して、Prpf31^{+/+}マウスで決定して、本発明者らは、RPE細胞層に存在するファゴソーム(図2B、矢じり)を計数した。本発明者らは、光照射開始後2時間に全ての対照マウスで食作用のバーストを観察して、網膜の切片の100μm当たり22~26個のファゴソームを確認した(図2C、+2時点)。対照的に、変異マウスは、同じピーク時点で10~14個のファゴソームを示しただけであった。光照射の他の間：暗サイクルでは、食作用レベルは対照マウスでは比較的低いままであり(「ピークオフ時間」、2~12個のファゴソーム/100μm網膜)、これらのレベルは、変異マウスでは一般的に上昇した(6~14個のファゴソーム/100μm網膜)。これらの結果は、変異マウスの3種全てのタイプにおいて食作用のピーク強度における低下を示し、ピーク時が広がってそれがPrpf3およびPrpf8変異体ではより長く持続して、Prpf31変異体ではより早く始まる。さらに、Prpf8変異体は、ピークオフ時点で(+8時間)、WT対照と比較して有意により多くのファゴソームを有する。

【0054】

減少した網膜の接着がピーク時点で観察される

RPE頂点の微絨毛とPOSの末端の先端との間の接着は、同期されたリズムに従って、最大強度は光照射開始後3.5時間に、食作用のピークのわずかに後に起こることが知られている^{4,15}。接着は、安楽死の直後に平坦化された眼杯から網膜を剥離し、次に網膜に移されたRPE65などのRPEメラニン含有率および頂点のRPEタンパク質マーカーの両者を定量することにより、決定することができる。この方法を使用して、本発

10

20

30

40

50

明者らは、Prpf変異マウスおよび同腹子対照で、光照射開始後3.5および8.5時間に(それぞれ、ピーク時およびピークオフの接着)接着を推定した。RPE接着は、先ず標準的メラニン定量の手順¹⁴、次にメラニン生成を確認するためにRPE65の存在についてウェスタンブロットを使用して定量した。本発明者らは、ピーク時におけるPrpf^{3T494M/T494M}のメラニン含有率が $56 \pm 16\%$ 減少すること(N=6、 $p < 0.05$ 、変動は標準偏差に等しい)およびピークオフ時点における(図3A)接着に有意の変化はないことを認めた。ウェスタンブロット分析により、ピーク接着における $30 \pm 2\%$ 減少でこの観察を確認した(図3B)。Prpf^{8H2309P/H2309P}マウスにおけるメラニン定量は、接着が、ピーク時点で $61 \pm 28\%$ 、およびピークオフ時点で $51 \pm 16\%$ と有意に減少することを示した(両時点共、N=6、 $P < 0.05$) (図3A)。しかしながら、ウェスタンブロット分析では、ピーク時点においてのみ有意の $36 \pm 11\%$ 減少が確認された(図3B)。Prpf^{31+/+}マウスでは、 $15 \pm 1\%$ の減少がピーク時点で観察されて(図3A)、イムノブロット分析によって確認された(両方のパネルについて、N=3~7、 $P < 0.05$) (図3B、 $14 \pm 1\%$)。

【0055】

食作用および接着マーカーの局在

RPE細胞は高度に分極しており、それらの機能はこの極性に依存する²⁴。RPEで発現された多くのタンパク質の特異的局在は重要であり、局在における不規則性は、RPまたはベスト病などの網膜ジストロフィーの原因となり得る^{25、26}。3種全てのPrpf変異体マウスモデルにおける食作用および接着の両方の日周期的リズムの乱れがあると仮定し、本発明者らは、これらのプロセスにとって重要であることが知られているタンパク質の局在を特徴づけることを企てた。タンパク質の局在は、Prpf3およびPrpf8変異マウスについては凍結切片(図4)、およびPrpf31変異マウスについてはパラフィン切片でアッセイした(図5)。

【0056】

前に示したように、主要な食作用の受容体($\alpha 5$ インテグリンおよびMerTK)は、RPE頂点の表面に局在しているが²⁷、それらのリガンドは、POSおよびRPEの全体にわたって発現し得る²⁸。興味深いことに、光受容体間マトリックスで発現された細胞外リガンドは、RPEおよび光受容体細胞の両方で合成され得る。

【0057】

$\alpha 5$ -インテグリンは、その関連するリガンドMfg-E8(乳脂肪小球体-EGF8)と共に、食作用にとって重要であり、この機能の日周期的な周期性の原因であることが示されている^{13、15}。それに加えて、 $\alpha 5$ -インテグリンは、網膜の接着およびそのリズムに関与するが、Mfg-E8と異なるリガンドによる^{14、15、17}。 $\alpha 5$ インテグリンサブユニットは、RPE細胞における数種の $\alpha 5$ インテグリンサブユニットと複合体で結びつき¹⁴、それ故それは、 $\alpha 5$ インテグリンサブユニットの発現の分析にさらに関連する。したがって、本発明者らは、 $\alpha 5$ インテグリン受容体の $\alpha 5$ および $\beta 5$ サブユニットを別々に探索した。野生型組織では、各インテグリンはRPEの頂点側に主として局在しており、一部の発現はRPE細胞全体にわたる。全ての3種のPrpf変異体の組織において、 $\alpha 5$ -インテグリンの局在に変化は観察されなかった(図4A、5A)。対照的に、 $\alpha 5$ インテグリンは、Prpf3およびPrpf31変異体の組織ではRPEの基底側に主として局在しているが、それは、Prpf8変異体のRPE細胞ではRPE全体にわたる均等な発現を示した。本発明者らは、RPEまたはPOSのいずれにおいてもMfg-E8の局在における変化を観察しなかったが、Prpf8および31変異体の両方でより多く発現されているように思われる。

【0058】

下流のシグナル伝達タンパク質FAK(限局性接着キナーゼ)は、インビトロおよびインビボの両方で、 $\alpha 5$ インテグリンとMerTK受容体間の逐次活性化のリンクを提供する^{29、30、33}。FAKは、RPE全体にわたって見出され、このパターンに対する変化は、Prpf3またはPrpf31変異マウスでは観察されなかった(図4B、

5 B)。しかしながら、Prpf8変異マウスは、RPEの基底側にFAKの局在を示した。

【0059】

食作用は、活性のピーク時にリン酸化によるMerTKの適時の活性化により推進される^{13, 31, 32}。Gas6およびタンパク質Sは、インビトロで脱落した外側セグメントの取り込みを刺激し得るMerTKのリガンドである³³。二重ロックアウト動物は、MerTKに受容体がないラットで起こる急速な網膜の変性を再現するので³⁴、両リガンドは、POSの内部移行に必要である。野生型組織におけるMerTK発現は、RPEの頂点および基底膜の両方に局在するが、それに対してMerTKは、Prpf31変異体のRPE細胞の頂点側にだけ局在している(図4C、5C)。野生型組織では、第1のMerTKリガンドのGas6は、POSに、およびRPEの頂点の層に局在する。発現の減少はPrpf3変異マウスのPOSで観察され、散在性の発現がRPE全体にわたって見られる。Prpf8変異マウスは、POS中におけるGas6発現を維持するが、RPEにおける頂点の局在を失うように見えて、やはりRPE全体にわたって散在性の発現を示す。局在の変化は、Prpf31変異マウスでは観察することができない。第2のMerTKリガンドタンパク質Sの発現は、野生型および全てのPrpf変異マウス中のPOSに特異的に局在している(図4C、5C)。

【0060】

考察

ここで、本発明者らは、RNAスプライシング因子Prpf3、8、および31における変異を有するマウス中のRPEの機能の最初のキャラクタリゼーションを報告する。本発明者らが以前報告したように、変異マウスでは、光受容体の変性はないが、むしろRPEにおける形態学的変化がある⁸。RNAスプライシング因子RPは後期発症疾患であるから、これらの結果は、驚くことではなく、これらのモデルにより、本発明者らは、疾患の発症に導く機構を検討することができる。本発明者らの結果は、マウスにおいて、およびヒトにおいても、同様な食作用の欠損が、PRPF31がロックダウンされたヒトARPE-19細胞で観察されることを考慮に入れれば、RPEが、これらの3種のRNAスプライシング因子の変異により罹患する主要な細胞型である可能性が高いことを示す。疾患の病原性の厳密な機構は未だ確認されていないが、これらのデータは、研究がRPEに集中されることを許容する。例えば、これらの障害に罹患する主要な細胞型としてのRPEの同定により、これらの検討をヒト細胞に拡大することが可能になるであろう。遺伝性の網膜疾患を有する患者のヒト由来の多分化能幹細胞(hiPSC)からRPE細胞を発生させることが現在では可能であるからである⁴²⁻⁴⁵。

【0061】

実施例1のための参考文献

- [1] Will CL, Luhrmann R: Spliceosome Structure and Function. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2011, 3.
- [2] Liu MM, Zack DJ: Alternative splicing and retinal degeneration. Clinical Genetics 2013, 84: 142-149.
- [3] Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS: Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. Archives of Ophthalmology 2007, 125:151-158.
- [4] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP: Retinitis pigmentosa. The Lancet 2006, 368: 1795-809.
- [5] Sullivan LS, Bowne SJ, Reeves MJ, Blain D, Goetz K, NDifor V, Vitez S, Wang X, Tumminia SJ, Daiger SP: Prevalence of Mutations in eyeGENE Probands With a Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2013, 54:6255-61.
- [6] Nishiguchi KM, Rivolta C: Genes Associated with Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases Are Frequently Mutated in the General Population. PLoS ONE 2012, 7.
- [7] Neveling K, Collin RWJ, Gilissen C, van Huet RAC, Visser L, Kwint MP, Gijzen

10

20

30

40

50

- SJ, Zonneveld MN, Wieskamp N, de Ligt J, Siemiatkowska AM, Hoefsloot LH, Buckley MF, Kellner U, Branham KE, den Hollander AI, Hoischen A, Hoyng C, Klevering BJ, van den Born LI, Veltman JA, Cremers FPM, Scheffer H: Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Human Mutation* 2012, 33:963-72.
- [8] Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramaudt BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS, Pierce EA: Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011, 52:190-8.
- [9] Graziotto JJ, Inglehearn CF, Pack MA, Pierce EA: Decreased Levels of the RNA Splicing Factor Prpf3 in Mice and Zebrafish Do Not Cause Photoreceptor Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2008, 49:3830-8. 10
- [10] Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS, Rivolta C: Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of Clinical Investigation* 2008, 118:1519-31.
- [11] Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, Rivolta C: CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. *PLoS Genetics* 2012, 8.
- [12] Kevany BM, Palczewski K: Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Physiology* 2010, 25:8-15. 20
- [13] Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC: Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *The Journal of Experimental Medicine* 2004, 200:1539-45.
- [14] Nandrot EF, Anand M, Sircar M, Finnemann SC: Novel role for alphavbeta5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2006, 290(4):C1256-62.
- [15] Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, Finnemann SC: Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104:12005-10. 30
- [16] Ruggiero L, Connor MP, Chen J, Langen R, Finnemann SC: Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not Itgb5^{-/-} or Mfge8^{-/-} mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109:8145-8.
- [17] Nandrot EF, Finnemann SC: Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research* 2008, 40:120-3.
- [18] Nandrot E, Dufour EM, Provost AC, Pequignot MO, Bonnel S, Gogat K, Marchant D, Rouillac C, Sepulchre de Conde B, Bihoreau M-T: Homozygous Deletion in the Coding Sequence of the c-mer Gene in RCS Rats Unravels General Mechanisms of Physiological Cell Adhesion and Apoptosis. *Neurobiology of Disease* 2000, 7:586-99. 40
- [19] Issa PC, Bolz HJ, Ebermann I, Domeier E, Holz FG, Scholl HP: Characterisation of severe rod-cone dystrophy in a consanguineous family with a splice site mutation in the MERTK gene. *British Journal of Ophthalmology* 2009, 93:920-5.
- [20] Ostergaard E, Duno M, Batbayli M, Vilhelmsen K, Rosenberg T: A novel MERTK deletion is a common founder mutation in the Faroe Islands and is responsible for a high proportion of retinitis pigmentosa cases. *Molecular Vision* 2011, 17:1485.
- [21] Davies JQ and Gordon S: Isolation and culture of murine macrophages. *Basic cell culture protocols* 2005: 91-103. 50

- [22] Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips AD, Cooper DN: The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Human Genetics* 2013;1-9.
- [23] Mao Y, Finnemann S: Analysis of Photoreceptor Outer Segment Phagocytosis by RPE Cells in Culture. *Retinal Degeneration*. Edited by Weber BHF, Langmann T. Humana Press, 2013. pp. 285-95.
- [24] Marmorstein AD: The Polarity of the Retinal Pigment Epithelium. *Traffic* 2001, 2:867-72.
- [25] Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N, O'Sullivan J, Maher GJ, McKibbin M, Downes SM, Lotery AJ, Jacobson SG, Brown PD, Black GC, Manson FD: Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *American journal of Human Genetics* 2009, 85:581-92. 10
- [26] Lopes VS, Gibbs D, Libby RT, Aleman TS, Welch DL, Lillo C, Jacobson SG, Radu RA, Steel KP, Williams DS: The Usher 1B protein, MYO7A, is required for normal localization and function of the visual retinoid cycle enzyme, RPE65. *Human Molecular Genetics* 2011, 20:2560-70.
- [27] Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E: Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires $\alpha 5$ integrin for binding but not for internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, 94:12932-7. 20
- [28] Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G: TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2006, 33:96-108.
- [29] Finnemann SC: Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *The EMBO Journal* 2003, 22:4143-54.
- [30] Qin S, Rodrigues GA: Roles of $\alpha 5$, FAK and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis. *Experimental Eye Research* 2012, 94:63-70.
- [31] Nandrot EF, Silva KE, Scelfo C, Finnemann SC: Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of $\alpha 5$ integrin. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2012, 104:326-41. 30
- [32] Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA: Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* 2005, 81:581-91.
- [33] Burstyn-Cohen T, Lew ED, Traves PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G: Genetic Dissection of TAM Receptor-Ligand Interaction in Retinal Pigment Epithelial Cell Phagocytosis. *Neuron* 2012, 76:1123-32.
- [34] Yin J, Brocher J, Fischer U, Winkler C: Mutant Prpf31 causes pre-mRNA splicing defects and rod photoreceptor cell degeneration in a zebrafish model for Retinitis pigmentosa. *Molecular Neurodegeneration* 2011, 6:1-18. 40
- [35] Masland RH: Cell populations of the retina: the Proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011, 52:4581-91.
- [36] Finnemann SC, Nandrot EF: MerTK activation during RPE phagocytosis in vivo requires $\alpha 5$ integrin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2006, 572:499-503.
- [37] Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D: Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 2000, 26:270-1. 50

- [38] Mackay DS, Henderson RH, Sergouniotis PI, Li Z, Moradi P, Holder GE, Waseem N, Bhattacharya SS, Aldahmesh MA, Alkuraya FS: Novel mutations in MERTK associated with childhood onset rod-cone dystrophy. *Molecular Vision* 2010, 16:369-377.
- [39] Tschernutter M, Jenkins S, Waseem N, Saihan Z, Holder G, Bird A, Bhattacharya S, Ali R, Webster A: Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the MERTK gene. *British Journal of Ophthalmology* 2006, 90:718-23.
- [40] Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu C-c, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S: Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011, 478:127-31. 10
- [41] Dell'Angelica EC: AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Current Opinion in Cell Biology* 2009, 21:552-9.
- [42] Farkas MH, Grant GR, White JA, Sousa ME, Consugar MB, Pierce EA: Transcriptome analyses of the human retina identify unprecedented transcript diversity and 3.5 Mb of novel transcribed sequence via significant alternative splicing and novel genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 486.
- [43] Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO: Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Translational Medicine* 2013, 2:384-93.
- [44] Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, Pini Ila I, Martin JM, Tian S, Stewart R: Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment. *Stem Cells* 2011, 29:1206-18. 20
- [45] Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer J, Martin JM, Smith MA, Perez ET, Shen W, Wallace KA, Capowski EE: Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2013, 54: 6767-78.

【実施例 2】

【0062】

ゲノム編集技法を使用する PRPF31 ノックアウト ARPE - 19 細胞の開発および機能のキャラクタリゼーション 30

実施例 1 に記載したように、網膜色素上皮 (RPE) を、RNA スプライシング網膜色素変性 (RP) の 3 種の変異体マウスモデルにおける病原性の部位と同定した。しかしながら、これらの結果は、ヒト RPE において確認される必要があった。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技法の出現で、疾患のこれらの形態のためのヒト細胞系列モデルが開発された。本実施例は、ヒト細胞系列で初めて PRPF31 をノックアウトするための CRISPR/Cas9 ゲノム編集の使用を提供し、および RPE 機能に対する効果をキャラクタライズする。

【0063】

PRPF31 のエクソン 7 への 20 bp のガイド RNA (gRNA) を設計して、gRNA 足場配列を含有する pCAG ベクター中にクローニングした。gRNA ベクターを、pCAG-Cas9-GFP ベクターと共に ARPE - 19 細胞中にコトランスフェクトした。 40

【0064】

GFP 陽性細胞は、96 ウェルプレートの個々のウェル中に選別された単一細胞であり、コンフルエントになるまで増殖させた。DNA を各クローンから単離して、予測される切断部位付近の領域を Sanger 法で配列決定して、正確な切断および非相同末端連結 (NHEJ) を示すところを同定した。qRT-PCR および食作用アッセイの両方を使用して、5 通りの NHEJ 系列をさらなるキャラクタリゼーションのために選択して、FITC 標識された光受容体外側セグメント取り込みを、フローサイトメトリーを用いて定 50

量した。これらの系列を、R P E に特異的な遺伝子の分極および最高の発現を確実にするために、3週間コンフルエントな培養として維持した。

【0065】

トランスフェクション後に検証された個々のクローンの約25%が、2個と11個との間の塩基が欠失したN H E Jを示し、1つのクローンが1塩基挿入を有した(図6)。ヘテロ接合のインデル(indel)だけが同定され、これは、P R P F 3 1における変異がハプロ不全による疾患の原因であるという以前の報告と矛盾しない。5種のゲノム編集されたクローン中4種におけるP R P F 3 1の発現が、野生型対照と比較して50~80%有意に($P < 0.05$)減少した。これらの変化がゲノム編集の結果であることを確認するために、P R P F 3 1変異因子C N O T 3の発現レベルを決定した。1つの系列で発現が2倍に増大して、それは、その系列におけるP R P F 3 1の低下したレベルを説明することができる。P O S 取り込みのフローサイトメトリー分析は、食作用がゲノム編集された系列で10~60倍減少したことを示した。

10

【0066】

現在のところ、ヒトモデルでR N A スプライシング因子R P の疾患機構を検討することは難しい。本発明者らは、マウスモデルにおける発見を模倣するP R P F 3 1関連疾患のためのヒト細胞系列モデルを創出した。これらの系列は、本発明者らが、より関連するモデルで疾患を検討することを可能にして、本発明者らがスプライシングをより深く調べることができるようにするであろう。さらに、本発明者らは、P R P F 3 1のA A Vにより媒介される遺伝子増強の、疾患の病原性に対する効果および機能欠如のレスキューを検討

20

【0067】

例えば、実施例1で言及したように、光受容体外側セグメント(P O S)は、それらの末端の先端における視神経円板の脱落により調節されるそれらの基底における連続した増殖により、10日毎に完全に更新される(Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *Journal of Cell Biology*. 1967;33:61-72; Young RW. Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey. *J Ultrastruct Res*. 1971;34:190-203)。R P E による弱ったP O S 材料に対する食作用は、それがなくまたは遅延すると視力の喪失をもたらすので、適当な網膜の機能にとって必須である(Dowling JE, Sidman RL. Inherited retinal dystrophy in the rat. *Journal Cell Biology*. 1962;14:73-109; Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45)。P O S に対する食作用は、日齢10日の変異マウスからの初代R P E 細胞培養で減少し、これは、ヒトA R P E - 19細胞中のP R P F 3 1のs h R N A 媒介ノックダウンにより再現される(実施例1、図1)。インビボにおける食作用の日周期的な周期性も失われ、R P E 頂点の微絨毛とP O S との間の接着の強度は、3種全ての変異体モデルでピーク接着時において、低下していた(Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45; Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research*. 2008;40:120-3)。

30

40

【実施例3】

【0068】

ゲノム編集技法を使用するP R P F 3 1がノックアウトされたヒト由来多分化能幹細胞(h i P S C)の開発および機能のキャラクタリゼーション

上の実施例2で記載したように、C R I S P R / C a s 9ゲノム編集を、正常h i P S C においてP R P F 3 1をノックアウトするために使用した(Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proceedin*

50

gs of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110:15644-9; Xue H, Wu J, Li S, Rao MS, Liu Y. Genetic Modification in Human Pluripotent Stem Cells by Homologous Recombination and CRISPR/Cas9 System. *Methods Molecular Biology*. 2014; Peters DT, Cowan CA, Musunuru K. Genome editing in human pluripotent stem cells. *StemBook*. Cambridge (MA) 2013; Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 393-4. PMID: 3925309)。

【 0 0 6 9 】

h i P S C 技法の開発により、h i P S C は R P E 細胞に容易に分化することができるので、現在では、ヒト R P E 細胞が、R N A スプライシング因子遺伝子における変異により同様に罹患するかどうかを決定することが可能になっている（実施例 1、Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer JT, Martin J, Smith M, Shen W, Perez ET, Wallace KA, Capowski EE, Wright L, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54:6767-78; Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson L V, Clegg DO. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009;27:2427-34; Okamoto S, Takahashi M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52:8785-90; Ukrohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, Li W, Zhu S, Schultz A, Wang J, Siuzdak G, Ding S, Friedlander M. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem cells translational medicine*. 2012;1:96-109; Westenskow PD, Moreno SK, Krohne TU, Kurihara T, Zhu S, Zhang ZN, Zhao T, Xu Y, Ding S, Friedlander M. Using flow cytometry to compare the dynamics of photoreceptor outer segment phagocytosis in iPS-derived RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53:6282-90; Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem cells translational medicine*. 2013;2:384-93を参照されたい)。

h i P S C から誘導された R P E 細胞は、機能的なタイトジャンクション、P O S の食作用、および分極を含め、天然の R P E 細胞と多くの特徴を共有する。(同上)。

【 0 0 7 0 】

h i P S C - R P E を得るために、胚様体 (E B) 発生させて、ラミニンでコートされたプレートに接着させ、網膜の分化培地 (R D M) 中で 6 0 ~ 9 0 日間培養した。次に、色素沈着細胞の領域は、顕微解剖されて分離され、確立されたプロトコルに従って t r a n s w e l l インサート上に送られるであろう (Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer JT, Martin J, Smith M, Shen W, Perez ET, Wallace KA, Capowski EE, Wright L, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54:6767-78; Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, Miller MJ, Verhoeven AD, Martin JM, Wright LS, Shen W, Capowski EE, Percin EF, Perez ET, Zhong X, Canto-Soler MV, Gamm DM. Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53:2007-19)。

次に、色素の沈着した単層が再形成される場合、細胞をさらに 3 0 ~ 6 0 日の間培養する。実験で使用する前に、T r a n s w e l l インサート上で増殖した h i P S C - R P E 単層の経上皮耐性 (T E R) を測定する。T E R > 1 5 0 c m ² で培養されたものだけが、さらなる検討のために選択される。全ての実験のために、本発明者らは、目的の各変異および野生型対照細胞について 2 連を含め、それらを培養

10

20

30

40

50

し、平行して分析する。h i P S C から誘導された R P E 細胞の構造および機能を、数通りの方法を使用してキャラクタライズする。

【 0 0 7 1 】

構造：顕微鏡および電子顕微鏡を使用して、頂点の隆起および基底外側の陥入の形成を含む分極を推定する（実施例 1、Garland DL, Fernandez-Godino R, Kaur I, Speicher K D, Harnly JM, Lambris JD, Speicher DW, Pierce EA. Mouse genetics and proteomic analyses demonstrate a critical role for complement in a model of DHRD/ML, an inherited macular degeneration. Human Molecular Genetics. 2013;Sep 4. [Epub ahead of print]; Liu Q, Lyubarsky A, Skalet JH, Pugh EN, Jr., Pierce EA. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2003;44:4171-83）。

10

【 0 0 7 2 】

食作用：

上で記載したように、Prpf3^{T494M/T494M}、Prpf8^{H2309P/H2309P}、およびPrpf31^{+/-}マウスからの R P E 細胞の初代培養物は、POS に食作用を行う能力が有意に低下している（図 1）。本発明者らは、h i P S C から誘導された R P E 細胞の食作用機能を、確立された技法を使用して推定するであろう（実施例 1；Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta 5 integrin for binding but not for internalization. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94: 12932-7；Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. Human Molecular Genetics. 2013;22:593-60を参照されたい）。

20

【 0 0 7 3 】

h i P S C から誘導された R P E 細胞の極性を推定するために、Transwell 上で増殖させた安定にトランスフェクトされた細胞のピプラトーム切片を、確立された技法を使用して確立された R P E 細胞マーカーに対する抗体で免疫染色する（Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. Journal Experimental Medicine. 2004;200:1539-45；Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. Ophthalmic Research. 2008;40:120-3；Finnemann SC, Nandrot EF. MerTK activation during RPE phagocytosis in vivo requires alphaVbeta5 integrin. Advances Experimental Medicine Biology. 2006;572:499-503）。この染色された細胞を共焦点顕微鏡によって評価して、マーカータンパク質の分布および相対量を変異体および対照 h i P S C から誘導された R P E 細胞で比較する。これらの R P E 細胞マーカーのレベルも、分化した細胞でウェスタンブロットにより評価する（Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. Journal Experimental Medicine. 2004;200:1539-45）。

30

40

【 0 0 7 4 】

ゲノム編集された h i P S C において観察された R P E 表現型における変化は、RNA スプライシング因子 RP を有する患者からの h i P S C を使用して確認される。PRPF 31 の遺伝子における変異に基づく RP を有する患者および家族は同定されており、h i P S C は、3 組の家族の各々から 1 名の罹患したおよび 1 名の罹患していないファミリーメンバーからの線維芽細胞を使用して発生させる。簡単に説明すると、記載されたように、線維芽細胞を、7 種のリプログラミング因子（OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、c-Myc、KLF4、およびSV40の大きいT-抗原）をコードする非組み

50

込み性 *oriP* 含有プラスミドベクターを使用して、プログラムし直す (Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;324:797-801)。
 。正常核型を有し且つ多分化能性のマーカー OCT4、SSSEA4、NANOG および TRA-1-81 の奇形腫の検討および発現により多分化能であることが確認されている *hiPSC* 系列を、さらなる検討のために選択する (Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. *iPS* cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Human Molecular Genetics*. 2013;22:593-607; Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer JT, Martin J, Smith M, Shen W, Perez ET, Wallace KA, Capowski EE, Wright L, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human *iPS* cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54:6767-78; Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, Pinilla I, Martin JM, Tian S, Stewart R, Pattnaik B, Thomson JA, Gamm DM. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells*. 2011;29:1206-18)。
 各 *hiPSC* 系列が予想される変異を有することを確認した後、*hiPSC* から誘導された RPE 機能を患者からの細胞でキャラクタライズして、罹患していないファミリーメンバーと上記の技法を使用して比較する。

10

20

【実施例 4】

【0075】

遺伝子増強療法のための AAV ベクター

RNA スプライシング因子 RP に罹患した初代細胞と思われる RPE 細胞の同定 (実施例 1 を参照されたい) により、PRPF31 における変異により引き起こされた疾患のために遺伝子増強療法を使用する機会が得られる。この目標を達成するために、本発明者らは、RPE 細胞中でヒト PRPF31 を発現する AAV ベクターを開発して、培養された RPE 細胞において、および次にインビボにおける $Prpf31^{+/-}$ マウスにおいて、AAV 送達された PRPF31 の表現型を改良する能力を試験した。AAV は、RPE65 LCA およびコロイデレミアのための遺伝子療法の臨床試験、ならびに他の臨床試験および前臨床試験の成功に基づく、網膜の障害のための好ましい遺伝子送達ベクターである (Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2240-8. PMID: 2829748; Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2231-9; Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings National Academy Sciences USA*. 2008;105:15112-7. PMID: 2567501; Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JL, Hauck B, Zelenia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone

30

40

50

E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374:1597-605 ; Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon T J, Calcedo R, Pang JJ, Erger KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ, Hauswirth WW. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives Ophthalmology*. 2012;130:9-24 ; Bennett J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Cyckowski LL, Chung DC, McCague S, Pierce EA, Chen Y, Bennicelli JL, Zhu X, Ying GS, Sun J, Wright JF, Auricchio A, Simonelli F, Shindler KS, Mingozzi F, High KA, Maguire AM. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Science translational medicine*. 2012;4:120ra15 ; Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, Li J, Wang B, Monahan PE, Rabinowitz JE, Grieger JC, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Xiao X, Samulski RJ. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20:443-55. PMID: 3277234 ; Maclachlan TK, Lukason M, Collins M, Munger R, Isenberger E, Rogers C, Malatos S, Dufresne E, Morris J, Calcedo R, Veres G, Scaria A, Andrews L, Wadsworth S. Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Molecular Therapy*. 2011;19:326-34. PMID: 3034852 ; Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *New England Journal of Medicine*. 2011;365:2357-65. PMID: 3265081)。

【 0 0 7 6 】

AAVは、初期相の臨床試験で例外的安全性の記録を有し、AAVゲノムは光受容体およびRPE細胞などの最終的に分化した細胞中においてエピソーム形態で安定であるので、他のベクター系と比較して遺伝毒性のリスクをもたらしにくい (Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, Engelhardt JF, Kotin R, Davidson BL. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus : effects of viral capsid and genome size. *JVirology*. 2002;76:7651-60 ; Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW, Jacobson SG. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular Therapy*. 2005;12:1072-82)。

【 0 0 7 7 】

PFPF31のための数種のAAVベクター系が、異なったプロモーターの選択およびカプシドの血清型で開発されている。プロモーターに関して、ベクターは、多くの細胞型 (例えば、CAGまたはCASI)、RPE細胞 (例えば、RPE特異的タンパク質、例えば、VMD2、RPE65、RLBP1、RGR、またはTIMP3などのためのプロモーター) および光受容体細胞 (RHO) において発現を駆動するプロモーターを含むことができる (Esumi N, Oshima Y, Li Y, Campochiaro PA, Zack DJ. Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation. *Journal Biological Chemistry*. 2004;279:19064-73 ; Guziewicz KE, Zangerl B, Komaromy AM, Iwabe S, Chiodo VA, Boye SL, Hauswirth WW, Beltran WA, Aguirre GD. Recombinant AA

V-Mediated BEST1 Transfer to the Retinal Pigment Epithelium: Analysis of Serotype-Dependent Retinal Effects. *PLoS One*. 2013;8:e75666; Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, Sanges D, Iodice C, Petrillo M, Vandenberghe LH, Wilson JM, Marigo V, Surace EM, Auricchio A. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol*. 2007;81:11372-80)。AAVベクターの成分は、遺伝子発現のレベルおよび持続時間を改善するようにコドン最適化されたPRPF31配列を使用して合成される(III CR, Chiou HC. Gene therapy progress and prospects: recent progress in transgene and RNAi expression cassettes. *Gene Therapy*. 2005;12:795-802; Foster H, Sharp PS, Athanasopoulos T, Trollet C, Graham IR, Foster K, Wells DJ, Dickson G. Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Molecular Therapy*. 2008;16:1825-32; Sack BK, Merchant S, Markusic DM, Nathwani AC, Davidoff AM, Byrne BJ, Herzog RW. Transient B cell depletion or improved transgene expression by codon optimization promote tolerance to factor VIII in gene therapy. *PLoS One*. 2012;7:e37671)。予備的検討で、コドン最適化されたPRPF31は、全長PRPF31タンパク質をARPE-19細胞中で産生した。調製されたベクターは、最適の発現を達成するために必要な最小のベクターゲノムをコードする。本発明者らは、RPE細胞に形質導入することに主として関心があるので、本発明者らは、対照血清型としてAAV2を使用するが、これは、このベクターが培養された単層細胞に形質導入することが知られており、インビボで首尾よくRPEに形質導入を起こしたからである(Pang JJ, Lauramore A, Deng WT, Li Q, Doyle TJ, Chiodo V, Li J, Hauswirth WW. Comparative analysis of in vivo and in vitro AAV vector transduction in the neonatal mouse retina: effects of serotype and site of administration. *Vision Research*. 2008;48:377-85; Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, Wang L, Castle MJ, Maguire AC, Grant R, Wolfe JH, Wilson JM, Bennett J. Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Science translational medicine*. 2011;3:88ra54; Tolmachova T, Tolmachov OE, Barnard AR, de Silva SR, Lipinski DM, Walker NJ, Maclaren RE, Seabra MC. Functional expression of Rab escort protein 1 following AAV2-mediated gene delivery in the retina of choroideremia mice and human cells ex vivo. *Journal of Molecular Medicine*. 2013;91:825-37. PMID: 3695676)。ベクター製剤を生成し、確立された技法を使用して精製した(Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, Wang L, Castle MJ, Maguire AC, Grant R, Wolfe JH, Wilson JM, Bennett J. Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Science translational medicine*. 2011;3:88ra54, Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, Samanta A, Toelen J, Debyser Z, Wilson JM. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Human Gene Therapy*. 2010;21:1259-71. PMID: 2957274)。タイターの決定は、ベクターゲノム中のポリアデニル化シグナルに対するプライマープロベセットを用いてTaqman qPCRにより実施した。

【0078】

培養された細胞中におけるPRPF31の発現を検討するために、PRPF31変異体および対照ARPE-19細胞を、実施例1に記載したように、Transwellフィルター上で培養した。細胞を所望量のAAV-PRPF31ベクターで処理して、さらに11~14日間培養した。AAV-PRPF31で処理された野生型RPE細胞、およびAAV-E GFPで処理されたPRPF31^{+/+}細胞を対照として使用した。AAV-PRPF31処理の効果を、数通りの手法を使用して評価する。全長PRPF31タンパク質の産生は、形質導入後2~4日に免疫蛍光顕微鏡およびウェスタンブロット実験により評価する(Liu Q, Zhou J, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Smith JE, Sullivan LS, Zuo J, Milam AH, Pierce EA. Identification and subcellular localization

10

20

30

40

50

of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43:22-32 ; Liu Q, Zuo J, Pierce EA. The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *Journal Neuroscience*. 2004;24:6427-36 ; Falk MJ, Zhang Q, Nakamaru-Ogiso E, Kannabiran C, Fonseca-Kelly Z, Chakarova C, Audo I, Mackay DS, Zeitz C, Borman AD, Staniszewska M, Shukla R, Palavalli L, Mohand-Said S, Waseem NH, Jalali S, Perin JC, Place E, Ostrovsky J, Xiao R, Bhattacharya SS, Consugar M, Webster AR, Sahel JA, Moore AT, Berson EL, Liu Q, Gai X, Pierce EA. NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*. 2012;44:1040-5)。遺伝子移入を qPCR によってベクターゲノムについてアッセイした。変異体細胞の正常な食作用活性の回復を、FITC 標識 P O S を用いる処理により、確立された技法を使用して測定する (実施例 1、Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:12932-7 ; Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Human Molecular Genetics*. 2013;22:593-607)。

【 0 0 7 9 】

Prpf31^{+/-}変異マウスにおける PRPF31 発現および機能を検討するために、PRPF31 の AA V により媒介される送達を使用して、インビボで Prpf31^{+/-}マウスにおける欠損食作用を処理する。これらの検討のために、細胞培養の検討で確認された AA V - PRPF31 ベクターの最適の用量を、Prpf31^{+/-}マウスの 1 眼中の網膜下に注射する。注射後 1 カ月に眼を取り出して免疫蛍光およびウェスタンブロットアッセイを使用して、全長 PRPF31 タンパク質の発現および局在を評価する (Liu Q, Lyubarsky A, Skalet JH, Pugh EN, Jr., Pierce EA. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:4171-83 ; Liu Q, Saveliev A, Pierce EA. The severity of retinal degeneration in Rp1h gene-targeted mice is dependent on genetic background. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50:1566-74 ; Liu Q, Collin RW, Cremers F P, den Hollander AI, van den Born LI, Pierce EA. Expression of Wild-Type Rp1 Protein in Rp1 Knock-in Mice Rescues the Retinal Degeneration Phenotype. *PLoS One*. 2012;7:e43251)。

【 0 0 8 0 】

AA V を送達された PRPF31 の、RPE 食作用の周期性の喪失を防止またはレスキューする能力を、光照射開始の 2 時間前 (-2)、光照射開始時 (0)、および光照射開始の 2、4、および 6 (+2、+4、+6) 時間後に、ロドプシンの免疫蛍光染色および RPE 細胞層に所在するファゴソームの検出について、確立された技法を使用して推定する (Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchroized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45 ; Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research*. 2008;40:120-3)。本発明者らは、これらの動物で、AA V - PRPF31 の注射後 1 カ月および 2 カ月に初めて、表現型のレスキューの証拠について、処理された網膜を評価する。RPE 変性の防止の証拠を評価するために、マウスを月齢 1 カ月で処置して、RPE の超微細構造を、表現型のレスキューについて、AA V - PRPF31 注射後 5、8 および 11 カ月に評価する (Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramautd BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS, Pierce EA. Three gene-targeted mouse models of RNA splicing fact

10

20

30

40

50

or RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52:190-8)。P R P F 3 1 変異の無症候性の保因者からのデータに基づいて、本発明者らは、処理された R P E 細胞における P R P F 3 1 レベルの控えめの増大でさえ治療効果があるであろうと予想する (Rio FT, Wade NM, Ransijn A, Bers on EL, Beckmann JS, Rivolta C. Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *Journal Clinical Investigation*. 2008;118:1519-31 ; Vithana EN, Abu-Safieh L, Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, Hunt DM, Bustin SA, Bhattacharya SS. Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:4204-9)。

10

【実施例 5】**【0081】**

培養された R P E 細胞における欠損食作用表現型を改良するための A A V により媒介される遺伝子増強療法

上で記載したように、P R P F 3 1 における変異は、ハプロ不全により疾患を引き起こし、したがって優性の R P のこの形態は、遺伝子増強療法を用いる処置を受けやすいという十分な証拠がある (Wang et al., *American Journal Medical Genetics A*. 2003;121A:235-9 ; Xia et al., *Molecular Vision*. 2004;10:361-5 ; Abu-Safieh et al., *MolVis*. 2006;12:384-8 ; Rivolta et al., *Human Mutation*. 2006;27:644-53 ; Sullivan et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:4579-88 ; Rio et al., *Human Mutation*. 2009;30:1340-7)。この仮説と矛盾することなく、野生型対立遺伝子由来の P R P F 3 1 の発現のレベルは、P R P F 3 1 における変異を有する患者における疾患の重症度と相関する (Rio et al., *Journal Clinical Investigation*. 2008;118:1519-31 ; Venturini et al., *PLoS genetics*. 2012;8:e1003040 ; Rose et al., *Scientific reports*. 2016;6:19450)。この仮説を試験するために、本発明者らは、A A V により媒介される遺伝子増強療法を使用して、培養された R P E 細胞における表現型を改良した。

20

【0082】

これらの検討のために、本発明者らは、A A V . C A S I . P R P F 3 1 ウイルスのベクターを生成し、これが、培養された細胞中で全長 P R P F 3 1 タンパク質を産生できることを示した。このベクターの配列は以下の通りである。

30

【0083】

【化 1 - 1】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGGCGACCTTTGGTTCG
 CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCC
 TTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAAT
 TCGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGC
 CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
 AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGT
 ACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT
 ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGA
 GCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTAT
 TTTTAAATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGGC
 GGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGCGGAGAGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC
 GCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCCATAAAAAAGCGAAGCG
 CGCGGGGGGCGGTGCTGCTGCGCGTGCCTGCCCGCTGCCCGCTGCCCGCTCCCGCGCCCTCGCGC
 CGCCCCCGGGCTGACTGACCGGTTACTAAAAACAGGTAAGTCCGGCCTCCGCGCCGGGTTT
 TGGCGCCTCCCGGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAG
 CGAGCGTCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCT
 TAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGT
 TTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGAT
 CTCCTGGGGCGGTGAACGCCGATGATGCCTCTACTAACCATGTTTCATGTTTTCTTTTTTTTCTA
 CAGGTCTGGGTGACGAACAGGCTAGCGCCACCATGGGTAAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGG
 TCTCGATTCTACGGCCGCCACCATGTCTCTGGCAGATGAGCTCTTAGCTGATCTCGAAGAGGCGAG
 CAGAAGAGGAGGAAGGAGGAAGCTATGGGGAGGAAGAAGAGGAGCCAGCGATCGAGGATGTG
 CAGGAGGAGACACAGCTGGATCTTTCCGGGGATTCAAGTCAAGACCATCGCCAAGCTATGGGATA
 GTAAGATGTTTGTGAGATTATGATGAAGATTGAGGAGTATATCAGCAAGCAAGCCAAAGCTTC
 AGAAGTGATGGGACCAGTGGAGGCGCGCCTGAATACCGCGTCATCGTGGATGCCAACACCTG
 ACCGTGGAGATCGAAAACGAGCTGAACATCATCCATAAGTTTCATCCGGGATAAGTACTCAAAGA
 GATTCCTGAACTGGAGTCTTGGTCCCAATGCACTGGATTACATCCGCACGGTCAAGGAGCTG
 GGCAACAGCCTGGACAAGTGAAGAACAATGAGAACCTGCAGCAGATCCTCACCAATGCCACCA
 CATGGTCTGCTAGGCTCACCGCTCACCGCTCCACCACCCAGGGCAGCAGCTGTCCGAGGAGCTGGA
 GCGGCTGGAGGAGGCTGCGACATGGCGCTGGAGCTGAACGCCTCCAAGCACCGCATCTACGAG
 TATGTGGAGTCCCGGATGTCCTTCATCGCACCCAACCTGTCCATCATTATCGGGGCATCCACGGC
 CGCCAAGATCATGGGTGTGGCCGGCGGCTGACCAACCTCTCCAAGATGCCCGCTGCAACATCA
 TGCTGCTCGGGGCCAGCGCAAGACGCTGTCCGGGCTTCTCGTCTACCTCAGTGTGCCCCACACC
 GGCTACATCTACCACAGTGACATCGTGCAGTCCCTGCCACCGGATCTGCGGGCGAAAGCGGGCC
 GGCTGGTGGCCGCCAAGTGACACTGGCAGCCCGTGTGGACAGTTTTCCACGAGAGCACAGAAGG
 GAAGTGGGCTACGAAGTGAAGGATGAGATCGAGCGCAAATTCGACAAGTGGCAGGAGCCCGCC
 GCCTGTGAAGCAGTGAAGCCGCTGCCTGCGCCCTGGATGGACAGCGGAAGAAGCGAGGGCGC
 CGCAGGTACCGCAAGATGAAGGAGCGGCTGGGGCTGACGGAGATCCGGAAGCAGGCCAACCGT
 ATGAGCTTCGGAGAGATCGAGGAGGACGCTACCAGGAGGACCTGGGATTACGCTGGGCCACC
 TGGGCAAGTCCGGCAGTGGGCGTGTGCGGCAGACACAGGTAACGAGGCCACCAAGGCCAGGA
 TCTCCAAGACGCTGCAGCGGACCCTGCAGAAGCAGAGCGTCTGATATGGCGGGAAGTCCACCAT
 CCGCGACCGCTCCTCGGGCACGGCTCCAGCGTGGCCTTACCCCACTCCAGGGCCTGGAGATTG
 TGAACCCACAGGCGGCAGAGAAGAAGGTGGCTGAGGCCAACCAGAAAGTATTTCTCCAGCATGGC
 TGAGTTCCTCAAGGTCAAGGGCGAGAAGAGTGGCCTTATGTCCACCTGAACCGGTTGGCTAATAA
 AGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATAT
 GGGAGGGCAAATCATTAAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCA
 TATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTG
 CTGTCCATTCTTATCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTTGT
 GTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCCTCT
 CCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTTCTCTTATGGAGATCGGATCCGAATTTCCCGATAAG
 GATCTTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACATAAAGGAAC
 CCCTAGTGTAGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA
 AAGTCCGGCCGACCGCCGGGCTTTGCCCGGCGCTCAGTAGCGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTTA
 ATTAACCTAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAA
 CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
 TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGATTAA
 GCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCT
 CCTTTCGCTTTCCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGG
 GGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGT
 GATGTTTACAGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAC
 GTTCTTTAATAGTGGACTTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTT
 TGATTTATAAGGGATTTTTCGGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
 TTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTATAATTTACAGTGGCATCTTTCCGGGAAATGTG

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

【化 1 - 2】

CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
 CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC
 CCTTATTTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
 AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAATAGTGGTA
 AGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTAT
 GTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCT
 CAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
 GAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACG
 ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGA
 TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTA
 GTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACA
 ATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG
 GCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTG
 GGGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG
 ATGAACGAAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA
 CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGT
 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTC
 AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
 GCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
 TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAG
 TTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA
 GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
 TAAGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACC
 TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
 AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACAGGGGAGCTTCCAG
 GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
 CTGGCCTTTTTGCTGCGGTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC
 GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGACCGAGCGCAGCGAGTC
 AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATT
 CATTAAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA
 ATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
 GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTT
 AATTAAGG (配列番号 34)

10

20

- I T R - p Z a c 2 . 1 逆位末端反復 - n t s 1 ~ 1 3 0 および 3 2 9 1 ~ 3 4 2 0
- プロモーター - C A S I n t s 1 9 7 ~ 1 2 5 2
- タグ - V 5 n t s 1 2 5 9 ~ 1 3 0 9
- 挿入 - P R P F 3 1 n t s 1 3 1 9 ~ 2 8 1 8
- ポリ A 配列 - ウサギ - グロビン n t s 2 8 2 5 ~ 3 2 1 1

30

【 0 0 8 5】

本発明者らは、次に、ゲノム編集された P R P F 3 1 - 欠損 A R P E - 1 9 細胞におけ
 る欠損食作用表現型を修正する A A V . C A S I . P R P F 3 1 の能力を試験した。これ
 らの実験のために、ゲノム編集された P R P F 3 1 変異体 (G E 3 1) A R P E - 1 9 細
 胞に、A A V . C A S I . P R P F 3 1 を 0、1 0、0 0 0、および 1 5、0 0 0 の感染
 多重度 (M O I) で形質導入した。形質導入に続いて、各複製を、 1×10^6 個の F I T
 C 標識された光受容体外側セグメント (F I T C - P O S) と 1 時間 3 7 でインキュベ
 ートした。F I T C - P O S 取り込みは、フローサイトメトリーを使用して F I T C 陽性
 細胞を計数することにより決定した。G E 3 1 変異体細胞系列の処置の結果、用量依存性
 の様式で F I T C - P O S 取り込みが増大した (図 7)。この結果により、遺伝子増強療
 法が P R P F 3 1 - 関連する網膜の変性を処置するために使用される可能性が確認される
 。

40

【 0 0 8 6】

他の実施形態

本発明をそれらの詳細な説明と関連して説明したが、前述の説明は、例示することが意
 図され、本発明の範囲を限定することは意図されず、本発明は、添付の請求項の範囲によ

50

って定義されることが理解されるべきである。他の態様、利点、および改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

また、本発明は、以下の態様を含み得る。

[1]

ヒト対象において、P R P F 3 1における変異により引き起こされる網膜色素変性を処置する方法であって、網膜色素上皮 (R P E) 細胞における発現を駆動するプロモーターと作動可能に連結した、ヒト P R P F 3 1 をコードする配列を含む治療的有効量のアデノ随伴ウイルスタイプ 2 (A A V 2) ベクターを前記対象の眼に送達することを含む方法。

[2]

前記プロモーターが、C A G、C A S I、R P E 6 5 または V M D 2 プロモーターである、[1] に記載の方法。

10

[3]

前記 P R P F 3 1 配列がコドン最適化されている、[2] に記載の方法。

[4]

前記ベクターが網膜下注射により送達される、[1] ~ [3] に記載の方法。

[5]

ヒト対象の眼において P R P F 3 1 の発現を増大させる方法であって、網膜色素上皮 (R P E) 細胞における発現を駆動するプロモーターと作動可能に連結した、ヒト P R P F 3 1 をコードする配列を含む治療的有効量のアデノ随伴ウイルスタイプ 2 (A A V 2) ベクターを前記対象の眼に送達することを含む方法。

20

[6]

前記プロモーターが C A G、C A S I、R P E 6 5 または V M D 2 プロモーターである、[5] に記載の方法。

[7]

前記 P R P F 3 1 配列がコドン最適化されている、[5] に記載の方法。

[8]

前記ベクターが網膜下注射により送達される、[5] ~ [7] に記載の方法。

[9]

網膜色素上皮 (R P E) 細胞における発現を駆動するプロモーターに作動可能に連結した、ヒト P R P F 3 1 をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルスタイプ 2 (A A V 2) ベクター。

30

[1 0]

前記プロモーターが C A G、C A S I、R P E 6 5 または V M D 2 プロモーターである、[9] に記載のベクター。

[1 1]

前記 P R P F 3 1 配列がコドン最適化されている、[9] に記載のベクター。

[1 2]

網膜下注射による送達のために製剤化された、[9] ~ [1 1] に記載のベクターを含む医薬組成物。

40

[1 3]

ヒト対象の眼において、P R P F 3 1 における変異により引き起こされる網膜色素変性の処置に使用するための、[9] ~ [1 1] に記載のベクター。

[1 4]

ヒト対象の眼において、P R P F 3 1 の発現を増大させることに使用するための、[9] ~ [1 1] に記載のベクター。

[1 5]

ヒト対象の眼において、P R P F 3 1 における変異により引き起こされる網膜色素変性の処置に使用するための、[1 2] に記載の医薬組成物。

[1 6]

ヒト対象の眼において、P R P F 3 1 の発現を増大させることに使用するための、[1

50

2]に記載の医薬組成物。

【 図 1 - 1 】

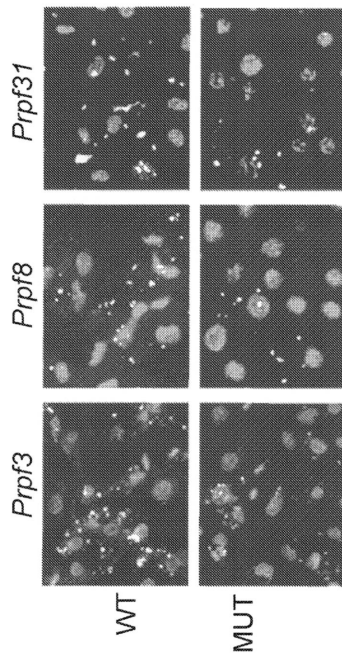


図1A

【 図 1 - 2 】

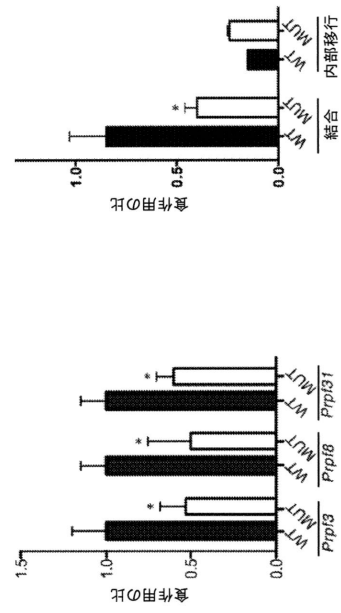
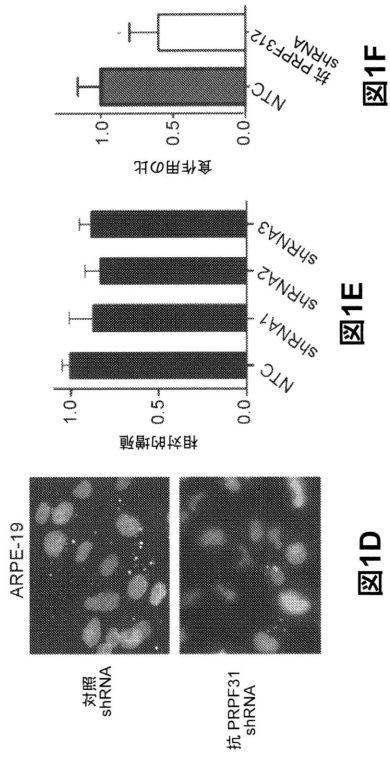


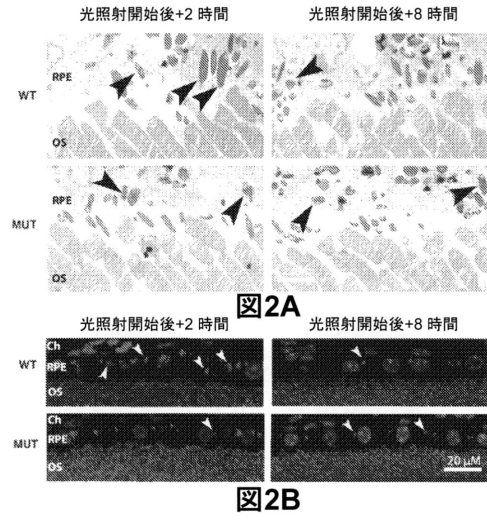
図1B

図1C

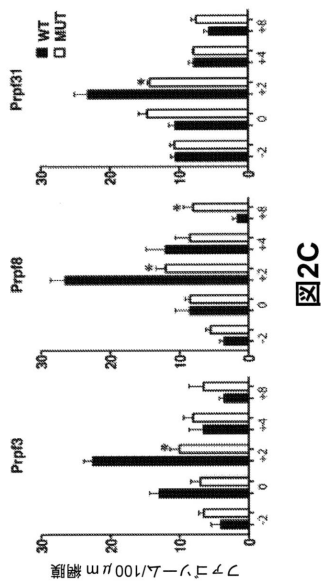
【 図 1 - 3 】



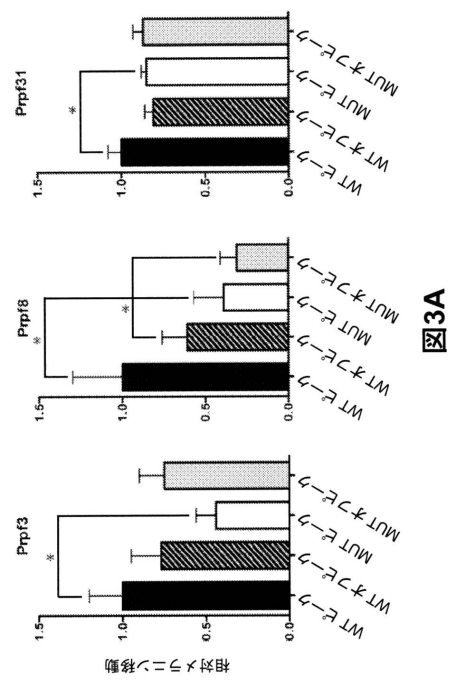
【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

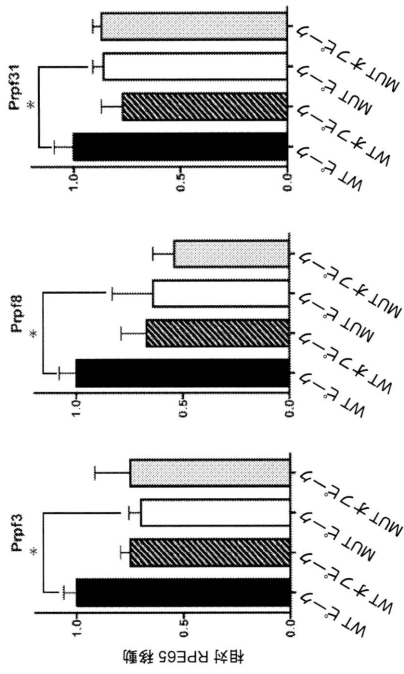


図3B

【 図 4 - 1 】

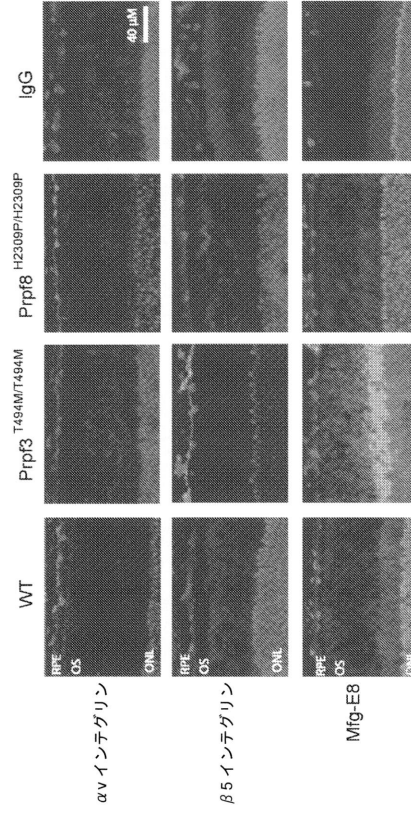


図4A

【 図 4 - 2 】



図4B

【 図 4 - 3 】

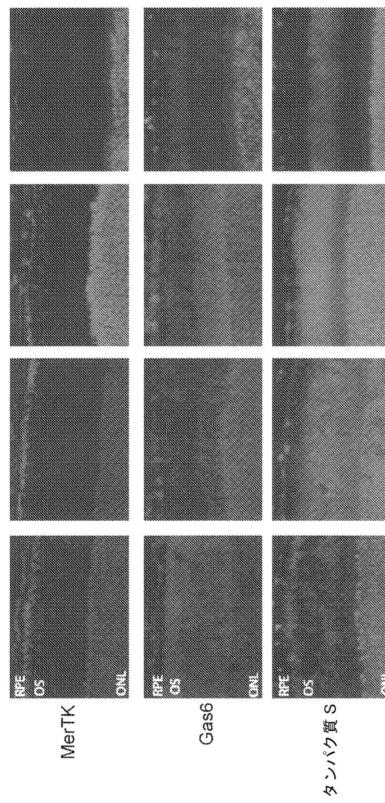


図4C

【 図 7 】

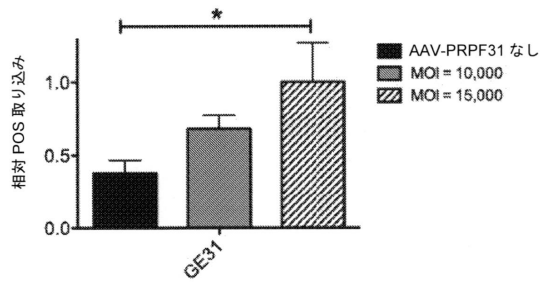


図7

【 配列表 】

0006812368000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47

(72)発明者 ピアス, エリック エー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 7 8 , ブルックライン, ゴーデン ストリート 1
1 8

(72)発明者 ファーカス, マイケル エイチ .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 5 1 , レヴェレ, アプト . 2 2 0 , パークサイド
プレイス 1 5

(72)発明者 ソウサ, マリア イー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 0 2 6 , デドハム, フェアフィールド ストリート
2 0

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 特表2014-512171(JP, A)
国際公開第2013/173129(WO, A2)
The American Journal of Pathology, 2014年, Vol.184, No.10, pp.2641-2652
実験医学, 2008年, Vol.26, No.10, pp.1590-1595
PLOS ONE, 2013年, Vol.8, No.10, e75666(11pages)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 7 6 1

A 6 1 K 3 8 / 1 7

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 2 7 / 0 2

C 1 2 N 1 5 / 8 6 4

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)