

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/002854

発行日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(43) 国際公開日 平成28年1月7日(2016.1.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

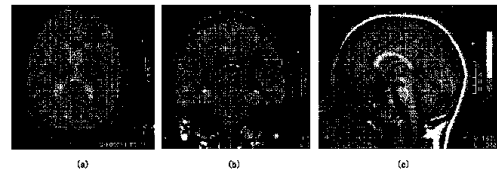
出願番号 特願2016-531427 (P2016-531427)	(71) 出願人 504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島 1-5-4 5
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/069032	
(22) 国際出願日 平成27年7月1日(2015.7.1)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-136979 (P2014-136979)	(74) 代理人 100106002 弁理士 正林 真之
(32) 優先日 平成26年7月2日(2014.7.2)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 岡澤 均 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立 大学法人東京医科歯科大学内
	F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02 4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 NA14 ZA011 ZA012 ZA021 ZA022 ZA151 ZA152 ZC411 ZC412
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する

(57) 【要約】

P Q B P - 1 をコードする所定の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法を提供する。

神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤は、P Q B P - 1 をコードする配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA 等、又はこれら DNA 等がコードするポリペプチドを有効成分として含有する。また、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤は、P Q B P - 1 をコードする配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA 等、又はこれら DNA 等がコードするポリペプチドを有効成分として含有する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

polyglutamine-tract binding protein 1 (PQBP-1) をコードする以下の (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤。

(a) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、かつ、神経幹細胞の増殖を促進することができる DNA

(d) 配列番号 1 記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ神経幹細胞の増殖を促進することができる DNA

【請求項 2】

前記神経幹細胞の増殖の促進は、細胞周期の延長の抑制によるものである、請求項 1 記載の製剤。

【請求項 3】

PQBP-1 をコードする以下の (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤。

(a) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列を有する DNA

(d) 配列番号 1 記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列からなる DNA

【請求項 4】

PQBP-1 をコードする以下の (a)、(b)、(e) 又は (f) に記載の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤。

(a) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

(e) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列を有する DNA

(f) 配列番号 1 記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列からなる DNA

【請求項 5】

PQBP-1 をコードする以下の (a)、(b)、(e) 又は (f) に記載の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤。

(a) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

(e) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基

10

20

30

40

50

配列を有するDNA

(f) 配列番号1記載の塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列からなるDNA

【請求項6】

前記DNAがベクターに組み込まれている請求項1から5いずれか記載の製剤。

【請求項7】

神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法であって、

被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程と、

前記被験物質が投与された前記動物細胞又はヒトを除く動物の、内在性PQBP-1の発現量又はPQBP-1による神経幹細胞増殖促進の程度を測定する工程と、

前記測定結果に基づいて、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有するスクリーニング方法。

【請求項8】

シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法であって、

被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程と、

前記被験物質が投与された前記動物細胞又はヒトを除く動物の、内在性PQBP-1の発現量又はPQBP-1によるシナプス後部形成の促進の程度を測定する工程と、

前記測定結果に基づいて、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有するスクリーニング方法

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

polyglutamine-tract binding protein1 (以下、本明細書において、PQBP-1と称する)は、変性疾患ポリグルタミン病において中間病態を担うタンパク質であることが、従来知られている(例えば、非特許文献1参照)。

【0003】

このPQBP-1遺伝子の変異が、X染色体連鎖知的障害/精神遅滞家系(XLID/XLMR)で高頻度に見つかり、PQBP-1が知的障害の主要な原因遺伝子であり得ることが報告されている(例えば、非特許文献2を参照)。また、PQBP-1がRNAのスプライシングに関わり得ることが報告されている(例えば、非特許文献3を参照)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Waragai et al., "PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival", Hum Mol Genet, 1999; 8(6): p. 977-987

【非特許文献2】Kalscheuer et al., "Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene

10

20

30

40

50

cause X-linked mental retardation", *Nature Genetics* 2003; 35(4): p. 313-315

【非特許文献3】Okazawa et al., "Interaction between Mutant Ataxin-1 and PQBP-1 Affects Transcription and Cell Death", *Neuron*, 2002; 34: p. 701-713

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記のとおり、PQBP-1が知的障害の原因遺伝子である可能性や、RNAのスプライシングに関わることが報告されているが、PQBP-1がいかなる知的障害と実際に関連していることは未だに不明である。

10

【0006】

本発明は、PQBP-1をコードする所定のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて、神経幹細胞の細胞周期が長くなること、及び、シナプス後部形成が減少することを見出し、本発明を完成するに至った。より具体的には、本発明は以下のようなものを提供する。

20

【0008】

(1) polyglutamine-tract binding protein 1 (PQBP-1)をコードする以下の(a)から(d)のいずれかに記載のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤。

(a) 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA

(b) 配列番号1記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

30

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、かつ、神経幹細胞の増殖を促進することができるDNA

(d) 配列番号1記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ神経幹細胞の増殖を促進することができるDNA

【0009】

(2) 前記神経幹細胞の増殖の促進は、細胞周期の延長の抑制によるものである、(1)記載の製剤。

【0010】

(3) PQBP-1をコードする以下の(a)から(d)のいずれかに記載のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤。

40

(a) 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA

(b) 配列番号1記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列を有するDNA

(d) 配列番号1記載の塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつ、神経幹細胞の増

50

殖を促進する塩基配列からなるDNA

【0011】

(4) PQBP-1をコードする以下の(a)、(b)、(e)又は(f)に記載のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤。

(a) 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA

(b) 配列番号1記載の塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

(e) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列を有するDNA

(f) 配列番号1記載の塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列からなるDNA

【0012】

(5) PQBP-1をコードする以下の(a)、(b)、(e)又は(f)に記載のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤。

(a) 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA

(b) 配列番号1記載の塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

(e) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列を有するDNA

(f) 配列番号1記載の塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列からなるDNA

【0013】

(6) 前記DNAがベクターに組み込まれている(1)から(5)いずれか記載の製剤。

【0014】

(7) 神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法であって、

被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程と、

前記被験物質が投与された前記動物細胞又はヒトを除く動物の、内在性PQBP-1の発現量又はPQBP-1による神経幹細胞増殖促進の程度を測定する工程と、

前記測定結果に基づいて、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有するスクリーニング方法。

【0015】

(8) シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法であって、

被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程と、

前記被験物質が投与された前記動物細胞又はヒトを除く動物の、内在性PQBP-1の発現量又はPQBP-1によるシナプス後部形成の促進の程度を測定する工程と、

前記測定結果に基づいて、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有するスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、PQBP-1をコードする所定のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する、神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の

10

20

30

40

50

促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】PQBP-1遺伝子に変異した患者の脳形状を磁気共鳴画像により解析した画像を示す図である。図1中、(a)は水平面の画像であり、(b)は冠状面の画像であり、(c)は矢状面の画像を示す。

【図2】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)のそれぞれの脳の写真である。

【図3】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)の脳の質量を示すグラフであり、(a)は雄のマウスについてのグラフであり、(b)は雌のマウスについてのグラフである。

【図4】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)の脳の写真である。

【図5】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄及び雌の成体マウスの脳の質量を示すグラフであり、(a)は雄のマウスについてのグラフであり、(b)は雌のマウスについてのグラフである。

【図6】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄及び雌の成体マウス(2ヶ月)のそれぞれの冠状面の写真であり、(a)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄成体マウスについての写真であり、(b)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄成体マウスについての写真であり、(c)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雌成体マウスについての写真であり、(d)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雌成体マウスについての写真である。

【図7】BrdUを妊娠マウスに腹腔内注射してから24時間後の、神経新生の細胞数、幹細胞プール中に残っている細胞数、ラベルされてない神経幹細胞の数の相対的な割合のグラフである。

【図8】TUNEL染色による、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスと、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていないNestin-Creマウスの、大脳皮質の細胞死のレベルのグラフである。

【図9】(a)は、野生型マウスと、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスと、APC4が形質転換された野生型マウスと、APC4が形質転換された、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスの、それぞれのE14の胚から準備した神経幹細胞の増殖を示すグラフである。(b)は、それぞれのマウスの胚における、APC4、PQBP-1、Cyclin B、GAPDHの発現量をウエスタンブロッティングにより分析した結果の写真である。

【図10】FACS分析による、(a)野生型マウスと、(b)PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスと、(c)APC4が形質転換された、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスと、(d)APC4が形質転換された野生型マウスの、それぞれのマウスのE14の胚から抽出した神経幹細胞における、それぞれの細胞数の数を表すグラフである。

【図11】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスと、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていないNestin-CreマウスのそれぞれのE13の胚にAPC4 GFP又はGFPを導入した後の、E18の脳組織の写真である。

10

20

30

40

50

【図12】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスと、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていないNestin-CreマウスのそれぞれのE13の胚にAPC4-GFP又はGFPを導入した後の、E18の脳組織における、頂端表面に対する軟膜表面の割合のグラフである。

【図13】野生型マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKOマウス(2ヶ月)の脳におけるタンパクを、ウエスタンブロッティングにより分析した結果の写真である。

【図14】野生型マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKOマウス(2ヶ月)の脳におけるタンパクの量の比を、ウエスタンブロッティングにより分析したグラフである。

【図15】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄及び雌マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていないコントロールの雄及び雌マウス(2ヶ月)と、それぞれにAAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したマウス(2ヶ月)における、脳の重量のグラフである。(a)は雄マウスのグラフを、(b)は雌マウスのグラフをそれぞれ示す。

【図16】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入した雄の成体マウス(2ヶ月)の脳の形態の写真である。

【図17】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄の成体マウス(2ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入した雄の成体マウス(2ヶ月)の脳の冠状面の写真である。(a)は、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入していないマウスの冠状面の写真を示し、(b)は、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したマウスの冠状面の写真を示す。

【図18】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄の成体マウス(2.5ヶ月)と、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入した雄の成体マウス(2.5ヶ月)の、皮質の全体の厚さに対する各層の相対厚さの割合のグラフである。

【図19】PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKO成体マウス(3ヶ月)、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKO成体マウス(3ヶ月)についての、回転ロッドの試験における、それぞれのマウスが、ロッドから落ちる平均時間のグラフである。

【図20】野生型成体マウス(3ヶ月)、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKO成体マウス(3ヶ月)、PQBP-1遺伝子をノックアウトし、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKO成体マウス(3ヶ月)についての、フィアコンディショニングの試験における、マウスの止まった時間のグラフである。

【図21】野生型成体マウス(3ヶ月)、Fllox成体マウス(3ヶ月)、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre-cKO成体マウス(3ヶ月)についての、回転ロッドの試験における、それぞれのマウスが、ロッドから落ちる平均時間のグラフである。

【図22】野生型マウス(3ヶ月)、Flloxマウス(3ヶ月)、Synapsin1-Cre成体マウス(3ヶ月)、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre-cKOマウス野生型成体マウス(3ヶ月)についての、フィアコンディショニングの試験における、マウスの止まった時間のグラフである。

10

20

30

40

50

【図23】Synapsin1-Creマウス、Floxマウス、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre-cKOマウスのシナプス後部形成の程度を示す図である。

【図24】Synapsin1-Creマウス、Floxマウス、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre-cKOマウスのシナプス後部における、樹上の直径、突起ヘッドの直径、樹上突起の数のグラフである。

【図25】Synapsin1-Creマウス、FloxマウスPQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre-cKOマウスのシナプス後部形成の程度の経時変化を示す図である。

【図26】Synapsin1-Creマウス、Floxマウス、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたSynapsin1-Cre-cKOマウスのシナプス後部形成の樹上突起の動態形態変化のグラフである。

【図27】高脂肪食を与えたマウスにおけるPQBP-1の発現を、ウエスタンブロッティングにより分析した結果の写真である。

【図28】高脂肪食を与えたマウスにおけるPQBP-1の発現を、ウエスタンブロッティングにより分析した結果のグラフである。

【図29】高脂肪食を与えたマウスにおける、シナプス後部の数のグラフを示す図である。PQBP-1の発現を、ウエスタンブロッティングにより分析した結果のグラフである。

【図30】高脂肪食を与えたマウスのシナプス後部形成の樹上突起の動態形態変化のグラフである。

【図31】(a)は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された野生型のマウスの大脳皮質神経細胞のスパインの画像を示し、(b)は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された5xFADマウスの大脳皮質神経細胞のスパインの画像を示し、(c)は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクター及びAAV-CMV-PQBP-1ウイルスベクターが投与された5xFADマウスの大脳皮質神経細胞のスパインの画像を示す。

【図32】AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された野生型のマウス(n=8)、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された5xFADマウス(n=5)、及びAAV-CMV-EGFPウイルスベクターとAAV-CMV-PQBP-1ウイルスベクターが投与された5xFADマウス(n=8)についてのグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明の具体的な実施形態について詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本発明の目的の範囲内において、適宜変更を加えて実施することができる。なお、説明が重複する箇所については、適宜説明を省略する場合があるが、発明の要旨を限定するものではない。

【0019】

< 製剤 >

本発明の製剤は、polyglutamine-tract binding protein 1 (PQBP-1) をコードする所定のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する。以下、本発明の製剤について説明する。

【0020】

(神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤)

本発明の神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤は、PQBP-1をコードする以下の(a)から(d)のいずれかに記載のDNA、又はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する。

(a) 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA

(b) 配列番号1記載の塩基配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

10

20

30

40

50

(c) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列を有する DNA

(d) 配列番号 1 記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有し、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列からなる DNA

【0021】

本発明者らは、PQBP-1 異常となることで、細胞周期が延長されることを見いだした。この細胞周期の延長により、神経幹細胞の分裂回数が減少し、神経幹細胞が減少する。しかし、本発明の製剤によると、細胞周期の延長を抑制することができるのでこれにより、神経幹細胞の減少を抑制することができる。

10

【0022】

(神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤)

本発明の神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤は、PQBP-1 をコードする以下の (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する。

(a) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列を有する DNA

20

(d) 配列番号 1 記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有し、かつ、神経幹細胞の増殖を促進する塩基配列からなる DNA

【0023】

なお、本明細書における「神経幹細胞の減少に関連する疾患」は、神経幹細胞の減少により生じる疾患のことを指し、例えば、小頭症 (例えば、脳の形状に異常を伴わない小頭症)、精神遅滞等の先天性知的障害や、自閉症、学習障害等の発達障害が挙げられる。ここで「神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療効果」は、小頭症、精神遅滞等の先天性知的障害、自閉症、学習障害等の発達障害のうち少なくとも 1 種の症状が改善され又は症状悪化が抑制される効果であって、改善又は抑制が統計的に有意である効果を指す。これらのうち、特に予防又は治療効果が高い点で、小頭症に用いるのが好ましい。また、神経幹細胞の減少によって関連する疾患の予防又は治療効果は、X連鎖性疾患の場合は、特に、ヒトの男性に対して有効である。

30

【0024】

(シナプス後部形成の促進に用いられる製剤)

本発明のシナプス後部形成の促進に用いられる製剤は、PQBP-1 をコードする以下の (a)、(b)、(e) 又は (f) に記載の DNA、又はこの DNA がコードするポリペプチドを有効成分として含有する。

(a) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA

(b) 配列番号 1 記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有する DNA

40

(e) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び / 又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列を有する DNA

(f) 配列番号 1 記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有し、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列からなる DNA

【0025】

(シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤)

本発明のシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤は、PQBP-1 をコードする以下の (a)、(b)、(e) 又は (f) に記載の DNA、又

50

はこのDNAがコードするポリペプチドを有効成分として含有する。

(a) 配列番号1記載の塩基配列を有するDNA

(b) 配列番号1記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNA

(e) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列をコードし、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列を有するDNA

(f) 配列番号1記載の塩基配列と90%以上の相同性を有し、かつ、シナプス後部形成を促進する塩基配列からなるDNA

【0026】

なお、本明細書における「シナプス後部形成の減少に関連する疾患」は、シナプス後部形成の減少により生じる疾患のことを指し、例えば、アルツハイマー病等の認知症、筋萎縮性側索硬化症、精神発達遅滞、前頭側頭葉型認知症、ハンチントン病、パーキンソン病、汎発性レヴィー小体病、脊髄小脳失調症等の疾患が挙げられる。ここで「シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療効果」は、アルツハイマー病等の認知症、筋萎縮性側索硬化症、精神遅滞の少なくとも1種の症状が改善され又は症状悪化が抑制される効果であって、改善又は抑制が統計的に有意である効果を指す。これらのうち、特に予防又は治療効果が高い点で、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、精神遅滞に用いるのが好ましい。

【0027】

(DNA)

本発明のDNAは、上記(a)~(f)のいずれかのDNAである。

【0028】

配列番号1は、ヒトPQBP-1をコードする塩基配列である。この配列番号1記載の塩基配列は、神経幹細胞の増殖及びシナプス形成を促進する。ここで、本明細書において、「塩基配列が神経幹細胞の増殖又はシナプス形成を直接促進する」とは、塩基配列がコードするポリペプチドが神経幹細胞の増殖又はシナプス形成を促進することを意味する。配列番号1記載の塩基配列を有するDNAの変異体やホモログには、例えば、配列番号1記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる塩基配列を有するDNAが含まれる。ここで、「ストリンジェントな条件」としては、例えば、通常のハイブリダイゼーション緩衝液中、40~70 (好ましくは、50~67、より好ましくは、60~65) で反応を行い、塩濃度15~300mM (好ましくは、15~150mM、より好ましくは15~60mM、更に好ましくは、30~50mM) の洗浄液中で洗浄を行う条件が挙げられる。

【0029】

配列番号2は、ヒトPQBP-1タンパク質を構成することが知られている。本発明のDNAには、かかる配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAも含まれる。ここで「1もしくは複数」とは、通常、50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、更に好ましくは10アミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、1アミノ酸)である。神経幹細胞の増殖又はシナプス形成を促進する作用を維持する場合、変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。

【0030】

10

20

30

40

50

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadié-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列は、配列番号2記載のアミノ酸配列と相同性が高い方が好ましい。ここで、配列番号2記載のアミノ酸配列 (ヒトPQBP-1のアミノ酸配列) とマウスPQBP-1のアミノ酸配列との相同性は86.8%であるが (Hitoshi Okazawa et al., "PQBP-1 (Np/PQ): A polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein", Brain Research Bulletin, 2001, Vol. 56, Nos. 3/4, pp. 273-280)、ヒトPQBP-1タンパク質は、マウスにおいても、高い効果 (神経幹細胞の増殖の促進効果、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療効果、シナプス後部形成の促進効果、又はシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療効果) を奏する。この観点から、配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列と、配列番号2記載のアミノ酸配列との相同性は、85%以上が好ましくは、90%以上がより好ましく、95%以上 (96%以上、97%以上、98%以上、99%以上) が更に好ましい。

【0031】

上記DNAの最も好ましい態様は、配列番号1記載の塩基配列からなるDNAであるが、本発明のDNAには、更に、神経幹細胞の増殖の促進効果又は神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療効果を有する種々の変異体やホモログや、シナプス後部形成の促進効果又はシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療効果を有する種々の変異体やホモログが含まれる。ここで、PQBP-1のN末端側のWWドメイン (配列番号3)、C末端側のCターミナルドメイン (配列番号4) が知られている。WWドメインは、RNAポリメラーゼとの作用において重要な役割を担う配列であり、プロリンリッチな配列特異的に結合することが知られている。また、Cターミナルドメインは、スプライシングにおいて重要な役割を担う天然変性タンパクとして知られている。そのため、本発明のDNAは、PQBP-1の機能を発揮するためには、配列番号3、4のいずれか一方、又は両方の配列を含むのが好ましい。

【0032】

更に、配列番号1記載の塩基配列を有するDNAの変異体やホモログには、配列番号1記載の塩基配列と高い相同性を有する塩基配列からなるDNAが含まれる。このようなDNAは、好ましくは、配列番号1記載の塩基配列と90%以上、更に好ましくは95%以上 (96%以上、97%以上、98%以上、99%以上) の相同性を有する。アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具

体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【0033】

なお、上記配列番号1~4は、NCBI CCDS DatabaseのReport for CCDS14309.1 (current version) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS14309.1&ORGANISM=0&BUILDS=CURRENTBUILDS>) に由来する。

【0034】

本発明における「DNA」は、センス鎖又はアンチセンス鎖 (例えば、プローブとして使用できる) のいずれでもよく、その形状は一本鎖と二本鎖のいずれでもよい。また、ゲノムDNAであっても、cDNAであっても、合成されたDNAであってもよい。

10

【0035】

本発明のDNAを取得する方法としては、特に限定されないが、mRNAから逆転写することでcDNAを得る方法 (例えば、RT-PCR法)、ゲノムDNAから調整する方法、化学合成により合成する方法、ゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーから単離する方法等の公知の方法 (例えば、特開平11-29599号公報参照) が挙げられる。

【0036】

(ポリペプチド)

本発明の予防又は治療剤で使用されるポリペプチドは、前述のDNAによりコードされ、例えば、配列番号2記載のアミノ酸配列を有し、又は配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列を有する。

20

【0037】

本発明のDNAがコードするポリペプチドは、例えば、前述のDNAを含む発現ベクターが導入された形質転換体を使用することで、作製できる。すなわち、まず、この形質転換体を適宜の条件で培養し、このDNAがコードするタンパク質 (ポリペプチド) を合成させる。そして、合成されたタンパク質を形質転換体又は培養液から回収することにより、本発明のポリペプチドを得ることができる。

30

【0038】

形質転換体の培養は、ポリペプチドが大量にかつ容易に取得できるように、形質転換体の種類等に応じて、公知の栄養培地から適宜選択し、温度、栄養培地のpH、培養時間等を適宜調整して行うことができる (例えば、特開平11-29599号公報参照)。

【0039】

ポリペプチドの単離方法及び精製方法としては、特に限定されず、溶解度を利用する方法、分子量の差を利用する方法、荷電を利用する方法等の公知の方法 (例えば、特開平11-29599号公報参照) が挙げられる。なお、本発明で使用できるベクター及び形質転換体を以下に説明する。

【0040】

(ベクター)

発現ベクターは、適当なベクターに上述のDNAを挿入することにより、作製できる。「適当なベクター」とは、原核生物及び/又は真核生物の各種の宿主内で複製保持又は自己増殖できるものであればよく、使用の目的に応じて適宜選択できるものである。例えば、DNAを大量に取得したい場合には高コピーベクターを選択でき、ポリペプチドを取得したい場合には発現ベクターを選択できる。その具体例としては、特に限定されず、例えば、特開平11-29599号公報に記載された公知のベクターが挙げられる。

40

【0041】

また、ベクターは、ポリペプチドを合成するのみならず、本発明の製剤にも利用することができる。すなわち、上述のDNAが組み込まれたベクターを含む本発明の製剤は、ヒ

50

トに直接導入することで、神経幹細胞の増殖の促進、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療、シナプス後部形成の促進、又はシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いることができる。この場合におけるベクターは、ヒトの細胞内に導入可能なベクターを用いる。かかるベクターとしては、例えば、AAVベクターが挙げられる。

【0042】

(形質転換体)

形質転換体は、前述のDNAを含むベクターを宿主に導入することにより、作製できる。このような宿主は、本発明のベクターに適合し形質転換され得るものであればよく、その具体例としては、特に限定されないが、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等の、公知の天然細胞もしくは人工的に樹立された細胞(特開平11-29599号公報参照)、あるいは、ヒト、マウス等の動物が挙げられる。

10

【0043】

ベクターの導入方法は、ベクターや宿主の種類等に応じて適宜選択できるものである。その具体例としては、特に限定されないが、例えば、細菌を宿主とした場合、プロトプラスト法、コンピテント法等の公知の方法(例えば、特開平11-29599号公報参照)が挙げられる。

【0044】

また、ヒトを宿主とした場合、例えば、上述のAAVベクターを用いて妊娠したヒトに形質転換する場合、腹部に注射することで形質転換することができる。

20

【0045】

本明細書における「有効成分」は、神経幹細胞の増殖の促進効果、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療効果、シナプス後部形成の促進効果、又はシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療効果を得るために必要な量で含有される成分を指し、効果が所望のレベル未満にまで損なわれない限りにおいて、他の成分も含有されてよい。また、製剤の投与経路は、経口又は非経口のいずれであってもよく、適宜設定される。

【0046】

経口投与の場合、製剤は、一般に使用される結合剤、包含剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤のような添加剤を含有してよく、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤等の種々の形状に製剤化される。また、製剤は、内用水剤、懸濁剤、乳剤シロップ剤等の液体状態であってもよく、使用時に再溶解される乾燥状態であってもよい。

30

【0047】

非経口投与の場合、製剤は、安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤等の添加剤も含有してよく、通常、単位投与量アンプルもしくは多投与量容器又はチューブ内に收容された状態で流通される。また、製剤は、使用時に、適当な担体(滅菌水等)で再溶解可能な粉体に製剤化されてもよい。

【0048】

以上で述べた本発明の製剤は、上記で述べたような方法で、ヒトに投与することにより、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療、又は、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いることができる。

40

【0049】

<スクリーニング方法>

本発明に係るスクリーニング方法は、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法、又は、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法である。

【0050】

(神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法)

50

本発明の神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法は、被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程と、被験物質が投与された動物細胞又はヒトを除く動物の、P Q B P - 1による神経幹細胞増殖促進の程度を測定する工程と、測定結果に基づいて、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有する。

【0051】

(シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法)

本発明のシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質のスクリーニング方法は、被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程と、被験物質が投与された動物細胞又はヒトを除く動物の、P Q B P - 1によるシナプス後部形成の促進の程度を測定する工程と、測定結果に基づいて、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有する。

10

【0052】

上記の各スクリーニング方法によれば、症状改善が検出された被検物質により、P Q B P - 1の機能を補完又は代替できるため、神経幹細胞の減少に関連する疾患又はシナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いられる製剤の候補物質として特定できる。以下に上記の両スクリーニング方法の各工程について説明する。

20

【0053】

(投与工程)

投与工程は、被験物質を、動物細胞又はヒトを除く動物に投与する工程である。

【0054】

被験物質は、特に限定されず、天然又は合成の有機又は無機の低分子又は高分子物質等の任意の物質であってよい。

【0055】

動物細胞は、P Q B P - 1を発現する細胞(神経細胞、神経幹細胞等)であれば、特に限定されず、ヒト、マウス等の従来公知の動物の細胞を使用することができる。また、動物細胞は、野生型でもよく、あらかじめP Q B P - 1の発現が抑制されたものでもよい。

30

【0056】

ヒトを除く動物は、特に限定されないが、例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ等の哺乳等物等を使用することができる。

【0057】

投与方法は、特に限定されず、例えば、動物細胞に投与する場合、動物細胞を含む組織検体等と、被験物質を混合してもよく、被験物質の存在下で動物細胞を培養してもよい。あるいは、ヒトを除く動物に投与する場合、例えば、非経口投与であってもよい。非経口投与は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等であってもよい。また、経口投与であってもよい。

40

【0058】

(測定工程)

測定工程は、被験物質が投与された動物細胞又はヒトを除く動物の、内在性P Q B P - 1の発現量又はP Q B P - 1による神経幹細胞増殖促進の程度、もしくは、P Q B P - 1によるシナプス後部形成の促進の程度を測定する工程である。

【0059】

測定方法は、特に限定されず、従来公知の方法を使用することができ、例えば、被験物質の投与後の動物細胞又はヒトを除く動物中から抽出したP Q B P - 1を発現する細胞の、被験物質の投与前のP Q B P - 1の発現量、又は神経幹細胞の数もしくはシナプス後部形成と、被験物質の投与後のP Q B P - 1の発現量、又は神経幹細胞の数もしくはシナ

50

プス後部形成を比較することで、神経幹細胞増殖促進の程度又はシナプス後部形成の促進の程度を測定することができる。この測定結果に基づいて、後述の選択工程において、候補物質を選択することができる。

【0060】

(選択工程)

選択工程は、上記測定結果に基づいて、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いられる製剤、又は、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防もしくは治療に用いられる製剤の候補物質として被験物質を選択する工程である。

【0061】

選択方法は、特に限定されず、従来公知の選択方法により候補物質を選択すればよい。例えば、PQBP-1の発現量、神経幹細胞増殖の程度又はシナプス後部形成の促進の程度に基づいて、候補物質を選択してもよい。これらは、他のPQBP-1の発現量、神経幹細胞増殖の程度又はシナプス後部形成の促進の程度と比較することで、選択してもよい。比較対象の具体例としては、PQBP-1の発現量が減少している動物細胞又はヒトを除く動物や、神経幹細胞増殖の程度、シナプス後部形成の促進の程度が減少しているものであってもよく、あるいは被験物質が投与されていないネガティブコントロールであってもよい。また、選択は、PQBP-1の発現量、神経幹細胞増殖の程度又はシナプス後部形成の促進の程度が回復することを確認することで、被験物質を候補物質として選択してもよく、これらがネガティブコントロールより上昇していることを確認することで選択してもよい。

10

20

【実施例】

【0062】

(PQBP-1遺伝子ノックアウトマウスの作製)

個体の発生に必須な遺伝子は単純な方法ではノックアウト個体を得ることができないが、Cre-loxP系等を用いることで特定の条件下でのみ遺伝子ノックアウトすることが可能である。本実施例では、Nestinが神経幹細胞で選択的に発現すること、及び、Synapsin1が成熟神経細胞で選択的に発現することを利用して、神経幹細胞を標的とするノックアウトマウス(Nestin-Cre-cKOマウス)、及び、成熟神経細胞を標的とするノックアウトマウス(Synapsin1-Cre-cKOマウス)を作成した。以下、Nestin-Cre-cKOマウスは、神経幹細胞でPQBP-1遺伝子がノックアウトされたマウス、Synapsin1-Cre-cKOマウスは、成熟神経細胞でPQBP-1遺伝子がノックアウトされたマウスをいう。

30

40

【0063】

ターゲティングベクターを作製するために、まず、マウスのBAC(bacterial artificial chromosome)ライブラリー(ID:RP23-404N15)から、PCRによって3種類のPQBP-1ゲノムフラグメントを合成した。そのうち、エキソン1及びエキソン2を含む約3.6kbの5'側フラグメントを、FLP認識標的配列に挟まれたネオマイシン耐性遺伝子の配列の上流に組み込み、エキソン3から7を含む約3.9kbのフラグメントを2つのLoxP配列の間に組み込み、約4.1kbのイントロンのフラグメントを3'側に付加し、3'側の配列の外側に、組み替え時のランダム挿入を防ぐためにジフテリア毒素遺伝子(DTA)を付加した。この操作により、ターゲティングベクターを作製した。

【0064】

作成したターゲティングベクターをES細胞(C57BL/6)にエレクトロポレーションにより導入し、G418(株式会社シグマ社製、200mg/ml)により相同組換えが行われたES細胞を選択後、PCRにより目的遺伝子が導入されたことを確認した。選択されたES細胞について、制限酵素処理し、その後のゲノムをサザンブロッティングにより分析することで、目的遺伝子が導入されたことを更に確認した。

【0065】

選別されたES細胞をC57BL/6マウス胚盤胞ヘインジェクションすることで、キ

50

メラマウスを作製した。このキメラマウスをC57BL/6マウスと交配して、目的の対立遺伝子を有するマウスを作製した。ネオマイシン耐性遺伝子は、CAG-FLPe組換えトランスジェニックマウスと交配することで取り除いた。これにより得られた、PQBP-1-floxヘテロ接合型雌マウスを、更にNestin-Cre雄マウス(B6.Cg-Tg(Nes-Cre)1Kln/J; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)と交配させ、Nestin-Cre-ノックアウト(cKO)マウスを作製した。また、PQBP-1-floxヘテロ接合型雌マウスを、Synapsin1-Cre雄マウス(B6.Cg-Tg(Syn1-Cre)671Jxm/J; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)と交配させ、Synapsin1-Cre-ノックアウト(cKO)マウスを作製した。なお、Nestin-Cre-cKOマウスと、Synapsin1-Cre-cKOマウスは、それぞれ雄と雌両方のマウスについて作製した。

PQBP-1遺伝子は、X染色体上の遺伝子であるから、これらcKOマウスは、X染色体が1本の雄ではPQBP-1遺伝子はノックアウトされているが、X染色体が2本の雌ではPQBP-1遺伝子は正常とノックアウトのヘテロ接合となる。

【0066】

(脳の解析)

PQBP-1遺伝子に変異した患者の脳の構造を磁気共鳴画像により解析した。その結果を図1に示す。図1中、(a)は、水平面、(b)は冠状面、(c)は矢状面を示す。その結果、PQBP-1に変異した患者において、通常の皮質構造であることが確認された。

【0067】

次に、2ヶ月の成体マウスから脳を取り出した。脳からの取り出しは、常法に従って行った。成体マウスは、(神経幹細胞で)PQBP-1遺伝子がノックアウトされたNestin-Cre雄及び雌マウス、(成熟神経細胞で)PQBP-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre雄及び雌マウス、PQBP-1遺伝子がノックアウトされていないコントロールの雄及び雌マウスを用いた。図2は、PQBP-1遺伝子がノックアウトされたNestin-Cre雄及び雌マウスと、PQBP-1遺伝子がノックアウトされていないコントロールの雄及び雌マウスの脳の写真であり、図4はPQBP-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre雄及び雌マウスと、PQBP-1遺伝子がノックアウトされていないコントロールの雄及び雌マウスの脳の写真である。また、各のマウスのそれぞれの脳の質量を測定した。その結果を図3、図5に示す。図3、図5中、(a)は雄マウスについての結果を示し、(b)は雌マウスについての結果を示す。なお、図中の「XY」は、野生型のC57BL/6雄マウスを意味し、「XX」は、野生型のC57BL/6雌マウスを意味し、「XFloxy」及び「XF^fY」は、PQBP-1-floxヘテロ接合型雄マウスを意味し、「XFloxx」及び「XF^fX」は、PQBP-1-floxヘテロ接合型雌マウスを意味する。また、図中の「+」の記号は、該記号が付されたマウスと、Nestin-Creマウス又はSynapsin1-Creマウスとを交配して作製したマウスを意味し、「-」の記号は、該記号が付されたマウスと、Nestin-Creマウス又はSynapsin1-Creマウスとを交配せずに、野生型のC57BL/6と交配して作製されたマウスを意味する。図3、5の各棒グラフの上の数値は、各マウスのn数を示す。

【0068】

図2、3から、胎生期の神経幹細胞でPQBP-1遺伝子がノックアウトされたNestin-Cre-cKO雄マウスにおいて、脳が小さくなり、脳の質量が有意に減少することが確認された。これにより、PQBP-1の減少による小頭症は、ヒトの男性で特に発症しやすいことが示された。また、図4、5から、成熟神経細胞でPQBP-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre-cKOにおいては、小頭症は発症しないことが示された。これにより、PQBP-1の減少によって発症する小頭症は、先天性であることが示された。

10

20

30

40

50

【0069】

また、2ヶ月の成体マウスの冠状面の写真を撮影した。成体マウスとしては、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄及び雌の成体マウスと、PQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄及び雌の成体マウスを用いた。図6中、(a)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雄成体マウスについての写真であり、(b)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄成体マウスについての写真であり、(c)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしていない雌成体マウスについての写真であり、(d)はPQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雌成体マウスについての写真である。

【0070】

図6から、PQBP-1遺伝子の変異したヒトと同様に(図1を参照)、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Creマウスの雄においては、脳の構造に特に異常は観察されないことが示された。これにより、PQBP-1の減少が原因となる小頭症は、脳の構造の異常を伴わないタイプの小頭症であることが示された。

【0071】

(Nestin-Cre-cKOマウスの細胞周期の分析)

Nestin-Cre-cKOマウスの神経幹細胞(NSPC)の細胞周期の分析を行った。まず、BrdU(シグマ社製、100mg/kg体重)を、E14(胎生14日)の各妊娠マウスの腹腔内に注入した(妊娠マウスの種類は後述の表1に示す)。妊娠マウスにBrdUを繰り返し注入し(3時間間隔)、累積してラベリングを行った。各マウスは、最初のBrdUの注入後、1、1.5、2、3.5、6.5、15.5又は24.5時間にそれぞれの胚脳を取り出した。取り出した胚脳を4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに組み込んだ。胚脳の断片は、3mmの間隔で作製し、パラフィンを除き、再水和し、それから、15分間、pHが6.0の10mMクエン酸緩衝液中にいた状態で電子レンジで加熱した。その後、抗体のインキュベーションを、マウス抗BrdU抗体(1:200、BD Biosciences社製)、ウサギ抗ホスホ-ヒストンH3(pH3)抗体、M期の細胞のマーカー(1:500、ミリポア社製)を用い、4、オーバーナイトで行った。二次抗体のインキュベーションは、Alexa Fluor 488又はCy3複合体(1:500、Invitrogen社製)を用いて行った。脳室帯における、BrdU/pH3ダブル陽性細胞のpH3陽性細胞に対する割合を、G2/M期の長さを決定するためにBrdUの単一の注射した後、1、1.5、2時間で計算した。1、1.5、2、3.5及び6.5時間における標識化指数値(LI)の直線グラフによって、Y軸切片(0時間でのLI)を推定し、傾きを計算した。野生型マウスの脳室帯での成長率(増殖する細胞の割合)が、1.0に近い場合、0時間におけるLIと傾きは、全細胞周期(T_s/T_c)に対するS期の割合と、全細胞周期($1/T_c$)の逆数をそれぞれ表す。 T_s と T_c は、S期、全細胞周期の長さを表す。これらの値(T_s/T_c と $1/T_c$)から、 T_s と T_c を算出した。それぞれの細胞周期の長さを、表1に示す。

【0072】

【表1】

	— XY	— XFloxy	Nes-Cre XY	Nes-Cre XFloxy
Tc	18.48	18.32	18.12	20.32
Ts	4.99	4.93	4.71	4.80
G2	0.90	0.96	0.97	0.92
M	1.12	1.11	1.10	2.53
G1	11.47	11.31	11.36	12.07

【0073】

表1から、細胞周期の長さが、コントロールと比較して、Nestin-Cre-cK

マウスにおいて、細胞周期が長くなっていることが確認された。特に、G2/M期は、コントロールと比較して67パーセントと大幅に延び、G1期は6%と僅かに延長したことが観察された。このように、PQBP-1をノックアウトすることで、特にM期の細胞周期が長くなったことが示された。

【0074】

(Nestin-Cre-cKOマウスの細胞数の割合の分析)

幹細胞プールからの神経新生をBrdU及びKi67の共染色によって分析した。BrdUを妊娠マウスに腹腔内注射して24又は72時間後に、神経新生の細胞数(BrdU+/Ki67-)、幹細胞プール中に残っている細胞数(BrdU+/Ki67+)、ラベルされていない神経幹細胞(BrdU-/Ki67+)の数を計算するためにE15のそれぞれの胚脳を分析した。その結果、24時間後、72時間後において、各グループの細胞の割合に差は検出されなかった。図7は、注入して24時間後の、神経新生の細胞数、幹細胞プール中に残っている細胞数、ラベルされていない神経幹細胞(BrdU-/Ki67+)の数の相対的な割合を示すグラフである。

10

【0075】

(Nestin-Cre-cKOマウスの細胞死の分析)

Nestin-Cre-cKOマウスと、Nestin-Creマウスにおける、大脳皮質の細胞死のレベルを、E10、E15、E18、P0、及びP60において、TUNEL染色によって評価した。その結果を図8に示す。図8より、Nestin-Cre-cKOマウスと、Nestin-Creマウスとの間で、細胞死した細胞の数に差がないことが確認された。

20

【0076】

従来、小頭症は、神経幹細胞の分化効率が上昇する(このために幹細胞が枯渇する)、神経幹細胞の細胞死が亢進する、分化ニューロンの細胞移動が障害される等のメカニズムによるものであると考えられていた。しかしながら、上記の結果より、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre-cKOマウスは、小頭症を発症するが、上記のメカニズムが生じおらず、そのかわりに細胞周期時間が延長していることが示された。この細胞周期の延長により、神経幹細胞の分裂回数を減らし、結果としてニューロン産生が減少していると考えられる。

30

【0077】

(PQBP-1によるスプライシングと関連性の強い遺伝子の分析)

PQBP-1によるスプライシングと関連性の強い遺伝子の分析を行うために、野生型のマウスとPQBP-1遺伝子をノックアウトしたマウスとのそれぞれのエキソンのシグナルを比較して、エキソンのレベルが著しく変化した遺伝子を見つける「エキソンエキソン分析」を行った。その差は、2つの試料の手段が同じであるという帰無仮説に基づいて、ストウーデントのt検定により調べた。また、エキソン間の相対的な発現レベルの変化を検出する「バリアンス分析」を行った。これは、野生型及びPQBP-1をノックアウトしたマウスの各遺伝子におけるエキソンレベルのプローブセットを用いて実施した。その差は、これら2つのサンプルが同じパターン及び分散を有するという帰無仮説に基づくF-testによって調べた。なお、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたマウスのエキソンは、E15のNestin-Cre-cKOマウスの神経幹細胞(Neural Stem Cell)、生後4週齢のNestin-Cre-cKOマウスの皮質、又は、生後4週齢のSynapsin1-Cre-cKOマウスの皮質を用いて、それぞれを野生型マウスと比較した。その結果を表2~4に示す。なお、遺伝子が複数のエキソンプローブを保有する場合、最も低いp-値を用いた。表2は、E15のNestin-Cre-cKOマウスと野生型マウスの神経幹細胞を比較した結果を示す。表3は、生後4週齢のNestin-Cre-cKOマウスと野生型マウスの皮質を比較した結果を示す。表4は、生後4週齢のSynapsin1-Cre-cKOマウスと野生型マウスの皮質とを比較した結果を示す。

40

【0078】

50

【表 2】

	Gene Symbol	Exon-Exon (t-test)	Variance (F-test)
		cKO vs WT	cKO vs WT
Nes-cKO vs. WT (normalized)	Anapc1	0.000229	0.039263
	Anspc2	0.001590	0.810960
	Anspc4	0.004486	0.968582
	Ncam1 variant 1	0.178742	0.924134
	Ncam1 variant 3	0.027464	0.927272
	Pqbp1	6.391E-06	2.734E-14

10

【 0 0 7 9 】

【表 3】

	Gene Symbol	Exon-Exon (t-test)	Variance (F-test)
		cKO vs WT	cKO vs WT
Nes-cKO vs. WT (normalized)	Anapc1	0.002232	0.007268
	Anspc2	0.000329	0.700063
	Anspc4	0.017040	0.349418
	Ncam1 variant 1	0.040663	0.830541
	Ncam1 variant 3	0.002262	0.451681
	Pqbp1	0.000100	8.664E-06

20

【 0 0 8 0 】

【表 4】

	Gene Symbol	Exon-Exon (t-test)	Variance (F-test)
		cKO vs WT	cKO vs WT
Syn-cKO vs. WT (normalized)	Anapc1	0.000705	0.002233
	Anspc2	0.007623	0.275360
	Anspc4	0.016360	0.155673
	Ncam1 variant 1	0.074728	0.225696
	Ncam1 variant 3	0.001484	0.155621
	Pqbp1	0.004363	0.014594

30

【 0 0 8 1 】

その結果(表 2、表 3、表 4)、APC1とPQBP-1は、両方の分析で、「E15のNestin-Cre-cKOマウス、生後4週齢のNestin-Cre-cKOマウス」、及び、生後4週齢のSynapsin1-Cre-cKOマウスのすべての遺伝子型において、それぞれの発現レベルが著しく影響を受けたことが確認された。一方、APC4は、Nestin-Cre-cKOマウスの皮質では発現レベルの変化は有意であるとはいえないが、神経幹細胞では有意であることが示された。一方、エキソアレイデータの2つの分析(エキソエキソ分析とパリアンス分析)と、スプライシング/転写の寄与は、結果が相関していると推測される。この推測から、転写とスプライシングの両方がAPC1とPQBP-1に影響を与えているのに対し、APC4では転写の影響が比較的大きいことが示唆された。

40

【 0 0 8 2 】

PQBP-1によるスプライシングと関連性の強い遺伝子の分析を更に行うために、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を行った。分析には、Nestin-Cre-cKOマウスと、野生型のマウスとをそれぞれ3種用いた

50

。G S E Aにより選択された、M期に關係のある遺伝子について、P P I分析を行った。その結果、M期においてP Q B P - 1と強い関連性のある遺伝子が、U - 5 1 5 k d、A P C 2、A P C 4であることが確認された。

【0083】

(Nest in - Cre - c K Oマウスに対するA P C 4遺伝子の導入試験)

A P C 4遺伝子を、P Q B P - 1がノックアウトされたマウスに導入する試験を行った。まず、マウスのA P C 4のc D N A (Genbank accession number NM__024213)を、R T - P C Rにより準備し、これを、X h o I / B a m H Iで制限酵素処理したp I R E S 2 - h r E G F P I I (Stratagene社製)に組み込み、p A p c 4 - I R E S 2 - h r E G F P I Iを作製した。この遺伝子を用い、野生型マウスと、Nest in - Cre - c K Oマウスの胚の脳室にエレクトロポレーションにより導入した。

10

【0084】

図9(a)は、野生型のマウスと、Nest in - Cre - c K Oマウスと、A p c 4が形質転換された野生型マウスと、A p c 4が形質転換されたNest in - Cre - c K Oマウスの、それぞれのE 1 4の胚から準備した神経幹細胞の増殖を示す。これにより、A P C 4をP Q B P - 1をノックアウトしたマウスに導入することで、神経幹細胞の増殖が、有意に回復することが確認された。また、図9(b)は、ウエスタンブロッティングによる、A P C 4、P Q B P - 1、C y c l i n B、G A P D Hのそれぞれの発現量を示す。これにより、A P C 4が形質転換されたNest in - Cre - c K Oマウスにおいて、P Q B P - 1が発現していないこと、A P C 4の発現量が、A P C 4を導入していないマウスより増えていることが確認された。また、C y c l i n Bの発現量が、Nest in - Cre - c K Oマウスにおいて増えているのに対し、A P C 4を導入したNest in - Cre - c K Oマウスにおいては、発現が抑えられていることが確認された。

20

【0085】

また、F A C S分析により、それぞれのマウスのE 1 4の胚から抽出した神経幹細胞において、それぞれの細胞数の数を確認した。その結果を図10に示す。(a)は、野生型マウス、(b)は、Nest in - Cre - c K Oマウス、(c)は、A P C 4が形質転換されたNest in - Cre - c K Oマウス、(d)はA P C 4が形質転換された野生型マウスにおける、それぞれの細胞数の数を示す。これにより、Nest in - Cre - c K Oマウスにおいて、G 2 / M期の割合が野生型マウスより上昇していたが、A P C 4を導入することで、G 2 / M期の割合の上昇が抑えられることが確認された。

30

【0086】

また、頂端表面に対する軟膜表面の割合が、子宮内電気穿孔法により形質転換されたE G F P陽性細胞の増殖に対して影響を与えるかを試験した。具体的には、まず、マウスのA P C 4のc D N A (Genbank accession number NM__024213)を、R T - P C Rにより準備し、これを、X h o I / B a m H Iで制限酵素処理したp I R E S 2 - E G F P (Clontech社製)に組み込み、p A p c 4 - I R E S 2 - E G F Pを作製した。野生型マウスと、Nest in - Cre - c K OマウスのE 1 3の胚の脳室に、p A p c 4 - I R E S 2 - E G F P又はp I R E S 2 - E Gを導入し、E 1 8の胚の脳組織を分析した。その結果を図11、12に示す。この結果から、頂端表面に対する軟膜表面の割合が、P Q B P - 1遺伝子がノックアウトされたマウスにおいて減少していたが、A P C 4を外から加えることにより、回復した。これにより、細胞周期の延長が、A P C 4を加えることで、回復することが示された。

40

【0087】

(Nest in - Cre - c K Oマウスに対する、P Q B P - 1遺伝子の導入試験)

まず、P Q B P - 1遺伝子がノックアウトされたマウス(Nest in - Cre - c K Oマウス)にヒトP Q B P - 1遺伝子を導入した。具体的には、ベクターとしてA A Vベクタープラスミドを用いた。A A Vベクタープラスミドは、ヒトサイトメガロウイルス前

50

初期プロモーター（CMVプロモーター）からなる発現カセットを含有し、その後ろ側に、ヒトPQBP1又はヒトPQBP1-EGFPをコードするcDNA、AAV3ゲノムの逆方向末端反復の間のシミアンウイルス40ポリアデニル化シグナル配列（SV40ポリ（A））が続くように設計した。組換えAAVベクター（AAV-PQBP-1ベクター）は、ベクタープラスミド、AAV2 rep及びAAV1 vp発現プラスミド、及びアデノウイルスヘルパープラスミド、pHelper（Agilent Technologies社製）を用いて、HEK293細胞への一過的な導入により作製した。組換えウイルスは、2つの経時的な塩化セシウム勾配の分離形成によって精製し、ウイルス価を定量RT-PCRによって決定した。AAVベクター（AAV-PQBP-1ベクター）のインビボでの投与は、C57BL/6J妊娠マウス（E10のNestin-Cre-cKO胎児マウスを妊娠）に腹腔内投与することにより、AAV-PQBP-1ベクター（ 2.0×10^{11} ゲノムコピー）をNestin-Cre-cKO胎児マウスに導入した。このAAV-PQBP-1ベクターが導入されたNestin-Cre-cKOMマウス（2ヶ月（10週齢））を用いて、以下の試験を行った。

10

【0088】

野生型マウス（2ヶ月（10週齢））と、Nestin-Cre-cKOMマウス（2ヶ月（10週齢））と、AAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入したNestin-Cre-cKOMマウス（2ヶ月（10週齢））の脳におけるタンパクを、ウエスタンブロットティングにより分析した。ウエスタンブロットティングの写真を図13に、PQBP-1のタンパク量の割合を示すグラフを図14にそれぞれ示す。ヒトPQBP-1タンパク質のアミノ酸配列と、マウスPQBP-1タンパク質のアミノ酸配列は、上記のとおり、高い相同性を有するため、ウエスタンブロットティングにおいても、タンパク質のサイズが略同じものとして検出される。これにより、PQBP-1遺伝子を導入することにより、PQBP-1のタンパク量が約2.5倍増えることが確認された。

20

【0089】

また、2ヶ月（10週齢）の成体マウスから脳を取り出した。成体マウスとしては、PQBP-1遺伝子がノックアウトされたNestin-Cre雄及び雌マウス、PQBP-1遺伝子がノックアウトされていないコントロールの雄及び雌マウスと、それぞれにAAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入したマウスとを用いた。それぞれのマウスの脳の重量を図15に示す。（a）は雄マウス、（b）は雌マウスの結果を示す。これにより、特に、PQBP-1がノックアウトされた雄のマウス（白の棒グラフ）において減少した脳の重量が、AAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入すること（黒の棒グラフ）で有意に回復したことが示された。

30

【0090】

また、2ヶ月（10週齢）の成体マウスの脳の形態の写真（図16）と冠状面の写真（図17）を撮影した。成体マウスとしては、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄の成体マウスと、AAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入した、PQBP-1遺伝子をノックアウトした雄の成体マウス（Nestin-Cre-cKOMマウス）を用いた。図17中、（a）はAAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入していないマウスの冠状面の写真を示し、（b）は、AAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入したマウスの冠状面の写真を示す。これにより、PQBP-1がノックアウトされた雄のマウスにおいて、脳の形態、冠状面においても、AAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入することで脳の重量が回復することが確認された。

40

【0091】

また、2.5か月の成体マウスの皮質の全体の厚さに対する各層の相対厚さの定量分析を行った。成体マウスとしては、PQBP-1遺伝子をノックアウトしたNestin-Cre雄の成体マウス（Nestin-Cre-cKOMマウス）（白の棒グラフ）と、AAV（AAV-PQBP-1ベクター）を導入した、PQBP-1遺伝子をノックアウトした雄の成体マウス（Nestin-Cre-cKOMマウス）（黒の棒グラフ）を用いた。また、各層の特異的なマーカーとして、Cux、Tbr1、GAD67、Foxp1を

50

用いた。その結果を図18に示す。この結果より、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入しても、特に層の厚さに変化はみられなかったことから、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入しても脳の厚さに影響を与える等の副作用はないことが確認された。

【0092】

以上の結果より、神経幹細胞が減少し、それによって発症する小頭症等の知的障害を、PQBP-1によって予防又は治療できることが示された。

【0093】

(行動解析)

3か月の成体マウス(Nestin-Cre-cKOマウス、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKOマウス)について、回転ロッドの試験を行った。まず、マウスを回転ロッド(直径3cm)に置き、回転速度を3.5回転から300秒で35rpmに直線的に増加させ、600秒経過するまで35rpmの回転数で続けた。各試験の間に10分の休憩間隔をおき、9回の試験(3日間連続して行い、1日3試験)を行った。ロッドから落下する時間を記録し、ロッドから落ちる平均時間を記録した。その結果を図19に示す。

10

【0094】

図19より、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKOマウスは、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入していないNestin-Cre-cKOマウスより、回転ロッドに滞在する時間が長かったことが示された。

20

【0095】

次に、3か月の成体マウス(野生型マウス、Nestin-Cre-cKOマウス、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したNestin-Cre-cKOマウス)について、フィア(恐怖)コンディショニングの試験を行った。この試験は、コンディショニングトライアルとテストトライアルの2つのパートにより構成した。フィアコンディショニングは、ステンレス製の格子床(34cm×26cm×30cm[H])を搭載した透明なプラスチック容器で実施した。CCDカメラを、容器の天井に備え付け、ビデオモニターとコンピュータに接続した。格子床は、ショック発生器に接続した。ホワイトノイズ(65db)は、聴覚信号としての(条件刺激、CS)拡声器から供給した。2秒間連続での0.4ミリアンペアのフットショック(無条件刺激、US)を30秒間、CSの期間の終了時に行った。コンディショニングトライアルは、30秒ごとに区切られた3つのCS-USの組み合わせによって、2分間の探査期間で構成した。テストは、コンディショニングトライアルの24時間後にフットショックを行わずに、5分間、同じコンディショニングチャンパー中で行った。マウスの止まった反応の速度を、フィアメモリーの指標として測定した。その結果を図20に示す。これにより、PQBP-1遺伝子がノックアウトされたNestin-Cre-cKOマウスでは、野生型マウスより止まった時間が少なかったが、AAV(AAV-PQBP-1ベクター)を導入したことで、止まった時間が有意に上昇した。

30

【0096】

(Synapsin-1-Cre-cKOマウスに関する行動解析)

野生型マウス、Floxマウス、Synapsin-1-Cre-cKOマウスについて、上記Nestin-Cre-cKOマウスでの行動解析と同様の方法で回転ロッドによる回転速度の試験を行ったところ、Synapsin-1-Cre-cKOマウスが、他のコントロールのマウスより、Nestin-Cre-cKOマウス同様、有意に回転ロッドに滞在した時間が短かったことが確認された(図21)。

40

【0097】

更に、野生型マウス、Floxマウス、Synapsin-1-Creマウス、Synapsin-1-Cre-cKOマウスについて、上記と同様の方法でフィアコンディショニングの試験を行ったところ、Synapsin-1-Cre-cKOマウスが、他の

50

コントロールのマウスより、Nestin-Cre-cKOマウス同様、有意に止まった時間が少なかったが確認された(図22)。

【0098】

(Synapsin-1-Cre-cKOのシナプス形成の分析)

Synapsin1-Creマウス(n=3、4週齢)、Floxマウス(n=3、4週齢)、Synapsin1-Cre-cKOマウス(n=3、4週齢)の成熟神経細胞のシナプス後部形成の程度を測定した。測定は、それぞれのマウスの成熟神経細胞を、2光子顕微鏡を用いて観察することによって行った。より具体的には、あらかじめAAV-GFP(5x10¹¹ viral genome/ml)をretrosplenial dysgranular (RSD) cortex(bregmaより前後方向-2.0mm、内外方向0.6mm)内に注入しておいたそれぞれのマウスに、イソフルランによる吸入麻酔(0.1ml/min)、観察部皮膚を切開し、ドリルを用いて頭蓋骨を薄く削り観察用のウィンドウを作成した(thinned-skull法)。マルチフォトンレーザーMaiTai HP DeepSee-OL(Spectra Physics社製)、水浸型対物レンズXLPlanN25xW(オリンパス社製)を搭載した2光子レーザー顕微鏡システムFV1000MPE(オリンパス社製)を用いてスパインと樹状突起のイメージングデータを取得した。GFPはレーザー波長890nmで励起し、thinned-skull法によるウィンドウよりRSD cortexを観察し、1μm間隔で1024x1024ピクセルを持つ解像度のイメージングデータを取得した。その観察結果を図23に示す。これにより、成熟神経細胞でPQB-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre-cKOマウスにおいて、シナプス後部の形成が減少していることが確認された。

10

20

【0099】

また、上記のSynapsin1-Creマウス(n=3、4週齢)、Floxマウス(n=3、4週齢)、Synapsin1-Cre-cKOマウス(n=3、4週齢)の成熟神経細胞のシナプス後部における、樹上の直径、突起ヘッドの直径、樹上突起の数(number/10μm)を測定した。測定は、上記のそれぞれのマウスから得られたイメージングデータをIMARIS(Bitplane社)に読み込ませ、フィラメントツール(樹状突起直径:0.297-4.950μm、スパインヘッド直径:0.2-3.0μm)を用いて樹状突起とスパインを認識させ3次元モデルを構築し解析することによって行った。その結果を図24に示す。これにより、成熟神経細胞でPQB-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre-cKOマウスにおいて、樹上の直径、突起ヘッドの直径、樹上突起の数が有意に減少していることが確認された。

30

【0100】

また、上記のSynapsin1-Creマウス(n=3、4週齢)、Floxマウス(n=3、4週齢)、Synapsin1-Cre-cKOマウス(n=3、4週齢)の成熟神経細胞のシナプス後部形成の程度の経時変化を確認した。測定は、上記のそれぞれのマウスのイメージングデータの観察を0、8、24時間で行った。その結果を図25に示す。これにより、経時変化とともに、成熟神経細胞でPQB-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre-cKOマウスのシナプス後部形成が減少することが確認された。

40

【0101】

また、上記のSynapsin1-Creマウス(n=3、4週齢)、Floxマウス(n=3、4週齢)、Synapsin1-Cre-cKOマウス(n=3、4週齢)の成熟神経細胞のシナプス後部形成の樹上突起の動的形態の変化を測定した。測定は、上記のそれぞれのマウスから得られたイメージングデータをIMARIS(Bitplane社)に読み込ませ、フィラメントツール(樹状突起直径:0.297-4.950μm、スパインヘッド直径:0.2-3.0μm)を用いて樹状突起とスパインを認識させ3次元モデルを構築し解析することによって行った。その結果を図26に示す。図26中「Formation」は、新たに形成されたシナプス後部の割合を示し、「Elimina

50

tion」は、形成されていたシナプス後部のうち、なくなったものの割合を示し、「Stable」は、変化がなかったシナプス後部の割合を示す。この結果から、成熟神経細胞でPQBP-1遺伝子がノックアウトされたSynapsin1-Cre-cKOマウスにおいて、新たに形成されたシナプス後部の割合が減少することが確認された。

【0102】

以上のことから、Synapsin1-Cre-cKOマウスの行動異常（学習障害、認知障害）は、シナプス後部形成異常との相関性が強く示唆された。

【0103】

（Synapsin1-Cre-cKOを用いたPQBP-1と関連性の遺伝子の解析）

4週齢のSynapsin1-Cre-cKO（n=3）及び野生型のマウス（n=3）の脳をサンプルとし、GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array（Affymetrix社）を用いてエキソンアレイデータを取得し、以下の手順によりエキソンアレイデータ分析を行った。

【0104】

まず、Affymetrix社のプロトコールに従い、各エキソンに対応するプローブセットのシグナル値を推定した。得られた各プローブセットのシグナル値を転写物単位でグルーピングし、各転写物に対応するプローブセット群のシグナル値の合計が一定となるように正規化を行った。次に、各転写物ごとに、Synapsin1-Cre-cKO及び野生型の各群におけるプローブセット群のシグナル値の分散に関する等分散の検定を行い、二群間で分散が有意に変化した転写物のリストを作成した。更に、各プローブセットについて、Synapsin1-Cre-cKOと野生型の二群間におけるシグナル値の平均値の差の検定を行うことにより、発現量が有意に変化したエキソンのリストを作成した。

【0105】

以上の操作により得られた転写物のリストとエキソンのリストの共通集合を求めることにより、PQBP-1に関連性の遺伝子を解析した。その結果を表5に示す。

【0106】

10

20

【表 5】

Disease group	Reference DB	Number of Genes belonging to disease group	Number of genes in array	Coverage of gene group by array	Number of genes changing in Syn-cKO	The ratio of changed genes in the gene group	Significance of changes in Syn-cKO (p-value by Fisher's exact test)
Autism	AutDB (http://autism.mindspec.org/autdb/)	615	544	88.46%	132	24.26%	8.83E-39
Mental Retardation (MR)	Genetics 166: 835-881	282	229	81.21%	29	12.66%	1.37E-03
Alzheimer's Disease (AD)	KEGG Pathway (map05010)	181	164	90.61%	26	15.85%	5.99E-05
Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)	KEGG Pathway (map05014)	52	50	96.15%	9	18.00%	0.0063
Huntington's Disease (HD)	KEGG Pathway (map05016)	189	170	89.95%	18	10.59%	0.0651
Parkinson's Disease	KEGG Pathway (map05012)	143	121	84.62%	11	9.09%	0.3626
Synapse	KEGG Pathway (5 pathways)	341	328	96.19%	49	14.94%	2.32E-07

10

20

30

【0107】

表5より、PQBP-1遺伝子は、精神発達遅滞 (Mental Retardation (MR))、アルツハイマー病 (ADD)、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS))、シナプスに関連する遺伝子群と、密接な関連性があることが示唆された。

40

【0108】

以上の結果から、シナプス後部形成が減少することによって発症するアルツハイマー病等の疾患は、PQBP-1によって予防又は治療可能であることが示唆された。

【0109】

(高脂肪食摂取マウスにおけるPQBP1-1の発現の解析)

高脂肪食を与えたマウスの脳におけるPQBP-1の発現を、ウエスタンブロッティングにより分析した。マウス (C57BL/6) は、6週齢から6週間の高脂肪食群 (n = 3、図27-30の「HFD6W」に相当) と、11週齢から1週間の高脂肪食群 (n =

50

3、図27-30の「HFD1W」に相当)を用いた。また、比較として高脂肪食を与えない通常食群(n=3、図27-30の「HFD0W」に相当)のマウスを用いた。分析は、それぞれのマウスの12週齢目に分析を行った。なお、高脂肪食としては、日本クレア社のHigh Fat Diet 32を用い、これをマウスに自由摂取させた。高脂肪食を摂取する以外の期間の高脂肪食群と、通常食群には、通常食(日本クレア社のCE-2)を自由摂取させた。水分も自由摂取とし、飼育室の明暗コントロールは12時間ごとに行い、室温 25 ± 2 、湿度 $50 \pm 10\%$ で飼育した。分析結果の写真を図27に示し、タンパク量の割合を示すグラフを図28に示す。従来より、肥満はアルツハイマー病の危険因子であると考えられていたが、この結果より、肥満によるPQBP-1の減少が、アルツハイマー病の原因となることが示唆された。

10

【0110】

(高脂肪食摂取マウスにおけるシナプス形成の程度の測定)

上記の高脂肪食を与えた高脂肪食群のマウスと、通常食を与えた通常食群のマウスにおける、シナプス後部の数を測定した。測定は、まず、10週齢でマウスにAAV-GFP(5×10^{11} viral genome/ml)がretrosplenial dysgranular (RSD) cortex (bregmaより前後方向-2.0mm、内外方向0.6mm)内に注入し、12週齢でイソフルランによる吸入麻酔(0.1 ml/min)、観察部皮膚を切開し、ドリルを用いて頭蓋骨を薄く削り観察用のウィンドウを作成した(thinned-skull法)。マルチフォトンレーザーMaiTai HP DeepSee-OL(Spectra Physics社製)、水浸型対物レンズXLPlanN25xW(オリンパス社製)を搭載した2光子レーザー顕微鏡システムFV1000MPE(オリンパス社製)を用いてスパインと樹状突起のイメージングデータを取得した。GFPはレーザー波長890nmで励起し、thinned-skull法によるウィンドウよりRSD cortexを観察し、 $1 \mu\text{m}$ 間隔で 1024×1024 ピクセルを持つ解像度のイメージングデータを取得した。得られたイメージングデータをIMARISに読み込ませ、フィラメントツール(樹状突起直径: $0.297 - 4.950 \mu\text{m}$ 、スパインヘッド直径: $0.2 - 3.0 \mu\text{m}$)を用いて樹状突起とスパインを認識させ3次元モデルを構築し解析することによって、測定を行った。その結果を図29に示す。これにより、シナプス後部の数が、高脂肪食を与えることにより減少することが確認された。この結果は、肥満によるPQBP-1の減少は、シナプス後部の形成の減少を引き起こし、それがアルツハイマー病の原因となることが示唆する。

20

30

【0111】

上記の高脂肪食を与えた高脂肪食群のマウスと、通常食を与えた通常食群のシナプス後部形成の樹状突起の動態形態変化を測定した。測定は、得られたイメージングデータをIMARISに読み込ませ、フィラメントツール(樹状突起直径: $0.297 - 4.950 \mu\text{m}$ 、スパインヘッド直径: $0.2 - 3.0 \mu\text{m}$)を用いて樹状突起とスパインを認識させ3次元モデルを構築し解析することによって行った。その結果を図30に示す。これにより、高脂肪食をマウスに与えることにより、形成されていたシナプス後部のうち、なくなるものの割合が増えることが確認された。

40

【0112】

以上の結果から、肥満によりPQBP-1が減少して、その結果、シナプス後部形成が減少することにより発症するアルツハイマー病等の疾患は、PQBP-1によって予防又は治療可能であることが示唆された。

【0113】

(AAV-PQBP-1ベクター投与によるマウスの大脳皮質神経細胞のスパインの形態観察)

5.5か月齢の5xFADマウス(アルツハイマー病モデルマウス)又は野生型マウスに、AAV-CMV-EGFP-PQBP-1ウイルスベクター(1×10^9 vg/ml)又はAAV-CMV-EGFPウイルスベクター(1×10^9 vg/ml) $100 \mu\text{l}$ を、osmotic pumpに充填後、マウス背部に皮下移植し、連結したガラスマイ

50

クロピペットでクモ膜下腔に72時間持続投与した。ウイルス投与開始日より14日後、thin-skull法(脳表の頭蓋骨を厚さ20-50 μ m程度まで薄く剥離する方法)にて、retrosplenial dysgranular (RSD) cortexの第1-2層の神経細胞のスパンを二光子顕微鏡により観察した。撮影した画像から画像解析ソフトimaris7.6.1を用いて、単位樹状長当たりのスパン数の定量評価を行った。マウスの大脳皮質神経細胞のスパンの画像を図31に示す。図32に、マウスの大脳皮質神経細胞の樹上突起の数(number/10 μ m)を示す。

【0114】

なお、5xFADマウスは、The Jackson Laboratoryより入手した。また、AAV-CMV-EGFP-PQBP-1ウイルスベクターは、上述の「Nestin-Cre-cKOマウスに対する、PQBP-1遺伝子の導入試験」におけるCMVプロモーターからなる発現カセットを含有するAAVベクタープラスミドにおいて、EGFP-ヒトPQBP-1をコードするcDNAが発現するように構成されたベクターである。AAV-CMV-EGFPウイルスベクターは、CMVプロモーターからなる発現カセットを含有するAAVベクタープラスミドにおいて、EGFPをコードするcDNAが発現するように構成されたベクターである。

10

【0115】

図31中、(a)は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された野生型のマウスの大脳皮質神経細胞のスパンの画像であり、(b)は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された5xFADマウスの大脳皮質神経細胞のスパンの画像であり、(c)は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターとAAV-CMV-PQBP-1ウイルスベクターが投与された5xFADマウスの大脳皮質神経細胞のスパンの画像である。図32中、「WT+AAV-CMV-EGFP」は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された野生型のマウス(n=8)についてのグラフであり、「5xFAD+AAV-CMV-EGFP」は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターが投与された5xFADマウス(n=5)についてのグラフであり、「5xFAD+AAV-CMV-PQBP-1+AAV-CMV-EGFP」は、AAV-CMV-EGFPウイルスベクターとAAV-CMV-PQBP-1ウイルスベクターが投与された5xFADマウス(n=8)についてのグラフである。

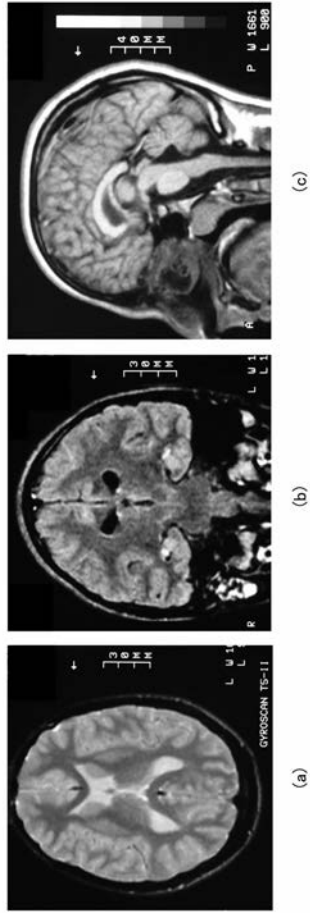
20

【0116】

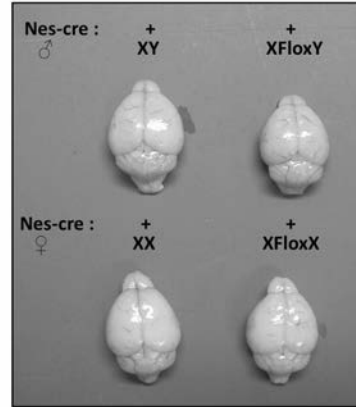
図31に示すように、5xFADマウスにおいては、野生型マウスよりスパンの数が減少しているのに対し、PQBP-1が投与された5xFADマウスにおいては、スパンの数が増えていることが確認された。また、図32に示すように、5xFADマウスにおいては、野生型マウスより樹状突起の数が有意に減少しているのに対し、PQBP-1が投与された5xFADマウスにおいては、樹状突起の数が、野生型マウスと同程度まで有意に改善されたことが確認された。この結果により、PQBP-1は、シナプス後部形成を促進することで、アルツハイマー病を治療又は予防できることがわかった。

30

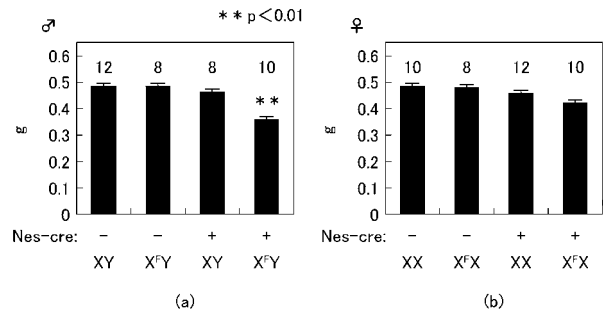
【 図 1 】



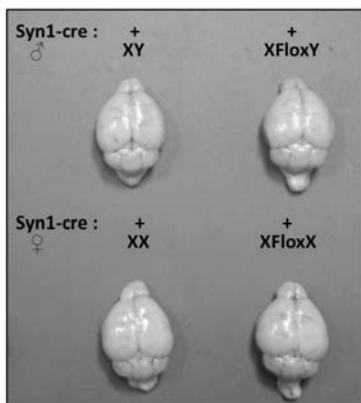
【 図 2 】



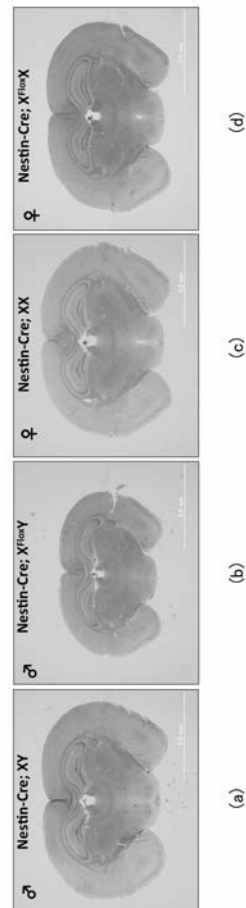
【 図 3 】



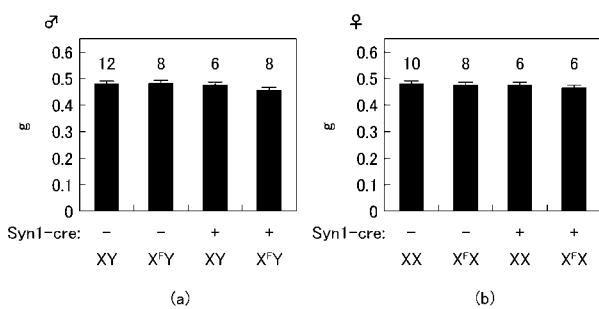
【 図 4 】



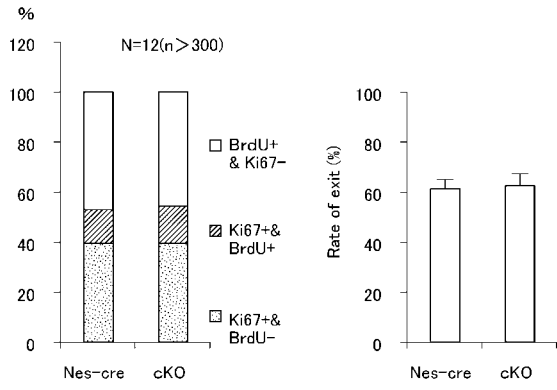
【 図 6 】



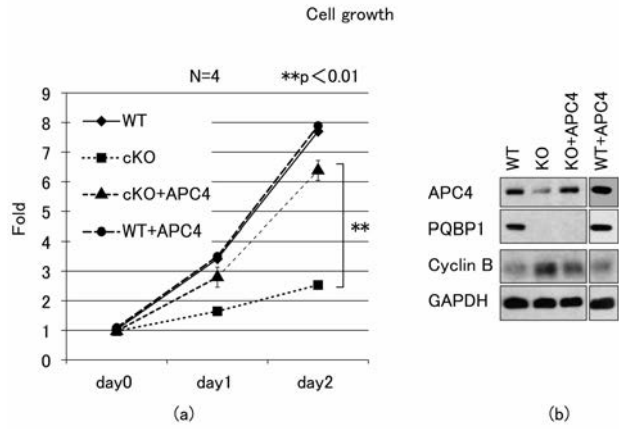
【 図 5 】



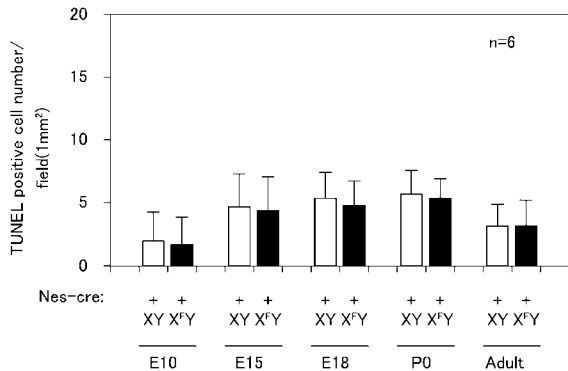
【 7 】



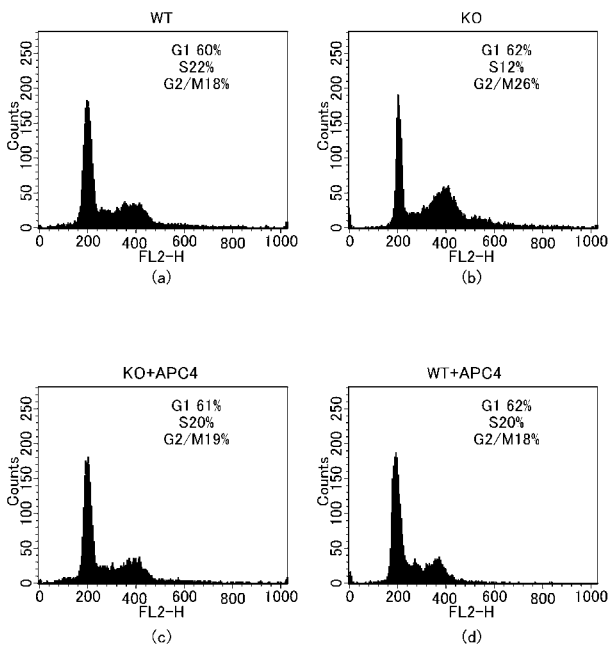
【 9 】



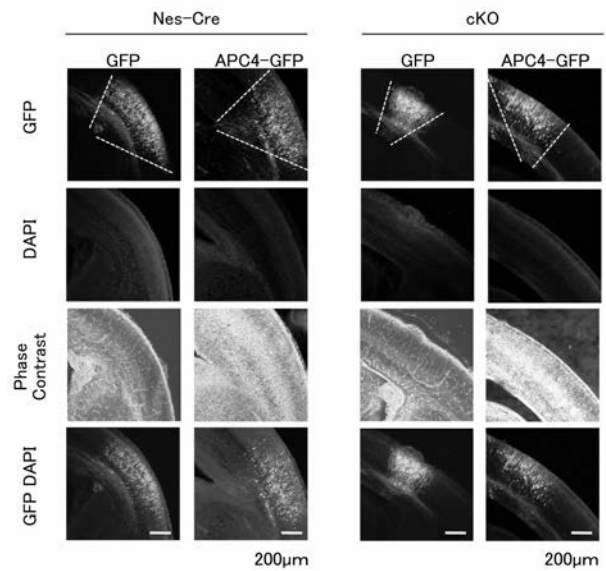
【 8 】



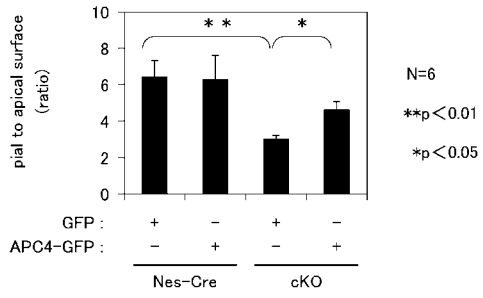
【 10 】



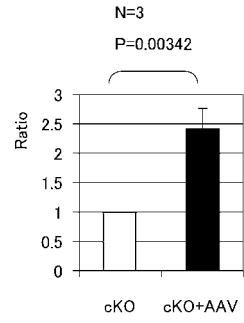
【 11 】



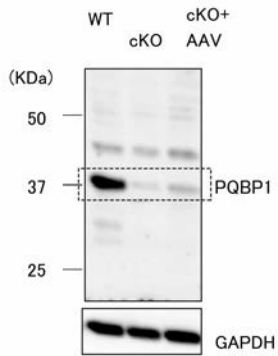
【 図 1 2 】



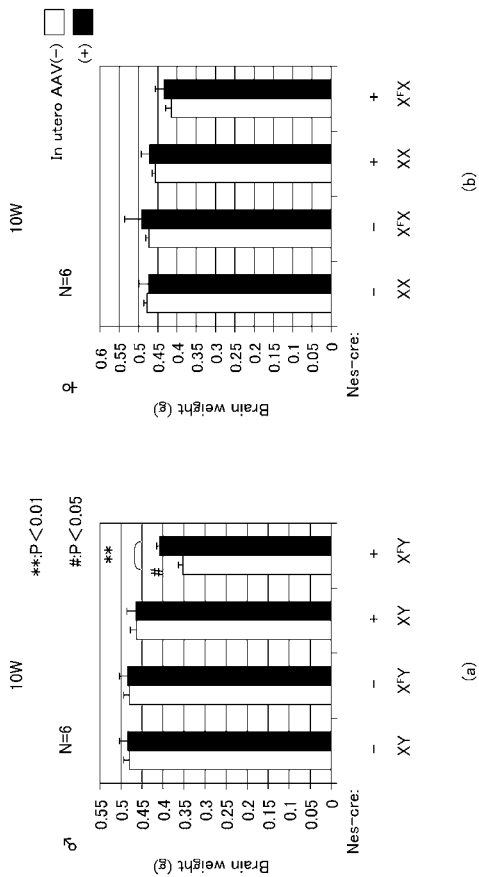
【 図 1 4 】



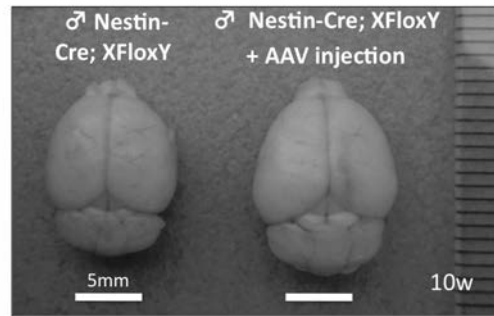
【 図 1 3 】



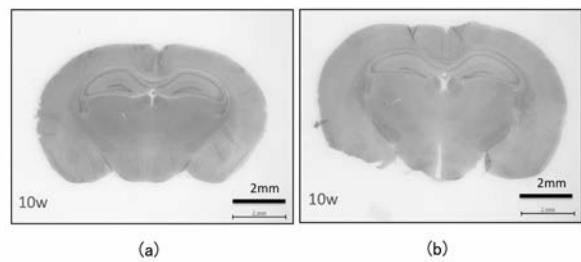
【 図 1 5 】



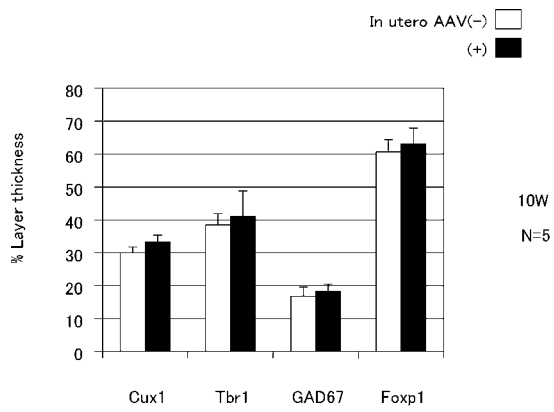
【 図 1 6 】



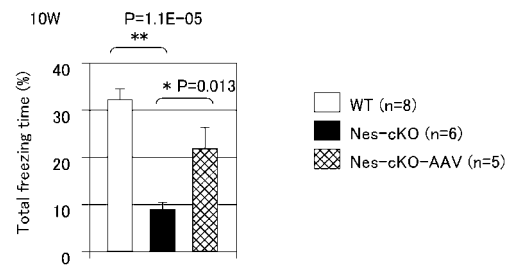
【 図 1 7 】



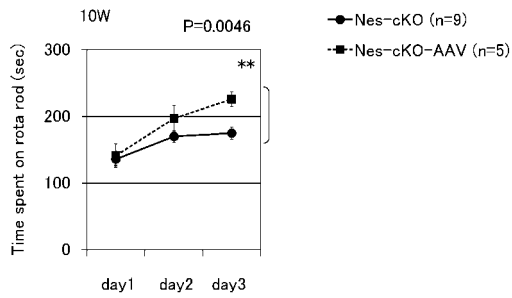
【 図 1 8 】



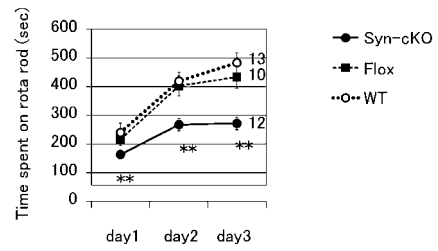
【 図 2 0 】



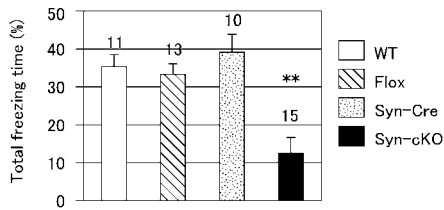
【 図 1 9 】



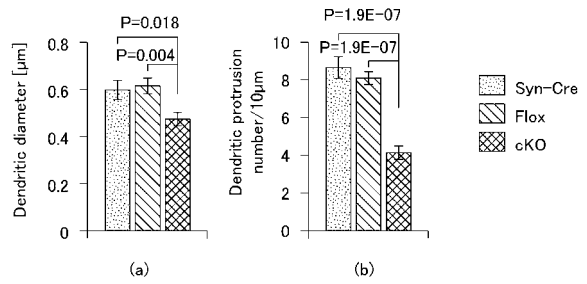
【 図 2 1 】



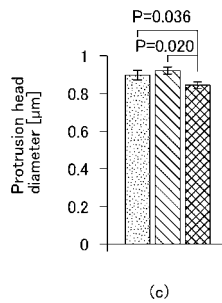
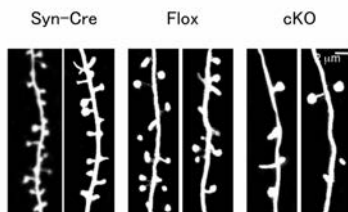
【 図 2 2 】



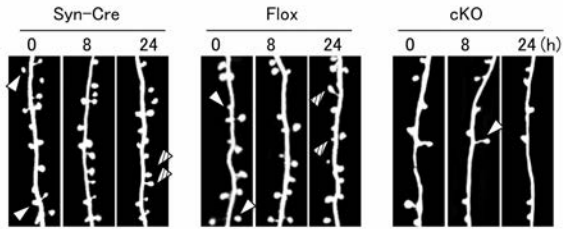
【 図 2 4 】



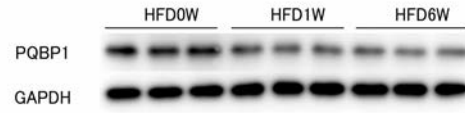
【 図 2 3 】



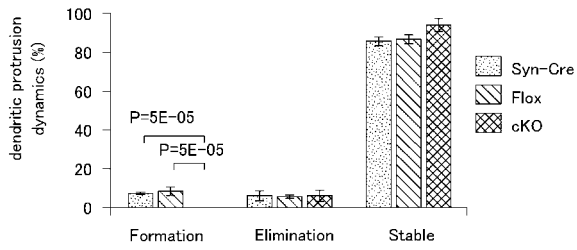
【 図 2 5 】



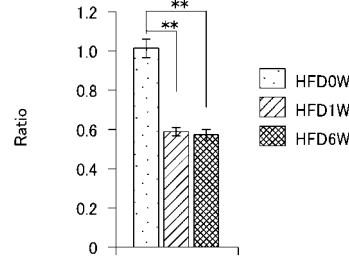
【 図 2 7 】



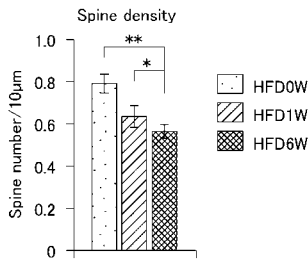
【 図 2 6 】



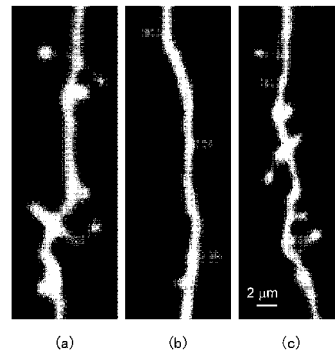
【 図 2 8 】



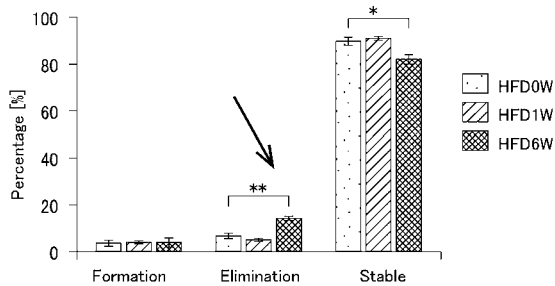
【 図 2 9 】



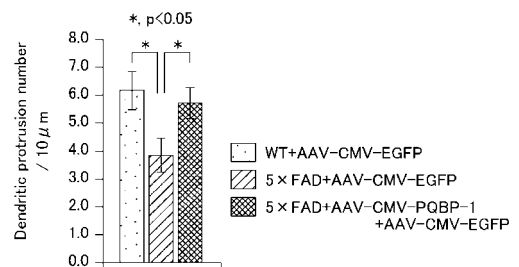
【 図 3 1 】



【 図 3 0 】



【 図 3 2 】



【配列表】

2016002854000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/069032
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K48/00(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0797(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i 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) A61K48/00, A61K31/711, A61K38/00, A61P25/00, A61P43/00, C12N5/0797, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hiroki SHIWAKU et al., "Molecular medicine of PQBP1-linked developmental disorder" Journal of Clinical and Experimental Medicine, 05 November 2011 (05.11.2011), vol.239, no.6, pages 653 to 659, entire text, particularly, page 654, right column, lines 1 to 6, page 655, left column, lines 4 to 7, page 655, right column, line 4 to page 656, left column, line 3, page 656, left column, line 9 to page 657, left column, line 6, page 657, right column, line 8 to page 658, right column, line 5	1-8 1-8
Y	LUO, H.; "Functional deficiency of PQBP1 impairs cell cycle progression of neural stem cells through a splicing factor U5-15kD", Journal of Japanese Biochemical Society, 2007, p.1P-0939, entire text	1-3, 6, 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 17 August 2015 (17.08.15)		Date of mailing of the international search report 01 September 2015 (01.09.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/069032

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI, J. H. et al.; "Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons" <i>European Journal of Neuroscience</i> , 1998, vol.10, pp.1704-1715, entire text, particularly, abstract, page 1704, left column, lines 1 to 5, right column, lines 1 to 6, page 1711, right column, line 4 to page 1712, right column, line 6	4-6, 8
X Y	JP 2008-178351 A (Tokyo Medical and Dental University), 07 August 2008 (07.08.2008), entire text; particularly, claims; paragraphs [0022], [0023]; examples (Family: none)	7, 8 7
P, X	ITO, H. et al.; "In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells" <i>Molecular Psychiatry</i> , 2015, vol.20, pp.459-471, entire text, particularly, summary	1-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 6 9 0 3 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. A61K48/00(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0797(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i											
B. 調査を行った分野											
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. A61K48/00, A61K31/711, A61K38/00, A61P25/00, A61P43/00, C12N5/0797, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	塩飽裕紀ら ; 「PQBPI 遺伝子異常による発達障害の分子医学」	1-8									
Y	医学のあゆみ, 2011.11.05, vol.239, No.6, pp.653-659 全文、特に、第654頁右欄第1-6行、第655頁左欄第4-7行、第655頁右欄第4行-第656頁左欄第3行、第656頁左欄第9行-第657頁左欄第6行、第657頁右欄第8-第658頁右欄第5行	1-8									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 17.08.2015		国際調査報告の発送日 01.09.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長岡 真	4U 5277								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2015/069032

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LUO, H. ; “Functional deficiency of PQBP1 impairs cell cycle progression of neural stem cells through a splicing factor U5-15kd” 生化学, 2007, p.1P-0939 全文	1-3, 6, 7
Y	LI, J. H. et al. ; “Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons” European Journal of Neuroscience, 1998, vol.10, pp.1704-1715 全文、特に、Abstract、第1704頁左欄第1-5行、右欄第1-6行、 第1711頁右欄第4行-第1712頁右欄第6行	4-6, 8
X	JP 2008-178351 A (国立大学法人 東京医科歯科大学), 2008.08.07, 全文、特に、特許請求の範囲、[0022]、[0023]、実施例	7, 8
Y	ファミリーなし	7
P, X	ITO, H. et al. ; “In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells” Molecular Psychiatry, 2015, vol.20, pp.459-471 全文、特に、要旨	1-8

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/00	G
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BC83 NA13 NA14 ZA01 ZA02 ZA15 ZC41

(54) 【発明の名称】神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。