(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-539080
(P2024-539080A)
(43)公表日　令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全98頁）　最終頁に続く

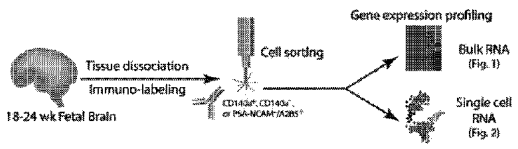
(21)出願番号　特願2024-523274(P2024-523274)
(86)(22)出願日　令和4年10月19日(2022.10.19)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月17日(2024.4.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/047083
(87)国際公開番号　WO2023/069482
(87)国際公開日　令和5年4月27日(2023.4.27)
(31)優先権主張番号　63/257,827
(32)優先日　令和3年10月20日(2021.10.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/350,039
(32)優先日　令和4年6月8日(2022.6.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/350,041
最終頁に続く

(71)出願人　521145462
ユニヴァーシティ オヴ ロチェスター
Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ
アメリカ合衆国 １４６４２ ニューヨーク州 ロチェスター、 ボックス ユーアールヴィ、 エルムウッド アヴェニュー ６０１
６０１ Ｅｌｍｗｏｏｄ Ａｖｅｎｕｅ，Ｂｏｘ ＵＲＶ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ １４６４２ （ＵＳ）
(74)代理人　110000084
弁理士法人アルガ特許事務所
(72)発明者　スティーブン エー． ゴールドマン
アメリカ合衆国 １４５８０ ニューヨー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　グリア前駆細胞を若返らせることによってミエリン欠乏症を処置するための組成物及び方法

(57)【要約】
本発明は、成体グリア前駆細胞の集団における若返りを誘導する方法、及びミエリン欠乏症を有する対象を処置する方法に関する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ミエリン欠乏症を有する対象を処置する方法であって、
前記対象のグリア前駆細胞において、Ｂ細胞リンパ腫／白血病１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａ）、ヒストンデアセチラーゼ２（ＨＤＡＣ２）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、ｍｙｃ癌原遺伝子タンパク質（ＭＹＣ）、高移動度群タンパク質ＨＭＧＩ－Ｃ（ＨＭＧＡ２）、核因子１Ｂ型（ＮＦＩＢ）及び転写エンハンサー因子ＴＥＦ－４　１０（ＴＥＡＤ２）からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子を発現させるステップ
を含み、前記発現させるステップが、前記対象においてミエリン形成を誘導するのに有効であり、それにより、前記ミエリン欠乏症を処置する、方法。
【請求項２】
前記対象のグリア前駆細胞において、ＰＤＧＦＲＡ、ＺＮＦ４８８、ＧＰＲ１７、ＯＬＩＧ２、ＣＳＰＧ４及びＳＯＸ１０からなる群から選択される１つ又は複数のグリア細胞特異的遺伝子を発現させるステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
成体グリア前駆細胞における若返りを誘導する方法であって、
前記成体グリア前駆細胞において、Ｂ細胞リンパ腫／白血病１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａ）、ヒストンデアセチラーゼ２（ＨＤＡＣ２）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、ｍｙｃ癌原遺伝子タンパク質（ＭＹＣ）、高移動度群タンパク質ＨＭＧＩ－Ｃ（ＨＭＧＡ２）、核因子１Ｂ型（ＮＦＩＢ）及び転写エンハンサー因子ＴＥＦ－４（ＴＥＡＤ２）からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子を発現させるステップ
を含み、前記発現させるステップが、前記成体グリア前駆細胞における若返りを誘導するのに有効である、方法。
【請求項４】
前記成体グリア前駆細胞において、ＰＤＧＦＲＡ、ＺＮＦ４８８、ＧＰＲ１７、ＯＬＩＧ２、ＣＳＰＧ４及びＳＯＸ１０からなる群から選択される１つ又は複数のグリア細胞特異的遺伝子を発現させるステップをさらに含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記発現させるステップが、ＢＣＬ１１Ａを発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記発現させるステップが、ＨＤＡＣ２を発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記発現させるステップが、ＥＺＨ２を発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記発現させるステップが、ＭＹＣを発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記発現させるステップが、ＨＭＧＡ２を発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記発現させるステップが、ＮＦＩＢを発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記発現させるステップが、ＴＥＡＤ２を発現させる、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】
前記発現させるステップが、
前記１つ又は複数の転写因子を少なくともコードする核酸配列及び／あるいは前記１つ又は複数のグリア細胞特異的遺伝子を少なくともコードする核酸配列；並びに
前記核酸配列に作動可能に連結された調節エレメント
を各々が含む１つ又は複数の発現ベクターを投与することによって実施される、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記調節エレメントが、グリア細胞特異的プロモーターを含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記調節エレメントが、誘導性プロモーターを含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記１つ又は複数の発現ベクターが、非ウイルスベクターを含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記１つ又は複数の発現ベクターが、ウイルスベクターを含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記ウイルスベクターがＡＡＶベクターである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
前記ミエリン欠乏症が、多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断性脊髄炎、視神経炎、皮質下脳卒中、糖尿病性白質脳症、高血圧性白質脳症、加齢性白質病、脊髄傷害、放射線又は化学療法誘導性脱髄、感染後及びワクチン接種後白質脳炎、脳室周囲白質軟化症、小児白質ジストロフィー、リソソーム蓄積症、先天性髄鞘形成不全、炎症性脱髄、血管性脱髄、並びに脳性麻痺からなる群から選択される状態に関連する、請求項１、２及び５から１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
Ｂ細胞リンパ腫／白血病１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａ）、ヒストンデアセチラーゼ２（ＨＤＡＣ２）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、ｍｙｃ癌原遺伝子タンパク質（ＭＹＣ）、高移動度群タンパク質ＨＭＧＩ－Ｃ（ＨＭＧＡ２）、核因子１Ｂ型（ＮＦＩＢ）及び転写エンハンサー因子ＴＥＦ－４　１０（ＴＥＡＤ２）からなる群から選択される前記１つ又は複数の転写因子を少なくともコードする核酸配列；並びに
前記核酸配列に作動可能に連結された調節エレメント
を含む発現ベクターであって、前記調節エレメントが、グリア前駆細胞特異的プロモーター又は誘導性プロモーターを含み、前記発現ベクターが、レンチウイルスベクター又はＡＡＶベクターである、発現ベクター。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、これにより参照により本明細書に組み込まれる、２０２１年１０月２０日出願の米国仮特許出願第６３／２５７，８２７号、２０２２年６月８日出願の同第６３／３５０，０３９号、同第６３／３５０，０４１号、及び同第６３／３５０，０４２号の優先権を主張する。
【０００２】
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈによって付

与されたＮＳ１１０７７６及びＡＧ０７２２９８の下で政府の支援によりなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【０００３】

本発明は、転写因子を抑圧する薬剤を用いてＣＮＳグリア集団を若返らせるための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【０００４】

グリア前駆細胞（オリゴデンドロサイト前駆細胞及びＮＧ２細胞とも呼ばれるＧＰＣ）は、発生の間にヒト脳に定着し、成人期を通じて豊富に持続する。発生の間、ヒトＧＰＣ（ｈＧＰＣ）は、高度に増殖性の二分化能性細胞であり、新たなオリゴデンドロサイト及びアストロサイトを生じる（Ｆｒｅｎｃｈ－Ｃｏｎｓｔａｎｔ及びＲａｆｆ、「Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｎｇ Ｂｉｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ ｉｎ Ａｄｕｌｔ Ｒａｔ Ｏｐｔｉｃ Ｎｅｒｖｅ」、Ｎａｔｕｒｅ ３１９：４９９～５０２（１９８６）、並びにＲａｆｆら、「Ａ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ ｔｈａｔ Ｄｅｖｅｌｏｐｓ ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ｉｎｔｏ ａｎ Ａｓｔｒｏｃｙｔｅ ｏｒ ａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｄｅｐｅｎｄｉｎｇ ｏｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｕｍ」、Ｎａｔｕｒｅ ３０３：３９０～３９６（１９８３））。げっ歯類では、この能力は、正常な加齢の間に衰え、増殖、遊走及び分化コンピテンスは全て、加齢したＧＰＣでは弱まる（Ｃｈａｒｉら、「Ｄｅｃｌｉｎｅ ｉｎ Ｒａｔｅ ｏｆ Ｃｏｌｏｎｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ（ＯＰＣ）－ｄｅｐｌｅｔｅｄ Ｔｉｓｓｕｅ ｂｙ Ａｄｕｌｔ ＯＰＣｓ Ｗｉｔｈ Ａｇｅ」、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ．Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．６２：９０８～９１６（２００３）；Ｇａｏ及びＲａｆｆ、「Ｃｅｌｌ Ｓｉｚｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ ａ Ｃｅｌｌ－ｉｎｔｒｉｎｓｉｃ Ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ Ｐｒｏｇｒａｍ ｉｎ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｎｇ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１３８：１３６７～１３７７（１９９７）；Ｍｏｙｏｎら、「ＴＥＴ１－ｍｅｄｉａｔｅｄ ＤＮＡ Ｈｙｄｒｏｘｙｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ Ｒｅｇｕｌａｔｅｓ Ａｄｕｌｔ Ｒｅｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ ｉｎ Ｍｉｃｅ」、Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ １２：３３５９～３３５９（２０２１）；Ｓｅｇｅｌら、「Ｎｉｃｈｅ Ｓｔｉｆｆｎｅｓｓ Ｕｎｄｅｒｌｉｅｓ ｔｈｅ Ａｇｅｉｎｇ ｏｆ Ｃｅｎｔｒａｌ Ｎｅｒｖｏｕｓ Ｓｙｓｔｅｍ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎａｔｕｒｅ ５７３：１３０～１３４（２０１９）；Ｔａｎｇら、「Ｌｏｎｇ－Ｔｅｒｍ Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ｐｕｒｉｆｉｅｄ Ｐｏｓｔｎａｔａｌ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ Ｃｅｌｌｓ．Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｆｏｒ ａｎ Ｉｎｔｒｉｎｓｉｃ Ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ Ｐｒｏｇｒａｍ ｔｈａｔ Ｐｌａｙｓ Ｏｕｔ Ｏｖｅｒ Ｍｏｎｔｈｓ」、Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１４８：９７１～９８４（２０００）；Ｔｅｍｐｌｅ及びＲａｆｆ、「Ｃｌｏｎａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｉｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｆｏｒ ａ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ Ｃｌｏｃｋ ｔｈａｔ Ｃｏｕｎｔｓ Ｃｅｌｌ Ｄｉｖｉｓｉｏｎｓ」、Ｃｅｌｌ ４４：７７３～７７９（１９８６）；Ｗｏｌｓｗｉｊｋ及びＮｏｂｌｅ、「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎ Ａｄｕｌｔ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ」、Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １０５：３８７～４００（１９８９）；並びにＷｒｅｎら、「Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｏｒｉｇｉｎ ａｎｄ Ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ｏｆ Ｏ－２Ａ ａｄｕｌｔ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１１６，：１６７～１７６（１９９２））。同様に、成体ヒトＧＰＣは、先天的に髄鞘形成不全のマウス宿主に移植された場合、その胎児カウンターパートよりも、増殖性が低く、遊走性が低く、より容易に分化することが、以前に見出された（Ｗｉｎｄｒｅｍら、「Ｆｅｔａｌ ａｎｄ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎ

itor Cell Isolates Myelinate the Congenitally Dysmyelinated Brain」、Nat.Med.10：93～97（2004））。しかし、胎児及び成体hGPCの明らかに異なるコンピテンシー、並びに加齢のげっ歯類モデルにおけるGPC転写に関する豊富なデータ（Bouhraraら、「Evidence of Demyelination in Mild Cognitive Impairment and Dementia Using a Direct and Specific Magnetic Resonance Imaging Measure of Myelin Content」、Alzheimers Dement.14：998～1004（2018）；de la Fuenteら、「Changes in the Oligodendrocyte Progenitor Cell Proteome with Ageing」、Mol.Cell Proteomics 19：1281～1302（2020）；Neumannら、「Metformin Restores CNS Remyelination Capacity by Rejuvenating Aged Stem Cells」、Cell Stem Cell 25：473～485 e478（2019）；及びSpitzerら、「Oligodendrocyte Progenitor Cells Become Regionally Diverse and Heterogeneous with Age」、Neuron 101：459～471 e455（2019））にもかかわらず、ヒト加齢の間のGPC遺伝子発現における変化を扱うデータ（Perlmanら、「Developmental Trajectory of Oligodendrocyte Progenitor Cells in the Human Brain Revealed by Single Cell RNA Sequencing」、Glia 68：1291～1303（2020）及びSimsら、「Complementary Patterns of Gene Expression by Human Oligodendrocyte Progenitors and their Environment Predict Determinants of Progenitor Maintenance and Differentiation」、Ann.Neurol.59：763～779（2006））、又は胎児及び成体ヒトGPCによる転写の明確な1対1の比較を提供するデータは、ほとんど入手不能である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、前記分野における欠乏症を克服することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一態様は、ミエリン欠乏症（myelin deficiency）を有する対象を処置する方法に関する。この方法は、対象のグリア前駆細胞において、B細胞リンパ腫／白血病11A（BCL11A）、ヒストンデアセチラーゼ2（HDAC2）、ヒストン－リシンN－メチルトランスフェラーゼEZH2（EZH2）、myc癌原遺伝子タンパク質（MYC）、高移動度群タンパク質HMGI－C（HMGA2）、核因子1B型（NFIB）及び転写エンハンサー因子TEF－4 10（TEAD2）からなる群から選択される1つ又は複数の転写因子を発現させるステップを含み、当該発現させるステップは、対象においてミエリン形成を誘導するのに有効であり、それにより、ミエリン欠乏症を処置する。

【0007】

本発明の別の態様は、成体グリア前駆細胞における若返りを誘導する方法に関する。この方法は、成体グリア前駆細胞において、BCL11A、HDAC2、EZH2、MYC、HMGA2、NFIB及びTEAD2からなる群から選択される1つ又は複数の転写因子を発現させるステップを含み、当該発現させるステップは、成体グリア前駆細胞におけ

る若返りを誘導するのに有効である。
【図面の簡単な説明】
【０００８】
【図１－１】ヒト胎児ＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ特徴付けを示す図である。パネルＡ：ＣＤ１４０ａ＋、ＣＤ１４０ａ－、及びＡ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭのバルク及びｓｃＲＮＡ配列決定のワークフロー－－選択された第２三半期ヒト胎児脳分離物。パネルＢ：２つのバッチにわたるすべての試料の主成分分析。
【図１－２】ヒト胎児ＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ特徴付けを示す図である。パネルＣ：ＣＤ１４０ａ＋対ＣＤ１４０ａ－及びＣＤ１４０＋対Ａ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－差次的発現遺伝子セットのベン図（ｐ＜０．０１及び絶対Ｌｏｇ２　変化倍率＞１）。
【図１－３】ヒト胎児ＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ特徴付けを示す図である。パネルＤ：両遺伝子セットの有意なＩｎｇｅｎｕｉｔｙパスウエイ解析（Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ　Ｐａｔｈｗａｙ　Ａｎａｌｙｓｉｓ）ターム。サイズは－ｌｏｇ１０　ｐ値を表し、色は、活性化Ｚスコア（青色、ＣＤ１４０ａ＋；赤色、Ａ２Ｂ５＋又はＣＤ１４０ａ－）を表す。
【図１－４】ヒト胎児ＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ特徴付けを示す図である。パネルＥ：両遺伝子セットの有意な遺伝子のＬｏｇ２　変化倍率。バーがないものは有意でなかった。
【図１－５】ヒト胎児ＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ特徴付けを示す図である。パネルＦ：パネルＥの１９個の選択された遺伝子の、変換された、１００万個当たりの転写物（ＴＰＭ）のヒートマップ。
【図２－１】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＡ：在胎期間２０週のヒト胎児ＶＺ／ＳＶＺに由来するＦＡＣＳ単離ｈＧＰＣのｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ分析中に同定された主な細胞タイプのＵＭＡＰプロット。
【図２－２】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＢ～パネルＣ：ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－／Ａ２Ｂ５＋（Ｂ）又はＣＤ１４０ａ＋（Ｃ）ヒト胎児細胞のみのＵＭＡＰ。
【図２－３】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＤ：細胞タイプ選択マーカー遺伝子のバイオリンプロット。
【図２－４】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＥ：ＧＰＣ集団対プレＧＰＣ集団の火山プロット。
【図２－５】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＦ：ＧＰＣとプレＧＰＣとの間で差次的に発現された、選択された遺伝子の特徴プロット。
【図２－６】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＧ：有意に富化された、選択されたＧＰＣ　ＩＰＡターム及びプレＧＰＣ　ＩＰＡターム。その－ｌｏｇ１０　ｐ値及び活性化Ｚスコアが示されている。
【図２－７】ＣＤ１４０ａ及びＡ２Ｂ５で選択されたヒト胎児ＧＰＣの単一細胞ＲＮＡ配列を示す図である。パネルＨ：胎児ｈＧＰＣで有意に活性化されると予測された転写因子の選択された特徴プロット。ＳＣＥＮＩＣパッケージを使用して計算された相対的転写因子レギュロン活性化が示されている。
【図３－１】成体ヒトＧＰＣが胎児ＧＰＣとは転写的及び機能的に異なることを示す図である。パネルＡ：ヒト成体ＧＰＣ及び胎児ＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ分析のワークフロー。パネルＢ：３つのバッチにわたるすべての試料の主成分分析。
【図３－２】成体ヒトＧＰＣが胎児ＧＰＣとは転写的及び機能的に異なることを示す図である。パネルＣ：成体対胎児差次的発現遺伝子セットの両方のベン図。
【図３－３】成体ヒトＧＰＣが胎児ＧＰＣとは転写的及び機能的に異なることを示す図である。パネルＤ：厳選されたターム及び遺伝子のＩＰＡネットワーク。ノードサイズはノード次数に比例する。標識色は、成体（赤色）集団又は胎児（青色）集団のいずれかの富

化に対応する。
【図３－４】成体ヒトＧＰＣが胎児ＧＰＣとは転写的及び機能的に異なることを示す図である。パネルＥ：モジュールごとの有意なＩＰＡタームの棒グラフ。Ｚスコアは、胎児（青色）ｈＧＰＣ又は成体（赤色）ｈＧＰＣの活性化予測を示す。
【図３－５】成体ヒトＧＰＣが胎児ＧＰＣとは転写的及び機能的に異なることを示す図である。パネルＦ．ネットワーク遺伝子のＴＰＭのＬｏｇ２　変化倍率の棒グラフ及びヒートマップ。
【図４－１】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＡ：胎児ＧＰＣ及び成体ＧＰＣにおいて活性であると予測された有意に富化された転写因子の正規化富化スコアプロット。各ドットはモチーフであり、そのサイズはそのモチーフが活性であると予測される遺伝子の数を示し、色はそのモチーフが富化されていることが見出されるプロモーター付近のウィンドウを表す。
【図４－２】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＢ：富化ＴＦ　ＴＰＭのヒートマップ。
【図４－３】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＣ：両胎児ｈＧＰＣ分離物についての対数の変化倍率対成体ＧＰＣ。
【図４－４】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＤ：Ｄ胎児活性化因子。
【図４－５】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＥ：胎児リプレッサー。
【図４－６】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＦ：成体活性化因子。
【図４－７】転写因子活性の推定により、成体ｈＧＰＣ同一性の確立に１セットの転写リプレッサーの関与が示唆されることを示す図である。パネルＧ：成体リプレッサーに分割された厳選された遺伝子の直接転写因子活性予測。色は、成体（赤色）ｈＧＰＣ又は胎児（青色）ｈＧＰＣのいずれかにおける差次的発現を示す。形状はノードのタイプを示す（八角形、リプレッサー；長方形、活性化因子；楕円形、他の標的遺伝子）。四角で囲まれた遺伝子及び丸で囲まれた遺伝子は、グリア前駆細胞／オリゴデンドロサイト同一性、老化／増殖標的、又はそれらも活性化されていると考えられる上流もしくは下流ＴＦのいずれかに寄与する機能的関連遺伝子を示す。
【図５－１】成体ｈＧＰＣ富化リプレッサーによる加齢ＧＰＣトランスクリプトームの誘導を示す図である。パネルＡ：各々が転写リプレッサー：Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３、ＭＡＸ、又はＺＮＦ２７４の１つをコードする４つの異なるドキシサイクリン（Ｄｏｘ）誘導性ＥＧＦＰレンチウイルス発現ベクターの構造の概略アウトライン。パネルＢ：誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来ｈＧＰＣ培養物（Ｃ２７系（Ｃｈａｍｂｅｒｓら、Ｎａｔｕｒｅ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２７巻、２７５～２８０頁、２００９年；Ｗａｎｇら、Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　１２巻、２５２～２６４頁、２０１３年））を、単一のレンチウイルス又はビヒクルで１日間にわたって形質導入し、次いで残りの実験のために、Ｄｏｘで処理した。Ｄｏｘ誘導性導入遺伝子発現の開始の３、７、及び１０日後に、ｈＧＰＣをｑＰＣＲにかけるためにＦＡＣＳで単離した。
【図５－２】成体ｈＧＰＣ富化リプレッサーによる加齢ＧＰＣトランスクリプトームの誘導を示す図である。パネルＣ：一致時点対照と比べて各転写因子の発現を示すＤｏｘ処理細胞のｑＰＣＲ。パネルＤ：選択された加齢関連遺伝子のｑＰＣＲの変化倍率ヒートマップ。対照との時点内比較は、細胞バッチ効果の回帰後の線形モデルの事後最小二乗平均検定により計算した。ＦＤＲ調整済みｐ値：＊＜０．０５、＊＊＜０．０１、＊＊＊＜０．００１。
【図６－１】ｍｉＲＮＡが転写因子活性と並行して成体ＧＰＣ転写分岐を駆動することを

示す図である。パネルＡ：ヒトＡ２Ｂ５＋成体ＧＰＣ及びＣＤ１４０ａ＋胎児ＧＰＣに由来するｍｉＲＮＡマイクロアレイ試料の主成分分析。
【図６－２】ｍｉＲＮＡが転写因子活性と並行して成体ＧＰＣ転写分岐を駆動することを示す図である。パネルＢ：差次的に発現されたｍｉＲＮＡのＬｏｇ２　変化倍率の棒グラフ及びヒートマップ。
【図６－３】ｍｉＲＮＡが転写因子活性と並行して成体ＧＰＣ転写分岐を駆動することを示す図である。パネルＣ：その予測される遺伝子標的の平均ｌｏｇ２ＦＣに対する、ｍｉＲＮＡの富化特徴付けバブルプロット。
【図６－４】ｍｉＲＮＡが転写因子活性と並行して成体ＧＰＣ転写分岐を駆動することを示す図である。パネルＤ：胎児（上段）富化ｍｉＲＮＡ及びそれらの予測標的の厳選されたシグナル伝達ネットワーク。
【図６－５】ｍｉＲＮＡが転写因子活性と並行して成体ＧＰＣ転写分岐を駆動することを示す図である。パネルＥ：成体（下段）富化ｍｉＲＮＡ及びそれらの予測標的の厳選されたシグナル伝達ネットワーク。
【図７－１】図１と関連して、ＣＤ１４０ａ＋又はＡ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－選択によるヒト胎児ＧＰＣの富化を示す図である。パネルＡ：ＣＤ１４０ａ＋及びＡ２Ｂ５＋胎児ＧＰＣの主成分分析。パネルＢ：有意なＡ２Ｂ５（緑色）及びＣＤ１４０ａ（青色）富化遺伝子を示す火山プロット。
【図７－２】図１と関連して、ＣＤ１４０ａ＋又はＡ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－選択によるヒト胎児ＧＰＣの富化を示す図である。パネルＣ：ＣＤ１４０ａ＋及びＣＤ１４０ａ－胎児細胞の主成分分析。パネルＤ：有意なＣＤ１４０ａ－（深紅色）及びＣＤ１４０ａ（青色）富化遺伝子を示す火山プロット。
【図７－３】図１と関連して、ＣＤ１４０ａ＋又はＡ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－選択によるヒト胎児ＧＰＣの富化を示す図である。パネルＥ：両遺伝子セットで有意に上方制御及び下方制御された遺伝子のアップセットプロット。
【図８－１】図２と関連して、単一細胞ＲＮＡ－Ｓｅｑ品質フィルタリングを示す図である。フィルタリング無しのパネルＡ：Ａ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－捕捉のバイオリンプロット及びパネルＢ：ＣＤ１４０ａ　ｓｃＲＮＡ－ｓｅｑ捕捉のバイオリンプロット。
【図８－２】図２と関連して、単一細胞ＲＮＡ－Ｓｅｑ品質フィルタリングを示す図である。パネルＣ：Ａ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－捕捉及びパネルＤ：ＣＤ１４０ａ＋捕捉の品質フィルタリング（ミトコンドリア遺伝子発現パーセント＜１５％及び＞５００個の固有遺伝子）後のバイオリンプロット。
【図９－１】図２と関連して、ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－／Ａ２Ｂ５＋対ＣＤ１４０ａ＋胎児ｈＧＰＣの単離細胞ＲＮＡ配列決定を示す図である。パネルＡ：Ａ２Ｂ５＋胎児ｈＧＰＣ及びＣＤ１４０ａ＋胎児ｈＧＰＣのＵＭＡＰプロット。
【図９－２】図２と関連して、ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－／Ａ２Ｂ５＋対ＣＤ１４０ａ＋胎児ｈＧＰＣの単離細胞ＲＮＡ配列決定を示す図である。パネルＢ：各選別パラダイム分離物中の細胞タイプの頻度。パネルＣ：ＣＤ１４０ａ＋胎児ｈＧＰＣ単離物とＡ２Ｂ５＋胎児ｈＧＰＣ単離物との間で差次的に発現されたバルクＲＮＡ－Ｓｅｑ　Ｌｏｇ２　変化倍率対擬似バルクＬｏｇ２　変化倍率の散布図。
【図１０】図４と関連して、胎児ｈＧＰＣ又は成体ｈＧＰＣにおける活性転写因子の共有モチーフ：胎児ＧＰＣ及び成体ＧＰＣのすべての予測活性転写因子のマトリックスを示す図である。サイズ及び色は、転写因子間で共有されるモチーフの度合いを示す。
【図１１】図５と関連して、成体リプレッサーアイソフォーム発現を示す図である。各ＧＰＣグループ中の成体リプレッサーアイソフォームをコードするすべてのタンパク質の１００万個当たりの転写物（ＴＰＭ）の棒グラフ。
【図１２】図５と関連して、ｉＰＳＣ由来ｈＧＰＣのバルクＲＮＡ－Ｓｅｑが、加齢関連遺伝子の存在量の合致を明らかにすることを示す図である。ｉＰＳＣ由来ｈＧＰＣ（Ｃ２７）をＣＤ１４０ａ＋ＦＡＣＳで単離し、バルクＲＮＡ配列決定でアッセイした。本発明者らの活性転写因子コホートにあるものを含む関連するグリア加齢関連遺伝子の存在量が

、胎児ｈＧＰＣデータ及び成体ｈＧＰＣデータと並べて表示されている。
【図１３－１】図６と関連して、ｍｉＲＮＡの転写因子調節がグリア加齢遺伝子発現の転写後モジュレーションを提供することを示す図である。パネル（Ａ）：差次的に発現された成体ＧＰＣ　ｍｉＲＮＡ対胎児ＧＰＣ　ｍｉＲＮＡの上流にあることが予測された有意な成体対胎児のＧＰＣ転写因子のＬｏｇ２　ＦＣバイオリンプロット。
【図１３－２】図６と関連して、ｍｉＲＮＡの転写因子調節がグリア加齢遺伝子発現の転写後モジュレーションを提供することを示す図である。パネル（Ｂ）：図２の同定された転写因子のネットワーク及び差次的に発現された成体ｈＧＰＣ　ｍｉＲＮＡ対胎児ｈＧＰＣ　ｍｉＲＮＡに関するそれらの調節予測。
【図１４】パネルＡ：ＣＢｈ－ＢＣＬ１１　Ａ－ＧＦＰ及び対照ＣＢｈ－ＧＦＰレンチウイルスの設計を示す図である。パネルＢ：ＡＡＶＳ１遺伝子座に由来するｔＲＦＰ－ｍＳｃａｒｌｅｔを発現する、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９－改変Ｃ２７　ｉＰＳＣ系の生成を示す図である。パネルＣ：Ｒａｇ１マウスにおける長期キメラ化及びＢＣＬ１１Ａ過剰発現のための実験パラダイムを図示する概略図である。パネルＤ：ｉｎ　ｖｉｔｒｏではｄｄＰＣＲにより、及び（パネルＥ）ｉｎ　ｖｉｖｏでは免疫組織化学により確認された、ＣＢｈＢＣＬ１１Ａ－ＧＦＰによるＢＣＬ１１Ａ過剰発現を示す図である。
【図１５】パネルＡ：ＣＢｈ－ＢＣＬ１１Ａ－ＧＦＰ（Ｌ）又はＣＢＨ－ＧＦＰ（Ｒ）による注射の３週間後のＲａｇ１－Ｃ２７１ＲＦＰマウス脳梁（ＣＣ）の冠状断面を示す図である。パネルＢ：ＢＣＬ１１Ａ－ＧＦＰの半球とＧＦＰのみの半球との間の、ＲＦＰタグ付けヒト細胞及びＯＬＩＧ２の差異を示す、ＣＣの冠状断面の拡大図である。パネルＤ：ＢＣＬ１１Ａ－ＧＦＰの半球とＧＦＰのみの半球との間の、ＲＦＰタグ付けヒト細胞及びマウスＮＧ２の差異を示す、ＣＣの拡大冠状断面を示す図である。
【図１６－１】パネルＡ：ＣＢｈ－ＢＣＬ１１Ａ－ＧＦＰ（Ｌ）又はＣＢｈ－ＧＦＰ（Ｒ）による注射の３週間後のキメラマウス脳梁（ＣＣ）の冠状画像を示す図である。ヒト細胞はｔＲＦＰ／ｍＳｃａｒｌｅｔでマーキングされており、ヒト核抗原（ｈＮＡ）は赤色で、ＯＬＩＧ２は緑色に染色されている。パネルＢ：注射の６週間後のキメラマウスＣＣの冠状画像を示す図である。ヒト細胞はｔＲＦＰ／ｍＳｃａｒｌｅｔで、ｈＮＡは赤色に、ＯＬＩＧ２は緑色にマーキングされている。
【図１６－２】パネルＣ：注射の３週間後のキメラマウスＣＣの冠状画像を示す図である。ヒト細胞はｔＲＦＰ／ｍＳｃａｒｌｅｔで、ｈＮＡは赤色に、ＰＤＧＦＲａは緑色にマーキングされている。パネルＤ：注射の３週間後のキメラマウスＣＣの冠状画像を示す図である。ヒト細胞はｔＲＦＰ／ｍＳｃａｒｌｅｔで、ｈＮＡは赤色に、ＮＧ２は緑色にマーキングされている。
【図１７】ＢＣＬ１１Ａ発現ベクターの例示的な設計を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
本発明のある特定の態様及び例示的な実施形態を、添付の構造及び図面の例を示しながら、詳細に参照するものとする。本発明の態様は、方法、物質、及び例を含む例示的な実施形態と併せて説明されることになる。そのような説明は限定ではなく、本発明の範囲は、一般的に公知であるか又は本明細書に組み込まれているかのいずれかである、均等物、代替物、及び改変物をすべて包含することが意図されている。本発明の記載されている態様、特徴、利点、及び特質は、１つ又は複数のさらなる実施形態では任意の好適な様式で組み合わせることができる。当業者であれば、本発明は、特定の実施形態の特定の態様又は利点の１つ又は複数を用いずに実施することができることを認識するだろう。他の例では、本発明のすべての実施形態に存在していなくてもよい追加の態様、特徴、及び利点を、ある特定の実施形態において認識し、特許請求することができる。さらに、当業者であれば、本明細書に記載のものに類似するか等価である多数の技法及び物質を認識するだろう。それらは、本発明の態様及び実施形態の実施に使用することができる。本発明の記載されている態様及び実施形態は、記載されている方法及びに物質に制限されない。
【００１０】

別様に定義されていない限り、本明細書で使用される技術的用語及び科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【００１１】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、状況が明白に別様に指示しない限り、複数の指示物を含む。したがって、例えば、「ペプチド」への言及は、「１つ又は複数の」ペプチド又は「複数の」そのようなペプチドを含む。

【００１２】

Ｉ．定義

本明細書で使用される場合、以下の用語又は語句（括弧内の）は、以下の意味を有するものとする。

【００１３】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、状況が明白に別様に指示しない限り、複数の指示物を含む。したがって、例えば、「ペプチド」への言及は、「１つ又は複数の」ペプチド又は「複数の」そのようなペプチドを含む。

【００１４】

「約」又は「およそ」という用語は、値の統計的に意味のある範囲内にあることを含む。そのような範囲は、所与の値又は範囲の同じ桁数内であってもよく、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、またより好ましくは１０％以内、さらにより好ましくは５％以内であってもよい。「約」又は「およそ」という用語により包含される許容可能なばらつきは、研究下の特定の系に依存し、当業者であれば容易に理解することができる。

【００１５】

「及び／又は」という用語は、本明細書で使用される場合、列挙されている項目が個々に又は組合せで存在するか又は使用されることを意味する。したがって、この用語は、列挙されている項目の「少なくとも１つ」又は「１つもしくは複数」が使用されるか又は存在することを意味する。

【００１６】

当業者であれば理解することになるように、書面による説明を提供することなど、ありとあらゆる目的のため、本明細書で開示されたすべての範囲は、ありとあらゆる考え得る部分範囲及びそれらの部分範囲の組合せも包含する。あらゆる列挙されている範囲は、同じ範囲が少なくとも等しい半分、３分の１、４分の１、５分の１、及び１０分の１などへと分割されることを十分に記述及び可能にすることを容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で考察されている各範囲は、下位３分の１、中間３分の１、及び上位３分の１などに容易に分割することができる。また当業者であれば理解することになるように、「最大で」及び「少なくとも」などのすべての文言は、記載の数値を含み、その後上記で考察されているように部分範囲に分割することができる範囲を指す。最後に、当業者であれば理解することになるように、範囲は各々個々のメンバーを含む。

【００１７】

本発明の範囲を理解するうえで、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語及びその派生形は、本明細書で使用される場合、述べられている特徴、要素、成分、群、整数、及び／又はステップの存在を指定するが、他の述べられていない特徴、要素、成分、整数、及び／又はステップの存在を除外しないオープンエンド用語であることが意図されている。上述の内容は、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｖｏｌｖｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」という用語、及びそれらの派生形など、類似の意味を有する単語にも当てはまる。「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ）」という用語及びその派生形は、本明細書で使用される場合、述べられている特徴、要素、成分、群、整数、及び／又はステップの存在を指定するが、他の述べられていない特徴、要素、成分、整数、及び／又はステップの存在を除外するクローズド用語であることが意図されている。「から本

質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語は、本明細書で使用される場合、述べられている特徴、要素、群、整数、及び／又はステップ、並びに特徴、要素、群、整数、及び／又はステップの基本的で新規の特質（複数可）に対して実質的に影響を及ぼさないものの存在を指定することが意図されている。「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語（など）が、移行句として使用されている実施形態又は請求項では、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語を、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」又は「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語に置き換えた実施形態も起想することができる。本開示の方法、キット、系、及び／又は組成物は、開示されている成分を含んでいてもよく、から本質的になっていてもよく、又はからなっていてもよい。

【００１８】

「追加の」又は「第２の」成分を含む実施形態では、第２の成分は、本明細書で使用される場合、他の成分又は第１の成分とは異なる。「第３の」成分は、他の、第１の、及び第２の成分とは異なり、さらに列挙されているか又は「追加の」成分は同様に異なる。

【００１９】

核酸に関して使用される場合、「相補的」という用語は、ＡとＴ又はＵとの、及びＧとＣとの塩基の対合を指す。「相補的」という用語は、完全に相補的である、すなわち、ＡとＴ又はＵの対合及びＧとＣとの対合が参照配列全体にわたって形成される核酸分子、並びに部分的に（例えば、少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％）相補的である分子を指す。

【００２０】

「核酸」、「ヌクレオチド」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、別様に指定されていない限り、ＤＮＡ及びＲＮＡの両方を包含する。

【００２１】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、又は「タンパク質」という用語は、同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。こうした用語は、あらゆる長さのタンパク質断片を含むあらゆる種類の天然に存在するタンパク質及び合成タンパク質、融合タンパク質、並びに限定ではないが、糖タンパク質並びにあらゆる他のタイプの修飾タンパ質（例えば、リン酸化、アセチル化、ミリストイル化、パルミトイル化、グリコシル化、酸化、ホルミル化、アミド化、ポリグルタミル化、ＡＤＰリボシル化、ペグ化、ビオチン化など）を含む修飾タンパク質を包含する。

【００２２】

遺伝子又は遺伝子産物（例えば、ＲＮＡ又はタンパク質）の発現に関して、「無効にする（ａｂｒｏｇａｔｅ）」、「無効化（ａｂｒｏｇａｔｉｏｎ）」、「排除する（ｅｌｉｍｉｎａｔｅ）」、又は「排除（ｅｌｉｍｉｎａｔｉｏｎ）」という用語は、遺伝子の転写及び／又は翻訳の完全な喪失又は遺伝子産物（例えば、ＲＮＡ又はタンパク質）の完全な喪失を指す。遺伝子又は遺伝子産物（例えば、ＲＮＡ又はタンパク質）の発現は、対照、例えば未改変細胞と比較して、本明細書に記載のものなどの技術水準で公知の方法により検出することができる。

【００２３】

「発現する」及び「発現」という用語は、対応する遺伝子又はＤＮＡ配列の転写及び／又は翻訳に関与する細胞機能を活性化することにより、遺伝子又はＤＮＡ配列中の情報が具現化されること、例えばＲＮＡ又はタンパク質が産生されることを可能にするか又は引き起こすことを意味する。ＤＮＡ配列は、細胞中で又は細胞により発現され、ＲＮＡ又はタンパク質などの「発現産物」を形成する。発現産物自体、例えば得られたタンパク質も、細胞により「発現された」と言うことができる発現産物は、細胞内、細胞外、又は膜貫通であるであると特徴付けることができる。

【００２４】

本明細書で使用される場合、「グリア細胞」という用語は、支持体及び栄養を提供し、

恒常性を維持し、ミエリンを形成するか又はミエリン形成を促進するかのいずれかであり、神経系でのシグナル伝送に参加する、非ニューロンの細胞の集団を指す。「グリア細胞」は、本明細書で使用される場合、オリゴデンドロサイト又は星状膠細胞などのグリア系統の完全に分化した細胞、並びに各々を大グリア細胞と呼ばれる場合があるグリア前駆細胞を包含する。

【００２５】

本明細書で使用される場合、「成体グリア前駆細胞」という用語は、出生後の任意の発生段階の哺乳動物に存在するグリア前駆細胞を指す。一部の実施形態では、「成体グリア前駆細胞」は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、又は１８歳以上であるヒト対象に存在するグリア前駆細胞を指す。一部の実施形態では、「成体グリア前駆細胞」という用語は、２０歳以上、２５歳以上、３０歳以上、３５歳以上、４０歳以上、４５歳以上、又は５０歳以上であるヒト対象に存在するグリア前駆細胞を指す。一部の実施形態では、「成体グリア前駆細胞」という用語は、５５歳以上、６０歳以上、６５歳以上、７０歳以上、７５歳以上、又は８０歳以上の成体など、高齢のヒト対象に存在するグリア前駆細胞を指す。

【００２６】

遺伝子産物（例えば、転写因子）の「機能的バリアント」という用語は、競合アッセイにおいて、未改変（野生型）転写因子の生物学的活性の少なくとも５０％を保持する改変転写因子（例えば、欠失、置換、挿入、グリコシル化などによる改変）を指す。

【００２７】

「有効量」という用語は、研究者、獣医、医師、又は他の臨床医により求められている組織、系、動物、個体、又はヒトの生物学的又は医学的応答を誘発する活性化合物又は医薬品の量を指す。

【００２８】

「調節配列」又は「調節エレメント」という用語は、そのような調節配列又はエレメントにより調節される遺伝子の発現を制御するか、調節するか、引き起こすか、又は可能にする核酸配列又はエレメントを指す。調節エレメント／配列は、調節される遺伝子のコード領域の５’もしくは３’側又はコード領域内、又はイントロン内に見出すことができる。調節配列／エレメントの例としては、これらに限定されないが、プロモーター、エンハンサー、ＲＮＡポリメラーゼ開始部位、リボソーム結合部位、及びコードされたポリペプチドの発現を所与の発現系にて促進する他の配列が挙げられる。

【００２９】

「プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、コード配列又は機能的ＲＮＡの発現を制御することが可能なヌクレオチド配列を指す。一般に、目的のポリヌクレオチドは、プロモーター配列の３’に位置する。一部の実施形態では、プロモーターは、その全体が天然遺伝子に由来する。一部の実施形態では、プロモーターは、異なる天然に存在するプロモーターに由来する異なるエレメントで構成されている。一部の実施形態では、プロモーターは、合成ヌクレオチド配列を含む。当業者であれば、異なるプロモーターは、異なる組織又は細胞タイプにおいて、あるいは異なる発生段階において、あるいは異なる環境条件に応答して又は薬物もしくは転写補因子の存在もしくは非存在に応答して、遺伝子の発現を指図することになることが理解されるだろう。遍在的、細胞タイプ特異的、組織特異的、発生段階特異的、及び条件付きプロモーター、例えば、薬物応答性プロモーター（例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター）は、当業者に周知である。プロモーターの例としては、これらに限定されないが、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ｐｈｏｐｈｏｇｌｙｃｅｒａｔｅ　ｋｉｎａｓｅ）（ＰＫＧ）プロモーター、ＣＡＧ、ＮＳＥ（神経特異的エノラーゼ）、シナプシン又はＮｅｕＮプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスＬＴＲプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ａｄ　ＭＬＰ）；単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えば、ＣＭＶ即時初期プロモーター領域（ＣＭＶＩＥ）、ＳＦＦＶプロモーター、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、合成プロモー

ター、及びハイブリッドプロモーターなどが挙げられる。プロモーターは、ヒト由来のものであってもよく、マウス由来を含む他の種に由来するものであってもよい。加えて、マウスメタロチオネイン遺伝子プロモーターなどの非ウイルス遺伝子に由来する配列も本明細書で使用することができるだろう。一部の実施形態では、プロモーターは異種性プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、近位及びより遠位の上流エレメントからなり、エンハンサーエレメントを含んでいてもよい。

【００３０】

「異種性プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、自然界では所与のコード配列に動作可能に連結していることが見出されないプロモーターを指す。

【００３１】

用語「エンハンサー」は、プロモーター活性を刺激することができ、プロモーターの生得的エレメント、又はプロモーターのレベルもしくは組織特異性を増強するために挿入された異種エレメントであり得る、ヌクレオチド配列を指す。

【００３２】

用語「動作可能に連結された」又は「作動可能に連結された」は、一方の機能が他方によって影響されるような、単一の核酸断片上での２つ又はそれよりも多くの核酸断片の関連を指す。例えば、プロモーターは、そのコード配列の発現に影響を与えることが可能である場合、コード配列と動作可能に連結している（例えば、コード配列は、プロモーターの転写制御下にある）。コード配列は、センス又はアンチセンス配向で、調節配列に動作可能に連結され得る。

【００３３】

用語「転写因子」は、特定の遺伝子の発現を調節するＤＮＡ結合タンパク質を指す。

【００３４】

転写因子は、遺伝子転写に対して正の影響を有し得、したがって、「転写活性化因子（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ）」、「活性化因子（ａｃｔｉｖａｔｏｒ）」又は「転写活性化因子（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ）」と呼ばれ得る。例示的な活性化因子（ａｃｔｉｖａｔｏｒ）（又は転写活性化因子（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ））は、シグナル伝達及び転写活性化因子３（ＳＴＡＴ３）である。本開示の図４Ｆに示されるように、成体グリア前駆細胞の文脈では、ＳＴＡＴ３は、老化関連遺伝子（例えば、ＢＩＮ１、ＤＭＴＦ１、ＣＤ４７、ＣＴＮＮＡ１、ＲＵＮＸ２、ＲＵＮＸ１、ＭＡＰ３Ｋ７及びＯＧＴ）、グリア細胞関連遺伝子（例えば、ＰＬＰ１、ＣＮＰ、ＰＭＰ２２、ＳＥＭＡ４Ｄ、ＣＬＤＮ１１、ＧＰＲ３７、ＭＹＲＦ、ＭＡＧ、ＢＣＡＳ１、ＳＴ１８、ＥＲＢＢ４、ＣＥＲＳ２、ＬＰＡＲ１及びＧＪＢ１）及び下流の転写因子（例えば、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６及びＩＫＺＦ３）のセットを活性化すると予測される。

【００３５】

転写因子はまた、遺伝子発現に負に影響を与え得、したがって、「転写リプレッサー」、「リプレッサー」又は「転写抑制因子」と呼ばれ得る。グリア前駆細胞老化に関与する例示的なリプレッサー（又は転写抑制因子）には、限定なしに、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６及びＩＫＺＦ３が含まれる。本開示の図４Ｇに示されるように、成体グリア前駆細胞の文脈では、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６及びＩＫＺＦ３は、増殖関連遺伝子標的（例えば、ＹＡＰ１、ＬＭＮＢ１、ＰＡＴＺ１、ＴＥＡＤ１、ＦＮ１、ＴＰ５３、ＣＤＫ１、ＣＣＮＤ２、ＣＤＫＮ２Ｄ、ＣＥＮＰＨ、ＭＫＩ６７、ＣＤＫ４、ＣＥＮＰＦ、ＣＤＫ５、ＣＤＫＮ３及びＣＨＥＫ１）、グリア細胞関連遺伝子（例えば、ＣＨＲＤＬ１、ＳＴ８ＳＩＡ１、ＰＴＰＲＺ１、ＣＡ１０、ＰＤＧＦＲＡ、ＢＣＡＮ、ＮＸＰＨ１、ＣＳＰＧ４及びＰＣＤＨ１５）及び下流の転写因子（例えば、ＢＬＣ１１Ａ、ＥＺＨ２、ＨＤＡＣ２、ＮＦ１Ｂ、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２及びＴＥＡＤ）のセットを抑制すると予測される。

【００３６】

用語「転写因子の阻害剤」又は「転写因子リプレッサー」は、転写因子の活性又は発現

を阻害する薬剤を指す。「転写因子の阻害剤」又は「転写因子リプレッサー」は、小分子、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ｓｈＲＮＡ又はｍｉＲＮＡであり得る。

【００３７】

本明細書、実施例及び特許請求の範囲において使用されるある特定の用語が、本明細書でまとめられる。他に定義しない限り、本開示において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【００３８】

本開示の所与の態様、特色、実施形態又はパラメーターについての選好及び選択肢は、文脈が他を示さない限り、本開示の全ての他の態様、特色、実施形態及びパラメーターについての任意の及び全ての選好及び選択肢と組み合わせて開示されているとみなすべきである。

【００３９】

ＩＩ．転写因子の活性化を含む方法

本発明の一態様は、ある特定の転写因子を活性化することによって、成体グリア前駆細胞における若返りを誘導する方法に関する。一部の実施形態では、この方法は、成体グリア前駆細胞において、Ｂ細胞リンパ腫／白血病１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａ）、ヒストンデアセチラーゼ２（ＨＤＡＣ２）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、ｍｙｃ癌原遺伝子タンパク質（ＭＹＣ）、高移動度群タンパク質ＨＭＧＩ－Ｃ（ＨＭＧＡ２）、核因子１Ｂ型（ＮＦＩＢ）及び転写エンハンサー因子ＴＥＦ－４（ＴＥＡＤ２）からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子の有効量を発現させるステップを含む。

【００４０】

本明細書で記載される場合、用語「若返り」又は「若返らせる」は、特に増殖及び／又は分化能に関する、細胞正体の喪失を伴わない、細胞における加齢プロセスの逆転及び若々しい細胞状態への復帰を指す。

【００４１】

本明細書に開示される方法における使用に適切な成体グリア前駆細胞には、哺乳動物グリア前駆細胞、例えば、ヒトグリア前駆細胞、げっ歯類グリア前駆細胞、非ヒト霊長類グリア前駆細胞、ヒツジグリア前駆細胞、ウシグリア前駆細胞、ブタグリア前駆細胞、イヌグリア前駆細胞及びネコグリア前駆細胞が含まれる。一部の実施形態では、成体グリア前駆細胞は、成体ヒトグリア前駆細胞である。

【００４２】

一部の実施形態では、グリア前駆細胞は、成体ヒトグリア前駆細胞である。一部の実施形態では、発現させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで実施される。一部の実施形態では、発現させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで実施される。

【００４３】

本出願の別の態様は、対象のグリア前駆細胞においてある特定の転写因子を活性化することによって、対象においてミエリン欠乏症を処置する方法に関する。一部の実施形態では、この方法は、対象のグリア前駆細胞において、ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子の有効量を発現させるステップを含む。

【００４４】

一部の実施形態では、発現させるステップは、ｅｘ　ｖｉｖｏで実施される。一部の実施形態では、発現させるステップは、ｉｎ　ｖｉｖｏで実施される。

【００４５】

本発明のこの態様によれば、ミエリン欠乏症は、多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断性脊髄炎、視神経炎、皮質下脳卒中（ｓｕｂｃｏｒｔｉｃａｌ　ｓｔｒｏｋｅ）、糖尿病性白質脳症（ｄｉａｂｅｔｉｃ　ｌｅｕｋｏｅｎｃｅｐｈａｌｏｐａｔｈｙ）、高血圧性白

質脳症（ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｖｅ ｌｅｕｋｏｅｎｃｅｐｈａｌｏｐａｔｈｙ）、加齢性白質病（ａｇｅ－ｒｅｌａｔｅｄ ｗｈｉｔｅ ｍａｔｔｅｒ ｄｉｓｅａｓｅ）、脊髄傷害、放射線又は化学療法誘導性脱髄、感染後及びワクチン接種後白質脳炎、脳室周囲白質軟化症、小児白質ジストロフィー（ｌｅｕｋｏｄｙｓｔｒｏｐｈｉｅｙ）（例えば、ペリツェウス・メルツバッハ病、テイ・サックス病（Ｔａｙ－Ｓａｃｈ Ｄｉｓｅａｓｅ）、サンドホフガングリオシドーシス、クラッベ病、異染性白質ジストロフィー、ムコ多糖症、ニーマン・ピック病Ａ型、副腎白質ジストロフィー、カナバン病、白質消失病及びアレキサンダー病）、リソソーム蓄積症、先天性髄鞘形成不全、炎症性脱髄、血管性脱髄（ｖａｓｃｕｌａｒ ｄｅｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ）、並びに脳性麻痺からなる群から選択される状態に関連し得る。

【００４６】

一部の実施形態では、ミエリン欠乏症は、神経変性疾患、例えば、ハンチントン病に関連する。本明細書で使用される場合、「ハンチントン病」は、典型的には成人期において顕在化する常染色体優性遺伝性脳障害を指す。ハンチントン病の病理は、髄鞘低形成、並びにニューロン及び白質喪失によって特徴付けられる（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｏｓｉｐｏｖｉｔｃｈら、「Ｈｕｍａｎ ＥＳＣ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ Ｈｕｎｔｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｒｅｖｅａｌ Ｃｅｌｌ－Ｉｎｔｒｉｎｓｉｃ Ｄｅｆｅｃｔｓ ｉｎ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２４（１）：１０７～１２２（２０１９）を参照されたい）。

【００４７】

他の実施形態では、ミエリン欠乏症は、精神神経疾患、例えば、統合失調症に関連する。本明細書で使用される場合、「統合失調症」は、比較的少量の白質及びしばしば明らかな髄鞘低形成によって典型的には特徴付けられる状態を指す（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｗｉｎｄｒｅｍら、「Ｈｕｍａｎ ｉＰＳＣ Ｇｌｉａｌ Ｍｏｕｓｅ Ｃｈｉｍｅｒａｓ Ｒｅｖｅａｌ Ｇｌｉａｌ Ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｉｏｎｓ ｔｏ Ｓｃｈｉｚｏｐｈｒｅｎｉａ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２１（２）：１９５～２０８（２０１７）を参照されたい）。

【００４８】

以下本明細書で使用される場合、ミエリン欠乏症を有する対象を「処置する」という用語は、以下を包含する：（１）ミエリン欠乏症に罹患している又はその素因がある可能性があるが、ミエリン欠乏症の臨床又は不顕性症状をいまだ経験も示しもしていない対象において発症するミエリン欠乏症の少なくとも１つの臨床又は不顕性症状の出現の発生率及び／又は可能性を予防する、遅延させる又は低減させること；あるいは（２）ミエリン欠乏症を阻害すること、即ち、ミエリン欠乏症もしくはその再発又はその少なくとも１つの臨床もしくは不顕性症状の発症を停止させる、低減させる又は遅延させること；あるいは（３）ミエリン欠乏症を軽減すること、即ち、ミエリン欠乏症、又はその臨床もしくは不顕性症状のうちの少なくとも１つの退縮を引き起こすこと。処置される対象にとっての利益は、統計的に有意、又は患者もしくは医師にとって少なくとも知覚可能のいずれかである。

【００４９】

以下本明細書で使用される場合、用語「対象」は、個々の生物、例えば、個々の哺乳動物を指す。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、非ヒト哺乳動物である。一部の実施形態では、対象は、非ヒト霊長類である。一部の実施形態では、対象は、げっ歯類である。一部の実施形態では、対象は、ヒツジ、ヤギ、ネコ又はイヌである。一部の実施形態では、対象は、研究動物である。一部の実施形態では、対象は、遺伝子操作されている、例えば、遺伝子操作された非ヒト対象である。対象は、成体対象であり得る。一部の実施形態では、対象は、少なくとも１歳、少なくとも２歳、少なくとも４歳、少なくとも６歳、少なくとも８歳、少なくとも１０歳、少なくとも１２歳

、少なくとも１５歳、少なくとも１８歳、少なくとも２０歳、少なくとも２５歳、少なくとも３０歳、少なくとも３５歳、少なくとも４０歳、少なくとも４５歳、少なくとも５０歳、少なくとも５５歳、少なくとも６０歳、少なくとも６５歳、少なくとも７０歳、少なくとも７５歳、少なくとも８０歳、少なくとも８５歳、少なくとも９０歳、少なくとも９５歳、少なくとも１００歳、又はそれよりも年上である。一部の実施形態では、対象は、１８～１００歳の間、２０～１００歳の間、３０～１００歳の間、４０～１００歳の間、５０～１００歳の間、５０～１００歳の間、６０～１００歳の間、７０～１００歳の間、８０～１００歳の間、又は９０～１００歳の間の成体対象である。

【００５０】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における発現させるステップは、それぞれ成体ＧＰＣ又は対象におけるＧＰＣに、ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子をコードする１つ又は複数の核酸分子を投与することを含む。

【００５１】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における発現させるステップは、それぞれ成体ＧＰＣ又は対象におけるＧＰＣに、ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子を発現する１つ又は複数の発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターの各々は、（１）ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子をコードするヌクレオチド配列、並びに（２）このヌクレオチド配列に作動可能に連結された調節配列を含む。

【００５２】

本明細書で使用される場合、本発明において言及される転写因子、例えば、ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２には、その全ての転写物バリアント及び機能的バリアントが含まれる。本明細書で同定される１つ又は複数の転写因子をコードするヌクレオチド配列は、当該分野で周知でありアクセス可能である。以下の表１は、それらの遺伝子名、遺伝子ＩＤ番号及びＮＣＢＩ参照転写物受託番号によって、転写因子及びそれらの転写物バリアントを同定する。

【００５３】

【表１】

例示的なヒト遺伝子及び転写物バリアント

遺伝子	遺伝子ID番号*	転写物バリアント	参照転写物受託番号*
BAFクロマチンリモデリング複合体サブユニット(BCL11A)	53335	転写物バリアント3	NM_138559.2
		転写物バリアント2	NM_018014.4
		転写物バリアント4	NM_001363864.1
		転写物バリアントX3	XM_011532910.1
		転写物バリアントX1	XM_011532909.1
		転写物バリアント1	NM_022893.4
		転写物バリアント5	NM_001365609.1
		転写物バリアントX7	XM_024452962.1
		転写物バリアントX5	XM_017004335.1
		転写物バリアントX2	XM_017004333.1
		転写物バリアントX7	XM_024452963.1
		転写物バリアントX8	XM_017004336.1
ヒストンデアセチラーゼ2 (HDAC2)	3066	転写物バリアント1	NM_001527.4
		転写物バリアント2	NR_033441.2
		転写物バリアント3	NR_073443.2
		転写物バリアントX1	XM_017010799.1
Zeste 2のエンハンサーポリコーム抑制性複合体2 (EZH2)	2146	転写物バリアント1	NM_004456.5
		転写物バリアント2	NM_152998.3
		転写物バリアント3	NM_001203247.2
		転写物バリアント4	NM_001203248.2
		転写物バリアント5	NM_001203249.2
		転写物バリアントX3	XM_005249962.4
		転写物バリアントX6	XM_005249963.4
		転写物バリアントX21	XM_005249964.4
		転写物バリアントX2	XM_011515883.2
		転写物バリアントX4	XM_011515884.2
		転写物バリアントX5	XM_011515885.2
		転写物バリアントX7	XM_011515886.2
		転写物バリアントX8	XM_011515887.3
		転写物バリアントX9	XM_011515888.2
		転写物バリアントX11	XM_011515889.2
		転写物バリアントX12	XM_011515890.2
		転写物バリアントX13	XM_011515891.3

		転写物バリアントX14	XM_011515892.2
		転写物バリアントX15	XM_011515893.2
		転写物バリアントX17	XM_011515894.2
		転写物バリアントX19	XM_011515895.2
		転写物バリアントX22	XM_011515896.2
		転写物バリアントX23	XM_011515897.2
		転写物バリアントX24	XM_011515898.2
		転写物バリアントX26	XM_011515899.3
		転写物バリアントX30	XM_011515901.3
		転写物バリアントX1	XM_017011817.2
		転写物バリアントX10	XM_017011818.1
		転写物バリアントX18	XM_017011819.1
		転写物バリアントX20	XM_017011820.2
		転写物バリアントX25	XM_017011821.1
		転写物バリアントX16	XM_024446680.1
		転写物バリアントX29	XR_001744581.1
		転写物バリアントX27	XR_002956413.1
		転写物バリアントX28	XR_002956414.1
MYC癌原遺伝子, bHLH転写因子 (MYC)	4609	転写物バリアント1	NM_002467.6
		転写物バリアント2	NM_001354870.1
高移動度群ATフック2 (HMAG2)	8091	転写物バリアント1	NM_003483.6
		転写物バリアント2	NM_003484.1
		転写物バリアント3	NM_001300918.1
		転写物バリアント4	NM_001300919.1
		転写物バリアント5	NM_001330190.1
核因子IB (NFIB)	4781	転写物バリアント1	NM_001190737.2
		転写物バリアント3	NM_005596.3
		転写物バリアント2	NM_001190738.2
		転写物バリアント4	NM_001282787.2
		転写物バリアント5	NM_001369458.1
		転写物バリアント6	NM_001369459.1
		転写物バリアント7	NM_001369460.1
		転写物バリアント8	NM_001369461.1
		転写物バリアント9	NM_001369462.1
		転写物バリアント10	NM_001369463.1
		転写物バリアント11	NM_001369464.1

		転写物バリアント12	NM_001369465.1
		転写物バリアント13	NM_001369466.1
		転写物バリアント14	NM_001369467.1
		転写物バリアント15	NM_001369468.1
		転写物バリアント16	NM_001369469.1
		転写物バリアント17	NM_001369470.1
		転写物バリアント18	NM_001369471.1
		転写物バリアント19	NM_001369472.1
		転写物バリアント20	NM_001369473.1
		転写物バリアント21	NM_001369474.1
		転写物バリアント22	NM_001369475.1
		転写物バリアント23	NM_001369476.1
		転写物バリアント24	NM_001369477.1
		転写物バリアント25	NM_001369478.1
		転写物バリアント26	NM_001369479.1
		転写物バリアント27	NM_001369480.1
		転写物バリアント28	NM_001369481.1
		転写物バリアント29	NR_161382.1
		転写物バリアント30	NR_161383.1
		転写物バリアント31	NR_161384.1
		転写物バリアント32	NR_161385.1
		転写物バリアントX1	XM_005251467.3
		転写物バリアントX14	XM_005251471.3
		転写物バリアントX2	XM_006716773.3
		転写物バリアントX5	XM_006716774.3
		転写物バリアントX6	XM_006716775.3
		転写物バリアントX9	XR_001746308.2
		転写物バリアントX10	XR_001746309.2
TEAドメイン転写因子2 (TEAD2)	8463	転写物バリアント3	NM_001256660.2
		転写物バリアント5	NM_003598.2
		転写物バリアント1	NM_001256658.2
		転写物バリアント2	NM_001256659.2
		転写物バリアント4	NM_001256661.2
		転写物バリアント6	NM_001256662.2
		転写物バリアントX8	XM_005259334.4
		転写物バリアントX7	XM_006723428.3
		転写物バリアントX9	XM_006723429.2

		転写物バリアントX1	XM_011527399.2
		転写物バリアントX2	XM_011527400.2
		転写物バリアントX3	XM_011527401.1
		転写物バリアントX4	XM_011527402.2
		転写物バリアントX5	XM_011527403.1
		転写物バリアントX6	XM_011527404.2
		転写物バリアントX10	XM_011527405.3
		転写物バリアントX11	XM_011527406.3

*その各々は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【００５４】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＢＣＬ１１Ａ、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、配列番号２１のＢＣＬ１１Ａバリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、配列番号２０のヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００５５】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＨＤＡＣ２、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００５６】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＥＺＨ２、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００５７】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＭＹＣ、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００５８】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＨＭＧＡ２、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００５９】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＨＦＩＢ、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００６０】
一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＴＥＡＤ２、その転写物バリアント又は機能的バリアントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む。
【００６１】
一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における発現させるステップは、それぞれ成体ＧＰＣ又は対象におけるＧＰＣに、転写因子リプレッサーの阻害剤の有効量を投与することを含む。
【００６２】
本明細書で使用される場合、用語「転写因子リプレッサー」は、転写因子の活性又は発現を阻害する薬剤を指す。「転写因子リプレッサー」は、ポリペプチド又はポリヌクレオチドであり得る。
【００６３】
一部の実施形態では、転写因子リプレッサーの阻害剤は、小分子である。

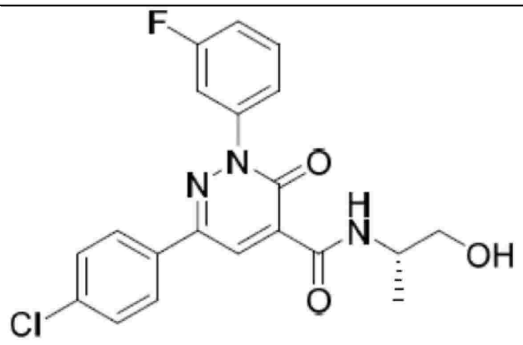
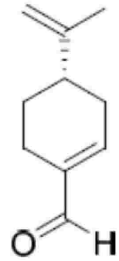
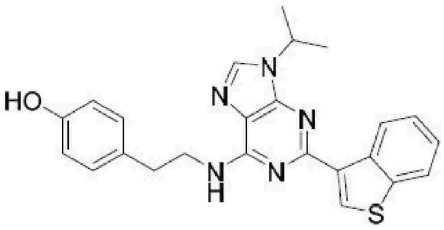
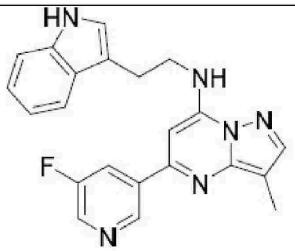
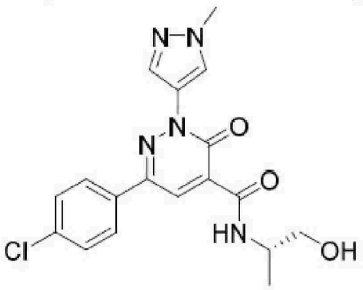
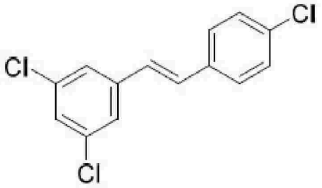
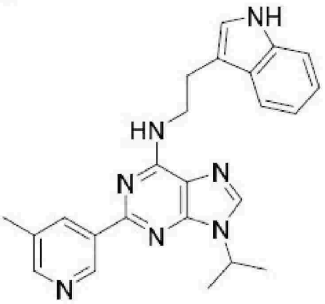
【００６４】
一部の実施形態では、転写因子リプレッサーの阻害剤は、ポリペプチド又はポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における発現させるステップは、それぞれ成体ＧＰＣ又は対象におけるＧＰＣに、（１）転写因子リプレッサーの阻害剤をコードするヌクレオチド配列、及び（２）このヌクレオチド配列に作動可能に連結された調節配列を含む発現ベクターの有効量を投与することを含む。
【００６５】
一部の実施形態では、転写因子リプレッサーは、アリール２０炭化水素受容体（ＡＨＲ）である。かかる実施形態によれば、転写因子リプレッサーの阻害剤は、ＡＨＲ阻害剤である。一部の実施形態では、ＡＨＲ阻害剤は、小分子阻害剤である。
【００６６】
適切なＡＨＲ阻害剤は、当該分野で公知であり、限定なしに、小分子、例えば、ＢＡＹ－２１８（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ａｂｓｔｒａｃｔ １２８８：Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｔｕｍｏｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｗｉｔｈ ＢＡＹ－２１８，ａ Ｎｏｖｅｌ，Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ Ａｒｙｌ Ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＡｈＲ）Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ」、Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ ２５ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ ２０１９；２０１９年３月２９日～４月３日；Ａｔｌａｎｔａ，ＧＡ．Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（ＰＡ）：ＡＡＣＲ；Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．７９（補遺１３）：Ａｂｓｔｒａｃｔ ｎｒ １２８８（２０１９）を参照されたい）；ペリルアルデヒド（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｆｕｙｕｎｏら、「Ｐｅｒｉｌｌａｌｄｅｈｙｄｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｓ ＡＨＲ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ａｎｄ Ａｃｔｉｖａｔｅｓ ＮＲＦ２ Ａｎｔｉｏｘｉｄａｎｔ Ｐａｔｈｗａｙ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｋｅｒａｔｉｎｏｃｙｔｅｓ」、Ｏｘｉｄ．Ｍｅｄ．Ｃｅｌｌ Ｌｏｎｇｅｖ．２０１８：９５２４６５７（２０１８）を参照されたい）；ステムレゲニン（ＳｔｅｍＲｅｇｅｎｉｎ）１（ＳＲ１）（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｏｉｔａｎｏら、「Ａｒｙｌ Ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｓ Ｐｒｏｍｏｔｅ ｔｈｅ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ」、Ｓｃｉｅｎｃｅ ３２９（５９９７）：１３４５～１３４８（２０１０）を参照されたい）；ＫＹＮ－１０１（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｃａｍｐｅｓａｔｏら、「Ｂｌｏｃｋａｄｅ ｏｆ ｔｈｅ ＡＨＲ Ｒｅｓｔｒｉｃｔｓ ａ Ｔｒｅｇ－Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｖｅ Ａｘｉｓ Ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ Ｌ－５ Ｋｙｎｕｒｅｎｉｎｅ」、ＮａｔｕｒｅＣｏｍｍ．１１：４０１１（２０２０）を参照されたい）；ＣＨ－２２３１９１（例えば、その全体がこれにより１０参照により本明細書に組み込まれる、Ｋｉｍら、「Ｎｏｖｅｌ Ｃｏｍｐｏｕｎｄ ２－Ｍｅｔｈｙｌ－２Ｈ－Ｐｙｒａｚｏｌｅ－３－Ｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ ａｃｉｄ（２－Ｍｅｔｈｙｌ－４－ｏ－Ｔｏｌｙｌａｚｏ－Ｐｈｅｎｙｌ）－Ａｍｉｄｅ（ＣＨ－２２３１９１）Ｐｒｅｖｅｎｔｓ ２，３，７，８－ＴＣＤＤ－Ｉｎｄｕｃｅｄ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ ｂｙ Ａｎｔａｇｏｎｉｚｉｎｇ ｔｈｅ Ａｒｙｌ Ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ」、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｏｃｌ．６９（６）：１８７１～１８７８（２００６）を参照されたい）；ＢＡＹ ２４１６９６４（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｂａｙｅｒ Ａｋｔｉｅｎｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔｅｎらに対する国際特許公報ＷＯ／２０１８／１４６０１０を参照されたい）；ＰＤＭ２（例えば、その全体がこれにより１５参照により本明細書に組み込まれる、ｄｅ Ｍｅｄｉｎａら、「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ Ｎｅｗ Ｓｔｉｌｂｅｎｅ Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ｏｆ Ｒｅｓｖｅｒａｔｒｏｌ ａｓ Ｎｅｗ Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ Ａｒｙｌ Ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ Ｍｏｄｕｌａｔｏｒｓ

」、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４８：２８７～２９１（２００５）を参照されたい）及びＧＮＦ３５１（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｍｉｔｈら、「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ａ Ｈｉｇｈ－Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｌｉｇａｎｄ ｔｈａｔ Ｅｘｈｉｂｉｔｓ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ａｒｙｌ Ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ａｎｔａｇｏｎｉｓｍ」、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．３３８（１）：３１８～３２７（２０１１）を参照されたい）が含まれる。例示的なＡＨＲ小分子阻害剤は、以下の表２に示される。

【００６７】

【表２】

例示的なＡＨＲ小分子阻害剤

アリール炭化水素受容体(AHR)	 BAY-218  ペリルアルデヒド
	 ステムレゲニン１(SR1)  KYN-101  CH-223191  BAY 2416964  PDM2  GNF351

、及び

【００６８】

一部の実施形態では、転写因子リプレッサーは、Ｍｙｃボックス依存的相互作用タンパク質（ＢＩＮ１）である。かかる実施形態によれば、転写因子リプレッサーの阻害剤は、ＢＩＮ１阻害剤である。

【００６９】

一部の実施形態では、転写因子リプレッサーは、ｍｉＲＮＡ分子である。かかる実施形態によれば、転写因子リプレッサーの阻害剤は、ｍｉＲＮＡの阻害剤である。本明細書で記載される場合、転写因子リプレッサーとして機能するｍｉＲＮＡには、限定なしに、以下の表３で同定されたものが含まれる。

【００７０】

【表３】

例示的なヒトmiRNA転写因子リプレッサー

miRNA	配列	配列番号
miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	1
miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC	2
miR-4687-3p	UGGCUGUUGGAGGGGGCAGGC	3
miR-4651	CGGGGUGGGUGAGGUCGGGC	4
miR-4270	UCAGGGAGUCAGGGGAGGGC	5
miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	6

【００７１】

一部の実施形態では、転写因子リプレッサーの阻害剤は、上で同定されたｍｉＲＮＡ（標的ｍｉＲＮＡ）のうちのいずれか１つ又は複数の阻害剤である。ｍｉＲＮＡの阻害剤は、「アンタゴミル（ａｎｔａｇｏｍｉｒ）」として当該分野で公知である。アンタゴミルは、特定のｍｉＲＮＡに対する相補性を有し、そのｍｉＲＮＡの活性を阻害する、ＲＮＡオリゴヌクレオチド又はＲＮＡオリゴヌクレオチド模倣物である。

【００７２】

一部の実施形態では、転写因子リプレッサーの阻害剤は、表３に列挙されるｍｉＲＮＡのうちの１つ又は複数を標的化するアンタゴミルである。アンタゴミルは、それが阻害するｍｉＲＮＡの相補配列からの、１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０ヌクレオチドの差異を含み得る。さらに、アンタゴミルは、それが阻害するｍｉＲＮＡと同じ長さ、それよりも長い長さ、又はそれよりも短い長さを有し得る。ある特定の実施形態では、アンタゴミルは、それが阻害するｍｉＲＮＡの５’末端における６～８ヌクレオチドにハイブリダイズする。他の実施形態では、アンタゴミルは、ｍｉＲＮＡに対して相補的であり、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９又は５０ヌクレオチド長である。他の実施形態では、アンタゴミルは、５～１０、６～８、１０～２０、１０～１５又は５～５００ヌクレオチド長である。

【００７３】

一部の実施形態では、アンタゴミルは、標的ｍｉＲＮＡに強固に結合しそれを不活性化する、標的ＲＮＡの合成逆相補体である。したがって、一部の実施形態では、アンタゴミルは、標的ｍｉＲＮＡの発現又は活性を特異的に阻害又は遮断する。

【００７４】

一部の実施形態では、アンタゴミルは、上記表３に提供されたｍｉＲＮＡ配列のうちのいずれか１つに対して少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％相補的である。

【００７５】

一部の実施形態では、アンタゴミルは、表３に開示された１つ又は複数のｍｉＲＮＡの発現を阻害することが可能である。

【００７６】

特に、本発明のアンタゴミルは、ｍｉＲ－１９３ａ－５ｐ、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ、ｍｉＲ－４６８７－３ｐ、ｍｉＲ－４６５１、ｍｉＲ－４２７０もしくはｍｉＲ－２４－３ｐから選択されるｍｉＲＮＡに、又はその一部分に特異的な核酸配列に対して実質的に相補的であり得る。したがって、実質的に等価な又は変更された活性を示す核酸又はそのアナログも、同様に企図される。

【００７７】

一部の実施形態では、アンタゴミルは、ヌクレアーゼ耐性及び結合親和性を改善する化学的改変を含む。適切な改変には、限定なしに、２’糖改変、例えば、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－ＭＯＥ）又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）が含まれる。

【００７８】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における発現させるステップは、それぞれ成体ＧＰＣ又は対象におけるＧＰＣに、（１）転写因子リプレッサーの阻害剤の有効量、並びに／又は（２）Ｂ細胞リンパ腫／白血病１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａ）、ヒストンデアセチラーゼ２（ＨＤＡＣ２）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、ｍｙｃ癌原遺伝子タンパク質（ＭＹＣ）、高１５移動度群タンパク質ＨＭＧＩ－Ｃ（ＨＭＧＡ２）、核因子１Ｂ型（ＮＦＩＢ）及び転写エンハンサー因子ＴＥＦ－４（ＴＥＡＤ２）からなる群から選択される１つもしくは複数の転写因子の有効量を投与することを含む。

【００７９】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における発現させるステップは、それぞれ成体ＧＰＣ又は対象におけるＧＰＣに、（１）転写因子リプレッサーの阻害剤をコードする発現ベクターの有効量、並びに／又は（２）Ｂ細胞リンパ腫／白血病１１Ａ（ＢＣＬ１１Ａ）、ヒストンデアセチラーゼ２（ＨＤＡＣ２）、ヒストン－リシンＮ－メチルトランスフェラーゼＥＺＨ２（ＥＺＨ２）、ｍｙｃ癌原遺伝子タンパク質（ＭＹＣ）、高移動度群タンパク質ＨＭＧＩ－Ｃ（ＨＭＧＡ２）、核因子１Ｂ型（ＮＦＩＢ）及び転写エンハンサー因子ＴＥＦ－４（ＴＥＡＤ２）からなる群から選択される１つもしくは複数の転写因子をコードする発現ベクターの有効量を投与することを含む。

【００８０】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における上記発現ベクターの調節配列は、グリア前駆細胞によって選択的又は特異的に発現される遺伝子のためのプロモーター及び／又はエンハンサーを含む。

【００８１】

グリア前駆細胞によって選択的に発現される遺伝子には、血小板２５由来増殖因子アルファ（ＰＤＧＦＲＡ）、ジンクフィンガータンパク質４８８（ＺＮＦ４８８）、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＲ１７）、オリゴデンドロサイト転写因子２（ＯＬＩＧ２）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン４（ＣＳＰＧ４）及びＳＲＹ－ボックス転写因子１０（ＳＯＸ１０）が含まれる。

【００８２】

かかる実施形態によれば、本明細書に開示される核酸阻害剤の発現を制御するために適切なプロモーター配列には、限定なしに、血小板由来増殖因子アルファ（ＰＤＧＦＲＡ）

プロモーター、ジンクフィンガータンパク質４８８（ＺＮＦ４８８）プロモーター、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＲ１７）プロモーター、オリゴデンドロサイト転写因子２（ＯＬＩＧ２）プロモーター、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン４（ＣＳＰＧ４）プロモーター及びＳＲＹ－ボックス転写因子１０（ＳＯＸ１０）プロモーターが含まれ、これらは、以下の表４で同定される。

【００８３】

【表４】

グリア前駆細胞によって選択的又は特異的に発現される例示的な遺伝子

遺伝子	生物	遺伝子ID番号*	NCBI参照配列:*
血小板由来増殖因子アルファ(PDGFRA)	*Homo sapiens*	5156	NG_009250.1
ジンクフィンガータンパク質488 (ZNF488)	*Homo sapiens*	118738	
Gタンパク質共役受容体(GPR17)	*Homo sapiens*	2840	NG_042235.1
オリゴデンドロサイト転写因子2 (OLIG2)	*Homo sapiens*	10215	NG_011834.1
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (CSPG4)	*Homo sapiens*	1464	
SRY-ボックス転写因子10 (SOX10)	*Homo sapiens*	6663	NG_007948.1

*その各々は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【００８４】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における上記発現ベクターの調節配列は、誘導性プロモーター又はプロモーター系、例えば、テトラサイクリン制御される誘導性の系、クメート（ｃｕｍａｔｅ）制御される誘導性の系及びラパマイシン制御される誘導性の系を含み、これらは、以下により詳細に記載される。

【００８５】

一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における上記発現ベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター又は細菌ベクターである。

【００８６】
一部の実施形態では、成体ＧＰＣにおける若返りを誘導する方法又は対象においてミエリン欠乏症を処置する方法における上記発現ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス及びヘルペスウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターである。一部の実施形態では、発現ベクターは、レンチウイルスベクターである。一部の実施形態では、発現ベクターは、レトロウイルスベクターである。他の実施形態では、発現ベクターは、ＡＡＶベクターである。発現ベクターとしての使用に適切なウイルスベクターを生成及び単離するための方法は、以下により詳細に記載される。
【００８７】
ＩＩＩ．転写因子の抑圧を含む方法
本発明の別の態様は、ある特定の転写因子を抑圧することによって、成体グリア前駆細胞の集団における若返りを誘導する方法に関する。この方法は、成体グリア前駆細胞の集団に、ジンクフィンガータンパク質２７４（ＺＮＦ２７４）、Ｍｙｃ関連因子Ｘ（ＭＡＸ）、Ｅ２Ｆ転写因子６（Ｅ２Ｆ６）、ジンクフィンガータンパク質アイオロス（ＩＫＺＦ３）及びシグナル伝達及び転写活性化因子３（ＳＴＡＴ３）からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子を抑圧する薬剤の有効量を投与することを含む。
【００８８】
本発明の別の態様は、ある特定の老化遺伝子を抑圧することによって、成体グリア前駆細胞の集団における若返りを誘導する方法に関する。この方法は、成体グリア前駆細胞の集団に、ＲＵＮＸ１、ＢＩＮ１、ＶＡＭＰ３、ＤＭＴＦ１、ＣＴＮＮＡ１、ＳＥＲＰＩＮＥ１、ＣＤＫ１９、ＣＤＫＮ１Ｃ、ＲＵＮＸ２、ＥＦＥＭＰ１、ＭＡＰ３Ｋ７、ＡＨＲ、ＯＧＴ、ＰＡＫ１、ＣＢＸ７及びＣＹＬＤからなる群から選択される１つ又は複数の老化遺伝子の発現を阻害する薬剤の有効量を投与することを含む。
【００８９】
本発明の別の態様は、ある特定の老化遺伝子を抑圧することによって、成体グリア前駆細胞の集団における若返りを誘導する方法に関する。この方法は、成体グリア前駆細胞の集団に、ＭＢＰ、ＣＤ９、ＥＮＰＰ２、ＰＬＰ１、ＥＲＢＩＮ、ＺＮＦ３６５、ＵＧＴ８、ＧＤＮＦ、ＤＵＳＰ１０、ＰＭＰ２２、ＥＲＢＢ４及びＭＹＲＦからなる群から選択される１つ又は複数のグリア標的遺伝子の発現を阻害する薬剤の有効量を投与することを含む。
【００９０】
本明細書に開示される方法における使用に適切な成体グリア前駆細胞には、哺乳動物グリア前駆細胞、例えば、ヒトグリア前駆細胞、げっ歯類グリア前駆細胞、非ヒト霊長類グリア前駆細胞、ヒツジグリア前駆細胞、ウシグリア前駆細胞、ブタグリア前駆細胞、イヌグリア前駆細胞及びネコグリア前駆細胞が含まれる。一部の実施形態では、成体グリア前駆細胞は、成体ヒトグリア前駆細胞である。
【００９１】
一部の実施形態では、当該投与は、ｅｘ　ｖｉｖｏで実施される。本開示に従う方法の他の実施形態では、当該投与は、ｉｎ　ｖｉｖｏで実施される。
【００９２】
本発明の別の態様は、ある特定の転写因子を抑圧することによって、対象においてミエリン欠乏症を処置する方法に関する。この方法は、ミエリン欠乏症を有する対象に、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及びＳＴＡＴ３からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子を抑圧する薬剤を投与することを含み、この薬剤は、対象の成体グリア前駆細胞において１つ又は複数の転写因子を抑圧するための有効量で投与される。
【００９３】
本発明の別の態様は、ある特定の老化遺伝子を抑圧することによって、対象においてミエリン欠乏症を処置する方法に関する。この方法は、対象に、ＲＵＮＸ１、ＢＩＮ１、ＶＡＭＰ３、ＤＭＴＦ１、ＣＴＮＮＡ１、ＳＥＲＰＩＮＥ１、ＣＤＫ１９、ＣＤＫＮ１Ｃ、

ＲＵＮＸ２、ＥＦＥＭＰ１、ＭＡＰ３Ｋ７、ＡＨＲ、ＯＧＴ、ＰＡＫ１、ＣＢＸ７及びＣＹＬＤからなる群から選択される１つ又は複数の老化遺伝子の発現を阻害する薬剤を投与することを含み、この薬剤は、対象の成体グリア前駆細胞において１つ又は複数の老化遺伝子を抑圧するための有効量で投与される。

【００９４】

本発明の別の態様は、ある特定のグリア標的遺伝子を抑圧することによって、対象においてミエリン欠乏症を処置する方法に関する。この方法は、対象に、ＭＢＰ、ＣＤ９、ＥＮＰＰ２、ＰＬＰ１、ＥＲＢＩＮ、ＺＮＦ３６５、ＵＧＴ８、ＧＤＮＦ、ＤＵＳＰ１０、ＰＭＰ２２、ＥＲＢＢ４及びＭＹＲＦからなる群から選択される１つ又は複数の老化遺伝子の発現を阻害する薬剤を投与することを含み、この薬剤は、対象の成体グリア前駆細胞において１つ又は複数のグリア標的遺伝子を抑圧するための有効量で投与される。

【００９５】

本発明のこの態様によれば、ミエリン欠乏症は、多発性硬化症、視神経脊髄炎、横断性脊髄炎、視神経炎、皮質下脳卒中、糖尿病性白質脳症、高血圧性白質脳症、加齢性白質病、脊髄傷害、放射線又は化学療法誘導性脱髄、感染後及びワクチン接種後白質脳炎、脳室周囲白質軟化症、小児白質ジストロフィー（例えば、ペリツェウス・メルツバッハ病、テイ・サックス病、サンドホフガングリオシドーシス、クラッベ病、異染性白質ジストロフィー、ムコ多糖症、ニーマン・ピック病Ａ型、副腎白質ジストロフィー、カナバン病、白質消失病及びアレキサンダー病）、リソソーム蓄積症、先天性髄鞘形成不全、炎症性脱髄、血管性脱髄、並びに脳性麻痺からなる群から選択される状態に関連し得る。

【００９６】

一部の実施形態では、ミエリン欠乏症は、神経変性疾患、例えば、ハンチントン病に関連する。本明細書で使用される場合、「ハンチントン病」は、典型的には成人期において顕在化する常染色体優性遺伝性脳障害を指す。ハンチントン病の病理は、髄鞘低形成、並びにニューロン及び白質喪失によって特徴付けられる。

【００９７】

他の実施形態では、ミエリン欠乏症は、精神神経疾患、例えば、統合失調症に関連する。

【００９８】

一部の実施形態では、若返りを誘導する方法又はミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、ＳＴＡＴ３を抑圧する薬剤である。本開示の図４Ｆに示されるように、成体グリア前駆細胞の文脈では、ＳＴＡＴ３は、老化関連遺伝子（例えば、ＢＩＮ１、ＤＭＴＦ１、ＣＤ４７、ＣＴＮＮＡ１、ＲＵＮＸ２、ＲＵＮＸ１、ＭＡＰ３Ｋ７及びＯＧＴ）、グリア細胞関連遺伝子（例えば、ＰＬＰ１、ＣＮＰ、ＰＭＰ２２、ＳＥＭＡ４Ｄ、ＣＬＤＮ１１、ＧＰＲ３７、ＭＹＲＦ、ＭＡＧ、ＢＣＡＳ１、ＳＴ１８、ＥＲＢＢ４、ＣＥＲＳ２、ＬＰＡＲ１及びＧＪＢ１）及び下流の転写因子（例えば、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６及びＩＫＺＦ３）のセットを活性化すると予測される。一部の実施形態では、薬剤は、ＳＴＡＴ３及び／又はＳＴＡＴ３によって活性化される上で示された老化関連遺伝子のいずれかの活性を抑圧又はサイレンシングする薬剤である。

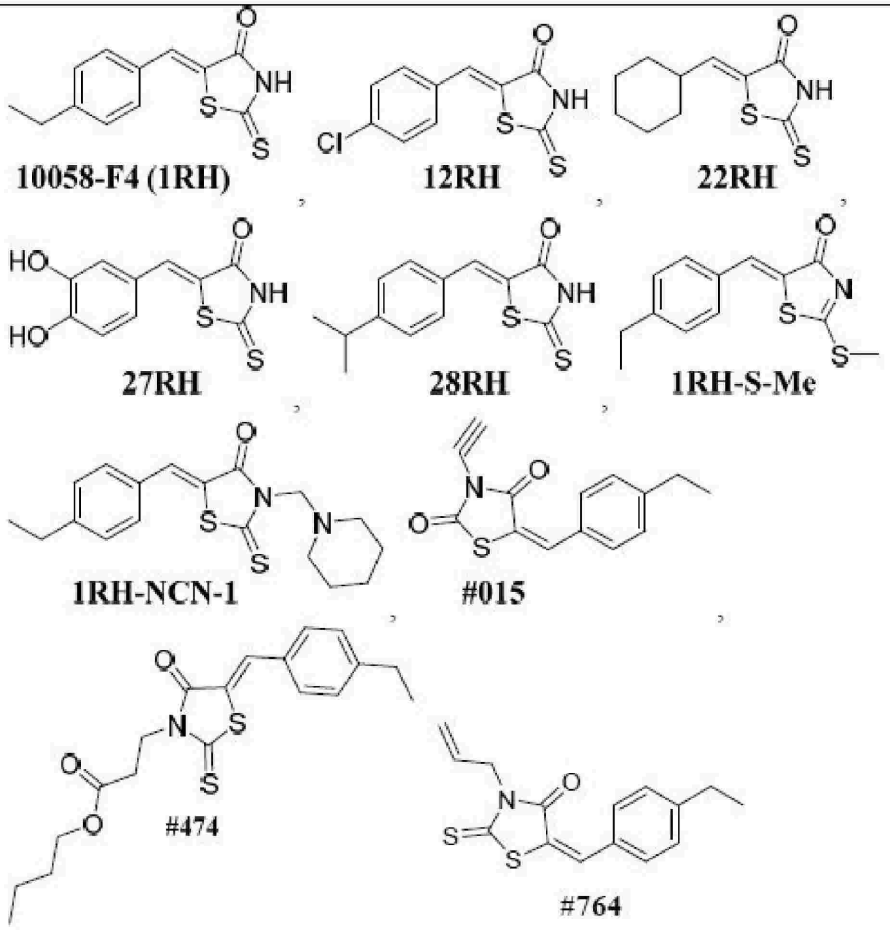
【００９９】

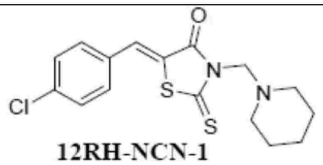
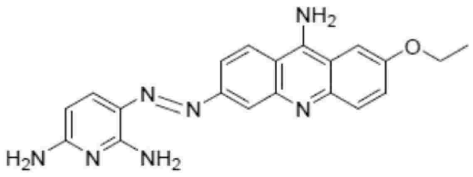
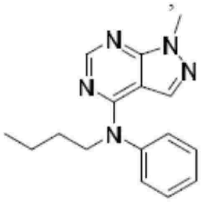
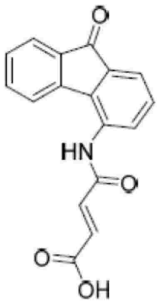
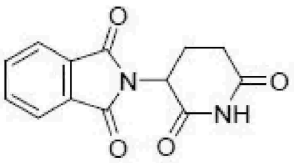
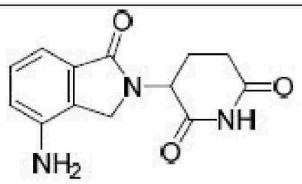
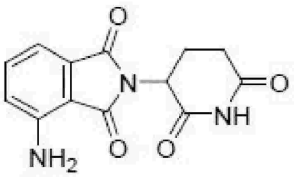
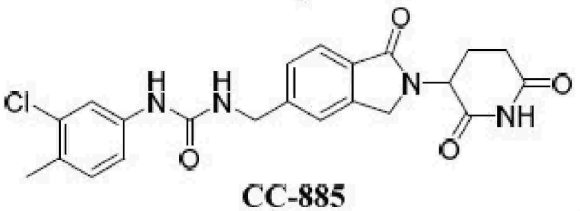
一部の実施形態では、若返りを誘導する方法及びミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６及びＩＫＺＦ３のうちの１つ又は複数を抑圧する薬剤である。本出願の図４Ｇに示されるように、成体グリア前駆細胞の文脈では、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６及びＩＫＺＦ３は、増殖関連遺伝子標的（例えば、ＹＡＰ１、ＬＭＮＢ１、ＰＡＴＺ１、ＴＥＡＤ１、ＦＮ１、ＴＰ５３、ＣＤＫ１、ＣＣＮＤ２、ＣＤＫＮ２Ｄ、ＣＥＮＰＨ、ＭＫＩ６７、ＣＤＫ４、ＣＥＮＰＦ、ＣＤＫ５、ＣＤＫＮ３及びＣＨＥＫ１）、グリア細胞関連遺伝子（例えば、ＣＨＲＤＬ１、ＳＴ８ＳＩＡ１、ＰＴＰＲＺ１、ＣＡ１０、ＰＤＧＦＲＡ、ＢＣＡＮ、ＮＸＰＨ１、ＣＳＰＧ４及びＰＣＤＨ１５）及び下流の転写因子（例えば、ＢＬＣ１１Ａ、ＥＺＨ２、ＨＤＡＣ２、ＮＦ１Ｂ、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２及びＴＥＡＤ）のセットを抑制すると予測される。

【０１００】
一部の実施形態では、薬剤は、下流の増殖関連遺伝子標的の発現を可能にするために、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３、又はそれらの任意の組合せの活性を抑圧又はサイレンシングする薬剤である。
【０１０１】
一部の実施形態では、薬剤は、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３を抑圧する薬剤である。本明細書で記載される方法における使用に適切な薬剤には、限定なしに、ＺＮＦ２７４阻害剤、ＭＡＸ阻害剤、Ｅ２Ｆ６阻害剤、ＩＫＺＦ３阻害剤及びＳＴＡＴ３阻害剤が含まれる。
【０１０２】
ＺＮＦ２７４阻害剤、ＭＡＸ阻害剤、Ｅ２Ｆ６阻害剤、ＩＫＺＦ３阻害剤及び／又はＳＴＡＴ３阻害剤は、（１）小分子阻害剤、（２）核酸分子阻害剤（例えば、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチド）、（３）ヌクレアーゼベースの遺伝子編集系（例えば、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／もしくはＳＴＡＴ発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）、又は（４）（２）もしくは（３）をコードする核酸分子、であり得る。
【０１０３】
小分子阻害剤
一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤、ＭＡＸ阻害剤、Ｅ２Ｆ６阻害剤、ＩＫＺＦ３阻害剤及び／又はＳＴＡＴ３阻害剤は、小分子阻害剤である。当該分野で公知であり、本明細書で記載される方法に従う使用に適切な、これらの転写因子の例示的な小分子阻害剤は、以下の表５に提供される。表５の小分子阻害剤のアナログ及び誘導体もまた、本明細書で記載される方法における使用のために企図される。
【０１０４】

【表５】

例示的な小分子阻害剤

転写因子	例示的な小分子阻害剤
YC 関連因子 X (MAX)阻害剤	

	 12RH-NCN-1 ,  28RH-NCN-1 ,  MYCMI-6 ,  MYCMI-11 , 及び  MYCMI-14
ジンクフィンガータンパク質アイオロス (IKZF3)	 サリドマイド ,  レナリドミド ,  ポマリドミド ,  CC-122 ,  CC-885 , 及び

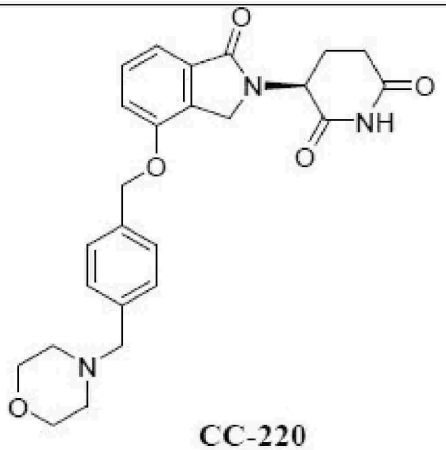
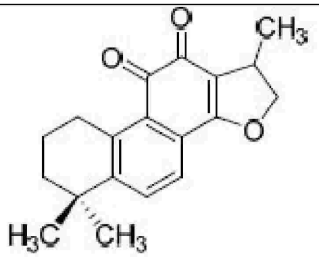
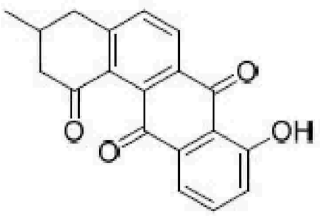
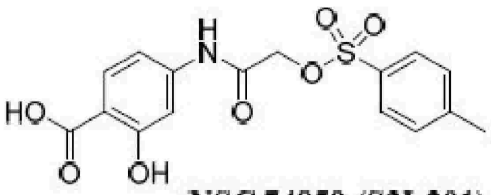
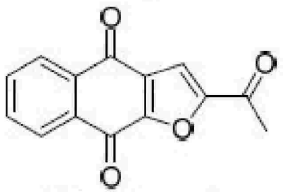
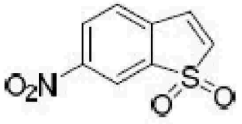
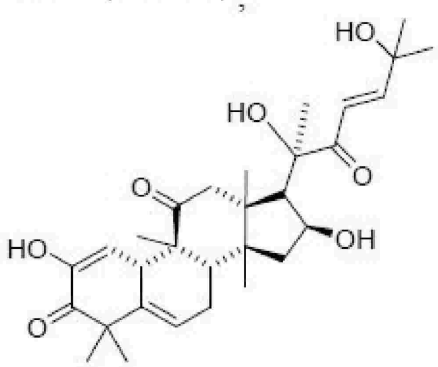
10

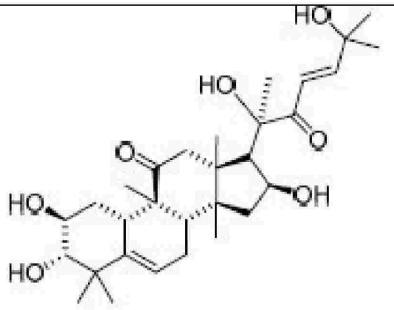
20

30

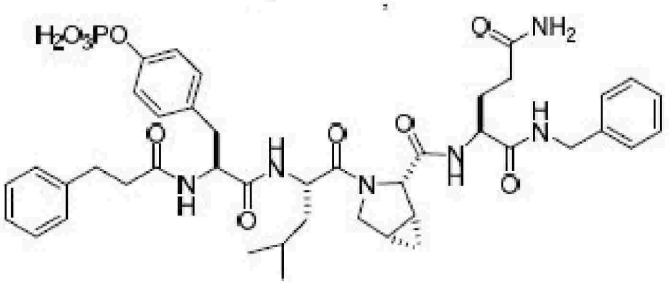
40

50

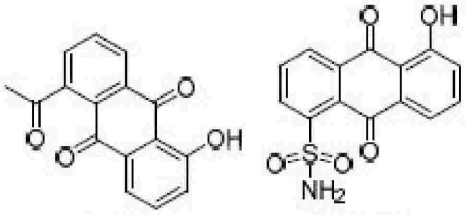
	 CC-220
シグナル伝達及び転写活性化因子 3 (STAT3)	 クリプトタンシノン  STA-21  NSC 74859 (S3I-201)  ナパブカシン  スタティック, 1  ククルビタシンI JSI-124



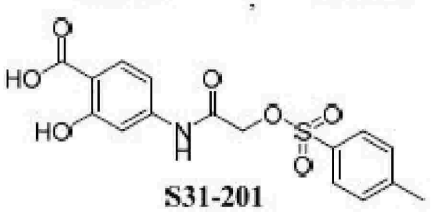
ククルビタシンQ



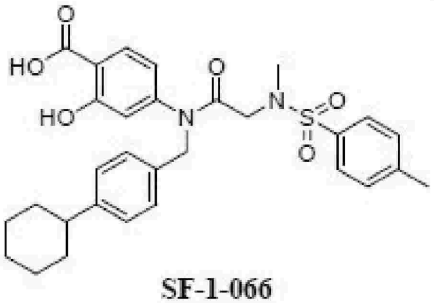
Phpr-pTyr-Leu-シス-3,4-メタノPro-Gln-NHBn



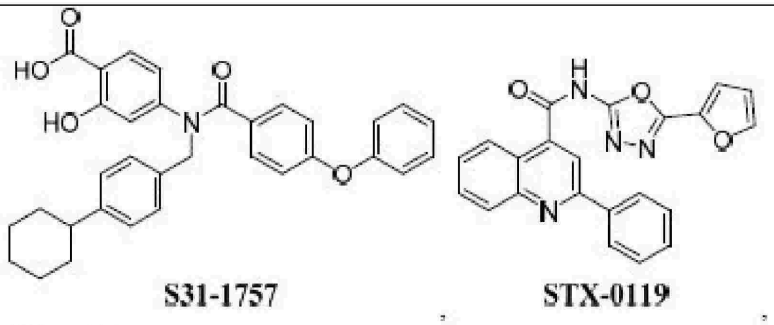
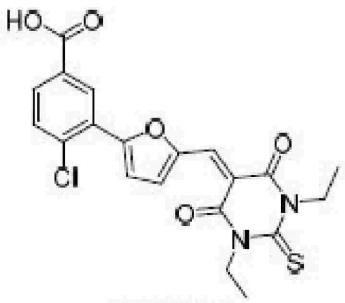
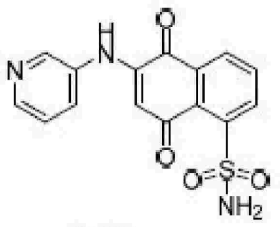
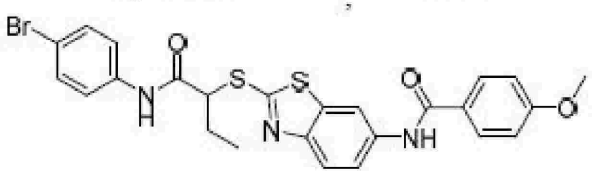
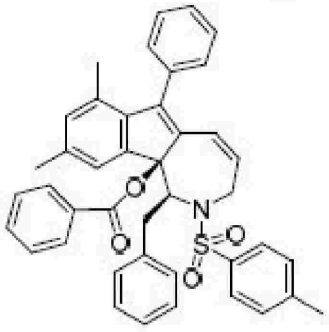
LLL-3 LLL-12



S31-201



SF-1-066

	 S31-1757 STX-0119  Cpd30-12  LY5  Cpd9 、及び  Cpd1 。

【０１０５】

一部の実施形態では、小分子阻害剤は、１００５８－Ｆ４（「１００５８－Ｆ４（１ＲＨ）」としても公知）（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｕａｎｇら、「Ａ Ｓｍａｌｌ－Ｍｏｌｅｃｕｌｅ ｃ－Ｍｙｃ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ，１００５８－Ｆ４，Ｉｎｄｕｃｅｓ Ｃｅｌｌ－Ｃｙｃｌｅ Ａｒｒｅｓｔ，Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ，ａｎｄ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ａｃｕｔｅ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ」、Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．３４（１１）：１４８０～１４８９（２００６）を参照されたい）；ＭＹＣＭＩ－６、ＭＹＣＭＩ－１１及びＭＹＣＭＩ－１４（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｃａｓｔｅｌｌｌら、「Ａ Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ Ｈｉｇｈ Ａｆｆｉｎｉｔｙ ＭＹＣ－Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｃｏｍｐｏｕｎｄ Ｉｎｈｉｂｉｔｓ ＭＹＣ：ＭＡＸ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ａｎｄ ＭＹＣ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｔｕｍｏｒ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ」、Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．８：１００６４（２０１８）を参照されたい）；１２ＲＨ、２２ＲＨ、２７ＲＨ、２８ＲＨ、１ＲＨ－Ｓ－Ｍｅ、１

ＲＨ－ＮＣＮ－１、＃０１５、＃４７４、＃７６４、１２ＲＨ－ＮＣＮ－１及び２８ＲＨ－ＮＣＮ－１（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｗａｎｇら、「Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｌｏｗ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｗｅｉｇｈｔ Ｍｙｃ－Ｍａｘ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ」、Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．６（９）：２３９９～２４０８（２００７）を参照されたい）からなる群から選択される、Ｍｙｃ関連因子Ｘ（ＭＡＸ）の小分子阻害剤である。

【０１０６】

一部の実施形態では、小分子阻害剤は、クリプトタンシノン（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｈｉｎら、「Ｃｒｙｐｔｏｔａｎｓｈｉｎｏｎｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｓ Ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅ Ｓｉｇｎａｌ Ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒ ａｎｄ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ３ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｔｈｒｏｕｇｈ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｔｈｅ Ｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｉｎ ＤＵ１４５ Ｐｒｏｓｔａｔｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６９（１）：１９３～２０２（２００９）を参照されたい）；ＳＴＡ－２１（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｏｎｇら、「Ａ Ｌｏｗ－Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ－Ｗｅｉｇｈｔ Ｃｏｍｐｏｕｎｄ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｅｄ ｔｈｒｏｕｇｈ Ｖｉｒｔｕａｌ Ｄａｔａｂａｓｅ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ Ｉｎｈｉｂｉｔｓ Ｓｔａｔ３ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｉｎ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌｓ」、ＰＮＡＳ １０２（１３）：４７００～４７０５（２００５）を参照されたい）；ＮＳＣ ７４５９（Ｓ３Ｉ－２０１）（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｉｄｄｉｑｕｅｅら、「Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｒｏｂｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ Ｓｔａｔ３，Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｄ ｔｈｒｏｕｇｈ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－Ｂａｓｅｄ Ｖｉｒｔｕａｌ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ，Ｉｎｄｕｃｅｓ Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」、ＰＮＡＳ １０４（１８）：７３９１～７３９６（２００７）を参照されたい）；ナパブカシン（ＢＢＩ６０８）（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉら、「Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｌａｐｓｅ ａｎｄ Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ ｂｙ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ Ｃａｎｃｅｒ Ｓｔｅｍｎｅｓｓ」、ＰＮＡＳ １１２（６）：１８３９～１８４４（２０１５）及びＨｕｂｂａｒｄら、「Ｎａｐａｂｕｃａｓｉｎ：Ａｎ Ｕｐｄａｔｅ ｏｎ ｔｈｅ Ｆｉｒｓｔ－ｉｎ－Ｃｌａｓｓ Ｃａｎｃｅｒ Ｓｔｅｍｎｅｓｓ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ」、Ｄｒｕｇｓ ７７（１０）：１０９１～１１０３（２０１７）を参照されたい）；スタティック（Ｓｔａｔｔｉｃ）、ククルビタシンＩ、ククルビタシンＱ、Ｐｈｐｒ－ｐＴｙｒ－Ｌｅｕ－シス－３，４－メタノＰｒｏ－Ｇｌｎ－ＮＨＢｎ（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、ＭｃＭｕｒｒａｙ，Ｊ．、「Ａ Ｎｅｗ Ｓｍａｌｌ－Ｍｏｌｅｃｕｌｅ Ｓｔａｔ３ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ」、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１３（１１）：１１２３～１１２４（２００６）を参照されたい）；ＬＬＬ－３（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｆｕｈら、「ＬＬＬ－３ Ｉｎｈｉｂｉｔｓ ＳＴＡＴ３ Ａｃｔｉｖｉｔｙ，Ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ Ｇｌｉｏｂｌａｓｔｏｍａ Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ Ｐｒｏｌｏｎｇｓ Ｓｕｒｖｉｖａｌ ｉｎ ａ Ｍｏｕｓｅ Ｇｌｉｏｂｌａｓｔｏｍａ Ｍｏｄｅｌ」、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ １００（１）：１０６～１１２（２００９）を参照されたい）；ＬＬＬ－１２、Ｓ３１－２０１、ＳＦ－１－０６６、Ｓ３１－１７５７、ＳＴＸ－０１１９、Ｃｐｄ３０－１２、ＬＹ５、Ｃｐｄ９及びＣｐｄ１（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｏｒｌｏｖａら、「Ｄｉｒｅｃｔ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｐｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＳＴＡＴ３ ａｎｄ ＳＴＡＴ５ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ」、Ｃａｎｃｅｒｓ １１（１２）：１９３０（２０１９）を参照されたい）；ＳＦ－１－０８７、ＳＦ－１－１２１、Ｓ３Ｉ－Ｍ２００１、Ｓ３Ｉ－２０１．１０６６及びＢＰ－１－１０２（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｗｕら、「Ｎｅｇａｔｉｖｅ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ ｏｆ ＳＴＡＴ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｐａｔｈｗａｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒｓ」、Ｃａｎｃｅ

ｒ Ｍａｎａｇ．Ｒｅｓ．１１：４９５７～４９６９（２０１９）を参照されたい）；ＨＯ－３８６７（例えば、Ｔｉｅｒｎｅｙら、「ＨＯ－３８６７，ａ ＳＴＡＴ３ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｉｎｄｕｃｅｓ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｂｙ Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ＳＴＡＴ３ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｉｎ ＢＲＣＡ１－Ｍｕｔａｔｅｄ Ｏｖａｒｉａｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．１３（９）：７６６～７７５（２０１２）を参照されたい；コリリフォル（ｃｏｒｙｌｉｆｏｌ）Ａ（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｅｅら、「Ｐｈｅｎｏｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｉｓｏｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ Ｐｓｏｒａｌｅａ ｃｏｒｙｌｉｆｏｌｉａ Ｉｎｈｉｂｉｔ ＩＬ－６－Ｉｎｄｕｃｅｄ ＳＴＡＴ３ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ」、Ｐｌａｎｔａ．Ｍｅｄ．７８（９）：９０３～９０６（２０１２）を参照されたい）；並びにＳＤ １００８（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉｕら、「ＳＯＣＳ３ Ｐｒｏｍｏｔｅｓ Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ ａｎｄ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｖｉａ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ ＪＡＫ２／ＳＴＡＴ３ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｐａｔｈｗａｙ ｉｎ ３Ｔ３－Ｌ１ Ａｄｉｐｏｃｙｔｅ」、Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ ２２０（８）：９４７～９５３（２０１５）を参照されたい）からなる群から選択される、シグナル伝達及び転写活性化因子３（ＳＴＡＴ３）の小分子阻害剤である。

【０１０７】

核酸阻害剤

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤、ＭＡＸ阻害剤、Ｅ２Ｆ６阻害剤、ＩＫＺＦ３阻害剤及び／又はＳＴＡＴ３阻害剤は、核酸分子阻害剤である。

【０１０８】

本明細書で使用される場合、用語「核酸分子阻害剤」は、標的遺伝子の発現を低減させる又は排除する核酸分子を指す。核酸分子阻害剤は、典型的には、標的特異的阻害を達成するために、標的遺伝子又は標的遺伝子ｍＲＮＡ中の配列を特異的に標的化する領域を含有する。典型的には、核酸阻害剤分子の標的化領域は、核酸阻害剤分子の効果を、特定された標的遺伝子又は標的遺伝子ｍＲＮＡへと指向させるために、標的遺伝子又は標的遺伝子ｍＲＮＡ上の配列に対して十分に相補的な配列を含む。例えば、「ＺＮＦ２７４の核酸分子阻害剤」は、ＺＮＦ２７４遺伝子の発現を低減させる又は排除する。核酸阻害剤分子には、天然リボヌクレオチド、天然デオキシリボヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオチドが含まれ得る。改変ヌクレオチドには、改変、例えば、糖環上の位置上の置換、ヌクレオチド間のリン酸エステル連結の改変、非天然塩基、並びに非天然の代替的炭素構造、例えば、ロック核酸（「ＬＮＡ」）及びアンロック核酸（「ＵＮＡ」）が含まれる。

【０１０９】

本明細書で使用される場合、用語「低減させる（ｒｅｄｕｃｅ）」又は「低減させる（ｒｅｄｕｃｅｓ）」は、当該分野で一般に受容される通りのその意味を指す。例示的な核酸阻害剤分子（例えば、ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の核酸分子阻害剤）に関して、低減させる（ｒｅｄｕｃｅ）」又は「低減させる（ｒｅｄｕｃｅｓ）」は一般に、核酸阻害剤分子の非存在下で観察された遺伝子の転写及び／又は翻訳と比較した、遺伝子の転写及び／もしくは翻訳又は遺伝子産物のレベルにおける抑圧を指す。一部の実施形態では、遺伝子の転写及び／もしくは翻訳又は遺伝子産物のレベルにおける低減は、本開示に従う核酸阻害剤分子の非存在下で観察されたものと比較して、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、最大で１００％（即ち、検出可能な転写及び／又は翻訳なし）である、又は多くて２分の１、多くて５分の１、多くて１０分の１、多くて２０分の１、多くて３０分の１、多くて４０分の１、多くて５０分の１もしくはそれよりも下への低減である。

【０１１０】
適切な核酸阻害剤分子には、限定なしに、（ｉ）ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）から選択される、ＺＮＦ２７４の核酸分子阻害剤；（ｉｉ）ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、ＭＡＸの核酸分子阻害剤；（ｉｉｉ）ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、Ｅ２Ｆ６の核酸分子阻害剤；（ｉｖ）ｍｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、ＩＫＺＦ３の核酸分子阻害剤；並びに（ｖ）ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ阻害剤、ｓｈＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される、ＳＴＡＴ３の核酸分子阻害剤、が含まれる。

【０１１１】
本明細書で使用される場合、用語「ｍｉｃｒｏＲＮＡ」又は「ｍｉＲＮＡ」は、遺伝子発現を負に調節し得る小さいＲＮＡ分子のクラスを指す（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｌａｍら、「ｓｉＲＮＡ Ｖｅｒｓｕｓ ｍｉＲＮＡ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅ Ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ」、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ４（９）：ｅ２５２（２０１５）を参照されたい）。ｍｉＲＮＡ遺伝子転写が、核においてＲＮＡポリメラーゼＩＩによって実施されて、一次ｍｉＲＮＡ（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）を生じ、これは、二本鎖ステム－ループ構造を有する、５’キャップされ３’ポリアデニル化されたＲＮＡである。次いで、ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡは、マイクロプロセッサ（ｍｉｃｒｏｐｒｏｃｅｓｓｏｒ）複合体（Ｄｒｏｓｈａ及びマイクロプロセッサ複合体サブユニットＤＣＧＲ８を含む）によって切断されて、前駆体ｍｉＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）を形成し、これは、散在したミスマッチを有する７０～１００ヌクレオチドを含有し、ループ構造をとる、二重鎖である。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、引き続いて、エクスポーチン５によって核から細胞質に輸送され、この場所で、Ｄｉｃｅｒによって、１８～２５ヌクレオチドのｍｉＲＮＡ二重鎖へとさらにプロセシングされる。次いで、ｍｉＲＮＡ二重鎖は、ＲＩＳＣと会合して、ｍｉＲＩＳＣと呼ばれる複合体を形成する。ｍｉＲＮＡ二重鎖はほどけ、パッセンジャー鎖（センス鎖）を放出及び放棄する。成熟一本鎖ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲＩＳＣを標的ｍＲＮＡにガイドする。成熟ｍｉＲＮＡは、部分的な相補的塩基対合を介して標的ｍＲＮＡに結合し得、その結果、標的遺伝子サイレンシングが、翻訳抑制、分解及び／又は切断を介して生じる。一部の実施形態では、核酸阻害剤分子は、ｍｉＲＮＡ分子である。本開示の方法における使用に適切なｍｉＲＮＡ阻害剤分子には、限定なしに、以下の表６で同定されたものが含まれる。

【０１１２】

【表６】

例示的なmiRNA配列

転写因子	**miRNA**	配列	配列番号
MAX	miR-485-5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC	7
E2F6	miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	8
STAT3	miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	9
STAT3	miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	10
STAT3	miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	11
STAT3	miR-130a-3p	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	12
STAT3	miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	13

【０１１３】

一部の実施形態では、ＭＡＸ阻害剤は、ＭＡＸの核酸分子阻害剤であり、適切なＭＡＸ核酸分子阻害剤は、ｍｉＲＮＡである。かかる実施形態によれば、例示的なＭＡＸ阻害剤ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－４８５－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－４８５－５ｐ又は成熟ｍｉＲ－４８５－５ｐに対応するヌクレオチド配列を有する。例えば、ｍｉＲＮＡは、配列番号７のヌクレオチド配列を有し得る。

【０１１４】

一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６阻害剤は、Ｅ２Ｆ６の核酸分子阻害剤であり、適切なＥ２Ｆ６核酸分子阻害剤は、ｍｉＲＮＡである。かかる実施形態によれば、例示的なＥ２Ｆ６阻害剤ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－３７９－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－３７９－５ｐ又は成熟ｍｉＲ－３７９－５ｐに対応するヌクレオチド配列を有する。例えば、ｍｉＲＮＡは、配列番号８のヌクレオチド配列を有し得る。

【０１１５】

一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３阻害剤は、ＳＴＡＴ３の核酸分子阻害剤であり、適切なＳＴＡＴ３阻害剤は、ｍｉＲＮＡである。かかる実施形態によれば、例示的なＳＴＡＴ３阻害性ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、成熟ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、成熟ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１７－５ｐ、成熟ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、成熟ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐ又は成熟ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐに対応するヌクレオチド配列を有する。例えば、ｍｉＲＮＡは、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２又は配列番号１３のヌクレオチド配列を有し得る。

【０１１６】

一部の実施形態では、若返りを誘導する方法及びミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、（ｉ）当該投与が、シグナル伝達及び転写活性化因子３（ＳＴＡＴ３）シグナル伝達経路を抑圧する、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ及びｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐからなる群から選択される１つもしくは複数のｍｉｃｒｏＲＮＡ；（ｉｉ）当該投与が、Ｅ２Ｆ転写因子６（Ｅ２Ｆ６）シグナル伝達経路を抑圧する、ｍｉＲ－３７９－５ｐ；並びに／又は（ｉｉｉ）当該投与が、Ｍｙｃ関連因子Ｘ（ＭＡＸ）シグナル伝達経路を抑圧する、ｍｉＲ－４８５－５ｐをコードする１つ又は複数の発現ベクターを含む。

【０１１７】
一部の実施形態では、若返りを誘導する方法及びミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、ＭＡＸ阻害剤をコードする発現ベクターを含む。一部の実施形態では、ＭＡＸ阻害剤は、核酸分子阻害剤である。一部の実施形態では、ＭＡＸ核酸分子阻害剤は、ｍｉＲＮＡである。かかる実施形態によれば、例示的なＭＡＸ阻害剤ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－４８５－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－４８５－５ｐ又は成熟ｍｉＲ－４８５－５ｐに対応するヌクレオチド配列を有する。例えば、ｍｉＲＮＡは、配列番号７のヌクレオチド配列を有し得る。
【０１１８】
一部の実施形態では、若返りを誘導する方法及びミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、Ｅ２Ｆ６阻害剤をコードする発現ベクターを含む。一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６阻害剤は、核酸分子阻害剤である。一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６核酸分子阻害剤は、ｍｉＲＮＡである。かかる実施形態によれば、例示的なＥ２Ｆ６阻害剤ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－３７９－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－３７９－５ｐ又は成熟ｍｉＲ－３７９－５ｐに対応するヌクレオチド配列を有する。例えば、ｍｉＲＮＡは、配列番号８のヌクレオチド配列を有し得る。
【０１１９】
一部の実施形態では、若返りを誘導する方法及びミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、ＳＴＡＴ３阻害剤をコードする発現ベクターを含む。一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３阻害剤は、核酸分子阻害剤である。一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３核酸分子阻害剤は、ｍｉＲＮＡである。かかる実施形態によれば、例示的なＳＴＡＴ３阻害性ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、成熟ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、成熟ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１７－５ｐ、成熟ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、成熟ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐ、ｐｒｅ－ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐ又は成熟ｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐに対応するヌクレオチド配列を有する。例えば、ｍｉＲＮＡは、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２又は配列番号１３のヌクレオチド配列を有し得る。
【０１２０】
一部の実施形態では、若返りを誘導する方法及びミエリン欠乏症を処置する方法において使用される薬剤は、以下の表７に示されるような、（１）ｍｉＲ－４８５－５ｐ　ｍｉＲ－３７９－５ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ及びｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐからなる群から選択される１つ又は複数のｍｉｃｒｏＲＮＡ、並びに（２）ｍｉＲ－９３－３ｐ、ｍｉＲ－１２６０ｂ、ｍｉＲ－７６７－５ｐ、ｍｉＲ－３０ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－９－３ｐ及びｍｉＲ－９－５ｐからなる群から選択される１つ又は複数のｍｉｃｒｏＲＮＡをコードする発現ベクターを含む。
【０１２１】

【表７】

miRNA配列

miRNA	配列	配列番号
miR-93-3p	ACUGCUGAGCUAGCACUUCCCG	8
miR-1260b	AUCCCACCACUGCCACCAU	9
miR-767-5p	UGCACCAUGGUUGUCUGAGCAUG	10
miR-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	11
miR-9-3p	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU	12
miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	13

【０１２２】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の核酸阻害剤分子は、ｓｈＲＮＡ分子である。低分子ヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子は、ループによって接続された、標的遺伝子由来のセンス配列及びアンチセンス配列を含む。いったん転写されると、ｓｈＲＮＡ分子は、核から細胞質中に輸送され、この場所で、酵素Ｄｉｃｅｒが、低分子ヘアピン型ＲＮＡ干渉プロセスにおいて、それらを低分子（ｓｍａｌｌ／ｓｈｏｒｔ）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）へとプロセシングする。本明細書で使用される場合、用語「低分子ヘアピン型ＲＮＡ干渉」又は「ｓｈＲＮＡｉ」は、遺伝子発現を負に調節する小さいＲＮＡ分子のクラスによって媒介されるプロセスである。

【０１２３】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤は、ＺＮＦ２７４の核酸分子阻害剤であり、適切なＺＮＦ２７４阻害剤は、ＺＮＦ２７４　ｓｈＲＮＡである。一部の実施形態では、ＭＡＸ阻害剤は、ＭＡＸの核酸分子阻害剤であり、適切なＭＡＸ阻害剤は、ＭＡＸ　ｓｈＲＮＡである。一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６阻害剤は、Ｅ２Ｆ６の核酸分子阻害剤であり、適切なＥ２Ｆ６阻害剤は、Ｅ２Ｆ６　ｓｈＲＮＡである。一部の実施形態では、ＩＫＺＦ３阻害剤は、ＩＫＺＦ３の核酸分子阻害剤であり、適切なＩＫＺＦ３阻害剤は、ＩＫＺＦ３　ｓｈＲＮＡである。一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３阻害剤は、ＳＴＡＴ３の核酸分子阻害剤であり、適切なＳＴＡＴ３阻害剤は、ＳＴＡＴ３　ｓｈＲＮＡである。

【０１２４】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の核酸阻害剤分子は、ｓｉＲＮＡである。本明細書で使用される場合、用語「低分子干渉ＲＮＡ」又は「ｓｉＲＮＡ」は、３’－２ヌクレオチドオーバーハングを有する、典型的には２１～２３ヌクレオチド長の短い核酸分子を指す（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、ＭｃＭａｎｕｓ及びＳｈａｒｐ、「Ｇｅｎｅ　Ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ　ｉｎ　Ｍａｍｍａｌｓ　ｂｙ　Ｓｍａｌｌ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡｓ」、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．３（１０）：７３７～７４７（２００２）を参照されたい）。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（「ＲＩＳＣ」）と相互作用し、それを活性化する。ＲＩＳＣのエンドヌクレアーゼアルゴノート２（ＡＧＯ２）成分は、ｓｉＲＮＡのパッセンジャー鎖（センス鎖）を切断するが、ガイド鎖（アンチセンス鎖）は、ＲＩＳＣと会合したままである。

【０１２５】

引き続いて、ガイド鎖は、ＡＧＯ２による切断のために、活性ＲＩＳＣをその標的ｍＲＮＡにガイドする。ガイド鎖は、それに対して完全に相補的なｍＲＮＡのみに結合するので、ｓｉＲＮＡは、特異的遺伝子サイレンシングを引き起こす（例えば、その全体がこれ

により参照により本明細書に組み込まれる、Ｌａｍら、「ｓｉＲＮＡ　Ｖｅｒｓｕｓ　ｍｉＲＮＡ　ａｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅ　Ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ」、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　４（９）：ｅ２５２（２０１５）を参照されたい）。

【０１２６】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤は、ＺＮＦ２７４　ｓｉＲＮＡである。一部の実施形態では、ＭＡＸ阻害剤は、ＭＡＸ　ｓｉＲＮＡである。一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６阻害剤は、Ｅ２Ｆ６　ｓｉＲＮＡである。一部の実施形態では、ＩＫＺＦ３阻害剤は、ＩＫＺＦ３　ｓｉＲＮＡである。一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３阻害剤は、ＳＴＡＴ３　ｓｉＲＮＡである。

【０１２７】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の核酸阻害剤分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。本明細書で使用される場合、用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ＡＳＯ」は、種々の機構を介して遺伝子発現をモジュレートするために使用され得る、多様な化学の小さい（約１８～３０ヌクレオチド）合成の一本鎖核酸ポリマーを指す（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｒｏｂｅｒｔｓら、「Ａｄｖａｎｃｅｓ　ｉｎ　Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　１９：６７３～６９４（２０２０）を参照されたい）。ＡＳＯは、以下の２つの主要なカテゴリーへと下位分割され得る：ＲＮａｓｅ　Ｈコンピテント及び立体遮断（ｓｔｅｒｉｃ　ｂｌｏｃｋ）。内因性ＲＮａｓｅ　Ｈ酵素ＲＮＡＳＥＨ１は、ＤＮＡベースのオリゴヌクレオチドがそれらのコグネートｍＲＮＡ転写物に結合する際に形成されるＲＮＡ－ＤＮＡヘテロ二重鎖基質を認識し、ＲＮＡの分解を触媒する。ＡＳＯ結合の部位における切断は、標的ＲＮＡの破壊を生じ、それにより、標的遺伝子発現をサイレンシングする。立体遮断オリゴヌクレオチドは、高い親和性で標的転写物に結合するように設計されているが、ＲＮａｓｅ　Ｈコンピテンスを欠如するので、標的転写物分解を誘導しない、ＡＳＯである。したがって、かかるオリゴヌクレオチドは、連続するＤＮＡ様塩基の一続きが回避されるように、ＲＮＡと対合した場合にＲＮａｓｅ　Ｈ基質を形成しないヌクレオチド、又はヌクレオチド化学の混合物（即ち、「ミクスマー（ｍｉｘｍｅｒ）」）のいずれかを含む。

【０１２８】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤は、ＺＮＦ２７４　ＡＳＯである。一部の実施形態では、ＭＡＸ阻害剤は、ＭＡＸ　ＡＳＯである。一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６阻害剤は、Ｅ２Ｆ６　ＡＳＯである。一部の実施形態では、ＩＫＺＦ３阻害剤は、ＩＫＺＦ３　ＡＳＯである。一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３阻害剤は、ＳＴＡＴ３　ＡＳＯ、例えば、ダンバチルセン（ｄａｎｖａｔｉｒｓｅｎ）である（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｘｕら、「Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｄａｎｖａｔｉｒｓｅｎ　Ｓｕｐｐｏｒｔｉｎｇ　Ｆｌａｔ　Ｄｏｓｉｎｇ　Ｓｗｉｔｃｈ」、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔ．Ｐｈａｒｍａｃｏｄｙｎ．４６（１）：６５～７４（２０１９）を参照されたい）。

【０１２９】

核酸阻害剤を設計する方法は、当該分野で周知であり、本明細書で記載される方法における使用のための核酸阻害剤を設計するのに適切である（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｌａｍら、「ｓｉＲＮＡ　Ｖｅｒｓｕｓ　ｍｉＲＮＡ　ａｓ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅ　Ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ」、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　４（９）：ｅ２５２（２０１５）及びＫｕｌｋａｒｎｉら、「Ｔｈｅ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｌａｎｄｓｃａｐｅ　ｏｆ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」、Ｎａｔｕｒｅ　Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１６：６３０～６４３（２０２１）を参照されたい）。

【０１３０】

核酸阻害剤分子は、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３並びにそれらの転写バリアントを、配列特異的様式で標的化するように設計される。ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３並びにそれらの転写バリアントの配列は、当該分野で周知であり、種々のキュレートされたデータベース、例えば、ＮＣＢＩヌクレオチド又は遺伝子データベースを介してアクセス可能である。一部の実施形態では、核酸阻害剤分子は、提供されたＮＣＢＩ受託番号を介して入手可能な配列を使用して以下の表８で同定された転写因子のうちの１つ又は複数を標的化するように設計される。

【０１３１】

【表８】

例示的なヒト転写因子遺伝子及び転写物バリアント

転写因子	遺伝子ID番号*	転写物バリアント	参照転写物受託番号*
ジンクフィンガータンパク質274 (ZNF274)	10782	ZNF274c	NM_133502.3
		ZNF274b	NM_016324.4
		ZNF274a	NM_016325.4
		ZNF274d	NM_001278734.2
		転写物バリアントX1	XM_011526327.1
		転写物バリアントX3	XM_011526328.2
		転写物バリアントX2	XM_017026174.1
		転写物バリアントX5	XM_017026175.1
		転写物バリアントX4	XR_001753588.2
		転写物バリアントX6	XR_001753589.2
Myc関連因子X (MAX)	4149	転写物バリアント1	NM_002382.5
		転写物バリアント2	NM_145112.3
		転写物バリアント3	NM_145113.3
		転写物バリアント4	NM_145114.3
		転写物バリアント6	NM_197957.4
		転写物バリアント7	NM_001271068.2
		転写物バリアント8	NM_001271069.2
		転写物バリアント11	NM_001320415.2
		転写物バリアント9	NR_073137.1
		転写物バリアント10	NR_073138.1
		転写物バリアントX1	XM_011536773.3
		転写物バリアントX7	XM_017021312.2
		転写物バリアントX8	XM_017021313.1
		転写物バリアントX3	XR_943450.3
		転写物バリアントX4	XR_943451.3

		転写物バリアントX5	XR_943452.3
		転写物バリアントX6	XR_001750326.2
		転写物バリアントX9	XR_001750327.2
		転写物バリアントX2	XR_002957553.1
E2F転写因子6 (E2F6)	1876	転写物バリアントa	NM_198256.4
		転写物バリアントf	NM_212540.3
		転写物バリアントb	NM_001278275.2
		転写物バリアントc	NM_001278276.2
		転写物バリアントd	NM_001278277.2
		転写物バリアントe	NM_001278278.2
		転写物バリアントg	NR_103490.2
		転写物バリアントX1	XM_017003547.1
		転写物バリアントX2	XM_017003548.1
		転写物バリアントX3	XM_017003549.2
		転写物バリアントX4	XR_001738660.1
ジンクフィンガータンパク質アイオロス(IKZF3)	22806	転写物バリアント1	NM_012481.5
		転写物バリアント2	NM_183228.3
		転写物バリアント3	NM_183229.3
		転写物バリアント4	NM_183230.3
		転写物バリアント5	NM_183231.3
		転写物バリアント6	NM_183232.3
		転写物バリアント7	NM_001257408.2
		転写物バリアント8	NM_001257409.2
		転写物バリアント9	NM_001257410.2
		転写物バリアント10	NM_001257411.2
		転写物バリアント11	NM_001257412.2
		転写物バリアント12	NM_001257413.2
		転写物バリアント13	NM_001257414.2
		転写物バリアント14	NM_001284514.2
		転写物バリアント15	NM_001284515.2
		転写物バリアント16	NM_001284516.1

シグナル伝達及び転写活性化因子3 (STAT3)	6774	転写物バリアント1	NM_139276.3
		転写物バリアント2	NM_003150.4
		転写物バリアント3	NM_213662.2
		転写物バリアント4	NM_001369512.1
		転写物バリアント5	NM_001369513.1
		転写物バリアント6	NM_001369514.1
		転写物バリアント7	NM_001369516.1
		転写物バリアント8	NM_001369517.1
		転写物バリアント9	NM_001369518.1
		転写物バリアント10	NM_001369519.1
		転写物バリアント11	NM_001369520.1
		転写物バリアント12	NM_001384984.1
		転写物バリアント13	NM_001384985.1
		転写物バリアント14	NM_001384986.1
		転写物バリアント15	NM_001384987.1
		転写物バリアント16	NM_001384988.1
		転写物バリアント17	NM_001384989.1
		転写物バリアント18	NM_001384990.1
		転写物バリアント19	NM_001384991.1
		転写物バリアント20	NM_001384992.1
		転写物バリアント21	NM_001384993.1
		転写物バリアント22	XM_017024973.2
		転写物バリアント22	XM_024450896.1

*その各々は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３２】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤、ＭＡＸ阻害剤、Ｅ２Ｆ６阻害剤、ＩＫＺＦ３阻害剤及び／又はＳＴＡＴ３阻害剤は、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の発現をサイレンシングすることが可能なヌクレアーゼベースの遺伝子編集系である。本明細書で使用される場合、用語「ヌクレアーゼベースの遺伝子編集系」は、ゲノム中の標的配列に動員され得るヌクレアーゼ又はその誘導体を含む系を指す。この系は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート関連（「Ｃａｓ」）タンパク質（例えば、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２ａ及びＣａｓ１２ｂ）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（「ＺＦＮ」）又は転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（「ＴＡＬＥ

Ｎ」）を含み得る。
【０１３３】
一部の実施形態では、ヌクレアーゼベースの遺伝子編集系は、ＺＮＦ２７４発現、ＭＡＸ発現、Ｅ２Ｆ６発現、ＩＫＺＦ３発現及び／又はＳＴＡＴ３発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系である。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸分子と、標的ＤＮＡ配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡとを含み得る。
【０１３４】
本明細書で記載される場合、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓタンパク質を標的ＤＮＡ配列にガイドするガイドＲＮＡと共にリボヌクレオタンパク質複合体を形成する。適切なＣａｓタンパク質には、Ｃａｓヌクレアーゼ（即ち、標的核酸配列において二本鎖切断を導入することが可能なＣａｓタンパク質）、Ｃａｓニッカーゼ（即ち、標的核酸配列において一本鎖切断を導入することが可能なＣａｓタンパク質誘導体）及びヌクレアーゼデッド（ｄｅａｄ）Ｃａｓ（ｄＣａｓ）タンパク質（即ち、ヌクレアーゼ活性を全く有さないＣａｓタンパク質誘導体）が含まれる。
【０１３５】
一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。本明細書で使用される場合、用語「Ｃａｓ９タンパク質」又は「Ｃａｓ９」は、組換えのもしくは天然に存在する形態のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）又はそのバリアントもしくはホモログのいずれかを含む。一部の実施形態では、バリアント又はホモログは、天然に存在するＣａｓ９タンパク質と比較して、配列全体又は配列の一部分（例えば、５０、１００、１５０又は２００連続するアミノ酸の部分）にわたって少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔ参照番号Ｑ９９ＺＷ２、Ｇ３ＥＣＲ１、Ｊ７ＲＵＡ５、Ａ０Ｑ５Ｙ３もしくはＪ３Ｆ２Ｂ０（これらは、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）によって同定されるタンパク質又はそれと実質的な同一性を有するバリアントもしくはホモログと実質的に同一である。一部の実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ、Ｃａｓ９ニッカーゼ及びヌクレアーゼデッドＣａｓ９（「ｄＣａｓ９」）からなる群から選択される。
【０１３６】
一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１２ａタンパク質である。本明細書で使用される場合、用語「Ｃａｓ１２ａタンパク質」又は「Ｃａｓ１２ａ」は、組換えのもしくは天然に存在する形態のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質１２（Ｃａｓ１２ａ）又はそのバリアントもしくはホモログのいずれかを含む。一部の実施形態では、バリアント又はホモログは、天然に存在するＣａｓ１２ａタンパク質と比較して、配列全体又は配列の一部分（例えば、５０、１００、１５０又は２００連続するアミノ酸の部分）にわたって少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、Ｃａｓ１２ａタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔ参照番号Ａ０Ｑ７Ｑ２、Ｕ２ＵＭＱ６、Ａ０Ａ７Ｃ６ＪＰＣ１、Ａ０Ａ７Ｃ９Ｈ０Ｚ９もしくはＡ０Ａ７Ｊ０ＡＹ５５（これらは、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）によって同定されるタンパク質又はそれと実質的な同一性を有するバリアントもしくはホモログと実質的に同一である。一部の実施形態では、Ｃａｓ１２ａタンパク質は、Ｃａｓ１２ａヌクレアーゼ、Ｃａｓ１２ａニッカーゼ及びヌクレアーゼデッドＣａｓ１２ａ（「ｄＣａｓ１２ａ」）からなる群から選択される。
【０１３７】
一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１２ｂタンパク質である。本明細書で使用される場合、用語「Ｃａｓ１２ｂタンパク質」又は「Ｃａｓ１２ｂ」は、組換えのもしくは天然に存在する形態のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質１２（Ｃａｓ１２ｂ）又はそのバリアントもしくはホモログのいずれかを含む。一部の実施形態では、バリアント又はホモログは、天然に存在するＣａｓ１２ｂタンパク質と比較して、配列全体又は配列の一

部分（例えば、５０、１００、１５０又は２００連続するアミノ酸の部分）にわたって少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、Ｃａｓ１２ｂタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔ参照番号Ｔ０Ｄ７Ａ２、Ａ０Ａ６Ｉ３ＳＰＩ６、Ａ０Ａ６Ｉ７ＦＵＣ４、Ａ０Ａ６Ｎ９ＴＰ１７、Ａ０Ａ６Ｍ１ＵＦ６４、Ａ０Ａ７Ｙ８Ｖ７４８、Ａ０Ａ７Ｘ７ＫＩＳ４、Ａ０Ａ７Ｘ８Ｘ２Ｕ５もしくは Ａ０Ａ７Ｘ８ＵＭＷ７（これらは、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）によって同定されるタンパク質又はそれと実質的な同一性を有するバリアントもしくはホモログと実質的に同一である。一部の実施形態では、Ｃａｓ１２ｂタンパク質は、Ｃａｓ１２ｂヌクレアーゼ、Ｃａｓ１２ｂニッカーゼ及びヌクレアーゼデッドＣａｓ１２ｂ（「ｄＣａｓ１２ｂ」）からなる群から選択される。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、用語「ガイドＲＮＡ」又は「ｇＲＮＡ」は、核タンパク質に結合することが可能であり、それによりリボヌクレオタンパク質複合体を形成する、リボヌクレオチド配列を指す。本開示の方法及び系によれば、ガイドＲＮＡは、（ｉ）ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３又はＳＴＡＴ３配列の標的核酸配列に対して相補的なＤＮＡ標的化配列、及び（ｉｉ）Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ、Ｃａｓ９ニッカーゼ、ｄＣａｓ９、Ｃａｓ１２ａヌクレアーゼ、Ｃａｓ１２ａニッカーゼ又はｄＣａｓ１２ａ）のための結合配列を含む。

【０１３９】

一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、「シングルガイドＲＮＡ」又は「ｓｇＲＮＡ」が含まれ得る、シングルガイドＲＮＡ分子（単一のＲＮＡ核酸）である。他の実施形態では、本開示の核酸には、２つのＲＮＡ分子（例えば、結合配列におけるハイブリダイゼーションを介して一緒に接続されている）が含まれる。したがって、ガイドＲＮＡという用語は、２分子核酸及び単一分子核酸（例えば、ｓｇＲＮＡ）の両方を指して、包括的である。

【０１４０】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００又はそれよりも多くの核酸残基長である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、１０～３０核酸残基長である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、２０核酸残基長である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡの長さは、少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００又はそれよりも多くの核酸残基長又は糖残基長である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、５～５０、１０～５０、１５～５０、２０～５０、２５～５０、３０～５０、３５～５０、４０～５０、４５～５０、５～７５、１０～７５、１５～７５、２０～７５、２５～７５、３０～７５、３５～７５、４０～７５、４５～７５、５０～７５、５５～７５、６０～７５、６５～７５、７０～７５、５～１００、１０～１００、１５～１００、２０～１００、２５～１００、３０～１００、３５～１００、４０～１００、４５～１００、５０～１００、５５～１００、６０～１００、６５～１００、７０～１００、７５～１００、８０～１００、８５～１００、９０～１００、９５～１００、又はそれよりも多くの残基長である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、１０～１５、１０～２０、１０～３０、１０～４０又は１０～５０残基長である。

【０１４１】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、ＺＮＦ２７４遺伝子発現をサイレンシングするように標的化され、ガイドＲＮＡは、ＺＮＦ２７４遺伝子配列の一部分に対し

て相補的なヌクレオチド配列を含む。
【０１４２】
一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、ＭＡＸ遺伝子発現をサイレンシングするように標的化され、ガイドＲＮＡは、ＭＡＸ遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。
【０１４３】
一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｅ２Ｆ６遺伝子発現をサイレンシングするように標的化され、ガイドＲＮＡは、Ｅ２Ｆ６遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。
【０１４４】
一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、ＩＫＺＦ３遺伝子発現をサイレンシングするように標的化され、ガイドＲＮＡは、ＩＫＺＦ３遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。
【０１４５】
一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、ＳＴＡＴ３　ＤＮＡ発現をサイレンシングするように標的化され、ガイドＲＮＡは、ＳＴＡＴ３遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。
【０１４６】
一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４発現、ＭＡＸ発現、Ｅ２Ｆ６発現、ＩＫＺＦ３発現及び／又はＳＴＡＴ３発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、ＣＲＩＳＰＲｉ系である。本明細書で使用される場合、用語「ＣＲＩＳＰＲ干渉」又は「ＣＲＩＳＰＲｉ」は、遺伝子発現の配列特異的抑制を可能にする系を指す。ＣＲＩＳＰＲｉ系は、標的ＤＮＡ配列を切断することなしに標的遺伝子の転写を遮断するために、ヌクレアーゼデッドＣａｓ（「ｄＣａｓ」）タンパク質（即ち、ヌクレアーゼ不活性化Ｃａｓタンパク質）を含む。ヌクレアーゼ不活性化Ｃａｓタンパク質及びヌクレアーゼ不活性化Ｃａｓタンパク質を生成する方法は、当該分野で周知である（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｑｉら、「Ｒｅｐｕｒｐｏｓｉｎｇ　ＣＲＩＳＰＲ　ａｓ　ａｎ　ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ　Ｐｌａｔｆｏｒｍ　ｆｏｒ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ　１５２（５）：１１７３～１１８３（２０１３）を参照されたい）。
【０１４７】
本明細書で記載される使用に適切なＣＲＩＳＰＲｉ系は、（ｉ）ヌクレアーゼデッドＣａｓ（ｄＣａｓ）タンパク質（即ち、ヌクレアーゼ不活性化Ｃａｓタンパク質）又はｄＣａｓタンパク質をコードする核酸分子、並びに（ｉｉ）ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及びＳＴＡＴ３の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを含み得る。
【０１４８】
一部の実施形態では、ヌクレアーゼデッドＣａｓ（ｄＣａｓ）タンパク質は、ｄＣａｓ９、ｄＣａｓ１２ａ及びｄＣａｓ１２ｂからなる群から選択される。
【０１４９】
一部の実施形態では、ヌクレアーゼデッドＣａｓ（ｄＣａｓ）タンパク質は、Ｃａｓタンパク質と、標的遺伝子、即ち、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及びＳＴＡＴ３の発現を抑圧又はサイレンシングする１つ又は複数のエピジェネティックモジュレーターとを含む融合タンパク質である。
【０１５０】
適切なエピジェネティックモジュレーターには、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ酵素（例えば、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ３アルファ（「ＤＮＭＴ３Ａ」）及びＤＮＡメチルトランスフェラーゼ３様（「ＤＮＭＴ３Ｌ」））、ヒストン脱メチル化酵素（例えば、リシン特異的ヒストンデメチラーゼ１（「ＬＳＤ１」））、ヒストンメチルトランスフェラーゼ酵素（例えば、Ｇ９Ａ及びＳｕＶ３９ｈ１）、転写因子動員ドメイン（例えば

、クルッペル関連ボックスドメイン（「ＫＲＡＢ」）、ＫＲＡＢ－メチル－ＣｐＧ結合タンパク質２ドメイン（「ＫＲＡＢ－ＭｅＣＰ２」）、Ｚｅｓｔｅのエンハンサー２（「ＥＺＨ２」））、ジンクフィンガー転写リプレッサードメイン（例えば、スパルト（ｓｐａｌｔ）様転写因子１（「ＳＡＬＬ１」）、並びに欠損サイレンシングタンパク質のサプレッサー３（「ＳＤＳ３」））（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｒｅｚｇｉｎら、「Ｄｅａｄ Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ：Ｔｙｐｅｓ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｓｃｉ．２０：６０４１（２０１９）を参照されたい）が含まれるがこれらに限定されない。

【０１５１】

一部の実施形態では、エピジェネティックモジュレーターは、ＤＮＭＴ３Ａ、ＤＮＭＴ２Ｌ、ＬＳＤ１、ＫＲＡＢ、ＫＲＡＢ－ＭｅＣＰ２、ＥＺＨ２、ＳＡＬＬ１、ＳＤＳ３、Ｇ９Ａ及びＳｕｖ３９ｈ１からなる群から選択される（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｙｅｏら、「Ａｎ Ｅｎｈａｎｃｅｄ ＣＲＩＳＰＲ Ｒｅｐｒｅｓｓｏｒ ｆｏｒ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｇｅｎｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ」、１５（８）：６１１～６１６（２０１８）；Ａｌｅｒａｓｏｏｌら、「Ａｎ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ＫＲＡＢ Ｄｏｍａｉｎ ｆｏｒ ＣＲＩＳＰＲｉ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ １７：１０９３～１０９６（２０２０）；及びＤｕｋｅら、「Ａｎ Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＣＲＩＳＰＲ／ｄＣａｓ９ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ Ｔｏｏｌ ｆｏｒ Ｎｅｕｒｏｎａｌ Ｇｅｎｅ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ ２：９（２０２０）を参照されたい）。

【０１５２】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４阻害剤は、ＺＮＦ２７４ ＤＮＡ発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲｉ系であり、ガイドＲＮＡは、ＺＮＦ２７４遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。

【０１５３】

一部の実施形態では、ＭＡＸ阻害剤は、ＭＡＸ ＤＮＡ発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲｉ系であり、ガイドＲＮＡは、ＭＡＸ遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。

【０１５４】

一部の実施形態では、Ｅ２Ｆ６阻害剤は、Ｅ２Ｆ６ ＤＮＡ発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲｉ系であり、ガイドＲＮＡは、Ｅ２Ｆ６遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。

【０１５５】

一部の実施形態では、ＩＫＺＦ３阻害剤は、ＩＫＺＦ３ ＤＮＡ発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲｉ系であり、ガイドＲＮＡは、ＩＫＺＦ３遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。

【０１５６】

一部の実施形態では、ＳＴＡＴ３阻害剤は、ＳＴＡＴ３ ＤＮＡ発現をサイレンシングするように標的化されるＣＲＩＳＰＲｉ系であり、ガイドＲＮＡは、ＳＴＡＴ３遺伝子配列の一部分に対して相補的なヌクレオチド配列を含む。

【０１５７】

一部の実施形態では、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３を抑圧する薬剤は、ＺＮＦ２７４阻害剤、ＭＡＸ阻害剤、Ｅ２Ｆ６阻害剤、ＩＫＺＦ３阻害剤及びＩＫＺＦ３阻害剤からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子阻害剤を発現する１つ又は複数の発現ベクターを含む。各発現ベクターは、（１）ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＩＫＺＦ３に対する１つ又は複数の核酸阻害剤をコードするヌクレオチド配列、並びに（２）このヌクレオチド配列に作動可能に連結された調節配列を含む。一部の実施形態では、調節配列は、ＰＤＧＦＲＡプロモーター、ＺＮＦ４８８プロモーター、ＧＰＲ１７プロモーター、ＯＬＩＧ２プロモーター、ＣＳＰ

ＧＦＡＰプロモーター、ＧＦＡＰ５プロモーター及びＳＯＸ１０プロモーターからなる群から選択されるグリア細胞特異的プロモーターを含む。一部の実施形態では、調節配列は、誘導性プロモーター又はプロモーター系、例えば、テトラサイクリン制御される誘導性の系、クメート制御される誘導性の系及びラパマイシン制御される誘導性の系を含み、これらは、以下により詳細に記載される。

【０１５８】

一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター又は細菌ベクターを含む。一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、アデノウイルス、ＡＡＶ、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス及びヘルペスウイルスからなる群から選択されるウイルスベクターを含む。一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、レンチウイルスベクターを含む。一部の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、レトロウイルスベクターを含む。他の実施形態では、１つ又は複数の発現ベクターは、ＡＡＶベクターを含む。発現ベクターとしての使用に適切なウイルスベクターを生成及び単離するための方法は、以下により詳細に記載される。

【０１５９】

ＩＶ．発現ベクター

本開示の別の態様は、本出願に記載される発現ベクターに関する。一部の実施形態では、発現ベクターは、ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子を発現し、発現ベクターは、（１）ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＥＺＨ２、ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ及びＴＥＡＤ２からなる群から選択される１つ又は複数の転写因子をコードするヌクレオチド配列、並びに（２）このヌクレオチド配列に作動可能に連結された調節配列を含む。

【０１６０】

一部の実施形態では、発現ベクターは、（１）ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＩＫＺＦ３に対する１つ又は複数の核酸阻害剤をコードするヌクレオチド配列、並びに（２）このヌクレオチド配列に作動可能に連結された調節配列を含む。

【０１６１】

一部の実施形態では、調節配列は、ＰＤＧＦＲＡプロモーター、ＺＮＦ４８８プロモーター、ＧＰＲ１７プロモーター、ＯＬＩＧ２プロモーター、ＣＳＰＧ４プロモーター及びＳＯＸ１０プロモーターからなる群から選択されるグリア細胞特異的プロモーターを含む。

【０１６２】

一部の実施形態では、調節配列は、誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系配列を含む。本開示の方法を実施する際に使用され得る又は本開示の系に含まれ得る誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系には、ホルモン及びホルモンアナログ、例えば、プロゲステロン、エクジソン及びグルココルチコイドによって調節されるもの、並びにテトラサイクリン、ヒートショック、重金属イオン、インターフェロン及びラクトースオペロン活性化化合物によって調節されるプロモーターが含まれる。誘導性プロモーター及び／オペレーター系は、それが動作可能にカップリングされた核酸分子の転写を、「調節剤」（例えば、化学的薬剤又は生物学的分子、例えば、代謝物、小分子）又は刺激に応答して直接的又は間接的に活性化することが可能である。「調節剤」又は刺激の非存在下では、誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系に作動可能に連結されたヌクレオチド配列は、転写されない、又は実質的に発現されない。

【０１６３】

用語「転写されない」又は「実質的に発現されない」は、転写のレベルが、適切な刺激又は調節剤の存在下で観察される転写のレベルの多くて５０分の１；好ましくは、適切な刺激又は調節剤の存在下で観察される転写のレベルの多くて１００分の１、２５０分の１もしくは５００分の１又はそれよりも下であることを意味する。これらの系の総説については、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｇｉｎｇｒｉｃｈ及び

Ｒｏｄｅｒ、「Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ Ｎｅｒｖｏｕｓ Ｓｙｓｔｅｍ ｏｆ Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｉｃｅ」、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２１：３７７～４０５（１９９８）を参照されたい。

【０１６４】

本発明の発現ベクター中に含めるための適切な誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系は、当該分野で周知であり、限定なしに、テトラサイクリン制御されるオペレーター系、クメート制御されるオペレーター系、ラパマイシン誘導性の系、ＦＫＣｓＡ誘導性の系及びＡＢＡ誘導性の系が含まれる（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋａｌｌｕｎｋｉら、「Ｈｏｗ ｔｏ Ｃｈｏｏｓｅ ｔｈｅ Ｒｉｇｈｔ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｓｔｕｄｉｅｓ？」Ｃｅｌｌｓ ８（８）：７９６（２０１９）；米国特許第８７２８７５９号；及び米国特許第７７４５５９２号を参照されたい）。

【０１６５】

一部の実施形態では、テトラサイクリン制御されるオペレーター系は、抑制ベースの構成を含み、ＴｅｔオペレーターＴｅｔＯ」）は、構成的プロモーターと目的の遺伝子との間に挿入され、オペレーターへのＴｅｔリプレッサー（「ＴｅｔＲ」）の結合は、目的の核酸配列の下流の転写を抑圧する（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋａｌｌｕｎｋｉら、「Ｈｏｗ ｔｏ Ｃｈｏｏｓｅ ｔｈｅ Ｒｉｇｈｔ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｓｔｕｄｉｅｓ？」Ｃｅｌｌｓ ８（８）：７９６（２０１９）を参照されたい）。かかる実施形態によれば、テトラサイクリン（又は合成テトラサイクリン誘導体ドキシサイクリン）の添加は、ＴｅｔＲとＴｅｔＯとの間の会合の崩壊を生じ、それにより、目的の核酸配列のＴｅｔＯ依存的転写を誘発する。

【０１６６】

一部の実施形態では、テトラサイクリン制御されるオペレーター系は、Ｔｅｔ－オフ構成を含み、タンデムＴｅｔＯ配列は、目的の核酸配列が後に続くミニマルプロモーターの上流に位置付けられる（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋａｌｌｕｎｋｉら、「Ｈｏｗ ｔｏ Ｃｈｏｏｓｅ ｔｈｅ Ｒｉｇｈｔ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｓｔｕｄｉｅｓ？」Ｃｅｌｌｓ ８（８）：７９６（２０１９）を参照されたい）。かかる実施形態によれば、ＴｅｔＲと、単純ヘルペスウイルス１型に由来する真核生物トランス活性化因子であるＶＰ１６（「ｔＴＡ」）とからなるキメラタンパク質は、転写活性化因子に変換され、発現プラスミドは、オペレータープラスミドと一緒にトランスフェクトされる。したがって、テトラサイクリン（又は合成テトラサイクリン誘導体ドキシサイクリン）の存在は、この系又はその成分の発現のスイッチをオフにするが、テトラサイクリンの除去は、スイッチをオンにする。

【０１６７】

一部の実施形態では、テトラサイクリン制御されるオペレーター系は、Ｔｅｔ－オン構成を含み、この系又はその成分は、テトラサイクリンが存在する場合に転写される（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋａｌｌｕｎｋｉら、「Ｈｏｗ ｔｏ Ｃｈｏｏｓｅ ｔｈｅ Ｒｉｇｈｔ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｓｔｕｄｉｅｓ？」Ｃｅｌｌｓ ８（８）：７９６（２０１９）を参照されたい）。かかる実施形態によれば、タンデムＴｅｔＯ配列は、目的の核酸配列が後に続くミニマルプロモーターの上流に位置付けられる。テトラサイクリン（又は５合成テトラサイクリン誘導体ドキシサイクリン）の存在下では、突然変異体ｒＴａ（「ｒｔＴａ」）は、ＴｅｔＯ配列に結合し、それにより、ミニマルプロモーターを活性化する。

【０１６８】

一部の実施形態では、誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系は、クメート制御

されるオペレーター系である。テトラサイクリン制御されるオペレーター系と同様、クメート制御されるオペレーター系、クメートオペレーター（「ＣｕＯ」）及びそのリプレッサー（「ＣｙｍＲ」）は、リプレッサー構成、活性化因子構成及び逆活性化因子（ｒｅｖｅｒｓｅ　ａｃｔｉｖａｔｏｒ）構成へと操作され得る（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋａｌｌｕｎｋｉら、「Ｈｏｗ　ｔｏ　Ｃｈｏｏｓｅ　ｔｈｅ　Ｒｉｇｈｔ　Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｓｔｕｄｉｅｓ？」Ｃｅｌｌｓ　８（８）：７９６（２０１９）を参照されたい）。

【０１６９】

一部の実施形態では、クメート制御されるオペレーター系は、抑制ベースの構成を含み、クメートオペレーター（「ＣｕＯ」）は、構成的プロモーターと目的の遺伝子との間に挿入され、オペレーターへのクメートリプレッサー（「ＣｙｍＲ」）の結合は、本明細書で記載される系（又は系成分）の下流の転写を抑圧する。かかる実施形態によれば、クメートの添加は、ＣｙｍＲを放出し、それにより、系又は系成分のＣｕＯ依存的発現を誘発する。

【０１７０】

一部の実施形態では、クメート制御されるオペレーター系は、活性化因子構成を含み、キメラ分子（「ｃＴＡ」）は、ＣｙｍＲとＶＰ１６との融合を介して形成される。この構成では、ミニマルプロモーターは、マルチマー化されたオペレーター結合部位（例えば、６×ＣｕＯ）の下流に配置される。目的の核酸配列の転写は、クメートの非存在下で活性化されるミニマルプロモーターによって制御される。

【０１７１】

一部の実施形態では、クメート制御されるオペレーター系は、逆活性化因子構成を含み、核酸配列は、クメートが存在する場合に転写される。かかる実施形態によれば、タンデムＣｕＯ配列は、目的の核酸配列が後に続くミニマルプロモーターの上流に位置付けられる。クメートの存在下では、ｃＴＡ突然変異体（「ｒｃＴＡ」）は、ＣｕＯ配列に結合し、それにより、ミニマルプロモーターを活性化する。

【０１７２】

一部の実施形態では、誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系は、ラパマイシン誘導性の系である。かかる実施形態によれば、プロモーターは、ラパマイシン誘導性プロモーター（例えば、ミニマルＩＬ－２プロモーター）である。この系では、ＤＮＡ　２５結合ドメイン（ＺＦＨＤ１）及び転写因子活性化ドメイン（ＮＦ－ＫＢｐ６５）は、それぞれＦＫＢＰ１２及びＦＲＡＰ（ｍＴＯＲ）のラパマイシン結合ドメインとの融合タンパク質として、別々に発現される（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋｏｈら、「Ｕｓｅ　ｏｆ　ａ　Ｓｔｒｉｎｇｅｎｔ　Ｄｉｍｅｒｉｚｅｒ－Ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　ＢＭＰ２　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１４（５）：Ｐ６８４～６９１（２００６）を参照されたい）。ラパマイシン（又はラパマイシンアナログＦＫ５０６）の添加により、融合タンパク質は、可逆的に架橋されて、目的の核酸配列の転写を駆動する。ｍＴＯＲ活性化ドメイン融合タンパク質のラパマイシン結合領域の突然変異は、ラパマイシンとは異なり、内因性ｍＴＯＲタンパク質に結合せず、したがって、免疫抑制活性も抗増殖活性もほとんど有さないラパマイシン様化合物（ラパログ（ｒａｐａｌｏｇ））に対して応答性の系を生じる。

【０１７３】

一部の実施形態では、調節配列は、ヒト伸長因子１αプロモーター（「ＥＦ１Ａ」）、５サイトメガロウイルス（「ＣＭＶ」）プロモーター、ヒトユビキチンＣプロモーター（「ＵＢＣ」）、ニワトリベータ－アクチンプロモーター、ハイブリッドニワトリベータ－アクチンプロモーター（ＣＢｈ）及びホスホグリセロキナーゼ（ｐｈｏｓｐｈｏｇｌｙｃｅｒｏｋｉｎａｓｅ）（「ＰＧＫ」）プロモーターを含む。かかる実施形態によれば、プロモーターは、１つ、２つ、３つもしくはそれよりも多くのＴｅｔオペレーター（Ｔｅｔ

Ｏ）部位、又は１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つもしくはそれよりも多くのＣｕＯ部位を含むように改変され得る。

【０１７４】

本発明の発現ベクター中に含めるためのさらなる適切なプロモーターには、Ｈ１プロモーター及びＵ６プロモーターが含まれるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系が、Ｃａｓ系中の１つ又は複数のガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される場合、プロモーターは、Ｈ１プロモーター又はＵ６プロモーターである。Ｈ１プロモーターは、１つ、２つ、３つ又はそれよりも多くのＴｅｔオペレーター（ＴｅｔＯ）部位を含む改変されたＨ１プロモーターであり得る。Ｕ６プロモーターは、１つ、２つもしくは３つのＴｅｔオペレーター（ＴｅｔＯ）部位、又は１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つもしくはそれよりも多くのＣｕＯ部位を含む改変されたＵ６プロモーターであり得る（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｕｎら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｄｒｕｇ－２０ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｆｏｒ Ｌａｒｇｅ－Ｓｃａｌｅ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ」、ＢＭＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ２０：２２５（２０１９）を参照されたい）。

【０１７５】

一部の実施形態では、調節配列は、転写エンハンサー結合部位、ＲＮＡポリメラーゼ開始部位、リボソーム結合部位、及び／又は発現ベクター中の調節配列に作動可能に連結されたヌクレオチド配列の発現を促進する他の部位をさらに含み得る。

【０１７６】

一部の実施形態では、発現ベクターは、成体グリア前駆細胞の集団の若返りを誘導するため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための系をコードする。

【０１７７】

一部の実施形態では、成体グリア前駆細胞の集団の若返りを誘導するため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための系は、ヌクレアーゼデッドＣａｓ（ｄＣａｓ）系である。この系は、エピジェネティックモジュレーターに融合されたヌクレアーゼデッドＣａｓ（ｄＣａｓ）タンパク質を含む融合タンパク質をコードする第１の核酸分子；１つ又は複数のガイドＲＮＡをコードする第２の核酸分子であって、１つ又は複数のガイドＲＮＡが各々、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３のＤＮＡ配列の一部分にハイブリダイズするＲＮＡ配列を含む、第２の核酸分子；並びに第１の核酸分子、第２の核酸分子又はその両方に動作可能に連結された誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系を含む。一部の実施形態では、不活性化Ｃａｓタンパク質（ｄＣａｓ）は、ｄＣａｓ９、ｄＣａｓ１２ａ及びｄＣａｓ１２ｂからなる群から選択される（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｒｅｚｇｉｎら、「Ｄｅａｄ Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ：Ｔｙｐｅｓ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｓｃｉ．２０：６０４１（２０１９）を参照されたい）。

【０１７８】

適切なエピジェネティックモジュレーターは、上に詳細に記載される。一部の実施形態では、エピジェネティックモジュレーターは、ＤＮＭＴ３Ａ、ＤＮＭＴ２Ｌ、ＬＳＤ１、ＫＲＡＢ、ＫＲＡＢ－ＭｅＣＰ２、ＥＺＨ２、ＳＡＬＬ１、ＳＤＳ３、Ｇ９Ａ、Ｓｕｖ３９ｈ１、Ｃｓ及びＷＲＰＷからなる群から選択される（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｙｅｏら、「Ａｎ Ｅｎｈａｎｃｅｄ ＣＲＩＳＰＲ Ｒｅｐｒｅｓｓｏｒ ｆｏｒ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｇｅｎｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ」、１５（８）：６１１～６１６（２０１８）；Ａｌｅｒａｓｏｏｌら、「Ａｎ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ＫＲＡＢ Ｄｏｍａｉｎ ｆｏｒ ＣＲＩＳＰＲｉ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ １７：１０９３～１０９６（２０２０）；及びＤｕｋｅら、「Ａｎ Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＣＲＩＳＰＲ／ｄＣａｓ９ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ Ｔｏｏｌ ｆｏｒ Ｎ

ｅｕｒｏｎａｌ Ｇｅｎｅ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ ２：９（２０２０）を参照されたい）。一部の実施形態では、遺伝子又は遺伝子プロモーターのメチル化が、その転写を抑圧するのに有効である場合、エピジェネティックモジュレーターは、メチルトランスフェラーゼである。

【０１７９】

一部の実施形態では、エピジェネティックモジュレーターは、Ｔｅｔメチルシトシンジオキシゲナーゼ１（「ＴＥＴ１」）、ＳｕｎＴａｇ－ＴＥＴ１、ＭＳ２／ＭＣＰ－ＴＥＴ１、ｐ３００Ｃｏｒｅ、４つのタンデムコピーの単純ヘルペスウイルスタンパク質１６（「ＶＰ６４」）、ＶＰ１６０、ＮＦ－ＫＢ ｐ６５活性化ドメイン（「ｐ６５」）、エプスタイン・バーウイルス由来Ｒトランス活性化因子（「Ｒｔａ」）、ＳｕｎＴａｇ－ＶＰ６４、ＶＰ６４－ｐ６５－Ｒｔａ（「ＶＰＲ」）、ＳｕｎＴａｇ－ｐ６５－ＨＳＦ１、ＴＶ、相乗的活性化メディエーター（「ＳＡＭ」）、増強された発現のための３成分別用途技術（Ｔｈｒｅｅ－Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ Ｒｅｐｕｒｐｏｓｅｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｆｏｒ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）（「ＴＲＥＥ」）、Ｃａｓｉｌｉｏ、Ｓｃａｆｆｏｌｄ及びＣＭＶからなる群から選択される（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｒｅｚｇｉｎら、「Ｄｅａｄ Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ：Ｔｙｐｅｓ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｓｃｉ．２０（２３）：６０４１（２０１９）を参照されたい）。一部の実施形態では、遺伝子又は遺伝子タンパク質の脱メチル化がその転写を抑圧するのに有効である場合、エピジェネティックモジュレーターは、デメチラーゼ（例えば、ＴＥＴ１）である。

【０１８０】

一部の実施形態では、成体グリア前駆細胞の集団における若返りを誘導するため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための系は、ｄＣａｓがメチルトランスフェラーゼに融合されている、ｄＣａｓ融合タンパク質を含む。任意の実施形態では、成体グリア前駆細胞の集団における若返りを誘導するため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための系は、ｄＣａｓがデメチラーゼに融合されている、ｄＣａｓ融合タンパク質を含む。

【０１８１】

本発明の方法に従う使用のための［例示的なｄＣａｓ融合タンパク質及びｄＣａｓ融合タンパク質系は、以下の表９で同定される。

【０１８２】

【表９】

例示的なCas融合タンパク質

dCas9-TET1	Liu et al., “Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome," *Cell* 167:233-247 (2016)
dCas9-SunTag-TET1	Morita et al., “Targeted DNA Demethylation in vivo using dCas9-Peptide Repeat and scFv-TET1 Catalytic Domain Fusions," *Nat. Biotechnol.* 34:1060-1065 (2016)
dCas9-MS2/MCP-TET1	Xu et al., “A CRISPR-Based Approach for Targeted DNA Demethylation," *Cell Discov.* 2:16009 (2016)
dCas9-P300 Core	Hilton et al., “Epigenome Editing by a CRISPR/Cas9-Based Acetyltransferase Activates Genes from Promoter and Enhancers," *Nat. Biotechnol.* 33(5):510-517 (2015)
dCas9-VP64	Gilbert et al., “CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes," *Cell* 154:442-451 (2013)
dCas9-VP160	Cheng et al., “Multiplexed Activators of Endogenous Genes by CRISPR-on, an RNA-Guided Transcriptional Activator System," *Cell Res.* 23:1163 (2013)
dCas9-p65	Gilbert et al., “CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes," *Cell* 154:442-451 (2013)
dCas9-VPR	Chavez et al., “Highly Efficient Cas9-Mediated Transcriptional Programming," *Nat. Methods.* 12:326 (2015)
dCas9 SAM系	Konermann et al., “Genome-Scale Transcriptional Activation by an Engineered CRISPR-Cas9 Complex," *Nature* 517(7536):583-588 (2015)
dCas9 TREE系	Kunii et al., “Three-Component Repurposed Technology for Enhanced Expression: Highly Accumulable Transcriptional Activators via Branched Tag Arrays," *CRISPR J.* 1(5):337-347 (2018)
dCas9-TV (*即ち*、dCas9-6TAL-VP128)	Li et al., “A potent Cas9-Derived Gene Activator for Plant and Mammalian Cells," *Nat. Plants.* 3:930-936 (2017)

dCas12a-VPR	Liu et al., “Engineering Cell Signaling Using Tunable CRISPR-Cpf1-Based Transcription Factors," *Nat. Commun.* 8:2095 (2017)
dCas12a-p65	Tak et al., “Inducible and Multiplex Gene Regulation Using CRISPR-Cpf1-Based Transcription Factors," *Nat. Methods* 14:1163-1166 (2017)

*その各々は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【０１８３】
一部の実施形態では、ｄＣａｓタンパク質は、ｄＣａｓ９又はｄＣａｓ１２タンパク質である。
【０１８４】
一部の実施形態では、このｄＣａｓ系の第１及び第２の核酸分子は、単一の発現ベクター中に含有される。一部の実施形態では、この系の第１及び第２の核酸分子は、別々の発現ベクター中に含有される。
【０１８５】
一部の実施形態では、成体グリア前駆細胞の集団の若返りを誘導するため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための系は、Ｃａｓ系である。この系は、Ｃａｓタンパク質をコードする第１の核酸分子；１つ又は複数のガイドＲＮＡをコードする第２の核酸分子であって、当該１つ又は複数のガイドＲＮＡが各々、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３のＤＮＡ配列の一部分にハイブリダイズするＲＮＡ配列を含む、第２の核酸分子；並びに第１の核酸分子、第２の核酸分子又はその両方に動作可能に連結された誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系を含む。
【０１８６】
一部の実施形態では、このＣａｓヌクレアーゼ系は、Ｃａｓ９タンパク質又はＣａｓ１２タンパク質（例えば、Ｃａｓ１２ａ又はＣａｓ１２ｂ）を含む。本開示に従う系に含めるための適切なＣａｓタンパク質及びその誘導体は、当該分野で周知であり、上により詳細に記載される。
【０１８７】
一部の実施形態では、このＣａｓヌクレアーゼ系の第１及び第２の核酸分子は、単一の発現ベクター中に含有される。一部の実施形態では、第１及び第２の核酸分子は、別々の発現ベクター中に含有される。
【０１８８】
一部の実施形態では、成体グリア前駆細胞の集団の若返りを誘導するため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための系は、遺伝子編集ヌクレアーゼ系である。この系は、以下を含む：第１のＤＮＡ結合モチーフを含む第１の配列特異的遺伝子編集ヌクレアーゼをコードする第１の核酸分子であって、第１のＤＮＡ結合モチーフが、それぞれＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の第１のＤＮＡ配列に結合する、第１の核酸分子；第２のＤＮＡ結合モチーフを含む第２の配列特異的遺伝子編集ヌクレアーゼをコードする第２の核酸分子であって、当該第２のＤＮＡ結合モチーフが、それぞれＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、Ｅ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３及び／又はＳＴＡＴ３の第２のＤＮＡ配列に結合する、第２の核酸分子；並びに第１の核酸分子、第２の核酸分子、又は第１及び第２の核酸分子の両方に動作可能にカップリングされた誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系配列。
【０１８９】
本開示に従う系に含めるための適切な配列特異的遺伝子編集ヌクレアーゼは、当該分野

で周知であり、限定なしに、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（「ＺＦＮ」）及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（「ＴＡＬＥＮ」）が含まれる。

【０１９０】

一実施形態では、本明細書で記載される系の配列特異的遺伝子編集ヌクレアーゼは、ＺＦＮである。ＺＦＮは、ヌクレアーゼドメイン（例えば、ＦｏｋＩ制限酵素の切断ドメイン）に融合された少なくとも１つのジンクフィンガーモチーフ（例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ又は５つのジンクフィンガーモチーフ）を含む人工的エンドヌクレアーゼである。標的核酸配列における２つの個々のＺＦＮのヘテロダイマー化は、標的配列の切断を生じ得る。例えば、２つの個々のＺＦＮは、標的ＤＮＡ配列の対向する鎖に結合して、標的核酸配列中に二本鎖切断を誘導し得る。本開示の系に含めるための適切なＺＦＮを設計する方法は、当該分野で周知である（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｕｒｎｏｖら、「Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ ｗｉｔｈ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｚｉｎｃ Ｆｉｎｇｅｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ」、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．１１（９）：６３６～６４６（２０１０）；Ｇａｊら、「Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｇｅｎｅ Ｋｎｏｃｋｏｕｔ ｂｙ Ｄｉｒｅｃｔ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｚｉｎｃ－Ｆｉｎｇｅｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」、Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ９（８）：８０５～８０７（２０１２）；米国特許第６，５３４，２６１号；米国特許第６，６０７，８８２号；米国特許第６，７４６，８３８号；米国特許第６，７９４，１３６号；米国特許第６，８２４，９７８号；米国特許第６，８６６，９９７号；米国特許第６，９３３，１１３号；米国特許第６，９７９，５３９号；米国特許第７，０１３，２１９号；米国特許第７，０３０，２１５号；米国特許第７，２２０，７１９号；米国特許第７，２４１，５７３号；米国特許第７，２４１，５７４号；米国特許第７，５８５，８４９号；米国特許第７，５９５，３７６号；米国特許第６，９０３，１８５号；及び米国特許第６，４７９，６２６号を参照されたい）。一部の実施形態では、第１及び第２の遺伝子編集ヌクレアーゼは、ＦｏｋＩヌクレアーゼである。かかる実施形態によれば、第１及び第２のＤＮＡ結合モチーフは、ジンクフィンガーモチーフである。

【０１９１】

一部の実施形態では、本明細書で記載される系の配列特異的遺伝子編集ヌクレアーゼは、ＴＡＬＥＮである。ＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ結合ドメイン及びヌクレアーゼドメイン（例えば、ＦｏｋＩ制限酵素の切断ドメイン）を含む、操作された転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼである。ＤＮＡ結合ドメインは、各々が単一塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸のリピートドメインを含む。標的核酸配列における２つの個々のＴＡＬＥＮのヘテロダイマー化は、標的配列の切断を生じ得る。例えば、２つの個々のＴＡＬＥＮは、標的ＤＮＡ配列の対向する鎖に結合して、標的核酸配列中に二本鎖切断を誘導し得る。本開示の系に含めるための適切なＺＦＮを設計する方法は、当該分野で周知である（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｓｃｈａｒｅｎｂｅｒｇら、「Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｗｉｔｈ ＴＡＬ－Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ａｎｄ Ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ Ｍｏｄｕｌａｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ」、Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１３（４）：２９１～３０３（２０１３）；Ｇａｊら、「Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｇｅｎｅ Ｋｎｏｃｋｏｕｔ ｂｙ Ｄｉｒｅｃｔ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｚｉｎｃ－Ｆｉｎｇｅｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ」、Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ９（８）：８０５～８０７（２０１２）；Ｂｅｕｒｄｅｌｅｙら、「Ｃｏｍｐａｃｔ Ｄｅｓｉｇｎｅｒ ＴＡＬＥＮｓ ｆｏｒ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ」、Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．４：１７６２（２０１３）；米国特許第８，４４０，４３１号；米国特許第８，４４０，４３２号；米国特許第８，４５０，４７１号；米国特許第８，５８６，３６３号；及び米国特許第８，６９７，８５３号を参照されたい）。一部の実施形態では、第１及び第２の遺伝子編集ヌクレアーゼは、ＦｏｋＩヌクレアーゼである。かかる実施形態によれば、第１及び第２のＤＮＡ結合モチーフは、ＴＡＬＥモチーフである。

【０１９２】

一部の実施形態では、本明細書で記載される配列特異的遺伝子編集ヌクレアーゼ系の第１及び第２の核酸分子は、単一の発現ベクター中に含有される。一部の実施形態では、第１及び第２の核酸分子は、別々の発現ベクター中に含有される。

【０１９３】

グリア前駆細胞を若返らせるため又は対象においてミエリン欠乏症を処置するための本明細書で記載される全ての系において、この系の第１及び／又は第２の核酸分子は、上により詳細に記載されるように、誘導性プロモーター及び／又はオペレーター系に動作可能にカップリングされる。

【０１９４】

一部の実施形態では、本出願の発現ベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター又は細菌ベクターである。

【０１９５】

一部の実施形態では、本出願の発現ベクターは、レンチウイルスベクターである（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｆａｎｇらに対する米国特許第７４８，５２９号；Ｕｒａら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒ－Ｂａｓｅｄ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」、Ｖａｃｃｉｎｅｓ ２：６２４～６４１（２０１４）；及びＨｕら、「Ｉｍｍｕｎｉｚａｔｉｏｎ Ｄｅｌｉｖｅｒｅｄ ｂｙ Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ ａｎｄ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ Ｄｉｓｅａｓｅｓ」、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．２３９：４５～６１（２０１１）、１５を参照されたい）。

【０１９６】

一部の実施形態では、本出願の発現ベクターは、レトロウイルスベクター（例えば、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｆａｎｇらに対する米国特許第７４８，５２９号及びＵｒａら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒ－Ｂａｓｅｄ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」、Ｖａｃｃｉｎｅｓ ２：６２４～６４１（２０１４）を参照されたい）、ワクシニアウイルス、複製欠損アデノウイルスベクター及びガットレス（ｇｕｔｌｅｓｓ）アデノウイルスベクター（例えば、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，８７２，００５号を参照されたい）である。

【０１９７】

他の実施形態では、本出願の発現ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである（例えば、その各々の全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｋｒａｕｓｅら、「Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ａｎｔｉｇｅｎｓ ｂｙ Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ」、Ｔｈｅｒ．Ｄｅｌｉｖ．２（１）：５１～７０（２０１１）；Ｕｒａら、「Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒ－Ｂａｓｅｄ Ｖａｃｃｉｎｅｓ」、Ｖａｃｃｉｎｅｓ ２：６２４～６４１（２０１４）；Ｂｕｎｉｎｇら、「Ｒｅｃｅｎｔ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｖｉｒｕｓ Ｖｅｃｔｏｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」、Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．１０：７１７～７３３（２００８）を参照されたい）。

【０１９８】

ベクターとしての使用に適切なウイルス発現ベクターを生成及び単離するための方法は、当該分野で公知である（例えば、その各々の全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｕｌｃｈａら、「Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒ Ｐｌａｔｆｏｒｍｓ ｗｉｔｈｉｎ ｔｈｅ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｌａｎｄｓｃａｐｅ」、Ｎａｔｕｒｅ ６：５３（２０２１）；Ｂｏｕａｒｄら、「Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ｆｒｏｍ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ｔｏ Ｔｒａｎｓｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１５７（２）：１５３～１６５（２００９）；Ｇｒｉｅｇｅｒ及びＳａｍｕｌｓｋｉ、「Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｖｉｒｕｓ ａｓ ａ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｖｅｃｔｏｒ：Ｖｅｃｔｏｒ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」、Ａｄｖ．Ｂｉｏｃ

ｈｅｍ．Ｅｎｇｉｎ／Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９９：１１９～１４５（２００５）；Ｂｕｎｉｎｇら、「Ｒｅｃｅｎｔ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｖｉｒｕｓ Ｖｅｃｔｏｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ」、Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．１０：７１７～７３３（２００８）を参照されたい）。

【０１９９】

Ｖ．遺伝子改変されたグリア前駆細胞

本発明の態様はまた、本発明の発現ベクター又は核酸分子で遺伝子改変されたグリア前駆細胞に関する。一部の実施形態では、発現ベクター又は核酸分子は、遺伝子改変されたグリア前駆細胞のゲノム中に組み込まれる。一部の実施形態では、発現ベクター又は核酸分子は、遺伝子改変されたグリア前駆細胞中に染色体外（ｅｐｉｃｈｒｏｍｏｓｏｍａｌ）形態で存在する。

【０２００】

一部の実施形態では、グリア前駆細胞は、本出願に従うヌクレアーゼデッドＣａｓ（ｄＣａｓ）系、ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ系又は遺伝子編集ヌクレアーゼ系で遺伝子改変される。

【０２０１】

一部の実施形態では、遺伝子改変されたグリア前駆細胞は、哺乳動物グリア前駆細胞である。任意の実施形態では、遺伝子改変されたグリア前駆細胞は、ヒトグリア前駆細胞である。

【０２０２】

本明細書に記載される遺伝子改変に適切なグリア前駆細胞は、当該分野で公知の又は本明細書で記載される方法を使用して、多分化能性細胞（例えば、神経幹細胞）又は多能性細胞（例えば、胚性幹細胞及び誘導多能性幹細胞）から誘導され得る。さらに別の実施形態では、グリア前駆細胞は、それらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｇｏｌｄｍａｎに対する米国特許出願公開第２００４００２９２６９号及び同第２００３０２２３９７２号に記載されるように、プロモーター特異的分離技法を使用することによって直接、細胞の混合集団を含有する胚性組織、胎児組織又は成体脳組織から抽出され得る。この実施形態によれば、グリア前駆細胞は、脳の脳室もしくは脳室下ゾーンから又は皮質下白質から単離される。

【０２０３】

一部の実施形態では、遺伝子改変されたグリア前駆細胞は、遺伝子改変された二分化能性グリア前駆細胞である。一部の実施形態では、遺伝子改変されたグリア前駆細胞は、遺伝子改変された、オリゴデンドロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞である。一部の実施形態では、遺伝子改変されたグリア前駆細胞は、遺伝子改変された、アストロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞である。

【０２０４】

一部の実施形態では、本明細書で記載される発現ベクター又は系を含有するように改変されたグリア前駆細胞の濃度及び／又は純度を増加させるために、遺伝子改変の前又は後に、グリア前駆細胞を含む細胞調製物を富化することが好まれ得る。したがって、一実施形態では、発生又は分化プロセスの初期にグリア前駆細胞上に存在するガングリオシドを認識しそれに結合するＡ２Ｂ５モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、細胞の混合集団からグリア前駆細胞を分離するために利用される（その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｎｕｎｅｓら、「Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｕｌｔｉｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ｎｅｕｒａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ Ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ｓｕｂｃｏｒｔｉｃａｌ Ｗｈｉｔｅ Ｍａｔｔｅｒ ｏｆ ｔｈｅ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｂｒａｉｎ．」、Ｎａｔ Ｍｅｄ．９（４）：４３９～４７（２００３））。Ａ２Ｂ５ｍＡｂを使用して、グリア前駆細胞は、細胞型の混合集団から分離、富化又は精製され得る。別の実施形態では、ＣＤ１４０α／ＰＤＧＦＲα陽性細胞の選択が、二分化能性グリア前駆細胞の精製又は富化された調製物を産生するために使用される。別の実施形態では、ＣＤ９陽性細胞の選択が、オリゴデンドロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞の精製又は富化された調製物を産生するために使

用される。さらに別の実施形態では、ＣＤ１４０α／ＰＤＧＦＲα及びＣＤ９陽性細胞選択の両方が、オリゴデンドロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞の精製又は富化された調製物を産生するために使用される。別の実施形態では、ＣＤ４４陽性細胞の選択が、アストロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞の精製又は富化された調製物を産生するために使用される（その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる、Ｌｉｕら、「ＣＤ４４ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ Ａｓｔｒｏｃｙｔｅ－Ｒｅｓｔｒｉｃｔｅｄ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２７６（１）：３１～４６（２００４））。別の実施形態では、ＣＤ１４０α／ＰＤＧＦＲα及びＣＤ４４陽性細胞選択の両方が、オリゴデンドロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞の精製又は富化された調製物を産生するために使用される。別の実施形態では、ＣＤ１４０α／ＰＤＧＦＲα、ＣＤ９及びＣＤ４４陽性細胞選択は、オリゴデンドロサイトに向けて分化が偏ったグリア前駆細胞の精製又は富化された調製物を産生するために使用される。

【０２０５】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う遺伝子構築物を発現するグリア前駆細胞の調製物に関する。

【０２０６】

以下の実施例は、本開示の実施形態の実施を例示することを意図するが、その範囲を限定することは決して意図しない。

【実施例】

【０２０７】

物質及び方法

細胞系

ヒトｉＰＳＣ系Ｃ２７を使用してｈＧＰＣを生成し、ｈＧＰＣにて目的の予測転写物を検証した。Ｃ２７系は雄である。細胞を、ヒトｉＰＳＣ由来ＧＰＣ産生について詳述されているようにＧＰＣへと分化させた（Ｃｈａｍｂｅｒｓら、「Ｈｉｇｈｌｙ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｎｅｕｒａｌ Ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ ＥＳ ａｎｄ ｉＰＳ Ｃｅｌｌｓ ｂｙ Ｄｕａｌ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ＳＭＡＤ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ」、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２７巻：２７５～２８０頁（２００９年）。この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０８】

細胞単離のための成体脳処理及び胎児脳処理

ヒト脳試料は、ロチェスター大学ストロング記念病院にて同意を得た患者から、施設内審査委員会承認のプロトコールに基づいて得た。脳組織は、正常ＧＷ１８～２４皮質及び／又はＶＺ／ＳＶＺ解剖又は成体白質／皮質てんかん切除から得た（ｍＲＮＡの場合は、１８Ｆ、１９Ｍ、及び２７Ｆ歳、ｍｉＲＮＡの場合は、８Ｍ、２０Ｆ、４３Ｍ、及び５４Ｆ歳）。胎児ＧＰＣ入手、Ａ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－細胞の解離及び免疫磁気選別は記載の通りだった（Ｗｉｎｄｒｅｍら、「Ｆｅｔａｌ ａｎｄ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｅ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ｔｈｅ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌｌｙ Ｄｙｓｍｙｅｌｉｎａｔｅｄ Ｂｒａｉｎ」、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１０巻：９３～９７頁（２００４年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。二重免疫磁気選別戦略を使用してＧＰＣを解離組織から単離した。マイクロビーズタグ付きラット抗マウスＩｇＭ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して、マウス抗ＰＳＡ－ＮＣＡＭ＋（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＤＳＨＢ）細胞を枯渇させ、次いで記載のように、ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－プールからＡ２Ｂ５＋（クローン１０５；ＡＴＣＣ、マナッサス、バージニア州）を選択した（Ｗｉｎｄｒｅｍら、「Ｆｅｔａｌ ａｎｄ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｅｓ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ｔｈｅ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌｌｙ Ｄｙｓｍｙｅｌｉｎａｔｅｄ Ｂｒａｉｎ」、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１０巻：９３～９７頁（２００４年）及びＷｉｎｄｒｅｍら、

「Ｎｅｏｎａｔａｌ Ｃｈｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｈｕｍａｎ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ ｃａｎ ｂｏｔｈ Ｒｅｍｙｅｌｉｎａｔｅ ａｎｄ Ｒｅｓｃｕｅ ｔｈｅ Ｏｔｈｅｒｗｉｓｅ Ｌｅｔｈａｌｌｙ Ｈｙｐｏｍｙｅｌｉｎａｔｅｄ Ｓｈｉｖｅｒｅｒ Ｍｏｕｓｅ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２巻：５５３～５６５頁（２００８年）。こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。選別後、細胞を１０ｎｇ／ｍｌ ｂＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍｌ ＰＤＧＦ－ＡＡを有するＤＭＥＭ－Ｆ１２／Ｎ１中で１～１４日間維持した。代替的に、ＣＤ１４０ａ／ＰＤＧＦαＲにより規定されるＧＰＣを単離し、以前に記載のようにＭＡＣＳを使用して選別して（Ｓｉｍら、「ＣＤ１４０ａ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ ａ Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｉｇｈｌｙ Ｍｙｅｌｉｎｏｇｅｎｉｃ，Ｍｉｇｒａｔｉｏｎ－Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ａｎｄ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔｌｙ Ｅｎｇｒａｆｔｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２９巻：９３４～９４１頁（２０１１年ｂ）、この文献は、その全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、ＣＤ１４０＋グリア前駆細胞の富化集団を得た。

【０２０９】

バルクＲＮＡ配列決定

Ｑｉａｇｅｎ ＲＮｅａｓｙキットによりＲＮＡを単離物から精製し、バルクＲＮＡ配列決定ライブラリーを構築した。試料は、ロチェスター大学ゲノミクス研究センターのＩｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ２５００で詳細に配列決定された。生ＦＡＳＴＱファイルをトリミングし、ｆａｓｔｐを使用してアダプターを除去し（Ｃｈｅｎら、「ｆａｓｔｐ：Ａｎ Ｕｌｔｒａ－ｆａｓｔ Ａｌｌ－ｉｎ－ｏｎｅ ＦＡＳＴＱ Ｐｒｅｐｒｏｃｅｓｓｏｒ」、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３４巻：ｉ８８４～ｉ８９０頁（２０１８年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、全試料にわたって２パスモードのＳＴＡＲによりＥｎｓｅｍｂｌ９５遺伝子注釈を使用してＧＲＣｈ３８にアラインさせ（Ｄｏｂｉｎら、「ＳＴＡＲ：Ｕｌｔｒａｆａｓｔ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＲＮＡ－ｓｅｑ Ａｌｉｇｎｅｒ、「Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２９巻：１５～２１頁（２０１３年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、ＲＳＥＭバージョンで定量化した（Ｌｉ及びＤｅｗｅｙ、「ＲＳＥＭ：Ａｃｃｕｒａｔｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｆｒｏｍ ＲＮＡ－Ｓｅｑ Ｄａｔａ Ｗｉｔｈ ｏｒ Ｗｉｔｈｏｕｔ ａ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｇｅｎｏｍｅ」、ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ １２巻：３２３頁（２０１１年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。その後の分析をＲで実施し（Ｒ Ｃｏｒｅ Ｔｅａｍ Ｒ：Ａ Ｌａｎｇｕａｇｅ ａｎｄ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ ｆｏｒ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ．（ウィーン、オーストリア：Ｒ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ）（２０１７年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、この場合、ＲＳＥＭ遺伝子レベルの結果をｔｘｉｍｐｏｒｔでインポートした（Ｓｏｎｅｓｏｎら、「Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ａｎａｌｙｓｅｓ ｆｏｒ ＲＮＡ－ｓｅｑ：Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ－Ｌｅｖｅｌ Ｅｓｔｉｍａｔｅｓ Ｉｍｐｒｏｖｅ Ｇｅｎｅ－Ｌｅｖｅｌ Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅｓ，」 Ｆ１０００Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４巻：１５２１頁（２０１５年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。ＤＥ分析をＤＥＳｅｑ２で実施し（Ｌｏｖｅら、「Ｍｏｄｅｒａｔｅｄ Ｅｓｔｉｍａｔｉｏｎ ｏｆ Ｆｏｌｄ Ｃｈａｎｇｅ ａｎｄ Ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ ｆｏｒ ＲＮＡ－ｓｅｑ Ｄａｔａ Ｗｉｔｈ ＤＥＳｅｑ２」、Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ １５：５５０巻（２０１４年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、この場合、ペア分析（胎児Ａ２Ｂ５＋対ＣＤ１４０ａ＋、胎児ＣＤ１４０ａ＋対ＣＤ１４０ａ－）ではペア情報をそれらのモデルに追加した。成体対胎児ＤＥ分析では、年齢を選別マーカー（ＣＤ１４０ａ－試料は含まれていなかった）と連結させてグループ変数を定義し、また、技術的ばらつきを考慮するために配列決

定バッチをモデルに追加した。調整済みｐ値＜０．０１及び絶対Ｌｏｇ２　変化倍率＞１を有する遺伝子を、有意であるとみなした。次いで、こうしたデータを、少なくとも１つのグループでＴＰＭ中央値が１である（ＲＳＥＭにより計算）と規定した意味のある存在量によりさらにフィルタリングした（２０，６６３個の遺伝子がＤＥ前にこの基準を満たしていた）。

【０２１０】

ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ分析

胎児脳試料を、単一細胞が、ＣＤ１４０ａ＋表面発現又はＰＳＡ－ＮＣＡＭ－／Ａ２Ｂ５＋表面発現のいずれかでＦＡＣＳにより選別されるまで、バルクｒｎａ－ｓｅｑのために上記のように処理した。次いで、単一細胞を、Ｖ２化学を使用して１０Ｘ　ｇｅｎｏｍｉｃｓクロムコントローラーで捕捉し、製造業者の説明書に従ってライブラリーを生成した。

【０２１１】

試料を、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨＩＳｅｑ２５００システムで配列決定した。次いで、多重分離された試料を、Ｃｅｌｌ　Ｒａｎｇｅｒを使用して、タンパク質をコードするｌｎｃＲＮＡ又はｍｉＲＮＡバイオタイプのみを使用して、ＧＲＣｈ３８及びＥｎｓｅｍｂｌ９５遺伝子注釈から生成されたインデックスに対してアライン及び定量化した。ｓｃＲＮＡ－Ｓｅｑ試料の分析は、Ｒ内のＳｅｕｒａｔ（Ｂｕｔｌｅｒら、「Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ　Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｉｃ　Ｄａｔａ　Ａｃｒｏｓｓ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ　Ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｓ，　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，ａｎｄ　Ｓｐｅｃｉｅｓ」、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３６巻：４１１～４２０頁（２０１８年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）により実施した。両試料をマージし、ミトコンドリア遺伝子発現が１５％よりも多いか、又は固有遺伝子が５００個よりも少ないと規定される低品質細胞をフィルタリングして除外した。次いで、ＵＭＩの総数、ミトコンドリア遺伝子含有量パーセント、又は各細胞のＳ期スコア及びＧ２Ｍ期スコアの差による寄与を、回帰により除去するように注意しながら、ＳＣＴｒａｎｓｆｏｒｍを使用して試料を正規化した。次いで、ＰＣＡを計算し、ｎ．ｎｅｉｇｈｂｏｒｓ＝６０及びｒｅｐｕｌｓｉｏｎ．ｓｔｒｅｎｇｔｈ＝０．８で最初の３０次元を使用してＵＭＡＰを実行した。次いで、ＦｉｎｄＮｅｉｇｈｂｏｒｓを実行し、続いて解像度を０．３５に設定してＦｉｎｄＣｌｕｓｔｅｒｓを実行した。各クラスターの発現プロファイルに基づいて、一部の類似したクラスターをより広範な細胞タイプクラスターにマージした。クラスターの静的差次的発現を、ＭＡＳＴ試験（Ｆｉｎａｋら、「ＭＡＳＴ：Ａ　Ｆｌｅｘｉｂｌｅ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ　Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　ｆｏｒ　Ａｓｓｅｓｓｉｎｇ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　Ｃｈａｎｇｅｓ　ａｎｄ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚｉｎｇ　Ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ　ｉｎ　Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ　ＲＮＡ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｄａｔａ」、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１６巻：２７８頁（２０１５年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）を使用して計算し、＜０．０１の調整済みｐ値及び＞０．５の絶対Ｌｏｇ２変化倍率を有意であるとみなした。活性転写因子レギュロンの予測は、ｈｔｔｐｓ：／／ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ．ａｅｒｔｓｌａｂ．ｏｒｇ／ｃｉｓｔａｒｇｅｔ／．にあるｈｇ３８データベースを使用して、ＲのＳＣＥＮＩＣパッケージを用いて実施した（Ａｉｂａｒら、「ＳＣＥＮＩＣ：Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ　Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｎｅｔｗｏｒｋ　Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ」、Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１４巻：１０８３～１０８６頁（２０１７年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。遺伝子は、少なくとも１％の細胞で発現された場合、共発現分析に含めた。

【０２１２】

Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙパスウエイ解析及びネットワーク構築

差次的に発現された遺伝子を、Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙパスウエイ解析（Ｑｉａｇｅｎ）に入力して、有意な標準的、機能的、及び上流のシグナル伝達タームを決定した。ＩＰＡネ

ットワークを構築するために、タームを、０．００１を下回る調整済みｐ値でフィルタリングした。ｉＧｒａｐｈパッケージ（Ｃｓａｒｄｉ，ＧＮ，Ｔａｍａｓ「Ｔｈｅ Ｉｇｒａｐｈ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｆｏｒ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｎｅｔｗｏｒｋ Ｒｅｓｅａｒｃｈ」、ＩｎｔｅｒＪｏｕｒｎａｌ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｓｙｓｔｅｍｓ １６９５（２００６年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）を使用して、無関連ＩＰＡタームを、ジャッカード類似性インデックスにより評価した高度に冗長な機能的タームと共に削除した。モジュール性をＧｅｐｈｉ内で確立し（Ｂａｓｔｉａｎら、「Ｇｅｐｈｉ：Ａｎ Ｏｐｅｎ Ｓｏｕｒｃｅ Ｓｏｆｔｗａｒｅ ｆｏｒ Ｅｘｐｌｏｒｉｎｇ ａｎｄ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ Ｎｅｔｗｏｒｋｓ」、（２００９年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、それにより最終的なネットワークをＣｙｔｏｓｃａｐｅを使用して可視化した（Ｓｈａｎｎｏｎ Ｐ．、「Ｃｙｔｏｓｃａｐｅ： Ａ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ ｆｏｒ Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ Ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ Ｎｅｔｗｏｒｋｓ」、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ １３巻：２４９８～２５０４頁（２００３年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。目的の遺伝子及びタームを、視覚化のために保持した。モジュールを相互に分割し、ｙＦｉｌｅｓ有機レイアウトを使用して整理した。

【０２１３】

転写因子活性の推定

成体富化遺伝子リスト及び胎児富化遺伝子リストを別々にＲｃｉｓＴａｒｇｅｔに入力して（Ａｉｂａｒら、「ＳＣＥＮＩＣ： Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｎｅｔｗｏｒｋ Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ａｎｄ Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ」、Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４巻：１０８３～１０８６頁（２０１７年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、遺伝子のプロモーター付近のウィンドウ（５００ｂｐ上流／１００ｂｐ下流並びに１０ｋｂ上流及び１０ｋｂ下流）におけるモチーフの過剰発現を同定した。次いで、有意に富化されたモチーフ（ＮＥＳ＞３）に関連付けられた転写因子を、入力遺伝子リストの有意な差次的発現によりフィルタリングした。各ウィンドウ及び遺伝子リスト内には、適切なＴＦ遺伝子相互作用（遺伝子を下方制御するリプレッサー及び遺伝子を上方制御する活性化因子）のみを保持した。次いで、スキャンウィンドウをマージして、予測胎児／成体リプレッサー／活性化因子のＴＦ遺伝子エッジリストを作成した。目的のＴＦは、文献で主に活性化因子又はリプレッサーとしてのみ報告されているものに絞り込んだ。

【０２１４】

ｍｉＲＮＡマイクロアレイ解析

Ａ２Ｂ５＋成体（ｎ＝３）細胞懸濁物及びＣＤ１４０ａ＋胎児（ｎ＝４）細胞懸濁物を上記のようにＭＡＣＳで単離し、製造業者の使用説明書（ＱＩＡＧＥＮ）に従ってｍｉＲＮｅａｓｙキットを使用してそれらのｍｉＲＮＡを単離した。次いで、精製ｍｉＲＮＡを、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＣｈｉｐ ｍｉＲＮＡ３．０アレイで標準的プロトコールによる指示に従って調製及びプロファイリングした。次いで、生ＣＥＬファイルをオリゴ（Ｃａｒｖａｌｈｏ及びＩｒｉｚａｒｒｙ、「Ａ Ｆｒａｍｅｗｏｒｋ ｆｏｒ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｐｒｅｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ」、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２６巻：２３６３～２３６７頁（２０１０年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）パッケージでＲに読み込み、試料を、ロバストなマルチアレイ平均化（ＲＭＡ）で正規化した。次に、プローブを、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ注釈に従ってヒトｍｉＲＮＡのみについてフィルタリングし、差次的発現をｌｉｍｍａで実施し（Ｒｉｔｃｈｉｅら、「Ｌｉｍｍａ Ｐｏｗｅｒｓ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｎａｌｙｓｅｓ ｆｏｒ ＲＮＡ－Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ａｎｄ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｓｔｕｄｉｅｓ」、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４３巻：ｅ４７頁（２０１５年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、有意性を調整済みｐ値＜０．０１で確立

した。最後に、ｍｉＲＮＡｔａｐ（Ｐａｊａｋ Ｍ．、「ｍｉＲＮＡｔａｐ： ｍｉＲＮＡｔａｐ： ｍｉｃｒｏＲＮＡ Ｔａｒｇｅｔｓ－Ａｇｇｒｅｇａｔｅｄ Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎｓ」、Ｒ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ １．２２．０（２０２０年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）を使用し、ｍｉｎ＿ｓｒｃを２に設定し、方法を「ｇｅｏｍ」に設定して、５つの独立したｍｉＲＮＡ予測データベースにわたって差次的発現ｍｉＲＮＡを調査した。ｍｉＲＮＡの転写因子調節は、ＴｒａｓｍｉＲ Ｖ２．０データベースをクエリーすることにより実施した（Ｔｏｎｇら、「ＴｒａｎｓｍｉＲ ｖ２．０： Ａｎ Ｕｐｄａｔｅｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｆａｃｔｏｒ－ｍｉｃｒｏＲＮＡ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ Ｄａｔａｂａｓｅ」、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４７巻：Ｄ２５３～Ｄ２５８頁（２０１９年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２１５】

探索的解析及び視覚化

バルクＲＮＡ－Ｓｅｑ試料又はマイクロアレイ試料のＰＣＡは、ＤＥＳｅｑ２オブジェクトの分散安定化値の初期設定を用いてｐｒｃｏｍｐで計算した。ＰＣＡを、ｇｇｆｏｒｔｉｆｙパッケージのａｕｔｏｐｌｏｔでプロットした。ＥｎｈａｎｃｅｄＶｏｌｃａｎｏを使用して火山プロットを生成した。グラフを、ｇｇｐｌｏｔ２を使用してさらに編集又は新たに生成し、ｐａｔｃｈｗｏｒｋを使用してアラインした。

【０２１６】

ヒトｉＰＳＣ由来ＧＰＣ産生

ヒト誘導多能性幹細胞（Ｃ２７（Ｃｈａｍｂｅｒｓら、「Ｈｉｇｈｌｙ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｎｅｕｒａｌ Ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ ＥＳ ａｎｄ ｉＰＳ Ｃｅｌｌｓ ｂｙ Ｄｕａｌ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ＳＭＡＤ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ」、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２７巻：２７５～２８０頁（２００９年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる））を、本発明者らの以前に記載のプロトコールを使用してＧＰＣへと分化させた（Ｏｓｉｐｏｖｉｔｃｈら、「Ｈｕｍａｎ ＥＳＣ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｏｄｅｌｓ ｏｆ Ｈｕｎｔｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｒｅｖｅａｌ Ｃｅｌｌ－Ｉｎｔｒｉｎｓｉｃ Ｄｅｆｅｃｔｓ ｉｎ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２４巻：１０７－１２２ｅ１０７（２０１９年）；Ｗａｎｇら、「Ｈｕｍａｎ ｉＰＳＣ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ Ｃａｎ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ａｎｄ Ｒｅｓｃｕｅ ａ Ｍｏｕｓｅ Ｍｏｄｅｌ ｏｆ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌ Ｈｙｐｏｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １２巻：２５２～２６４頁（２０１３年）；及びＷｉｎｄｒｅｍら、「Ｈｕｍａｎ ｉＰＳＣ Ｇｌｉａｌ Ｍｏｕｓｅ Ｃｈｉｍｅｒａｓ Ｒｅｖｅａｌ Ｇｌｉａｌ Ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｉｏｎｓ ｔｏ Ｓｃｈｉｚｏｐｈｒｅｎｉａ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２１巻：１９５－２０８．ｅ１９６（２０１７年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。簡単に説明すると、細胞を、まず神経上皮細胞へと、次いでプレＧＰＣへと、最終的にはＧＰＣへと分化させた。ＧＰＣを、Ｔ３、ＮＴ３、ＩＧＦ１、及びＰＤＧＦ－ＡＡで補完したグリア培地で維持した。

【０２１７】

レンチウイルス過剰発現

Ｅ２Ｆ６、ＺＮＦ２７４、ＩＫＺＦ３、又はＭＡＸの過剰発現について、本発明者らは、まず、こうした遺伝子の各々の最も存在量の多いタンパク質コード転写物を成体ｈＧＰＣデータセットから同定した。各転写物のｃＤＮＡを、ｐＴＡＮＫ－ＴＲＥ－ＥＧＦＰ－ＣＡＧ－ｒｔＴＡ３Ｇ－ＷＰＲＥベクターのテトラサイクリン応答エレメントプロモーターの下流にクローニングした。水疱性口内炎ウイルスＧ糖タンパク質でシュードタイピングしたウイルス粒子を、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞の一過性トランスフェクションにより産生させ、超遠心分離により濃縮し、ＱＰＣＲ（ｑＰＣＲレンチウイルス力価キット、ＡＢＭ

－Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｉｎｃ）で滴定した。ｉＰＳＣ（Ｃ２７）由来ＧＰＣ培養物（ｉｎ ｖｉｔｒｏで１６０～１８０日間）を、１．０ＭＯＩで２４時間グリア培地中で感染させた。細胞をＨＢＳＳで洗浄し、残りの実験のために、１μｇ／ｍｌのドキシサイクリン（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ－Ｓｉｇｍａ セントルイス、ミズーリ州）で補完したグリア培地中で維持した。形質導入ｈＧＰＣを、ドキシサイクリンの初期添加の３日、７日、及び１０日後に、ＤＡＰＩ－／ＥＧＦＰ＋発現に対するＦＡＣＳで単離した。ドキシサイクリン対照細胞はＤＡＰＩのみで選別した。

【０２１８】

定量的ＰＣＲ

過剰発現実験のＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙマイクロキット（Ｑｉａｇｅｎ、ドイツ）を使用して抽出した。第一鎖ｃＤＮＡを、ＴａｑＭａｎ逆転写試薬（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、米国）を使用して合成した。ｑＰＣＲ反応は、反応ごとにＦａｓｔＳｔａｒｔ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳｙｂｒＧｒｅｅｎ Ｍａｓｔｅｒｍｉｘ（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、ドイツ）と混合した１ｎｇのＲＮＡを負荷することにより三連で行い、リアルタイムＰＣＲ機器（ＣＦＸ Ｃｏｎｎｅｃｔ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ Ｓｙｓｔｅｍ Ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ；Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で分析した。結果を、各試料の１８Ｓの発現に対して正規化した。

【０２１９】

定量化及び統計分析

ｑＰＣＲ実験では、細胞バッチ共変数の追加による過剰発現条件及び時点の相互作用により構築された線形モデルで、各遺伝子のデルタＣＴの有意差を分析した。ｌｓｍｅａｎｓパッケージを使用して、時点内のＤｏｘ対照に対する最小二乗平均検定により事後対比較を行った（Ｌｅｎｔｈ，Ｒ．Ｖ．、「Ｌｅａｓｔ－Ｓｑｕａｒｅｓ Ｍｅａｎｓ： Ｔｈｅ Ｒ Ｐａｃｋａｇｅ ｌｓｍｅａｎｓ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｏｐｅｎ Ａｃｃｅｓｓ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ ６９巻（ｉ０１）（２０１６年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。ｐ値＜０．０５を有意とみなした偽発見率法を使用してＰ値を多重比較用に調整した。

【０２２０】

実施例１

ＣＤ１４０ａ選択は、Ａ２Ｂ５よりも効率的にヒト胎児グリア前駆細胞を富化する

ＧＰＣ加齢との転写付随物を同定するために、まず、バルクＲＮＡ－Ｓｅｑ及び単一細胞ＲＮＡ－Ｓｅｑを使用して、ＰＤＧＦＲαのＣＤ１４０ａエピトープ（Ｓｉｍら、「ＣＤ１４０ａ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ ａ Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｉｇｈｌｙ Ｍｙｅｌｉｎｏｇｅｎｉｃ， Ｍｉｇｒａｔｉｏｎ－Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ａｎｄ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔｌｙ Ｅｎｇｒａｆｔｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２９巻：９３４～９４１頁（２０１１年ａ）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）又はモノクローナル抗体Ａ２Ｂ５により認識されるグリアガングリオシド（Ｄｉｅｔｒｉｃｈら、「Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ａ２Ｂ５＋ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ Ｃｅｌｌｓ Ｆｒｏｍ Ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖｅｄ Ｈｕｍａｎ Ｆｅｔａｌ Ｂｒａｉｎ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｇｌｉａ ４０巻：６５～７７頁（２００２年）；Ｓｉｍら、「ＣＤ１４０ａ Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｓ ａ Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｉｇｈｌｙ Ｍｙｅｌｉｎｏｇｅｎｉｃ，Ｍｉｇｒａｔｉｏｎ－Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ａｎｄ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔｌｙ Ｅｎｇｒａｆｔｉｎｇ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２９巻：９３４～９４１頁（２０１１年ａ）；及びＷｉｎｄｒｅｍら、「Ｆｅｔａｌ ａｎｄ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｅｓ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ｔｈｅ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌｌｙ Ｄｙｓｍ

ｙｅｌｉｎａｔｅｄ Ｂｒａｉｎ」、Ｎａｔ． Ｍｅｄ．１０巻：９３～９７頁（２００４年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）を標的とすることにより単離されたか否かにかかわらず、第２三半期胎児ヒト組織由来のｈＧＰＣを特徴付けた。この目的のため、在胎期間１８～２２週（ｇ．ａ．）胎児脳の脳室／脳室下帯（ＶＺ／ＳＶＺ）を解離させ、同じ胎児脳（ｎ＝３）から単離されたＣＤ１４０ａ＋及びＡ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－（Ａ２Ｂ５＋）ＧＰＣ又はＣＤ１４０ａ＋ＧＰＣのいずれか、並びにＣＤ１４０ａ枯渇残部（ｎ＝５；図１、パネルＡ）について蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）により選別した２つの試料一致実験を実施した。次いで、バルクＲＮＡ－Ｓｅｑライブラリーを生成し、両実験について詳細に配列決定した。主成分分析（ＰＣＡ）は、ＣＤ１４０ａ＋細胞及びＡ２Ｂ５＋細胞の分離を示し、ＣＤ１４０ａ枯渇試料からの両細胞のさらなる分離を示した（図１、パネルＢ）。両方の対コホートにおける差次的発現（ｐ＜０．０１、絶対Ｌｏｇ２ 変化倍率＞１）は、ＣＤ１４０ａ＋ＧＰＣとＡ２Ｂ５＋ ＧＰＣとの間で差次的に発現される遺伝子として７２３個の遺伝子を同定した（ＣＤ１４０ａでは４３５個、Ａ２Ｂ５では２８８個、表Ｓ１）。対照的に、２，６２９個の遺伝子が、ＣＤ１４０ａ＋ ＧＰＣとＣＤ１４０ａ－細胞とを区別した（図１、パネルＣ）。ＣＤ１４０＋細胞とＡ２Ｂ５＋細胞又はＣＤ１４０－細胞のいずれかとを比較すると、差次的遺伝子発現方向性は非常に一貫しており、４個の遺伝子を除くすべてが合致していた。

【０２２１】

こうした遺伝子セットの両方のＩｎｇｅｎｕｉｔｙパスウエイ解析（ＩＰＡ）を使用した経路富化解析は、ＣＤ１４０＋ ＧＰＣにおいて比較的活性な同様の経路を同定した。こうした経路としては、細胞運動、オリゴデンドロサイト分化、脂質合成、及び下流のＰＤＧＦ、ＳＯＸ１０、及びＴＣＦ７Ｌ２シグナル伝達が挙げられる（図１、パネルＤ）。予想通り、ＣＤ１４０ａ＋ ＧＰＣを、Ａ２Ｂ５＋ ＧＰＣとではなくＣＤ１４０ａ－細胞と比較すると、典型的にはより強力な活性化Ｚスコアが観察された。興味深いことに、ＣＤ１４０ａ＋細胞も、おそらくは、ミクログリア表面でのＰＤＧＦαＲエピトープの再発現の結果としての少量のミクログリア夾雑のため、免疫系に関連する少なからぬ経路を差次的に発現した。Ａ２Ｂ５＋試料は、Ａ２Ｂ５合成を担う酵素であるＳＴ８ＳＩＡ１の上方制御（Ｓｉｍら、「Ｆａｔｅ Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎｅｕｒｏｎ Ｇｌｉａ Ｂｉｏｌ ５巻：４５～５５頁（２００９年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）並びに前神経経路をさらに示した。

【０２２２】

ＣＤ１４０ａ＋単離物において差次的に上方制御された遺伝子の中には、ＰＤＧＦＲＡ自体、並びにＯＬＩＧ１、ＯＬＩＧ２、ＮＫＸ２－２、ＳＯＸ１０、及びＧＰＲ１７を含む少なからぬ初期オリゴデンドログリア遺伝子があった（図１、パネルＥ－１、パネルＦ）。さらに、ＣＤ１４０ａ＋画分も、ＭＢＰ、ＧＡＬ３ＳＴ１、及びＵＧＴ８を含む、後期ミエリン形成関連遺伝子の発現増加も呈した。ＣＤ１４０ａ分離物では、オリゴデンドログリア系統の富化だけでなく、ＣＤ６８、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、及びＴＲＥＭ２を含む、典型的にはミクログリアに関連付けられる多数の遺伝子も富化された。対照的に、Ａ２Ｂ５＋分離物は星状膠細胞（ＡＱ４、ＣＬＵ）及び初期ニューロン（ＮＥＵＲＯＤ１、ＮＥＵＲＯＤ２、ＧＡＢＲＧ１、ＧＡＢＲＡ４、ＥＯＭＥＳ、ＨＴＲ２Ａ）遺伝子の富化を呈し、未熟星状膠細胞及びニューロンによる並びにＧＰＣ及びオリゴデンドログリア系統細胞によるＡ２Ｂ５の発現が示唆された。全体として、オリゴデンドログリア富化は、各々を枯渇画分と比較した場合、Ａ２Ｂ５により規定されるＧＰＣよりも ＣＤ１４０ａ＋ＧＰＣにおいて有意により高く、ＣＤ１４０ａ分離物はｈＧＰＣにてより富化されており、したがってＣＤ１４０ａは成体ｈＧＰＣとの直接比較のより適切な表現型であることが示唆された。

【０２２３】

実施例２

単一細胞ＲＮＡ配列決定は、ヒト胎児ＧＰＣ分離物内の細胞不均質性を明らかにした

胎児ｈＧＰＣ分離物の組成を単一細胞解像度でさらに詳しく記述するために、ＣＤ１４０ａ＋ ｈＧＰＣ及びＡ２Ｂ５＋ ｈＧＰＣの両方を、ＦＡＣＳにより２０週ｇ．ａ．胎児ＶＺ／ＳＶＺから単離し、各々のトランスクリプトームを、単一細胞ＲＮＡ－Ｓｅｑでアッセイした（図１、パネルＡ、１０Ｘ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｖ２）。各々の＞１，０００個の細胞を捕捉することが求められた。低品質細胞（固有遺伝子＜５００個、ミトコンドリア遺伝子パーセンテージ＞１５％）をフィルタリングした後、１，０５３個のＰＳＡ－ＮＣＡＭ－／Ａ２Ｂ５＋及び９５７個のＣＤ１４０ａ＋高品質細胞が残った（１細胞当たり中央値で６，８４５個の固有分子識別子及び２，３３６個の固有遺伝子）。均一マニフォールド近似及び投影（ＵＭＡＰ、ｕｎｉｆｏｒｍ ｍａｎｉｆｏｌｄ ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐｒｏｊｅｃｔｉｏｎ）による次元削減、それに続くＳｅｕｒａｔを使用したすべての細胞の共有最近傍モジュールベースクラスタリング（ｓｈａｒｅｄ ｎｅａｒｅｓｔ ｎｅｉｇｈｂｏｒ ｍｏｄｕｌａｒｉｔｙ－ｂａｓｅｄ ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ）（Ｂｕｔｌｅｒら、「Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｎｇ Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｉｃ Ｄａｔａ Ａｃｒｏｓｓ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ Ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｓ，Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，ａｎｄ Ｓｐｅｃｉｅｓ」、Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３６巻：４１１～４２０頁（２０１８年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）は、マーカー遺伝子の差次的富化により規定される８つの主要な細胞タイプを有する１１個のクラスターを明らかにした。こうした主要な細胞タイプとしては、ＧＰＣ、プレＧＰＣ、神経前駆細胞（ＮＰＣ）、未熟ニューロン、ニューロン、ミクログリア、並びに内皮細胞及び周皮細胞からなるクラスターが挙げられる。本発明者らは、ＣＤ１４０ａ＋ ＦＡＣＳ分離物では、胎児Ａ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－細胞よりもＧＰＣ集団及びプレＧＰＣ集団がより富化されていたことを見出した（図２、パネルＡ－２、パネルＤ）。さらに、ＣＤ１４０ａ選別細胞は、主にＧＰＣ及びプレＧＰＣに限定され、ミクログリア夾雑が散在するのみであったが、Ａ２Ｂ５＋／ＰＳＡ－ＮＣＡＭ－分離物は星状膠細胞及び神経系統細胞も含んでいた。後者は神経系ＰＳＡ－ＮＣＡＭの事前枯渇にもかかわらず含まれていた。こうしたデータにより、Ａ２Ｂ５ベースのＧＰＣ単離ではなく、ＣＤ１４０ａベースのＧＰＣ単離の方が、より選択的で表現型が制限された性質であることが裏付けられた。

【０２２４】

これに基づき、次に、ＣＤ１４０ａ＋胎児分離物、ＧＰＣ、及びプレＧＰＣにおける優勢な細胞集団の遺伝子発現プロファイルを探索した。こうした２つのプール間の差次的発現は２６９個をもたらした（１４３個が上方制御され、１２６個が下方制御された。ｐ＜０．０１、Ｌｏｇ２ 変化倍率＞０．５、図２、パネルＥ）。プレＧＰＣからＧＰＣへの移行中に、初期オリゴデンドログリア系統遺伝子は急速に上方制御されたが（ＯＬＩＧ２、ＳＯＸ１０、ＮＫＸ２－２、ＰＬＬＰ、ＡＰＯＤ）、プレＧＰＣで発現された遺伝子は効果的に消失した（ＶＩＭ、ＨＯＰＸ、ＴＡＧＬＮ２、ＴＮＣ）。興味深いことに、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、及びＢ２Ｍを含む、ヒト白血球抗原系に関与する遺伝子は、細胞がＧＰＣ期へと移行すると共にすべて下方制御された（図２、パネルＦ）。ＩＰＡ解析は、プレＧＰＣでは、遊走、増殖、及び星状膠細胞同一性を予兆するものに関連するタームが比較的富化されていたのに対し（ＢＭＰ４、ＡＧＴ、及びＶＥＧＦシグナル伝達）、ＧＰＣでは、ＭＹＣ及びＭＹＣＮ経路の活性化に加えて、オリゴデンドログリア同一性の獲得に関連付けられるタームの富化を示した（ＰＤＧＦ－ＡＡ、ＦＧＦＲ２、ＣＣＮＤ１）（図２、パネルＧ）。次に、ＳＣＥＮＩＣパッケージを使用したプロモーターモチーフ富化と共に単一細胞共発現データを使用して（Ａｉｂａｒら、「ＳＣＥＮＩＣ：Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｎｅｔｗｏｒｋ Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ａｎｄ Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ」、Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ １４巻：１０８３～１０８６頁（２０１７年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、プレＧＰＣと比べてＧＰＣにて相対的に活性化されると予測された２６２個の転写因子を同定した（ウィルコクソン順位和検定、ｐ＜０．０１）。それらには、ＳＡＴＢ１

、並びに初期ＧＰＣ特異性因子であるＯＬＩＧ２、ＳＯＸ１０、及びＮＫＸ２－２が含まれていた（図２、パネルＨ）。

【０２２５】

実施例３

ヒト成体及び胎児ＧＰＣは転写的に異なる

この研究では、次に、成体ｈＧＰＣの転写が胎児ｈＧＰＣとどのように異なり得るかを調べた。この目的のために、Ａ２Ｂ５＋ ｈＧＰＣを外科的に切除した成体ヒト側頭新皮質から単離し（１９～２１歳、ｎ＝３）、４つの追加の胎児ＣＤ１４０ａ＋試料と共に対にして、バルクＲＮＡ発現を評価した。Ａ２Ｂ５選択は成体ヒト脳からＧＰＣを単離するのに十分であり、成体ｈＧＰＣにおけるＰＤＧＦＲＡ発現の成熟関連下方制御を考慮すると、その点でＣＤ１４０ａよりもより感受性であることが以前に指摘されていた（Ｓｉｍら、「Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｐａｔｔｅｒｎｓ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｂｙ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ Ｐｒｅｄｉｃｔ Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｎｔｓ ｏｆ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ａｎｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ」、Ａｎｎ Ｎｅｕｒｏｌ ５９巻：７６３～７７９頁（２００６年）及びＷｉｎｄｒｅｍら、「Ｆｅｔａｌ ａｎｄ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｅｓ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ｔｈｅ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌｌｙ Ｄｙｓｍｙｅｌｉｎａｔｅｄ Ｂｒａｉｎ」、Ｎａｔ． Ｍｅｄ．１０巻：９３～９７頁（２００４年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２２６】

Ａ２Ｂ５＋成体ＧＰＣにおけるＰＤＧＦＲＡは、胎児Ａ２Ｂ５＋細胞のＴＰＭ中央値４７．５６と比較して、０．５５のＴＰＭ中央値で発現されたことが見出された。これは、以前の観察を確認するものだった。配列決定と胎児ＣＤ１４０ａ選択細胞の分析とを対にすることにより、配列決定バッチ効果の回帰が可能になり、同時に検出力が向上した（図３、パネルＡ）。ＰＳＡ－ＮＣＡＭの発現は成体皮質及び白質では停止するため、ＰＳＡ－ＮＣＡＭ＋細胞の枯渇は、成体ｈＧＰＣ試料では必要なかった（Ｓｅｋｉら、「Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｏｓｓｉｂｌｅ Ｒｏｌｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｈｉｇｈｌｙ Ｐｏｌｙｓｉａｌｙｌａｔｅｄ Ｎｅｕｒａｌ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ （ＮＣＡＭ－Ｈ） ｉｎ ｔｈｅ Ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ ａｎｄ Ａｄｕｌｔ Ｃｅｎｔｒａｌ Ｎｅｒｖｏｕｓ Ｓｙｓｔｅｍ」、Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．１巻：２６５～２９０頁（１９９３年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。その結果、ヒト成体及び胎児ＧＰＣのＰＣＡは、成体ＧＰＣの緊密なクラスター化を示し、選別した胎児ｈＧＰＣプールから両者を明確に分離した（図３、パネルＢ）。Ａ２Ｂ５＋又はＣＤ１４０ａ＋胎児ＧＰＣ集団のいずれかと比較した成体ＧＰＣの差次的発現により、それぞれ３，１４２個及び５，２８２個の有意な遺伝子が得られた（ｐ＜０．０１；絶対Ｌｏｇ２ 変化倍率＞１）（図３、パネルＣ）。差次的発現を規定する際の正確性を増加させるために、共通する２，７２０個の遺伝子に対して下流分析を実施した（図３、パネルＤ、胎児ｈＧＰＣと比較して、成体ＧＰＣでは１，０６０個が上方制御され、１，６６０個が下方制御された）。驚くべきことに、こうした２つの差次的発現遺伝子セット内では、遺伝子の１００％が方向的に合致していた。

【０２２７】

成体ＧＰＣと胎児ＧＰＣとの間の差異をより良好に理解するために、非冗長で有意なＩＰＡターム及びそれらが寄与する差次的発現遺伝子の遺伝子オントロジーネットワークを構築した（図３、パネルＤ－３、パネルＥ）。このネットワークのスピングラスコミュニティ検出（Ｓｐｉｎ ｇｌａｓｓ ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ）（Ｒｅｉｃｈａｒｄｔら、「Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｍｅｃｈａｎｉｃｓ ｏｆ Ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ」、Ｐｈｙｓ． Ｒｅｖ． Ｅ Ｓｔａｔ． Ｎｏｎｌｉｎ．Ｓｏｆｔ Ｍａｔｔｅｒ Ｐｈｙｓ．７４巻：０１６１１０頁（２００６年）、この文

献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）は、高度に接続された機能的ターム（図３Ｅ）及び遺伝子（図３Ｆ、表Ｓ３）の３つのモジュール（モジュールＭ１～Ｍ３）を明らかにした。Ｍ１には、グリア発生、増殖、及び運動に関係付けられるターム及び遺伝子が含まれていた。注目すべきことに、成体ＧＰＣでは、ＧＰＣ個体発生に関連付けられる少なからぬ遺伝子が下方制御された。そうした遺伝子には、ＣＳＰＧ４／ＮＧ２、ＰＣＤＨ１５、ＣＨＲＤＬ１、ＬＭＮＢ１、ＰＴＰＲＺ１、及びＳＴ８ＳＩＡ１が含まれていた（Ｈｕａｎｇら、「Ｏｒｉｇｉｎｓ ａｎｄ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｖｅ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｃｅｌｌ １８２巻：５９４～６０８頁ｅ５１１（２０２０年）；ＭｃＣｌａｉｎら、「Ｐｌｅｉｏｔｒｏｐｈｉｎ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｔｙｒｏｓｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ－β／ζ Ｍａｉｎｔａｉｎｓ ｔｈｅ Ｓｅｌｆ－ｒｅｎｅｗａｌ Ｃｏｍｐｅｔｅｎｃｅ ｏｆ Ｆｅｔａｌ Ｈｕｍａｎ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ３２巻：１５０６６～１５０７５頁（２０１２年）；Ｎｉｓｈｉｙａｍａら、「Ｃｏ－Ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ＮＧ２ Ｐｒｏｔｅｏｇｌｙｃａｎ ａｎｄ ＰＤＧＦ α－Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｏｎ Ｏ２Ａ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ Ｒａｔ Ｂｒａｉｎ」、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４３巻：２９９～３１４頁（１９９６年）；Ｓｉｍら、「Ｆａｔｅ Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｄｕｌｔ Ｈｕｍａｎ Ｇｌｉａｌ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｎｅｕｒｏｎ Ｇｌｉａ Ｂｉｏｌ ５巻：４５～５５頁（２００９年）；及びＹａｔｔａｈら、「Ｄｙｎａｍｉｃ Ｌａｍｉｎ Ｂ１－Ｇｅｎｅ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ Ｄｕｒｉｎｇ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ」、Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ Ｒｅｓ ４５巻：６０６～６１９頁（２０２０年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。対照的に、成体ＧＰＣでは、ＭＡＧ、ＭＯＧ、ＭＹＲＦ、ＰＬＰ１、ＣＤ９、ＣＬＤＮ１１、ＣＮＰ、ＥＲＢＢ４、ＧＪＢ１、ＰＭＰ２２、及びＳＥＭＡ４Ｄを含む、出現がオリゴデンドロサイト分化及びミエリン形成に先行しその間にわたって継続する数多くの遺伝子が上方制御された。

【０２２８】

モジュール２は、細胞加齢並びに増殖及び老化のモジュレーションに関連付けられる数多くのタームを内包していた。ＭＫＩ６７、ＴＯＰ２Ａ、ＣＥＮＰＦ、ＣＥＮＰＨ、ＣＨＥＫ１、ＥＺＨ２を含む増殖因子、並びにＣＤＫ１及びＣＤＫ４を含む数多くのサイクリンが強力に富化されていたため、胎児ＧＰＣでは細胞周期進行及び有糸分裂が活性化されると予測された。さらに、増殖誘導性経路も活性化されると推定された。そうした経路には、ＭＹＣ、ＣＣＮＤ１、及びＹＡＰ１シグナル伝達が含まれており、そのうちＹＡＰ１転写物及びＭＹＣ転写物は両方が同様に上方制御された（Ｂｒｅｔｏｎｅｓら、「Ｍｙｃ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ」、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １８４９巻：５０６～５１６頁（２０１５年）；Ｂｕｎｔら、「Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ ｂｙ Ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ＯＴＸ２ ｉｎ Ｍｅｄｕｌｌｏｂｌａｓｔｏｍａ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ」、Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ． ８巻：１３４４～１３５７頁（２０１０年）；及びＸｉｅら、「ＹＡＰ／ＴＥＡＤ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｓ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ」、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７３巻：３６１５～３６２４頁（２０１３年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。この点に関して、最近では、加齢げっ歯動物ＧＰＣにおけるＭＹＣの一過性過剰発現は、増殖及び分化の両方の能力を回復させることが示されている（Ｎｅｕｍａｎｎら、「Ｍｙｃ Ｄｅｔｅｒｍｉｎｅｓ ｔｈｅ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ａｇｅ Ｓｔａｔｅ ｏｆ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、

Ｎａｔｕｒｅ Ａｇｉｎｇ １巻：８２６～８３７頁（２０２１年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。逆に、成体ＧＰＣは、Ｅ２Ｆ６、ＭＡＰ３Ｋ７、ＤＭＴＦ１／ＤＭＰ１、ＯＧＴ、ＡＨＲ、ＲＵＮＸ１、及びＲＵＮＸ２を含む老化関連転写物の上方制御を呈した（Ｆｅｒｒａｎｄら、「Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ｏｆ ａ Ｋｉｎａｓｅ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｒｅｖｅａｌｓ Ｎｏｖｅｌ Ｐｒｏ－ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｋｉｎａｓｅｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｃｏｍｍｏｎ ＮＦ－κＢ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ Ｐｒｏｇｒａｍ」、Ａｇｉｎｇ（Ａｌｂａｎｙ ＮＹ）７巻：９８６～１００３頁（２０１５年）；Ｉｎｏｕｅら、「Ｄｉｓｒｕｐｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＡＲＦ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ ＤＭＰ１ Ｆａｃｉｌｉｔａｔｅｓ Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｏｒｔａｌｉｚａｔｉｏｎ，Ｒａｓ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｔｕｍｏｒｉｇｅｎｅｓｉｓ」、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ １４巻：１７９７～１８０９頁（２０００年）；Ｌｅｅ及びＺｈａｎｇ、「Ｏ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｎ－Ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ（ＯＧＴ）Ｉｎｔｅｒａｃｔｓ Ｗｉｔｈ ｔｈｅ Ｈｉｓｔｏｎｅ Ｃｈａｐｅｒｏｎｅ ＨＩＲＡ Ｃｏｍｐｌｅｘ ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｓｏｍｅ Ａｓｓｅｍｂｌｙ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ」、Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １１３巻：Ｅ３２１３～Ｅ３２２０頁（２０１６年）；Ｗｏｔｔｏｎら、「ＲＵＮＸ１ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ ｉｓ Ｒｅｖｅａｌｅｄ ｉｎ ｔｈｅ Ａｂｓｅｎｃｅ ｏｆ ｐ５３」、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２３巻：５４７６～５４８６頁（２００４年）；及びＫｉｌｂｅｙら、「Ｒｕｎｘ２ Ｄｉｓｒｕｐｔｉｏｎ Ｐｒｏｍｏｔｅｓ Ｉｍｍｏｒｔａｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｏｎｆｅｒｓ Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ ｔｏ Ｏｎｃｏｇｅｎｅ－ｉｎｄｕｃｅｄ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｍｕｒｉｎｅ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ」、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６７巻：１１２６３～１１２７１頁（２００７年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。同時に、成体ｈＧＰＣは、ＬＭＮＢ１、ＰＡＴＺ１、ＢＣＬ１１Ａ、ＨＤＡＣ２、ＦＮ１、ＥＺＨ２、及びＹＡＰ１、並びにその補因子ＴＥＡＤ１を含んでいた胎児転写物の下方制御を呈した（Ｃｈｏら、「ＰＯＺ／ＢＴＢ ａｎｄ ＡＴ－ｈｏｏｋ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ Ｚｉｎｃ Ｆｉｎｇｅｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ １（ＰＡＴＺ１）Ｉｎｈｉｂｉｔｓ Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｔｈｒｏｕｇｈ ａ ｐ５３ Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｐａｔｈｗａｙ」、Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｆｆｅｒ １９巻：７０３～７１２頁（２０１２年）；Ｆａｎら、「ＥＺＨ２－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ａ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ ｉｎ Ｍｅｌａｎｏｍａ Ｃｅｌｌｓ ｂｙ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｐ２１／ＣＤＫＮ１Ａ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．９巻：４１８～４２９頁（２０１１年）；Ｆｒｅｕｎｄら、「Ｌａｍｉｎ Ｂ１ Ｌｏｓｓ ｉｓ ａ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｂｉｏｍａｒｋｅｒ」、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ ２３巻：２０６６～２０７５頁（２０１２年）；Ｌｕｃら、「Ｂｃｌ１１ａ Ｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ Ｌｅａｄｓ ｔｏ Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｄｅｆｅｃｔｓ ｗｉｔｈ ａｎ Ａｇｉｎｇ－ｌｉｋｅ Ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ」、Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ．１６巻：３１８１～３１９４頁（２０１６年）；Ｌｕｋｊａｎｅｎｋｏら、「Ｌｏｓｓ ｏｆ Ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ Ｆｒｏｍ ｔｈｅ Ａｇｅｄ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｎｉｃｈｅ Ａｆｆｅｃｔｓ ｔｈｅ Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｏｆ Ｓｋｅｌｅｔａｌ Ｍｕｓｃｌｅ ｉｎ Ｍｉｃｅ」、Ｎａｔ Ｍｅｄ ２２巻：８９７～９０５頁（２０１６年）；Ｓｕｎｄａｒら、「Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｂｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｉｓｔｏｎｅ Ｄｅａｃｅｔｙｌａｓｅ ２ Ｌｅａｄｓ ｔｏ Ｌｕｎｇ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ ａｎｄ Ｌｙｍｐｈｏｉｄ Ｆｏｌｌｉｃｌｅ Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｉｎ ＣＯＰＤ／Ｅｍｐｈｙｓｅｍａ」、ＦＡＳＥＢ Ｊｏｕｒｎａｌ：Ｏｆｆｉｃｉａ

ｌ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｆｅｄｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｉｅｓ ｆｏｒ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３２巻：４９５５～４９７１頁（２０１８年）；及びＸｉｅら、「ＹＡＰ／ＴＥＡＤ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｓ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ」、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７３巻：３６１５～３６２４頁（２０１３年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。その結果、成体ｈＧＰＣにて活性であることが予測された機能的タームには、老化、ハッチンソン－ギルフォード早老症で観察される急速な加齢の開始、及びＣＤＫＮ１Ａ／ｐ２１及びＣＤＫＮ２Ａ／ｐ１６の下流のサイクリン依存性キナーゼ阻害経路が含まれていた。さらに、ＡＨＲ及びそのシグナル伝達経路は、ＭＹＣの阻害による老化の駆動に関与が示唆されており（Ｙａｎｇら、「Ｔｈｅ Ａｒｙｌ Ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅｌｙ Ｒｅｐｒｅｓｓｅｓ Ｃ－Ｍｙｃ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｍａｍｍａｒｙ Ｔｕｍｏｒ Ｃｅｌｌｓ」、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２４巻：７８６９～７８８１頁（２００５年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、成体ＧＰＣでは同様に上方制御された。

【０２２９】

モジュール３は、加齢にも関連付けられる発生及び疾患関連シグナル伝達経路から主になっていた。これには、胎児ｈＧＰＣではＡＳＣＬ１シグナル伝達及びＢＤＮＦシグナル伝達、並びに成体ＧＰＣではＭＡＰＴ／Ｔａｕシグナル伝達、ＡＰＰシグナル伝達、及びＲＥＳＴシグナル伝達の活性化の予測が含まれていた（Ａｈｌｉｎら、「Ｈｉｇｈ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｃｙｃｌｉｎ Ｄ１ ｉｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｔｏ Ｈｉｇｈ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ｒａｔｅ ａｎｄ Ｉｎｃｒｅａｓｅｄ Ｒｉｓｋ ｏｆ Ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ｉｎ Ｗｏｍｅｎ Ｗｉｔｈ ＥＲ－ｐｏｓｉｔｉｖｅ Ｂｕｔ Ｎｏｔ ｉｎ ＥＲ－ｎｅｇａｔｉｖｅ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒｓ。、Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．Ｔｒｅａｔ １６４巻：６６７～６７８頁（２０１７年）；Ｅｒｉｃｋｓｏｎら、「Ｂｒａｉｎ－ｄｅｒｉｖｅｄ Ｎｅｕｒｏｔｒｏｐｈｉｃ Ｆａｃｔｏｒ ｉｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｗｉｔｈ Ａｇｅ－ｒｅｌａｔｅｄ Ｄｅｃｌｉｎｅ ｉｎ Ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ Ｖｏｌｕｍｅ」、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．３０巻：５３６８～５３７５頁（２０１０年）；及びＨａｒｒｉｓら、「Ｃｏｏｒｄｉｎａｔｅｄ Ｃｈａｎｇｅｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｅｈａｖｉｏｒ Ｅｎｓｕｒｅ ｔｈｅ Ｌｉｆｅｌｏｎｇ Ｍａｉｎｔｅｎａｎｃｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｈｉｐｐｏｃａｍｐａｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ（２０２１年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。全体として、成体ＧＰＣの転写及び機能プロファイリングは、増殖能力に関連付けられる転写物の低減、並びに老化及びより成熟した表現型へのシフトを明らかにした。

【０２３０】

実施例４

転写因子活性の推定は成体ＧＰＣ転写リプレッサーの関与を示唆する

成体ＧＰＣと胎児ＧＰＣとの間の有意な転写不同性を考慮して、この研究では、次に、どの転写因子がそれらの同一性を指図するかを推定することができるか否かを調べた。これを達成するために、成体又は胎児富化ＧＰＣ遺伝子セットの２つのプロモーターウィンドウ（５００ｂｐ上流／１００ｂｐ下流、１０ｋｂ上流／１０ｋｂ下流）をまずスキャンして、有意に富化されたＴＦモチーフを推定した（Ａｉｂａｒら、「ＳＣＥＮＩＣ： Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｎｅｔｗｏｒｋ Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ ａｎｄ Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ」、Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４巻：１０８３～１０８６頁（２０１７年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。これにより、スキャンされた共通データセットでも差次的に発現された４８個のＴＦが同定された。これらの中で、まず、ＤＮＡ相互作用の主な手段が排他的に抑制性又は

刺激性のいずれかであったＴＦを、既知補因子の富化も考慮しつつ調査した。この分析により、探索すべき１２個の潜在的な上流調節因子が得られた（図４、パネルＡ－４、パネルＣ）：４個の成体リプレッサーＥ２Ｆ６、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、及びＩＫＺＦ３；１個の成体活性化因子ＳＴＡＴ３：３個の胎児リプレッサーＢＣＬ１１　ＡＨＤＡＣ２、及びＥＺＨ２；及び４個の胎児活性化因子ＭＹＣ、ＨＭＧＡ２、ＮＦＩＢ、及びＴＥＡＤ２。興味深いことに、こうした予測されたＴＦのうち、３つのグループは、それらの標的プロモーター内で高コンコーダンスのモチーフ類似性を共有していた：１）Ｅ２Ｆ６、ＺＮＦ２７４、ＭＡＸ、及びＭＹＣ；２）ＳＴＡＴ３及びＢＣＬ１１Ａ；並びに３）ＥＺＨ２及びＨＤＡＣ２。これは、それらが、共有遺伝子座でのＤＮＡ結合を協調又は競合する可能性があることを示唆している（図４、パネルＡ）。

【０２３１】

次に、同定されたＴＦのセットにより標的とされる遺伝子を予測するために、厳選された転写相互作用に基づいて４つの潜在的なシグナル伝達経路を構築した（図４、パネルＤ－４、パネルＧ）。胎児ＧＰＣにて富化された活性化因子のうち（図４、パネルＤ）、増殖因子であるＭＹＣ（Ｄａｎｇ，Ｃ．Ｖ．、「ｃ－Ｍｙｃ　Ｔａｒｇｅｔ　Ｇｅｎｅｓ　Ｉｎｖｏｌｖｅｄ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ　Ｇｒｏｗｔｈ，　Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ，　ａｎｄ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ」、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１９巻：１頁（１９９９年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、グリア形成の重要な決定因子であるＮＦＩＢ（Ｄｅｎｅｅｎら、「Ｔｈｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　ＮＦＩＡ　Ｃｏｎｔｒｏｌｓ　ｔｈｅ　Ｏｎｓｅｔ　ｏｆ　Ｇｌｉｏｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ　Ｓｐｉｎａｌ　Ｃｏｒｄ」、Ｎｅｕｒｏｎ　５２巻：９５３～９６８頁（２００６年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）、ＹＡＰ／ＴＡＺエフェクターであるＴＥＡＤ２、及び別の増殖因子であるＨＭＧＡ２は各々、有糸分裂関連転写物及び老化の開始を阻害することが示されているものの両方を含む、前駆細胞期遺伝子のコホートを活性化することが予測された（Ｄａｎｇ，Ｃ．Ｖ．、「ｃ－Ｍｙｃ　Ｔａｒｇｅｔ　Ｇｅｎｅｓ　Ｉｎｖｏｌｖｅｄ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ　Ｇｒｏｗｔｈ，　Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ，　ａｎｄ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ」、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１９巻：１頁（１９９９年）；Ｄｅｎｅｅｎら、「Ｔｈｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　ＮＦＩＡ　Ｃｏｎｔｒｏｌｓ　ｔｈｅ　Ｏｎｓｅｔ　ｏｆ　Ｇｌｉｏｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　Ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ　Ｓｐｉｎａｌ　Ｃｏｒｄ」、Ｎｅｕｒｏｎ　５２巻：９５３～９６８頁（２００６年）；Ｄｉｅｐｅｎｂｒｕｃｋら、「Ｔｅａｄ２　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｌｅｖｅｌｓ　Ｃｏｎｔｒｏｌ　ｔｈｅ　Ｓｕｂｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｙａｐ　ａｎｄ　Ｔａｚ，　Ｚｙｘｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎｄ　Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ－ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　Ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ」、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　１２７巻：１５２３～１５３６頁（２０１４年）；及びＹｕら、「ＨＭＧＡ２　Ｒｅｇｕｌａｔｅｓ　ｔｈｅ　ｉｎ　Ｖｉｔｒｏ　Ａｇｉｎｇ　ａｎｄ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｈｕｍａｎ　Ｕｍｂｉｌｉｃａｌ　Ｃｏｒｄ　Ｂｌｏｏｄ－Ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｓｔｒｏｍａｌ　Ｃｅｌｌｓ　Ｔｈｒｏｕｇｈ　ｔｈｅ　ｍＴＯＲ／ｐ７０Ｓ６Ｋ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｐａｔｈｗａｙ」、Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ　１０巻：１５６～１６５頁（２０１３年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。こうした４個の胎児活性化因子間では、ＮＦＩＢがＨＭＧＡ２及びＴＥＡＤ２により駆動され、ＭＹＣがＴＥＡＤ２及びＮＦＩＢにより駆動され、ＨＭＧＡ２がＭＹＣ及びＴＥＡＤ２により駆動され、ＴＥＡＤ２がＭＹＣにより相互に駆動されるという、こうした４個の胎児活性化因子間での直接的な正の調節も予測された（図４、パネルＤ）。こうした胎児活性化因子とは対照的に、Ｃ２Ｈ２型ジンクフィンガーＢＣＬ１１Ａ、ポリコーム抑制性複合体サブユニットＥＺＨ２、及びヒストン脱アセチル化酵素ＨＤＡＣ２を含む胎児期リプレッサーは各々、この段階でより成熟したオリゴデンドロサイト遺伝子発現を抑制することが予測された（図４、パネルＥ）（Ｌａｈｅ

ｒｔｙら、「Ｈｉｓｔｏｎｅ Ｄｅａｃｅｔｙｌａｓｅｓ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｗｉｔｈ ｔｈｅ ｍＳｉｎ３ Ｃｏｒｅｐｒｅｓｓｏｒ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｍａｄ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ Ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ ８９巻：３４９～３５６頁（１９９７年）；Ｌａｉｂｌｅら、「Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｈｏｍｏｌｏｇｕｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｐｏｌｙｃｏｍｂ－ｇｒｏｕｐ Ｇｅｎｅ Ｅｎｈａｎｃｅｒ ｏｆ Ｚｅｓｔｅ Ｍｅｄｉａｔｅ Ｇｅｎｅ Ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ｉｎ Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ Ｈｅｔｅｒｏｃｈｒｏｍａｔｉｎ ａｎｄ ａｔ Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ Ｔｅｌｏｍｅｒｅｓ」、ＥＭＢＯ Ｊ １６巻：３２１９～３２３２頁（１９９７年）；及びＮａｋａｍｕｒａら、「Ｅｖｉ９ Ｅｎｃｏｄｅｓ ａ Ｎｏｖｅｌ Ｚｉｎｃ Ｆｉｎｇｅｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ ｔｈａｔ Ｐｈｙｓｉｃａｌｌｙ Ｉｎｔｅｒａｃｔｓ ｗｉｔｈ ＢＣＬ６，ａ ｋｎｏｗｎ Ｈｕｍａｎ Ｂ－Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｔｏ－Ｏｎｃｏｇｅｎｅ Ｐｒｏｄｕｃｔ」、Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ２０巻：３１７８～３１８６頁（２０００年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。さらに、こうしたＴＦの３個すべては、老化との関連が示唆される標的を阻害すると予測された。そのため、こうした因子は、下流の転写事象を直接的に調整して、循環前駆細胞（ｃｙｃｌｉｎｇ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ）状態の維持に結び付くと考えられる。

【０２３２】

次に、こうした予測された成体ＧＰＣシグナル伝達ネットワークを、それらの加齢関連遺伝子発現変化の原因である潜在的な機序について評価した。ＳＴＡＴ３は、初期分化関連及びミエリン形成関連オリゴデンドロサイト遺伝子の大規模コホートの上方制御により、ＧＰＣ同一性をグリア成熟に向けてシフトさせることが予測された（図４、パネルＦ）。加えて、ＳＴＡＴ３は、ＢＩＮ１、ＲＵＮＸ１、ＲＵＮＸ２、ＤＭＴＦ１、ＣＤ４７、ＭＡＰ３Ｋ７、ＣＴＮＮＡ１、及びＯＧＴを含む、１セットの老化関連遺伝子も活性化すると推定された。同時に、成体ＧＰＣにおける抑制は、ＩｋａｒｏｓファミリージンクフィンガーＩＫＺＦ３／Ａｉｏｌｏｓ、ＫＲＡＢ（ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス）ジンクフィンガーＺＮＦ２７４、ＭＹＣ関連因子ＭＡＸ、及び細胞周期調節因子Ｅ２Ｆ６を介して達成されることが予測された（図４、パネルＧ）（Ｂｌａｃｋｗｏｏｄ及びＥｉｓｅｎｍａｎ、「Ｍａｘ：Ａ Ｈｅｌｉｘ－ｌｏｏｐ－ｈｅｌｉｘ Ｚｉｐｐｅｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｔｈａｔ Ｆｏｒｍｓ ａ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＤＮＡ－ｂｉｎｄｉｎｇ Ｃｏｍｐｌｅｘ Ｗｉｔｈ Ｍｙｃ」、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５１巻：１２１１～１２１７頁（１９９１年）；Ｆｒｉｅｔｚｅら、「ＺＮＦ２７４ Ｒｅｃｒｕｉｔｓ ｔｈｅ Ｈｉｓｔｏｎｅ Ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ＳＥＴＤＢ１ ｔｏ ｔｈｅ ３’Ｅｎｄｓ ｏｆ ＺＮＦ Ｇｅｎｅｓ」、ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ５巻：ｅ１５０８２頁（２０１０年）；Ｍａら、「Ｉｋａｒｏｓ ａｎｄ Ａｉｏｌｏｓ Ｉｎｈｉｂｉｔ Ｐｒｅ－Ｂ－ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ｂｙ Ｄｉｒｅｃｔｌｙ Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｎｇ ｃ－Ｍｙｃ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ」、Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ３０巻：４１４９～４１５８頁（２０１０年ｂ）；及びＯｇａｗａら、「Ａ Ｃｏｍｐｌｅｘ ｗｉｔｈ Ｃｈｒｏｍａｔｉｎ Ｍｏｄｉｆｉｅｒｓ ｔｈａｔ Ｏｃｃｕｐｉｅｓ Ｅ２Ｆ－ ａｎｄ Ｍｙｃ－Ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ Ｇｅｎｅｓ ｉｎ Ｇ０ Ｃｅｌｌｓ」、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６巻：１１３２～１１３６頁（２００２年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。このセットの転写因子による標的化は、胎児ＧＰＣシグネチャに寄与する遺伝子セットの抑制を予測した。これは、初期前駆細胞遺伝子ＰＤＧＦＲＡ及びＣＳＰＧ４、並びに細胞周期遺伝子ＣＤＫ１、ＣＤＫ４、及びＭＫＩ６７の下方制御において実際に観察された。また、これらの発現が老化の開始を緩徐又は防止するＹＡＰ１、ＬＭＮＢ１、及びＴＥＡＤ１の抑制も予測された。興味深いことに、４個の成体リプレッサーのこのセットは、胎児富化リプレッサーＢＣＬ１１Ａ、ＥＺＨ２、及びＨＤＡＣ２に加えて、胎児富化活性化因子ＮＦＩＢ、ＭＹＣ、ＴＥＡＤ２、及びＨＭＧＡ２の各々の下方制御された発現を予測した。

【０２３３】

実施例５

成体富化リプレッサーの発現は、ＧＰＣにおいて加齢関連転写変化を誘導する

次に、図４のパネルＧで同定された４個の成体富化転写リプレッサーＥ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３、ＭＡＸ、及びＺＮＦ２７４が個々に、そうでなければ若年のＧＰＣによる遺伝子発現の加齢関連変化の側面を誘導するのに十分であるか否かを調べた。これを達成するために、ドキシサイクリン（Ｄｏｘ）誘導性過剰発現レンチウイルスを、各転写因子ごとに設計した（図５、パネルＡ）。簡単に説明すると、内因性加齢関連上方制御を最も良好に模倣するために、まず、どのタンパク質コードアイソフォームが成体ＧＰＣに最も多く存在するかを各リプレッサーごとに同定した。こうした候補は、Ｅ２Ｆ６－２０２、ＩＫＺＦ３－２１７、ＭＡＸ－２０１、及びＺＮＦ２７４－２０１だった。こうしたｃＤＮＡを、テトラサイクリン応答エレメントプロモーターの下流であり、Ｔ２Ａ自己切断性ＥＧＦＰレポーターの上流にクローニングした（図５、パネルＡ）。次いで、以前に記載のように（Ｗａｎｇら、「Ｈｕｍａｎ ｉＰＳＣ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ Ｃａｎ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ａｎｄ Ｒｅｓｃｕｅ ａ Ｍｏｕｓｅ Ｍｏｄｅｌ ｏｆ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌ Ｈｙｐｏｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １２巻：２５２～２６４頁（２０１３年）、この文献はその全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）Ｃ２７系から調製したヒト誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）由来ｈＧＰＣ培養物を２４時間感染させ、次いでＤｏｘで処理して、導入遺伝子過剰発現を誘導した。Ｃ２７ ｉＰＳＣ由来ＧＰＣを選択したのは、それらのトランスクリプトームが胎児のものと似ており、移植すると同様に生着し、髄鞘形成不全マウスをミエリン化することが可能であるためだった（Ｗａｎｇら、「Ｈｕｍａｎ ｉＰＳＣ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ Ｃｅｌｌｓ Ｃａｎ Ｍｙｅｌｉｎａｔｅ ａｎｄ Ｒｅｓｃｕｅ ａ Ｍｏｕｓｅ Ｍｏｄｅｌ ｏｆ Ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌ Ｈｙｐｏｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １２巻：２５２～２６４頁（２０１３年）及びＷｉｎｄｒｅｍら、「Ｈｕｍａｎ ｉＰＳＣ Ｇｌｉａｌ Ｍｏｕｓｅ Ｃｈｉｍｅｒａｓ Ｒｅｖｅａｌ Ｇｌｉａｌ Ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｉｏｎｓ ｔｏ Ｓｃｈｉｚｏｐｈｒｅｎｉａ」、Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２１巻：１９５－２０８．ｅ１９６（２０１７年）、こうした文献はそれらの全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる）。Ｄｏｘ添加の３、７、及び１０日後に、過剰発現細胞を、ＥＧＦＰ発現でＦＡＣＳにより選択した（図５、パネルＢ、ｎ＝３～５）。Ｄｏｘを与えた非感染培養物を対照として使用した。

【０２３４】

ＲＮＡを抽出し、目的の加齢関連遺伝子をｑＰＣＲで分析した。各成体富化リプレッサーの有意な誘導が、Ｄｏｘ補完後の各時点で観察された（図５、パネルＣ）。ＭＫＩ６７及びＣＤＫ１は、その上方制御が活発な細胞分裂に関連付けられている遺伝子であり、各過剰発現パラダイムにおいて２つ又はそれよりも多くの時点で有意に抑制された（図５、パネルＤ）。これは、成体ＧＰＣにおけるそれらの発現減少と一致し（図３、パネルＦ）、Ｅ２Ｆ６、ＭＡＸ、及びＺＮＦ２７４（ＭＫＩ６７）による、又は４つすべて（ＣＤＫ１）によるそれらの直接的抑制を示唆した。ＰＤＧＦ－ＡＡのコグネート受容体であるＧＰＣ期マーカーＰＤＧＦＲＡも、３日目のＩＫＺＦ３形質導入ＧＰＣ並びにＥ２Ｆ６形質導入ＧＰＣでは２つの時点で有意に抑制され、正常な成体ＧＰＣでの抑制と一致した。興味深いことに、老化関連サイクリン依存性キナーゼ阻害剤ＣＤＫＮ１Ａ／ｐ２１は、試験したリプレッサーの各々に応答してすべての時点で上方制御されたが、ＣＤＫＮ２Ａ／ｐ１６は、７日目には、ＺＮＦ２７４形質導入ｈＧＰＣにおいて並びにＥ２Ｆ６過剰発現ＧＰＣにおいてすべての時点で同様に上方制御された（図５、パネルＤ）。加えて、両方とも胎児と比べて成体ｈＧＰＣで強力に上方制御されるＭＢＰ及びＩＬ１Ａは両方とも、リプレッサー形質導入に応答して上方制御発現に対する明確な傾向を呈したが、時点関連変動性により、それらの増加は統計的有意性を達成することが妨げられた。まとめると、こうしたデータは、成体富化ＧＰＣリプレッサーＥ２Ｆ６、ＩＫＺＦ３、ＭＡＸ、及びＺＮ

Ｆ２７４の強制的な未熟発現が個々に、若年ｉＰＳＣ由来ＧＰＣにおいて加齢ＧＰＣトランスクリプトームの複数の特徴を誘導するのに十分であるという本発明者らの予測を裏付けた。

【０２３５】

実施例６

胎児ｈＧＰＣのｍｉＲＮＡ発現パターンは老化の抑制を予測する

遺伝子発現の潜在的な転写後調節因子を同定するために、本発明者らは、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧｅｎｅＣｈｉｐ ｍｉＲＮＡ ３．０アレイを使用して、成体ＧＰＣと胎児ＧＰＣとの間のｍｉＲＮＡ発現の違いを評価した（ｎ＝４）。ＰＣＡは、ｍｉＲＮＡ発現プロファイルにより規定すると、両ＧＰＣ集団が分離されること示した（図６、パネルＡ）。両年齢間での差次的発現（調整済みｐ値＜０．０１）は、５６個の遺伝子をもたらした（２３個は成体ＧＰＣで富化されており、３３個は胎児ＧＰＣで富化されていた。図６、パネルＢ～Ｃ）。注目すべきは、こうした差次的に発現されるｍｉＲＮＡの中には、胎児前駆細胞期ｍｉＲＮＡ ｍｉＲ－９－３ｐ、ｍｉＲ－９－５ｐ（Ｌａｕ，Ｐ．、Ｖｅｒｒｉｅｒ，Ｊ．Ｄ．、Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｊ．Ａ．、Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｋ．Ｒ．、Ｎｏｔｔｅｒｐｅｋ，Ｌ．、及びＨｕｄｓｏｎ，Ｌ．Ｄ．（２００８年）．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｙｎａｍｉｃａｌｌｙ ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ａｎｄ ｍＲＮＡ ｎｅｔｗｏｒｋｓ ｉｎ ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅｓ．Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２８巻、１１７２０～１１７３０頁）、及びｍｉＲ－１７－５ｐ（Ｂｕｄｄｅ，Ｈ．、Ｓｃｈｍｉｔｔ，Ｓ．、Ｆｉｔｚｎｅｒ，Ｄ．、Ｏｐｉｔｚ，Ｌ．、Ｓａｌｉｎａｓ－Ｒｉｅｓｔｅｒ，Ｇ．、及びＳｉｍｏｎｓ，Ｍ．（２０１０年）．Ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｇｌｉａｌ ｃｅｌｌ ｎｕｍｂｅｒ ｂｙ ｔｈｅ ｍｉＲ－１７－９２ ｃｌｕｓｔｅｒ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １３７巻、２１２７頁）に加えて、成体オリゴデンドロサイト調節因子ｍｉＲ－２１９ａ－３ｐ及びｍｉＲ－３３８－５ｐ（Ｄｕｇａｓ，Ｊ．Ｃ．、Ｃｕｅｌｌａｒ，Ｔ．Ｌ．、Ｓｃｈｏｌｚｅ，Ａ．、Ａｓｏｎ，Ｂ．、Ｉｂｒａｈｉｍ，Ａ．、Ｅｍｅｒｙ，Ｂ．、Ｚａｍａｎｉａｎ，Ｊ．Ｌ．、Ｆｏｏ，Ｌ．Ｃ．、ＭｃＭａｎｕｓ，Ｍ．Ｔ．、及びＢａｒｒｅｓ，Ｂ．Ａ．（２０１０年）．Ｄｉｃｅｒ１ ａｎｄ ｍｉＲ－２１９ Ａ ｒｅ ｒｅｑｕｉｒｅｄ ｆｏｒ ｎｏｒｍａｌ ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ａｎｄ ｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ．Ｎｅｕｒｏｎ ６５巻、５９７～６１１頁）があった。

【０２３６】

この研究では、次に、ｍｉＲＮＡのこのコホートを使用して、それらの発現がｍｉＲＮＡ上方制御により抑制されることが予想され得る遺伝子を予測し、成体ＧＰＣプール及び胎児ＧＰＣプールの両方を別々に分析した。これを達成するために、ｍｉＲＮＡｔａｐを使用して、５つのｍｉＲＮＡ遺伝子標的データベースをクエリーした：ＤＩＡＮＡ（Ｍａｒａｇｋａｋｉｓ，Ｍ．、Ｖｅｒｇｏｕｌｉｓ，Ｔ．、Ａｌｅｘｉｏｕ，Ｐ．、Ｒｅｃｚｋｏ，Ｍ．、Ｐｌｏｍａｒｉｔｏｕ，Ｋ．、Ｇｏｕｓｉｓ，Ｍ．、Ｋｏｕｒｔｉｓ，Ｋ．、Ｋｏｚｉｒｉｓ，Ｎ．、Ｄａｌａｍａｇａｓ，Ｔ．、及びＨａｔｚｉｇｅｏｒｇｉｏｕ，Ａ．Ｇ．（２０１１年）．ＤＩＡＮＡ－ｍｉｃｒｏＴ Ｗｅｂ ｓｅｒｖｅｒ ｕｐｇｒａｄｅ ｓｕｐｐｏｒｔｓ Ｆｌｙ ａｎｄ Ｗｏｒｍ ｍｉＲＮＡ ｔａｒｇｅｔ ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｂｉｂｌｉｏｇｒａｐｈｉｃ ｍｉＲＮＡ ｔｏ ｄｉｓｅａｓｅ ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３９巻、Ｗ１４５～１４８頁）、Ｍｉｒａｎｄａ（Ｅｎｒｉｇｈｔ，Ａ．Ｊ．、Ｊｏｈｎ，Ｂ．、Ｇａｕｌ，Ｕ．、Ｔｕｓｃｈｌ，Ｔ．、Ｓａｎｄｅｒ，Ｃ．、及びＭａｒｋｓ，Ｄ．Ｓ．（２００３年）．ＭｉｃｒｏＲＮＡ ｔａｒｇｅｔｓ ｉｎ Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ．Ｇｅｎｏｍｅ ｂｉｏｌｏｇｙ ５巻、Ｒ１）、ＰｉｃＴａｒ（Ｌａｌｌ，Ｓ．、Ｇｒｕｎ，Ｄ．、Ｋｒｅｋ，Ａ．、Ｃｈｅｎ，Ｋ．、Ｗａｎｇ，Ｙ．Ｌ．、Ｄｅｗｅｙ，Ｃ．Ｎ．、Ｓｏｏｄ，Ｐ．、Ｃｏｌｏｍｂｏ，Ｔ．、Ｂｒａｙ，Ｎ．、Ｍａｃｍｅｎａｍｉｎ，Ｐ．ら（２００６年）．Ａ ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ｍａｐ ｏｆ ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ

ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｔａｒｇｅｔｓ ｉｎ Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ．Ｃｕｒｒｅｎｔ ｂｉｏｌｏｇｙ：ＣＢ１６、４６０～４７１頁）、ＴａｒｇｅｔＳｃａｎ（Ｆｒｉｅｄｍａｎ，Ｒ．Ｃ．、Ｆａｒｈ，Ｋ．Ｋ．、Ｂｕｒｇｅ，Ｃ．Ｂ．、及びＢａｒｔｅｌ，Ｄ．Ｐ．（２００９年）．Ｍｏｓｔ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｍＲＮＡｓ ａｒｅ ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ ｔａｒｇｅｔｓ ｏｆ ｍｉｃｒｏＲＮＡｓ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ １９巻、９２～１０５頁）、及びｍｉＲＤＢ（Ｗｏｎｇ，Ｎ．及びＷａｎｇ，Ｘ．（２０１５年）．ｍｉＲＤＢ：ａｎ ｏｎｌｉｎｅ ｒｅｓｏｕｒｃｅ ｆｏｒ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｔａｒｇｅｔ ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ａｎｎｏｔａｔｉｏｎｓ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４３巻、Ｄ１４６～１５２頁）。

【０２３７】

精度を最大化するために、遺伝子は、少なくとも２つのデータベースに出現した場合にのみ標的であるとみなした。この手法は、胎児富化ｍｉＲＮＡでは、１ｍｉＲＮＡ当たり平均で３６．３（ＳＤ＝２４．５）個の遺伝子が抑制されることを予測した。対照的に、成体ｈＧＰＣ富化ｍｉＲＮＡでは、１ｍｉＲＮＡ当たり平均で４６．４（ＳＤ＝３７．８）個の遺伝子が標的であると予測された（図６、パネルＣ）。まとめると、これは、胎児ｍｉＲＮＡにより成体ＧＰＣ富化遺伝子の４８．８％が抑制される可能性があり、成体ｍｉＲＮＡにより胎児ＧＰＣ富化遺伝子の３９．９％が抑制される可能性があることを同定した。

【０２３８】

こうしたｍｉＲＮＡ依存性転写後調節機序の機能的重要性を評価するために、この研究では、機能的に関連し、差次的に発現される遺伝子のｍｉＲＮＡ標的化に従って胎児及び成体ネットワークを厳選した（図６、パネルＤ～Ｅ）。提案された上流成体転写調節因子ＳＴＡＴ３、Ｅ２Ｆ６、及びＭＡＸは、胎児ＧＰＣにおいて７つのｍｉＲＮＡにより阻害されることが予測された（図２４、パネルＤ）。それらには、ｍｉＲ－１２６ｂ－５ｐ、ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、及びｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐによる他の細胞タイプにおけるＳＴＡＴ３の既に検証されている抑制が含まれる（Ｄｕ，Ｗ．、Ｐａｎ，Ｚ．、Ｃｈｅｎ，Ｘ．、Ｗａｎｇ，Ｌ．、Ｚｈａｎｇ，Ｙ．、Ｌｉ，Ｓ．、Ｌｉａｎｇ，Ｈ．、Ｘｕ，Ｃ．、Ｚｈａｎｇ，Ｙ．、Ｗｕ，Ｙ．ら（２０１４年ａ）．Ｂｙ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｓｔａｔ３ ｍｉｃｒｏＲＮＡ－１７－５ｐ Ｐｒｏｍｏｔｅｓ Ｃａｒｄｉｏｍｙｏｃｙｔｅ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｔｏ Ｉｓｃｈｅｍｉａ Ｆｏｌｌｏｗｅｄ ｂｙ Ｒｅｐｅｒｆｕｓｉｏｎ．Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３４巻、９５５～９６５頁）。並行して、少なからぬ初期及び成熟オリゴデンドロサイト遺伝子が同時に阻害の標的とされ、すべては前駆細胞状態の維持と一致していた。それらには、ＭＢＰ、ＵＧＴ８、ＣＤ９、ＰＬＰ１、ＭＹＲＦ、及びＰＭＰ２２が含まれていた（Ｇｏｌｄｍａｎ，Ｓ．Ａ．及びＫｕｙｐｅｒｓ，Ｎ．Ｊ．（２０１５年）．Ｈｏｗ ｔｏ ｍａｋｅ ａｎ ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １４２巻、３９８３～３９９５頁）。重要なことには、老化の誘導もしくは増殖の阻害のいずれか、又はその両方に関係付けられる遺伝子のコホートも、胎児ＧＰＣにおいて活発に抑制されることが予測された。それらには、ＲＵＮＸ１、ＲＵＮＸ２、ＢＩＮ１、ＤＭＴＦ１／ＤＭＰ１、ＣＴＮＮＡ１、ＳＥＲＰＩＮＥ１、ＣＤＫＮ１Ｃ、ＰＡＫ１、ＩＦＩ１６、ＥＦＥＭＰ１、ＭＡＰ３Ｋ７、ＡＨＲ、ＯＧＴ、ＣＢＸ７、及びＣＹＬＤが含まれていた（Ｅｃｋｅｒｓ，Ａ．、Ｊａｋｏｂ，Ｓ．、Ｈｅｉｓｓ，Ｃ．、Ｈａａｒｍａｎｎ－Ｓｔｅｍｍａｎｎ，Ｔ．、Ｇｏｙ，Ｃ．、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ，Ｖ．、Ｃｏｒｔｅｓｅ－Ｋｒｏｔｔ，Ｍ．Ｍ．、Ｓａｎｓｏｎｅ，Ｒ．、Ｅｓｓｅｒ，Ｃ．、Ａｌｅ－Ａｇｈａ，Ｎ．ら（２０１６年）．Ｔｈｅ ａｒｙｌ ｈｙｄｒｏｃａｒｂｏｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｐｒｏｍｏｔｅｓ ａｇｉｎｇ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅｓ ａｃｒｏｓｓ ｓｐｅｃｉｅｓ．Ｓｃｉ Ｒｅｐ ６巻、１９６１８頁）。また、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－９３－３ｐ、ｍｉＲ－１２６０ｂ、ｍｉＲ－１０６ａ－５ｐ、ｍｉＲ－７６７－５ｐ、ｍｉＲ－１３０ａ－３ｐ、ｍｉＲ－９－３ｐ、ｍｉＲ－９－５ｐ、及びｍｉＲ－１３０ｂ－３ｐを含

む、ここで同定されたｍｉＲＮＡの幾つかにより、老化の阻害又は増殖の活性化が認められた。まとめると、こうしたデータは、胎児ｈＧＰＣがそれらの特徴的な前駆細胞転写状態及びシグネチャを維持することができる補完的な機序を提供する。

【０２３９】

実施例７

成体ｍｉＲＮＡシグナル伝達は、増殖前駆細胞状態を抑制し老化の前兆となる可能性がある

次に、この研究では、成体ｈＧＰＣ内の潜在的なｍｉＲＮＡ調節ネットワークを調査した（図６、パネルＥ）。これは、ＨＤＡＣ２、ＮＦＩＢ、ＢＣＬＬ１Ａ、ＴＥＡＤ２、及びＨＭＧＡ２を含む、５個の同定された活性胎児転写調節因子を制御する５つのｍｉＲＮＡの関与を示唆し、ｍｉＲ－４６５１によるそれらのサイレンシングは増殖を阻害することが以前に示されている（Ｈａｎ，Ｘ．、Ｙａｎｇ，Ｒ．、Ｙａｎｇ，Ｈ．、Ｃａｏ，Ｙ．、Ｈａｎ，Ｎ．、Ｚｈａｎｇ，Ｃ．、Ｓｈｉ，Ｒ．、Ｚｈａｎｇ，Ｚ、Ｆａｎ，Ｚ．（２０２０年）．ｍｉＲ－４６５１ ｉｎｈｉｂｉｔｓ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｇｉｎｇｉｖａｌ ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ ＨＭＧＡ２ ｕｎｄｅｒ ｎｉｆｅｄｉｐｉｎｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ．Ｉｎｔ Ｊ Ｏｒａｌ Ｓｃｉ １２巻、１０頁）。ｍｉＲＮＡのこのコホートは、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＴＰＲＺ１、ＺＢＴＢ１８、ＳＯＸ６、ＥＧＦＲ、及びＮＲＸＮ１を含む、ＧＰＣ前駆細胞状態の維持に関与する遺伝子の発現阻害に、成体転写リプレッサーと並行して作動することが予測された。さらに、成体ｍｉＲＮＡ環境は、増殖状態を誘導するか又は老化を遅延させることが知られている数多くの遺伝子を抑制することが予測された。そうした遺伝子としては以下のものが挙げられる：ＬＭＮＢ１（Ｆｒｅｕｎｄ，Ａ．、Ｌａｂｅｒｇｅ，Ｒ．Ｍ．、Ｄｅｍａｒｉａ，Ｍ．、及びＣａｍｐｉｓｉ，Ｊ．（２０１２年）．Ｌａｍｉｎ Ｂ１ ｌｏｓｓ ｉｓ ａ ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｂｉｏｍａｒｋｅｒ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｅｌｌ ２３巻、２０６６～２０７５頁）、ＰＡＴＺ１（Ｃｈｏ，Ｊ．Ｈ．、Ｋｉｍ，Ｍ．Ｊ．、Ｋｉｍ，Ｋ．Ｊ．、及びＫｉｍ，Ｊ．Ｒ．（２０１２年）．ＰＯＺ／ＢＴＢ ａｎｄ ＡＴ－ｈｏｏｋ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｚｉｎｃ ｆｉｎｇｅｒ ｐｒｏｔｅｉｎ １（ＰＡＴＺ１）ｉｎｈｉｂｉｔｓ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌ ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ ｔｈｒｏｕｇｈ ａ ｐ５３ ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｐａｔｈｗａｙ．Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｆｆｅｒ １９巻、７０３～７１２頁）、ＧＡＤＤ４５Ａ（Ｈｏｌｌａｎｄｅｒ，Ｍ．Ｃ．、Ｓｈｅｉｋｈ，Ｍ．Ｓ．、Ｂｕｌａｖｉｎ，Ｄ．Ｖ．、Ｌｕｎｄｇｒｅｎ，Ｋ．、Ａｕｇｅｒｉ－Ｈｅｎｍｕｅｌｌｅｒ，Ｌ．、Ｓｈｅｈｅｅ，Ｒ．、Ｍｏｌｉｎａｒｏ，Ｔ．Ａ．、Ｋｉｍ，Ｋ．Ｅ．、Ｔｏｌｏｓａ，Ｅ．、Ａｓｈｗｅｌｌ，Ｊ．Ｄ．ら（１９９９年）．Ｇｅｎｏｍｉｃ ｉｎｓｔａｂｉｌｉｔｙ ｉｎ Ｇａｄｄ４５ａ－ｄｅｆｉｃｉｅｎｔ ｍｉｃｅ．Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ ２３巻、１７６～１８４頁）、ＹＡＰ１及びＴＥＡＤ１（Ｘｉｅ，Ｑ．、Ｃｈｅｎ，Ｊ．、Ｆｅｎｇ，Ｈ．、Ｐｅｎｇ，Ｓ．、Ａｄａｍｓ，Ｕ．、Ｂａｉ，Ｙ．、Ｈｕａｎｇ，Ｌ．、Ｌｉ，Ｊ．、Ｈｕａｎｇ，Ｊ．、Ｍｅｎｇ，Ｓ．ら（２０１３年）．ＹＡＰ／ＴＥＡＤ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｃｏｎｔｒｏｌｓ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７３巻、３６１５～３６２４頁）、ＣＤＫ１（Ｄｉｒｉｌ，Ｍ．Ｋ．、Ｒａｔｎａｃａｒａｍ，Ｃ．Ｋ．、Ｐａｄｍａｋｕｍａｒ，Ｖ．Ｃ．、Ｄｕ，Ｔ．、Ｗａｓｓｅｒ，Ｍ．、Ｃｏｐｐｏｌａ，Ｖ．、Ｔｅｓｓａｒｏｌｌｏ，Ｌ．、及びＫａｌｄｉｓ，Ｐ．（２０１２年）．Ｃｙｃｌｉｎ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｋｉｎａｓｅ １ （Ｃｄｋ１） ｉｓ ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ｆｏｒ ｃｅｌｌ ｄｉｖｉｓｉｏｎ ａｎｄ ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ＤＮＡ ｒｅ－ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｂｕｔ ｎｏｔ ｆｏｒ ｌｉｖｅｒ ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０９巻、３８２６～３８３１頁）、ＴＰＸ２（Ｒｏｈｒｂｅｒｇ，Ｊ．、Ｖａｎ ｄｅ Ｍａｒｋ，Ｄ．、Ａｍｏｕｚｇａｒ，Ｍ．、Ｌｅｅ，Ｊ．Ｖ．、Ｔａｉｌｅｂ，Ｍ．、Ｃｏｒｅｌｌａ，Ａ．、Ｋｉｌｉｎｃ，Ｓ．、Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｊ．、Ｊｏｋｉｓ

ch，M．L．、Camarda，R．ら（２０２０年）．MYC Dysregulates Mitosis，Revealing Cancer Vulnerabilities．Cell Rep ３０巻、３３６８～３３８２頁）、S１PR１（Liu，Y．、Zhi，Y．、Song，H．、Zong，M．、Yi，J．、Mao，G．、Chen，L．、及びHuang，G．（２０１９年）．S１PR１ promotes proliferation and inhibits apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma through activating STAT３ pathway．Journal of Experimental&Clinical Cancer Research ３８巻、３６９頁）、RRM２（Aird，K．M．、Zhang，G．、Li，H．、Tu，Z．、Bitler，B．G．、Garipov，A．、Wu，H．、Wei，Z．、Wagner，S．N．、Herlyn，M．ら（２０１３年）．Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene－induced senescence．Cell Rep ３巻、１２５２～１２６５頁）、CCND２（Bunt，J．、de Haas，T．G．、Hasselt，N．E．、Zwijnenburg，D．A．、Koster，J．、Versteeg，R．、及びKool，M．（２０１０年）．Regulation of cell cycle genes and induction of senescence by overexpression of OTX２ in medulloblastoma cell lines．Mol Cancer Res ８巻、１３４４～１３５７頁）、SGO１（Murakami－Tonami，Y．、Ikeda，H．、Yamagishi，R．、Inayoshi，M．、Inagaki，S．、Kishida，S．、Komata，Y．、Jan，K．、Takeuchi，I．、Kondo，Y．ら（２０１６年）．SGO１ is involved in the DNA damage response in MYCN－amplified neuroblastoma cells．Scientific Reports ６巻、３１６１５頁）、MCM４及びMCM６（Mason，D．X．、Jackson，T．J．、及びLin，A．W．（２００４年）．Molecular signature of oncogenic ras－induced senescence．Oncogene ２３巻、９２３８～９２４６頁）、ZNF４２３（Hernandez－Segura，A．、de Jong，T．V．、Melov，S．、Guryev，V．、Campisi，J．、及びDemaria，M．（２０１７年）．Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells．Current biology：CB ２７巻、２６５２～２６６０頁）、PHB（Piper，P．W．、Jones，G．W．、Bringloe，D．、Harris，N．、MacLean，M．、及びMollapour，M．（２００２年）．The shortened replicative life span of prohibitin mutants of yeast appears to be due to defective mitochondrial segregation in old mother cells．Aging cell １巻、１４９～１５７頁）、WLS（Poudel，S．B．、So，H．S．、Sim，H．J．、Cho，J．S．、Cho，E．S．、Jeon，Y．M．、Kook，S．H．、及びLee，J．C．（２０２０年）．Osteoblastic Wntless deletion differentially regulates the fate and functions of bone marrow－derived stem cells in relation to age．Stem Cells．）、並びにZMAT３（Kim，B．C．、Lee，H．C．、Lee，J．J．、Choi，C．M．、Kim，D．K．、Lee，J．C．、Ko，Y．G．、及びLee，J．S．（２０１２年）．Wig１ prevents cellular sene

scence by regulating p21 mRNA decay through control of RISC recruitment. EMBO J 31巻、4289～4303頁）。より直接的には、老化の誘導又は増殖の阻害は、miR－584－5p（Li，Q.、Li，Z.、Wei，S.、Wang，W.、Chen，Z.、Zhang，L.、Chen，L.、Li，B.、Sun，G.、Xu，J.ら（2017年）.Overexpression of miR－584－5p inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting WW domain－containing E3 ubiquitin protein ligase 1 in gastric cancer.J Exp Clin Cancer Res 36巻、59頁）、miR－193a－5p（Chen，J.、Gao、S.、Wang、C.、Wang、Z.、Zhang，H.、Huang，K.、Zhou，B.、Li，H.、Yu，Z.、Wu，J.ら（2016年）.Pathologically decreased expression of miR－193a contributes to metastasis by targeting WT1－E－cadherin axis in non－small cell lung cancers.J Exp Clin Cancer Res 35巻，173頁）、miR－548ac（Song，F.、Yang，Y.、及びLiu，J.（2020年）.MicroRNA－548ac induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma cells by targeting transmembrane protein 158.Oncol Lett 20巻，69頁）、miR－23b－3p（Campos－Viguri，G.E.、Peralta－Zaragoza，O.、Jimenez－Wences，H.、Longinos－Gonzalez，A.E.、Castanon－Sanchez，C.A.、Ramirez－Carrillo，M.、Camarillo，C.L.、Castaneda－Saucedo，E.、Jimenez－Lopez，M.A.、Martinez－Carrillo，D.N.ら（2020年）.MiR－23b－3p reduces the proliferation，migration and invasion of cervical cancer cell lines via the reduction of c－Met expression.Sci Rep 10巻，3256頁）、miR－140－3p（Wang，M.、Wang，X.、及びLiu，W.（2020a年）.MicroRNA－ 130a－3p promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of cervical cancer cells via negative regulation of RUNX3. Mol Med Rep 22巻，2990～3000頁），及びmiR－330－3p（Wang，Y.、Chen，J.、Wang，X.、及びWang，K.（2020年b）.miR－140－3p inhibits bladder cancer cell proliferation and invasion by targeting FOXQ1.Aging 12巻，20366～20379頁）の上方制御に関係付けられている。総合すると、こうしたデータは、こうしたmiRが、胎児hGPCの前駆細胞状態の維持における活性参加因子であること、及びそれらのモジュレーションは、成体hGPCがそれらのシグネチャ遺伝子発現プロファイルを呈する考え得る機序であることを示唆している。

【0240】

実施例8

miRNAの転写因子調節はGPC同一性を確立及び強化する

次に、この研究では、TransmiR転写因子miRNA調節データベース（Tongら（2011年）.TransmiR v2.0：an updated transcription factor－microRNA regulation database. Nucleic Acids Res 47巻、D253～D258頁）を

クエリーすることにより、胎児ＧＰＣ及び成体ＧＰＣで差次的に発現されるｍｉＲＮＡの上流調節を予測しようとした。この手法では、胎児ＧＰＣと成体ＧＰＣとの間で有意に差次的に発現されることが同様に決定された６６個の転写因子により、５６個の年齢特異的ＧＰＣ ｍｉＲＮＡのうち５４個が調節されることが予測された。興味深いことに、上位４つの予測されたｍｉＲＮＡ調節ＴＦは、ＭＡＸ、ＭＹＣ自体、Ｅ２Ｆ６、及び胎児富化ＭＹＣ関連ジンクフィンガータンパク質ＭＡＺを含む、すべてのＭＹＣ関連因子であり、それぞれ３６、３３、３０、及び２８個の固有の差次的発現ｍｉＲＮＡを標的とした。

【０２４１】

１２個のＴＦ候補の状況にて提案された関係性を調査したところ、少なからぬ胎児ｈＧＰＣ富化ｍｉＲＮＡが、胎児活性化因子及び成体リプレッサーの両方により標的とされると予測されたのに対し、成体ＧＰＣにて富化されたｍｉＲＮＡはより固有に標的とされたことが示された。ＭＹＣは、胎児ＧＰＣにて数多くのｍｉＲＮＡの発現を駆動することが予測され、それらの多くは成人期にはＥ２Ｆ６、ＭＡＸ、又はその両方により抑制されることが予測された。特にｍｉＲ－１３０ａ－３ｐは、ＴＥＡＤ２による活性化に加えて、ＭＹＣ、ＭＡＸ、及びＥ２Ｆ６により標的とされることが予測された。注目すべきことには、他の細胞タイプで検証されたＴＦ－ｍｉＲＮＡ相互作用の中で、若返りのｍｉＲ－１７－５ｐのＭＹＣによる上方制御及びＭＡＸによるその抑制（Ｄｕら（２０１４年ｂ）．ｍｉＲ－１７ ｅｘｔｅｎｄｓ ｍｏｕｓｅ ｌｉｆｅｓｐａｎ ｂｙ ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｂｙ ＭＫＰ７．Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｓ ５巻、ｅ１３５５頁）が報告されている。同様に、ＭＹＣ又はＴＥＡＤ２及びＹＡＰ１による増殖性ｍｉＲ－１３０－３ｐの並行した活性化（Ｓｈｅｎら（２０１５年）．Ａ ｍｉＲ－１３０ａ－ ＹＡＰ ｐｏｓｉｔｉｖｅ ｆｅｅｄｂａｃｋ ｌｏｏｐ ｐｒｏｍｏｔｅｓ ｏｒｇａｎ ｓｉｚｅ ａｎｄ ｔｕｍｏｒｉｇｅｎｅｓｉｓ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ ２５巻、９９７～１０１２頁）が報告されている。また、オリゴデンドロサイトの成熟性と共に減少する（Ｌａｕ，Ｐ．ら（２００８年）．Ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｙｎａｍｉｃａｌｌｙ ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ａｎｄ ｍＲＮＡ ｎｅｔｗｏｒｋｓ ｉｎ ｄｅｖｅｌｏｐｉｎｇ ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅｓ．Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２８巻、１１７２０～１１７３０頁）、ＭＹＣによるｍｉＲ－９の両アームの活性化（Ｍａ，Ｌ．ら（２０１０年ａ）．ｍｉＲ－９，ａ ＭＹＣ／ＭＹＣＮ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｍｉｃｒｏＲＮＡ，ｒｅｇｕｌａｔｅｓ Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ ａｎｄ ｃａｎｃｅｒ ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ．Ｎａｔ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ １２巻、２４７～２５６頁）も報告されている。

【０２４２】

成体ＧＰＣでは、本発明者らの有意に富化されたＴＦコホートにより調節されることが予測された富化ｍｉＲＮＡは、胎児リプレッサーの成体活性化因子によってのみ標的化され、ＨＭＧＡ２の予測阻害剤であるｍｉＲ－１５１ａ－５ｐ及びｍｉＲ－４６８７－３ｐのみは、それぞれＢＣＬ１１Ａ及びＥＺＨ２と対比してＳＴＡＴ３により逆に標的とされる可能性がより高かった。これの他に、ｍｉＲ－１２６８ｂは、ＥＺＨ２及びＨＤＡＣ２の両方により並行して阻害されることが予測された。注目すべきことには、重要なオリゴデンドロサイトマイクロＲＮＡであるｍｉＲ－２１９ａ－２－３ｐは、胎児ＧＰＣにおいてＥＺＨ２により阻害されたままであることが予測されたが、ＳＴＡＴ３は、７つの他のｍｉＲの発現を独立して駆動する可能性が高い。興味深いことに、その活性の増加が老化と関係付けられているＳＴＡＴ３（Ｋｏｊｉｍａら（２０１３年）．ＩＬ－６－ＳＴＡＴ３ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ａｎｄ ｐｒｅｍａｔｕｒｅ ｓｅｎｅｓｃｅｎｃｅ．ＪＡＫ ＳＴＡＴ ２巻、ｅ２５７６３頁）は、ｍｉＲ－５８４－５ｐ、ｍｉＲ－３３０－３ｐ、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ、及びｍｉＲ－１４０－３ｐを含む、独立して老化誘導と関連付けられているｍｉＲＮＡのコホートの発現を駆動することも予測された。

【０２４３】

転写プロファイリング及びｍｉＲＮＡプロファイリング、経路富化解析、及び標的予測

を統合して、本発明者らは、胎児ｈＧＰＣが、前駆細胞遺伝子発現を維持し、増殖プログラムを活性化し、老化を防止する一方、オリゴデンドロサイト及び老化遺伝子プログラムを転写的にもマイクロＲＮＡにより転写後にも抑制するという、ヒトＧＰＣ加齢のモデルを提案する。成体成熟及び時間の経過並びに集団倍加に伴い、ｈＧＰＣは、こうした胎児前駆細胞関連ネットワークのリプレッサーを上方制御し始め、同時に、徐々により分化し最終的には老化表現型を促進するためのプログラムも活性化する。

【０２４４】

実施例９

キメラ動物モデルの脳におけるＢＣＬ１１Ａの発現は、宿主においてＢＣＬ１１Ａ発現ＧＰＣの増殖をもたらす

この研究では、新鮮な組織試料から選別された胎児及び成体ヒトグリア前駆細胞（ＧＰＣ）のＲＮＡ配列決定データを分析することにより、「若年」ＧＰＣと「高齢」ＧＰＣとを区別する遺伝子調節ネットワークの中心をなすものとして、幾つかの転写因子を同定した。それらのうち、転写リプレッサーＢＣＬ１１Ａ（Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫１１Ａ）は、最も顕著に差次的に発現された遺伝子の１つであり、胎児ｈＧＰＣでは高く、成体細胞では低く、それが胎児ｈＧＰＣ表現型を保存する役割を果たしていることが示唆された。ＢＣＬ１１Ａが中枢神経系において、又はグリア前駆細胞の拡大増殖、運命、及び加齢の調節においてそのような役割を果たすことはまったく知られていなかった。

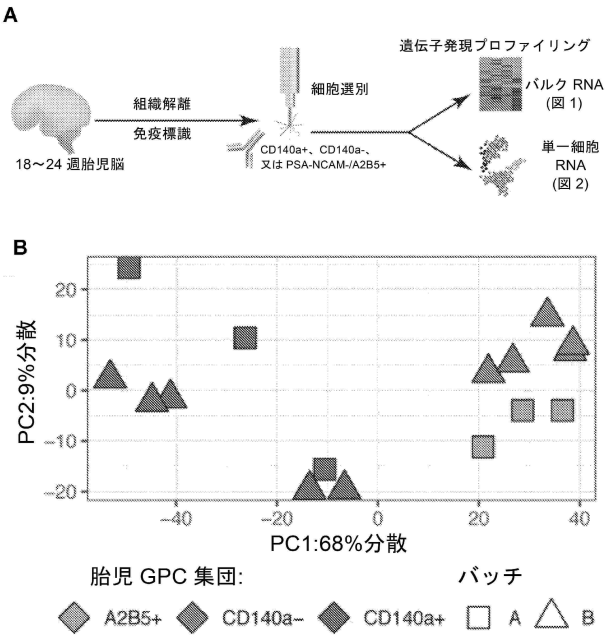
【０２４５】

次いで、ＢＣＬ１１Ａが、加齢ＧＰＣにおいて自己再生を再開又は加速することができるか否かを調査するために、この研究では、ＣＢｈプロモーターにより駆動されるＢＣＬ１１Ａ及びＧＦＰを発現するレンチウイルス（本明細書ではＣＢｈ－ＢＣＬ１１Ａと呼ばれる）、並びに緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）のみの対照ウイルス（ＣＢｈ－ＧＦＰ）を生成した（図１４ａ）。ＧＰＣを、ヒトＣ２７　ｉＰＳＣ系から生成し、赤色蛍光発現導入遺伝子（ＲＦＰ）でタグ付けし（図１４ｂ）、次いで生後１日目のＲａｇ１免疫不全マウスの脳梁（ＣＣ）に以前に記載のように移植した（Ｗｉｎｄｒｅｍら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　３４巻、１６１５３～１６１６１頁（２０１４）、Ｗｉｎｄｒｅｍら、Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　２１巻、１９５～２０８．ｅ６頁（２０１７年））。キメラ化マウスは、生着後２年間の加齢を可能にさせ、その時点でマウスは、左半球にＣＢｈ－ＢＣＬ１１Ａ及び右半球にＣＢｈ－ＧＦＰ対照ウイルスの定位注射を受けた。ウイルスは、線条体、脳梁、及び皮質に沈着した。注射の３週間後又は６週間後のいずれかで、マウスを単細胞分析のために解剖したか、又は切片化及び免疫組織化学のために４％ＰＦＡで灌流したかのいずれかだった（図１４ｃ）。

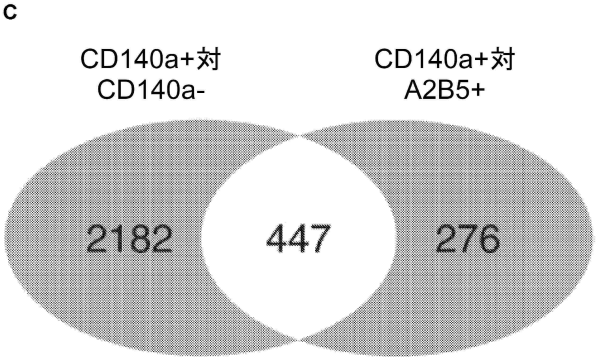
【０２４６】

この研究により、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＲＮＡ発現（図１４ｄ）及びｉｎ　ｖｉｖｏでのタンパク質染色（図１４ｅ）の両方によりＢＣＬ１１Ａの過剰発現が確認された。この研究では、感染の３週間後に、脳の対照側と比較して、ＣＢｈ－ＢＣＬ１１Ａ処理半球でのＧＰＣ集団の拡大増殖が観察された（図１５ａ）。この研究では、ＧＰＣ系統のＲＦＰタグ付きヒト細胞及びＯＬＩＧ２＋細胞の存在のロバストな増加（図１５ｂ、１５ｃで定量化）、並びにマウスＮＧ２抗原により同定された常在マウスＧＰＣの増加（図１５ｄ、１５ｅで定量化）が見出された。この効果は、感染の６週間後でも依然として存在しており（図１６ａ）、ＣＢｈ－ＢＣＬ１１Ａ感染半球では、ＣＢｈ－ＧＦＰ処理対照よりも多くのＲＦＰ＋及びＯＬＩＧ２＋細胞が検出された（図１６ｂ）。その６週間の時点では、ドナー細胞分散は、広範囲かつ比較的均一であり、腫瘍も異所性も見出されなかった。こうした観察は、ＢＣＬ１１Ａ形質導入が、加齢常在ヒト及びマウスＧＰＣを両方とも同様に活性化して、宿主脳の有糸分裂拡大増殖及び遊走性定着を再開させることを示した。さらに、ＢＣＬ１１Ａ動員ヒトドナー細胞の（赤色）膜タグ付けにより、白質にあるドナー細胞の大部分の形態学的特徴がミエリン形成オリゴデンドロサイトであると規定することが可能だった。これは、こうした加齢マウスにおける典型的な加齢関連ミエリン喪失が少なくとも部分的に逆転したことを示唆している。

【０２４７】
種々の実施形態を上記で説明してきたが、そのような開示は例として提示されたものに過ぎず、限定ではないことが理解されるべきである。したがって、本発明の組成物及び方法の幅及び範囲は、上記に記載の例示的な実施形態のいずれによっても限定されるべきではなく、以下の特許請求の範囲及びその均等物によってのみ規定されるべきである。
【０２４８】
上記の説明は、本発明をどのようにして実施するのかを当業者に教示することを目的としており、当業者にとって説明を読めば明らかになるであろう本発明のすべての自明な改変及び変形形態を詳述することを意図したものではない。しかしながら、そのような自明な改変及び変形形態はすべて、以下の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲内に含まれることが意図されている。特許請求の範囲は、状況が特にそうではないことを示さない限り、意図されている目的を達成するのに効果的なあらゆる順序の成分及びステップを網羅することが意図されている。
【図面】
【図１－１】

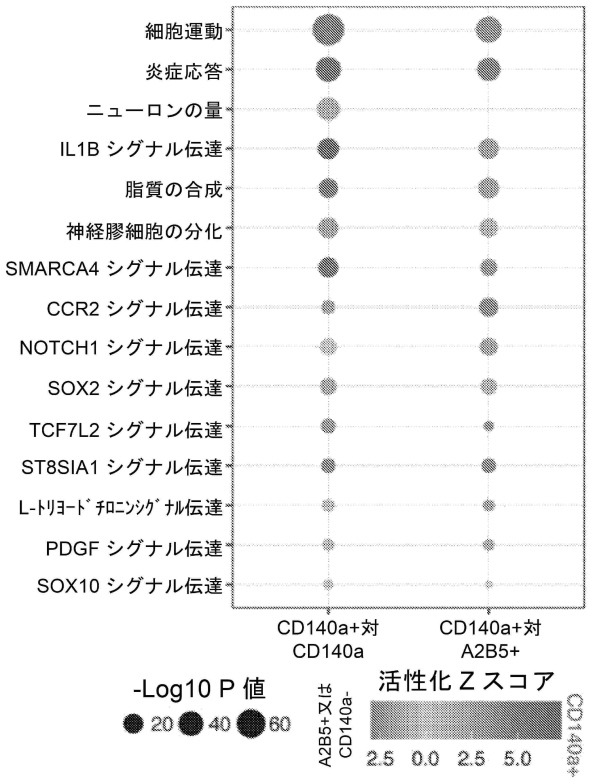


【図１－２】



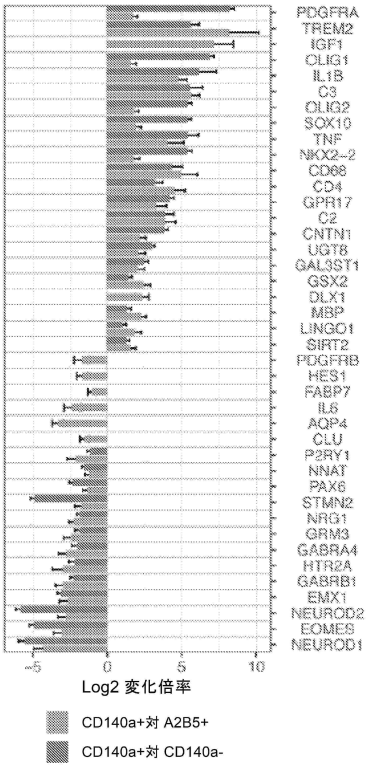
【図１－３】

D



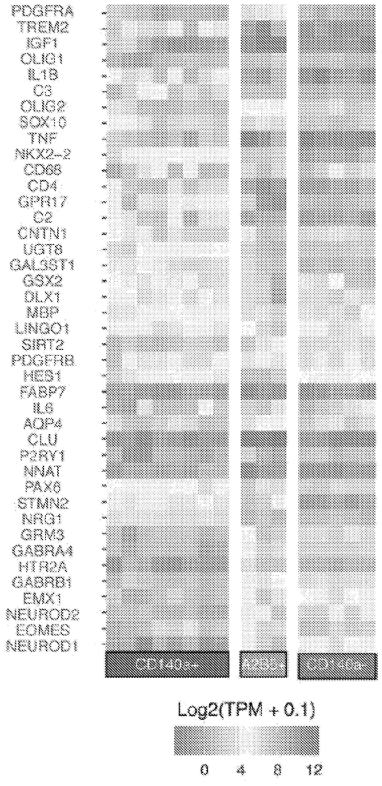
【図１－４】

E



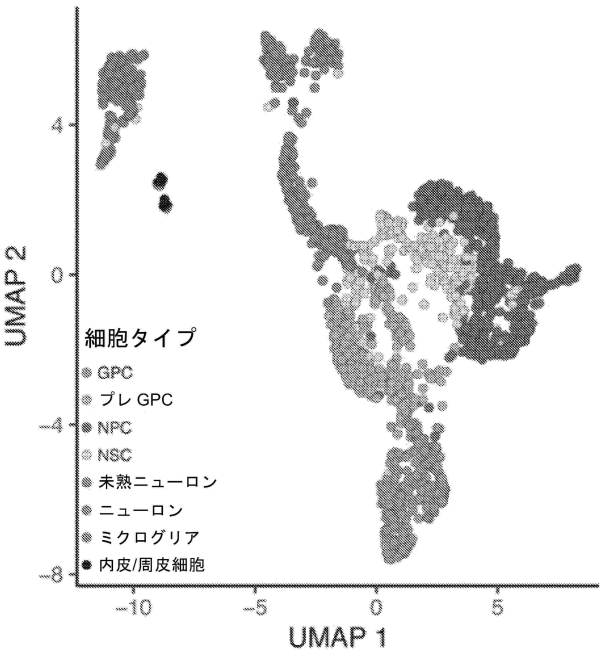
【図１－５】

F

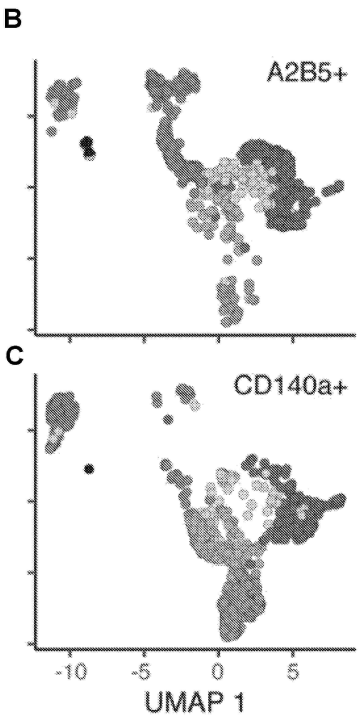


【図２－１】

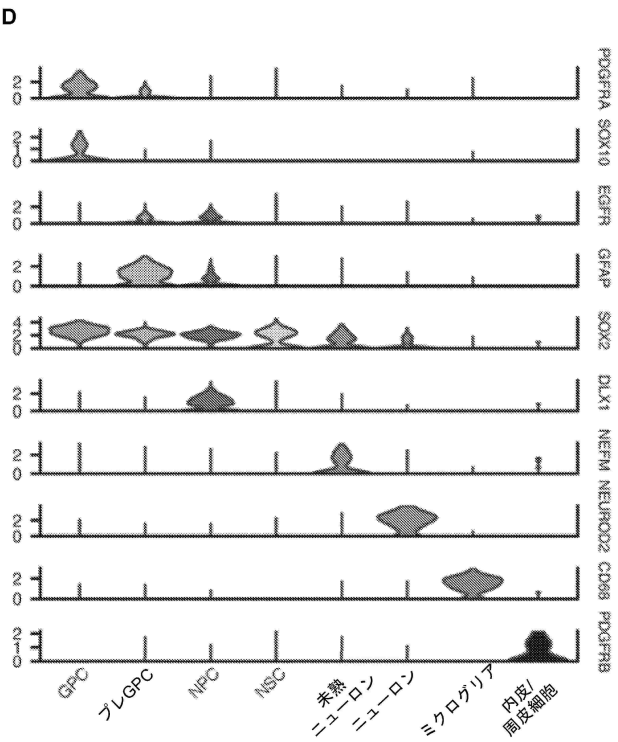
A



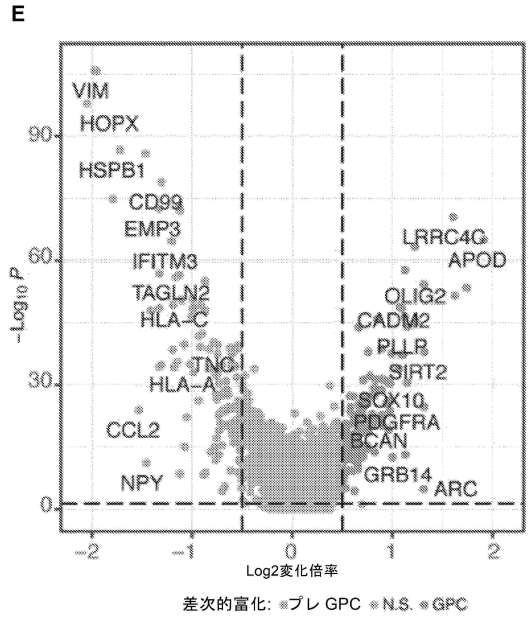
【図２－２】



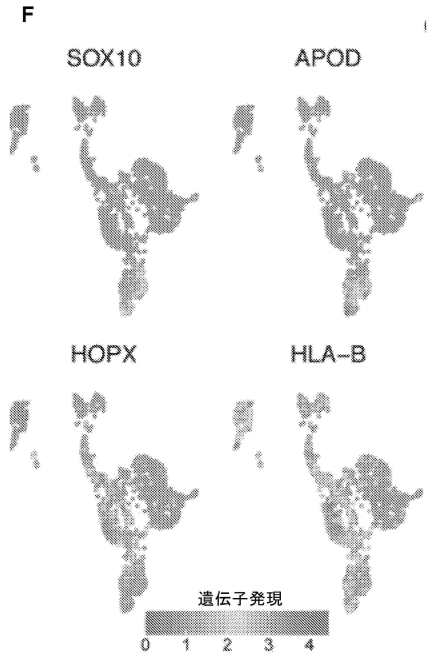
【図２－３】



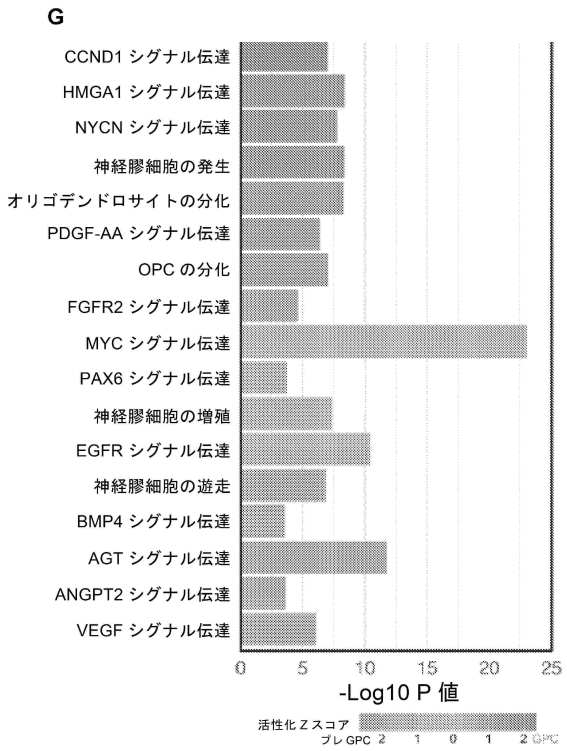
【図２－４】



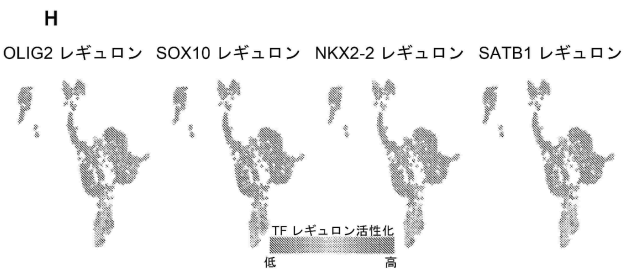
【図２－５】



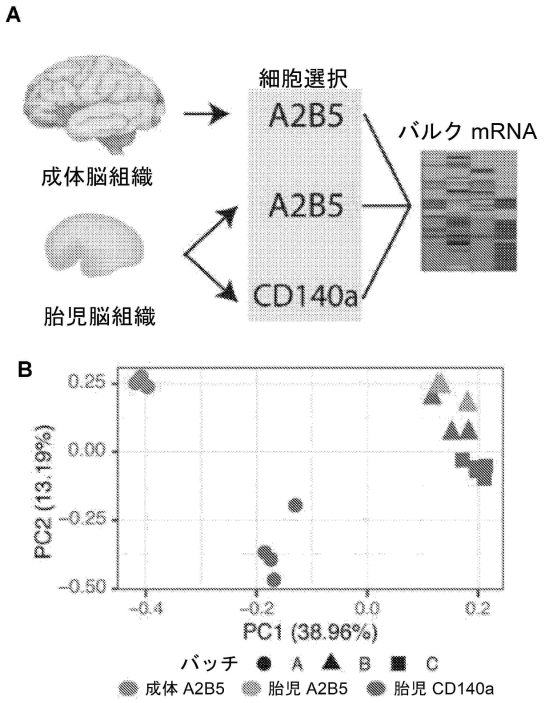
【図２－６】



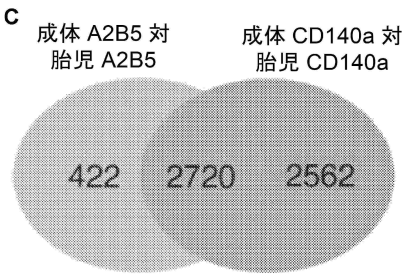
【図２－７】



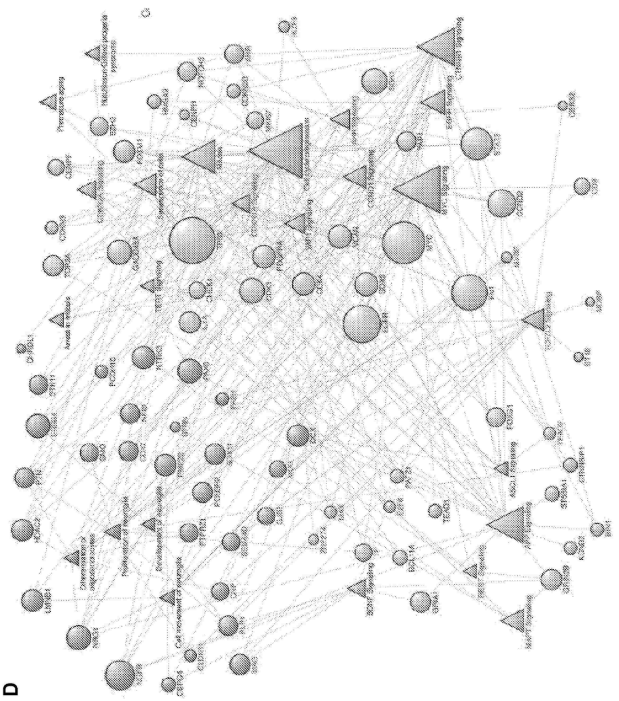
【図３－１】



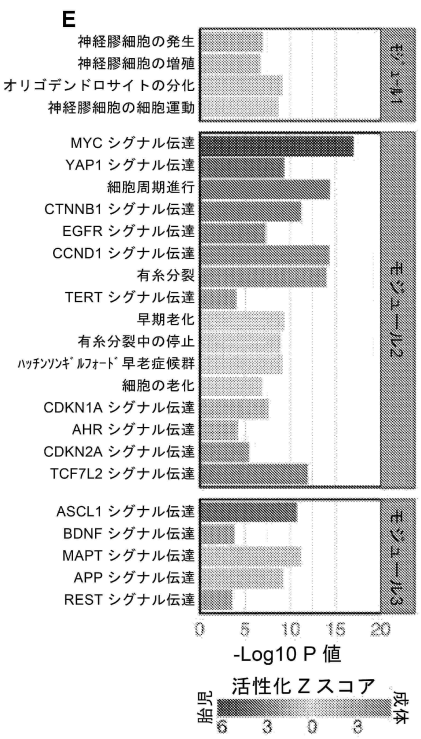
【図３－２】



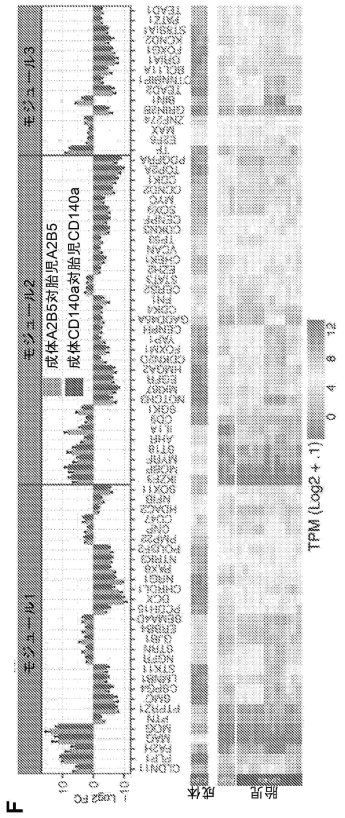
【図３－３】



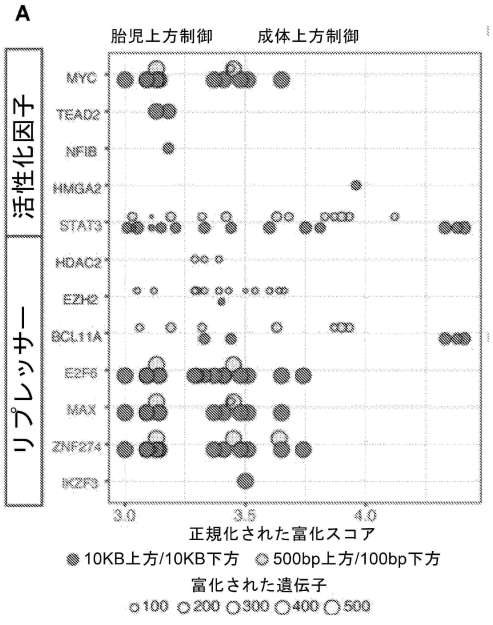
【図３－４】



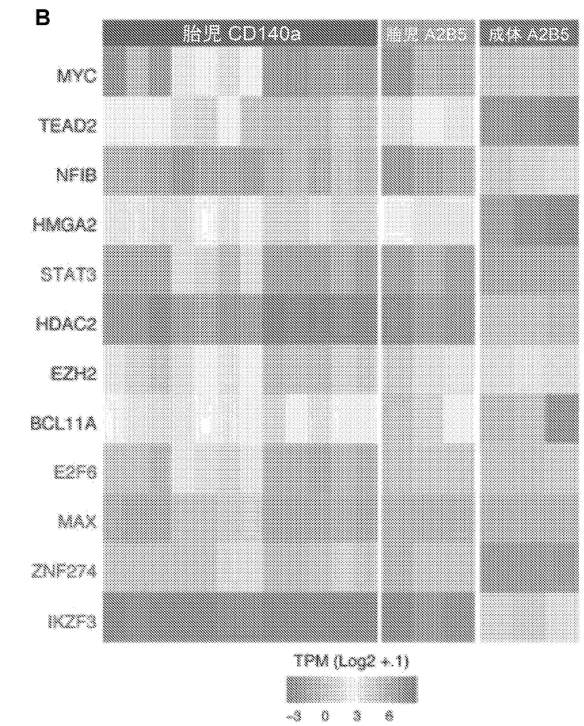
【図３－５】



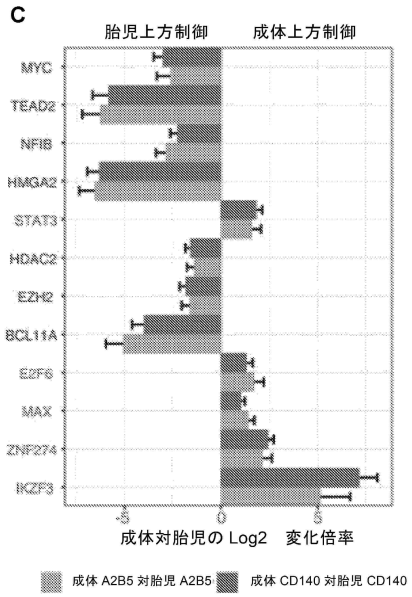
【図４－１】



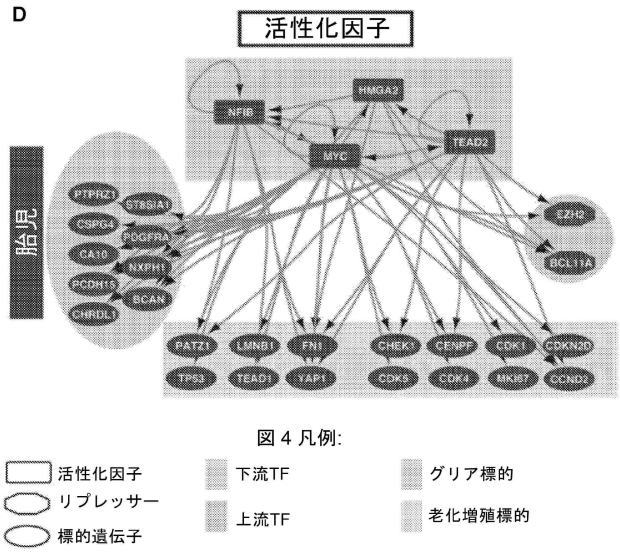
【図４－２】



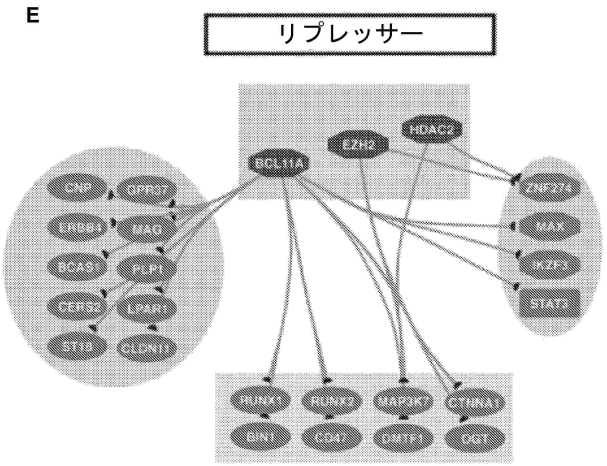
【図４－３】



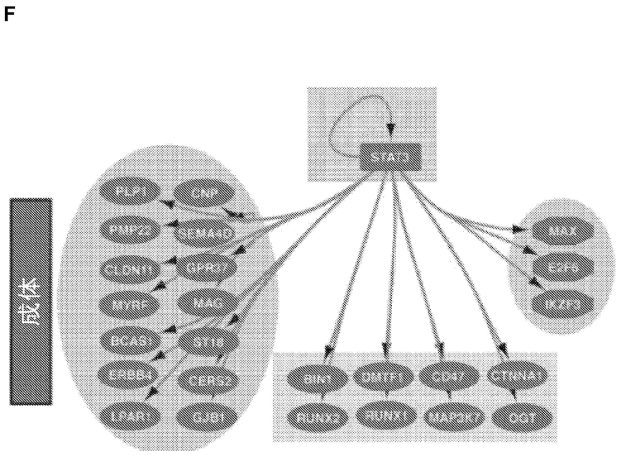
【図４－４】



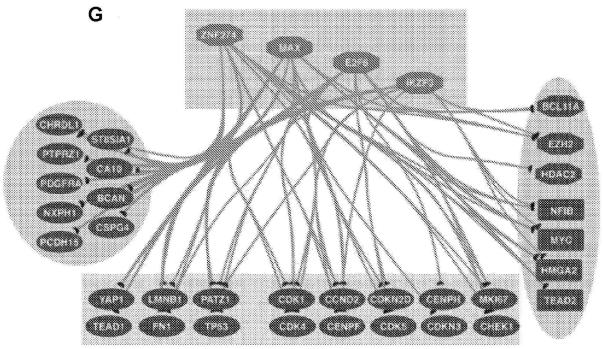
【図４－５】



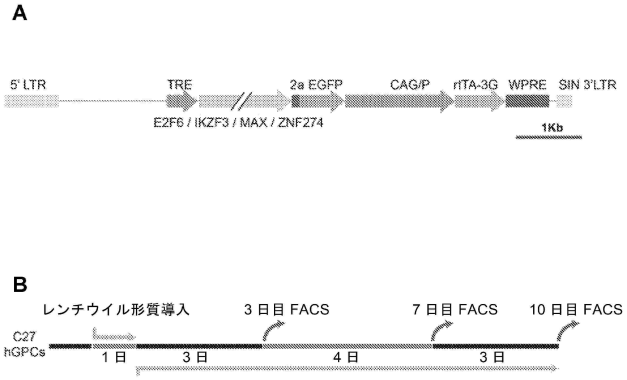
【図４－６】



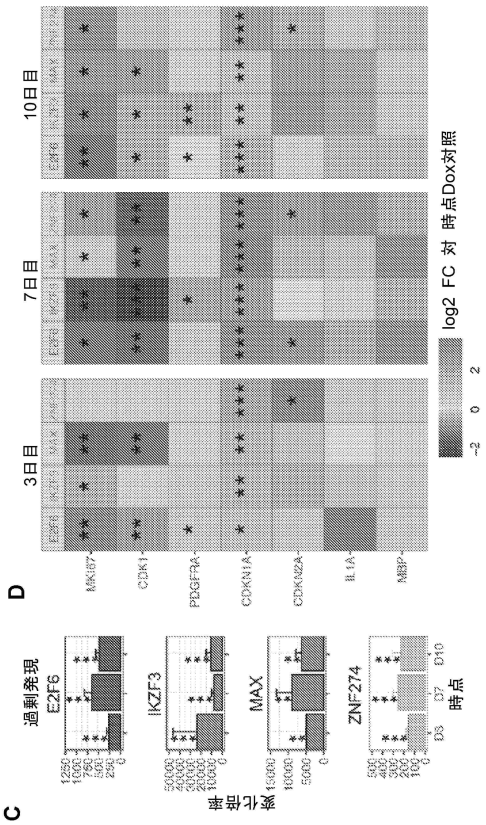
【図４－７】



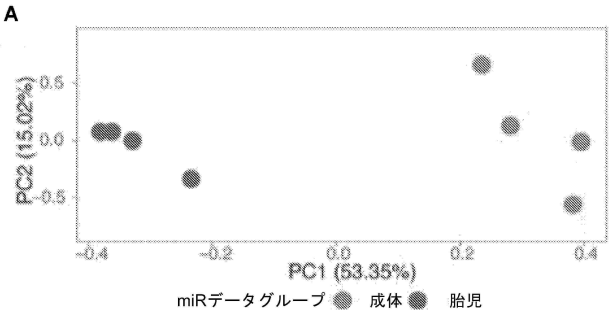
【図５－１】



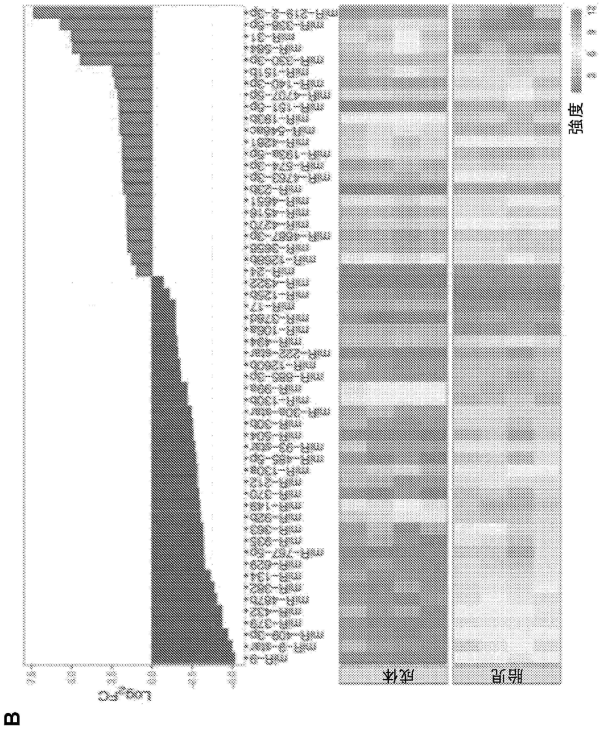
【図５－２】



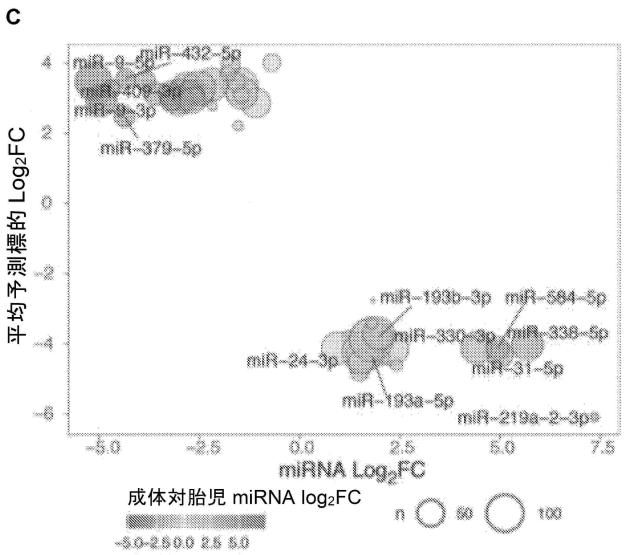
【図６－１】



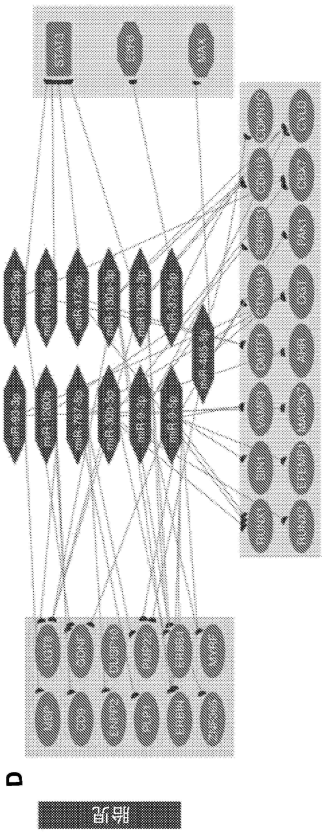
【図６－２】



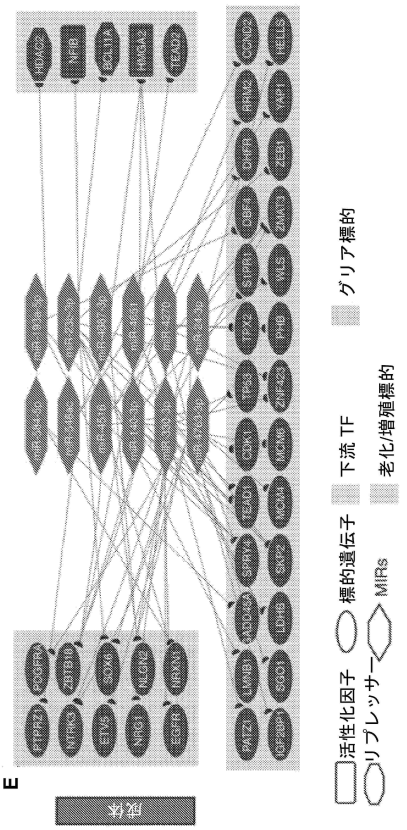
【図６－３】



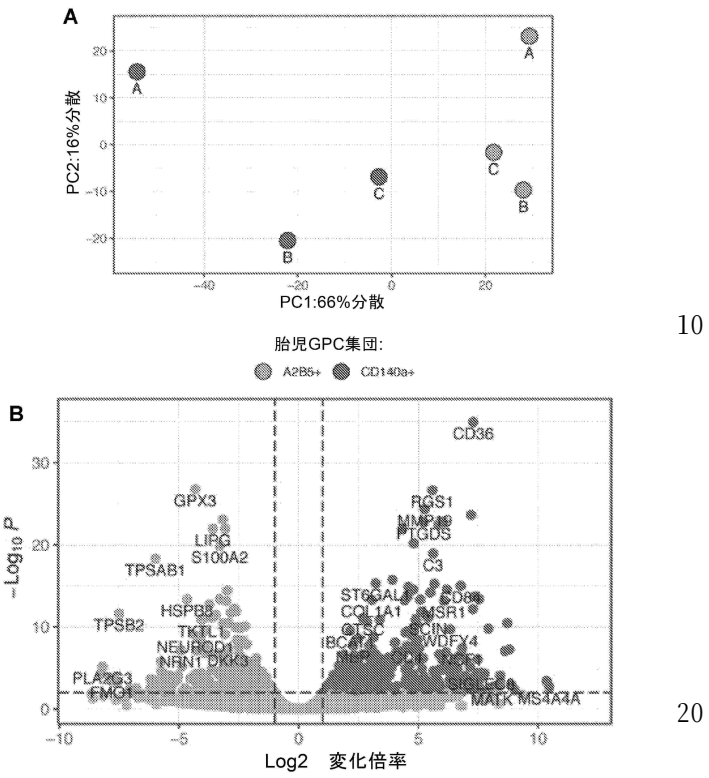
【図６－４】



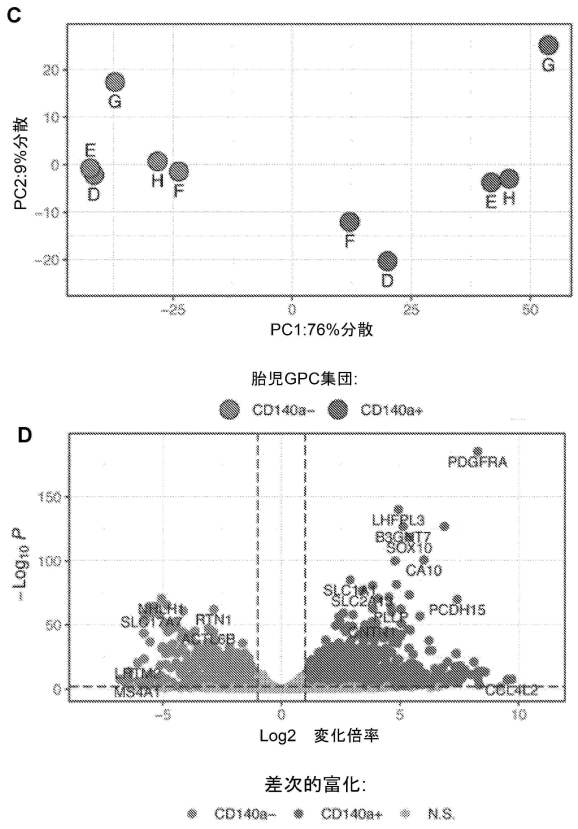
【図６－５】



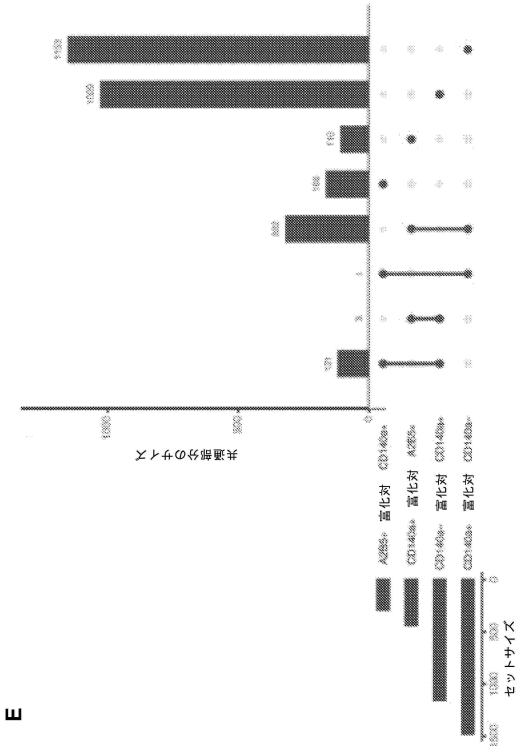
【図７－１】



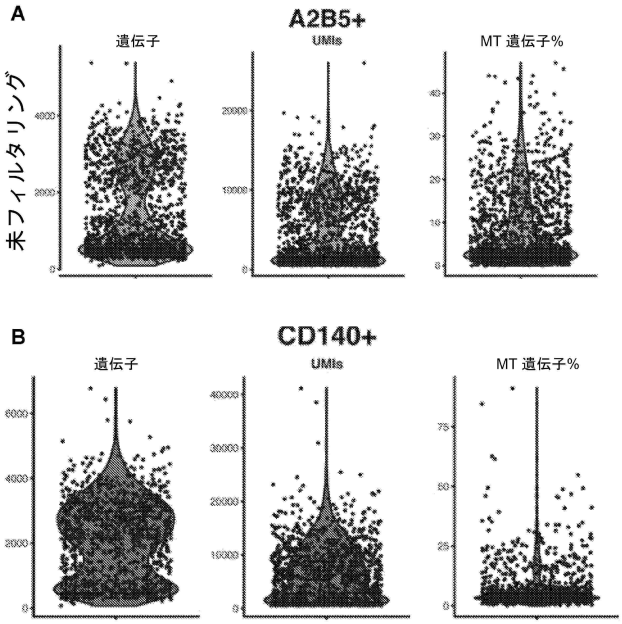
【図７－２】



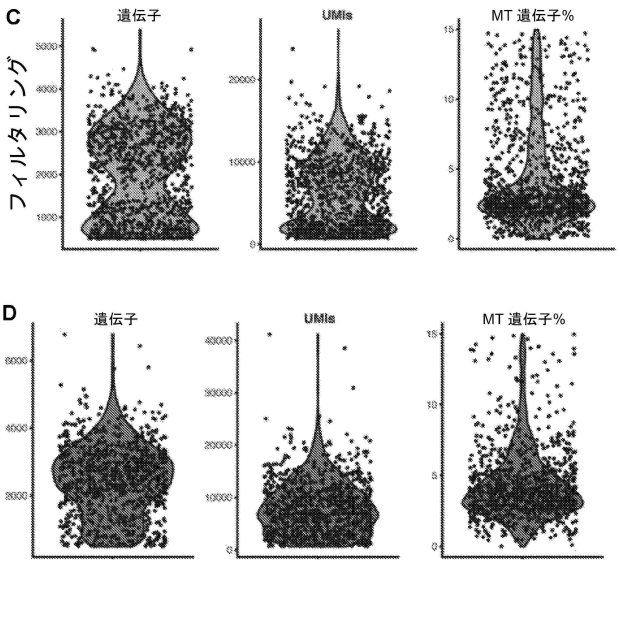
【図７－３】



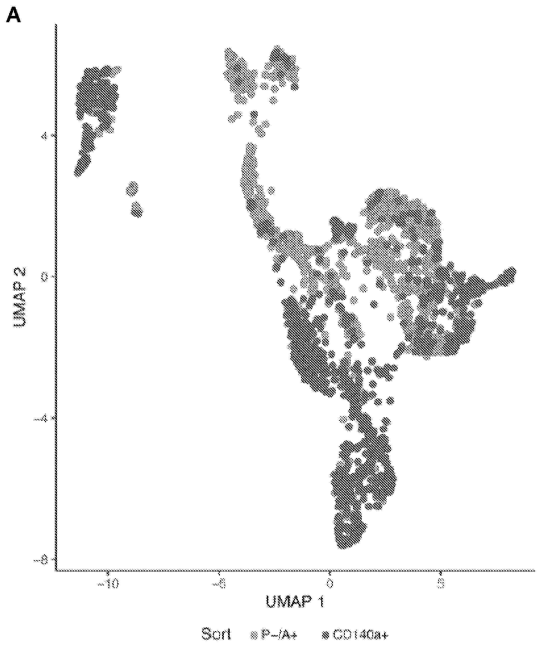
【図８－１】



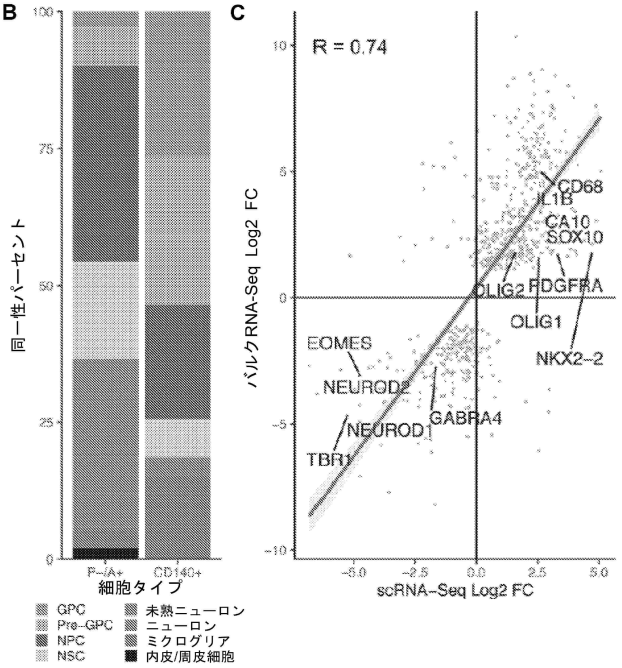
【図８－２】



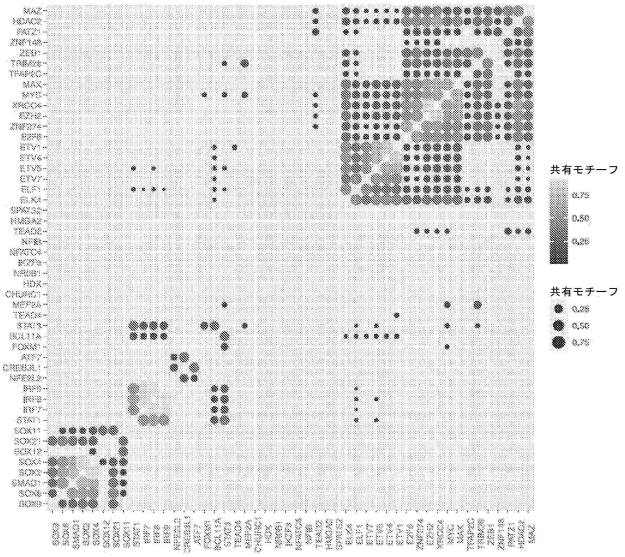
【図９－１】



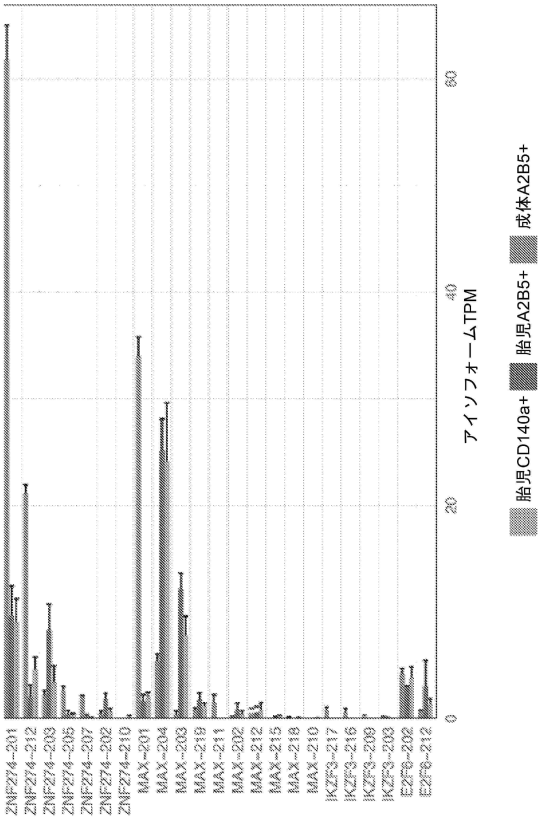
【図９－２】



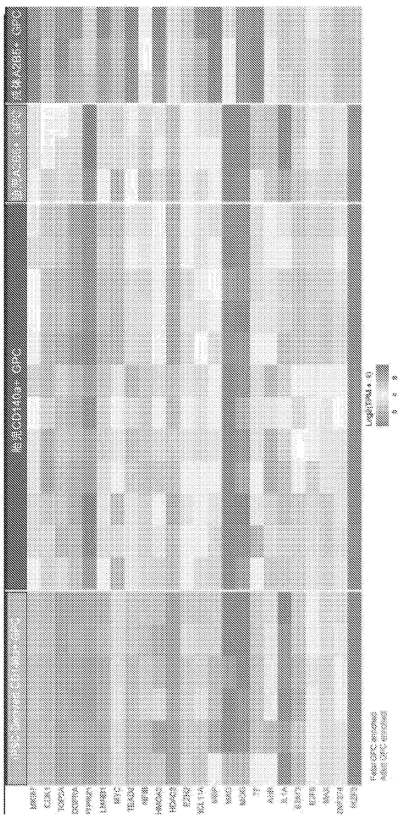
【図１０】



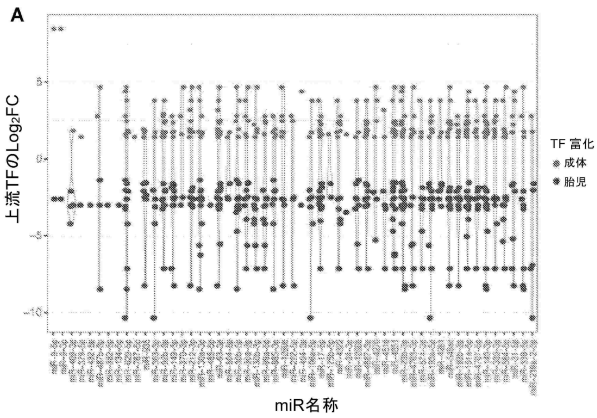
【図１１】



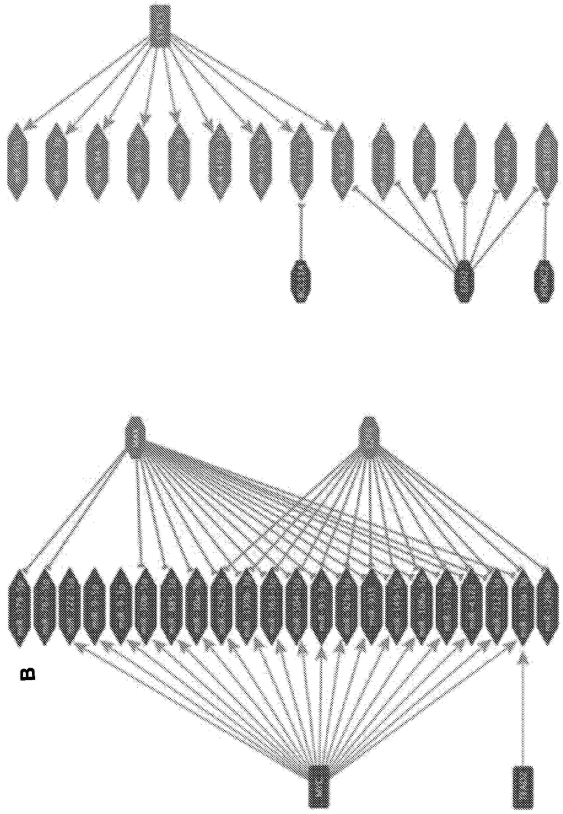
【図１２】



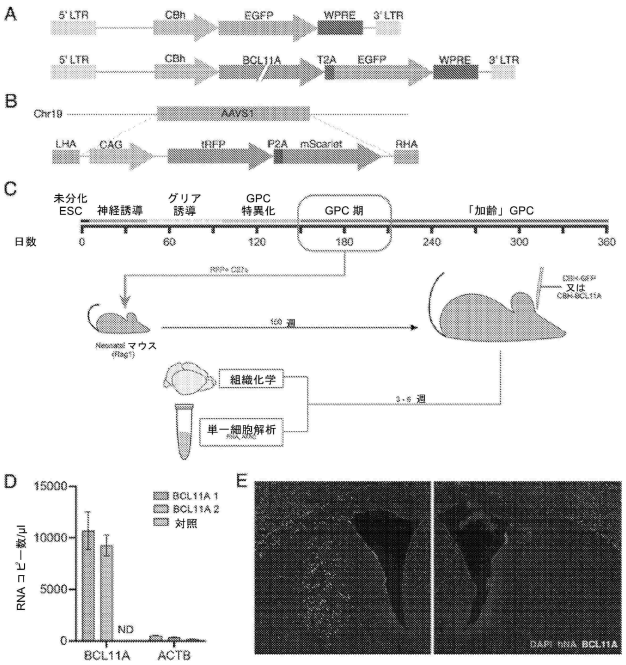
【図１３－１】



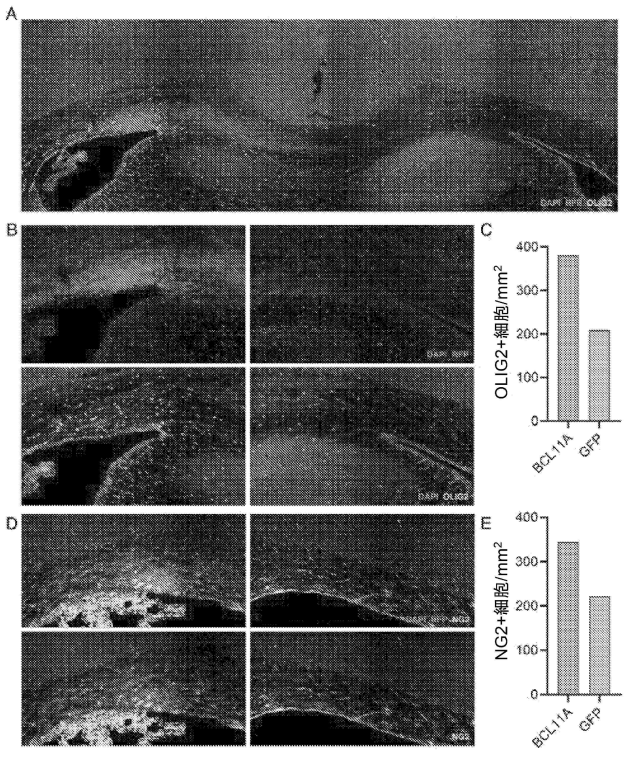
【図１３－２】



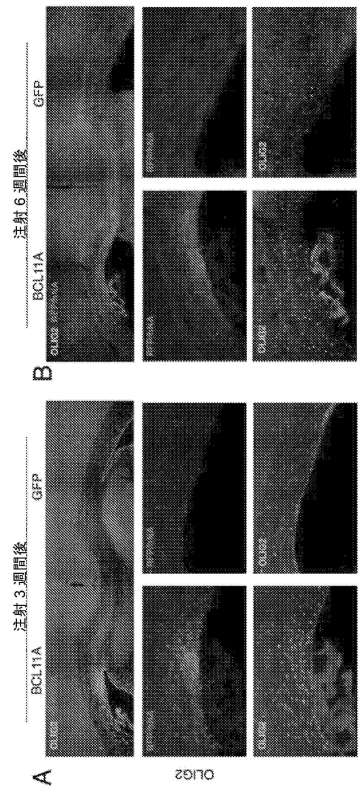
【図１４】



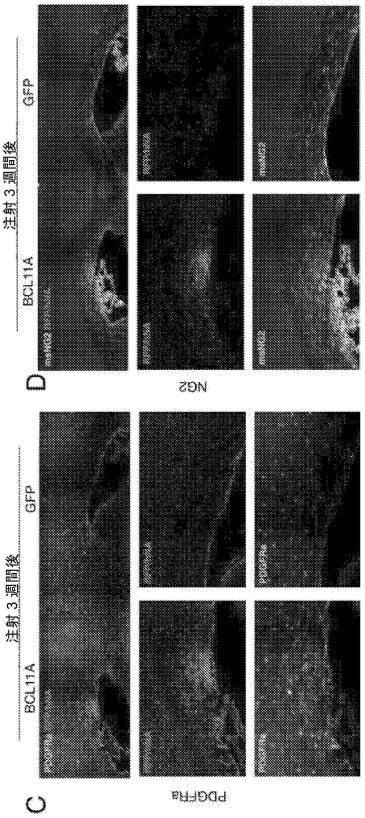
【図１５】



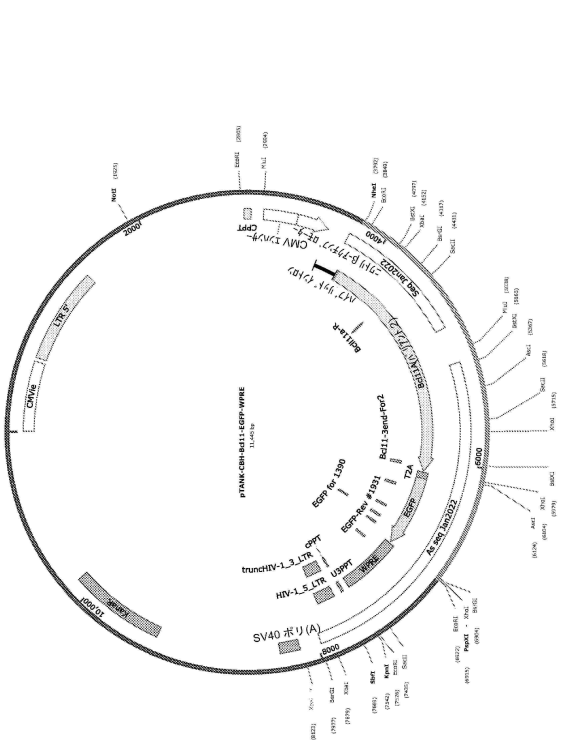
【図１６－１】



【図１６－２】



【図１７】



【配列表】

<u>2024539080000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/047083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 C12N5/079 C12N15/85
ADD.

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)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/167822 A2 (UNIV ROCHESTER [US]) 20 August 2020 (2020-08-20)	1-4,6-20
A	the whole document	5
Y	NEUMANN BJÖRN ET AL: "Myc determines the functional age state of oligodendrocyte progenitor cells", NATURE AGING, vol. 1, no. 9, 14 September 2021 (2021-09-14), pages 826-837, XP093011678, DOI: 10.1038/s43587-021-00109-4 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s43587-021-00109-4> cited in the application the whole document	1-4,8, 12-20

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* 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	Date of mailing of the international search report
2 March 2023	15/03/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Romano, Alper

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/047083

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/047083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARIANI JOHN N. ET AL: "Age-Associated Induction of Senescent Transcriptional Programs in Human Glial Progenitor Cells", SSRN ELECTRONIC JOURNAL, 25 September 2021 (2021-09-25), pages 1-51, XP093011595, US ISSN: 1556-5068, DOI: 10.2139/ssrn.3950750 Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3950750 [retrieved on 2023-01-04] figure 4	1-4,6,7, 9-20
A	NEUMANN BJÖRN ET AL: "Metformin Restores CNS Remyelination Capacity by Rejuvenating Aged Stem Cells", CELL STEM CELL, ELSEVIER, CELL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 25, no. 4, 3 October 2019 (2019-10-03), page 473, XP085849410, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/J.STEM.2019.08.015 [retrieved on 2019-10-03] the whole document	1-20
A	LO L-C ET AL: "V-myc immortalization of early rat neural crest cells yields a clonal cell line which generates both glial and adrenergic progenitor cells", DEVELOPMENTAL BIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 145, no. 1, 1 May 1991 (1991-05-01), pages 139-153, XP024787596, ISSN: 0012-1606, DOI: 10.1016/0012-1606(91)90220-W [retrieved on 1991-05-01] the whole document	1-20
A	BALESTRI SONIA ET AL: "The Current Challenges for Drug Discovery in CNS Remyelination", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 22, no. 6, 12 March 2021 (2021-03-12) , page 2891, XP093022397, DOI: 10.3390/ijms22062891 the whole document	1-20

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/047083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOLDMAN STEVEN A. ET AL: "Glial progenitor cell-based repair of the dysmyelinated brain: Progression to the clinic", SEMINARS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY., vol. 116, 1 August 2021 (2021-08-01), pages 62-70, XP093011534, GB ISSN: 1084-9521, DOI: 10.1016/j.semcdb.2020.12.004 the whole document -----	1-20

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/047083

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020167822 A2	20-08-2020	EP 3923962 A2	22-12-2021
		US 2023057355 A1	23-02-2023
		WO 2020167822 A2	20-08-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ｃ１２Ｎ	*5/079(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/079		
Ｃ１２Ｎ	*15/867(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/864(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		

(32)優先日　令和4年6月8日(2022.6.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/350,042
(32)優先日　令和4年6月8日(2022.6.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ク，ウェブスター，１０３４ サンセット トレイル
(72)発明者　ジョン エヌ． マリアーニ
アメリカ合衆国 １４６２６ ニューヨーク，ロチェスター，８７ マスコット ドライブ

Ｆターム（参考）　4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA33 ZB11
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZB11