

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-546704

(P2008-546704A)

(43) 公表日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 Z N A E	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66 G	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 6 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 7 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-517080 (P2008-517080)	(71) 出願人	503294773 ユニバーシティ オブ シカゴ アメリカ合衆国 イリノイ 60637, シカゴ, サウス エリス アベニュー 5801
(86) (22) 出願日	平成18年6月14日 (2006.6.14)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月7日 (2008.2.7)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/023215	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02006/138412	(72) 発明者	ポプコ, ブライアン アメリカ合衆国 イリノイ 60611, シカゴ, イースト 18ティーエイチ ストリート 324
(87) 国際公開日	平成18年12月28日 (2006.12.28)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/690, 691		
(32) 優先日	平成17年6月14日 (2005.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/744, 826		
(32) 優先日	平成18年4月13日 (2006.4.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/792, 007		
(32) 優先日	平成18年4月14日 (2006.4.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 脱髄障害を処置するための方法

(57) 【要約】

本発明は、神経学分野に属する。詳細には、本発明は、神経脱髄または再髄鞘形成で役割を果たす分子成分の発見および特徴付けに関する。さらに、本発明は、髄鞘低形成を示す動物モデルの生成に関する。本発明で具体化された組成物および方法は、特に、脱髄障害の薬物スクリーニングおよび/または治療に有用である。本発明は、神経脱髄を軽減する生物活性剤の開発方法を提供する。本方法は、(a) 候補薬剤を髄鞘形成細胞と接触させる工程と、(b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または前記遺伝子産物の活性の変化を検出する工程と、前記遺伝子または遺伝子産物が小胞体 (ER) ストレスに相関することと、(c) 前記遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは前記遺伝子産物の活性レベルが前記コントロール細胞と比較して調整された場合、前記薬剤を候補として選択する工程とを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の神経脱髄を阻害する方法であって、該被験体に髄鞘形成細胞中の小胞体（ER）のストレスレベルを調整するのに有効な量の生物活性剤（biologically active agent）を投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記生物活性剤が、髄鞘形成細胞中の小胞体（ER）の持続したストレスレベルを減少させるのに有効である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生物活性剤が、インターフェロン - （INF - ）アンタゴニストであり、但し、神経脱髄の発症後に適用する場合、該インターフェロン - （INF - ）アンタゴニストが抗 INF - 抗体ではない、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記生物活性剤が、予防効果を得るために神経脱髄の発症前に投与されるインターフェロン - （INF - ）またはインターフェロン - （INF - ）アゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 ER の持続したストレスレベルの減少が、小胞体（ER）ストレスに相関するタンパク質レベルの減少によって特徴づけられる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 ER ストレスに相関するタンパク質が、リン酸化燐臓 ER キナーゼ遺伝子（p - PERK）、真核細胞翻訳開始因子 2（eIF - 2）、真核細胞翻訳開始因子（eIF - 2）、イノシトール要求 1（inositol requiring 1）（IRE1）、活性化転写因子 6（ARTF6）、CAAT エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質（CHOP）、結合免疫グロブリンタンパク質（BIP）、カスパーゼ - 12、成長および DNA 損傷タンパク質 34（GADD34）、CreP（eIF2 リン酸化の構成性リプレッサー）、および X ボックス結合タンパク質 - 1（XBP - 1）からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記髄鞘形成細胞が前記被験体の中枢神経系または末梢神経系中に位置する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

神経脱髄の発症後に被験体の神経再髄鞘形成を促進する方法であって、該被験体に再髄鞘形成を生じているニューロン組織中の小胞体（ER）のストレスレベルを調整するのに有効な量の生物活性剤を投与する工程を含む、方法。

【請求項 9】

前記生物活性剤が、髄鞘形成細胞中の小胞体（ER）の持続したストレスレベルを減少させるのに有効である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 ER の持続したストレスレベルの減少が、小胞体（ER）ストレスに相関するタンパク質レベルの減少によって特徴づけられる、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記 ER ストレスに相関するタンパク質が、リン酸化燐臓 ER キナーゼ遺伝子（p - PERK）、真核細胞翻訳開始因子 2（eIF - 2）、真核細胞翻訳開始因子（eIF - 2）、イノシトール要求 1（inositol requiring 1）（IRE1）、活性化転写因子 6（ARTF6）、CAAT エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質（CHOP）、結合免疫グロブリンタンパク質（BIP）、カスパーゼ - 12、成長および DNA 損傷タンパク質 34（GADD34）、CreP（eIF2 リン酸化の構成性リプレッサー）、および X ボックス結合タンパク質 - 1（XBP - 1）からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

前記被験体が脱髄障害を罹患している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記被験体が多発性硬化症を罹患している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記被験体が病原体またはウイルスによって負わされた神経脱髄を罹患している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記生物活性剤が I N F - アンタゴニストである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記インターフェロン - (I N F -) アンタゴニストが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記生物活性剤が、細胞中に存在する e I F 2 キナーゼ活性の増加またはリン酸化 e I F - 2 レベルの増加によって e I F - 2 経路を活性化するのに有効である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記生物活性剤が、細胞中に存在する P E R K キナーゼ活性の増加またはリン酸化 P E R K もしくは P E R K 二量体レベルの増加によって e I F - 2 経路を活性化するのに有効である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記生物活性剤が、G A D D 3 4 経路の不活化によって e I F - 2 経路を活性化するのに有効である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 G A D D 3 4 経路の不活化によって G A D D 3 4 シグナル伝達が減少する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 G A D D 3 4 経路の不活化によって細胞中に存在する P P I (タンパク質ホスファターゼ I) のホスファターゼ活性が減少するか P P I レベルが減少する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

治療を必要とする被験体の脱髄障害の進行を改善する方法であって、該被験体における再髄鞘形成または I N F - シグナル伝達を生じている該被験体の神経組織中に存在するインターフェロン - (I F N -) レベルを減少させる工程を含む、方法。

【請求項 2 3】

前記 I F N - レベルの減少が、インターフェロン - (I F N -) アンタゴニストから構成される一定量の薬学的組成物を脱髄化病変に送達させることによってもたらされる、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記インターフェロン - (I F N -) アンタゴニストが抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記被験体が脱髄障害を罹患している、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記被験体が多発性硬化症を罹患している、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記被験体が病原体またはウイルスによって負わされた神経脱髄障害を罹患している、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

I F N - シグナル伝達の減少が、I F N - の下流シグナル伝達分子またはその生物活

10

20

30

40

50

性のレベルの減少によってもたらされる、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 I F N - の下流シグナル伝達分子が S O C S 1 または S t a t 1 を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記神経脱髄が炎症性因子によって負わされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記神経脱髄が炎症性因子によって負わされる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記被験体が、炎症性因子によって負わされた神経脱髄障害を罹患している、請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 3 3】

神経脱髄を減少させる生物活性剤を開発する方法であって、

- (a) 候補薬剤を髄鞘形成細胞と接触させる工程と、
 - (b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または該遺伝子産物の活性の変化を検出する工程であって、該遺伝子または遺伝子産物が小胞体 (E R) ストレスに相関する、工程と、
 - (c) 該遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは該遺伝子産物の活性レベルが該コントロール細胞と比較して調整された場合、該薬剤を候補として選択する工程と
- を含む、方法。

20

【請求項 3 4】

前記神経脱髄が、中枢神経系中の乏突起膠細胞の喪失によって特徴づけられる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記神経脱髄が、神経系中の有髄軸索の減少によって特徴づけられる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記神経脱髄が、乏突起膠細胞マーカーまたはシュワン細胞マーカーレベルの減少によって特徴づけられる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記マーカーが、C C 1、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (C G T)、ミエリン関連糖タンパク質 (M A G)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (M O G)、乏突起膠細胞 - ミエリン糖タンパク質 (O M G)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (C N P)、N O G O、ミエリンタンパク質ゼロ (M P Z)、末梢性ミエリンタンパク質 2 2 (P M P 2 2)、タンパク質 2 (P 2)、ガラクトセレブロシド (G a l C)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質 (P L P) からなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の方法。

30

【請求項 3 8】

前記髄鞘形成細胞が乏突起膠細胞である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記髄鞘形成細胞がシュワン細胞である、請求項 3 3 に記載の方法。

40

【請求項 4 0】

前記生物活性剤が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体、リボソーム、低分子干渉 R N A、ならびに小さな有機化合物および無機化合物からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 1】

神経再髄鞘形成を促進する生物活性剤を開発する方法であって、

- (a) 候補生物活性剤を被験体の脱髄病変由来の髄鞘形成細胞と接触させる工程と、
- (b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または該遺伝子産物の活性の変化を検出する工程であって、該遺伝子または遺伝子産物が小胞体 (E R

50

) ストレスに相関する、工程と、

(c) 該遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは該遺伝子産物の活性レベルが該コントロール細胞と比較して調整された場合、該薬剤を候補として選択する工程とを含む、方法。

【請求項 4 2】

前記 ER ストレスに相関する遺伝子産物が、リン酸化腠臓 ER キナーゼ遺伝子 (p - P E R K)、真核細胞翻訳開始因子 2 (e I F - 2)、真核細胞翻訳開始因子 (e I F - 2)、イノシトール要求 1 (i n o s i t o l r e q u i r i n g 1) (I R E 1)、活性化転写因子 6 (A R T F 6)、C A A T T エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 (C H O P)、結合免疫グロブリンタンパク質 (B I P)、カスパーゼ - 1 2、成長および DNA 損傷タンパク質 3 4 (G A D D 3 4)、C r e P (e I F 2 リン酸化の構成性リプレッサー)、および X ボックス結合タンパク質 - 1 (X B P - 1) からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 3】

前記検出工程が免疫アッセイを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記検出工程がハイブリッド形成アッセイを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記生物活性剤が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体、リボソーム、低分子干渉 RNA、ならびに小さな有機化合物および無機化合物からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

20

【請求項 4 6】

前記髄鞘形成細胞が、前記被験体の中枢神経系中の脱髄病変に由来する、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記乏突起膠細胞が髄鞘形成乏突起膠細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記被験体がトランスジェニック動物である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記トランスジェニック動物は、(a) 該動物のゲノムに安定に組み込まれているインターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列を有する、請求項 4 1 に記載の方法。

30

【請求項 5 0】

前記被験体が、(a) 前記動物のゲノムに安定に組み込まれているインターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列を有し、かつ (b) 少なくとも 1 つの他の遺伝子の発現が変化しており、ここで、該 I F N - の発現の際に、該動物が、(a) の安定に組み込まれたインターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列を有するトランスジェニック動物と比較して脱髄の程度がより高いが、該少なくとも 1 つの他の遺伝子の発現の変化を欠いている、請求項 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 1】

前記少なくとも 1 つの他の遺伝子が小胞体ストレスと相関する、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記被験体は、腠臓 ER キナーゼ遺伝子 (P E R K) のヘテロ接合性ノックアウトを含み、前記動物のゲノムにインターフェロン - (I N F -) を含むトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれている、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

非ヒトトランスジェニック動物であって、

(a) 該動物のゲノムに安定に組み込まれているインターフェロン - (I F N -) を

50

コードするトランスジェニックヌクレオチド配列を有し、
 (b) 少なくとも1つの他の遺伝子の発現が変化しており、
 ここで、該 I F N - の発現の際に、該動物が、工程 (a) において見られるようなインターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれたトランスジェニック動物と比較して脱髄の程度がより高いが、該少なくとも1つの他の遺伝子の発現の変化を欠いている、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 4】

前記少なくとも1つの他の遺伝子が小胞体ストレスと相関する、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 5】

前記動物は、腓膵 E R キナーゼ遺伝子 (P E R K) のヘテロ接合性ノックアウトを含み、該動物のゲノムにインターフェロン - (I N F -) を含むトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれている、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 6】

前記動物が、野生型動物と比較して I N F - 媒介性神経脱髄に対する脆弱性が増大している、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 7】

前記動物が、野生型動物と比較して該動物の中枢神経系中の乏突起膠細胞が少ない、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 8】

前記インターフェロン - (I N F -) の発現が誘導性である、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 5 9】

前記インターフェロン - (I N F -) の発現が中枢神経系に異所的に限定される、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 0】

前記動物がインターフェロン - (I N F -) についてヘテロ接合性であり、そして / または前記小胞体ストレスに相関する1つの他の遺伝子についてヘテロ接合性である、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 1】

前記動物がインターフェロン - (I N F -) についてホモ接合性であり、そして / または前記小胞体ストレスに相関する1つの他の遺伝子についてヘテロ接合性である、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 2】

前記小胞体ストレスに相関する1つの他の遺伝子が、腓膵 E R キナーゼ遺伝子 (P E R K)、真核細胞翻訳開始因子 2 (e I F - 2)、真核細胞翻訳開始因子 (e I F - 2)、イノシトール要求 5 3 (I R E 1)、活性化転写因子 6 (A R T F 6)、C A A T T エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 (C H O P)、結合免疫グロブリンタンパク質 (B I P)、カスパーゼ - 1 2、成長および D N A 損傷タンパク質 3 4 (G A D D 3 4)、C r e P (e I F 2 リン酸化の構成性リプレッサー)、サイトカインシグナル伝達のサプレッサー 1 (S O C S 1)、および X ボックス結合タンパク質 - 1 (X B P - 1) からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 3】

前記1つの他の遺伝子が内因性遺伝子である、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 4】

前記1つの他の遺伝子が外因性遺伝子である、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 5】

10

20

30

40

50

前記動物が、哺乳動物、霊長類、およびげっ歯類からなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 6】

前記動物が、マウス、ラット、モルモット、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、チンパンジー、およびサルからなる群から選択される、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 7】

前記少なくとも 1 つの他の遺伝子の変化は、該 1 つの他の遺伝子の破壊に起因する、請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 6 8】

請求項 5 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物の細胞であって、該細胞は、インターフェロン - (I N F -) をコードする導入遺伝子が該細胞のゲノムに安定に組み込まれ、E R ストレスに相関するタンパク質をコードする少なくとも 1 つの他の遺伝子が増加している、細胞。

【請求項 6 9】

前記細胞が前記動物の神経系に由来する、請求項 6 8 に記載の細胞。

【請求項 7 0】

前記細胞が乏突起膠細胞またはシュワン細胞である、請求項 6 8 に記載の細胞。

【請求項 7 1】

脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験する方法であって、
(a) 候補薬剤を請求項 1 に記載の非ヒトトランスジェニック動物に投与する工程であって、I F N - 発現の際に該動物において脱髄が起こる、工程と、
(b) 脱髄障害に関連する現象に及ぼす該薬剤の影響を決定する工程とを含む、方法。

【請求項 7 2】

前記脱髄障害に関連する現象が、前記動物の神経系中の乏突起膠細胞またはシュワン細胞の喪失によって特徴づけられる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記脱髄障害に関連する現象が、前記神経系中の有髄軸索の減少によって特徴づけられる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記脱髄障害に関連する現象が、乏突起膠細胞マーカーまたはシュワン細胞マーカーレベルの減少によって特徴づけられる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記乏突起膠細胞またはシュワン細胞マーカーが、C C 1、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (C G T)、ミエリン関連糖タンパク質 (M A G)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (M O G)、乏突起膠細胞 - ミエリン糖タンパク質 (O M G)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (C N P)、N O G O、ミエリンタンパク質ゼロ (M P Z)、末梢性ミエリンタンパク質 2 2 (P M P 2 2)、タンパク質 2 (P 2)、ガラクトセレブロシド (G a l C)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質 (P L P) からなる群から選択される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記脱髄障害が多発性硬化症である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記脱髄障害が、病原体または物理的損傷によって負わされる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記脱髄障害に関連する現象に及ぼす薬剤の影響の決定が免疫アッセイを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 79】

前記脱髄障害に関連する現象に及ぼす薬剤の影響の決定がハイブリッド形成アッセイを含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 80】

前記生物活性剤が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体、リボソーム、低分子干渉 RNA、ならびに小さな有機化合物および無機化合物からなる群から選択される、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 81】

脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験する方法であって、

(a) 候補薬剤を請求項 1 に記載の非ヒトトランスジェニック動物由来の細胞と接触させる工程と、

(b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または該遺伝子産物の活性の変化を検出する工程であって、該遺伝子または遺伝子産物が小胞体 (ER) ストレスに相関する、工程と、

(c) 該遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは該遺伝子産物の活性レベルが該コントロール細胞と比較して調整された場合、脱髄障害に関連する現象を調整するのに有効であるとして該薬剤を選択する工程と

を含む、方法。

【請求項 82】

前記神経脱髄に関連する現象が、前記動物の中樞神経系または末梢神経中の乏突起膠細胞またはシュワン細胞の喪失によってそれぞれ特徴づけられる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記神経脱髄に関連する現象が、前記動物の神経系中の有髄軸索の減少によって特徴づけられる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 84】

前記神経脱髄に関連する現象が、乏突起膠細胞マーカーまたはシュワン細胞マーカーレベルの減少によって特徴づけられる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 85】

前記乏突起膠細胞またはシュワン細胞マーカーが、CC1、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (CGT)、およびプロテオリピドタンパク質 (PLP) からなる群、CC1、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (CGT)、ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (MOG)、乏突起膠細胞 - ミエリン糖タンパク質 (OMG)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (CNP)、NOGO、ミエリンタンパク質ゼロ (MPZ)、末梢性ミエリンタンパク質 22 (PMP22)、タンパク質 2 (P2)、ガラクトセレブロシド (GalC)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質 (PLP) からなる群から選択される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記脱髄障害が多発性硬化症である、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 87】

前記脱髄障害が、病原体またはウイルスによって負わされる、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 88】

前記脱髄障害に関連する現象に及ぼす薬剤の影響の決定が免疫アッセイを含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 89】

前記脱髄障害に関連する現象に及ぼす薬剤の影響の決定がハイブリッド形成アッセイを含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 90】

前記生物活性剤が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体、リボソーム、低分子干渉 RNA、ならびに小さな有機化合物および無機化合物からなる群から選択される

10

20

30

40

50

、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 9 1】

脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験する方法であって、

(a) (i) 試験動物の神経脱髄の誘導、および (i i) 該試験動物を脱髄病変の再髄鞘形成が示されるのに十分な時間脱髄誘導から回復させることを含む方法によって得られた該試験動物に候補生物活性剤を投与する工程と、

(b) 脱髄障害に関連する現象に及ぼす該薬剤の影響を決定する工程とを含む、方法。

【請求項 9 2】

前記試験動物がトランスジェニック動物である、請求項 9 1 に記載の方法。

10

【請求項 9 3】

前記試験動物が、(a) インターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が該動物のゲノムに安定に組み込まれており、かつ (b) 少なくとも 1 つの他の遺伝子の発現が変化している、トランスジェニック動物であり、ここで、該 I F N - の発現の際に、該動物が、(a) インターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれたトランスジェニック動物と比較して脱髄の程度がより高いが、該少なくとも 1 つの他の遺伝子の発現の変化を欠いている、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記少なくとも 1 つの他の遺伝子が小胞体ストレスと相関する、請求項 9 3 に記載の方法。

20

【請求項 9 5】

前記動物は、腓膵 E R キナーゼ遺伝子 (P E R K) のヘテロ接合性ノックアウトを含み、該動物のゲノムにインターフェロン - (I N F -) を含むトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれている、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記 E R ストレスに相関するタンパク質が、リン酸化腓膵 E R キナーゼ遺伝子 (p - P E R K)、真核細胞翻訳開始因子 2 (e I F - 2)、真核細胞翻訳開始因子 (e I F - 2)、イノシトール要求 1 (I R E 1)、活性化転写因子 6 (A R T F 6)、C A A T T エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 (C H O P)、結合免疫グロブリンタンパク質 (B I P)、カスパーゼ - 1 2、成長および D N A 損傷タンパク質 3 4 (G A D D 3 4)、C r e P (e I F 2 リン酸化の構成性リプレッサー)、X ボックス結合タンパク質 - 1 (X B P - 1)、成長および D N A 損傷タンパク質 3 4 (G A D D 3 4)、C r e P (e I F 2 リン酸化の構成性リプレッサー)、および X ボックス結合タンパク質 - 1 (X B P - 1) からなる群から選択される、請求項 9 4 に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

前記脱髄障害に関連する現象が、前記動物の神経系中の乏突起膠細胞またはシュワン細胞の喪失によって特徴づけられる、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記脱髄障害に関連する現象が、前記動物の神経系中の有髄軸索の減少によって特徴づけられる、請求項 9 1 に記載の方法。

40

【請求項 9 9】

前記脱髄障害に関連する現象が、乏突起膠細胞またはシュワン細胞マーカーレベルの減少によって特徴づけられる、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記乏突起膠細胞またはシュワン細胞マーカーが、C C 1、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (C G T)、ミエリン関連糖タンパク質 (M A G)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (M O G)、乏突起膠細胞 - ミエリン糖タンパク質 (O M G)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ (C N P)、N O G O、ミエリンタンパク質ゼロ (M P Z)、末梢性ミエリンタンパク質 2 2 (P M P 2 2)

50

、タンパク質 2 (P 2)、ガラクトセレブロシド (G a l C)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質 (P L P) からなる群から選択される、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記脱髄障害が多発性硬化症である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記脱髄障害が、病原体またはウイルスによって負わされる、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記脱髄障害に関連する現象に及ぼす薬剤の影響の決定が免疫アッセイを含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記脱髄障害に関連する現象に及ぼす薬剤の影響の決定がハイブリッド形成アッセイを含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記生物活性剤が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体、リボソーム、低分子干渉 RNA、ならびに小さな有機化合物および無機化合物からなる群から選択される、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記生物活性剤が、脱髄病変の再髄鞘形成の促進に有効である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記生物活性剤が、髄鞘を再形成する乏突起膠細胞における小胞体ストレスに特徴的なタンパク質レベルの調整で有効である、請求項 9 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(相互参照)

本出願は、2005年6月14日に提出された米国仮出願第60/690,691号、2006年4月13日に提出された米国仮出願第60/744,826号、および2006年4月14日に提出された米国仮出願第60/792,007号、ならびに2006年5月9日に提出された米国出願第11/431,782号、2006年5月9日に提出された米国出願第11/431,601号、および2006年5月9日に提出された米国出願第11/431,372号の利益を主張する。これらの全ては、その全体について本明細書に参考として援用される。

本発明は、神経学分野に属する。詳細には、本発明は、神経脱髄または再髄鞘形成で役割を果たす分子成分の発見および特徴付けに関する。さらに、本発明は、髄鞘低形成を示す動物モデルの生成に関する。本発明で具体化された組成物および方法は、特に、脱髄障害の薬物スクリーニングおよび/または治療に有用である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

神経脱髄は、中枢神経系中のミエリンタンパク質の減少によって特徴づけられる有害な病態である。ミエリンは、中枢神経系 (CNS) および末梢神経系 (PNS) の重要要素であり、ニューロンの軸索を包み込み、髄鞘として公知の絶縁層を形成する。髄鞘の存在により、下にある神経軸索への電位の伝播形態の神経シグナルの速度および完全性を増強する。髄鞘の喪失により、神経シグナルがその標的に非常にゆっくりか、非同期的か (例えば、いくつかの軸索が神経伝導において他の軸索よりも速い)、断続的に (例えば、高周波の伝導のみが損なわれる) に到達するか、全く到達しないので、感覚、運動、および他の機能型が有意に損なわれる。

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

髄鞘は、CNS中の膠細胞 - 乏突起膠細胞およびPNS中のシュワン細胞の原形質膜（すなわち、細胞膜）によって形成される。髄鞘形成の活動期の際に、CNS中の乏突起膠細胞は、約5000 μm^2 のミエリン表面積/日および約 10^5 個ミエリンタンパク質分子/分ほども産生しなければならない（非特許文献1）。髄鞘形成乏突起膠細胞は、脱髄病変で同定されており、このことは、新規に合成されたミエリンを使用して脱髄軸索を修復することができることを示す。

【0004】

神経脱髄は、CNSおよびPNSの多数の遺伝性障害および獲得性障害で出現する。これらの障害には、多発性硬化症（MS）、進行性多巣性白質脳症（PML）、脳脊髄炎、橋中心髄鞘崩壊症（Central Pontine Myelolysis）（CPM）、抗MAG疾患、白質萎縮：副腎脳白質ジストロフィ（ALD）、アレキサンダー病、カナヴァン病、クラッペ病、異染性白質ジストロフィ（MLD）、ペリツェーウス・メルバッハー病、レフサム病、コケイン症候群、ファンデルナップ症候群（Van der Knapp Syndrome）、ツェルウェーガー症候群、ギラン・バレー症候群（GBS）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害（CIDP）、多病巣性運動神経障害（multifocal motor neuropathy）（MMN）、アルツハイマー病、および進行性核上麻痺が含まれる。これら障害の多くは、治療薬が存在せず、有効な療法はわずかしかない。

【0005】

多発性硬化症は、最も一般的な中枢神経系の脱髄疾患であり、世界で約1,000,000人が罹患し、約250,000~350,000人が米国人である。この疾患は、臨床的に再発および緩和によって特徴づけられ、最終的に、慢性身体障害に至る。多発性硬化症の初期は、麻痺、協調性の欠如、感覚障害、および視覚障害をもたらす髄鞘に対する自己免疫炎症性発作（strike）によって特徴づけられる。その後の疾患の慢性進行期は、典型的には、髄鞘の活動性変性および脱髄病変の不適切な再髄鞘形成に起因する（非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4）。

【0006】

本疾患の正確な病因および病理発生は未知のままである。しかし、病理学的、遺伝的、および免疫学的特長が同定されており、疾患が炎症および自己免疫を根拠とすることが示唆される。例えば、非特許文献5；非特許文献6を参照のこと。活性化Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞によって分泌される多面発現性サイトカインであるインターフェロン- γ （IFN- γ ）は、免疫媒介性脱髄障害（MSおよび実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）が含まれる）で有害な役割を果たすことが現在公知である（非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9）。このサイトカインは、通常、CNS中に存在せず、これらの障害の症候期中に検出可能となる（非特許文献10）。in vitro研究により、IFN- γ が精製された発達中の乏突起膠細胞におけるアポトーシスを促進することができることが示されている（非特許文献11；非特許文献12；非特許文献13）。これらの広範な研究にもかかわらず、IFN- γ の分泌によって乏突起膠細胞が異常になり、髄鞘が変化する正確な機構は十分に理解されていない。

【0007】

したがって、神経脱髄の分子的機序を解明することができる組成物および方法が非常に必要とされている。脱髄障害治療に有効な生物活性剤の開発も差し迫って必要である。

【非特許文献1】 Pfeiffer, et al., Trends Cell Biol. (1993) 3: 191 - 197

【非特許文献2】 Franklin, Nat. Rev. Neurosci. (2002) 3: 705 - 714

【非特許文献3】 Bruck, et al., J. Neurol. Sci. (2003) 206: 181 - 185

【非特許文献4】 Compston, et al., Lancet (2002) 359: 1221 - 1231

10

20

30

40

50

【非特許文献5】Waksman, et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1984) 175: 282 - 294

【非特許文献6】Hafner et al., Immunol. Rev. (1987) 100: 307 - 332

【非特許文献7】Popko et al. Mol. Neurobiol. (1997) 14: 19 - 35

【非特許文献8】Popko and Baerwald, Neurochem. Res. (1999) 24: 331 - 338

【非特許文献9】Steinman, Mult. Scler. (2001a) 7: 275 - 276

10

【非特許文献10】Panitch, Drugs (1992) 44: 946 - 962

【非特許文献11】Baerwald and Popko, J. Neurosci. Res. (1998) 52: 230 - 239

【非特許文献12】Andrews et al., J. Neurosci. Res. (1998) 54: 574 - 583

【非特許文献13】Feldhaus et al., J. Soc. Gynecol. Invest. (2004) 11: 89 - 96

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

20

(発明の概要)

本発明は、神経脱髄を軽減する生物活性剤の開発方法を提供する。本方法は、(a) 候補薬剤を髄鞘形成細胞と接触させる工程と、(b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または前記遺伝子産物の活性の変化を検出する工程と、前記遺伝子または遺伝子産物が小胞体(ER) ストレスに相関することと、(c) 前記遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは前記遺伝子産物の活性レベルが前記コントロール細胞と比較して調整された場合、前記薬剤を候補として選択する工程とを含む。

【0009】

本発明はまた、神経再髄鞘形成を促進する生物活性剤を開発する方法を提供する。本方法は、(a) 候補生物活性剤を被験体の脱髄病変由来の髄鞘形成細胞と接触させる工程と、(b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または前記遺伝子産物の活性の変化を検出する工程と、前記遺伝子または遺伝子産物が小胞体(ER) ストレスに相関することと、(c) 前記遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは前記遺伝子産物の活性レベルが前記コントロール細胞と比較して調整された場合、前記薬剤を候補として選択する工程とを含む。

30

【0010】

本発明は、さらに、脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験する方法に関する。このような方法は、(a) 候補薬剤を非ヒトトランスジェニック動物に投与する工程と、IFN- γ 発現の際に前記動物において脱髄が起こることと、(b) 脱髄障害に関連する現象に及ぼす前記薬剤の影響を決定する工程とを含む。

40

【0011】

脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験する方法であって、以下の工程：(a) 候補薬剤を非ヒトトランスジェニック動物由来の細胞と接触させる工程と、(b) コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または前記遺伝子産物の活性の変化を検出する工程と、前記遺伝子または遺伝子産物が小胞体(ER) ストレスに相関することと、(c) 前記遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは前記遺伝子産物の活性レベルが前記コントロール細胞と比較して調整された場合、前記薬剤を脱髄障害に関連する現象を調整するのに有効な候補として選択する工程とを行うことによる、方法も本発明で提供する。

【0012】

50

本発明は、脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験する別の方法を提供する。本方法は、(a)(i)試験動物の神経脱髄の誘導、および(ii)前記試験動物を脱髄病変の再髄鞘形成が示されるのに十分な時間脱髄誘導から回復させることを含む方法によって得られた試験動物に候補生物活性剤を投与する工程と、(b)脱髄障害に関連する現象に及ぼす前記薬剤の効果を決定する工程とを含む。

【0013】

本発明の種々の実施形態では、脱髄障害に関連する現象は、中枢神経系中の乏突起膠細胞または末梢神経系中のシュワン細胞の喪失によって特徴づけられる。他の実施形態では、神経脱髄に関連する現象は、中枢神経系または末梢神経系中の有髄軸索の減少によって特徴づけられる。さらに他の実施形態では、神経脱髄に関連する現象は、乏突起膠細胞マーカーまたはシュワン細胞マーカー、好ましくは、タンパク質性マーカーのレベルの減少によって特徴づけられる。髄鞘形成細胞(乏突起膠細胞およびシュワン細胞が含まれる)の非限定的な例示的マーカータンパク質は、CC1、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質(MOG)、乏突起膠細胞-ミエリン糖タンパク質(OMG)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(CNP)、NOGO、ミエリンタンパク質ゼロ(MPZ)、末梢性ミエリンタンパク質22(PMP22)、タンパク質2(P2)、ガラクトセレブロシド(GalC)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質(PLP)からなる群から選択される。MPZ、PMP22、およびP2は、シュワン細胞の好ましいマーカーである。

10

20

【0014】

一定の実施形態では、本明細書中に言及される脱髄障害は多発性硬化症である。他の実施形態では、脱髄障害は、進行性多巣性白質脳症(PML)、脳脊髄炎、橋中心髄鞘崩壊症(CPM)、抗MAG疾患、白質萎縮：副腎脳白質ジストロフィ(ALD)、アレキサンダー病、カナヴァン病、クラッペ病、異染性白質ジストロフィ(MLD)、ペリツェウス・メルバッハー病、レフサム病、コケイン症候群、ファンデルナップ症候群、ツェルウェーガー症候群、ギラン・バレー症候群(GBS)、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害(CIDP)、多病巣性運動神経障害(MMN)、アルツハイマー病、および進行性核上麻痺からなる群から選択される。

【0015】

本発明の1つの態様では、細胞ベースのアッセイで使用される生物活性剤は、単純または複雑な有機分子もしくは無機分子、ペプチド、ペプチド模倣物、タンパク質(例えば、抗体)、リボソーム、低分子干渉RNA、またはポリヌクレオチド(例えば、アンチセンス)などの生物学的または化学的化合物からなる群から選択することができる。

30

【0016】

本発明はまた、非ヒトトランスジェニック動物であって、(a)インターフェロン-(IFN-)をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が前記動物のゲノムに安定に組み込まれており、(b)少なくとも1つの他の遺伝子の発現が変化しており、ここで、前記IFN-の発現の際に、前記動物が、工程(a)において見られるようなインターフェロン-(IFN-)をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれたトランスジェニック動物と比較して脱髄の程度がより高いが、前記少なくとも1つの他の遺伝子の発現の変化を欠いている、非ヒトトランスジェニック動物を提供する。

40

【0017】

1つの態様では、少なくとも1つの他の遺伝子は、小胞体ストレスと相関する。このような遺伝子には、腓膵ERキナーゼ遺伝子(p-PERK)、真核細胞翻訳開始因子2(eIF-2)、真核細胞翻訳開始因子(eIF-2)、イノシトール要求1(IRE1)、活性化転写因子6(ARTF6)、CAATエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質(CHOP)、結合免疫グロブリンタンパク質(BIP)、カスパーゼ-12、成長およびDNA損傷タンパク質34(GADD34)、CreP(eIF2リン

50

酸化の構成性リプレッサー)、サイトカインシグナル伝達1のサブレッサー(S O C S 1)、およびXボックス結合タンパク質-1(X B P - 1)が含まれるが、これらに限定されない。

【0018】

別の態様では、非ヒトトランスジェニック動物は、膵臓ERキナーゼ遺伝子(P E R K)のヘテロ接合性ノックアウトを含み、前記動物のゲノムにインターフェロン-(I N F -)を含むトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれている。

【0019】

さらに別の態様では、動物は、野生型動物と比較してI N F - 媒介性神経脱髄に対する脆弱性が増大している。

【0020】

このような本発明のトランスジェニック動物由来の細胞も提供する。

【0021】

被験体の神経脱髄を阻害する方法であって、被験体に末梢神経系または中枢神経系における髄鞘形成細胞中の小胞体(E R)のストレスレベルを調整するのに有効な量の生物活性剤を投与する工程を含む、方法も本発明に含まれる。髄鞘形成細胞は、乏突起膠細胞またはシュワン細胞であり得る。本発明の1つの態様では、生物活性剤は、髄鞘形成細胞中の小胞体(E R)の持続したストレスレベルを減少させるのに有効である。いくつかの態様では、生物活性剤は、インターフェロン-(I N F -)アンタゴニストであり、但し、神経脱髄の発症後に適用する場合、インターフェロン-(I N F -)アンタゴニストは抗I N F - 抗体ではない。他の態様では、生物活性剤は、予防効果を得るために神経脱髄の発症前に投与されるインターフェロン-(I F N -)またはインターフェロン-(I F N -)アゴニストである。必要に応じて、生物活性剤は、E Rの持続したストレスレベルを減少させる能力によって特徴づけることができ、同様に、小胞体(E R)ストレスに相関するタンパク質レベルの減少によって特徴づけることができる。例示的なE Rストレス相関タンパク質には、リン酸化膵臓ERキナーゼ遺伝子(p - P E R K)、真核細胞翻訳開始因子2(e I F - 2)、真核細胞翻訳開始因子(e I F - 2)、イノシトール要求1(I R E 1)、活性化転写因子6(A R T F 6)、C A A T Tエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質(C H O P)、結合免疫グロブリンタンパク質(B I P)、カスパーゼ-12、成長およびDNA損傷タンパク質34(G A D D 3 4)、C r e P(e I F 2 リン酸化の構成性リプレッサー)、およびXボックス結合タンパク質-1(X B P - 1)が含まれるが、これらに限定されない。

【0022】

神経脱髄の発症後に被験体の神経再髄鞘形成を促進する方法であって、前記被験体に再髄鞘形成を生じているニューロン組織中の小胞体(E R)のストレスレベルを調整するのに有効な量の薬剤を投与する工程を含む方法を本発明でさらに提供する。1つの態様では、意図する生物活性剤は、I N F - アンタゴニスト(抗I N F - 抗体またはその抗原結合フラグメントが含まれるが、これらに限定されない)である。別の態様では、生物活性剤は、髄鞘形成細胞中の小胞体(E R)の持続したストレスレベルを減少させるのに有効である。別の態様では、細胞中に存在するe I F 2 キナーゼ活性の増加またはリン酸化e I F - 2 レベルの増加によってe I F - 2 経路を活性化するのに有効である。さらに別の態様では、生物活性剤は、細胞中に存在するP E R Kキナーゼ活性の増加またはリン酸化P E R KもしくはP E R K二量体レベルの増加によってe I F - 2 経路を活性化するのに有効である。なおさらに別の態様では、生物活性剤は、G A D D 3 4経路の不活化によってe I F - 2 経路を活性化するのに有効である。いくつかの例では、G A D D 3 4経路の不活化によってG A D D 3 4シグナル伝達が減少する。他の例では、G A D D 3 4経路の不活化によって細胞中に存在するP P I(タンパク質ホスファターゼ1)のホスファターゼ活性が減少するかP P Iレベルが減少する。

【0023】

本発明は、さらに、治療を必要とする被験体の脱髄障害の進行を改善する方法を提供す

10

20

30

40

50

る。本方法は、被験体における再髄鞘形成または I N F - シグナル伝達を生じている被験体の神経組織中に存在するインターフェロン - (I F N -) レベルを減少させる工程を含む。いくつかの例では、I F N - レベルの減少が、インターフェロン - (I F N -) アンタゴニスト (例えば、抗 I N F - 抗体または抗原結合フラグメント) から構成される一定量の薬学的組成物を脱髄化病変に送達させることによってもたらされる。別の態様では、I F N - シグナル伝達の減少が、I F N - の下流シグナル伝達分子またはその生物活性のレベルの減少によってもたらされる。I F N - の下流シグナル伝達分子が S O C S 1 および / または S t a t 1 を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

(発明の詳細な説明)

本開示を通して、種々の刊行物、特許、および公開された特許明細書は、引例の識別によって援用される。これらの刊行物、特許、および公開された特許明細書の開示は、本発明が関連する分野の状態を完全に説明するために、本開示に参考として援用される。

【0025】

(一般的技術：)

本発明の実施には、他で示さない限り、従来免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、および組換え DNA 技術を使用し、これらは、当業者の範囲内である。Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)) を参照のこと。

【0026】

(定義：)

明細書および特許請求の範囲で使用する場合、文脈上で他のものを明確に記載しない限り、単数形「a」、「an」、および「the」には複数形が含まれる。例えば、用語「a cell」には、複数の細胞 (その混合物が含まれる) が含まれる。

【0027】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」を、交換可能に使用する。これらは、任意の長さのヌクレオチドの高分子形態 (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはそのアナログのいずれか) をいう。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、既知または未知の任意の機能を実行することができる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメントのコード領域または非コード領域、連鎖分析から定義された遺伝子座 (遺伝子座)、エクソン、イントロン、伝令 RNA (mRNA)、運搬 RNA、リボゾーム RNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離 DNA、任意の配列の単離 RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログなどの修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、プライマーのアセンブリの前または後にヌクレオチド構造の修飾に影響を及ぼし得る。ヌクレオチド配列は、非ヌクレオチド成分によって妨害され得る。ポリヌクレオチドを、重合後に標識成分との抱合によってさらに修飾することができる。

【0028】

10

20

30

40

50

「ヌクレオチドプローブ」または「プローブ」は、ハイブリッド形成反応においてその対応する標的ポリヌクレオチドの検出または同定のために使用されるポリヌクレオチドをいう。

【0029】

「ハイブリッド形成」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化された複合体を形成する反応をいう。ワトソン-クリック塩基対合、ホーグスタイン結合、または任意の他の配列特異的様式によって水素結合が起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つまたはそれを超える鎖、単一自己ハイブリッド形成鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリッド形成反応は、より広範な過程（PCRの開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断など）から構成され得る。

10

【0030】

用語「ハイブリッド形成された」は、ポリヌクレオチドに適用する場合、ポリヌクレオチドがヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化された複合体を形成する能力をいう。ワトソン-クリック塩基対合、ホーグスタイン結合、または任意の他の配列特異的様式によって水素結合が起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つまたはそれを超える鎖、単一自己ハイブリッド形成鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリッド形成反応は、より広範な過程（PCRの開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断など）から構成され得る。

20

【0031】

本明細書中で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAおよび/または過程に転写され、次いで、転写されたmRNA（「転写物」ともいう）がペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳される過程をいう。転写物およびコードされたポリペプチドを、集合的に、「遺伝子産物」という。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞中でのmRNAのスプライシングを含み得る。

30

【0032】

「差分発現された」は、被験体中のヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に適用する場合、コントロール中で検出された配列と比較した場合に上記配列の過剰発現または過小発現をいう。過小発現はまた、コントロールと比較した場合の試験被験体中での検出可能な発現の非存在によって証明された特定の配列の発現の非存在を含む。

40

【0033】

「シグナル伝達」は、刺激シグナルまたは阻害シグナルが細胞内に伝達されて細胞内応答を誘発する過程である。分子は、同一経路または関連経路の下流分子との直接または間接的相互作用を介してそのシグナル伝達効果を媒介することができる。例えば、IFNシグナル伝達は、多数の下流分子（1つまたは複数の以下のタンパク質が含まれるが、これらに限定されない：PERK、eIF-2、SOCS1、およびStat1）を含み得る。

【0034】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいうために本明細書中で交換可能に使用される。ポリマーは、線状または分岐してよく、修飾アミノ酸を含むことができ、非アミノ酸が割り込んでいてよい。この用語はまた、修飾されたアミノ酸ポリマー（例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化（lipidation）、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作（標識成分との抱合））を含む。本明細書中で使用される、用語「アミノ酸」は、天然および/または非天然または合成アミノ酸（グリシンおよびDまたはL光学異性体が含まれる）ならびにアミノ酸アナログおよびペプチド模倣物のいずれかをいう。

50

【0035】

本明細書中で使用される、「髄鞘形成細胞」は、神経系中の軸索を絶縁するミエリンを産生することができる細胞をいう。例示的な髄鞘形成細胞は、中枢神経系でのミエリン産生を担う乏突起膠細胞および末梢神経系でのミエリン産生を担うシュワン細胞である。

60

【0036】

「被験体」、「個体」、または「患者」は、交換可能に使用され、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトをいう。哺乳動物には、マウス、サル、ヒト、家畜、競技用動物、およびペットが含まれるが、これらに限定されない。in vivoで得られるかin vitroで培養した生物学的存在(biological entity)の組織、細胞、およびその子孫も含まれる。

【0037】

「コントロール」は、比較を目的として実験で使用される選択的被験体またはサンプルである。

【0038】

本発明の中心的態様は、神経髄鞘形成で役割を果たす細胞中での神経脱髄の小胞体(ER)との関連の発見である。

【0039】

(細胞ベースのアッセイ：)

したがって、1つの実施形態では、本発明は、神経脱髄を減少させる生物活性剤を開発する方法を提供する。本方法は、(a)候補薬剤を髄鞘形成細胞と接触させる工程と、(b)コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または前記遺伝子産物の活性の変化を検出する工程と、前記遺伝子または遺伝子産物が小胞体(ER)ストレスに相関することと、(c)前記遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは前記遺伝子産物の活性レベルが前記コントロール細胞と比較して調整された場合、前記薬剤を候補として選択する工程とを含む。

【0040】

別の実施形態では、本発明は、神経再髄鞘形成を促進する生物活性剤を開発する方法を提供する。本方法は、(a)候補生物活性剤を被験体の脱髄病変由来の髄鞘形成細胞と接触させる工程と、(b)コントロール細胞と比較して遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の変化または前記遺伝子産物の活性の変化を検出する工程と、前記遺伝子または遺伝子産物が小胞体(ER)ストレスに相関することと、(c)前記遺伝子もしくは遺伝子産物の発現レベルまたは前記遺伝子産物の活性レベルが前記コントロール細胞と比較して調整された場合、前記薬剤を候補として選択する工程とを含む。

【0041】

本発明の実施は、コントロール細胞との試験髄鞘形成細胞(乏突起膠細胞またはシュワン細胞のいずれか)中の遺伝子もしくは遺伝子産物の発現の比較を含む。本発明のために使用される試験髄鞘形成細胞は、中枢神経系または末梢神経系から単離することができ、試験髄鞘形成細胞由来の細胞培養物およびその子孫、ならびに供給源から調製した区分もしくは塗抹標本、または乏突起膠細胞、シュワン細胞、またはその子孫を含む任意の他の脳サンプルが含まれる。必要に応じて、実質的に他の神経細胞型(ニューロン、小グリア細胞、および星状細胞など)を含まない負荷されたこれらの細胞培養物を使用するために選択することができる。成熟した乏突起膠細胞またはシュワン細胞を単離、生成、または維持するための種々の方法が当該分野で公知であり(Baerwald, et al. (1998) J. Neurosci. Res. 52: 230-239; Levi, et al. (1996) J. Neurosci. Methods. 68(1): 21-6)、これらを本明細書中に例示する。

【0042】

一定の実施形態では、神経系が能動的に髄鞘形成している幼若被験体由来の髄鞘形成細胞を使用することが好ましいかもしれない。他の実施形態では、脱髄病変(病原体または物理的損傷によって負わされた病変およびクプリゾンなどの毒物に起因する病変が含まれるが、これらに限定されない)中の成体乏突起膠細胞前駆体由来の再髄鞘形成細胞を使用することが好ましいかも知れない。さらに他の実施形態では、IFN- に直接曝露されるか、神経系がIFN- に曝露された被験体に由来する髄鞘形成細胞を使用することが好ましいかもしれない。例えば、中枢神経系中でIFN- を異所的に発現するトランス

10

20

30

40

50

ジェニック動物由来の乏突起膠細胞を使用するために選択することができる。さらに他の実施形態では、任意のERストレス関連遺伝子を差発現する試験髄鞘形成細胞を選択することができる。このような髄鞘形成細胞は、ERストレス原因遺伝子またはERストレス抑制遺伝子（例えば、BIPおよび腓膵ERキナーゼ遺伝子（PERK））を過剰発現するか過小発現することができる。これらの髄鞘形成細胞は、1つまたは複数のERストレス関連遺伝子ノックイン（過剰発現）またはノックアウト（過小発現）を有するトランスジェニック動物に由来し得る。

【0043】

あるいは、このような髄鞘形成細胞を、このような過剰発現または過小発現をもたらすための遺伝子媒介物（genetic vehicle）の細胞への導入によって生成することができる。本発明に適切な膨大な遺伝子媒介物は、当該分野で利用可能である。これらには、ウイルスおよび非ウイルス発現ベクターが含まれる。非限定的な例示的ウイルス発現ベクターは、レトロウイルスなどのRNAウイルスならびにアデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどのDNAウイルス由来のベクターである。非ウイルス発現ベクターには、プラスミド、コスミド、およびDNA/リボソーム複合体が含まれるが、これらに限定されない。必要に応じて、遺伝子媒介物を、遺伝子媒介物中に保有される外因性遺伝子の組織特異的、細胞特異的、またはさらにオルガネラ特異的発現を指示する調節配列を保有するように操作することができる。

10

【0044】

中枢神経系および末梢神経系中で導入遺伝子を発現するために適用可能な多数の組織または細胞特異的調節配列が証明されている。例示的配列は、グリア線維酸性遺伝子（GFAP）の転写調節配列である。調節配列により、中枢神経系および末梢神経系（例えば、シュワン細胞）中で導入遺伝子を異所性発現することが可能である。

20

【0045】

広範な種々の細胞内局在配列が特徴づけられており、導入遺伝子のオルガネラ特異的発現を指示するために適用可能である。例えば、細胞内局在化配列は、以下のいずれか1つであり得る：（a）細胞の外側への遺伝子産物の分泌を指示するシグナル配列、（b）原形質膜または細胞の他の膜成分へのタンパク質の付着を可能にする膜繫留ドメイン、（c）核へのコードタンパク質の転位置を媒介する核局在化配列、（d）コードタンパク質を主にERに限定する小胞体保留配列（例えば、KDEL配列）、または（e）コードタンパク質産物の差分細胞内分布で役割を果たす任意の他の配列。

30

【0046】

遺伝子媒介物を、当該分野で公知の任意の方法によって宿主細胞（例えば、乏突起膠細胞またはシュワン細胞などの髄鞘形成細胞）に挿入することができる。適切な方法には、リン酸カルシウム沈降、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、または微量注入を使用したトランスフェクションが含まれ得る。

【0047】

適切なコントロール細胞または組織の選択は、最初に選択される試験細胞または組織およびその表現型または遺伝子型の特徴に依存し、これらは研究中である。試験髄鞘形成細胞が脱髄病変に由来するのに対して、非脱髄組織由来の1つまたは複数の対応物をコントロール細胞として使用することができる。試験髄鞘形成細胞をIFN- γ で処置するのに対して、コントロール細胞は未処置対応物であり得る。試験細胞およびコントロールを並行して分析することが一般的に好ましい。

40

【0048】

本発明の目的のために、神経脱髄を調整するのに有効な生物活性剤は、生物学的または化学的な化合物（単純または複雑な有機または無機分子、ペプチド、ペプチド模倣物、タンパク質（例えば、抗体）、リボソーム、低分子干渉RNA、またはポリヌクレオチド（例えば、アンチセンス）など）（これらに限定されない）を含むことが意図される。好ましい薬剤クラスには、標的分子の下流シグナル伝達効果を遮断するクラスが含まれる。この薬剤クラスには、典型的には細胞に繫留した未変性受容体とリガンドの結合を競合し、

50

それにより、リガンドのその下流効果の媒介を防止する可溶性リガンド受容体またはその誘導体が含まれ得る。方法論は、当該分野で公知である。例えば、Economides et al. (2003) Nat Med 9(1): 47-52を参照のこと。

【0049】

ありとあらゆる化合物（例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドなどのポリマーならびに合成有機化合物）を、種々のコア構造に基づいて合成することができ、これらも本明細書中で意図される。さらに、種々の天然供給源から、スクリーニング用の化合物（植物または動物の抽出物など）を得ることができる。常に明確に記載しているわけではないが、本スクリーニング法によって同定された薬剤として、活性成分（active agent）を単独で使用するか、同一または兎となる生物活性を有する別のモジュレーターと組み合わせて使用できると理解すべきである。好ましい薬剤クラスは、IFN-アンタゴニストである。当業者に理解されるように、アンタゴニストは、アンタゴニストが相互作用する標的によって媒介される生物活性を阻害する。アンタゴニストは、標的への直接的結合または標的との直接的相互作用によって阻害効果を有効にすることができる。アンタゴニストはまた、同一のシグナル伝達経路中の分子との最初の相互作用によってその阻害効果を間接的に有効にすることができる。本発明のIFN-アンタゴニストは、神経脱髄に及ぼすIFN-の有害な影響を減少することができる単純または複雑な有機分子もしくは無機分子、ペプチド、ペプチド模倣物、タンパク質（例えば、抗体）、リボソーム、低分子干渉RNA、またはポリヌクレオチド（例えば、アンチセンス）を含む。

10

20

【0050】

予防効果が望まれるいくつかの例では、IFN-またはIFN-アゴニスト（例えば、サルブリノール（salubrino1）（Sal））を、神経脱髄の発症前に適用することができる。当業者に理解されるように、アゴニストは、アゴニストが相互作用する標的によって媒介される生物活性を活性化する。アゴニストは、標的への直接的結合または標的との直接的相互作用によって阻害効果を有効にすることができる。アゴニストはまた、同一のシグナル伝達経路中の分子との最初の相互作用によってその刺激効果を間接的に有効にすることができる。本発明のIFN-アゴニストは、神経脱髄に及ぼすIFN-の有害な影響を減少することができる単純または複雑な有機分子もしくは無機分子、ペプチド、ペプチド模倣物、タンパク質（例えば、抗体）、リボソーム、低分子干渉RNA、またはポリヌクレオチド（例えば、アンチセンス）を含む。

30

【0051】

薬剤が裸のRNA以外の組成物である場合、薬剤を、細胞培養物に直接添加するか、添加のための培養培地に添加することができる。当業者に明らかなように、「有効な」量を添加しなければならず、この量は、経験的に決定することができる。薬剤がポリペプチドである場合、トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって細胞に直接導入することができる。あるいは、上記の遺伝子送達媒介物または他の方法を使用して細胞に挿入することができる。

【0052】

本明細書中で使用される場合、ERストレス関連遺伝子は、ERにおけるストレスに相関するタンパク質をコードする全ての核酸を含む。一般に、これらのタンパク質は、ERホメオスタシスで役割を果たす。ストレス（内因性または外因性）が細胞中に出現し得る方法が多数存在し、これらには、病的感染、化学的傷害、遺伝子変異、栄養枯渇、さらに正常な細胞分化が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0053】

一般に、ホメオスタシスの破壊およびそれによるERストレスは、ER小胞体ルーメン中の非折り畳みタンパク質または誤折り畳みタンパク質の蓄積によって証明される（Rutkowski, et al. (2004) Trends Cell Biol. 14: 20-28; Ma, et al. (2001) Cell 107: 827-830）。このストレスは、非折り畳みタンパク質応答（細胞がそれ自体をERストレスから防御する

50

ことを意図する機能的機構)を誘発する。非折り畳みタンパク質応答は、1)その機能がERの折り畳み能力を増加させてタンパク質凝集を防止することであるERシャペロンタンパク質の転写誘導、2)タンパク質の過負荷およびその後の非折り畳みタンパク質の蓄積を減少させるための翻訳弱化、および3)26Sプロテアソームによるその分解に関連する逆行性輸送によるERからの誤折り畳みタンパク質の除去を含み得る。これらの防御応答は、ER内のホメオスタシスを維持するために一過性に作用するが、保持されたERストレスが最終的に細胞死を導き得る(Rutkowski, et al (2004) Trends Cell Biol. 14:20-28; Ma, et al. (2001) Cell 107:827-830; Rao, et al. (2004) Cell Death Differ. 11:372-380)。そのようなものとして、上記の非折り畳みタンパク質応答の1つまたは複数の態様に関する遺伝子は、本発明の実施に適切である。ERストレス関連遺伝子の非限定的な例には、膀胱ERキナーゼ遺伝子(PERK)、真核細胞翻訳開始因子2(eIF-2)、真核細胞翻訳開始因子(eIF-2)、イノシトール要求1(IRE1)、活性化転写因子6(ARTF6)、CAATエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質(CHOP)、結合免疫グロブリンタンパク質(BIP)、カスパーゼ-12、成長およびDNA損傷タンパク質34(GADD34)、CreP(eIF2リン酸化の構成性リプレッサー)、およびXボックス結合タンパク質-1(XBP-1)が含まれる。

10

【0054】

ERストレス関連遺伝子または遺伝子産物の発現の変化を、候補薬剤とい接触した場合の試験髄鞘形成細胞とコントロール細胞との間の対応する遺伝子のmRNAレベルの相違についてのアッセイによって決定することができる。あるいは、ERストレス関連遺伝子の差分発現を、コードポリペプチドレベルまたは遺伝子産物レベルの相違の検出によって決定する。

20

【0055】

mRNA転写物または対応するポリヌクレオチドのレベルの薬剤誘導性の変化をアッセイするために、髄鞘形成細胞を含む生体サンプル中に含まれる核酸を、当該分野の標準的方法にしたがって最初に抽出する。例えば、mRNAを、Sambrook et al. (1989), supraに従って種々の溶解酵素または化学的溶液を使用して単離するか、製造者によって提供された添付の説明書に従った核酸結合樹脂によって抽出することができる。次いで、抽出された核酸サンプル中に含まれるmRNAを、当該分野で広く知られている方法に従うか本明細書中に例示の方法に基づいた増幅手順または従来のハイブリッド形成アッセイ(例えば、ノーザンブロット分析)によって検出する。

30

【0056】

本発明の目的のために、増幅は、標的配列を複製することができる妥当な信頼性のあるプライマーおよびポリメラーゼを使用した任意の方法を意味する。天然または組換えDNAポリメラーゼ(TaqGold(商標)、T7DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウフラグメント、および逆転写酵素など)によって増幅を行うことができる。好ましい増幅方法は、PCRである。特に、単離RNAを、定量的ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせた逆転写アッセイ(RT-PCR)に供して、ERストレス関連遺伝子の発現レベルを定量することができる。

40

【0057】

増幅アッセイ中に実時間で遺伝子発現レベルの検出を行うことができる。1つの態様では、増幅した産物を、蛍光DNA結合剤(DNA介入物およびDNA溝結合剤が含まれるが、これらに限定されない)で直接視覚化することができる。二本鎖DNA分子に組み込まれた介入物の量は、典型的には、DNA産物の増幅量に比例するので、当該分野の従来の光学系を使用した介入色素の蛍光の定量によって産物の増幅量を都合良く決定することができる。本出願に適切なDNA結合色素には、SYBRグリーン、SYBRブルー、DAPI、ヨウ化プロピジウム、Hoesstet、SYBRゴールド、臭化エチジウム、アクリジン、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリフラビン、フルオロクマリン(fl

50

uorcoumanin)、エリブチシン、ダウノマイシン、クロロキン、ジスタマイシンD、クロモマイシン、ホミジウム、ミトラマイシン、ルテニウムポリピリジル、およびアントラマイシンなどが含まれる。

【0058】

別の態様では、配列特異的プローブなどの他の蛍光標識を増幅反応で使用して、増幅産物の検出および定量を促進することができる。プローブベースの定量的増幅は、所望の増幅産物の配列特異的検出に依存する。これは、特異性および感度を増加させる蛍光標識の特異的プローブ(例えば、TaqMan(登録商標))を使用する。プローブベースの定量的増幅の実施方法は当該分野で十分に確立されており、米国特許第5,210,015号に教示されている。

10

【0059】

さらに別の実施形態では、ERストレス関連遺伝子と配列相同性を有するハイブリッド形成プローブを使用した従来のハイブリッド形成アッセイを行うことができる。典型的には、プローブは、ハイブリッド形成反応において試験被験体由来の生体サンプル内に含まれる標的ポリヌクレオチド(例えば、ERストレス関連遺伝子)と安定な複合体を形成することが可能である。アンチセンスをプローブ核酸として使用する場合、サンプル中に提供された標的ポリヌクレオチドをアンチセンス核酸配列に相補的であるように選択することが当業者に認識されている。逆に、核酸プローブがセンス核酸である場合、標的ポリヌクレオチドを、センス核酸配列に相補的であるように選択する。

20

【0060】

当業者に公知のように、種々のストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成を行うことができる。本発明の実施に適切なハイブリッド形成条件は、プローブと標的ERストレス関連遺伝子との間の認識相互作用が十分に特異的であり、且つ十分に安定である条件である。ハイブリッド形成反応のストリンジェンシーを増加させる条件は、当該分野で広く知られており、且つ公開されている。例えば、(Sambrook, et al, (1989), supra; Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual, Boehringer Mannheim, second edition)を参照のこと。ハイブリッド形成アッセイを、任意の固体支持体(ニトロセルロース、ガラス、シリコン、および種々の遺伝子アレイが含まれるが、これらに限定されない)上に固定したプローブを使用して形成することができる。米国特許第5,445,934号に記載のように、好ましいハイブリッド形成アッセイを高密度遺伝子チップにて行う。

30

【0061】

ハイブリッド形成アッセイ中に形成されたプローブ-標的複合体の都合の良い検出のために、ヌクレオチドプローブを転出可能な標識に抱合する。本発明での使用に適切な検出可能な標識には、光化学的手段、生化学的手段、分光学的手段、免疫学的手段、電気的手段、光学的手段、または化学的手段によって検出可能な任意の組成物が含まれる。広範な種々の適切な検出可能な標識は当該分野で公知であり、蛍光標識もしくは化学発光標識、放射性同位体標識、酵素、または他のリガンドが含まれる。好ましい実施形態では、蛍光標識または酵素タグ(ジゴキシゲニン、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ、アビジン/ビオチン複合体など)を使用することが望ましい可能性が高い。

40

【0062】

ハイブリッド形成強度を検出または定量するために使用される検出方法は、典型的には、上記で選択された標識に依存する。例えば、放射光を検出するための光検出器を使用して、放射性標識を検出することができる。酵素標識を、典型的には、酵素への基質の提供および基質に対する酵素作用によって産生された反応生成物の測定によって検出し、最後に、比色分析標識を、有色標識の簡単な視覚化によって検出する。

【0063】

ERストレス関連遺伝子の発現における薬剤誘導性の変化を、対応する遺伝子産物の試

50

験によって決定することもできる。タンパク質レベルの検出は、典型的には、a) 髄鞘形成細胞を含む生体サンプル中に含まれるタンパク質をERストレス関連タンパク質に特異的に結合する薬剤を接触させる工程と、(b) このようにして形成された任意の薬剤：タンパク質複合体を同定する工程とを含む。本発明の1つの態様では、ERストレス関連タンパク質に特異的に結合する薬剤は、抗体、好ましくは、モノクローナル抗体である。

【0064】

薬剤とERストレス関連タンパク質との間で複合体が形成される条件下で薬剤を試験サンプル由来のERストレス関連タンパク質のサンプルと接触させることによって反応を行う。複合体の形成を、当該分野の標準的手順にしたがって直接または間接的に検出することができる。直接的検出法では、薬剤を、検出可能な標識と共に提供し、未反応の薬剤を、複合体から除去することができる。それにより、残存標識の量は形成された複合体の量を示す。このような方法のために、ストリンジентな洗浄条件中ですえも薬剤に付着したままである標識を選択することが好ましい。標識が結合反応を妨害しないことが好ましい。代替法では、間接的検出手順は、薬剤が化学的または酵素的に導入された標識を含むことが必要である。望ましい標識は、一般に、得られた薬剤：ポリペプチド複合体の結合または安定性を妨害しない。しかし、標識を、典型的には、有効な結合およびそれによる検出可能なシグナルの生成のための抗体に接近可能なようにデザインする。

10

【0065】

タンパク質レベルの検出のための広範な種々の標識は、当該分野で公知である。非限定的な例には、放射性同位体、酵素、コロイド物質、蛍光化合物、生物発光化合物、および化学発光化合物が含まれる。

20

【0066】

結合反応中の薬剤：ポリペプチド複合体の形成量を、標準的な定量アッセイによって定量することができる。上記で説明するように、薬剤：ポリペプチド複合体の形成を、結合部位での標識の残存量によって直接測定することができる。代替法では、ERストレス関連タンパク質を、標識されたアナログと特異的因子上の部位への結合を競合する能力について試験する。この競合アッセイでは、標識の捕捉量は、試験サンプル中のERストレス関連タンパク質の存在量に反比例する。

【0067】

上記で概説した原則に基づいたタンパク質分析のための多数の技術が当該分野で利用可能である。これらには、放射免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫放射測定アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射測定アッセイ、*in situ*免疫アッセイ（例えば、コロイド金、酵素、または放射性同位体標識を使用する）、ウェスタンブロット分析、免疫値沈降アッセイ、免疫蛍光アッセイ、およびSDS-PAGEが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0068】

ERストレス関連タンパク質を特異的に認識するかこれに結合する抗体は、上記タンパク質分析の実施に好ましい。必要に応じて、特定の翻訳後修飾型（例えば、ERストレス関連誘導性修飾）を認識する抗体を使用することができる。翻訳後修飾には、グリコシル化、脂質化、アセチル化、およびリン酸化が含まれるが、これらに限定されない。これらの抗体を、業者から購入することができる。例えば、チロシンリン酸化タンパク質を特異的に認識する抗ホスホチロシン抗体は、多数の業者（*In vitro*ogenおよびPerkin Elmerが含まれる）から利用可能である。抗ホスホチロシン抗体は、ERストレスに应答してそのチロシン残基を差別的にリン酸化するタンパク質の検出に特に有用である。このようなタンパク質には、真核細胞翻訳開始因子2（eIF-2）が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、これらの抗体を、従来のポリクローナル抗体技術またはモノクローナル抗体技術を使用して、宿主動物または抗体産生細胞を所望の翻訳後修飾を示す標的タンパク質で免疫化することによって生成することができる。

40

【0069】

本発明の方法の実施では、異なる身体組織、異なる細胞型、および/または異なる細胞

50

内構造中でERストレス関連タンパク質の発現パターンを識別することが望ましいかもしれない。これらの研究を、一定の組織、細胞型、または細胞内構造中で選択的に発現するタンパク質マーカーに結合することができる組織特異的抗体、細胞特異的抗体、または細胞内構造特異的抗体を使用して実施することができる。

【0070】

例えば、標的ERストレス関連タンパク質を乏突起膠細胞などの特異的細胞型に局在化するために、乏突起膠細胞マーカーに特異的な1つまたは複数の抗体を使用した同時染色を使用することができる。乏突起膠細胞の例示的マーカーには、CC1、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質(MOG)、乏突起膠細胞-ミエリン糖タンパク質(OMG)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(CNP)、NOGO、ミエリンタンパク質ゼロ(MPZ)、末梢性ミエリンタンパク質22(PMP22)、タンパク質2(P2)、ガラクトセレブロシド(GalC)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質(PLP)が含まれるが、これらに限定されない。特異的細胞内構造中に局在するERストレス関連タンパク質を検出または定量するために、このような構造中に差分的に存在する抗原に指向する1つまたは複数の抗体を使用した同時染色を行うことが好ましい。広範な種々のオルガネラ特異的抗体を当該分野で利用可能である。非例示的例には、ER常在(resident)タンパク質BIPに指向する小胞体(ER)特異的抗体、細胞表面受容体(上皮成長因子受容体(EGF受容体)など)と反応性を示す原形質膜特異的抗体、ゴルジ特異的抗体-アダプチン、および(例えば、上皮細胞と間質細胞との間で)異なる細胞型由来のサイトケラチンに分化するサイトケラチン特異的抗体が含まれる。免疫特異的結合を検出および定量するために、デジタル画像システム(共焦点顕微鏡が含まれるが、これらに限定されない)を使用することができる。

10

20

【0071】

ERストレス関連遺伝子の発現の変化を、コントロール細胞と比較した遺伝子産物の活性の変化を試験することによって決定することもできる。ERストレス関連タンパク質の活性の薬剤誘導性変化についてのアッセイは、生物化学および/またはシグナル伝達経路(調査中)に依存するであろう。例えば、ERストレス関連タンパク質がキナーゼである場合、下流基質をリン酸化する能力の変化を、当該分野で公知の種々のアッセイによって決定することができる。代表的なアッセイには、リン酸化タンパク質を認識する抗ホスホチロシン抗体などの抗体を使用した免疫プロットイングおよび免疫沈降が含まれるが、これらに限定されない。さらに、キナーゼ活性を、高処理化学発光アッセイ(AlphaScreen(商標)(Perkin Elmerから利用可能)およびeTag(商標)アッセイなど)によって検出することができる(Chan-Hui, et al. (2003) *Clinical Immunology* 111:162-174)。

30

【0072】

ERストレス関連タンパク質が細胞内pH条件を変動させるシグナル伝達カスケードの一部である場合、蛍光pH色素などのpH感受性分子を、レポーター分子として使用することができる。ERストレス関連タンパク質がイオンチャネルである別の例では、膜電位および/または細胞内イオン濃度の変動をモニタリングすることができる。多数の市販のキットおよび高処理デバイスは、イオンチャネルのモジュレーターについての迅速且つ頑強なスクリーニングに特に適切である。代表的な装置には、FLIPR(商標)(Molecular Devices, Inc.)およびVIPR(Aurora Biosciences)が含まれる。これらの装置は、1000個を超えるマイクロプレートウェルの反応を同時に検出し、1秒間または1ミリ秒(minisecond)以内に実時間測定値および機能データを得ることができる。

40

【0073】

ERストレス関連タンパク質がプロテアーゼであるさらに別の例では、基質タンパク質の切断におけるその活性を、切断されたポリペプチドの分析によって検出することができ

50

る。いくつかのポリペプチド分析方法が当該分野で利用可能である。非限定的な例示の方法は、二次元電気泳動、質量分析、およびペプチド配列決定である。

【0074】

本発明の方法によって同定される候補薬剤の全部または一部を、広範な種々の条件が生じる神経脱髄を調整する能力によってさらに特徴づけることができる。例えば、病原体または物理的損傷によって負わされる障害、遺伝的素因、炎症、および/または自己免疫応答に寄与する障害で神経脱髄が起こり得る。具体的には、細菌またはウイルスの感染（例えば、HIV - 空胞性髄鞘障害およびHTLVなど）の際に神経脱髄が起こり得る。これはまた、有害物質との直接的接触または体内への有毒代謝産物の蓄積（例えば、橋中心髄鞘崩壊症およびビタミン欠乏症など）に起因し得る。神経脱髄はまた、脊髄損傷、遺伝病（白質萎縮、副腎脳白質ジストロフィ、変性多系統萎縮、ピンスワンガー脳症、中枢神経系の腫瘍、および多発性硬化症が含まれるが、これらに限定されない）で生じ得る。

10

【0075】

形態学的に、神経脱髄を、中枢神経系中の乏突起膠細胞または末梢神経系中のシュワン細胞の喪失によって特徴づけることができる。神経系中の有髄軸索の減少または乏突起膠細胞またはシュワン細胞マーカーレベルの減少によって決定することもできる。乏突起膠細胞またはシュワン細胞の例示的マーカータンパク質には、CC1、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)、ミエリン関連糖タンパク質(MAG)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質(MOG)、乏突起膠細胞-ミエリン糖タンパク質(OMG)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(CNP)、NOGO、ミエリンタンパク質ゼロ(MPZ)、末梢性ミエリンタンパク質22(PMP22)、タンパク質2(P2)、ガラクトセレブロシド(GalC)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質(PLP)が含まれるが、これらに限定されない。そのようなものとして、本発明の方法によって同定された候補薬剤は、神経脱髄の有害な形態学的特徴を阻害することができる物質を含む。

20

【0076】

本発明の方法によって同定された候補薬剤を、以下の2つのクラスに大きく分類することができる。第1のクラスは、細胞または被験体に投与した場合にERストレスを引き起こす遺伝子またはタンパク質の発現または活性のレベルを減少させる薬剤を含む。第2のクラスは、ERストレス抑制遺伝子またはタンパク質（例えば、BIPおよびPERK）の発現または活性のレベルを増加させる薬剤を含む。1つの態様では、薬剤は、中枢神経系中の乏突起膠細胞または末梢神経系中のシュワン細胞の再髄鞘形成における小胞体ストレスの特徴を示すタンパク質（例えば、主要組織適合遺伝子複合体I）のレベルを減少させる。

30

【0077】

（動物研究：）

神経脱髄容態に有利な生物活性剤の開発は、動物モデルの使用も含み得る。したがって、本発明は、脱髄障害に関連する現象を調整する生物活性剤を試験するための動物モデルの使用を提供する。本方法は、(a)(i)試験動物の神経脱髄の誘導、および(ii)前記試験動物を脱髄病変の再髄鞘形成が示されるのに十分な時間脱髄誘導から回復させることを含む方法によって得られた試験動物に候補生物活性剤を投与する工程と、(b)脱髄障害に関連する現象に及ぼす前記薬剤の効果を決定する工程とを含む。

40

【0078】

本発明の動物モデルは、動物の神経系（中枢神経系および末梢神経系が含まれる）中に神経脱髄容態を生じる手順を受け入れられる任意の非ヒト脊椎動物を含む。好ましいモデル生物には、哺乳動物、霊長類、およびげっ歯類が含まれるが、これらに限定されない。好ましいモデルの非限定的な例は、ラット、マウス、モルモット、ネコ、イヌ、ウサギ、ブタ、チンパンジー、およびサルである。試験動物は、野生型またはトランスジェニックであり得る。

【0079】

50

1つの態様では、本発明の方法は、インターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列がゲノムに安定に組み込まれたトランスジェニック動物を使用する。別の態様では、本発明の方法は、少なくとも1つの他の遺伝子の発現が変化しているトランスジェニック動物であって、ここで、I F N - の発現の際に、動物が、インターフェロン - (I F N -) のみをコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれたトランスジェニック動物と比較してより高い脱髄の程度を示す、トランスジェニック動物を含む。好ましい態様では、少なくとも1つの他の遺伝子がE Rストレス関連タンパク質をコードする。別の好ましい態様では、試験動物は、インターフェロン - (I F N -) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列がゲノムに安定に組み込まれた腓膵E Rキナーゼ遺伝子(P E R K) のヘテロ接合性ノックアウトである。好ましくは、トランスジェニック動物中に保有される導入遺伝子の発現は、異所性、組織特異的、細胞型特異的、またはオルガネラ特異的である発現をもたらすように誘導可能である。

10

20

30

40

50

【0080】

上記のように、組織特異的および細胞特異的調節配列は、中枢神経系中での導入遺伝子の発現に利用可能である。例示的配列は、グリア線維酸性遺伝子(G F A P) の転写調節配列である。調節配列により、中枢神経系中、具体的には、星状細胞中で導入遺伝子を異所性発現することが可能である。特定の細胞内位置中の導入遺伝子の発現が望ましい場合、導入遺伝子を、当該分野で広く実施されている組換えD N A技術によって対応する細胞内局在化配列に作動可能に連結することができる。例示的な細胞内局在化配列には、(a) 細胞の外側への遺伝子産物の分泌を指示するシグナル配列、(b) 原形質膜または細胞の他の膜成分へのタンパク質の付着を可能にする膜繫留ドメイン、(c) 核へのコードタンパク質の転位置を媒介する核局在化配列、(d) コードタンパク質を主にE Rに限定する小胞体保留配列(例えば、K D E L配列)、または(e) コードタンパク質産物の差分細胞内分布で役割を果たす任意の他の配列が含まれるが、これらに限定されない。

【0081】

試験動物の脱髄容態は、一般に、神経系(例えば、中枢神経系または末梢神経系)中の有髄軸索の減少または乏突起膠細胞およびシュワン細胞などの髄鞘形成細胞のマーカーレベルの減少をいう。髄鞘形成細胞を同定するための例示的マーカーには、C C 1、ミエリン塩基性タンパク質(M B P)、セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(C G T)、ミエリン関連糖タンパク質(M A G)、ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質(M O G)、乏突起膠細胞 - ミエリン糖タンパク質(O M G)、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ(C N P)、N O G O、ミエリンタンパク質ゼロ(M P Z)、末梢性ミエリンタンパク質22(P M P 2 2)、タンパク質2(P 2)、ガラクトセレブロシド(G a l C)、スルファチド、およびプロテオリピドタンパク質(P L P)が含まれるが、これらに限定されない。

【0082】

これらの現象を、本明細書中に記載の免疫組織化学的手段またはタンパク質分析によって観察することができる。1つの態様では、試験動物の脳の切片を、乏突起膠細胞マーカーを特異的に認識する抗体で染色することができる。別の態様では、乏突起膠細胞の発現レベルを、免疫プロットング、ハイブリッド形成手段、および増幅手順、ならびに当該分野で十分に確立され、そして/または本明細書中に提供されている任意の他の方法によって定量することができる。

【0083】

試験動物中に脱髄を誘導する方法が多数確立されている。例えば、神経脱髄を、病原体または物理的損傷、試験動物中に炎症反応および/または自己免疫応答を誘導する薬剤によって負わされ得る。好ましい方法は、脱髄誘導薬(I F N - およびクプリゾン(ピス - シクロヘキサノンオキサリジヒドラゾン)が含まれるが、これらに限定されない)を使用する。クプリゾン誘導性脱髄モデルは、M a t s u s h i m a , e t a l . (2 0 0 1) B r a i n P a t h o l . 1 1 : 1 0 7 - 1 1 6 に記載されている。この方法では

、試験動物に、典型的には、クプリゾンを含む飼料を数週間（約 1 ~ 約 10 週間の範囲）与える。

【0084】

適切な方法による脱髄容態の誘導後、動物を、前に脱髄した病変またはその付近に再髄鞘形成させるのに十分な時間で回復させる。再有髄軸索の発生に必要な時間が動物によって異なるが、一般に、少なくとも約 1 週間必要であり、より頻繁には少なくとも 2 ~ 10 週間、さらにより頻繁には約 4 ~ 約 10 週間必要である。再髄鞘形成を、神経系（例えば、中枢神経系または末梢神経系）中の有髄軸索の増加の観察または髄鞘形成細胞のマーカータンパク質レベルの増加の検出によって確認することができる。同一の脱髄検出方法を使用して、再髄鞘形成が起こったかどうかを決定することができる。

10

【0085】

脱髄に関連する現象に及ぼす試験薬剤の影響の決定は、当該分野で公知の任意の適切な方法（上記細胞ベースのアッセイの項に記載の方法が含まれるが、これらに限定されない）を含む。一般に、免疫組織化学的分析および電子顕微鏡分析を実施して、試験薬剤の影響を視覚化することができる。さらに、ER ストレス関連遺伝子または遺伝子産物の差分配列の検出に適用可能な手順を使用することができる。ER ストレス関連タンパク質の活性の測定技術も適用することができる。上記のように、ER ストレス関連遺伝子の非限定的な例には、腓膵 ER キナーゼ遺伝子（PERK）、真核細胞翻訳開始因子 2（eIF-2）、真核細胞翻訳開始因子（eIF-2）、イノシトール要求 1（IRE1）、活性化転写因子 6（ATF6）、CAAT エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質（CHOP）、結合免疫グロブリンタンパク質（BIP）、カスパーゼ-12、成長および DNA 損傷タンパク質 34（GADD34）、CreP（eIF2 リン酸化の構成性リプレッサー）、および X ボックス結合タンパク質-1（XBP-1）が含まれる。

20

【0086】

別の実施形態では、本発明は、神経脱髄病態の病理発生の誘発に適切な非ヒトトランスジェニック動物を提供する。トランスジェニック動物はまた、神経脱髄を阻害するか脱髄病変の再髄鞘形成を促進するのに有効な生物活性剤の開発に有用である。1つの態様では、本発明のトランスジェニック動物は、(a) インターフェロン-（IFN-）をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が動物のゲノムに安定に組み込まれており、(b) 少なくとも1つの他の遺伝子の発現が変化しており、ここで、IFN- の発現の際に、動物が、工程(a)において見られるようなインターフェロン-（IFN-）をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列が安定に組み込まれたトランスジェニック動物と比較して脱髄の程度がより高いが、少なくとも1つの他の遺伝子の発現の変化を欠いている。

30

【0087】

本発明は、その全細胞中に1つまたは複数の所望の導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物ならびにいくつかであるがその全てではない細胞中に導入遺伝子を保有する動物（すなわち、モザイク動物）を意図する。任意の種の動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、マイクロピッグ（micro-pig）、ヤギ、および非ヒト霊長類（例えば、バブーン、サル、およびチンパンジー）が含まれるが、これらに限定されない）を使用して、本発明のトランスジェニック動物を作製することができる。

40

【0088】

所望の導入遺伝子を、単一コピーまたはコンカテマー（例えば、ヘッド-ヘッドタンデムまたはテール-テールタンデム）として組み込むことができる。所望の導入遺伝子を、特定の組織または細胞型、好ましくは、中枢神経系内の細胞に選択的に導入し、活性化することもできる。このような細胞型特異的活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、調節配列は当業者に自明である。好ましくは、ターゲティングされた細胞型を、神経系（中枢神経系および末梢神経系が含まれる）に配置する。

【0089】

導入遺伝子を内因性対応物の染色体部位に組み込むことが望ましい場合、遺伝子ターゲ

50

ディングが好ましい。簡潔に述べれば、このような技術を使用すべきである場合、内因性対応物に相同ないくつかのヌクレオチド配列を、染色体配列を使用した相同組換えを介して、内因性遺伝子のヌクレオチド配列の機能に組み込み、破壊する目的でデザインする。

【0090】

胚頭微操作のためのテクノロジーにおける利点により、哺乳動物の受精卵に異種DNAを導入することも可能である。例えば、全能性または多能性の幹細胞を、微量注入、リン酸カルシウム媒介沈降、リボソーム融合、レトロウイルス感染、または他の手段によって形質転換することができる。次いで、形質転換した細胞を胚に導入し、次いで、胚をトランスジェニック動物に成長させる。好ましい実施形態では、成長中の胚に、所望の導入遺伝子を含むウイルスベクターを感染させ、その結果、導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物を感染胚から作製することができる。別の好ましい実施形態では、所望の導入遺伝子を、好ましくは単一細胞段階の胚の前核または細胞質に同時注入し、胚を成熟トランスジェニック動物に成長させた。これらの方法および他の異なるトランスジェニック動物の作製方法が当該分野で十分に確立されており、したがって、本明細書中に詳述しない。例えば、米国特許第5,175,385号および同第5,175,384号を参照のこと。

10

【0091】

本発明のトランスジェニック動物を、以下の2つの型に大きく分類することができる：「ノックアウト」および「ノックイン」。「ノックアウト」は、標的遺伝子の機能を減少させ、好ましくは、標的遺伝子発現が小さいか検出不可能であるようにトランスジェニック配列の導入を介して標的遺伝子が増加している。「ノックイン」は、例えば、標的遺伝子のさらなるコピーの導入または調節配列の作動可能な挿入によって標的遺伝子発現が増加し、それにより標的遺伝子の内因性コピーの発現が増強された宿主細胞ゲノムが変化したトランスジェニック動物である。ノックインまたはノックアウトトランスジェニック動物は、標的遺伝子に関してヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る。ノックアウトおよびノックインの両方は、「バイジェニック (bigenic)」であり得る。バイジェニック動物は、少なくとも2つの変化した宿主細胞遺伝子を有する。好ましいバイジェニック動物は、IFN- γ をコードする導入遺伝子および少なくとも1つの他の遺伝子の機能を破壊する別のトランスジェニック配列を保有する。

20

【0092】

本実施形態の一定の態様では、少なくとも1つの他の遺伝子は、ERストレス関連遺伝子である。別の態様では、他の遺伝子は、外因性遺伝子（すなわち、宿主細胞中に存在しない遺伝子）または内因性遺伝子（すなわち、導入された遺伝子がレシピエント動物由来の内因性対応物を見出す）であり得る。このようなERストレス関連遺伝子を、腓膵ERキナーゼ遺伝子 (PERK)、真核細胞翻訳開始因子2 (eIF-2)、真核細胞翻訳開始因子 (eIF-2)、イノシトール要求1 (IRE1)、活性化転写因子6 (ARTF6)、CAATエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 (CHOP)、結合免疫グロブリンタンパク質 (BIP)、カスパーゼ-12、成長およびDNA損傷タンパク質34 (GADD34)、CreP (eIF2リン酸化の構成性リプレッサー)、およびXボックス結合タンパク質-1 (XBP-1) からなる群から選択することができる。

30

40

【0093】

好ましい非トランスジェニック動物は、腓膵ERキナーゼ遺伝子 (PERK) のヘテロ接合性ノックアウトを含み、インターフェロン- γ (IFN- γ) をコードするトランスジェニックヌクレオチド配列がゲノムに安定に組み込まれている。1つの態様では、好ましいトランスジェニック動物は、野生型動物と比較してIFN- γ 媒介性神経脱髄に対する脆弱性が増加する。

【0094】

本発明の非ヒトトランスジェニック動物の細胞も本発明で提供する。1つの態様では、細胞は、IFN- γ をコードする導入遺伝子がゲノムに安定に組み込まれており、ERス

50

トレスに相関するタンパク質をコードする少なくとも1つの他の遺伝子に変化している。別の態様では、本発明の細胞は、中枢神経系に由来する。さらに別の態様では、本発明の細胞は乏突起膠細胞である。さらに別の態様では、本発明の細胞は、末梢神経系に由来し、シュワン細胞が含まれるが、これに限定されない。

【0095】

上記項目で考察されるように、これらの細胞は、神経脱髄容態の分子基盤の解明および神経脱髄の阻害または再髄鞘形成の促進に有効な薬剤の開発のための細胞ベースのアクセシの実施に特に有用である。

【0096】

(本発明の薬学的組成物：)

ERストレス関連遺伝子またはタンパク質を調整するのに有効な選択された生物活性剤を、神経脱髄障害の治療薬の調製のために使用することができる。好ましい薬剤クラスは、乏突起膠細胞中のIFN-誘発性ERストレスを緩和するのに有効である。

【0097】

1つの態様では、本発明の選択された薬剤を投与して、細菌およびウイルスなどの病原体によって負わされた神経脱髄を治療することができる。別の態様では、選択された薬剤を使用して、有害物質または体内への有毒代謝産物の蓄積(例えば、橋中心髄鞘崩壊症およびビタミン欠乏症など)に起因する神経脱髄を治療することができる。さらに別の態様では、薬剤を使用して、脊髄損傷などの物理的損傷に起因する脱髄を治療することができる。なおさらに別の態様では、薬剤を投与して、遺伝的特性を有する障害、遺伝病(白質萎縮、副腎脳白質ジストロフィ、変性多系統萎縮、ピンスワンガー脳症、中枢神経系の腫瘍、および多発性硬化症が含まれるが、これらに限定されない)中に生じた脱髄を治療することができる。

【0098】

種々の送達系が公知であり、これを使用して、本発明の生物活性剤を投与することができる(例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中のカプセル化、組換え細胞による発現、受容体媒介性エンドサイトーシス(Wu and Wu, (1987), J. Biol. Chem. 262: 4429-4432)、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療核酸の構築など)。送達方法には、動脈内、筋肉内、静脈内、鼻腔内、および経口経路が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本発明の薬学的組成物を治療を必要とする領域に局所的に投与することが望ましいかもしれない。これを、例えば、手術中の局所融合、注入、またはカテーテルによって行うことができる。一定の実施形態では、薬剤を、被験体の神経系、好ましくは中枢神経系に送達させる。別の実施形態では、再髄鞘形成を受けている神経組織に薬剤を投与する。

【0099】

選択された薬剤の投与を、一連の治療を通して1回、連続的、または断続的に行うことができる。最も有効な手段および投薬量の決定方法は、当業者に周知であり、治療に使用される組成物、治療の目的、治療される標的細胞、および治療される被験体によって変化する。単回または複数回の投与を、担当医によって選択された用量レベルおよびパターンを使用して行うことができる。

【0100】

本発明の薬学的組成物の調製を、一般的に承認されている医薬品の調製手順にしたがって行う。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Edition (1990), E.W. Martin ed., Mack Publishing Co., PAを参照のこと。意図する使用および投与様式に依存して、薬学的組成物の調製において有効成分をさらに処理することが望ましいかもしれない。適切な処理は、適切な非毒性および非干渉性組成物との混合、滅菌、投与単位への分割、および送達デバイス中のカプセル化を含み得る。

【0101】

経口、鼻腔内、または局所投与のための薬学的組成物を、固体、半固体、または液体形

10

20

30

40

50

態（錠剤、カプセル、粉末、液体、および懸濁液が含まれる）で供給することができる。注射用組成物を、溶液または懸濁液としてか、乳濁液としてか、注射前に液体に溶解または懸濁するのに適切な固体形態として供給することができる。気道を介した投与のために、好ましい組成物は、適切な噴霧デバイスと共に使用する場合、固体、粉末、またはエアゾールで提供される組成物である。

【0102】

液体の薬学的に許容可能な組成物を、例えば、本明細書中に具体化したポリペプチドを液体賦形剤（水、生理食塩水、デキストロス水溶液、グリセロール、またはエタノールなど）に溶解または分散させることによって調製することができる。組成物はまた、他の薬用因子（*medicinal agent*）、薬学的作用因子（*pharmaceutical agent*）、アジュバント、キャリア、および助剤（湿潤剤または乳化剤、およびpH緩衝剤など）を含み得る。

10

【0103】

必要に応じて、薬学的組成物を、遅延放出形態または徐放形態で処方し、それにより、比較的一定レベルの活性化合物を長期にわたって提供することができる。

【0104】

（同定されたERストレス関連遺伝子の他の適用：）

本発明の別の実施形態は、被験体中で幹細胞を使用して再髄鞘形成を促進する方法である。このアプローチでは、培養幹細胞を、典型的には、髄鞘形成乏突起膠細胞中のERストレスを改善することができる遺伝子でトランスフェクトする。次いで、遺伝子修飾した幹細胞を、神経脱髄容態を罹患した被験体のCNSに導入する。遺伝子修飾された幹細胞を送達するのに有効な任意の手段を利用可能である。典型的には、幹細胞を、被験体の神経系に直接注射する。この方法論は、例えば、*Morris, et al. (1997) J Biol Chem. 272(7): 4327-34*（本明細書中で参考として援用される）に詳述されている。幹細胞に導入されるべき候補遺伝子には、BIP、PERK、およびサイトカインシグナル伝達1のサブレッサー（SOCS1）が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0105】

ERストレスから細胞を防御するためにBIPが必要であると報告されている。BIPの過剰発現により、細胞mRNAの翻訳が継続され、それにより、ERストレスを軽減する。SOCS1は、IFN-シグナル伝達を遮断することが知られている。そのようなものとして、SOCS1を過剰発現する幹細胞およびそれによるこのような幹細胞由来の髄鞘形成細胞は、IFN-によって媒介される脱髄効果に対する感受性が低いと予想される。

30

【0106】

神経細胞集団を、胚幹細胞の分化培養物から産生することができ（*Li et al. (1998) Curr. Biol. 8: 971-974*）、動物モデル系において種々の欠損を修復するための実験モデルで使用されている（*review, Svendsen and Smith, Trends in Neurosci. 22: 357-364*）。

40

【0107】

ヒトでは、神経細胞は、ヒト胎児性癌細胞に由来し得、レチノイン酸を使用して分化するように誘導することができる。これらの胚幹細胞は、CNS疾患の実験モデルにおける欠損を修復することが示されている。いくつかの実施形態では、ERストレスのモジュレーターを、多能性幹細胞で発現することができる。好ましくは、操作された幹細胞を必要とする患者に導入して、再髄鞘形成を誘導し、そして/または本明細書中に引用した障害の患者に関連する脱髄から神経細胞を防御することができる。多能性幹細胞は、胚幹細胞（ES）または胚生殖細胞（EG）であり得る。*in vitro*での幹細胞からの神経前駆細胞の生成は、中枢神経系における組織再構築ならびに遺伝子の送達および発現のための無制限の細胞供給源として役立つ。

50

【0108】

ES細胞およびEG細胞の培養方法は、当該分野で公知である。例えば、ES株およびEG株を、支持細胞層上で培養し、線維芽細胞成長因子および白血病抑制因子などの組換えホルモンの存在下にて未分化状態で成長および維持することができる。ホルモン環境の変化、胚様体の形成、またはこれらの組み合わせによって分化を開始することができる。胚様体形成は、最も広く使用されている過程である。あるいは、組織特異的可逆的形質転換を、米国特許出願番号20060068496号(本明細書中で参考として援用される)に記載の方法に従って、出発物質として幹細胞を使用した分化神経細胞株の確立のために使用することができる。米国特許出願番号20060068496号は、形質転換遺伝子の組織特異的発現を使用する方法を開示しており、この方法を使用して、特定の細胞型を同定および培養することができる。この形質転換事象を、いくつかの形態の方法で、多数の可能な過程の1つを使用して逆戻させ、非形質転換分化細胞のクローン集団または半精製集団(異なる細胞もしくは半精製細胞またはクローン細胞集団が含まれる)を遊離することができる。グリア線維酸性遺伝子(GFAP)プロモーターを使用して、グリア期限の細胞中で遺伝子が選択的に発現されている。神経前駆細胞を分化させて、神経細胞またはグリア細胞を得ることができる。神経細胞を同定するために使用することができるマーカーには、GFAPおよびMPBが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0109】

細胞療法での使用に好ましい細胞は、ヒト胚幹細胞である。1つの態様では、本発明は、1つまたは複数のERストレスタンパク質のモジュレーターを発現することができる未分化のヒト胚幹細胞の負荷調製物を提供し、この調製物は、*in vitro*で増幅することができる。本発明の別の実施形態では、神経前駆細胞は、最初にヒトES細胞に由来し、ERストレス経路の1つまたは複数のモジュレーターを発現するように操作され、その後成熟神経細胞およびグリア細胞(乏突起膠細胞および星状細胞が含まれる)に分化する。あるいは、神経前駆細胞は、最初に成熟神経細胞(乏突起膠細胞および星状細胞が含まれる)に分化され、その後ERストレス応答の1つまたは複数のモジュレーターを発現するように操作される。

20

【0110】

神経前駆細胞中で発現されるように誘導することができるモジュレーターには、タンパク質の折り畳みおよび成熟、タンパク質輸送、タンパク質の合成および修飾、 Ca^{2+} ホメオスタシス、転写因子、UPR標的遺伝子、およびアポトーシスを媒介するタンパク質のモジュレーターが含まれる。タンパク質の折り畳みおよび成熟のモジュレーターには、BIP/GRP78、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ関連タンパク質P5、コラーゲン結合タンパク質2、第4哺乳動物ER DNA Jタンパク質(ERdj4)、酸素調節タンパク質150kD(ORP150)、FK506結合タンパク質(FKBP13)、GRP94、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼERp70様、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼERp60様、プロリン4ヒドロキシラーゼ - サブユニット(P4HB)、hsc70(71-kD熱ショック同族タンパク質)のモジュレーターが含まれるが、これらに限定されない。タンパク質輸送のモジュレーターには、推定ミトコンドリア膜タンパク質輸送受容体(hTIM44)、トランスロコン関連タンパク質 サブユニット(TRAP)、および膜貫通タンパク質rnp24が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の合成および修飾のモジュレーターには、グリシル-tRNAシターゼ、アラニル-tRNAシターゼ、アスパラギンシターゼ、グルタミン-フルクトース-6リン酸アミドトランスフェラーゼ(GFAT)、および内在性膜タンパク質1(ITM1)が含まれるが、これらに限定されない。 Ca^{2+} ホメオスタシスのモジュレーターには、カルアレチキュリン、スタニオカルシン2、原形質膜 Ca^{2+} ポンプ、ATPase、カルネキシン、新規のDNA結合/EF-ハンド/ロイシンジッパータンパク質(NEFA)、およびヌクレオニジン1が含まれるが、これらに限定されない。転写因子のモジュレーターには、CHOP、C/EBP-、TGF- 刺激クローン22(TSC

30

40

50

22) 様、Xボックス結合タンパク質1 (XBP-1)、およびEgr-1が含まれるが、これらに限定されない。UPR標的遺伝子のモジュレーターには、HERPおよびSERP/RAMP4のモジュレーターが含まれるが、これらに限定されない。アポトーシスのモジュレーターには、Bbc3/PUMA、カスパーゼ3、およびカスパーゼ12が含まれるが、これらに限定されない。

【0111】

好ましくは、未分化または分化した神経細胞中で発現するモジュレーターは、PERK経路のモジュレーターである。1つの実施形態では、PERK経路の1つまたは複数のモジュレーターを、未分化または分化した神経細胞で発現することができる。例えば、神経前駆細胞を、リン酸化eIF-2 (p-eIF-2) レベルが上昇する一方で、IFN- γ サイトカインシグナル伝達経路のインヒビター (例えば、SOCS1) を同時に発現する合成PERK融合酵素を発現するように誘導することができる。

10

【0112】

さらに別の態様では、本発明は、PERK経路のモジュレーターを発現する神経前駆細胞、神経細胞、およびグリア細胞を提供し、これらを、細胞療法および遺伝子療法のために使用することができる。幹細胞のために選択される送達経路は、送達経路が損傷した器官の修復が起こるかどうかを決定するための一助となると言う点で極めて重大である。損傷領域付近の高濃度の幹細胞は、器官を修復するための十分な幹細胞の局在化および分化が起こる機会を増加させる。多くの場合、これは、幹細胞の標的化投与および領域投与を含む。

20

【0113】

遺伝子療法は、髄鞘形成細胞のERストレスの調整によって再髄鞘形成を促進するための代替アプローチである。in vivoまたはex vivoのために発現ベクターを使用する場合、薬学的に許容可能なベクター (複製能力のないレトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターなど) が好ましい。本発明のERストレス抑制遺伝子を含む薬学的に許容可能なベクターを、挿入したポリヌクレオチドの一過性または安定な発現のためにさらに修飾することができる。本明細書中で使用される、用語「薬学的に許容可能なベクター」には、ERストレス抑制遺伝子を選択的にターゲティングして神経系に存在する細胞 (好ましくは、神経系中の乏突起膠細胞) に導入する能力を有するベクターまたは送達ビヒクル (vehicle) が含まれるが、これらに限定されない。複製能力のないレトロウイルスベクターの例は、LNL6である (Miller, A. D. et al. (1989) *BioTechniques* 7: 980-990)。遺伝子マーカーのレトロウイルス媒介性遺伝子導入のための複製能力のないレトロウイルスの使用方法は、十分に確立されている (Correll et al. (1989) *PNAS USA* 86: 8912; Bordignon (1989) *PNAS USA* 86: 8912-52; Culver, K. (1991) *PNAS USA* 88: 3155; and Rill, D. R. (1991) *Blood* 79 (10): 2694-700)。臨床的調査により、ウイルスベクターに関連する副作用はほとんど無いか全く無いことが示されている (Anderson (1992) *Science* 256: 808-13を参照のこと)。あるいは、ERストレス抑制遺伝子の導入を、Chernajovsky, et al. (2004) *Nat. Rev. Immunol.* 4 (10): 800-11に記載の方法を使用して行うことができる。

30

40

【0114】

髄鞘形成細胞 (乏突起膠細胞およびシュワン細胞が含まれる) 中のERストレス原因遺伝子の発現を、RNA干渉 (RNAi) テクノロジー (転写後遺伝子サイレンシング型) の使用によって阻害または防止することができる。RNAiを使用して、偽「ノックアウト」 (すなわち、遺伝子によってコードされた産物または目的のコード領域の発現が減少し、系中のコードされた産物の活性が全体的に減少する系) を作製することができる。そのようなものとして、RNAiを行って、核酸またはそのフラグメントもしくは変異型 (variant) をターゲティングし、次に、コードする産物の発現および活性レベルを

50

減少させることができる。このような系を、産物の機能的研究のために使用することができ、このような産物の活性に関連する障害を治療することもできる。RNAiは、例えば、Hammond et al. (2001) Science 10; 293 (5532) : 1146 - 50. , Caplen et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Aug 14; 98 (17) : 9742 - 7 (その全てが本明細書中で参考として援用される)に記載されている。RNAiを行うための試薬およびキットは、例えば、Ambion Inc. (Austin, Tex., USA) および New England Biolabs Inc. (Beverly, Mass., USA) から市販されている。

【0115】

いくつかの系におけるRNAiの初期因子 (initial agent) は、標的核酸に対応するdsRNA分子であると考えられる。次いで、dsRNAは、21~23ヌクレオチド長 (19~21dbpの二重鎖 (それぞれ2つのヌクレオチド3'オーバーハングを有する)) である低分子干渉RNA (siRNA) に切断すると考えられる。この第1の切断工程を行うと考えられる酵素は、「ダイサー」と呼ばれ、dsRNA特異的リボヌクレアーゼの多数のRNアーゼIIIファミリーに分類される。あるいは、RNAiを、細胞への直接導入またはこのようなsiRNAまたはsiRNA様分子の適切な前駆体 (例えば、前駆体をコードするベクターなど) の細胞への導入による細胞内での生成を介して行うことができる。次いで、siRNAを他の細胞内成分と結合させて、RNA誘導性サイレンシング複合体 (RISC) を形成することができる。このようにして形成されたRISCは、その後、相同性によってそのsiRNA成分と標的転写物との間の塩基対合相互作用を介して目的の転写物をターゲティングし、標的転写物がsiRNAの3'末端から約12ヌクレオチド切断することができる。したがって、標的mRNAが切断され、コードされるタンパク質産物のレベルが減少する。

【0116】

RNAiを、細胞への適切なin vitro合成siRNAまたはsiRNA様分子の導入によって行うことができる。RNAiを、例えば、化学合成RNAを使用して行うことができる。あるいは、適切な発現ベクターを使用して、in vitroまたはin vivoでこのようなRNAを転写することができる。センス鎖およびアンチセンス鎖 (同一のベクターまたは個別のベクター上に存在する配列によってコードされた) のin vitro転写を、例えば、T7 RNAポリメラーゼを使用して行うことができ、この場合、ベクターは、T7プロモーターに作動可能に連結された適切なコード配列を含み得る。in vitro転写RNAを、実施形態で、(例えば、大腸菌RNアーゼIIIを使用して) in vitroにてRNAiをもたらすサイズにプロセッシングすることができる。センスおよびアンチセンス転写物を組み合わせ、RNA二重鎖を形成し、これを目的の標的細胞に導入する。小ヘアピンRNA (shRNA) を発現し、これをsiRNA様分子にプロセッシングすることができる他のベクターを使用することができる。種々のベクターベースの方法は、例えば、Brummelkamp et al. (2002) Science Apr 19; 296 (5567) : 550 - 3. Epub 2002 Mar 21; Brummelkamp et al. Cancer Cell (2002) Sept 2 (3) : 243 - 7. Paddison et al. (2002) Genes Dev. 2002 Apr 15; 16 (8) : 948 - 58に記載されている。in vitroまたはin vivo (例えば、遺伝子療法) のいずれかで細胞にこのようなベクターを導入するための種々の方法は、当該分野で公知である。

【0117】

したがって、1つの実施形態では、1つまたは複数のERストレス原因遺伝子の発現を、ERストレス抑制遺伝子またはそのフラグメントをコードする核酸またはその核酸に相同な核酸に対応するsiRNAまたはsiRNA様分子を細胞に導入するか細胞内で精製するによって阻害することができる。「siRNA様分子」は、siRNAと (例えば、サイズおよび構造が) 類似し、siRNA活性を誘発する (すなわち、RNAi媒介性発

10

20

30

40

50

現阻害をもたらす)ことができる核酸分子をいう。種々の実施形態では、このような方法は、細胞への*siRNA*または*siRNA*様分子の直接投与または上記のベクターベースの方法の使用を必要とし得る。1つの実施形態では、*siRNA*または*siRNA*様分子は、約30ヌクレオチド長未満である。さらなる実施形態では、*siRNA*または*siRNA*様分子は、約21~23ヌクレオチド長である。1つの実施形態では、*siRNA*または*siRNA*様分子は、約19~21bpの二重鎖部分を含み、それぞれの鎖が2つの3'オーバーハングを有する。実施形態では、*siRNA*または*siRNA*様分子は、ERストレス原因遺伝子またはそのフラグメントもしくは変異型(または変異型のフラグメント)をコードする核酸に実質的に相同である。このような変異型は、ERストレス原因活性を有するタンパク質をコードすることができる。

10

【0118】

このようなRNAi法を使用して、例えば、中枢神経系中のIFN- γ の発現を阻害することができる。RNAi法によって阻害することができるERストレス原因遺伝子には、IFN- γ 、GADD34、タンパク質ホスファターゼ1(PP1)、およびアポトーシスを媒介する1つまたは複数の遺伝子(例えば、カスパーゼをコードする遺伝子)が含まれるが、これらに限定されない。

【0119】

本発明を、以下の実施例を参照してより深く理解することができ、実施例は単なる例示を意図するが、本発明の実施で現在知られている様式を制限しない。

【実施例】

20

【0120】

(実施例1: IFN- γ は、初期脱髄、乏突起膠細胞の喪失、ミエリン遺伝子発現の減少に影響を及ぼさない)

脱髄に及ぼすIFN- γ の影響を、テトラサイクリン調節系を使用してIFN- γ の送達を一過性に調節することが可能なトランスジェニックマウスを使用したクプリゾン動物モデルにおいて評価した(Lin, et al. (2004) J. Neurosci. 24: 10074-10083)。トランスジェニックマウスを、C57BL/6バックグラウンドの110 GFAP/tTAマウス株とC57BL/6バックグラウンドの184 TRE/IFN- γ とを交配して、GFAP/tTA; TRE/IFN- γ 二重トランスジェニックマウスを得ることによって作製した(Lin, et al. (2004) J. Neurosci. 24: 10074-10083)。コントロール(DOX+)マウスにおけるtTAによるTRE/IFN- γ 導入遺伝子の転写活性化を、飲料水に0.05mg/mlドキシサイクリンを添加し、これを計画日から自由に与えることによって抑制した。DOX+二重トランスジェニックマウスは、クプリゾン固形飼料を与えられ、且つドキシサイクリン溶液から決して開放されないGFAP/tTA; TRE/IFN- γ 二重トランスジェニック動物であった。DOX-二重トランスジェニックマウスは、クプリゾン固形飼料を与えられ、且つIFN- γ 発現を誘導するためにドキシサイクリンから開放したGFAP/tTA; TRE/IFN- γ 二重トランスジェニック動物であった。

30

【0121】

40

0.2%クプリゾン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MI)を含む破碎マウス固形飼料をマウスに6週間まで与えることによって、6週齢のDOX+およびDOX-雄マウスに脱髄を誘導した。その後、両マウス群を、正常な飼料に3週間戻して、再髄鞘形成をさせた。全動物手順を、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsを完全に遵守して行い、これらの手順は、Animal Care and Use Committee of The University of Chicagoによって承認された。

【0122】

脱髄に及ぼすIFN- γ およびMBPの影響を、IFN- γ およびMHC-Iレベル、乏突起膠細胞の喪失、およびミエリン遺伝子の発現として評価した。

50

【0123】

これらの動物中のIFN- γ 発現を、以下のように酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)分析によって試験した。脊髄および前脳を取り出し、氷冷PBSでリンスし、その直後に電動ホモジナイザーを使用して完全プロテアーゼカクテル(Roche, Indianapolis, IN)を含む5倍体積のPBS中で均質化した。氷上で5分間のインキュベーション後、抽出物を、14000rpmで10分間の遠心分離によって明澄化した。各抽出物のタンパク質含有量を、DCタンパク質アッセイ(Bio-Rad, Hercules, CA)によって決定した。ELISAアッセイを、マウスIFN- γ Quantikine ELISAキット(R&D system, 5 Minneapolis, MN)およびMBP抗体(1:1000; Sternberger Monoclonals)を使用し、製造者の説明書にしたがって行った。

10

【0124】

リアルタイムPCRを使用して、MHC-I発現に及ぼすIFN- γ の影響を決定した。RNAを、Trizol試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して、脳梁(Jurevics, et al., 2002)から単離し、DNase I(Invitrogen, Carlsbad, CA)で処置してゲノムDNAを消失させた。逆転写を、Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR kit(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して行った。リアルタイムPCRを、iQ supermix(Bio-Rad, Hercules CA)を使用して、Bio-Rad iQリアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad, Hercules CA)にて行った。リアルタイムPCR用のプライマーおよびプローブ(Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA)を以下に示した。

20

【0125】

MHC-IのPCR反応で使用したセンスおよびアンチセンスプライマーは、それぞれ、以下であった：

【0126】

【化1】

ATTCCCCAAAGGCCCATGT および GTCTCCACAAGCTCCATGTCC

30

。プローブは、MHC-Iプローブ：

【0127】

【化2】

TGCTGGGCCCTGGGCTTCTACC

であった。

【0128】

乏突起膠細胞集団に及ぼすIFN- γ の影響を、抗CC1抗体(APC7, 1:50; EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA)を使用した乏突起膠細胞の免疫組織化学的分析によって評価した。最初にマウスを麻酔し、左心室を介して4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M PBSを灌流したマウスから得た脳切片に対して免疫組織化学を行った。脳を取り出し、パラホルムアルデヒドで後固定し、30%スクロース中で低温保存し、OCT中に包埋し、凍結乾燥させた。凍結切片を、クリオスタット中で厚さ10 μ mに切断した。シドマン切片(Sidman section) 241~251に対応する脳梁の脳弓領域の冠状断面を、使用するために選択し、全ての比較分析を、正中脳梁に制限した(Sidman, et al. (1971) Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord (Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts)。免疫組織化学のために、凍結切片を、-20 $^{\circ}$ Cアセトンで処理し、10%NGSおよび0.

40

50

1% Triton X-100を含むPBSでブロッキングし、ブロッキング液で希釈した一次抗体と共に一晩インキュベートした。適切な蛍光色素または酵素で標識した二次抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を、検出のために使用した。CC1に対する抗体 (APC7, 1:50; EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA) を、成熟乏突起膠細胞のマーカーとして使用した。MBPに対する抗体 (1:1000; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MA) を使用して、髄鞘形成度を検証した。活性カスパーゼ-3に対する抗体 (1:50, Cell signaling Technology, Beverly, MA) を、アポトーシス細胞のマーカーとして使用した。蛍光染色切片を、DAPI (Vector Laboratories) を含むVectashieldマウント培地 (mounting medium) を使用してマウントし、Zeiss Axioplan 蛍光顕微鏡を使用して視覚化した。Open Labソフトウェアスイートを使用して、Apple Macintosh コンピュータに接続したPhotometries PXL CCDカメラを使用して画像を収集した。免疫陽性細胞を、 0.04 mm^2 の領域に限定された正中脳梁内の陽性細胞の計数によって定量した。DAPI染色によって認められる核を有する細胞のみを計数した。各MBP免疫染色スライドを、0から4のスケールで記録した。スコア0は、成体マウスの脳梁中の完全な脱髄を示し、スコア4は正常な髄鞘形成を示す。

10

【0129】

以下のプライマー-*adn*プローブを使用したリアルタイムPCRを上記のように使用して、MBP、PLP、およびCGTの発現を決定した：

20

【0130】

【化3】

MBPセンスプライマー: GCTCCCTGCCCCAGAAGT; MBPアンチセンスプライマー:

TGTCACAATGTTCTTGAAGAAATGG; MBPプローブ: AGCACGGCCGGACCCAAAGATG;

PLPセンスプライマー: CACTTACAACCTTCGCCGTCT; PLPアンチセンスプライマー:

GGGAGTTTCTATGGGAGCTCAGA; PLPプローブ: AACTCATGGCCGAGGCACCAA.

【0131】

【化3A】

CGTセンスプライマー: TTATCGGAAATTCACAAGGATCAA; およびCGTアンチセンスプライマー:

TGGCGAAGAATGTAGTCTATCCAATA; CGTプローブ: CCGGCCACCCTGTCAATCGG.

30

MBPレベルも上記の免疫組織化学的分析およびMBPに対する抗体 (1:1000; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MA) の使用によって決定されるので、脱髄の程度を決定した。脱髄を、下記の電子顕微鏡法によっても評価した。マウスを麻酔し、4%パラホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド (pH 7.3) を含む0.1M PBSを使用して灌流した。脳を1mmの切片にスライスし、脳弓領域に対応する切片をトリミングし、分析のために処理し、脳梁断面が得られるように仕向けた。薄片を切断し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、以前に記載のように分析した (Coetzee, et al. (1996) Cell 86: 209-219)。再有髄軸索の全比率は、マウスあたり最小で300本の線維の分析に基づいた。

40

【0132】

結果は、DOX + マウスが研究前に前脳にIFN- γ を発現しなかった一方で、DOX - マウスは2週間のクプリゾン処置およびドキシサイクリンの除去後に前脳中に約20 pg/mgのIFN- γ を発現し始めたことを示す (図1A)。リアルタイムPCR分析は、IFN- γ レベルの増加によって再髄鞘形成中の脳梁中に主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスI (MHC-I) (IFN- γ シグナル伝達の下流標的) の発現が有意に増加したことを示した (図1B)。クプリゾン処理から5週間後、DOX + およびDOX

50

- 二重トランスジェニックマウスの脳梁中の脱髄は最大レベルに到達し(図2)、軸索はほとんど完全に脱髄された(図3)。また、この時、CC1陽性成熟乏突起膠細胞は、DOX+およびDOX-二重トランスジェニックマウスの両方において病変部位内で喪失した(図4)。さらに、クプリゾンでの処置から2週間および4週間の脱髄期間中に、ミエリン遺伝子MBP、プロテオリピドタンパク質(PLP)、およびセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)の発現が減少し、この減少は、DOX+およびDOX-二重トランスジェニックマウスの間で類似していた(図5)。

【0133】

これらのデータにより、IFN- γ の存在はクプリゾン曝露によって誘導された初期病的過程に有意な影響を及ぼさないことが示唆される。

10

【0134】

統計学。データを、平均 \pm 標準偏差として示す。SigmaStat 3.1ソフトウェアを使用した一元配置ANOVA検定によって多重比較を統計的に評価した。p<0.05の場合、差異を統計的に有意と見なした。

【0135】

(実施例2: IFN- γ は、脱髄病変中の再髄鞘形成を抑制する)

実施例1に記載のクプリゾン処置マウスにおける再髄鞘形成に及ぼすIFN- γ の影響を、以下の5週間目のクプリゾンの使用中止後に決定した。使用した実験方法は、実施例1に記載の方法と同一である。

【0136】

図1AおよびBは、DOX-マウス中に存続するIFN- γ レベルがクプリゾンの使用中止後でさえも増加し、IFN- γ の増加に伴ってMCH-1が持続的に増加したことを示す。8週目までに、DOX+マウスの脳梁中にかなりの数の乏突起膠細胞が認められた一方で、DOX-中の乏突起膠細胞の再生は抑制された(図2AおよびB)。DOX+二重トランスジェニックマウスの脳梁中の再髄鞘形成は6週目に開始され、クプリゾンが飼料から除去された2週間後に明らかであった(8週目;図3)。コントロールマウスDOX+では、8週目に多数の軸索が実質的に回復したのに対して(48.4% \pm 4%、図4)、DOX-マウスの脳梁中の再髄鞘形成は顕著に抑制されたままであり(8週目;図3)、それに伴って、再有髄軸索がより少なかった(26.9% \pm 7%、図4)。ミエリン遺伝子が再髄鞘形成過程に上方制御することを示したという前の所見と一致して、コントロールDOX+マウスの脳梁において、ミエリン遺伝子MBP、PLP、およびCGTは、6週目で上方制御され、8週目でピークレベルに到達した(図5)。しかし、DOX-マウスでは、同一のミエリン遺伝子の発現は、6週目および8週目の両方で有意に低下した。

20

30

【0137】

これらのデータは、脱髄病変中のIFN- γ の存在が再髄鞘形成を抑制することを示す。

【0138】

(実施例3: IFN- γ は、脱髄病変中のCC1陽性乏突起膠細胞の再増殖を減少させる)

再髄鞘形成は、病変部位での乏突起膠細胞前駆体(OPC)による脱髄病変の再増殖によって起こり、乏突起膠細胞前駆体は病変部位で乏突起膠細胞に分化する(Matsushima, et al. (2001) Brain Pathol. 11: 107-116; Mason, et al. (2000) J. Neurosci. Res. 61: 251-262)。CC1陽性乏突起膠細胞は、NG2陽性OPCに由来する(Watanabe et al. 1998; Mason et al. 2000)。したがって、病変の再増殖を、CC1および/またはNG2陽性細胞の存在によって評価することができる。

40

【0139】

乏突起膠細胞前駆体(OPC)による脱髄病変の再増殖に及ぼすIFN- γ の影響を、

50

実施例 2 のマウスにおいて、DOX + および DOX - マウスの脳梁由来の切片中で計数した CC 1 陽性成熟乏突起膠細胞および NG 2 陽性 OPC の数として評価した。再髄鞘形成中の乏突起膠細胞の分析のために使用した方法は、実施例 2 に記載の方法と同一である。OPC 中の NG 2 の免疫染色を、NG 2 抗体 (1 : 5 0 ; Chemicon) を使用して行った。

【 0 1 4 0 】

クプリゾン曝露から 6 週間後、CC 1 陽性乏突起膠細胞は、コントロール DOX + マウスの脱髄脳梁内に再出現し始め ($42.5 \pm 2.1 / 0.04 \text{ mm}^2$)、8 週目に $82.7 \pm 20.2 / 0.04 \text{ mm}^2$ に到達した。しかし、DOX - 二重トランスジェニック動物では、同一測定点 (8 週目) で脳梁内の CC 1 陽性乏突起膠細胞数が劇的に減少した ($78 \pm 12.7 / 0.04 \text{ mm}^2$)。クプリゾン処置の 4 週目に、IFN - γ が、DOX + 動物中の数と比較した場合、DOX - マウスの脳梁中の NG 2 陽性 OPC 数が有意に増加した (DOX - : 46 ± 4.24 対 DOX + : $19 \pm 2.12 / 0.04 \text{ mm}^2$; $p < 0.05$)。しかし、6 週目に、DOX - マウスは、DOX + マウスよりも NG 2 陽性 OPC が少なかった (DOX - : 31.5 ± 0.71 対 DOX + : $80 \pm 2.8 / 0.04 \text{ mm}^2$; $p < 0.05$)。7 週目および 8 週目までに、DOX - マウス中の NG 2 陽性 OPC 数は、DOX + マウスに匹敵するようになった (図 6)。

【 0 1 4 1 】

データは、CC 1 陽性乏突起膠細胞数の減少は IFN - γ の存在下での脱髄病変の不十分な再髄鞘形成に寄与すること、および動員された OPC 数に有意に影響を及ぼすことなく IFN - γ が病変部位への OPC の動員を遅延させることを示す。

【 0 1 4 2 】

(実施例 4 : IFN - γ は MS 動物モデルにおける再髄鞘形成を阻害する)

CNS への IFN - γ の送達を一過性に調節することが可能な二重トランスジェニックマウス (Lin et al. , J Neurosci 24 : 10074 - 10083 (2004)) を使用して、EAE の病理発生における IFN - γ の役割を評価した。GFAP / tTA ; TRE / IFN - γ 二重トランスジェニックマウスを実施例 1 に記載のように使用して、EAE に起因する脱髄に及ぼす IFN - γ の影響を決定した。全マウスに、計画日からドキシサイクリンを与えて IFN - γ 発現を抑制し、ミエリン乏突起膠細胞タンパク質 (MOG 35 - 55) で免疫化して EAE を誘導した。免疫化後 7 日目 (P I D 7) に、実験群のドキシサイクリンの使用を中止した (P I D 7 DOX -)。

【 0 1 4 3 】

実施例 1 に記載の ELISA 免疫アッセイを使用してコントロール (DOX +) および P I D 7 DOX - マウスにおける IFN - γ レベルを決定し、疾患の重症度を、臨床スコアの関数として評価した。臨床重症度スコアを、0 ~ 5 ポイントのスケール (0 = 健康、1 = 弛緩した尾、2 = 運動失調および / または後肢の不全麻痺、3 = 後肢の麻痺および / または前肢の不全麻痺、4 = 四肢の麻痺 (tetraparalysis)、および 5 = 瀕死または死亡) にしたがって記録した。

【 0 1 4 4 】

EAE を罹患した DOX + および DOX - 動物由来の脊髄を、MBP で免疫染色し、軸索の再髄鞘形成を評価した。DOX + および DOX - マウス由来の脊椎中の乏突起膠細胞数を、CC 1 陽性細胞数として決定した。軸索損傷を、非リン酸化神経フィラメント - H の免疫染色によって評価した。非リン酸化神経フィラメント - H に対する抗体は、1000 倍希釈した S M I 3 2 であり、Sternberger Monoclonals から入手した。

【 0 1 4 5 】

ELISA アッセイ由来の結果は、DOX + および DOX - マウス中の IFN - γ レベルが P I D 1 7 での疾患ピークで類似する ($60 \text{ pg} / \text{mg}$) ことを示した。P I D 5 0 では、IFN - γ レベルは、コントロール DOX + マウス ($6.22 \text{ pg} / \text{mg}$) よりも DOX - マウス ($40.24 \text{ pg} / \text{mg}$) で有意に高かった。

10

20

30

40

50

【0146】

PID17での平均最大臨床スコアは、DOX+およびDOX-PID17マウスで類似していた(それぞれ、DOX+ : 2.66 ± 0.80 および DOX- : 2.69 ± 0.69)。この時、25匹のコントロールマウスのうちの20匹および30匹のDOX-マウスのうちの24匹が、後肢麻痺を発症した。コントロールマウスは、21日目までにEAEから回復し始め、50日目までに(PID50)、コントロールDOX+マウスは、ナイーブマウスと識別不可能であった。しかし、PID50で、EAEに特徴的な後肢麻痺を発症したDOX-マウスの半分(12/24)は、コントロール群で回復が認められた時点で、麻痺を罹患したままであった(PID50)。コントロールDOX+マウスの臨床スコアがPID50で1未満に減少した一方で、DOX-マウスのスコアはほぼ2のままであった(図7)。

10

【0147】

PID7では、DOX-マウスの腰髄中のMBPレベルは、DOX+マウスと比較した場合、顕著に減少した(図8Aおよび8B)。トルイジンブルー染色は、DOX-マウス由来の多数の軸索が髄鞘形成しなかった一方で、DOX+マウス由来の軸索はほとんど髄鞘形成しなかったことを示した(図8Cおよび8D)。CC1陽性突起膠細胞数は、DOX-動物において、PID50で有意に減少した(図8Eおよび8F)。非リン酸化神経フィラメント-Hの免疫染色は、DOX+およびDOX-マウスで類似し、したがって、軸索損傷はIFN- に影響を受けないことを示した(図8Gおよび8H)。

20

【0148】

これらのデータは、IFN- がEAEからの回復を遅延させ、IFN- に起因する再髄鞘形成の失敗はDOX-マウスの不十分な回復に寄与したことを示す。

【0149】

(実施例5: IFN- は、EAE脱髄病変における炎症反応を増強する)

IFN- は、MHC抗原を誘導してマクロファージおよびTリンパ球を活性化することが知られている。T細胞およびマクロファージの決定ならびにMHC-1、TNF-a、IL-2、IL-12、およびIL-17の発現の測定によって再髄鞘形成中のCNSにおけるIFN- の炎症効果を研究した。実施例4に記載のように、EAEを罹患したDOX+およびDOX-マウス由来の組織において免疫組織化学を行った。実験手順は、上記実施例に記載の手順に従った。

30

【0150】

CD3 (CD3抗体 1:50; Santa Cruz, Santa Cruz, CA) およびCD11b (CD11b抗体 1:50, Chemicon, Tenecula, CA) の免疫染色は、IFN- がDOX+およびDOX-マウスの腰髄中の浸潤T細胞およびマクロファージ数を有意に増加させないことを示した(図9AおよびB)。リアルタイムPCR分析により、DOX+動物と比較した場合、DOX-マウスにおいてIFN- がMHC-1、TNF-a、IL-2、およびIL-12の発現を増加させ、IL-17の発現を減少させることが明らかとなった。IFN- は、iNOSおよびIL-23の発現を変化させなかった(図9E)。使用したプローブおよびプライマーは以下である: MHC-Iセンスプライマー:

40

【0151】

【化4】

ATTCCCCAAAGGCCCATGT

MHC-Iアンチセンスプライマー:

【0152】

【化4A】

GTCTCCACAAGCTCCATGTCC

MHC-Iプローブ:

【0153】

【化4B】

TGCTGGGCCCTGGGCTTCTACC; TNF- α センスプライマー:
 GGCAGGTTCTGTCCCTTTCA, TNF- α アンチセンスプライマー: ACCGCCTGGAGTTCTGGA, TNF- α プローブ:
 CCAAGGCCACATCTCCCT; IL-2センスプライマー: CTACAGCGGAAGCACAGCAG, IL-2アンチセンスプライマー:
 ATTTGAAGGTGAGCATCCTGGG; IL-2プローブ: AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA; IL-12センスプライマー:
 CTCTATGGTCAGCGTTCCAACA, IL-12アンチセンスプライマー: GGAGGTAGCGTGATTGACACAT, IL-12プローブ:
 CCTCACCCCTCGGCATCCAGCAGC; IL-17センスプライマー: ATGCTGTTGCTGCTGCTGAG, IL-17アンチセンスプライマー:
 TTTGGACACGCTGAGCTTTGAG, IL-17プローブ: CGCTGCTGCCTTCACTGTAGCCGC; IL-23センスプライマー:
 CTTCTCCGTTCCAAGATCCTTCG; IL-23アンチセンスプライマー: GGCACCTAAGGGCTCAGTCAGA, IL-23プローブ:
 TGCTGCTCCGTGGGCAAAGACCC; 誘導性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)センスプライマー:
 GCTGGGCTGTACAAACCTTCC, iNOSセンスプライマー: TTGAGGTCTAAAGGCTCCGG, iNOSプローブ:
 TGTCCGAAGCAAACATCACATTCAGATCC

10

これらのデータは、IFN- γ がEAEの回復段階で脱髄病変中の免疫応答を適度に増強し、それにより、このサイトカインによって誘発された再髄鞘形成不全に寄与することを示す。

【0154】

(実施例6: IFN- γ による再髄鞘形成の抑制はERストレスに関連する)

乏突起膠細胞は、タンパク質合成の破壊および分泌経路の混乱に高い感受性を示すことが示されている(Pfeiffer, et al. (1993) Trends Cell Biol. 3: 191-197; Southwood, et al. (2002) Neuron 36: 585-596; Leegwater, et al. (2001) Nat. Genet. 29: 383-388)。IFN- γ が再髄鞘形成乏突起膠細胞における小胞体(ER)機能を妨害するかどうかを決定するために、IFN- γ を発現するマウスの脳梁中のERストレスマーカーの発現をモニタリングした。実施例1に記載のトランスジェニックマウスを使用して研究を行った。

20

【0155】

実施例1のクプリゾン処置マウスの脳梁中のERストレス関連遺伝子結合免疫グロブリンタンパク質/78kDaグルコース調節タンパク質(BIP/GRP78)およびCAATエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質/成長およびDNA損傷タンパク質153(CHOP/GADD153)をコードするmRNAのレベルを、実施例1に記載のように、リアルタイムPCRを使用して決定した。使用したプローブ、センスプライマー、およびアンチセンスプライマーは、以下であった。

30

【0156】

【化5】

BIPセンスプライマー: ACTCCGGCGTGAGGTAGAAA;
 BIPアンチセンスプライマー: AGAGCGGAACAGGTCCATGT;
 BIPプローブ: TTCTCAGAGACCCTTACTCGGGCCAAATT;
 CHOPセンスプライマー: CCACCACACCTGAAAGCAGAA;
 CHOPアンチセンスプライマー: AGGTGCCCCCAATTTTCATCT;
 CHOPプローブ: TGAGTCCCTGCCTTTCACCTTGGAGA.

40

【0157】

eIF-2複合体上のヌクレオチド交換を阻害してほとんどのタンパク質合成を弱めるリン酸化eIF-2のレベルをウェスタンブロットによって分析し、上記のように、発現はCC1抗体の免疫染色によって共存した。ウェスタンブロット分析を、以下のように行った。3匹のマウス由来の脳梁を、氷冷リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)でリンスしてプールし、その直後に、電動ホモジナイザーを使用して、5倍体積のTriton X-

50

100 緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、10% グリセロール、1 mM EDTA、10 mM ピロリン酸四ナトリウム、100 mM NaF、17.5 mM -グリセロホスフェート、10 mM フェニルメチルスルホニルフッ化物、15 µg/ml アプロトニン、および 6 µg/ml ペプスタチン A) 中で均質化した。氷上で 15 分間のインキュベーション後、抽出物を、14,000 rpm でそれぞれ 30 分間の 2 回の遠心分離によって明澄化した。各抽出物のタンパク質含有量を、タンパク質アッセイ (Bio-Rad) によって決定した。抽出物 (40 µg) を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロースに移した。プロットを、一次抗体 (下記) とインキュベートし、シグナルを、西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合二次抗体との反応後の化学発光によって明らかにした。以下の一次抗体を使用した: 抗 eIF-2 ; (1:500; Santa Cruz, Santa Cruz, CA)、抗 p-eIF-2 (1:1000, Cell Signaling Technology)、抗 CHOP (1:500; Santa Cruz)、および抗アクチン (1:1000; Sigma, St Louis, MO)。

10

【0158】

ER ストレス応答に関連する BIP および CHOP の mRNA レベルは、コントロール DOX + 動物と比較して、DOX - 二重トランスジェニックマウスの脳梁中で約 2 倍に増加した (図 10A および 10B)。ウェスタンプロット分析によって、DOX - 二重トランスジェニックマウスの脳梁中で CHOP タンパク質レベルの増加 (約 1.7 倍) も認められた (図 10C)。ウェスタンプロット分析により、IFN- が同一の DOX - 動物の脳梁中のリン酸化 eIF-2 (p-eIF-2) レベルを約 1.8 倍に上昇させることも明らかとなった (図 10C)。さらに、CC1 抗体を使用した共存分析により、再髄鞘形成乏突起膠細胞の p-eIF-2 レベルが増加することが明らかとなった (図 10D および 図 10E)。

20

【0159】

これらの結果は、再髄鞘形成に及ぼす IFN- の有害な影響が ER ストレス経路の活性化に関連することを示す。

【0160】

(実施例 7: PEAK が IFN- によって誘導された再髄鞘形成の減少の重症度を調整する)

30

病変を再髄鞘形成するための IFN- に起因する減少における ER ストレス応答の関与を、腓膵 ER キナーゼ (PERK) の機能変異の喪失にヘテロ接合性を示し (Harding, et al., (2001) Mol Cell 7: 1153-1163)、CNS 中の IFN- の発現を一過性に調節するように作製されたトランスジェニックマウスで試験した。TRE/IFN- マウスを、最初に、C57BL/6 バックグラウンドの PERK + / - マウスと交配して (Harding, et al. (2001) Mol Cell 7: 1153-1163)、PERK 変異を有するマウスを作製し、得られた子孫を GFAP/tTA マウスと交配させて、PERK 変異にヘテロ接合性を示すトランスジェニックマウスを得た。IFN- の存在下または非存在下での再髄鞘形成に及ぼす PERK の影響を、再髄鞘形成病変中の乏突起膠細胞の髄鞘形成レベルおよび再髄鞘形成病変中に存在する乏突起膠細胞数の関数として評価した。

40

【0161】

前の実施例に記載のように、INF- (DOX - PERK + / + および DOX - PERK + / -) を発現するように作製された PERK + / + および PERK + / - マウスおよび IFN- の発現が抑制されたマウス (DOX + PERK + / + および DOX + PERK + / -) 中の再髄鞘形成範囲を評価した。電子顕微鏡法によって再髄鞘形成を試験し、全動物の脳梁中の CC1 陽性乏突起膠細胞数およびカスパーゼ - 3 発現レベルと比較した。カスパーゼ - 3 レベルを、カスパーゼ抗体 (活性カスパーゼ - 3 抗体 1:50; Cell Signaling Technology) を使用した免疫組織化学的方法によっ

50

て、実施例 1 に記載の方法にしたがって決定した。脱髄は、0.2% クプリゾンでのマウスの同時処理およびドキシサイクリンからの開放によって、ドキシサイクリンに対して維持された PERK + / - バックグラウンドの 6 週齢の GFAP / tTA ; TRE / IFN - 二重トランスジェニックマウス (DOX - PERK + / -) で誘導された。6 週目にクプリゾンを使用中止することによって再髄鞘形成が起こった。

【0162】

CC1 陽性乏突起膠細胞の免疫組織化学的分析および EM 分析により、PERK 機能の喪失がクプリゾン処置中の脱髄過程に影響を及ぼさないことが明らかとなった (データ示さず)。対照的に、クプリゾン曝露時にドキシサイクリンから開放された GFAP / tTA ; TRE / IFN - , PERK + / - マウス (DOX - PERK + / -) は、PERK + / + バックグラウンドの二重トランスジェニックマウス (DOX - PERK + / +) (54.0% ± 4.3% 対 31.1% ± 7.6% ; p < 0.01) よりも 9 週目 (クプリゾンが飼料から除去された 3 週間後) で再髄鞘形成が有意により少なくなった (15.6% ± 7.6%、図 11)。ドキシサイクリンが継続的に維持されたマウス (DOX + PERK + / - および DOX + PERK + / +) は、DOX - マウスよりも再髄鞘形成が有意に多かった (54%) (図 11)。

10

【0163】

DOX + PERK + / + 動物 (283.2 ± 27.7 / 0.04 mm² ; p < 0.01 ; 図 12 A および B) よりも DOX - PERK + / + マウスで有意に少なかった (123.2 ± 27.5 / 0.04 mm²) CC1 陽性乏突起膠細胞数およびほんのわずかな乏突起膠細胞が、DOX - PERK + / - マウスの脳梁で検出された (図 12 A および B)。さらに、DOX - PERK + / - マウスにおけるカスパーゼ - 3 について陽性染色された乏突起膠細胞数は、DOX - PERK + / + マウスの 2.3 倍であった (図 12 C)。

20

【0164】

これらのデータは、ER ストレス応答が IFN - によって誘発された再髄鞘形成の失敗および乏突起膠細胞数の減少に関連し、PERK が ER ストレス中の再髄鞘形成に不可欠であることを示す。

【0165】

(実施例 8 : IFN - によって誘導された乏突起膠細胞のアポトーシスは *in vitro* での ER ストレスに関連する)

30

IFN - によって誘導された乏突起膠細胞のアポトーシスが ER ストレスに影響を及ぼすかどうかを試験するために (形態学に及ぼす影響)、アポトーシス度および ER マーカーの発現を、乏突起膠細胞前駆細胞 (OPC) 培養物において研究した。乏突起膠細胞前駆体を、新生ラット脳から培養した (Baerwald, et al. (1998) J. Neurosci. Res. 52 : 230 - 239)。混合グリア培養物を、フラスコ中の 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む培地中で成長させ、星状細胞層がコンフルエントになった場合 (10 ~ 14 日目)、オービタルシャーを使用して、乏突起膠細胞前駆体を星状細胞および小グリアから分離した。その 95% を超える細胞が A2B5 陽性、GFAP 陰性、および CD11b 陰性である細胞を、PDGF (10 ng / ml) および FGF (5 ng / ml) (共に R & D Systems, Minneapolis, MN) も含む 0.5% FBS 含有培地中で培養した。次いで、細胞を、分化のために PDGF および FGF を含まない 0.5% FBS 培地に変更した。分化培地中で 5 日後に、約 40% の細胞が ミエリンタンパク質 2'3' - 環状ヌクレオチド 3' - ホスホジエステラーゼ (CNP) に陽性であった。70 U / ml 組換えラット IFN - (Calbiochem, La Jolla, CA) を、5 日間分化させた細胞に添加した。分化培地中で 5 日後に、約 40% の細胞が CNP 陽性であった。70 U / ml の組換え IFN - (Calbiochem) を、5 日間分化させた細胞に添加した。一般的な ER ストレス誘導剤に対する乏突起膠細胞応答を試験するために、5 日間または 7 日間分化培地で培養した前駆細胞を、2 μg / ml の ツニカマイシン (Sigma Aldrich) で 6 時間処置した。

40

50

【0166】

OPC細胞のアポトーシスレベルを、製造者の説明書に従ってApopTagキット(Serologicals Corp., Norcross, CA)を使用したCNP(1:200; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD)およびTUNELの二重染色によって決定した。アポトーシスを、製造者の説明書にしたがって蛍光測定カスパーゼ3アッセイキット(Sigma, St. Louis, MO)を使用した乏突起膠細胞溶解物中のカスパーゼ-3活性の測定によっても評価した。

【0167】

IFN- γ がER機能に影響を及ぼすかどうかを決定するために、ERマーカー結合免疫グロブリンタンパク質(BIP)、CAATエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質(CHOP)、およびカスパーゼ12のRNA発現を、リアルタイムPCRを使用して決定した。RNAを、トリアゾール試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して培養培地およびマウス脳から単離し、DNAアーゼI(Invitrogen)で処置して、ゲノムDNAを消失させた。Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCRキット(Invitrogen)を使用して逆転写を行った。リアルタイムPCRを、iQ Supermix(Bio-Rad, Hercules CA)を使用して、Bio-Rad iQリアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad)にて行った。リアルタイムPCR用のプライマーおよびプローブ(Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA)を以下に示した:

【0168】

【化6】

マウスCHOPセンスプライマー: CCACCACACCTGAAAGCAGAA; マウスCHOPアンチセンスプライマー:
AGGTGCCCCCAATTTTCATCT; CHOPプローブ: TGAGTCCCTGCCTTTTCACCTTGGAGA; マウスBIPセンスプライマー:
ACTCCGGCGTGAGGTAGAAA; マウスBIPアンチセンスプライマー: AGAGCGGAACAGGTCCATGT;
BIPプローブ: TTCTCAGAGACCCTTACTCGGGCCAAATT;
マウスカスパーゼ12センスプライマー: ATGCTGACAGCTCCTCATGGA; およびマウスカスパーゼアンチセンスプライマー
TGAGAGCCAGACGTGTTTCGT

【0169】

リン酸化eIF-2 およびカスパーゼ12タンパク質レベルに及ぼすIFN- γ の影響を決定するために、以下のプロトコールに従って以下の抗体を使用してウェスタンブロット分析を行った: 抗-eIF-2 (1:500; Santa Cruz)、抗-p-eIF-2 (1:1000, Cell signaling Technology)、抗カスパーゼ-12 (1:500; Santa Cruz)、および抗アクチン(1:1000; Sigma, St. Louis, MO)。組織または培養細胞を、氷冷リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)でリンスし、その直後に、電動ホモジナイザーを使用して、5倍体積のTriton X-100緩衝液(20mM HEPES (pH 7.5)、150mM NaCl、1% Triton X-100、10%グリセロール、1mM EDTA、10mMピロリン酸四ナトリウム、100mM NaF、17.5mM -グリセロホスフェート、10mMフェニルメチルスルホニルフッ化物、15 μ g/mlアプロトニン、および6 μ g/mlペプスタチンA)中で均質化した。氷上で15分間のインキュベーション後、抽出物を、14,000rpmでそれぞれ30分間の2回の遠心分離によって明澄化した。各抽出物のタンパク質含有量を、タンパク質アッセイ(Bio-Rad)によって決定した。抽出物(40 μ g)を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロースに移した。プロットを、一次抗体(下記)とインキュベートし、シグナルを、西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合二次抗体との反応後の化学発光によって明らかにした。

【0170】

精製乏突起膠細胞前駆細胞（OPC）を、合成培地で5日間分化させ、その時点で約40%の細胞がミエリンタンパク質2'3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ（CNP）を発現し、分岐突起（branched process）を伸張した（図13Aおよび13C）。これらの細胞は、より成熟した乏突起膠細胞培養物の特徴である平膜シート（flat membrane sheet）に伸張しなかった。70 U/ml IFN- γ で48時間処置した場合、これらの細胞は、異常な形態学的変化（細胞の縮みおよび細胞体の凝集ならびにその後の培養プレートからの剥離が含まれる）を示した（図13Aおよび13B）。末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ（TdT）dUTPニック末端標識（TUNEL）およびCNP二重標識により、IFN- γ が相当

10

【0171】

IFN- γ がER機能を妨害するかどうかを決定するために、ERストレスマーカーの発現を、サイトカイン処置乏突起膠細胞培養物中でモニタリングした。結合免疫グロブリンタンパク質//78 kDa グルコース調節タンパク質（BIP/GRP78）およびCAATエンハンサー結合タンパク質相同タンパク質/成長およびDNA損傷タンパク質153（CHOP/GADD153）（共にERストレス応答に関連する）をコードするmRNAのレベルは、IFN- γ 曝露後の乏突起膠細胞で約2~3倍に増加した。eIF-2複合体上のヌクレオチド交換が阻害されてほとんどのタンパク質合成が弱めるeIF-2のリン酸化は、ERストレスの発生から数分以内に起こる（Ron, 2002）。ウェスタンブロット分析により、IFN- γ が乏突起膠細胞培養物中のリン酸化eIF-2（p-eIF-2）レベルを上昇させることが明らかとなった（図13H）。カスパーゼ-12（ER局在化カスパーゼ）はERストレスによって活性化され、カスパーゼ-3を切断することができる（Nakagawa, et al. (2000) Nature 403: 98-103; Lamkanfi, et al. (2004) Cell Death Differ. 11: 365-368）。IFN- γ での乏突起膠細胞の処置後にカスパーゼ-12の誘導が認められた（図13G）。さらに、カスパーゼ-12の活性フラグメントレベルは、IFN- γ 処置の48時間後に強く上昇した（図13H）。これらの結果は、培養乏突起膠細胞におけるIFN- γ 誘導性アポトーシスがERストレス経路の活性化に関連することを示す。

20

30

【0172】

合成培地中で5日間分化させた精製乏突起膠細胞前駆細胞（OPC）の40%が、ミエリンタンパク質2'3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ（CNP）を発現し、分岐突起を伸張した（図13Aおよび13C）。これらの細胞は、より成熟した乏突起膠細胞培養物の特徴である平膜シートに伸張しなかった。70 U/ml IFN- γ で48時間処置した場合、これらの細胞は、異常な形態学的変化（細胞の縮みおよび細胞体の凝集ならびにその後の培養プレートからの剥離が含まれる）を示した（図13Aおよび13B）。末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ（TdT）dUTPニック末端標識（TUNEL）およびCNP二重標識により、IFN- γ が相当な数の乏突起膠細胞でアポトーシスを誘導したことが明らかとなった（図13C、13D、および13E）。さらに、IFN- γ 処置乏突起膠細胞の細胞溶解物中のカスパーゼ-3活性は顕著に増加した（図13F）。

40

【0173】

これらのデータは、IFN- γ がミエリン成分を能動的に合成する乏突起膠細胞のアポトーシスを誘導することができることを示す。

【0174】

IFN- γ がER機能を妨害するかどうかを決定するために、ERストレスマーカーの

50

発現を、サイトカイン処置乏突起膠細胞培養物中でモニタリングした。結合免疫グロブリンタンパク質 / 78 KDa グルコース調節タンパク質 (BIP / GRP78) および CAAT エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 / 成長および DNA 損傷タンパク質 153 (CHOP / GADD153) (共に ER ストレス応答に関連する) をコードする mRNA のレベルは、IFN- γ 曝露後の乏突起膠細胞で約 2 ~ 3 倍に増加した (図 13 G)。eIF-2 複合体上のヌクレオチド交換が阻害されてほとんどのタンパク質合成を弱める eIF-2 のリン酸化は、ER ストレスの発生から数分以内に起こる (Ron, 2002)。ウェスタンブロット分析により、IFN- γ が乏突起膠細胞培養物中のリン酸化 eIF-2 (p-eIF-2) レベルを上昇させることが明らかとなった (図 13 H)。カスパーゼ-12 (ER 局在化カスパーゼ) は ER ストレスによって活性化され、カスパーゼ-3 を切断することができる (Nakagawa, et al. (2000) Nature 403: 98-103; Lamkanfi, et al. (2004) Cell Death Differ. 11: 365-368)。IFN- γ での乏突起膠細胞の処置後にカスパーゼ-12 の誘導が認められた (図 13 G)。さらに、カスパーゼ-12 の活性フラグメントレベルは、IFN- γ 処置の 48 時間後に強く上昇した (図 13 H)。

10

【0175】

これらの結果は、培養乏突起膠細胞における IFN- γ 誘導性アポトーシスが ER ストレス経路の活性化に関連することを示す。

20

【0176】

(実施例 9: IFN- γ の異所性発現によって誘導された髄鞘低形成は ER ストレスに関連する)

マウス発達中の乏突起膠細胞の髄鞘形成に及ぼす IFN- γ の影響を研究するために、テトラサイクリン (tet) 調節系 (Lin, et al. (2004) J. Neurosci. 24: 10074-10083) を使用した CNS への IFN- γ 送達を一過性に調節したトランスジェニックマウスを作製した。星状細胞中で tTA 発現を駆動するために、グリア線維酸性遺伝子 (GFAP) 遺伝子の転写調節領域を選択した (Brenner, et al. (1994) J. Neurosci. 14: 1030-1037)。GFAP / tTA マウスを TRE / IFN- γ マウスと交配させて、両方の導入遺伝子にヘミ接合性を示す動物を産生した。これらのマウスをドキシサイクリンに対して維持する場合 (DOX+)、IFN- γ 導入遺伝子の発現は抑制される (図 10 A)。二重トランスジェニックマウスをドキシサイクリンから開放した場合 (DOX-)、IFN- γ が発現する。これらの実験の目的のために、発生後 14 日目 (E14) までにドキシサイクリンをマウスに投与し、この時点で、実験動物 (DOX-) にドキシサイクリンを投与するのを停止する一方で、コントロール動物 (DOX+) に薬物を継続的に与えた。IFN- γ の mRNA は、生後 10 日目の早さで DOX- マウスにおいて検出することができる (データ示さず)。

30

【0177】

リアルタイム PCR を行い、IFN- γ 、MHC-1、BIP、CHOP、およびカスパーゼ 12 の発現レベルを決定した。BIP、CHOP、およびカスパーゼ 12 の PCR 反応のためのプライマーを、実施例 1 に示す。IFN- γ のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、それぞれ、

40

【0178】

【化 7】

GATATCTCGAGGAACTGGCAAAA および
CTTCAAAGAGTCTGAGGTAGAAAGAGATAAT

であり、MHC-1 のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、

【0179】

【化 8】

MHC-Iセンスプライマー: ATTCCCCAAAGGCCCATGT; およびMHC-IIアンチセンスプライマー
GTCTCCACAAGCTCCATGTCC.

であった。

【0180】

実施例6に記載のように、ウェスタンブロット分析を14日齢のマウスのCNSに対して行い、カスパーゼ-12の発現を決定した。

【0181】

以下の通りに免疫組織化学的方法を使用して、脳および脊髄組織を分析した。麻酔したマウスを、左心室を介して4%パラホルムアルデヒドを含む0.1M PBSを灌流した。半矢状(half-sagittal)脳および経頸的脊髄を取り出し、パラホルムアルデヒドで後固定し、30%スクロース中で低温保存し、OCT中に包埋し、凍結乾燥させた。凍結切片を、クリオスタット中で厚さ10 μ mに切断した。シドマン切片241~251に対応する脳梁の脳弓領域の冠状断面を、使用するために選択し、全ての比較分析を、正中脳梁に制限した(Sidman, et al. (1971) Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord (Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts)。免疫組織化学のために、凍結切片を、-20 アセトンで処理し、10%NGSおよび0.1% Triton X-100を含むPBSでブロッキングし、ブロッキング液で希釈した一次抗体と共に一晩インキュベートした。適切な蛍光色素または酵素で標識した二次抗体(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を、検出のために使用した。CC1に対する抗体(APC7, 1:50; EMD Bioscience, Inc., La Jolla, CA)を、成熟乏突起膠細胞のマーカーとして使用した。MBPに対する抗体(1:1000; Sternberger Monoclonals, Lutherville, MA)を使用して、髄鞘形成度を検証した。活性カスパーゼ-3に対する抗体(1:50, Cell signaling Technology, Beverly, MA)を、アポトーシス細胞のマーカーとして使用した。蛍光染色切片を、DAPI(Vector Laboratories)を含むVectashieldマウント培地を使用してマウントし、Zeiss Axioplan蛍光顕微鏡を使用して視覚化した。Open Labソフトウェアスイートを、Apple Macintoshコンピュータに接続したPhotometries PXL CCDカメラを使用して画像を収集した。免疫陽性細胞を、0.04mm²の領域に限定された正中脳梁内の陽性細胞の計数によって定量した。DAPI染色によって認められる核を有する細胞のみを計数した。各MBP免疫染色スライドを、0から4のスケールで記録した。スコア0は、成体マウスの脳梁中の完全な脱髄を示し、スコア4は正常な髄鞘形成を示す。

【0182】

リアルタイムPCR分析は、生後(PND)14日目のCNS中のIFN- γ および主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI(IFN- γ 活性の下流標的)が健全なレベルで発現したことを示した(図14A)。発達中にCNS中にIFN- γ を異所的に発現する二重トランスジェニックマウス(DOX-)は軽度に髄鞘低形成し(図16および17を参照のこと)、これは、乏突起膠細胞中でIFN- γ を構成性に発現するために以前に作製されたトランスジェニックマウスで認められた所見と一致する(Corbin, et al. (1996) Mol. Cell. Neurosci. 7:354-370)。これらのマウスで認められた髄鞘形成の減少は、IFN- γ 誘導性乏突起膠細胞アポトーシスと相関する(図19Aおよび19Fを参照のこと)。IFN- γ は、コントロールレベルの約1.6倍および2倍にBIPおよびCHOP発現を上方制御し、これらの動物のCNS中のカスパーゼ-12発現を強く増強した(図14A)。より顕著には、カスパーゼ-12の活性フラグメントレベルも、これらの動物のCNS中で増加した(図14B)

。さらに、CC1抗体を使用した共存分析により、乏突起膠細胞がBIP(図14Cおよび14D)、p-eIF-2(図14Eおよび14F)、およびカスパーゼ-12(図14Gおよび14H)の発現を増加させることが明らかとなった。

【0183】

これらのデータは、ERストレスと、IFN-誘導性乏突起膠細胞アポトーシスと、発達中の髄鞘低形成との間の関連性を支持する。

【0184】

(実施例10:IFN-の条件付き誤発現に対するPERK+/-マウスの過敏性) IFN-によって誘導されたERストレス応答の関与を試験するために、膵臓ERキナーゼ(PERK)の変異機能の喪失にヘテロ接合性を示すトランスジェニックマウスを使用してPERK酵素の関与を評価した(Harding, et al. (2001) Mol. Cell 7:1153-1163)。PERK+/-マウス中のp-eIF-2レベルの関数を実験したため、導入遺伝子動物の表現型を分析した。

10

【0185】

実施例1に記載のGFAP/tTAおよびTRE/IFN-二重トランスジェニックマウスを、PERK+/-マウスと交配し、得られた子孫を交雑受精させて、PERK変異にホモ接合性またはヘテロ接合性を示す二重トランスジェニックマウスを得た。PERK-/-バックグラウンドを有する二重トランスジェニックマウスの大部分は、全期間にわたってドキシサイクリンを投与されているかどうか、または胚齢14日目(E14)にドキシサイクリンを水と交換したかどうかと無関係に生後12日以内に死亡した。PERK+/-バックグラウンドの二重トランスジェニックGFAP/tTA;TRE/IFN-マウスは、E14でドキシサイクリンから開放される(E14 DOX-PERK+/-)、予想されるミノル振戦および運動失調を示したが、良好に生存した。対照的に、PERK+/-バックグラウンドの二重トランスジェニックマウス(E14 DOX-PERK+/-)は、さらにより重篤な表現型を有していた。これらの動物は、GFAP/tTAおよびTRE/IFN-対立遺伝子の組み合わせを受け継がなかったIFN-発現PERK+/-同腹仔またはPERK+/-動物よりもかなり小さく、重篤な振戦および運動失調を示さず、強直発作を経験したこれらのマウスの約2/3であった。顕著には、E14でドキシサイクリンから開放されたPERK+/-バックグラウンドの二重トランスジェニックマウスの90%超が生後(PDN)27日までに死亡したのに対して、野生型バックグラウンドの二重トランスジェニックマウスは、正常に生存した(図15)。

20

30

【0186】

マウスの表現型の重症度(severity)を決定づけるリン酸化eIF-2(p-eIF-2)を評価した。PERK+/-マウス由来の乏突起膠細胞中のp-eIF-2レベルは、PERK+/-マウスで測定されるレベルと比較した場合に有により高かったのに対して(図14EおよびF)、PERK+/-マウスのCNSでは小さなp-eIF-2の増加が認められた(図15BおよびC)。pERK中の機能変異の喪失は、BIP、CHOP、およびカスパーゼ-12のRNAレベルに有意な影響を及ぼさなかった(図15D)。

40

【0187】

これらの結果により、IFN-に反応してp-eIF-2レベルを上昇させる能力の低下はPERK+/-バックグラウンドのIFN-を発現するマウスにおける重篤な表現型に寄与する。

【0188】

(実施例11:IFN-誤発現はPERK+/-バックグラウンドで重篤な髄鞘低形成を引き起こす)

CNS中にIFN-を発現するPERK+/-マウスによって示される強直発作を伴う振戦表現型(実施例3に記載)は、ミエリン変態が示唆される。PERK+/-マウスにおける髄鞘形成レベルを評価するために、髄鞘形成状態を、MBPの免疫染色によって

50

評価し、この評価を、E14でドキシサイクリンから開放された14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスにおいて行い、野生型バックグラウンドの二重トランスジェニックマウスと比較した(図16)。ミエリン塩基性タンパク質(MBP)についての免疫染色は、野生型バックグラウンドの二重トランスジェニックマウスと比較して、E14でドキシサイクリンから開放された14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ , PERK+/-マウスのCNS中で顕著に減少した(図16)。さらに、超微細構造試験により、CNS中にIFN- γ を発現するPERK+/-マウスの脊髄中の軸索の大部分(81% \pm 14.9%)が髄鞘を形成しなかったことが明らかとなった(図17)。対照的に、E14でドキシサイクリンから開放された野生型バックグラウンドの二重トランスジェニック動物は、非有髄軸索が顕著により少なかったのに対して(30% \pm 12.9%)、IFN- γ 発現を抑制するためにドキシサイクリンに対して継続的に維持した動物は、非有髄軸索がさらにより少なかった(9.8% \pm 6.1%)。

10

【0189】

これらのデータは、PERK+/-バックグラウンドのIFN- γ によって誘導された重症振戦表現型と髄鞘低形成との間の相関を確立する。

【0190】

(実施例12: PERK+/-マウスにおけるIFN- γ 誤発現後の乏突起膠細胞の喪失)

CNS中にIFN- γ を発現するPERK+/-マウスによって示される髄鞘低形成を説明する細胞機構を洞察するために、これらの動物における乏突起膠細胞機能の状帯を試験した。本発明者らは、ミエリンマーカであるMBP、PLP、およびセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)をコードするmRNAの定常状態のレベルを決定した。リアルタイムPCR分析は、E14でドキシサイクリンから開放された野生型バックグラウンドの14日齢の二重トランスジェニックマウスの脳内のMBP、PLP、およびCGTのmRNAレベルが正常よりわずかに低いことを示した。E14でドキシサイクリンから開放されたGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスのCNS中のこれらのmRNAレベルはさらに低かった(図18)。ミエリンタンパク質コードmRNAの定常状態レベルの減少が髄鞘形成細胞数の減少に起因するかどうかを決定するために、本発明者らはこれらのマウス中の乏突起膠細胞数を決定した。コントロールマウスと比較して、E14でドキシサイクリンから開放された野生型バックグラウンドの14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ トランスジェニックマウスにおけるCC1免疫染色によって同定された乏突起膠細胞がわずかにより少なかった(図19A)。対照的に、PERK+/-バックグラウンドのIFN- γ 発現トランスジェニックマウスの脳梁および小脳中で非常に少数の乏突起膠細胞しか検出することができず、これらのマウスの脊髄中の乏突起膠細胞数は、50%を超えて減少した(図19A)。

20

30

【0191】

さらに、これらのマウスの頸髄中でTUNEL陽性を示した乏突起膠細胞数は、E14でドキシサイクリンから開放された後の野生型バックグラウンドの二重トランスジェニックマウス中のこのような細胞の数よりも2.5倍多かった(図19B、19C、19D、19E、および19F)。さらに、超微細構造試験は、アポトーシス乏突起膠細胞が高度に凝縮されたクロマチン塊、インタクトな膜、縮んだ細胞質、およびアポトーシス体を含んでいたことを示した(図19G)。これらのデータは、IFN- γ がERストレス経路によって乏突起膠細胞を損傷するという仮説を補足し、PERKがIFN- γ 誘導性ERストレスの有害な結果からの乏突起膠細胞の防御で極めて重要な役割を果たすことを示す。

40

【0192】

(実施例13: 成体動物中の乏突起膠細胞は、幼若動物由来の能動的に髄鞘形成する乏突起膠細胞よりもIFN- γ に対する感受性が低い)

幼若な成長中の動物の能動的に髄鞘形成する乏突起膠細胞と比較して、成体マウス中の乏突起膠細胞は、ミエリン構造におけるホメオスタシスの維持に過不足のないより低いレ

50

ベルの膜タンパク質および脂質を産生する (Morell, et al. (1999) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects (Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers): 69-93)。したがって、成体動物中の乏突起膠細胞の ER は、増加したタンパク質負荷を処理するためのより簡素な能力を有し得、そのようなものとして、タンパク質分泌経路の破壊により小さな感受性を示し得る。この可能性を試験するために、二重トランスジェニックマウスを成熟するまで成長させ、その時点で、CNS 中の IFN- γ 発現が開始された。リアルタイム PCR 分析は、4 週目でドキシサイクリンから開放された二重トランスジェニック動物が約 6 週齢で IFN- γ を発現し始め、CNS 中の IFN- γ mRNA およびタンパク質レベルが E14 でドキシサイクリンから開放された成長中のマウスのレベルに匹敵することを示した (データ示さず)。IFN- γ は、成体マウス、PERK+/ - バックグラウンドのマウスにおいてさえも乏突起膠細胞の生存に影響を及ぼさなかった (図 20B、20C、20D、および 20E)。さらに、超微細構造試験により、4 週齢でドキシサイクリンから開放された野生型または PERK+/ - バックグラウンドの 10 週齢の二重トランスジェニックマウスの CNS 中の正常なミエリンが明らかとなった (図 20F、20G、20H、および 20I)。IFN- γ による BIP および CHOP の小さな誘導は、4 週齢でドキシサイクリンから開放された 10 週齢の二重トランスジェニックマウスの小脳中で認められた (図 20A)。それにもかかわらず、共存分析は、成熟乏突起膠細胞が BIP 発現を有意に増加させないことを示した (図 20B、20C、20D、および 20E)。

10

20

【0193】

したがって、データは、成体動物由来の乏突起膠細胞が成長中の幼若マウスの能動的に髄鞘形成する乏突起膠細胞よりも IFN- γ の存在に対する感受性が低いことを示す。

【0194】

(実施例 14: EAE 発症時の IFN- γ の投与によって疾患の重症度が弱められる)
CNS への IFN- γ の送達を一過性に調節することが可能な二重トランスジェニックマウス (Lin et al., J Neurosci 24: 10074-10083 (2004)) を使用して、EAE の病理発生における IFN- γ の役割を評価した。GFAP/tTA; TRE/IFN- γ 二重トランスジェニックマウスを上記実施例に記載のように使用して、EAE に起因する脱髄に及ぼす IFN- γ の影響を決定した。全マウスに、計画日からドキシサイクリンを与えて IFN- γ 発現を抑制し、実験群をその後に MOG35-55 ペプチドで免疫化して EAE の発症を誘導した。EAE の誘導のために、マウスの脇腹および尾の根元 (tail base) に、600 μ g の結核菌 (H37Ra 株; Difco) を補足した完全フロイントアジュバント (Difco) 中に乳化した 200 μ g の MOG 35-55 ペプチドを皮下注射した。400 ng の百日咳毒素 (List Biological Laboratories) の 2 回の腹腔内注射を、24 時間後および 72 時間後に行った。臨床スコア (0 = 健康、1 = 弛緩した尾、2 = 運動失調および / または後肢の不全麻痺、3 = 後肢の麻痺および / または前肢の不全麻痺、4 = 四肢の麻痺、および 5 = 瀕死または死亡) を毎日記録した。コントロール動物に継続的にドキシサイクリンを与えた一方で (DOX + 二重マウス)、実験動物 (DOX - 二重マウス) の抗生物質異を枯渇させて IFN- γ を発現させた。IFN- γ の影響を以下のようにモニタリングした。

30

40

【0195】

疾患の発症は、DOX - および DOX + 二重動物の両方において 14 日目で明らかであり、その時点で (PID14; 免疫化後 14 日目) 臨床スコアに有意差は認められなかった。しかし、DOX - 二重マウスは、DOX + 二重マウスよりも有意に軽度の疾患を発症し、DOX - 群の 25 匹の動物のうち 2 匹のみが後肢麻痺を示す一方で、DOX + 二重マウスの有意により大きな部分 (20/25) は、肢麻痺を発症した (図 21 (a) および表 1)。

【0196】

50

【化9】

表1
EAE発症時のCNSへのIFN- γ の送達は疾患の重症度を弱める

	発症日 (PID:免疫後日数)	最大臨床スコアの平均 (平均 \pm SD)	後肢麻痺の発生率	死亡率
DOX+二重マウス	13.6 \pm 1.2	2.66 \pm 0.80	20/25	0/25
DOX+三重マウス	14.0 \pm 0.9	2.67 \pm 0.94	19/25	2/25
DOX-二重マウス	14.7 \pm 1.4	1.63 \pm 0.51*	2/25	0/25
DOX-三重マウス	13.6 \pm 0.8	2.71 \pm 1.11	18/25	3/25

*p,0.001, n=25. 臨床的重症度スコアを、0~5ポイントのスケール(0=健康、1=弛緩した尾、2=運動失調および/または後肢の不全麻痺、3=後肢の麻痺および/または前肢の不全麻痺、4=四肢の麻痺、および5=瀕死または死亡)にしたがって毎日記録した。

10

リアルタイムPCR分析を行って、DOX-およびDOX+動物の脊髄中のIFN- γ の発現レベルを評価した。麻酔したマウスを、PBSで灌流した。Trizol試薬(Invitrogen)を使用して脊髄からRNAを単離し、DNaseI(Invitrogen)で処置してゲノムDNAを消失させた。Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCRキット(Invitrogen)を使用して逆転写を行った。TaqmanリアルタイムPCRを、以前に記載のように、iQ supermix(Bio-Rad)を使用して、Bio-Rad iQリアルタイムPCR検出システムにて行った^{1,2}。図21(b)は、DOX-動物の脊髄中のIFN- γ レベルがEAE発症時(PID14)に検出できるようになり、疾患のピーク時(PID17)にピークに到達し、その後の疾患の回復期(PID22)に減少した。

20

【0197】

DOX-動物の脊髄中のIFN- γ mRNAレベルは、PID14、PID17、およびPID22のすべての時点でDOX+マウスより有意に高かった(図21b)。さらに、トランスジェニックIFN- γ を、PID14の早さでDOX-二重マウスの脊髄で検出することができる(図21c)。したがって、これらのデータは、EAE発症時のCNSへのIFN- γ の送達によって疾患の重症度の進行を有意に弱めることを示す。

30

【0198】

PID14でのDOX-およびDOX+動物の脊髄中の種々のサイトカインの発現のリアルタイムPCR分析は、IFN- γ はiNOS、TNF- α 、IL-2、IL-12、およびIL-10の発現を増加させるが、IL-2およびIL-5の発現に影響を及ぼさなかったことを示した(図22)。

【0199】

EAEに起因する脱髄に及ぼすIFN- γ の影響の組織病理学的評価を、疾患のピーク時(PID17)のDOX+およびDOX-動物の脊髄に対して行った。DOX-動物の脊髄は、髄鞘の破壊、軸索損傷、乏突起膠細胞喪失(図23A、23B、および23C)、血管周囲炎(図24Aおよび24B)を示し、これらは、EAEに典型的な組織病理学的特徴である。対照的に、DOX-動物の腰髄由来のミエリン、軸索、および乏突起膠細胞はほとんどインタクトなままであり(図23A、23B、および23C)、CD3陽性T細胞浸潤はDOX+動物で認められるものよりも低かった(図24A)。さらに、DOX-二重マウスの脊髄中のミエリン塩基性タンパク質(MBP)のmRNAレベルは、リアルタイムPCRによって評価したところ、年齢適合ナイーブマウス中のMBP mRNAレベルと比較した場合、MBP mRNAはEAEによって有意に減少しないことが明らかとなった。しかし、MBP mRNAレベルは、DOX+二重マウスにおいて30%減少した(図23D)。

40

【0200】

したがって、これらのデータは、CNSへのIFN- γ の送達により、EAE誘導性脱

50

髄から防御されることを示す。

【0201】

(実施例15: EAE発症時のIFN- γ の投与は、細胞防御機構によってその抗炎症性とは無関係に脱髄から乏突起膠細胞を防御する)

EAE病理発生中、T細胞が末梢神経系で刺激され、臨床的疾患発症の十分に以前にCNSに入る(Hickey et al., (1991) J Neurosci Res 28: 254-260)。EAEの脱髄の影響からのCNSの防御におけるIFN- γ の影響がIFN- γ の抗炎症活性に起因するかどうかを決定するために、T細胞および単球の浸潤レベルを評価し、既知の炎症性サイトカインの発現を評価した。

【0202】

図24Cおよび24Dに示す結果は、IFN- γ がCD3陽性T細胞浸潤に有意に影響を及ぼさないが、EAE発症時の脊髄中のCD11b陽性単球浸潤は増加させたことを示す(図24Eおよび24F)。重要には、リアルタイムPCR分析は、CNSへのIFN- γ の送達によって、EAE発症時の脊髄中の誘導性一酸化窒素シンターゼ(iNOS)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン-2(IL-2)、IL-12、およびIL-10の発現が増強されるが(図22)、疾患ピーク時にiNOSやTNF- α の発現に有意に影響を及ぼさなかった(図25)。さらに、IFN- γ のCNS送達は、疾患ピーク時のCD11b陽性単球浸潤を変化させなかった(図24B)。

【0203】

これらのデータにより、IFN- γ がその抗炎症性によってEAE誘導性脱髄を防御する(一部の研究者によって提案されている仮説)ことはありそうにないと示唆される(Muhl et al., Int. Immunopharmacol 3: 1247-1255 (2005))。

【0204】

乏突起膠細胞の死滅は、EAE病変中の炎症性浸潤を調整することが示されている(Hisahara et al., EMBO J 19: 341-348 (2000); Hisahara et al., (2001) J Exp Med 193: 111-122)。IFN- γ はEAEの発症時に炎症反応を促進し、その後の病期での乏突起膠細胞の死滅に及ぼすIFN- γ の阻害効果がT細胞浸潤の減少を説明することができる可能性がある。本発明者らの以前の所見は、MBP遺伝子の調節下でIFN- γ を発現するトランスジェニックマウスはクプリゾンによって誘導された乏突起膠細胞アポトーシスおよび脱髄に耐性を示すことを示している(Gao et al., (2000) Mol Cell Neurosci 16: 338-349)。クプリゾンによって損傷を受けた乏突起膠細胞がアポトーシスを経験し(Matsushima and Morell (2001) Brain Pathol 11: 107-116)、その直後に小グリアの動員およびミエリンの食作用が起こる。クプリゾン動物モデルでは、脱髄乏突起膠細胞アポトーシスがT細胞や血液脳関門の破壊と関与しないことが知られている。

【0205】

したがって、これらのデータにより、IFN- γ が細胞防御効果によって脱髄から乏突起膠細胞を防御することが示唆される。

【0206】

(実施例16: EAE発症時のIFN- γ の投与は、PERK経路の活性化によって脱髄から乏突起膠細胞を防御する)

脱髄および乏突起膠細胞の喪失は、多発性硬化症(MS)およびその動物モデル(実験的自己免疫性脳髄膜炎(EAE))の特質である。重篤な細胞損傷に起因せずに下流シグナル伝達経路を活性化する低レベルのストレスがより重篤なストレスの多い事象へのその後の曝露を防御することができることが長期にわたり知られている。腓膵小胞体キナーゼ(PERK)は、ERストレス誘導性キナーゼをコードし、これは真核細胞翻訳開始因子2(eIF2)をリン酸化して多数の細胞防御遺伝子のストレス誘導性発現を増強する(Harding et al., (1999) Nature 397: 271-274

10

20

30

40

50

; Lu et al., (2004) EMBO J 23:169-179; Harding et al., (2003) Mol Cell 11:619-633)。

【0207】

PERK経路がEAEによって誘導された脱髄からのIFN- γ の防御効果を媒介するかどうかを決定するために、一連のEAE中の乏突起膠細胞中のリン酸化PERK (p-PERK) およびリン酸化-eIF2 (p-eIF2) をモニタリングした。

【0208】

CC1抗体を使用した共存分析により、少数の乏突起膠細胞がEAE発症時のコントロールマウスの脊髄中でp-PERK陽性およびp-eIF2陽性であり、これは以前の報告と一致することが明らかとなった (Chakrabarty et al., 2004)。対照的に、IFN- γ のCNS送達は、乏突起膠細胞中でPERK-eIF2経路を顕著に活性化した (図24)。

【0209】

これらのデータは、乏突起膠細胞中のPERK経路の活性化とEAE誘導性脱髄におけるIFN- γ の防御的役割との間の関連を支持する。

【0210】

遺伝学ベースのアプローチを使用して、EAEに及ぼすIFN- γ の防御的影響におけるPERK経路の関与を試験した。PERKの機能変異の喪失にヘテロ接合性を示すマウスは表現型的に健康であるが、半数体不全の証拠を示す (Harding et al., 2000; Lin et al., 2005)。TRE/IFN- γ マウスを、PERK+/-マウスと交配し、その子孫をGFAP/tTAマウスと交配してPERK変異にヘテロ接合性を示す三重トランスジェニックマウスを得た。計画以来ドキシサイクリンを投与している6週齢のPERK+/-バックグラウンドの有するGFAP/tTA; TRE/IFN- γ 三重トランスジェニックマウスを、MOG35-55ペプチドで免疫化し、同時にドキシサイクリンの使用を停止するか (DOX-三重マウス)、ドキシサイクリンを投与し続けた (DOX+三重マウス)。コントロールDOX+三重マウスは、コントロールDOX+二重マウスに類似のEAE疾患経過を示した。顕著には、IFN- γ のCNS送達は、PERK変異についてヘテロ接合性のマウスにおいてEAEを改善しなかった。DOX-三重マウスの罹患率、EAE重症度、および死亡率は、コントロールDOX+三重マウスに匹敵した (表1)。神経病理学的分析により、EAE発症時のIFN- γ のCNS送達が、疾患ピーク時のPERK+/-バックグラウンドを有するマウスの腰髄における脱髄、軸索損傷、または乏突起膠細胞の喪失を防御しなかったことが明らかとなった。実際、MBP免疫染色、トルイジンブルー染色、およびMBPについてのリアルタイムPCR分析は、一貫して、疾患重症度のピーク時にDOX-三重マウスおよびコントロールDOX+三重マウスの脊髄中に類似の脱髄を示した (図23)。さらに、本発明者らは、PERKにおける機能変異の喪失は一連のEAE中の炎症性浸潤およびサイトカインの発現プロファイルに有意に影響を及ぼさないことを見出した。したがって、これらのデータは、乏突起膠細胞中のIFN- γ によるPERK経路の活性化がEAEに起因する脱髄からのニューロンの防御に不可欠であることを示す。これにより、IFN- γ は、PERK経路に依存する「総合的 (integrated) ストレス応答」を活性化し、その後の有害物への曝露から神経系を防御することが示唆される。

【0211】

(実施例17: 脱髄におけるGADD34の役割: in vivoでのGADD34の機能喪失の影響)

脱髄におけるGADD-34の役割を、GADD-34を欠損し、EAEが誘導されたマウスにおいて研究した。

【0212】

EAE中における乏突起膠細胞中のeIF2の活性化が認められている (Chakrabarty et al., 2004; Chakrabarty et al., 2005)。上記実施例に記載されるように、EAE発症時のIFN- γ のCNS送達は、PE

10

20

30

40

50

RK依存性総合的ストレス応答経路の活性化によってEAE誘導性脱髄を防御し、疾患の重症度を弱めることが示されている。GADD34は、タンパク質ホスファターゼ-1 (PP1)に関与し、真核細胞翻訳伸長因子eIF2の脱髄をターゲティングする調節サブユニットをコードするストレス誘導性遺伝子である(Connor et al., 2001; Novoa, 2001; Novoa et al., 2003)。GADD34-ヌルマウスは健康であるが、GADD34の喪失によってストレスを受けた細胞中のリン酸化eIF2 (p-eIF2)レベルが増加する。さらに、GADD34-ヌル動物がERストレスに起因する細胞死を顕著に防御することが示されている(Jousse et al., 2003; Marciniak et al., 2005)。したがって、EAEの病理発生におけるeIF2の役割を、GADD34-ヌルマウスを使用して試験した。

10

【0213】

GADD34-ヌルマウスを作製した。マウスを、C57BL/6マウスと6回戻し交配下。EAEを以下のように誘導する。マウスの脇腹および尾の根元に、600 μ gの結核菌を補足した完全フロイントアジュバント中に乳化した200 μ gのMOG35-55ペプチドを皮下注射した。400ngの百日咳毒素の2回の腹腔内注射を、MOG35-55ペプチドでの免疫化から24時間後および72時間後に行った。臨床重症度スコアを0~5ポイントのスケール(0=健康、1=弛緩した尾、2=運動失調および/または後肢の不全麻痺、3=後肢の麻痺および/または前肢の不全麻痺、4=四肢の麻痺、および5=瀕死または死亡)にしたがって毎日記録した。

20

【0214】

図26の結果は、コントロール動物と比較した場合、GADD34-ヌルマウスにおいて疾患の発症が有意に遅延することを示す。したがって、GADD34の阻害は、EAEの発症を遅延させる。

【0215】

CNS中の組織損傷を、Lin et al. (投稿中)に記載のように免疫組織化学的分析およびトルイジンブルー染色によって決定する。脊髄組織を、疾患重症度のピークでの組織損傷について分析する。CC1に対する抗体(APC7)をマーカーとして使用して成熟乏突起膠細胞を同定し、MBPに対する抗体を使用して脱髄の程度を決定し、非リン酸化神経フィラメント-H(SMI32)を使用して軸索損傷を検出する。さらに、脱髄および軸索損傷の重症度を、トルイジンブルーでの組織の染色によって試験する。ミエリン遺伝子発現が乏突起膠細胞機能と高度に相関するので、リアルタイムPCRを行って、脊髄中のMBP、PLP、およびセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ(CGT)をコードするmRNAの定常状態のレベルを決定する。TaqmanリアルタイムPCRにより、病変中の脱髄の程度を定量することが可能である。

30

【0216】

結果は、EAEの進行が、GADD34-ヌルマウスおよび野生型コントロールの両方においてMBP、PLP、およびCGTをコードするmRNAの減少を伴うことを示す。しかし、GADD34-ヌルマウスにおける減少は、野生型動物で見出された減少に先立つ。

40

【0217】

組織学的結果が臨床スコアを使用して定量した表現型の変化によって評価した疾患の経時変化と一致すると予想され、GADD34機能の喪失がEAEの特徴である脱髄および乏突起膠細胞の喪失を防御する可能性が高い。

【0218】

(実施例18: GADD34の喪失は、EAE中の脱髄から乏突起膠細胞を防御する) 種々のストレスの多い容態は、eIF2と関連する。以下の4つの哺乳動物eIF2キナーゼが同定されている: PERK、GCN2、RNA活性化タンパク質キナーゼ(PKR)、およびHRI(Proud, 2005)。上記実施例に記載されるように、PERK-eIF2経路を、免疫サイトカインIFN- γ によってEAE中の乏突起膠細胞

50

胞中で活性化させる。Chakrabarty et al. (2004) は、PKR-eIF2 経路の活性化が活性なEAEを罹患した動物のCNS中の炎症細胞で生じることを示した。

【0219】

EAEを有するがGADD34を欠くマウスで認められる影響が乏突起膠細胞の防御を反映することを確認するために、CC1およびp-eIF2の二重免疫染色をGADD34-ヌルマウス中で行い、野生型コントロール動物で行った二重免疫染色と比較する。

【0220】

さらに、CD3およびp-eIF2の二重免疫染色を行って、野生型動物と比較した場合にGADD34-ヌルマウスのCNS中のT細胞中でp-eIF2レベルが増加するかどうかを決定する。GADD34-ヌルマウスおよび同腹仔コントロールマウスにおけるCNSおよび末梢免疫系中の免疫応答を、Lin et al. (投稿中)に記載のように分析する。

10

【0221】

結果がp-eIF2レベルが野生型マウスよりもGADD34-ヌルマウスの乏突起膠細胞中で高いことを示すと予想される。いかなる特定の理論に拘束されないが、eIF2のリン酸化の増強が総合的ストレス応答を延長すると予想され、したがって、EAEに起因する損傷から乏突起膠細胞を防御する。

【0222】

(実施例19：脱髄におけるGADD34の役割：in vitroでのGADD34の機能喪失の影響)

20

乏突起膠細胞で認められ、且つGADD34欠失によって増加する防御効果を評価するために、GADD34の発現を遮断するためにsiRNAを使用する実験を、精製ラット培養乏突起膠細胞に対して行う。実験プロトコルは、Lin et al. (投稿中)に記載されている。新生ラット脳由来の乏突起膠細胞前駆体(OPC)を、以下のように培養する。混合グリア培養物を、フラスコ中の10%FBSを含む培地中で成長させ、星状細胞層がコンフルエントになった場合(10~14日目)、オービタルシェーカーを使用して、乏突起膠細胞前駆体を星状細胞および小グリアから分離した。その95%を超える細胞がA2B5陽性、GFAP陰性、およびCD11b陰性である細胞を、0.5%FBS、PDGF(10ng/ml)、およびFGF(5ng/ml)を含む培地中で最初に培養した。次いで、細胞をPDGFおよびFGFを含まない0.5%FBS培地に移して分化を誘導した。

30

【0223】

低分子干渉RNA(siRNA)を、siRNA Target Finderソフトウェア(Ambion)を使用してデザインし、これを使用して、ラットGADD34の発現を阻害する。siRNAの標的配列を、pSilencer Expression Vectors Insert Design Tool(Ambion)と組み合わせて使用して、siRNA標的配列由来のDNAオリゴヌクレオチドインサートをコードするヘアピンsiRNAを作製する。プログラムは、クローニングのために使用されるループ配列およびオーバーハングを付加する。ヘアピンsiRNAコードDNAオリゴヌクレオチドインサートを、製造者の説明書にしたがってpSilencer 4.1-CMVベクター(Ambion)にクローン化し、GADD34に特異的なヘアピンsiRNAをコードするpSilencer 4.1-CMVベクターを、製造者のプロトコルに従ってNucleofectorキット(Amaxa)を使用してOPCにトランスフェクトする。コントロール乏突起膠細胞を、GADD34 siRNAを欠く4.1-CMVベクターであるコントロールベクターでトランスフェクトする。トランスフェクション後、細胞を、2.5 μg/mlピューロマイシンを使用して10~14日間にわたって選択する。トランスフェクトしたOPCを、TaqmanリアルタイムPCRを使用してGADD34 mRNAの存在について分析し、ウェスタンブロット分析を使用してGADD34タンパク質の存在について分析する。

40

50

【0224】

結果により、GADD34遺伝子に特異的なsiRNAがGADD34の転写およびGADD34タンパク質の発現を首尾よく阻害すると示唆されると予想される。

【0225】

さらに、サルプリノール(Sal)の防御効果を試験して、Salがサイトカイン、酸化物、ペルオキシ亜硝酸塩、およびグルタミン酸塩から乏突起膠細胞を防御するかどうかを決定する。サルプリノールは、PP1-GADD34ホスファターゼ活性を特異的に阻害し、それにより、ストレスを受けた細胞中のeIF2リン酸化を維持することが知られている(Boyce et al., 2005)。Salを、TNF-、H₂O₂、ペルオキシ亜硝酸塩ドナーSIN-1、およびグルタミン酸塩と組み合わせ、これを7日間分化させた細胞に添加する。ウェスタンブロット分析を使用して、Salが培養乏突起膠細胞中でp-eIF2レベルを上昇させるかどうかを試験する。また、乏突起膠細胞の生存度を、Lin et al., 2001および2005に記載のように、MTTアッセイ(Roche)、TUNELアッセイ(ApopTag kit; Serological)、およびカスパーゼ-3活性アッセイ(Sigma, St. Louis, MO)によって決定する。

10

【0226】

結果は、siRNAテクノロジーを使用したその発現の遮断またはその酵素活性の直接阻害によるGADD34機能の阻害によって反応性酸化的/ニトロ化的ストレスおよびグルタミン酸塩細胞傷害性から乏突起膠細胞を防御することを示す。疾患ピークでの組織学的分析により、GADD34欠失が乏突起膠細胞中のp-eIF2レベルを上昇させ、EAE誘導性脱髄および乏突起膠細胞の喪失から防御されることが明らかとなるであろう。GADD34siRNAトランスフェクションおよびSalがサイトカイン曝露、反応性酸化的/ニトロ化的ストレス、およびグルタミン酸塩興奮毒性(excitotoxicity)から乏突起膠細胞を防御すると予想される。Salの細胞防御効果の種々の態様とGADD34siRNAトランスフェクションの態様とを比較する。EAEを罹患したマウスおよびMSを罹患した患者のマウスにおけるSalの防御効果を試験する。

20

【0227】

(実施例20:乏突起膠細胞におけるPERK依存性総合的ストレス応答経路の活性化は脱髄を防御する)

30

PERKの活性化は、PERKの二量体形成によって開始され、それにより、トランス自己リン酸化され、その基質eIF2のリン酸化能力が増加する。通常、この二量体形成事象は、PERKのストレス感受性ERルーメンドメインによって駆動される(Harding 1999)。他の研究者は、PERKのeIF2キナーゼエフェクタードメインを2修飾FK506結合ドメイン(Fv2E)を含むポリペプチドと融合して、融合タンパク質(Fv2E-PERK)を生成し、この人工的eIF2キナーゼ(Fv2E-PERK)の活性が二量体AP20187に従属し、ERストレスの上流シグナル伝達から脱共役される(Luet al., 2004)。

【0228】

in vitroでの乏突起膠細胞に及ぼすPERK活性化の防御効果を試験するために、乏突起膠細胞前駆細胞(OPC)を、Fv2E-PERKをコードする構築物でトランスフェクトした。Fv2E-PERK構築物を、哺乳動物ベクターpcDNA3.1にサブクローン化して、融合タンパク質Fv2E-PERKタンパク質を発現する哺乳動物発現プラスミド(pcDNA3.1-Fv2E-PERK)を生成する。上記の精製ラットOPCを、Nucleofactorキット(Amaxa)を使用してpcDNA3.1-Fv2E-PERKでトランスフェクトし、G418(400 μg/ml)を使用して10~14日間選択する。

40

【0229】

OPCを、分化するように7日間誘導し、PERK-eIF2経路の活性化を、二量体形成剤(dimerizer)AP20187のみの存在下またはTNF-、H₂O

50

2、ペルオキシ亜硝酸塩ドナー SIN - I、またはグルタミン酸塩と組み合わせて評価する。

【0230】

Fv2 - PERKをコードするmRNAの発現を、リアルタイムPCRを使用して検証し、Fv2 - PERKタンパク質の発現をウェスタンブロット分析によって検証する。PERK - eIF2の活性化の影響を、トランスフェクトしたOPCへのAP20187の添加後のp - eIF2についてウェスタンブロット分析によって評価する。さらに、トランスフェクトした乏突起膠細胞の生存度を、MTTアッセイ、TUNELアッセイ、およびカスパーゼ - 3活性アッセイを使用して、OPCの7日間の分化後に上記のように決定する。TNF - a、H₂O₂、ペルオキシ亜硝酸塩ドナー SIN - 1、またはグルタミン酸塩の存在下でOPCにAP20187を添加した後、同一の分析を行った。乏突起膠細胞の生存度を、MTTアッセイ、TUNELアッセイ、およびカスパーゼ - 活性によって決定する。

10

【0231】

AP20187がERストレス経路のエフェクターからFv2 - PERK発現乏突起膠細胞を防御すると予想される。

【0232】

(実施例21：PERK経路の活性によって上方制御される遺伝子の同定)

乏突起膠細胞に及ぼすPERK経路の活性化の防御効果を説明する機構を決定するために、mRNAマイクロアレイ分析を使用して、上方制御された細胞防御遺伝子を同定する。

20

【0233】

pcDNA3.1 - Fv2E - PERKでトランスフェクトされたOPCを7日間分化させ、AP20187で処置した。RNAを、Trizol試薬(Invitrogen)を使用してAP20187処置トランスフェクション細胞およびコントロールトランスフェクション細胞から単離し、DNaseI(Invitrogen)を添加してゲノムDNAを消失させる。蛍光標識RNAプローブを準備し、Affimetrixラット高密度オリゴヌクレオチドアレイとハイブリッド形成する。アレイの一次画像分析を、Genechipソフトウェアパッケージ(Affymetrix)を使用して行う。生データも、GeneSpringソフトウェアによって分析する。その未加工のハイブリッド形成シグナルがチップバックグラウンドより有意に強い遺伝子のみを評価する。各遺伝子についての未加工のシグナル強度を同一チップ由来の全遺伝子の平均シグナル強度に対して正規化して、正規化シグナル強度を得る。その後の分析のために同一スケールで全データを視覚化するために、各遺伝子の正規化シグナル強度を、全サンプル間の遺伝子の平均シグナル強度で割って発現レベルを得る。

30

【0234】

結果は、EAEにおけるPERK経路の防御効果に関与する細胞防御遺伝子が同定されることを示す。EAEの病理発生における新規に同定された遺伝子の役割を評価する。

【0235】

(実施例22：PERK - eIF2の活性化により、EAE中の乏突起膠細胞が細胞防御される)

40

PERK - eIF2経路の活性化が乏突起膠細胞に及ぼす細胞防御効果によってEAE誘導性組織損傷を防御することを直接証明するために、マウス中のPERK活性を、乏突起膠細胞中のPERK経路の活性化を調節可能にするように調整する。

【0236】

ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)遺伝子の調節配列の転写調節下で乏突起膠細胞中にタンパク質を特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製するために以前に使用された方法に基づいて(Fuss et al., 2000, 2001; Doerflinger et al., 2003)、融合Fv2E - PERK(PLP/Fv2E - PERK)を発現する発現構築物を操作し、導入遺伝子フラグメントを、受精C5

50

7 B L / 6 マウスの卵母細胞に注射する。

【0237】

導入遺伝子を発現する種々の P L P / F v 2 E - P E R K トランスジェニックマウス株が得られ、導入遺伝子の発現が動物に有害であることは見出されない。定量的リアルタイム P C R を使用して、ヘテロ接合性動物のゲノム内に組み込まれた導入遺伝子のコピー数を決定し、C N S 中の F v 2 E - P E R K m R N A およびタンパク質のレベルを、リアルタイム P C R およびウェスタンブロット分析を使用して決定する。トランスジェニックマウスに、A P 2 0 1 8 7 を腹腔内注射し、C N S 中の F v 2 E - P E R K 活性を、p - F v 2 E - P E R K および p - e I F 2 についてのウェスタンブロット分析によって決定する。最後に、C C 1 および p - e I F 2 二重免疫染色を行って、e I F 2 経路が A P 2 0 1 8 7 を投与されたトランスジェニックマウス中の乏突起膠細胞で特異的に活性化されるかどうかを確認する。

10

【0238】

A P 2 0 1 8 7 の投与後に乏突起膠細胞中の P E R K 経路を小さく活性化することが可能なトランスジェニックマウスを、E A E 実験のために選択する。実施例 1 に記載のように、マウスを M O G 3 3 - 3 5 ペプチドで免疫化し、乏突起膠細胞中の F v 2 E - P E R K を、E A E の発症前に A P 2 0 1 8 7 を投与することによって活性化する。乏突起膠細胞中での e I F 2 の活性化を、C C 1 および p - e I F 2 二重免疫染色によって検証し、臨床表現型、C N S における組織病理学的所見、および C N S における免疫応答を、上記実施例に記載のように特徴づける。

20

【0239】

(実施例 2 3 : 再髄鞘形成乏突起膠細胞における P E R K 経路の活性化は、E A E 誘導性脱髄病変の再髄鞘形成を促進させる)

P E R K 経路の活性化によって E A E 誘導性脱髄病変中の乏突起膠細胞の再髄鞘形成が促進されるかどうかを決定するために、P L P / F v 2 E - P E R マウスに E A E を誘導し、A P 2 0 1 1 8 7 の存在下および非存在下での P E R K の役割を評価する。

【0240】

実施例に記載のように P L P / F v 2 E - P E R K マウスを M O G 3 3 - 3 5 ペプチドで免疫化し、E A E の回復期のマウスへの A P 2 0 1 1 8 7 の投与によって乏突起膠細胞中の F v 2 E - P E R K を活性化する。臨床重症度スコアを、0 ~ 5 ポイントのスケール (0 = 健康、1 = 弛緩した尾、2 = 運動失調および / または後肢の不全麻痺、3 = 後肢の麻痺および / または前肢の不全麻痺、4 = 四肢の麻痺、および 5 = 瀕死または死亡) にしたがって毎日記録した。

30

【0241】

乏突起膠細胞中での e I F 2 の活性化を、C C 1 および p - e I F 2 二重免疫染色によって検証する。一旦 A P 2 0 1 8 7 処置マウスとコントロールマウスとの間の疾患の重症度が有意に異なるようであると、脊髄組織を調製し、再髄鞘形成について分析する。いずれかに記載のように (L i n e t a l . , 投稿中) 、C C 1 免疫染色を使用して脱髄病変中の成熟乏突起膠細胞数を決定し、M B P についての免疫染色およびトルイジンブルー染色を使用して脱髄の程度を検証する。C N S における免疫応答を、C D 1 1 b および C D 3 免疫染色、I F N - 、T N F - 、i N O s 、I L - 2 、I L - 4 、I L - 5 、I L - 1 0 、I L - 1 2 、I L - 1 7 、および I L - 2 3 についてのリアルタイム P C R 分析によって評価する。

40

【0242】

(実施例 2 4 : P E R K - e I F - 2 経路を、M S 患者の病変由来の乏突起膠細胞中で活性化する)

M S 患者の C N S 組織を、H u m a n B r a i n a n d S p i n a l F l u i d R e s o u r c e C e n t e r (L o s A n g e l e s , C A) および T h e R o c k y M o u n t a i n M S C e n t e r (E n g l e w o o d , C O) から入手する。組織は、その生存期間に M S を罹患していたヒト由来の脳および脊髄組織、髄

50

液、および他の組織標本を含み得る。サンプルを凍結するか、そうでなければ、ドナーの死亡直後に保存し、ドナーの病歴についての情報と共に慎重に貯蔵組織の目録を作成する。

【0243】

Trizol 試薬 (Invitrogen) を使用して総 RNA を凍結サンプルから単離し、DNase I (Invitrogen) で処置してゲノム DNA を消失させた。Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR キット (Invitrogen) を使用して逆転写を行った。Taqman リアルタイム PCR を使用して、IFN- α および ER ストレス マーカー BIP および CHOP の発現を定量した。PERK、eIF2、p-PERK、および p-eIF2 のタンパク質レベルを、ウェスタンブロット分析を使用して決定した。

10

【0244】

残存する凍結組織を、最適切断温度の化合物中に包埋する。組織サンプルの凍結切片 (厚さ 10 μ m) を調製し、CC1 免疫染色を使用して、脱髄病変中の乏突起膠細胞数を決定する。MBP 免疫染色を使用して、脱髄の程度を検証する。CNS 中の免疫応答を、CD11b 免疫染色および CD3 免疫染色によって評価する。さらに、CC1 および p-PERK 二重免疫染色または CC1 および p-eIF2 二重免疫染色を行って、MS 病変中の PERK-eIF2 経路の活性化を証明する。

【0245】

炎症性細胞および活性化小グリアの分布および密度に基づいて、MS 誘導性脱髄病変を、以下の3つのカテゴリーに分類することができる: 活動性 (急性)、慢性活動性、および慢性非活動性 (Lassmann, 1998; Trapp et al., 1999)。サンプル中の IFN- α レベルと PERK 経路の活性との間の関係および病変中の脱髄の程度と PERK 経路の活性との間の関係を決定する。

20

【0246】

PERK-eIF2 経路が MS 病変の乏突起膠細胞中で活性化されると予想される。MS 中の乏突起膠細胞の異種パターンのために、PERK-eIF2 経路の活性化は、いくつかの組織サンプルのみで検出されると予想される。

【0247】

(実施例 25: GADD34 の欠失は、乏突起膠細胞中の p-eIF2 レベルを増加させ、EAE 誘導性脱髄を防御する)

30

1. in vivo 研究

eIF2 のリン酸化は、シグナル伝達経路の間で高度に保存された収束点 (point of convergence) である (Jousse et al (2003) J. Cell. Biol. 163: 767-775; Proud CG (2005) Semin. Cell. Dev. Biol. 16: 3-12)。4つのタンパク質キナーゼは、ER (PERK) 中のタンパク質不良折り畳み (mal folding)、アミノ酸欠乏 (GCN2)、ウイルス感染 (PKR)、およびヘム欠損 (HRI) の他の非関連ストレスに eIF2 のリン酸化をつなぎ合わせることが公知である (Proud CG (2005) Semin. Cell. Dev. Biol. 16: 3-12)。この eIF2 リン酸化依存性ストレス誘導性経路は、総合的ストレス応答 (ISR) と呼ばれている (Harding, et al (2003) Mol. Cell 11: 619-633; Proud CG (2005) Semin. Cell. Dev. Biol. 16: 3-12)。ストレスから回復させるために、eIF2 を、酵素ホスファターゼ (PP1) およびその不可欠な非酵素補因子である成長停止 DNA 損傷 34 (growth arrest and DNA damage 34) (GADD34) を含む複合体によって迅速に脱リン酸化する (Connor, et al. (2001) Mol. Cell. Biol. 21: 6841-6850; Novoa et al (2001) J. Cell Biol. 153: 1011-1022; Novoa et al (2003) EMBO J. 22: 1180-1187)。GADD34 の発現を、サイトゾル転写因子 ATF4 の誘導

40

50

によって調節し、その翻訳を、 $eIF2$ リン酸化の存在下で上方制御し、それにより、強固な自己フィードバックループが作製される (Novoa et al (2003) *EMBO J.* 22: 1180 - 1187; Jiang et al (2004) *Mol. Cell. Biol.* 24: 1365 - 1377)。GADD34 欠失により、ストレス細胞中の $p-eIF2$ レベルが増加し、細胞がストレスから防御される (Jousse et al (2003) *J. Cell. Biol.* 163: 767 - 775; Marciniak et al (2004) *Genes Dev.* 18: 3066 - 3077)。

【0248】

上記実施例に示すように、CNS 中での $IFN-$ の初期誘導は、EAE を発症するように誘導した動物で防御効果を示し、この防御は PERK に依存する。乏突起膠細胞中の PERK の活性化によって $IFN-$ の初期の存在が総合的ストレス応答 (ISR) を活性化して炎症性脱髄から防御されるかどうかを試験するために、GADD34 変異マウスにおける EAE の影響を試験した。GADD34 の非存在下でのストレス応答の延長は有用であると予想される。

10

【0249】

a. EAE の発症は、GADD34 - ヌルマウスで有意に遅延される。

【0250】

実施例 17 に記載のように、GADD34 - ヌルマウスおよびコントロールマウスに EAE を誘導した。簡潔に述べれば、GADD34 - ヌルマウスを C57BL/6 マウスと少なくとも 6 回戻し交配した。マウスの脇腹および尾の根元に、 $600 \mu g$ の結核菌を補足した完全フロイントアジュバント中に乳化した $200 \mu g$ の MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを皮下注射によって投与することによって、EAE を誘導する。 $400 ng$ の百日咳毒素の腹腔内注射を、24 時間後および 72 時間後に行った。臨床重症度スコアを 0 ~ 5 ポイントのスケール (0 = 健康、1 = 弛緩した尾、2 = 運動失調および / または後肢の不全麻痺、3 = 後肢の麻痺および / または前肢の不全麻痺、4 = 四肢の麻痺、および 5 = 瀕死または死亡) を使用して毎日記録した。

20

【0251】

GADD34 - ヌルマウスで発症した臨床疾患は、同腹仔コントロールマウスでの発症と比較した場合、有意に遅延する (図 26)。さらに、GADD34 - ヌルマウスでの疾患の重症度は、コントロールマウスよりも軽度であった。したがって、GADD34 機能の喪失は、EAE の発症を遅延させ、疾患の重症度を小さくする。

30

【0252】

b. GADD34 の喪失は、乏突起膠細胞中の $p-eIF2$ レベルが増加し、EAE 誘導性脱髄から防御される

脊髄組織を調製し、コントロールマウスが疾患重症度のピークにある時点で分析した。予想通り、GADD34 の発現は、EAE を罹患したマウスの腰髄中の乏突起膠細胞中で上方制御され、これは、年齢適合ナイーブマウスの乏突起膠細胞中で検出不可能であった (図 27 a および 27 b)。さらに、CC1 および $p-eIF2$ の二重標識により、GADD34 欠失によってコントロールマウスと比較して、EAE を罹患した GADD34 ヌルマウスの腰髄中の乏突起膠細胞中の $p-eIF2$ レベルが顕著に増加することが明らかとなった (図 27 c および 27 b)。組織学的分析により、コントロールマウスの腰髄中に典型的な EAE 脱髄病変 (髄鞘の破壊 (図 28 a および 28 c)、乏突起膠細胞の喪失 (図 8 e)、軸索損傷 (図 28 g)) が明らかとなった。対照的に、この時点での MBP 免疫染色およびトルイジンブルー染色によって、GADD34 ヌルマウスの腰髄中に明らかな脱髄病変は認められなかった (図 28 b および 28 d)。重要には、GADD34 ヌルマウスの腰髄中の乏突起膠細胞は、ほとんどインタクトなままであった (図 28 f)。さらに、GADD34 欠失により、コントロールマウスと比較して GADD34 ヌルマウスの腰髄中の軸索損傷は劇的に減少した (図 28 g および 28 h)。まとめると、これらのデータは、GADD34 欠失が乏突起膠細胞中の $p-eIF2$ レベルを増加させ

40

50

、したがって、総合的ストレス応答を延長し、E A E 誘導性脱髄から防御することを示す。

【0253】

2. *in vitro* 研究

細胞のストレスからの防御における e I F 2 のリン酸化の重要性により、いくつかのヒト疾患の治療に潜在的に有用であり得る e I F 2 のリン酸化の小分子モジュレーターを探索した。Boyce et al. (Boyce, et al. (2005) Science 307:935-939) は、薬物スクリーニングを使用し、このスクリーニングは、ER ストレス誘導性アポトーシスに対する細胞防御を付与する小分子を同定するであろう。彼らは、e I F 2 脱リン酸化の小分子インヒビターであるサルプリナール (S A L) を同定した。これは、P P 1 - G A D D 3 4 ホスファターゼ活性を特異的に阻害し、それにより e I F 2 リン酸化が保持される。S A L での処置により、ER ストレスおよびウイルス感染から細胞が防御される (Boyce, et al. (2005) Science 307:935-939)。

10

【0254】

本発明者らの仮説は、総合的ストレス応答が多発性硬化症 (M S) 患者における炎症反応の有害な影響から乏突起膠細胞を防御する可能性があるということである。上に示すように、G A D D 3 4 がヌル変異したマウスは、e I F 2 リン酸化の増加および E A E 誘導に対する応答の遅延 (疾患ピークでの重症性脱髄の減少が含まれる) を示す。e I F 2 リン酸化を延長する薬剤が有害な炎症因子から乏突起膠細胞を防御し得るかどうかを試験するために、免疫サイトカイン I F N - の存在下でのサルプリノール (S a l) の影響を、髄鞘形成の *in vitro* モデルで試験した。

20

【0255】

in vitro で十分に髄鞘形成することが示されている海馬器官型培養物 (H O C) 。H O C を以前に記載のように調製および維持し (Kunkler and Kraig (1997) J Cereb Blood Flow Metab. 17:26-43) 、使用前に7日間 *in vitro* で保持した。種々の濃度の S A L を、100 U / m l I F N - と組み合わせ、H O C 培養物に7日間添加した。培養物中の豊富なレベルのミエリン特異的タンパク質であるミエリン塩基性タンパク質 (M B P) によって証明されるように、未処置 H O C 中に健全な髄鞘形成が認められた (図 29) 。100 U / m l I F N - 曝露の7日後、M B P レベルは、H O C において約 80% 減少した (図 29) 。S A L 処置のみでは M B P 発現に影響を及ぼさなかった。しかし、S A L 処置により、I F N - 曝露によって誘発された M B P 発現の減少が顕著に弱められた (図 29) 。I F N - の存在は、脱髄病変中の再髄鞘形成を阻害することが示されている (実施例 2 ~ 7 を参照のこと) 。まとめると、これらのデータは、e I F 2 リン酸化を促進するか延長する薬剤での処置によって免疫媒介性脱髄疾患においてミエリン修復を促進することができることを示す。

30

【0256】

(実施例 26 : サイトカインシグナル伝達の阻害は、I F N - の有害な影響から乏突起膠細胞を防御する)

40

1. トランスジェニックマウスの作製および評価

a) 乏突起膠細胞中で S O C S 1 を発現するトランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウス株 P L P / S O C S 1 を、P L P 発現カセットおよび S O C S 1 c D N A を含む構築物を使用して精製した (図 30 A) 。P L P 発現カセットは、他の場所に記載されており、多数の導入遺伝子の乏突起膠細胞特異的発現のために使用されている (Wight et al. , 1993 ; Fuss et al. , 2000 ; Doerflinger et al. , 2003 ; Gonzales et al. , 2005) 。ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) ベースまたは抗 F l a g 抗体ベースの検出方法における S O C S 1 発現のためのマーカーとして役立つ F l a g - エピトープ配列を含んでいたため、S O C S 1 c D N A クローン (Starr et al. , 1998

50

）を使用した（Einhauer and Jungbauer, 2001）。簡潔に述べれば、Flag-SOCS1 cDNAを、XbaIを使用して元の発現ベクターpEF-FLAG-I/m4A2から切り出した。フラグメントにクレノウを充填し、中間ベクター（修飾pNEB/193ベクター）のSmaI制限部位にサブクローン化した。得られたpNEB193/SOCS1ベクターを、AscIおよびPacIでさらに消化して（部分消化）、Flag-SOCS1フラグメントを放出し、PLP発現カセットのポリリンカー領域の同一の制限部位にサブクローン化した。PLP/SOCS1ベクターを、ApaIおよびSacIIで消化し（部分消化）、線状の15kb導入遺伝子を、受精（C57BL/6J×DBA/2J）卵母細胞への微量注入のために単離した。導入遺伝子に陽性の子孫を、導入遺伝子特異的プライマーを使用したPCRによるテールDNAの増幅によって同定した。同定された樹立系統を、次に、C57BL/6Jマウスと交配させて（Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）、トランスジェニック系統を確立した。

【0257】

b) CNS中にIFN- を発現するトランスジェニックマウス系統の作製

CNS中にIFN- を過剰発現するトランスジェニックマウスMBP/IFN-（172系統）およびGFAP/tTA×TRE/IFN-（184/110系統および184/67系統）は、別の場所に記載されている（Corbin et al., 1996; Gao et al., 2000; Lin et al., 2004, 2005）。簡潔に述べれば、MBP/IFN-（172系統）マウスは、IFN- 発現がミエリン塩基性タンパク質（MBP）転写調節領域によって駆動されるトランスジェニック動物である（Gao et al., 2000）。GFAP/tTA×TRE/IFN- は、単一トランスジェニックGFAP/tTA（184系統）と単一トランスジェニックTRE/IFN-（110系統および67系統）マウスとの交配によって得られた二重トランスジェニックマウスである。実験で使用した2つのTRE/IFN- マウス系統（110系統および67系統）は、GFAP/tTAMausと交配した場合に異なる量のIFN- を産生する（184/110および184/67）（Lin et al., 2004, 2005）。GFAP/tTA×TRE/IFN- は、テトラサイクリンオフ誘導系（tetracycline-off-inducible system）であり、この系は、グリア線維酸性遺伝子（GFAP）転写調節領域がtTAの発現を駆動し、次いで、TRE（tet応答エレメント）に結合してIFN- の発現を開始する。ドキシサイクリンの投与により、tTADNA結合およびIFN- 発現が抑制され、ドキシサイクリンの除去によってIFN- 発現の一過性調節誘導が可能である（Gao et al., 1999）。

【0258】

c) トランスジェニック動物の交配および評価

IFN- 過剰発現マウスを、二重トランスジェニック交配系（MBP/IFN- × PLP/SOCS1）および三重トランスジェニック交配系（GFAP/tTA×TRE/IFN- × PLP/SOCS1）でPLP/SOCS1マウスと交配させた。MBP/IFN- × PLP/SOCS1（172×PLP/SOCS1）交配を、標準的な交配プロトコールにしたがって行った。GFAP/tTA×TRE/IFN- × PLP/SOCS1交配を、以下の2工程交配過程で行った：GFAP/tTAMaus（184系統）を、PLP/SOCS1マウスと最初に交配し、次いで、二重陽性（184×PLP/SOCS1）子孫を、TRE/IFN- の110および67系統と個別に交配させた。この第2の交配工程を、前に記載した「tetオフ」プロトコールにしたがって行った。ドキシサイクリン0.05mg/ml（Sigma-Aldrich）を、胚齢14日目まで妊娠した雌マウスの水に添加し、その後、動物を正常な水に戻し、それにより、IFN- 転写が開始され、生後にピークになる（Lin et al., 2005）。

【0259】

交配系の同腹仔（F1世代）を毎日試験し、生後21日目で屠殺した。臨床評価は、拳

動観察および振戦を誘発するための負荷梯子歩行 (challenged ladder walking) を含んでいた。組織学的試験は、乏突起膠細胞の数および密度の定量ならびに髄鞘形成パターンの試験を含んでいた。IFN- γ および Flag-SOCS1 の発現を検証および測定するために、脳組織を屠殺時点で各動物から同時に得た (以下を参照のこと)。その後、遺伝子型に従って臨床的および組織学的所見を階層化した。全動物手順は、National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals を遵守して行い、これらの手順は、Institutional Animal Care and Use Committee at The University of Chicago によって承認されていた。

10

【0260】

d) トランスジェニック動物のポリメラーゼ連鎖反応および遺伝子型同定

全実験動物を、単位テール (Biotek 2000 automatic system, Beckman-Coulter, Fullerton, CA) を使用して遺伝子型同定を行った。導入遺伝子検出のための PCR (Qiagen PCR キット、Valencia, CA) を、以下の導入遺伝子特異的スクリーニングプライマーを使用して行った:

【0261】

【化10】

Flag-SOCS1 センスプライマー, 5'-

20

CCAGGACGACGATGACAAGA-3' および Flag-SOCS1 アンチセンスプライマー, 5'-TCAGGGGTCCCCA ATAGAAG-

3'; MBP/IFN- γ センスプライマー, 5'-ATGAGGAAGAGCTGCAAAGC-3', および MBP/IFN- γ アンチセンスプライマー, 5-

GGTGACAGACTC CAAGCACA-3'; GFAP/tTA センスプライマー, 5'-TCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCG-3'

および GFAP/tTA アンチセンスプライマー, 5'-TCTGAACGCTGTGACTTGGAGTGTCC-3'; TRE/IFN- γ センスプライマー 5'-

CGAATTCGAGCTCGG TACCC-3' および TRE/IFN- γ アンチセンスプライマー 5'-CCATCCTTTGCCATTCTCCAG-3'

(Integrated DNA Technologies Inc.)

。

【0262】

e) ノーザンプロット分析および定量的 PCR 法

30

総 RNA を、TRIzol 試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) を使用して実験動物から単離した。1.2% 変性アガロースゲル中で 20 μ g の総 RNA を分離することによってノーザンプロットを行った。サンプルをナイロン膜に移し、PCR (GenAmp 2400; Perkin-Elmer, Wellesley, MA) によって [³²P] dCTP および [³²P] dATP (New England Nuclear/Perkin-Elmer, Wellesley, MA) で無作為に標識した SOCS1 プロブを使用して一晩ハイブリッド形成した。Kodak フィルムを、ハイブリッド形成した膜に -80 で 48 時間曝露し、M7B Kodak 処理装置 (Kodak, Rochester, NY) を使用して現像した。各レーンに存在する総 RNA の相対レベルを評価するために、膜を剥ぎ取り、28S リボソーム RNA に特異的な放射性標識プロブを使用してハイブリッド形成させた (Baerwald et al., 1998)。

40

【0263】

定量的 PCR (Q-PCR またはリアルタイム PCR) を、オリゴ (dT)₁₂₋₁₈ および SuperScript II 逆転写酵素 (Invitrogen RT-PCR キット) を使用した 1 μ g の DNAase I 処置 (Invitrogen) 総 RNA の第 1 の逆転写によって行った。iQ Supermix および以下の Flag-SOCS1 および IFN- γ のためのプライマーおよびプロブを含む反応物での 20 ng の cDNA を使用して Q-PCR を行った:

【0264】

50

【化 1 1】

Flag-SOCS1センスプライマー, 5'-

GATGACAAGACGCGCCAG ATG -3'; Flag-SOCS1アンチセンスプライマー, 5'-GAGGACGAGGAGGGCTCTGA-3'; および Flag-SOCS1プロブ, 5'-56FAM-CGCACCCAGCTGGC AGCCGACATT-3BHQ-1/-3'; IFN- γ センスプライマー

5'-GATATCTCGAGGAACTGGCAAAA-3'; IFN- γ アンチセンスプライマー 5'-

CTACAAAGAGTCTGAGGTAGAAAAGAGATAAT-3'; および IFN- γ プロブ 5'- FAM-

TGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCA-BHQ1-3'; GAPDHセンスプライマー 5'-

CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCA-3'; GAPDHアンチセンスプライマー 5'-CCATTCTCGGCCTTGACTGT-3';

および GAPDHプロブ, 5'-5T_xRd-XN/TGACTCCACTCACGGCAAATTCAACG-3BHQ-2-3' (Integrated DNA

Technologies, Inc.).

10

。

以下の実験下で BioRad I - サイ클ーリアルタイム PCR ユニットを使用して反応を行った: 95 で3分間を1サイクル、95 で30秒間を40サイクル、および60 で30秒間 (Bio-Rad Laboratories)。Flag-SOCS1 および IFN- の mRNA レベルを、閾値サイクル (threshold cycles) (Flag-SOCS1 / GAPDH および IFN- / GAPDH 比) に基づいた GAPDH の発現レベルに正規化した (Lin et al., 2005)。

【0265】

f) ウェスタンブロット分析および免疫沈降法

20

いくつかの PLP / SOCS1 マウスおよび野生型マウスの脳および脾臓由来の総溶解物を、RIPA 緩衝液 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 中での組織均質化によって得た。氷上で15分間のインキュベーション後、溶解物を、14,000 rpm で30分間遠心分離し、上清を回収した。タンパク質サンプル (50 μ g) を、15% SDS - ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、PVDF 膜 (Trans-blot SD apparatus, Bio-Rad Laboratories) に移し、マウス抗 Flag 抗体 (M2, 1000 倍希釈) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と一晩インキュベートし、ECL Western blot 検出試薬 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) で検出した。Flag タンパク質 (Sigma-Aldrich) (Flag オリゴペプチドのポリマー) を、反応のためのポジティブコントロールとして使用した。

30

【0266】

免疫沈降キット (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を使用し、PLP / SOCS1 および野生型マウスの脳および脾臓由来のタンパク質抽出物の抗 Flag 抗体 (M2) との4 で4時間のインキュベーション、その後のタンパク質 A / C アガロースとの4 で一晩のインキュベーションによって免疫沈降を行った。免疫複合体を14,000 rpm での20秒間遠心分離によって回収し、キットから提供された試薬を使用して、タンパク質 A / C アガロースからタンパク質を分離した。免疫沈降タンパク質のウェスタンブロットを、上記のように行った

40

【0267】

g) 免疫組織化学

動物を、腹腔内投与した0.01 ml / g の2.5% アベルチン (Sigma-Aldrich) で麻酔し、生理食塩水およびその後の2% パラホルムアルデヒドで10分間灌流した。脳を取り出し、2% パラホルムアルデヒドで1時間後固定し、30% スクロース中で48時間低温保存し、凍結ブロックとして調製し (OCT compound, Sakura, Torrance, CA)、-20 で厚さ7 μ m の切片にした (Leica CM1800 cryostat, Leica Microsystems)。免疫染色前に、切片を0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) で10

50

分間処置し、10%ウシ血清アルブミン(Sigma-Aldrich)またはヤギ血清(Invitrogen)と30分間インキュベートした。一次抗体(室温で2時間または4で一晩)およびFITC抱合またはCy3抱合二次抗体(30分間)との連続インキュベーションによって、間接的免疫染色を行った。本研究で使用した全ての以下のプライマーおよび二次抗体は市販されている: マウスおよびウサギ抗Flag抗体(100倍希釈; Sigma-Aldrich)、マウス抗CC1抗体(20倍希釈; Oncogene)、マウスMHCクラスI抗体(100倍希釈; Chemicon International, Temecula, CA)、マウス抗PLP、プロテオリピドタンパク質、高アイ(100倍希釈; Chemicon International)、マウスおよびウサギ抗SOCS1抗体(100倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、ウサギ抗Stat1抗体(100倍希釈; Santa Cruz Biotechnology)、抗マウスまたは抗ウサギFITC抱合二次抗体(100倍希釈; Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME)、および抗マウスまたは抗ウサギCy3抱合抗体(500倍希釈; Jackson ImmunoResearch)。免疫染色切片を、DAPI核スタチン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を含むVectorshieldマウント培地を使用してマウントし、蛍光顕微鏡(Axoplan; Carl Zeiss Microimaging)を使用して試験した。

【0268】

以前に記載のように、Axiovisionソフトウェアを使用して、生後21日目の乏突起膠細胞の密度を評価した(Linet al., 2005)。脳を、脳梁を通過して2つの左右対称の半球に分割して矢状切片にした。各半球由来の10個の凍結切片を、厚さ7 μ mに調製し、その調製順に番号をつけた。研究群あたり3匹の動物の脳を、この様式で調製した。CC1免疫染色後、各切片の脳梁の対応領域を、デジタル処理で選択し、対応する全領域を得た。各切片の選択領域内のCC1細胞を手作業で計数し、平方領域(mm^2)あたりのCC1陽性細胞数を計算した。結果を、CC1(+)細胞/ mm^2 の平均 \pm SD(研究群あたり $n=3$)として示した。

【0269】

h) 電子顕微鏡法

電子顕微鏡法研究のために選択したマウスを、4%パラホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒドで灌流した。脳を採取し、白質構造を、ステレオタイプ顕微鏡(Wild M3C; Wild AG, Heebriegg, Switzerland)を使用して切片にした。組織を、四酸化オスmium中でさらに後固定し、新たに調製したエポキシ樹脂(Epon-812; Electron Microscope Science, Fort Washington, PA)中に60で48時間包埋した。樹脂ブロックを、Leica Ultracut ultramicrotome(Leica Microsystems)を使用して90nmの切片にし、5%酢酸ウラシルおよび2.5%クエン酸鉛で染色した。組織サンプルの超微細構造を、Tecnai-F30透過型電子顕微鏡(FEI Company, Hillsboro, OR)を使用して試験した。

【0270】

生後21日目の試験した動物の髄鞘形成パターンを、以前に記載のように(Linet al., 2005)、Image Jソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD)を使用した非有髄軸索の比率および軸索/線維の直径の比(G比)の計算によって評価した。脳を、脳梁を通過して2つの左右対称の半球に分割して矢状切片にした。脳梁の両半球の脳梁膝および脳梁膨大由来の約2 mm^3 のサンプルを、Wild M3Cステレオタイプ顕微鏡を使用して得た。軸索断面が得られる(ミエリン環(myelin ring)が十分に見える)樹脂ブロック中の標本の方法を選択し、少数のサンプル切片のトルイジンブルー染色によって確立した。選択した方向の樹脂ブロックを、電子顕微鏡試験のために処理した。無作為に選

扱った領域を試験し、脳梁膝および脳梁膨大の両方由来の10個の代表的な写真を、12000倍で得た。非有髄軸索数を、ミエリンを欠き、且つそれ自体の原形質膜のみによって富化された軸索の手作業の計数によって評価した。代表的画像中に存在する全ての非有髄軸索を計数し、その比率を、組織サンプルあたり全部で500個の軸索の試験によって計算した。有髄軸索のG比(軸索の直径/線維の直径比)を、髄鞘の内面および外面によって富化された領域のデジタル処理で選択すること、軸索(内面)および線維(外面)の直径を得ること、その対応する値を割ること(軸索直径/線維直径比)によって評価した。群あたり3匹の動物の脳を試験し、脳梁膝および脳梁膨大の両方由来の全部で150の神経線維のG比を試験した。結果を、G比および非有髄軸索の平均±SD(研究群あたりn=3)で示した。

10

【0271】

i) 混合初代乏突起膠細胞培養物およびSTAT1転位置アッセイ

混合初代乏突起膠細胞培養物を、以前に記載のように調製した(Baerwald et al., 2000)。簡潔に述べれば、PLP/SOCS1およびC57B1/6J交配の2~3日齢の新生児から脳組織を採取した。同腹仔がトランスジェニックの仔および野生型の仔を含んでいたため、各動物の脳を個別に処理し、個別に培養し、その後に表示型を適合させた。各脳を、0.25%トリプシンおよび10μg/ml DNAase I (Invitrogen)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を使用して37で20分間個別に消化し、細胞を、ポリD-リジンコーティング75mm²フラスコ(Sigma-Aldrich)上で培養した。培養物を、10%ウシ胎児血清DMEMを使用して37、5%CO₂で12日間維持し、次いで、5μl/mlのインスリン、50μl/mlのトランスフェリン、30nMのセレン、10nMのビオチン、10nMのプロゲステロン、15nMのT3、0.1%ウシ血清アルブミン、および1%アンピシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich)を含む合成培地に交換した。分化5日目に、培養物を、100U/mlのIFN- (Calbiochem, San Diego, CA)で30分間処置した。抗PLP抗体および抗Stat1抗体の二重免疫染色ならびにDAPI核染色を、上記のように行った。Stat1核転位置アッセイを、6つの個別の培養調製物で行った。野生型およびPLP/SOCS1培養物中の100個のPLP陽性細胞を手作業で計数した。結果を、Stat1核転位置に陽性を示す細胞の平均±SD%として示す。

20

30

【0272】

j) 統計分析

全データを、3つの独立した実験から作成した。平均、標準偏差、およびp値を、Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA)のAverage、Stdev、およびAnovaを使用して計算した。統計的有意差を、0.05未満のp値と定義した。

【0273】

2. PLP/SOCS1トランスジェニックマウス系統の特徴付け

実施例25に記載のように作製したPLP/SOCS1トランスジェニックマウスを、髄鞘形成細胞中でFlagエピトープタグ化SOCS1を発現する用にデザインした(図30A)。これらのマウスは、表現型異常を示さず、メンデルの法則において交配してトランスジェニック子孫を作製し、通常寿命である。1歳までの異なる時点で行った組織学的評価(電子顕微鏡法が含まれる)により、トランスジェニック同腹仔と野生型同腹仔との間で、髄鞘形成パターンまたは乏突起膠細胞の数、密度、もしくは形態学(以下を参照のこと)に有意差は認められなかった。

40

【0274】

生後21日目のPLP/SOCS1導入遺伝子の発現を、いくつかの方法を使用して特徴づけた。SOCS1 cDNAハイブリッド形成プローブを使用したノーザンプロット分析により、コントロール脳サンプルと比較してトランスジェニックマウス脳由来のRNAサンプル中のバンドの強度の増加が明らかとなったが、他の組織ではそうではなかった(

50

図30B)。導入遺伝子特異的プライマーを使用したリアルタイムPCR分析により、脳、脊髄、および座骨神経中で導入遺伝子由来のSOCS1 mRNAの濃度が最も高く、他の器官(心臓、胸腺、脾臓、および肝臓が含まれる)では有意により低いことが明らかとなった(図30C)。導入遺伝子の発現は、12月齢まで安定なようであった(データ示さず)。

【0275】

Flagタグに対する抗体を使用したウェスタンブロット分析により、PLP/SOCS1脳溶解物中のSOCS1の推定サイズに対応する19kDのバンドが明らかとなったが、野生型脳溶解物やPLP/SOCS1脾臓溶解物では層ではなかった(図30D)。Flag-SOCS1タンパク質発現をさらに確認するために、本発明者らは、抗Flag抗体を使用した免疫沈降を行い、これにより、PLP/SOCS1脳免疫沈降物中に19kDの陽性バンドが再度検出されたが、野生型脳やPLP/SOCS1脾臓免疫沈降物中には検出されなかった(図30E)。

10

【0276】

抗SOCS1抗体および抗Flag抗体を使用した野生型およびPLP/SOCS1脳の間接的免疫沈降も、導入遺伝子の発現が証明された(図30F~I)。本発明者らは、PLP/SOCS1脳のみにおいて抗Flagおよび抗SOCS1免疫陽性を検出した。

【0277】

CNS中にFlag-SOCS1発現を局在化するために、本発明者らは、野生型およびPLP/SOCS1脳組織の抗Flag抗体および抗PLP抗体(ミエリンのマーカ)または抗CC1抗体(乏突起膠細胞の細胞体のマーカ)のいずれかとの二重免疫染色を行った。抗PLP抗体と抗Flag抗体の間および抗CC1抗体と抗Flag抗体との間に強い共存が認められ(データ示さず)、Flag-SOCS1が白質および乏突起膠細胞に局在することが示唆された(図31)。抗Flag抗体、抗PLP抗体、または抗CC1抗体の非共存免疫陽性は検出されなかった。

20

【0278】

抗PLP抗体および抗Flag抗体での二重免疫染色によってトランスジェニック動物から確立した初代混合乏突起膠細胞培養物中でのFlag-SOCS1の発現も検出された(図32)。Flag-SOCS1の発現は、PLP/SOCS1動物由来の培地のみおよびPLPを発現する細胞のみで検出された。実質的に全てのPLP陽性細胞もFlag-SOCS1陽性を示した。抗Flagと抗PLP免疫反応との間の共存は、細胞体および細胞突起の両方を含むようであった(図32F)。

30

【0279】

3. PLP/SOCS1マウス由来の乏突起膠細胞はIFN- γ に対する反応性が減少する

初代混合グリア培養物におけるIFN- γ に対するPLP/SOCS1乏突起膠細胞の反応性を研究した。トランスジェニックSOCS1の発現がIFN- γ シグナル伝達分子Stat1の核転位置を妨害するかどうかを決定するために、細胞培養物を、100U/mLのIFN- γ で30分間処置し、抗PLP抗体および抗Stat1抗体をDAPI核色素と共に使用して免疫染色を行った(図33)。野生型培養物におけるStat1細胞内局在の実験により、全ての細胞(PLP陽性乏突起膠細胞が含まれる)におけるDAPI陽性核との強い共存が明らかとなった。対照的に、PLP/SOCS1培養物中のStat1細胞内局在化により、IFN- γ に対する差分応答が明らかとなった。トランスジェニックPLP陽性乏突起膠細胞では、Stat1が細胞質中に残存し、IFN- γ の存在下で細胞核と共存しなかった(図33E~H)。これは、野生型細胞と類似してStat1核局在化を伴ってIFN- γ に反応した周囲のPLP陰性細胞の応答と対照的であった。野生型培養物中の実質的に全てのPLP陽性乏突起膠細胞(96 \pm 3細胞)がStat1核転位置を伴ってIFN- γ 刺激に反応した。対照的に、Stat1核転位置は、IFN- γ 刺激後の偶発的(occasional)PLP陽性乏突起膠細胞(6 \pm 2細胞

40

50

)においてのみ検出された ($p < 0.05$)。

【0280】

本発明者らは、次に、IFN- γ 感受性の指標としての主要組織適合遺伝子複合体クラスI (MHCクラスI)分子発現の誘導を使用して、*in vivo*でのIFN- γ に対するPLP/SOCS1乏突起膠細胞の反応性を特徴づけた。SOCS1がMHCクラスI分子のIFN- γ 媒介性誘導を阻害する能力を、二重トランスジェニック系で試験した。CNS中で低レベルのIFN- γ を発現するMBP/IFN- γ (172系統)単一トランスジェニックマウス (Gao et al., 2000)をPLP/SOCS1マウスと交配し、単一および二重トランスジェニック子孫を、MHCクラスI分子発現の相違について試験した (図34)。MHCクラスI分子発現は、コントロール野生型マウスおよびPLP/SOCS1マウスのいずれでも検出できなかった (図34A~D)。以前の報告と一致して、MBP/IFN- γ マウスは、MHCクラスI分子の発現が上方制御され、髄鞘に沿って散在性タンパク質が局在した (図34E、F) (Corbin et al., 1996)。しかし、二重トランスジェニックマウス (MBP/IFN- γ x PLP/SOCS1)は、差分パターンのMHCクラスI分子発現を示した (図34G~J)。図34に示すように、Flagタグ化SOCS1に陽性を示す乏突起膠細胞およびミエリンは、検出可能なレベルのMHCクラスI分子を発現しなかったのに対して、導入遺伝子発現に陰性を示し、且つSOCS1陽性細胞に極めて近接した細胞は、強い免疫反応性を示した (図34G~j)。MHCクラスI分子発現の類似の差分上方制御は、PLP/SOCS1マウスの脳内のIFN- γ の直接投与後に認められた (データ示さず)。まとめると、これらのデータは、PLP/SOCS1マウス由来の乏突起膠細胞がIFN- γ に対する反応性の減少を示す。

10

20

【0281】

4. PLP/SOCS1マウスは、成長中にIFN- γ による損傷の影響から防御される

成長中のマウスのCNSにおけるIFN- γ のトランスジェニック発現により、乏突起膠細胞が喪失し、髄鞘低形成が起こる (Corbin et al., 1996; Lin et al. 2005)。SOCS1発現がIFN- γ による損傷の影響から成長中の乏突起膠細胞を防御することができるかどうかを決定するために、本発明者らは、PLP/SOCS1マウスを、異なるレベルでCNS中でIFN- γ を過剰発現する以下の3つのトランスジェニックマウス系統と交配させた：MBP/IFN- γ (172系統)、GFAP/tTA x TRE/IFN- γ (184/110系統)、およびGFAP/tTA x TRE/IFN- γ (184/67系統)。以下の3つの交配系を確立した (材料と方法に詳述)：MBP/IFN- γ x PLP/SOCS1 (172 x PLP/SOCS1、二重トランスジェニック系)およびGFAP/tTA x TRE/IFN- γ x PLP/SOCS1 (184/110 x PLP/SOCS1および184/67 x PLP/SOCS1、2つの三重トランスジェニック系)。各交配系の同腹仔 (F1世代)を、その表現型に応じて以下の4つの研究群に分類した：野生型/単一トランスジェニックコントロール、SOCS1のみを発現するマウス、IFN- γ のみを発現するマウス、IFN- γ およびSOCS1の両方を発現するマウス。交配系あたり全部で40匹の動物 (各研究群あたり10匹)を回収し、生後21日目に臨床的および組織学的に試験した。

30

40

【0282】

誕生から生後21日目まで同腹仔の表現型比較を行った。評価は、挙動観察および振戦を誘発するための負荷梯子歩行からなつた。別の場所で報告された所見 (Corbin et al., 1996)と一致して、MBP/IFN- γ (172系統)マウスは、CNS中に低レベルのIFN- γ を発現し、挙動の異常性は示されなかった。MBP/IFN- γ x PLP/SOCS1 (172 x PLP/SOCS1)交配系のF1世代由来のマウスは、表現型に関係なく挙動異常は示されなかった。二重トランスジェニックGFAP/tTA x TRE/IFN- γ (184/110系統)およびGFAP/tTA x TRE/IFN- γ (184/67系統)マウスは、軽度から中等度の振戦を示し、これは、出

50

生後第2週中に出現し、21日齢までにピークに達する(Lin et al., 2004; 2005)。GFAP/tTA×TRE/IFN- γ ×PLP/SOCS1交配系のF1世代由来のマウスは、振戦を示し、その発生は、表現型に依存した(表2)。

【0283】

【化12】

表2: トランスジェニック同腹仔の間の振戦の発生

	野生型/コントロール	<u>SOCS1</u>	<u>IFN-γ</u>	<u>IFN-γ×SOCS1</u>
172×PLP/SOCS1	0%	0%	0%	0%
184/110×PLP/SOCS1	0%	0%	80% (8/10)	10% (1/10)
184/67×PLP/SOCS1	0%	0%	100% (10/10)	30% (3/10)

10

3つのトランスジェニック交配系(172×PLP/SOCS1、184/110×PLP/SOCS1、および184/67×PLP/SOCS1)由来の同腹仔を、その表現型に従って以下の4つの群に階層化した: 野生型/コントロールマウス、SOCS1のみを発現するマウス、IFN- γ のみを発現するマウス、IFN- γ およびSOCS1の両方を発現するマウス。群あたり10匹のマウスを生後から最初の3週間臨床的に追跡し、振戦の発生を記録した。

【0284】

野生型マウスおよび単一トランスジェニックコントロールマウス(GFAP/tTA[184]、TRE/IFN- γ [67および110])、およびPLP/SOCS1マウスの表現型は臨床的に正常であった。振戦表現型(重症度は多様である)を、IFN- γ を過剰発現するほとんど全ての二重トランスジェニックGFAP/tTA×TRE/IFN- γ マウスで同定された(80%(8/10)の184/110マウスおよび100%(10/10)の184/67マウス)。IFN- γ およびSOCS1の両方を過剰発現する三重トランスジェニックGFAP/tTA×TRE/IFN- γ ×PLP/SOCS1マウスは、防御されるようであった。なぜなら、10%(1/10)の184/110×PLP/SOCS1マウスおよび30%(3/10)の184/67×PLP/SOCS1マウスしか振戦を発症しなかったからである(表2)。

20

【0285】

3つ全てのトランスジェニック交配系の臨床的に試験された同腹仔を、生後21日目の組織学的異常についてさらに評価した。各交配系由来の研究群あたり3匹の動物を、乏突起膠細胞およびミエリンの異常性について組織学的に試験した。屠殺時(固定灌流前)に各動物から脳組織を単離し、総RNAを単離した。SOCS1発現がIFN- γ 導入遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性を、定量的PCR(Q-PCR)を使用して、3つ全てのトランスジェニック交配系において試験した(図35A)。IFN- γ 発現は、172×PLP/SOCS1トランスジェニック系でのMBP/IFN- γ 単一トランスジェニックおよびMBP/IFN- γ ×PLP/SOCS1二重トランスジェニック同腹仔、184/110×PLP/SOCS1トランスジェニック系のGFAP/tTA×TRE/IFN- γ 二重トランスジェニックおよびGFAP/tTA×TRE/IFN- γ ×PLP/SOCS1三重トランスジェニック同腹仔、184/67×PLP/SOCS1トランスジェニック系のGFAP/tTA×TRE/IFN- γ 二重トランスジェニックおよびGFAP/tTA×TRE/IFN- γ ×PLP/SOCS1三重トランスジェニック同腹仔で検出された。IFN- γ 発現の2つの特徴が認められた。第1に、3つの交配系はその発現レベルが異なっていた。MBP/IFN- γ ×PLP/SOCS1(172×PLP/SOCS1)は最も低いIFN- γ レベルを発現し、GFAP/tTA×TRE/IFN- γ ×PLP/SOCS1(184/67×PLP/SOCS1)は最も高いIFN- γ レベルを発現した。第2に、IFN- γ のみまたはIFN- γ およびSOCS1の両方を発現する同一交配系の同腹仔は、その発現レベルが異ならなかった。野生型、GFAP/tTA、およびTRE/IFN- γ 単一トランスジェニックおよびPLP/SOCS1同腹仔で検出可能レベルのIFN- γ は見出されなかった。(図35A)。

30

40

50

【0286】

全トランスジェニック交配系由来の研究群あたり3匹の動物の脳を、乏突起膠細胞密度を決定するためのCC1抗体を使用した免疫組織化学分析のために処理した(図35Bおよび図33)。MBP/IFN-マウスは、以前に報告された結果に一致して(Gao et al., 2000)、GFAP/tTA×TRE/IFN-マウスと比較してCNS中で最も低いレベルのIFN-を発現し、CC1陽性細胞密度に有意な異常は認められなかった。本発明者らは、MBP/IFN-×PLP/SOCS1(172×PLP/SOCS1)交配系のF1世代由来のマウスの間で乏突起膠細胞密度の統計的有意差は見出さなかった。三重トランスジェニック系(GFAP/tTA×TRE/IFN-×PLP/SOCS1)では、本発明者らは、F1世代由来のマウスにおける乏突起膠細胞密度が遺伝子型に応じて異なることを見出した(図35Bおよび図36)。野生型マウスおよび単一トランスジェニックマウス(PLP/SOCS1、GFAP/tTA、およびTRE/IFN-)は、類似の乏突起膠細胞密度を有していた。本発明者らは、野生型および単一トランスジェニック同腹仔と比較してIFN-を過剰発現するGFAP/tTA×TRE/IFN-マウスで厳格な用量依存性の乏突起膠細胞喪失を見出した。184/110マウスで約20%の乏突起膠細胞が喪失し(野生型マウスの 146 ± 6 CC1(+)細胞/mm²からIFN-マウスの 115 ± 8 CC1(+)細胞/mm²まで)、184/67マウスで約40%が喪失した(野生型マウスの 144 ± 5 CC1(+)細胞/mm²からIFN-過剰発現マウスの 79 ± 9 CC1(+)細胞/mm²まで)。対照的に、IFN-およびSOCS1の両方を過剰発現するGFAP/tTA×TRE/IFN-×PLP/SOCS1三重トランスジェニック同腹仔は、IFN-のみを過剰発現するマウスと比較して統計的に有意により少数の乏突起膠細胞を喪失した。184/110×PLP/SOCS1マウスで約8%の乏突起膠細胞を喪失し(PLP/SOCS1マウスの 141 ± 6 CC1(+)細胞/mm²からIFN-およびSOCS1過剰発現マウスの 129 ± 6 CC1(+)細胞/mm²まで)、184/67×PLP/SOCS1マウスで約15%喪失した(PLP/SOCS1マウスの 142 ± 5 CC1(+)細胞/mm²からIFN-およびSOCS1過剰発現マウスの 112 ± 7 CC1(+)細胞/mm²まで)(図35Bおよび図36)。

10

20

【0287】

採取した脳における髄鞘形成パターンを、電子顕微鏡法を使用してさらに評価し、髄鞘形成レベルを、G比(軸索直径/線維直径比)および非有髄軸索の比率の計算によって評価した(図35CおよびD、および図37)。本発明者らは、野生型、単一トランスジェニック、およびMBP/IFN-×PLP/SOCS1(172×PLP/SOCS1)交配系由来の二重トランスジェニック同腹仔の間のG比に統計的有意差は見出さなかった。三重トランスジェニック系(GFAP/tTA×TRE/IFN-×PLP/SOCS1)では、表現型に応じてF1世代マウスの間でG比に有意差が見出された(図35Cおよび図36)。野生型、GFAP/tTA、TRE/IFN-、PLP/SOCS1単一トランスジェニック同腹仔の間のG比は類似していた。IFN-過剰発現GFAP/tTA×TRE/IFN-同腹仔は、髄鞘低形成(0.8を超えるG比と定義する)を示す有意に増加したG比を示した: 184/110マウスについては 0.89 ± 0.02 、184/67マウスについては 0.95 ± 0.04 (図35C)。対照的に、IFN-およびSOCS1を過剰発現するその三重トランスジェニック(GFAP/tTA×TRE/IFN-×PLP/SOCS1)同腹仔は、有意に低いG比を示した: 184/110×PLP/SOCS1マウスについては 0.75 ± 0.03 (正常範囲内)、184/67×PLP/SOCS1マウスについては 0.82 ± 0.08 (図35Cおよび図37)。

30

40

【0288】

ミエリン異常を、種々のトランスジェニック遺伝子型における非有髄軸索の比率の決定によってさらに定量した(図35D)。遺伝子型と無関係に、MBP/IFN-×PLP/SOCS1(172×PLP/SOCS1)二重トランスジェニック系のF1世代の

50

同腹仔間の非有髄軸索（9%未満）の比率に有意差は認められなかった（図35D）。しかし、三重トランスジェニックGFA/tTA×TRE/IFN- α PLP VSOC S1系では、非有髄軸索の分布は、遺伝子型に応じて異なった（図35D）。野生型および単一トランスジェニックコントロールマウスと比較して、GFA/tTA×TRE/IFN- α 同腹仔を過剰発現するIFN- α の非有髄軸索の比率は有意に増加した：184/110マウスで41% \pm 6、184/67マウスで57% \pm 7。対照的に、IFN- α およびSOC S1の両方を過剰発現する三重トランスジェニックGFA/tTA×TRE/IFN- α PLP/SOC S1は、IFN- α のみを過剰発現するマウスと比較して、非有髄軸索の比率が有意により低かった：184/110×PLP/SOC S1マウス13% \pm 3のみ、および184/67×PLP/SOC S1マウスで17% \pm 4.5（図35D）。まとめると、これらのデータは、SOC S1の乏突起膠細胞発現が成長中のCNSにおけるIFN- α 発現の臨床的および形態学的結果からマウスを防御することを証明する。

【0289】

CNS内のT細胞由来サイトカインIFN- α の存在は、免疫媒介性脱髄障害の病理発生に極めて重要な役割を果たすと考えられている（Panitch et al., 1987; Galbinski et al., 1999; Tran et al., 2000; Vartanian et al., 1996; Horwitz et al., 1997; Steinman, 2001）。それにもかかわらず、サイトカインの影響を受ける細胞標的は未解決のままである。この報告では、本発明者らは、乏突起膠細胞がIFN- α に応答する能力の有意な低下を示すトランスジェニックマウスの作製を記載している。これらのマウスは、CNS内のIFN- α の異所性発現の障害作用から防御され、このことは、乏突起膠細胞に及ぼすIFN- α の直接的な悪影響が免疫媒介性疾患の病理発生に寄与する。以下に考察するように、記載の研究は有意な臨床上の意義を有する。

【0290】

生後発育中のCNS中にIFN- α を異所的に発現するトランスジェニック動物は、髄鞘を低形成し、乏突起膠細胞数が減少する（Corbin et al., 1996; LeFerla et al., 2000; Lin et al., 2005）。さらに、脱髄傷害後のCNS中のIFN- α 発現の誘導により、脱髄病変の乏突起膠細胞の再増殖の減少および再髄鞘形成障害を引き起こす（Lin et al., 印刷中）。以前に報告した本発明者らのデータにより、CNS中のIFN- α の存在が乏突起膠細胞中のERストレス応答を活性化し、このことが認められた病理学的影響に寄与することが示唆される。（Lin et al., 2005; 印刷中）。しかし、乏突起膠細胞に及ぼすIFN- α の障害作用が直接作用の結果であるのかどうか、または恐らく小グリア活性化による二次的効果に相当するののかどうかは不明である。

【0291】

IFN- α はまた、in vitroでの乏突起膠細胞およびその子孫に悪影響を及ぼすことが示されている。少なくともこのサイトカインの障害作用の一部が小グリア細胞の活性化を通して仲介されることを示す、無視できない証拠が存在する。IFN- α 処置小グリアは細胞傷害因子（一酸化窒素および腫瘍壊死因子が含まれる）を放出し、細胞傷害因子は乏突起膠細胞を損傷することが知られている（Merrill et al., 1991, 1993, Loughlin et al., 1997）。in vitroで精製乏突起膠細胞を使用した研究により、サイトカインが乏突起膠細胞に直接的な悪影響を及ぼし得ることが示唆される（Torres et al., 1995; Agresti et al., 1996; Baerwald et al., 1998; Andrews et al., 1998; Lin et al., 2005）。IFN- α は、アポトーシス死を生じる傾向があり得る乏突起膠細胞前駆細胞の細胞周期からの離脱を阻害することが示されている（Chew et al., 2005）。さらに、IFN- α は、乏突起膠細胞成長のための非常に強力なアポトーシス誘導因子であることが示されている（Baerwald et al., 1998, 2000; Lin et al.,

10

20

30

40

50

2005)。in vitroで成熟乏突起膠細胞マーカーの発現点まで分化することが可能な乏突起膠細胞は、サイトカインの存在に対する感受性が低い、最終的には壊死に至る(Baerwald et al., 1998)。

【0292】

in vivoでの乏突起膠細胞に及ぼすIFN- γ の直接的対間接的影響を区別するために、本発明者らは、IFN- γ に対する乏突起膠細胞特異的応答性が減少したトランスジェニックマウスを作製した。IFN- γ 受容体サブユニット1のドミナントネガティブ形態(IFNGR1)またはサイトカインシグナル伝達1の抑制因子(SOCS1)のいずれかをコードするトランスジェニックマウスが以前に記載されている(Flodstrom et al., 2001; Gonzales et al., 2005, Hindinger et al., 2005)。IFNGR1のドミナントネガティブ形態の過剰発現により、野生型IFNGR1の分解およびIFN- γ 細胞結合部位の消失が促進された(Dighe et al., 1994)。SOCS1は、JakキナーゼによってIFN- γ 媒介性Stat1活性化(すなわち、リン酸化)を阻害する細胞内タンパク質である(Starr et al., 1997; Song and Shuai 1998; Sakamoto et al., 2000; Yasukawa et al., 2000; Kubo et al., 2003; Stark et al., 1998; Levy and Darnell, 2002)。SOCS1遺伝子のターゲティングされたヌル変異を有するマウス変異体は、IFN- γ に対して異常な過敏症を示し、正常レベルのサイトカインの存在下で多臓器不全にて死亡する(Starr et al., 1998; Alexander et al., 1999; Bullen et al., 2001)。さらに、SOCS1の強制発現により、種々の細胞型でIFN- γ 無反応状態が得られることが示されている(Tunley et al., 2001, 2002; Chong et al., 2001, Federici et al., 2002; Flodstrom et al., 2001)。

10

20

【0293】

PLP/SOCS1マウスは表現型異常または組織学的異常を示さず、このことは、in vitroでの成長因子のシグナル伝達への関与が示唆されるにもかかわらず、Stat1活性化が正常な乏突起膠細胞成長に必要なではないことが示された(Dell'Albani et al., 1998)。本発明者らの所見は、乏突起膠細胞またはミエリン異常を示さないが、IFN- γ 細胞応答が有意に損なわれたというStat1(-/-)ノックアウトマウスの表現型特性によって支持される(Meraz et al., 1996)。したがって、Stat1活性化が乏突起膠細胞の損傷および成長に差分的役割を果たすようである。

30

【0294】

PLP/SOCS1マウスの機能試験により、IFN- γ に対する乏突起膠細胞特異的応答性(Stat1活性化(すなわち、リン酸化)の阻害および核転位、ならびにMH2クラスI分子の上方制御が含まれる)がさらに証明された。CNS中のIFN- γ を過剰発現するトランスジェニックマウスと交配した場合、PLP/SOCS1マウスは、IFN- γ の有害な臨床上的影響および組織学的影響から防御された。PLP/POCS1導入遺伝子も有するIFN- γ 過剰発現トランスジェニックマウスは、PLP/POCS1導入遺伝子を持たないIFN- γ 発現マウスと比較して、有意な乏突起膠細胞およびミエリン保存ならびにより低い振戦発症を示した。それにより、本発明者らの研究結果は、IFN- γ が成長中の乏突起膠細胞に障害作用を及ぼすことを示す。

40

【0295】

SOCS1の過剰発現によって乏突起膠細胞が防御され、IFN- γ シグナル伝達の阻害によって細胞への影響が軽減することが示唆された。他で報告され、且つ本発明者らも認めるように、野生型乏突起膠細胞は、正常な条件下でほぼ検出不可能な量のSOCS1を発現し、炎症性条件下でさえも、周囲のグリア細胞および炎症細胞と比較してSOCS1発現が非常に低かった(Polizzotto et al., 2000; Wang

50

and Campbell 2002; Maier et al., 2002)。このような低構成性発現は、IFN- γ /Jak/Stat1シグナル伝達の有効な下方制御のための乏突起膠細胞の能力を制限し、それにより、IFN- γ 細胞の影響が増大し得る。本発明者らの実験系で認められた乏突起膠細胞におけるSOCS1過剰発現の救済効果は、この可能性を支持する。

【0296】

環境および実験による証拠により、IFN- γ が免疫媒介性脱髄障害である多発性硬化症で有害な役割を果たすことが示唆される(Popko et al., 1997, Steinman 2001)。IFN- γ は脱髄病変中に見出され、脳脊髄液中のそのレベルが疾患の重症度に相関する(Vartanian et al., 1996; Calabresi et al., 1998; Becher et al., 1999; Moldovan et al., 2003)。MS患者へのIFN- γ の投与によって疾患が悪化し、IFN- γ の中和抗体が疾患進行を遅延させることが示されている(Panitch et al., 1987; Skurkovich et al., 2001)。おそらく乏突起膠細胞によるSOCS1のターゲティングされた発現によるIFN- γ の局所効果の減少は、治療的に有益であり得る。脱髄障害後の乏突起膠細胞の再髄鞘形成は、IFN- γ の存在に対してより高い感受性を示し(Lin et al., in press)、したがって、このような防御は再髄鞘形成の促進に特に有用であろう。

10

【0297】

幹細胞療法は、脱髄障害(多発性硬化症および副腎白質ジストロフィなど)の潜在的治療アプローチとして急速に興味を持たれつつある(review in Keirstead 2005)。損傷CNSの細胞外環境に存在する有害サイトカインに耐性を示すように操作された幹細胞は、生存および再髄鞘形成の可能性がより高くなると予想される。したがって、乏突起膠細胞の損傷および成長に差分的役割を果たすシグナル伝達経路を同定することが興味深い。いかなる観察可能な乏突起膠細胞またはミエリン異常を誘導することのないIFN- γ 媒介性乏突起膠細胞損傷の阻害を記載した本発明者らの結果は、このようなアプローチを支持する。

20

【0298】

まとめると、本発明者らは、トランスジェニックマウスの乏突起膠細胞中のSOCS1の共生発現が乏突起膠細胞および髄鞘形成過程に及ぼす悪影響を防御することを証明した。本発明者らの結果は、髄鞘形成乏突起膠細胞に及ぼすIFN- γ の悪影響の少なくとも一部がこれらの細胞に及ぼす直接的悪影響に起因することを強く示す。さらに、本発明者らの研究により、乏突起膠細胞中のSOCS1の強制発現が免疫媒介性脱髄障害中の過酷な環境を防御することが示唆される。

30

【0299】

【化 1 3】

参考文献

- Agresti C, Bernardo A, Del Russo N, Marziali G, Battistini A, Aloisi F, Levi G, Coccia E (1998) Synergistic stimulation of MHC class I and IRF-1 gene expression by IFN-gamma and TNF-alpha in oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* 10:2975-2983.
- Agresti C, D'Urso D, Levi G (1996) Reversible inhibitory effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 8:1106-11016. 10
- Alexander W, Starr R, Fenner J, Scott C, Handman E, Spring N, Corbin J, Cornish, A, Darwische R, Owczarek C, Kay T, Nicola N, Hertzog P, Metcalf D, Hilton D (1999) Socs1 is a critical inhibitor of interferon-gamma signaling and prevents the potentially fatal action of this cytokine. *Cell* 98:598-608.
- Andrews T, Zhang P, Bhat N (1998) TNFalpha potentiates IFN gamma-induced cell death in oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci Res* 54:574-583.
- Becher B, Giacomini PS, Pelletier D, McCrea E, Prat A, Antel J (1999) Interferon-gamma secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy. *Ann Neurol* 45:247-250. 20
- Baerwald K, Popko B (1998) Developing and mature oligodendrocytes respond differently to the immune cytokine interferon-gamma. *J Neurosci Res* 52:230-239.
- Baerwald K, Corbin J, Popko B (2000) Major histocompatibility complex heavy chain accumulation in the endoplasmic reticulum of oligodendrocytes results in myelin abnormalities. *J Neurosci Res* 15:160-169.
- Billiau A (1996) Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 62:61-130.
- Bullen D, Darwich R, Metcalf D, Handman E, Alexander W (2001) Neutralization of interferon-gamma in neonatal SOCS1^{-/-} mice prevents fatty degeneration of the liver but not subsequent inflammatory disease. *Immunol* 2001, 104:92-98. 30
- Calabresi P, Tranquill L, McFarland H, Cowan E (1998) Cytokine gene expression in cells derived from CSF of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 14:198-205.
- Chew L., King W., Kenedy A, Gallo V (2005) Interferon-gamma inhibits cell cycle exit in differentiating oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 52:127-143. 40
- Chong M, Thomas H, Kay T (2001) gamma-Interferon signaling in pancreatic beta-cells is persistent but can be terminated by overexpression of suppressor of cytokine signaling-1. *Diabetes* 50:2744-2751.

【 0 3 0 0】

【化 1 4】

Corbin J, Kelly D, Rath E, Barwald K, Suzuki K, Popko B (1996) Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice leads to hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* 7:354-370.

Dell'Albani, Kahn M, Cole R, Condorelli D, Giuffrida-Stela A, Vellis J (1998) Oligodendrocyte survival factors, PFGF-AA and CNTF, activate Jak/STAT signaling pathways. *J Neurosci Res* 54:191-205.

Dighe A, Richards E, Old L, Schreiber R (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1:447-456.

10

Doerflinger N, Macklin W, Popko B (2003) Inducible site-specific recombination in myelinating cells. *Genesis* 35:63-72.

Einhauer A, Jungbauer A (2001) The flag peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys* 49:455-465.

Federici M, Giustiziri M, Scarponi C, Girolomini G, Albanesi C (2002) Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory response in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol* 169:434-443.

20

Flodstrom M, Maday A, Balakrishna D, Cleary M, Yoshimura A, Starvetnick N (2001) Target cell defense prevents development of diabetes after viral infection. *Nat Immunol* 3: 373-382.

Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchoff F, Nishiyama A, Macklin W (2000) Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev Biol* 218:259-274.

Gao X, Gilling T, Ye P, D'Ercole J, Matsushima G, Popko B (2000) Interferon- γ protects against cuprizone-induced demyelination. *Mol Cell Neurosci* 16:338-349.

30

Gao X, Kemper A, Popko B (1999) Advanced transgenic and gene-targeting approaches. *Neurochem Res* 24:1183-1190.

Glabinski A, Kranowski M, Han Y, Owens T, Ransohoff R (1999) Chemokine expression in GRO mice (lacking interferon-gamma) with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurovirol* 51:95-101.

Gonzales J, Bergmann C, Fuss B, Hinton D, Kangas C, Macklin W, Stohlman S (2005) Expression of dominant negative IFN- γ receptor on mouse oligodendrocytes. *Glia* 51:22-34.

40

Hindinger C, Gonzalez J, Bergmann C, Fuss B, Hinton D, Atkinson R, Macklin W, Stohlman S (2005) Astrocyte expression of a dominant-negative interferon-gamma receptor.

J Neurosci Res 82:20-31.

【 0 3 0 1】

【 化 1 5 】

- Horwitz M, Evans C, McGavern D, Rodriguez M, Oldstone M (1997) Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma. *Nature Med* 3:1037-1041.
- Keirstead H (2005) Stem cells for the treatment of myelin loss. *Trends Neurosci* 28:677-683.
- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A (2003) Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nature Immunol* 4:1169-1176.
- LaFerla F, Sugarman M, Lane T, Leissring M (2000) Regional dysplasia in transgenic mice with astrocyte-derived expression of interferon-gamma. *J Mol Neurosci* 15:45-59. 10
- Levy D, Darnell J (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Rev Mol Cell Biol* 651-662.
- Lin W, Kemper A, McCarthy K, Pytel P, Wang J, Campbell I, Utset M, Popko B (2004) Interferon-gamma induces medulloblastoma in the developing cerebellum. *J Neurosci* 24:10074-10083.
- Lin W, Harding H, Ron D, Popko B (2005) Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *J Cell Biol* 169:603-612. 20
- Lin W, Kemper A, Dupree J, Harding H, Ron D, Popko B. Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain* (in press).
- Loughlin A, Copelman C, Hall A, Armer T, Young B, Landon D, Cuzner M (1997) Myelination and remyelination of aggregate rat brain cell cultures enriched with macrophages. *J Neurosci Res* 47:384-392.
- Maier J, Kincaid C, Pagenstecher A, Campbell I (2002) Regulation of signal transducer and activator of transcription and suppressor of cytokine-signaling gene expression in the brain of mice with astrocyte-targeted production of interleukin-12 or experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 160:271-288. 30
- Merrill J, Zimmerman R (1991) Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. *Glia* 4:327-31.
- Merrill J, Ignarro L, Sherman M, Melinek J, Lane T (1993) Microglial cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151:2132-2141.
- Meraz M, White J, Sheehan K, Bach E, Roding S, Dighe A, Kaplan D, Riley J, Greenlund A, Campbell D, Caver-Moore K, Dubois R, Clark R, Aguet M, Schreiber R (1996) Targeted disruption of Stat1 gene in mice reveals unexpected physiological specificity in the Jak/STAT signaling pathway. *Cell* 84:431-442. 40
- Moldovan IR, Rudick RA, Coteleur AC, Born SE, Lee JC, Karafa MT, Pelfrey CM (2003) Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol* 141:132-140.

【 0 3 0 2 】

【化 1 6】

Pantitch N, Hirsch R, Haley A, Johnson K (1987) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1:893-895.

Polizzotto M, Bartlett P, Turnley A (2000) Expression of "suppressor of cytokine signaling" (SOCS) genes in the developing and adult mouse nervous system. *J Compar Neurol* 423:348-358.

Popko B, Corbin J, Baerwald K, Dupree J, Garcia A (1997) The effects of interferon-gamma on the central nervous system. *Mol Neurobiol* 14:19-35.

10

Pouly S, Becher B, Blain M, Antel J (2000) Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:280-286.

Sakamoto H, Kinjyo I, Yoshimura A (2000) The janus kinase inhibitor, Jab/SOCS1, is an interferon-gamma inducible gene and determines sensitivity to interferons. *Leuk Lymphoma* 38:49-58.

Skurkovich S, Boiko A, Beliaeva I, Buglak I, Alekseeva T, Smirnova T, Kulakova O, Tchechonin V, Gurova O, Deomina T, Favarova O, Skurkovith B, Gusev E (2001) Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 7:277-284.

20

Song M, Shuai K (1998) The suppressor of cytokine signaling (SOCS1) and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 25:35056-35062.

Steiman L (2001) Blockade of gamma interferon might be beneficial in MS. *Mult Scler* 7:275-276.

Stark G, Kerr I, Williams B, Silverman R, Schreiber R (1998) How cells respond to interferons. *Ann Rev Biochem* 67:257-264.

30

Starr R, Wilson T, Viney E, Murray L, Rayner J, Jenkins J, Brendan J, Gonda T, Alexander W, Metcalf D, Nicola N, Hilton J (1997) A family of cytokine inducible inhibitors of signaling. *Nature* 387:917-921.

Starr R, Donald M, Elefanta A, Brysha, M, Wilson T, Nicola A, Hilton D, Alexander W (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiency in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *PNAS USA* 95:14395:14999.

Torres C, Aranguéz I, Rubio N (1995) Expression of interferon-gamma receptors on murine oligodendrocytes and its regulation by cytokines and mitogens. *Immunology* 86:250-255.

Tran E, Prince E, Owens T (2000) IFN-gamma shapes invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 164:2759-2768.

40

Traugott U (2001) Evidence for immunopathogenesis. In: *Handbook of Multiple sclerosis* (Cook S, ed) 3d edition, pp163-192, New York: Marcel Deker.

【 0 3 0 3 】

【化 17】

Tunley A, Starr R, Bartlett P (2002) Failure of sensory neurons to express class I MHC is due to differential SOCS1 expression. *J Neuroimmunol* 123:35-40.

Tunley A, Starr R, Bartlett P (2001) SOCS1 regulates interferon-gamma mediated sensory neuron survival. *Neuroreport* 16:3443-3445.

Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K (1995) Interferon- γ induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1:732-743. 10

Wang J, Campbell I (2002) Cytokine signaling in the brain: putting a SOCS in it? *J Neurosci Res* 67:423-427.

Wight P, Duchala C, Readhead C, Macklin W (1993) A myelin proteolipid protein-lacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J Cell Biol* 123:443-454.

Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A (2000) Negative regulation of signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 18:143-164.

【図面の簡単な説明】 20

【0304】

【図1】図1は、二重トランスジェニックマウス (GFAP/tTA、TRE/IFN-) の IFN- 発現パターンの ELISA 分析の結果を示す。(A) クプリゾンで処置した二重トランスジェニックマウスの前脳中の IFN- タンパク質発現の ELISA 分析 (n = 2)。(B) クプリゾンで処置した二重トランスジェニックマウスの脳梁中の MHC-I 発現のリアルタイム PCR 分析 (n = 3)。* p < 0.05、** p < 0.01。

【図2】図2は、クプリゾンで処置した二重トランスジェニックマウスの脳梁中の CC1 抗体での成熟乏突起膠細胞の免疫染色の比較結果を示す。(A) CC1 免疫染色 (赤色蛍光) によって検出した成熟乏突起膠細胞は、DOX+ および DOX- 二重トランスジェニックマウスの両方で5週間までに枯渇するようになった。回復中の乏突起膠細胞の再生は、8週目の DOX- 二重トランスジェニックマウスで顕著に減少した。青色蛍光は、DAPI 対比染色を示す (n = 3、スケールバー = 25 μ m)。(B) クプリゾンで処置した二重トランスジェニックマウスの脳梁中の CC1 陽性細胞数 (n = 3、* p < 0.01)。

【図3】図3は、DOX+ および DOX- 二重トランスジェニックマウスの両方の脳梁の免疫組織化学的分析および電子顕微鏡分析の結果を示す。(A) MBP 免疫染色は、IFN- の存在が5週目にクプリゾン誘導性脱髄に影響を及ぼさず、8週目に再髄鞘形成を抑制したことを示した (n = 4、スケールバー = 50 μ m)。(B) MBP 免疫染色についての髄鞘形成スコア (成体雄マウスの完全な脱髄は0であり、正常な髄鞘形成は4である、n = 4、* p < 0.01)。

【図4】図4A。EM 分析によって脱髄および再髄鞘形成を評価した (n = 4) (スケールバー = 0.5 μ m)。(B) 再髄鞘形成した軸索の比率を、8週目の4匹のマウスから計算した (* p < 0.01)。

【図5】図5は、8週間にわたる DOX+ および DOX- 二重トランスジェニックマウスにおける MBP、PLP、および CGT の相対的 RNA レベルを示すリアルタイム PCR の結果を示す。クプリゾンで処置したマウスの脳梁中のミエリン遺伝子の発現パターン (n = 3) を得た。(A) MBP の相対的 mRNA レベルのリアルタイム PCR 分析 (* p < 0.05)。(B) PLP の相対的 mRNA レベルのリアルタイム PCR 分析 (* p < 0.05)。(C) CGT の相対的 mRNA レベルのリアルタイム PCR 分析 (* p < 0.05) 50

. 05)。

【図6】図6は、クプリゾンで処置したDOX+およびDOX-マウスの脳梁中のNG2陽性OPCの免疫染色を示す。(A)6週目および(B)8週目のDOX+二重トランスジェニックマウスの脳梁中のNG2免疫染色。(C)6週目および(D)8週目のDOX-二重トランスジェニックマウスの脳梁中のNG2免疫染色。赤色蛍光は、NG2免疫反応性を示す。青色蛍光は、DAPIでの対比染色を示す。スケールバー=24 μ m。(E)クプリゾンで処置したマウスの脳梁中のNG2陽性細胞(n=3、*p<0.05)。

【図7】図7は、障害の発症および障害からの回復中のDOX-およびDOX+EEEを罹患したマウスについての臨床スコアを示す。EEEの回復段階でのIFN- γ のCNS送達により、疾患の回復が遅延する。平均臨床スコア、各遺伝子型についてn=25。

【図8】図8は、PID50でのEEEからの回復中のCNSに及ぼすIFN- γ の影響を示す。特に、EEEの回復段階でのIFN- γ のCNS送達により、PID50での再髄鞘形成が阻害される。(A)DOX+マウスの腰髄中のMBP免疫染色。(B)PID7でのドキシサイクリンから放出されたDOX-マウスの腰髄中のMBP免疫染色。(C)DOX+マウスの腰髄中のトルイジンブルー染色。(D)PID7でのドキシサイクリンから放出されたDOX-マウスの腰髄中のトルイジンブルー染色。(E)DOX+マウスの腰髄中のCC1染色。(F)PID7でのドキシサイクリンから放出されたDOX-マウスの腰髄中のCC1染色。(G)DOX+マウスの腰髄中の非リン酸化神経フィラメント-H免疫染色。(H)PID7でのドキシサイクリンから放出されたDOX-マウスの腰髄中の非リン酸化神経フィラメント-H免疫染色。パネルAおよびBのスケールバー=50 μ m、パネルC~Hのスケールバー=25 μ m。パネルEおよびF中の赤色蛍光は、CC1免疫反応性を反映し、青色蛍光は、DAPI対比染色を示す。実験を三連で行った。

【図9】図9は、EEEを罹患したマウスのCNS中の脱髄病変中の炎症性浸潤を示す。EEEの回復段階でのIFN- γ のCNS送達により、脱髄病変における炎症性浸潤が増強される。(A)DOX+マウスの腰髄中のCD3免疫染色。(B)PID7でのドキシサイクリンから放出されたDOX-マウスの腰髄中のCD3免疫染色。(C)DOX+マウスの腰髄中のCD11b免疫染色。(D)PID7でのドキシサイクリンから放出されたDOX-マウスの腰髄中のCD11b免疫染色。(E)PID50でのDOX+およびDOX-マウスの腰髄中の炎症性マーカーの発現のリアルタイムPCR分析。実験を三連で行った(*p<0.05、**p<0.01)。

【図10】図10は、再髄鞘形成中のERストレスマーカーの発現に及ぼすIFN- γ の影響を示す。クプリゾンを用いて脱髄が誘導されたDOX+およびDOX-マウスの腰髄中の(A)BIPmRNAおよび(B)CHOPmRNAのリアルタイムPCR分析(n=3、*p<0.05)。(C)(A)のDOX+およびDOX-マウスの腰髄中のアクチンと比較したCHOP、p-eIF-1、eIF-2の発現のウェスタンブロット分析。(D)8週目のDOX+マウス(D)およびDOX-マウス(E)の腰髄中のCC1およびp-eIF-2の二重免疫染色。パネルDおよびE:n=3、スケールバー=10 μ m;赤色蛍光はCC1免疫反応性を反映し、緑色蛍光はp-eIF-2免疫反応性を反映する。再髄鞘形成に及ぼすIFN- γ の有害な影響は、ERストレスに関連する。

【図11】図11は、PERK酵素の変異について野生型またはヘテロ接合性であるDOX+およびDOX-マウス(PERK+/-)の腰髄中の再髄鞘形成状態の比較を示す。(A)9週目の腰髄中の電子顕微鏡写真(n=5、スケールバー=0.5 μ m)。(B)9週目の5匹のマウスにおける再髄鞘軸索の比率を示すグラフである(*p<0.01)。

【図12】図12は、PERK酵素の変異について野生型またはヘテロ接合性であるDOX+およびDOX-マウス(PERK+/-)の腰髄中の乏突起膠細胞数の比較を示す。(A)9週目のマウスにおけるCC1乏突起膠細胞の免疫染色。赤色蛍光はCC1細胞を反映し、青色染色はDAPI対比染色である(n=5、スケールバー=25 μ m)。(B)

) 9週目のマウスにおけるCC1陽性乏突起膠細胞数を示すグラフ ($n = 5$ 、 $* p < 0.01$)。 (C) 9週目のマウスにおけるCC1およびカスパーゼ - 3陽性乏突起膠細胞数を示すグラフ ($n = 5$ 、 $* p < 0.05$)。

【図13】図13は、培養ラット乏突起膠細胞におけるIFN- γ 誘導性アポトーシスがERストレスに関連することを示す。 (A) 7日間分化した未処置乏突起膠細胞。 (B) 5日間分化し、70 U/mlのIFN- γ で48時間処置した乏突起膠細胞 (細胞の縮みおよび細胞体の凝集が明らかとなった (矢印))。 (C) 7日間分化した未処置乏突起膠細胞のTUNELおよびCNP二重標識。 (D) 5日間分化し、70 U/mlのIFN- γ で48時間処置した乏突起膠細胞のTUNELおよびCNP二重標識。 (E) TUNELおよびCNPアーゼ二重陽性細胞の定量 ($* p < 0.05$)。 (F) 乏突起膠細胞溶解物におけるカスパーゼ - 3活性のアッセイ ($* p < 0.01$)。 (G) 70 U/mlのIFN- γ で処置したBIP、CHOP、およびカスパーゼ - 12の発現のリアルタイムPCR分析 ($* p < 0.05$)。 (H) 70 U/mlのIFN- γ で処置した総eIF-2、p-eIF-2、およびカスパーゼ - 12のウェスタンブロット分析。全実験を、少なくとも3回繰り返した。パネルAおよびB中のスケールバー = 30 μ M、パネルCおよびD中のスケールバー = 20 μ M。

【図14】図14は、異所的に発現したIFN- γ によって誘導された髄鞘低形成がERストレスに関連することを示す。 (A) IFN- γ を異所的に発現する14日齢マウスの脳内のmRNAの検出のためのリアルタイムPCR分析 ($n = 3$ 、 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$)。 E14でドキシサイクリンから放出された14日齢二重トランスジェニックマウスのCNS中のカスパーゼ - 12についてのウェスタンブロット分析。 (C) ドキシサイクリンを投与した14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のBIPおよびCC1二重免疫染色。 (D) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢二重トランスジェニックマウスの脊髄中のBIPおよびCC1二重免疫染色。 (E) ドキシサイクリンを投与した14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のp-eIF-2およびCC1二重免疫染色。 (F) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢二重トランスジェニックマウスの脊髄中のp-eIF-2およびCC1二重免疫染色。 (G) ドキシサイクリンを投与した14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のカスパーゼ - 12およびCC1二重免疫染色。 (H) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢二重トランスジェニックマウスの脊髄中のカスパーゼ - 12およびCC1二重免疫染色。パネルC、D、E、F、G、およびH: $n = 3$ 、スケールバー = 30 μ M

【図15】図15は、IFN- γ の条件付き異所性発現に対するPERK+/-マウスの過敏症を示す。 (A) マウス生存曲線 (各群について $n = 40$)。 (BおよびC) (B) ドキシサイクリンを投与したか、 (C) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中のp-eIF-2およびCC1二重標識。 (BおよびC) $n = 3$; バー、30 μ M。 (D) 14日齢マウスの脳内のmRNAレベルのリアルタイムPCR分析 ($n = 3$)。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図16】図16は、PERK+/-バックグラウンドを有する二重トランスジェニックマウスが重症髄鞘低形成を発症することを示す。 (A) ドキシサイクリンを投与した14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のMBP免疫染色。 (B) ドキシサイクリンを投与した14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中のMBP免疫染色。 (C) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のMBP免疫染色。 (D) E14でドキシサイクリンを投与した14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中のMBP免疫染色。パネルA、B、CおよびD: $n = 3$ 、スケールバー = 150 μ M。

【図17】図17は、PERK+/-バックグラウンドを有する二重トランスジェニックマウスが重症髄鞘低形成を発症することを示す。 (A) ドキシサイクリンを投与した14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中の正常な髄鞘形成を示す超微細構造試験。

(B) ドキシサイクリンを投与した14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中の正常な髄鞘形成を示す超微細構造試験。(C) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中に軽度の髄鞘低形成を示す超微細構造試験。(D) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中に重症髄鞘低形成を示す超微細構造試験。パネルA、B、C、およびD: n = 3、スケールバー = 1 μ M。(E) 頸髄の白質中の非有髄軸索の比率を、測定点あたり3匹のマウスから計算した(* p < 0.01)。

【図18】図18は、MBP、PLP、およびCGTのmRNAレベルがPERK+/-バックグラウンドを有する二重トランスジェニックマウスのCNS中で顕著に減少したことを示す。14日齢マウスの脳内のミエリン遺伝子発現についてのリアルタイムPCR分析(n = 3、* p < 0.05)。

【図19】図19は、PERK+/-バックグラウンドを有する二重トランスジェニックマウスがCNS中の大部分の乏突起膠細胞が喪失することを示す。(A) 14日齢マウスのCNS中のCC1陽性細胞の定量(n = 3、* p < 0.05)。(B) ドキシサイクリンを投与した14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のTUNELおよびCC1二重標識。(C) ドキシサイクリンを投与した14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中のTUNELおよびCC1二重標識。(D) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢の二重トランスジェニックマウスの脊髄中のTUNELおよびCC1二重標識。(E) E14でドキシサイクリンから放出された14日齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中のTUNELおよびCC1二重標識。パネルB、C、D、およびE: n = 3; スケールバー = 60 μ M; 赤色蛍光はCC1免疫反応性を示し、緑色蛍光はTUNEL染色を示し、青色蛍光はDAPI対比染色を示す。(F) 14日齢マウスの脊髄中のCC1二重陽性細胞のTUNELの定量(n = 3、* p < 0.01)。(G) 高度に凝縮されたクロマチン塊、インタクトな膜、縮んだ細胞質、およびアポトーシス体を含むアポトーシス乏突起膠細胞を示す超微細構造試験。

【図20】図20は、成体マウスの乏突起膠細胞が幼若マウスからの乏突起膠細胞の能動的髄鞘形成よりもIFN- γ に対する感受性が低いことを示す。(A) 10週齢マウスの脳内のmRNAレベルのリアルタイムPCR分析(n = 3、* p < 0.05)。(B) ドキシサイクリンを投与した10週齢の二重トランスジェニックマウスの小脳中のBIPおよびCC1二重免疫染色。(C) ドキシサイクリンを投与した10週齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの小脳中のBIPおよびCC1二重免疫染色。(D) 4週齢でドキシサイクリンから放出された10週齢の二重トランスジェニックマウスの小脳中のBIPおよびCC1二重免疫染色。(E) 4週齢でドキシサイクリンから放出された10週齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの小脳中のBIPおよびCC1二重免疫染色。パネルB、C、D、およびE: n = 3、スケールバー = 60 μ M。赤色蛍光はCC1免疫反応性を示し、緑色蛍光はBIP染色を示し、青色蛍光はDAPI対比染色を示す。(F) ドキシサイクリンを投与した10週齢の二重トランスジェニックマウスの小脳中に正常な髄鞘形成を示す超微細構造試験。(G) ドキシサイクリンを投与した10週齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの小脳中に正常な髄鞘形成を示す超微細構造試験。(H) 4週齢でドキシサイクリンから放出された10週齢の二重トランスジェニックマウスの小脳中に正常な髄鞘形成を示す超微細構造試験。(I) 4週齢でドキシサイクリンから放出された10週齢のGFAP/tTA; TRE/IFN- γ ; PERK+/-マウスの脊髄中に正常な髄鞘形成を示す超微細構造試験。パネルF、G、H、およびI: n = 3、スケールバー = 2 μ M。

【図21】図21は、PERK酵素の変異について野生型(DOX三重; PERK+/+)またはヘテロ接合性(DOX三重; PERK+/-)であるDOX+およびDOX-マウスにおけるEAEの発症および進行の比較を示す。(A) EAEを罹患しているか罹患

10

20

30

40

50

していないマウスについての平均臨床スコアの変化。(BおよびC)免疫化後(PID)14、17、および22日目のマウスにおけるIFN- およびT- INFの発現についてのリアルタイムPCR分析。* $p < 0.01 \sim 0.05$ 、スチューデントt検定; $n = 2$ 。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図22】図22は、PID14でのEAEを罹患したDOX+およびDOX-マウスの脊髄中のiNOS、TNF-、IL-2、IL-12、IL-10、IL-23、およびIL-5の発現についてのリアルタイムPCR分析野結果を示す。* $p < 0.05$ 、スチューデントt検定、 $n = 4$ 。

【図23】図23は、EAE発症時のIFN- のCNS送達によってPERK経路に依存するEAE誘導性脱髄が防御されることを示す。(A)腰髄組織のMBP免疫染色は、IFN- のCNS送達によって免疫化後17日目(PID17)でPERK+/+バックグラウンドを有するマウスにおいてEAE誘導性脱髄が防御されることを示した。対照的に、コントロールマウスと比較して、PID17でDOX-三重マウスの腰髄中でより重篤な脱髄が検出された。 $N = 3$ 、スケールバー = $50 \mu\text{M}$ 。(B)トルイジンブルー染色により、DOX-二重マウスの脊髄中のミエリンおよび軸索がPID17でほとんどインタクトなままであることが明らかになった。対照的に、PERK+/-バックグラウンドを有するマウスの腰髄中の脱髄および軸索損傷は、IFN- のCNS送達によってPID17までに防止されなかった。 $N = 3$ 、スケールバー = $10 \mu\text{M}$ 。(C)CC1免疫染色は、DOX-二重マウスの腰髄中の乏突起膠細胞がPID17にほとんどインタクトなままであることを示した。対照的に、コントロールマウスと同様に、DOX-三重マウスは、PID17に腰髄中の乏突起膠細胞の大部分を喪失した。 $N = 3$ 、スケールバー = $25 \mu\text{M}$ 。(D)PID17での脊髄中の相対MBP mRNAレベルのリアルタイムPCR分析。100%は、年齢適合ナイーブマウスの脊髄中のMBP mRNAレベルを示す($n = 3$)。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図24】図24は、IFN- が乏突起膠細胞に及ぼす細胞防御効果によってEAE誘導性脱髄を防御したことを示す。A.CD3免疫染色は、IFN- のCNS送達によってPID17でPERK+/+バックグラウンドのマウスの腰髄中のT細胞浸潤が減少するが、PERK+/-バックグラウンドのマウスではT細胞浸潤に有意な影響を及ぼさないことを示した。 $N = 3$ 、スケールバー = $50 \mu\text{M}$ 。B.CD11b免疫染色により、IFN- のCNS送達によってPID17でPERK+/+およびPERK+/-バックグラウンドのマウスの腰髄中のCD11b陽性単球の浸潤パターンを有意に変化されないことが明らかとなった。 $N = 3$ 、スケールバー = $50 \mu\text{M}$ 。C.およびD.CD3免疫染色は、IFN- のCNS送達によってPID14で腰髄中のT細胞浸潤に影響を及ぼさないことを示した。

【図25】図25は、疾患のピークにおける脊髄中のサイトカインの発現パターンについてのリアルタイムPCR分析を示す。(A)IFN- のCNS送達は、iNOSの発現は有意に影響を及ぼさなかった。(B)IFN- のCNS送達は、INF- 発現に有意に影響を及ぼさなかった。(C)IFN- のCNS送達は、PERK+/+バックグラウンドのマウスの脊髄中のIL-2発現を減少させたが、PERK+/-バックグラウンドのマウスにおいてIL-12発現を変化させなかった。(D)IFN- のCNS送達は、PERK+/+バックグラウンドのマウスの脊髄中のIL-2発現を減少させたが、PERK+/-バックグラウンドのマウスにおいてIL-12発現を変化させなかった。(E)IFN- のCNS送達は、PERK+/+バックグラウンドのマウスの脊髄中のIL-23発現を減少させたが、PERK+/-バックグラウンドのマウスにおいてIL-12発現を変化させなかった。(F)IFN- のCNS送達は、IL-5発現に有意に影響を及ぼさなかった。IFN- のCNS送達は、IL-10発現に有意に影響を与えなかった。全パネル： $n = 3$ 。エラーバーは、標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 。IFN- のCNS送達は、IL-10発現に有意に影響を及ぼさなかった。全パネル： $n = 3$ 。エラーバーは、標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 。

【図26】図26は、同腹仔コントロールマウスでの発症と場合にGADD34-ヌルマ

10

20

30

40

50

ウスにおける臨床的疾患が遅延することを示す。平均臨床的疾患重症度スコア、 $n = 6$ 。

【図27】図27は、GADD34機能の喪失の影響についての二重標識免疫組織化学的分析を示す。(a) GADD34は、8週齢のナイーブマウスの脊髄由来の乏突起膠細胞中で検出できなかった。(b) 矢印は、PID17でEAEを罹患したコントロールマウスの乏突起膠細胞中で上方制御されたGADD34を指し示す(スケールバー = $15 \mu\text{m}$ 、 $n = 3$ マウス / 研究群)。(c) 矢印は、CC1およびp-eIF2の二重標識を指し示す。これらは、PID17でEAEを罹患したコントロールマウスの腰髄の少数の乏突起膠細胞中でのeIF2の穏やかな活性化を示した。(d) CC1およびp-eIF2二重標識は、PID17でGADD34ヌルマウス中の乏突起膠細胞(矢印)中のp-eIF2レベルが増加したことを示した。 $N = 3$ 、スケールバー = $10 \mu\text{M}$ 。

【図28】図28は、GADD34-ヌルマウスおよびコントロールマウス由来の腰髄切片中のMBPの免疫染色を示す。(a) および(b)は、GADD34野生型およびGADD34-ヌルマウス由来の腰髄組織のMBP免疫染色を示す。(a) 矢印は、PID17でのEAEを罹患したコントロールマウスで認められる脱髄病変を指し示す一方で、(b) PID17でのEAEを罹患したGADD34ヌルマウスにおいて明確な脱髄病変は認められなかった($n = 3$ 、スケールバー = $50 \mu\text{M}$)。(c) および(d)は、GADD34野生型およびGADD34-ヌルマウスの腰髄切片トルイジンブルー染色を示す。(c) PID17でコントロールマウスの腰髄中の損傷が重篤に脱髄したのに対して、(d) GADD34欠失は、PID17でGADD34ヌルマウスの腰髄中のEAE誘導性脱髄を防御した($n = 3$ 、スケールバー = $10 \mu\text{M}$)。(e) および(f)。GADD34野生型およびGADD34-ヌルマウス由来の腰髄組織のCC1免疫染色。(e)は、コントロールマウスの腰髄中の脱髄病変中の乏突起膠細胞の大部分はPID17で喪失したのに帯して、GADD34ヌルマウスの腰髄中の乏突起膠細胞(矢印)は、ほとんどインタクトなままであったことを示す。(f) ($n = 3$ 、スケールバー = $25 \mu\text{M}$)。(g) および(h)は、コントロールマウスおよびGADD34-ヌルマウス由来の腰髄組織の非リン酸化神経フィラメント-H免疫染色の免疫染色を示す。(g) PID17でのコントロールマウス中の脱髄病変中の矢印は重篤な軸索損傷を示すのに対して、(h) GADD34が欠損したマウスは、GADD34ヌルマウスの腰髄中の軸索損傷(矢印)が顕著に減少した($n = 3$ 、スケールバー = $25 \mu\text{M}$)。

【図29】図29は、(A) ウェスタンブロット分析および(B) アクチンに正規化したMBPタンパク質バンドのデンストメトリー分析によるINFによって媒介されたMBPレベルの減少に及ぼすSalの軽減効果を示す。

【図30】図30は、Flag-SOCS1の発現を示す。A. PLP/SOCS1構築物は、2.4 KbのPLP5'隣接DNA、エクソン1(ATGなし)、イントロン1(斜めの縞模様のボックス)、Flag-SOCS1、およびSV40ポリAシグナル配列を含む。PLP/SOCS1導入遺伝子の発現を、いくつかの方法を使用して生後21日目に特徴づけた。B. ノーザンブロット分析により、野生型脳(レーン1(WT、野生型脳))と比較してPLP/SOCS1脳(レーン2(T、トランスジェニック脳))中のFlag-SOCS1発現が証明された。C. 導入遺伝子特異的プライマーを使用したQ-PCR分析により、脳、脊髄、および坐骨神経中に最も高い濃度の導入遺伝子由来SOCS1 mRNAが存在し、他の器官でのレベルは有意に低いことが明らかとなった。D. ウェスタンブロット。E. 免疫沈降。共に、PLP/SOCS1マウス由来の脳サンプル(脳fSOCS1+)をロードしたレーンのみで1つの19KD(SOCS1の推定分子量)のFlag陽性バンドが証明された。Flagタンパク質を、抗体反応のポジティブコントロールとして使用した(15% SDS-PAGE、抗Flag(M2)抗体)。抗SOCS1/FITC(F、H、緑色)および抗Flag/FITC抗体(G、I、緑色)での免疫染色は、PLP/SOCS1のみで陽性シグナルが証明され(H、I、緑色)、野生型マウスサンプルでは証明されなかった(F、G)。細胞核を、臭化エチジウムで対比染色した(F~I、赤色)。視床線維(thalamic fiber)の冠状断面; バー = $20 \mu\text{m}$ 。

10

20

30

40

50

【図31】図31は、*in vivo*でのFlag-SOCS1およびPLPの共存を示す。生後21日目に採取した野生型(A~C、上の横列)およびPLP/SOCS1(D~F、下の横列)小脳組織の二重免疫染色を、抗PLP/Cy3(A、D、赤色)および抗Flag/FITC(B、E、緑色)抗体ならびにDAPI核染色(C、F、青色)を使用して行った。(B)野生型サンプルのPLP陽性構造(A、赤色)は、抗Flag(B)について免疫陽性を示さず、(C)シグナルの共存は確立されなかった。対照的に、PLP/SOCS1サンプルのPLP陽性構造(D)は、Flag-SOCS1を発現し(E)、抗PLPと抗Flag免疫陽性との間の強い共存が検出された(F、黄色は共存を示す)。小脳の矢状断面；バー=20 μ m。

【図32】図32は、*in vitro*でのflag-SOCS1およびPLPの共存を示す。野生型(A~C、上の横列)およびPLP/SOCS1(D~F、下の横列)混合初代乏突起膠細胞培養物の二重免疫染色を、抗PLP/FITC(A、D、緑色)および抗Flag/Cy3(B、E、赤色)抗体を使用して行った。(A)野生型培養物におけるPLP陽性乏突起膠細胞は、抗Flag(B)について免疫陽性を示さず、(C)シグナルの共存は確立されなかった。対照的に、PLP/SOCS1培養物中のPLP陽性構造(E)は、抗PLPと抗Flagシグナルとの間の強い共存が検出された(F)。Flag-SOCS1は、乏突起膠細胞の細胞体(大きな矢印)および細胞過程(*cell processes*)中に局在するようであった。バー=20 μ m。

【図33】図33は、Stat1核移行の差分阻害を示す。野生型(A~D、上の横列)およびPLP/SOCS1(E~H；下の横列)マウス由来の混合初代乏突起膠細胞培養物を、100U IFN- γ で30分間刺激し、抗PLP/Cy3(A、E、赤色)、抗Stat1(B、F；緑色)、およびDAPI核染色(D、H；青色)を使用した二重免疫染色を行、蛍光シグナルをデジタル処理で重ね合わせた(CおよびG、PLP/Cy3とStat1/FITCシグナルとの間の重ね合わせ；DおよびH、PLP/Cy3と、Stat1/FITCと、DAPIシグナルとの間の重ね合わせ)。野生型培養物では、Stat1は、全細胞のDAPI染色核と共存し、PLP陽性乏突起膠細胞が含まれる(小さな矢印)(B、D、Stat1とDAPIとの間の共存)。PLP/SOCS1培養物では、Stat1は、PLP陰性細胞のDAPI陽性核と共存したが(小さな矢印)、PLP陽性乏突起膠細胞のDAPI陽性核と共存しなかった(大きな矢印)(F、H)。PLP陽性乏突起膠細胞中のStat1は、DAPI染色核と共存しなかったが、細胞質中に留まった(大きな矢印)(F、H)。バー=10 μ m。

【図34】図34は、MBP/IFN- γ x PLP/SOCS1マウスにおけるMHCクラスI分子の差分発現を示す。生後21日目で採取した野生型(A、B)、PLP/SOCS1(C、D)、MBP/IFN- γ x PLP/SOCS1(G、H、I、J)マウス脳を、抗MHCクラスI/FITC(A、C、E、G、I；緑色)および抗flag/Cy3(B、D、F、H、J；赤色)抗体ならびにDAPI核染色(J；青色)で二重免疫染色した。野生型サンプルは、二重陰性であった(A、B)。PLP/SOCS1サンプルは、(C)MHCクラスI分子に陰性であり、(D)Flagに陽性であった。MBP/IFN- γ サンプルは、(E)MHCクラスI分子に陽性であり、(F)Flagに陰性であった。二重トランスジェニックMBP/IFN- γ x PLP/SOCS1サンプルは、(G)MHCクラスI分子およびFlag(H)に二重陽性であった。より高い倍率のMBP/IFN- γ x PLP/SOCS1サンプル(G、H中の四角)は、免疫陽性の差分分布が明らかであった(I、J)。MHCクラスI陽性細胞(大きな矢印)は、Flagに陰性であるのに対して、Flag陽性細胞(小さな矢印)はMHCクラスI分子に陰性であった。脳梁の矢状断面；バー=20 μ m(A~H)；バー=10 μ m(I、J)。

【図35】図35は、乏突起膠細胞およびミエリンのSOCS1媒介性防御を示す。(A)IFN- γ 発現、(B)乏突起膠細胞密度(CC1細胞/mm²)、(C)G比、および(D)非有髄軸索の比率を、以下の3つのトランスジェニック系の同腹仔間で試験した：生後21日目の172 x PLP/SOCS1、184/110 x PLP/SOCS1、

10

20

30

40

50

および 184/67 × PLP/SOCS1 (完全な説明の結果を参照のこと)。(A) 相対的 IFN- γ 発現量は、系の間で異なったが、IFN- γ のみ (IFN- γ) または IFN- γ と SOCS1 との両方 (IFN- γ × SOCS1) のいずれかを発現する同一のトランスジェニック系由来の同腹仔間で発現レベルの統計的差異は認められなかった。IFN- γ 過剰発現同腹仔 (IFN- γ) は、野生型、単一トランスジェニックコントロール (wt/control)、および PLP/SOCS1 同腹仔と比較した場合、(B) 有意な用量依存性乏突起膠細胞の喪失および (C、D) 髄鞘低形成を示した (* p < 0.05、n = 3 動物/研究群)。IFN- γ および SOCS1 の両方を発現する三重トランスジェニック同腹仔 (IFN- γ × SOCS1) は、IFN- γ のみを過剰発現する同腹仔 (IFN- γ) と比較した場合、(B) 有意な乏突起膠細胞および (D、D) ミエリン保存を示した (** p < 0.05、n = 3 動物/研究群)。

【図36】図36は、SOCS1 媒介性乏突起膠細胞防御を示す。生後21日目の GFAP/tTAXTRE/IFN- γ × PLP/SOCS1 (184/67 × PLP/SOCS1) マウス由来の定量領域の代表的領域。A. 野生型; B. PLP/SOCS1; C. 184/67、および D; 184/67 × PLP/SOCS1。CC1/Cy3 (赤色) および DAPI 核染色 (青色) での免疫染色。脳梁の矢状断面; バー = 20 μ m。(A) 野生型および (B) PLP/SOCS1 マウス由来のサンプルと比較した (C) IFN- γ 過剰発現マウス由来のサンプルにおける CC1 陽性の喪失ならびに (D) IFN- γ および SOCS1 の両方を過剰発現するマウス由来のサンプル中の有意な乏突起膠細胞の保存に留意のこと。

【図37】図37は、SOCS1 媒介性ミエリン防御を示す。生後21日目の GFAP/tTAXTRE/IFN- γ × PLP/SOCS1 (184/67 × PLP/SOCS1) マウス由来の定量領域の代表的領域。A. 野生型; B. PLP/SOCS1; C. 184/67、および D; 184/67 × PLP/SOCS1。脳梁の電子顕微鏡写真; バー = 500 nm。(A) 野生型および (B) PLP/SOCS1 マウス由来のサンプルと比較した (C) IFN- γ 過剰発現マウス由来のサンプルにおける髄鞘低形成ならびに (D) IFN- γ および SOCS1 の両方を過剰発現するマウス由来のサンプル中の有意なミエリンの保存に留意のこと。

10

20

【 図 1 】

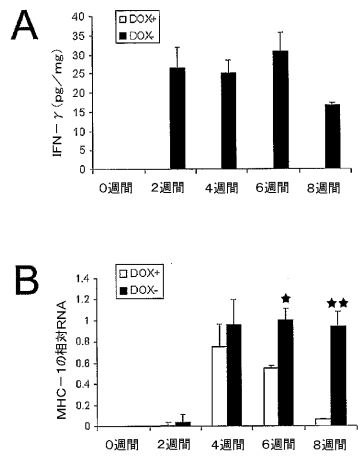


Figure 1

【 図 2 】

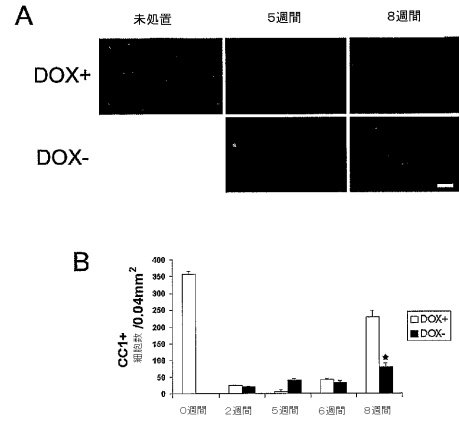


Figure 2

【 図 3 】

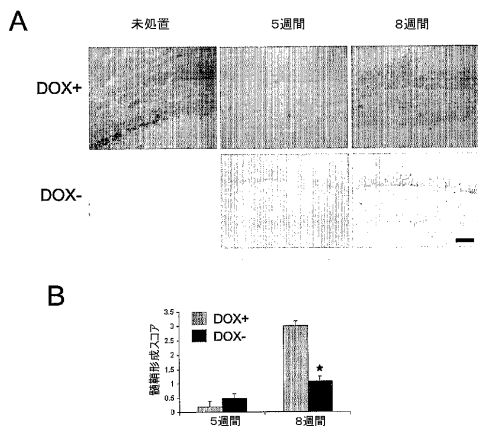


Figure 3

【 図 4 】

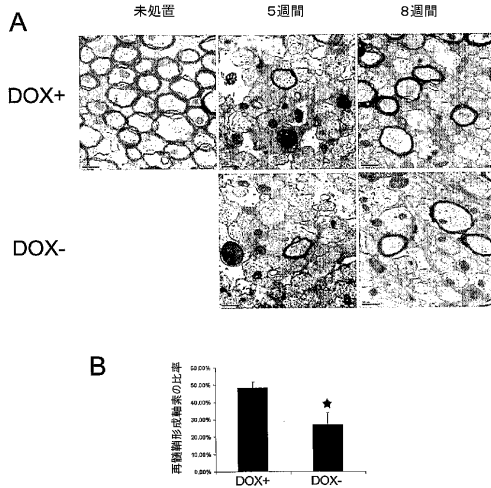


Figure 4

【 図 5 】

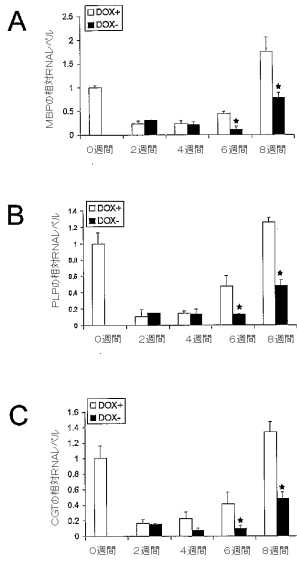


Figure 5

【 図 6 】

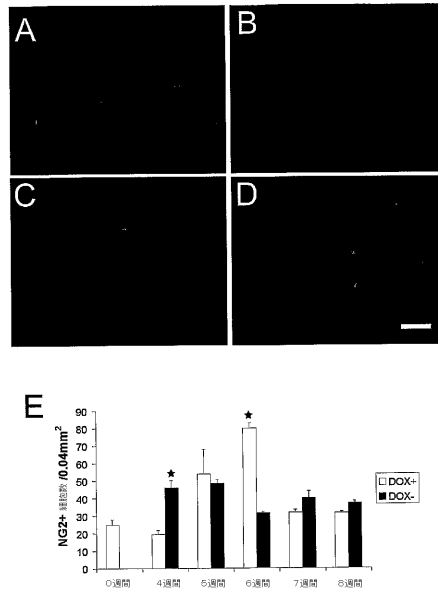


Figure 6

【 図 7 】

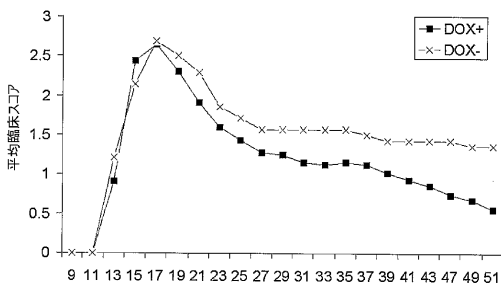


Figure 7

【 図 8 】

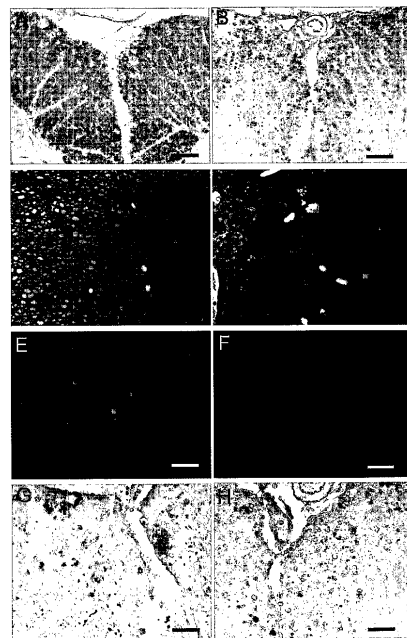


Figure 8

【 図 9 】

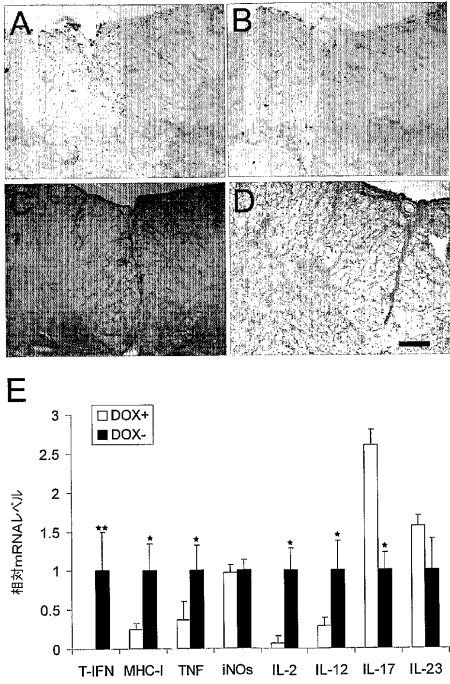


Figure 9

【 図 10 】

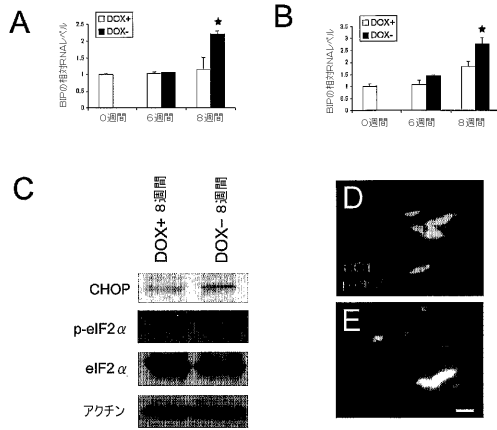


Figure 10

【 図 11 】

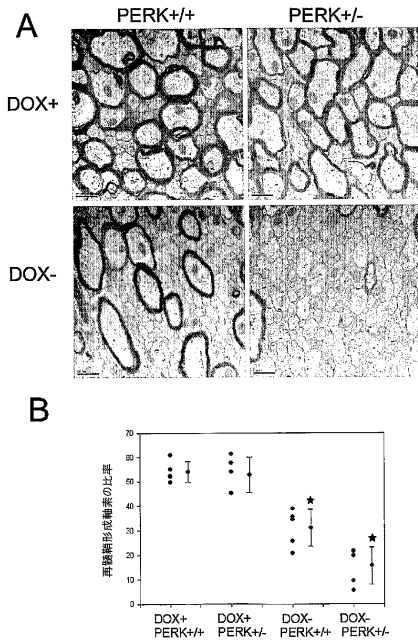


Figure 11

【 図 12 】

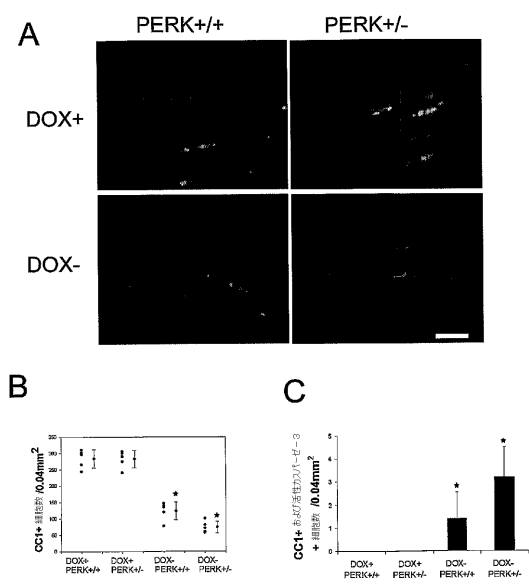


Figure 12

【図 13】

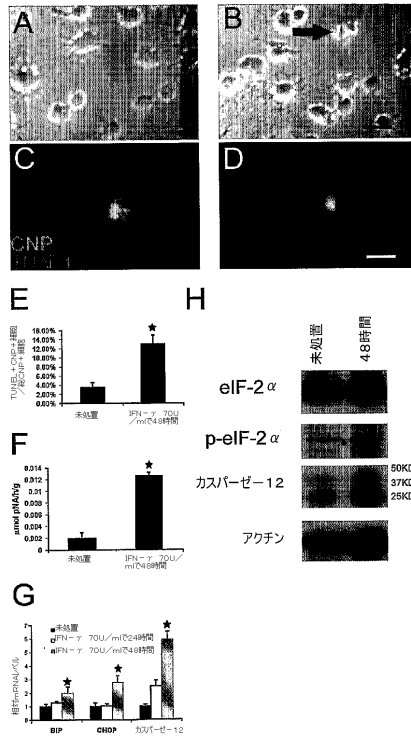


Figure 13

【図 14】

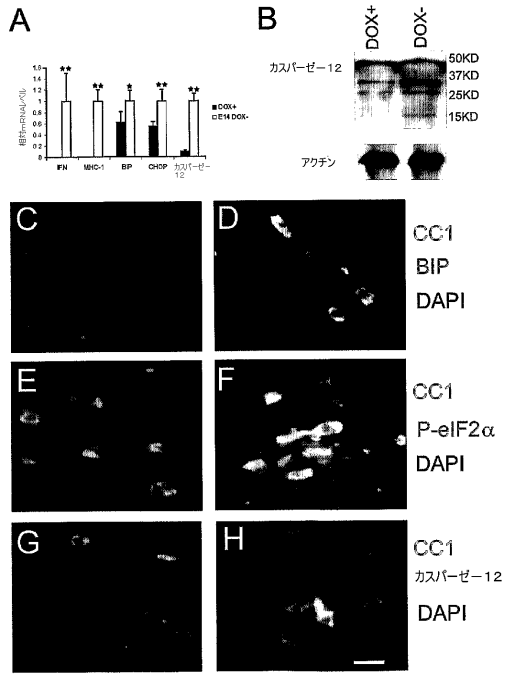


Figure 14

【図 15】

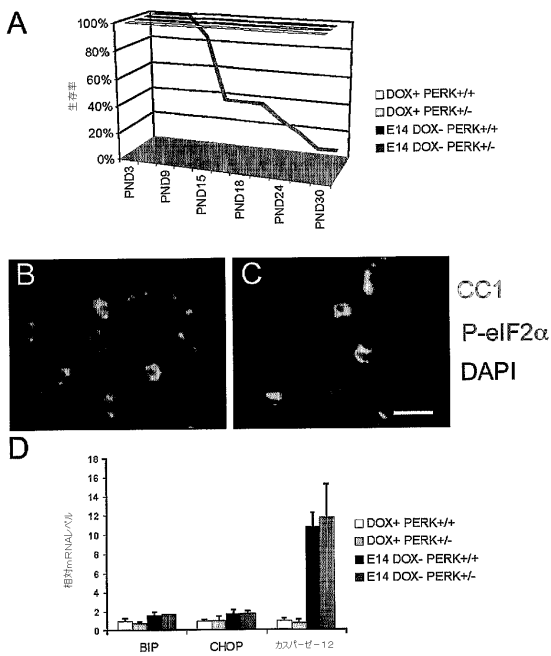


Figure 15

【図 16】

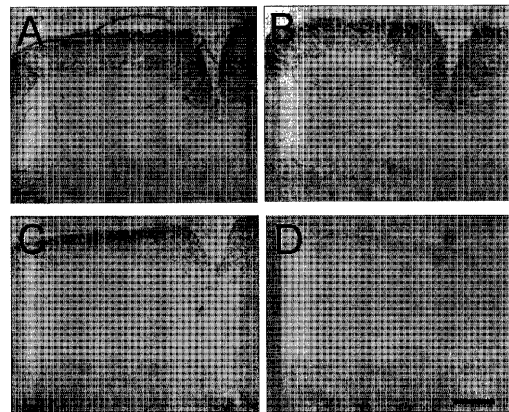


Figure 16

【 図 1 7 】

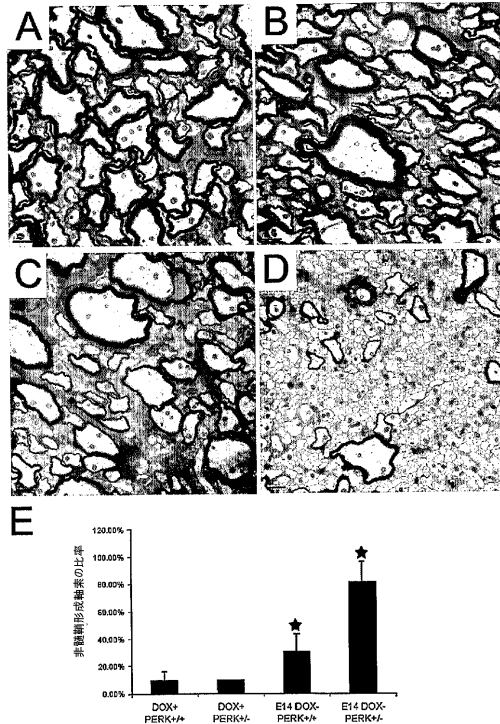


Figure 17

【 図 1 8 】

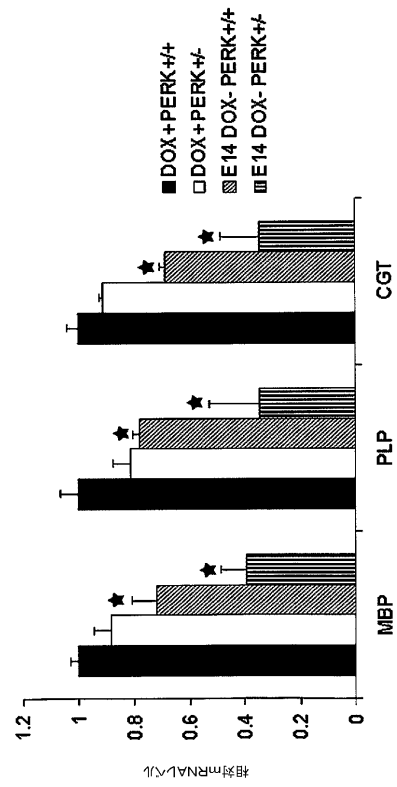


Figure 18

【 図 1 9 】

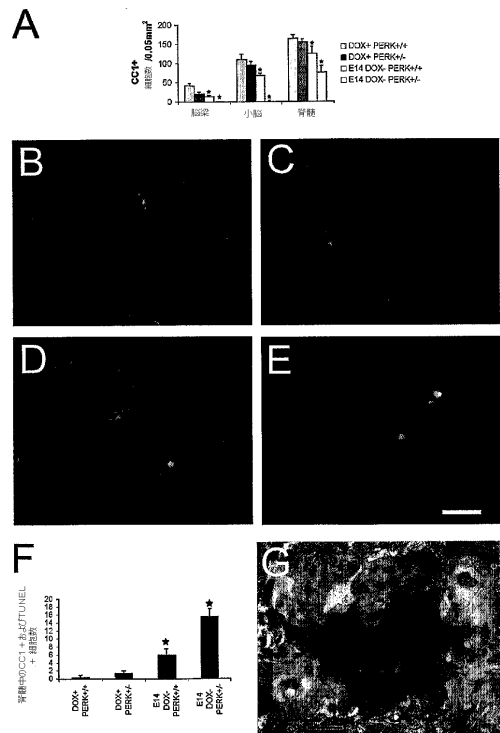


Figure 19

【 図 2 0 】

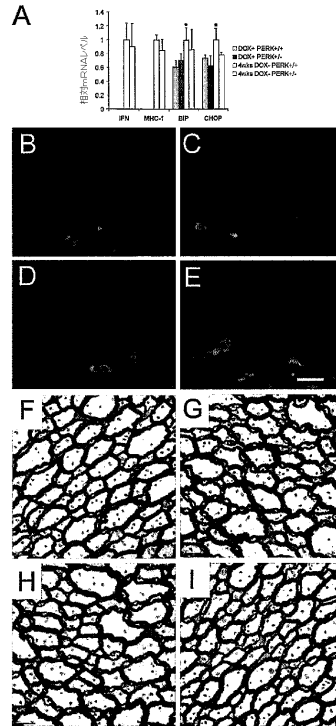


Figure 20

【 図 2 1 】

Fig 21a

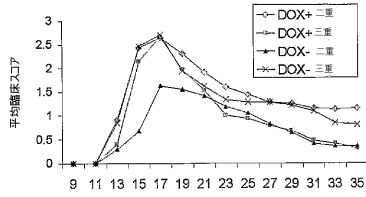


Fig 21b

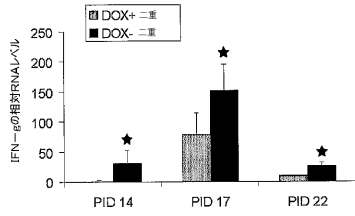
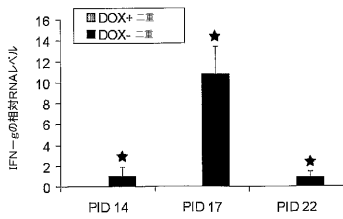


Fig 21c



【 図 2 2 】

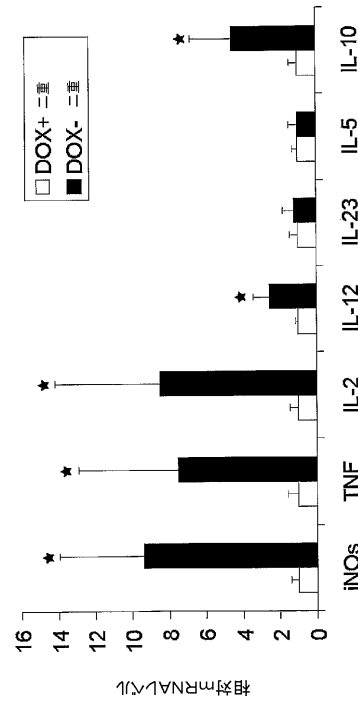


Figure 22

【 図 2 3 】

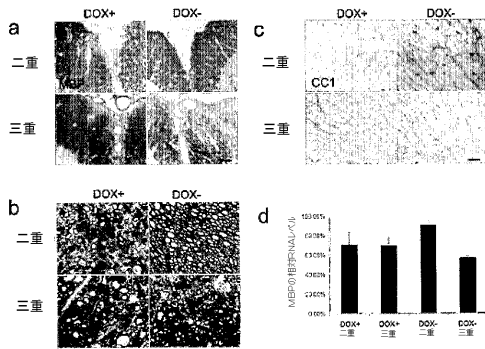


Figure 23

【 図 2 4 】

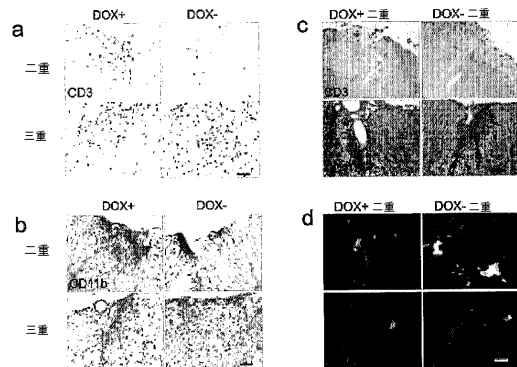


Figure 24

【 図 2 5 】

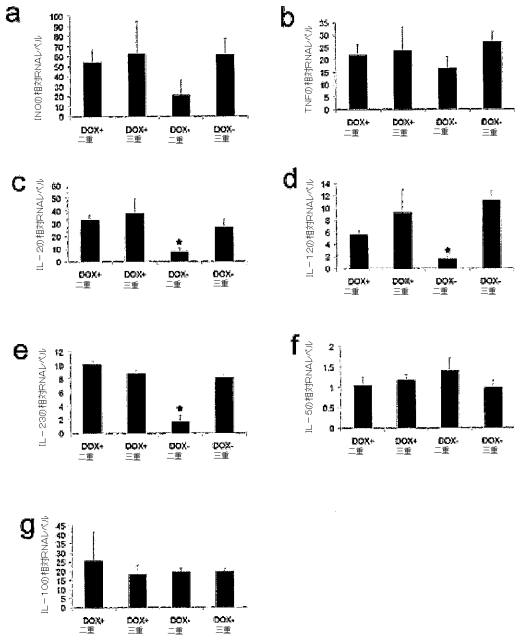


Figure 25

【 図 2 6 】

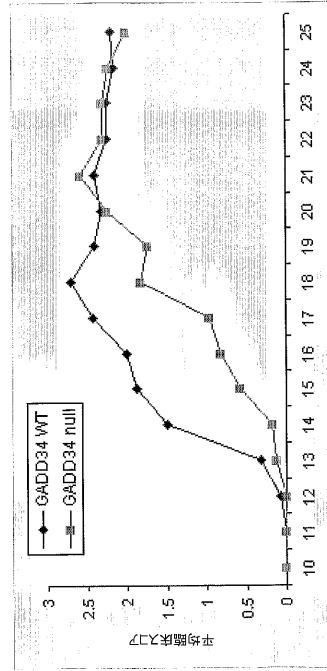


Figure 26

【 図 2 7 】

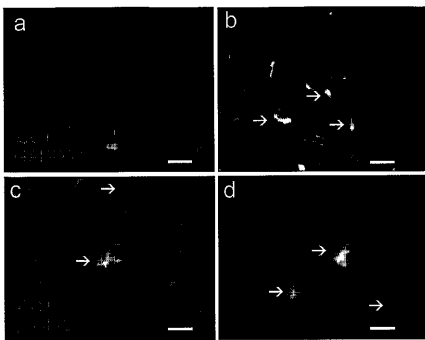


Figure 27

【 図 2 8 】

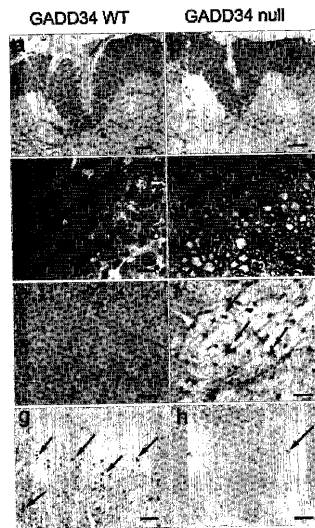


Figure 28

【 図 2 9 】

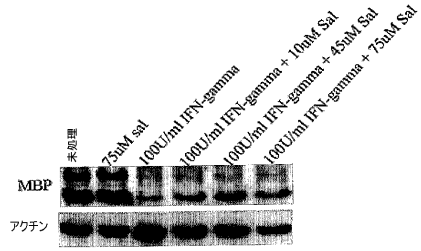


Figure 29A

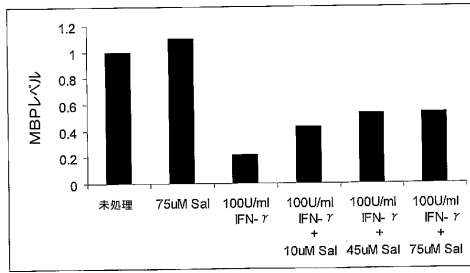


Figure 29B

【 図 3 0 】

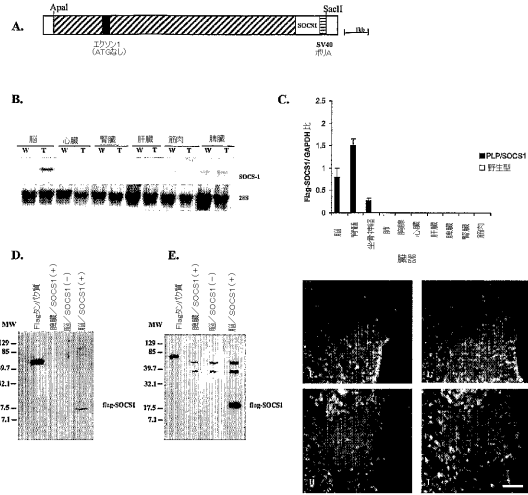


Figure 30

【 図 3 1 】

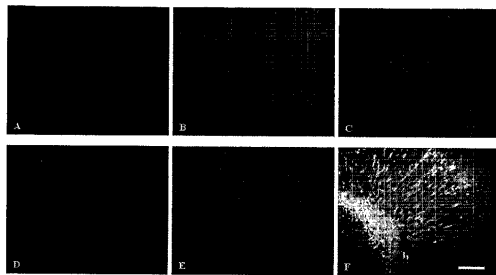


Figure 31

【 図 3 3 】

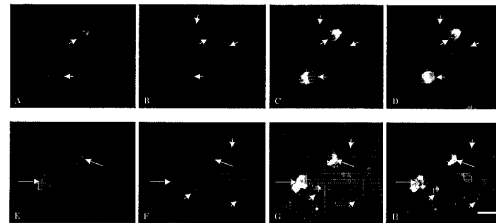


Figure 33

【 図 3 2 】

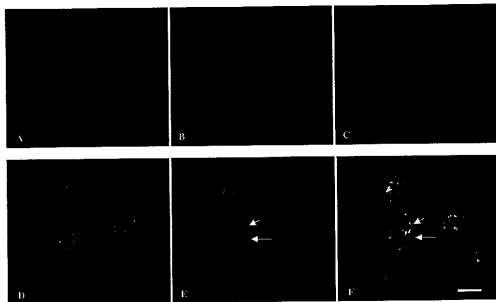


Figure 32

【 図 3 4 】

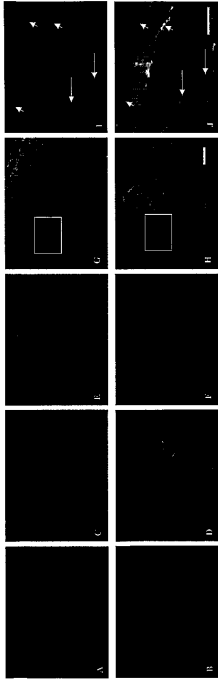


Figure 34

【 図 3 5 】

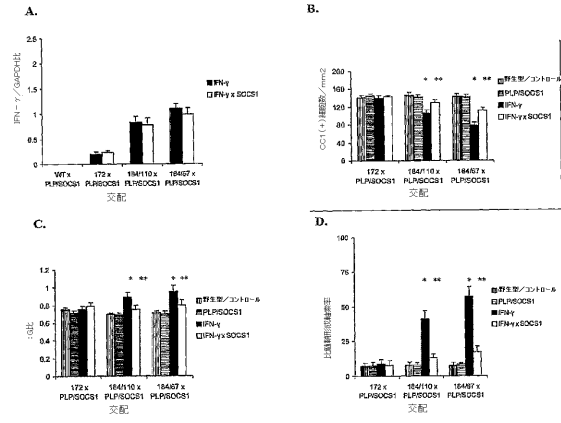


Figure 35

【 図 3 6 】

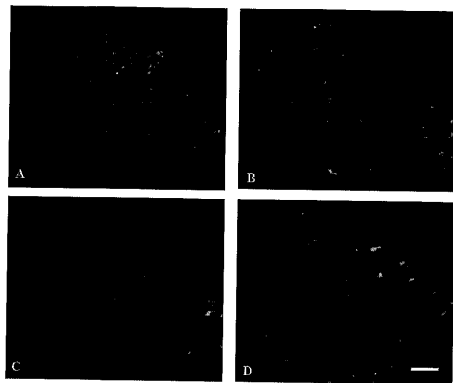


Figure 36

【 図 3 7 】

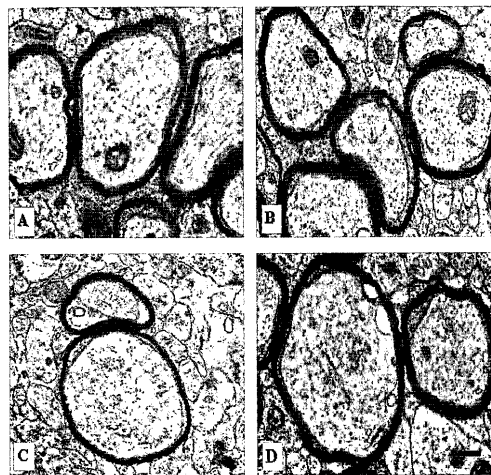


Figure 37

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/23215
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8): A01K 67/00(2006.01);G01N 33/00(2006.01);C12N 15/00(2006.01);A01N 61/00(2006.01) USPC: 800/8;800/3;800/21;514/1 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) U.S. : 800/8;800/3;800/21;514/1 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIN et al., The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage, February 2007, Vol 117, No 2, pages 448-456.	1-52, 71-107
A	LEES, et al. A little stress is good: IFGN-gamma, demyelination, and multiple sclerosis. February 2007, Vol 117, No 2, pages 297-299.	1-52, 71-107
A	SHOONJANS et al, Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. 2003, Vol. 21, pages 90-97.	53-70
A	HOCHPIED et al, Breaking the species barrier: derivation of germline-competent embryonic stem cells from mus spretusxCS7bl/6 hybrids. 2004, Vol 22, pages 441-447.	53-70
<input 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 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 14 May 2007 (14.05.2007)		Date of mailing of the international search report 12 JUN 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Paras Peter, Jr Telephone No. 571-272-4517

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Z
	A 6 1 K 48/00	

- (31)優先権主張番号 11/431,782
(32)優先日 平成18年5月9日(2006.5.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/431,601
(32)優先日 平成18年5月9日(2006.5.9)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 11/431,372
(32)優先日 平成18年5月9日(2006.5.9)
(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 リン, ウェンシェン
アメリカ合衆国 イリノイ 60637, シカゴ, エス メリーランド アベニュー 584
1 ルーム エービー514

Fターム(参考) 2G045 CB01 CB17 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA25 CA02 CA11 DA02 EA04 GA11 HA14
4B063 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62 QR77
QR80 QS25 QS34 QX02
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BB19 CA44 CA46
4C076 AA19 CC01 CC31 CC32
4C084 AA02 DA24 MA24 NA14 ZA011
4C085 AA13 AA14 CC03 CC04
4C086 AA01 AA02 EA16 MA24 NA14 ZA01 ZB33 ZB35

专利名称(译)	治疗脱髓鞘疾病的方法		
公开(公告)号	JP2008546704A	公开(公告)日	2008-12-25
申请号	JP2008517080	申请日	2006-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
[标]发明人	ポプコブライアン リンウエンシェン		
发明人	ポプコ, ブライアン リン, ウエンシェン		
IPC分类号	A61K45/00 C12N5/06 A61K38/21 A61K39/395 A61K31/7088 A61K38/00 A61K9/127 A61P25/00 C12N15/09 C12N5/10 A01K67/027 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 A61K48 /00		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K67/0276 A01K2217/05 A01K2217/058 A01K2217/075 A01K2217/20 A01K2227/105 A01K2267/0318 A01K2267/0325 A01K2267/0356 A61K38/1709 A61K38/217 A61K2039/505 A61P25 /00 A61P25/02 C07K14/47 C07K14/4703 C07K14/4713 C07K14/57 C07K2319/00 C12N9/1205 C12N15 /8509 C12N2517/02 C12N2830/008 G01N33/5058		
FI分类号	A61K45/00 C12N5/00.ZNA.E A61K37/66.G A61K39/395.D A61K39/395.N A61K31/7088 A61K37/02 A61K9/127 A61P25/00 C12N15/00.A C12N5/00.B A01K67/027 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.Z A61K48/00		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA25 4B024 /CA02 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063 /QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB19 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA19 4C076/CC01 4C076/CC31 4C076/CC32 4C084/AA02 4C084/DA24 4C084/MA24 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/CC04 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA24 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZB33 4C086/ZB35		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/690691 2005-06-14 US 60/744826 2006-04-13 US 60/792007 2006-04-14 US 11/431782 2006-05-09 US 11/431601 2006-05-09 US 11/431372 2006-05-09 US		
其他公开文献	JP2008546704A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明属于神经学领域。具体地，本发明涉及在神经元脱髓鞘或髓鞘再生中起作用的分子组分的发现和表征。此外，本发明涉及产生表现出髓鞘形成的动物模型。本发明所体现的组合物和方法特别适用于药物筛选和/或治疗脱髓鞘疾病。

	発症日 (PID:免疫後日数)	最大臨床スコアの平均 (平均±SD)	後肢麻痺の発生率	死亡率
DOX+二重マウス	13.6±1.2	2.66±0.80	20/25	0/25
DOX+三重マウス	14.0±0.9	2.67±0.94	19/25	2/25
DOX-二重マウス	14.7±1.4	1.63±0.51*	2/25	0/25
DOX-三重マウス	13.6±0.8	2.71±1.11	18/25	3/25

*p<0.001, n=25. 臨床的重症度スコアを、0~5ポイントのスケール(0=健康、1=弛緩した尾、2=運動失調および/または後肢の不全麻痺、3=後肢の麻痺および/または前肢の不全麻痺、4=四肢の麻痺、および5=溺死または死亡)によって毎日記録した。