(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5888572号
(P5888572)
(45)発行日　平成28年3月22日(2016.3.22)　(24)登録日　平成28年2月26日(2016.2.26)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 31/7105	(2006.01)	A61K	31/7105
A61P 25/00	(2006.01)	A61P	25/00
A61P 25/28	(2006.01)	A61P	25/28
A61P 25/16	(2006.01)	A61P	25/16
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00

請求項の数 21　(全 27 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-540189 (P2014-540189)
(86)(22)出願日　平成24年11月5日 (2012.11.5)
(65)公表番号　特表2014-533248 (P2014-533248A)
(43)公表日　平成26年12月11日 (2014.12.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/063604
(87)国際公開番号　WO2013/067531
(87)国際公開日　平成25年5月10日 (2013.5.10)
審査請求日　平成26年5月19日 (2014.5.19)
(31)優先権主張番号　61/555,152
(32)優先日　平成23年11月3日 (2011.11.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

前置審査

(73)特許権者　514101622
カオシウング　メディカル　ユニバーシティー
台湾　８０７０８　カオシウング，シ－チュアン　ファースト　ロード，１００
(74)代理人　100091683
弁理士　▲吉▼川　俊雄
(72)発明者　ジュオ，スーハング，エイチ.
台湾　カオシウング，チンネン　ファースト　ロード，ナンバー　６－７，８エフ－１
(72)発明者　ワン，ユン－ソン
台湾　カオシウング，チュンジアン　ロード，ナンバー　６２，１３エフ－２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】神経保護の提供におけるマイクロＲＮＡ１９５の使用法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ｍｉＲＮＡ－１９５、ＬＮＡ修飾型ｍｉＲＮＡ－１９５、およびそれらの組み合わせから選択される有効量のマイクロＲＮＡを含む、神経保護のための組成物。

【請求項２】

前記マイクロＲＮＡはｍｉＲＮＡ－１９５である、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記マイクロＲＮＡは、配列番号１～７から選択される配列を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項４】

前記マイクロＲＮＡは、配列番号１または配列番号２の配列を有する、請求項１に記載の組成物。

【請求項５】

前記ｍｉＲＮＡ－１９５は、量の範囲が１．０～１０．０ナノモル／ｋｇで投与される、請求項１に記載の組成物。

【請求項６】

前記ｍｉＲＮＡ－１９５は、量の範囲が３．０～１０．０ナノモル／ｋｇで投与される、請求項１に記載の組成物。

【請求項７】

前記ｍｉＲＮＡ－１９５は、前記ｍｉＲＮＡ－１９５の模倣物から得られる、請求項１

に記載の組成物。
【請求項８】
前記マイクロＲＮＡは、ナノ粒子と組み合わせることができる、請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
前記ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、金属ナノ粒子、または高分子ナノ粒子である、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ナノ粒子はリポソームである、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
前記神経保護は、Ｓｅｍａ３Ａの発現または蓄積の阻害を通じたものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
前記神経保護は、ニューロンアポトーシスの阻害または保護を通じたものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項１３】
前記神経保護は、ニューロンを細胞ストレスから保護する抗炎症効果を通じたものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項１４】
前記ストレスは、興奮毒性ストレス、酸化ストレス、あるいは脊椎ダメージ、運動失調、またはアルコール依存症により引き起こされるストレスである、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記神経保護は、ＮＯの過剰産生の減少を通じたものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項１６】
前記マイクロＲＮＡは、フリーラジカル消去剤または抗炎症薬として用いられる、請求項１に記載の組成物。
【請求項１７】
前記神経保護は、ニューロンまたは脳の損傷あるいは神経変性疾患に関連する、請求項１に記載の組成物。
【請求項１８】
前記神経変性疾患は、急性または慢性の神経変性疾患である、請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
前記神経保護は、脳血管不全、局所性もしくは散在性の脳外傷、脊椎損傷、脳虚血もしくは閉塞、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、レット症候群、リソソーム蓄積症もしくは多発性硬化症、低酸素、脊椎損傷、末梢神経損傷、または脳卒中に関連する、請求項１に記載の組成物。
【請求項２０】
前記脳虚血または閉塞は、塞栓性閉塞および血栓性閉塞、周産期低酸素性虚血、新生児低酸素性虚血性脳症、周産期窒息、心停止、頭蓋内出血、くも膜下出血、脳卒中、または外傷性脳損傷である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記脳卒中は虚血性脳卒中である、請求項２０に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、被験体にｍｉＲＮＡまたはそれを修飾したマイクロＲＮＡを有効量で投与することを含む、神経保護を提供する方法に関する。特に、神経保護は、脳卒中の治療およ

び／または予防に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

中枢神経系（「ＣＮＳ」）の重要な特徴は、分化したニューロンが本質的に再生不能であることである。このため、機能の永久的な喪失が、十分重篤な損傷または侵襲が脳に加えられた結果として起こり得る。したがって、中枢神経系の細胞を損傷後の細胞死から保護する手段が必要である。中枢神経系における様々な細胞型へのダメージ（例えば、窒息性侵襲、外傷性侵襲、中毒性侵襲、感染性侵襲、変性侵襲、代謝性侵襲、虚血性侵襲、または低酸素性侵襲）は、感覚消失、運動欠陥、または認知障害を引き起こす可能性がある。

【０００３】

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、約２１～２３のヌクレオチドからなる一本鎖ＲＮＡ分子である。ｍｉＲＮＡは、１つ以上のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の３'非翻訳領域（３'－ＵＴＲ）に対して相補的である。ｍｉＲＮＡをｍＲＮＡとアニーリングすると、タンパク質翻訳の阻害および／またはｍＲＮＡ分解の促進が引き起こされる。最近の研究から、ｍｉＲＮＡは、血管平滑筋細胞（ＶＳＭＣ）および内皮細胞内での遺伝子発現に影響を及ぼすことにより、粥状動脈硬化の過程において重要な役割を果たしている可能性があることが明らかになっている（Ｙ．Ｓｕａｒｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０５，１４０８２，２００８；Ｌ．Ｐｏｌｉｓｅｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ １０８，３０６８，２００６；およびＸ．Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．１０４，４７６，２００９）（非特許文献１～３）。例えば、ｍｉＲ－１４５は、ＶＳＭＣ表現型マーカーであり血管新生内膜病変形成を制御することが見つかっている（Ｙ．Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．１０５，１５８，２００９）（非特許文献４）。いくつかのｍｉＲＮＡでは、急性心筋梗塞の患者でその血漿中濃度が上昇していることも実証されており、循環ｍｉＲＮＡが循環器疾患のバイオマーカーの役割を果たす可能性があることを示唆している（Ｙ．Ｄ'Ａｌｅｓｓａｎｄｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｈｅａｒｔ Ｊ．３１，２７６５，２０１０）（非特許文献５）。しかしながら、粥状動脈硬化に関連したｍｉＲＮＡ研究は、いまだ未成熟な段階にある。

【０００４】

Ｘｕ Ｔ ｅｔ ａｌ．は、マイクロＲＮＡ－１９５が、ヒト肝細胞癌細胞の腫瘍形成能を抑制するとともにその細胞のＧ１／Ｓ移行を制御することを示した（Ｘｕ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ．２００９ Ｊｕｌ；５０（１）：１１３－２１）（非特許文献６）。Ｈｕａｑｉｎｇ Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．は、マイクロＲＮＡ－１９５が、Ｓｉｒｔ１を下方制御することにより心筋細胞でのパルミチン酸誘導型アポトーシスを促進すると報告した（Ｘｕ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ Ｒｅｓ（２０１１）、最初にオンラインで公開、２０１１年５月２７）（非特許文献７）。Ｓｅｋｉｙａ Ｙ ｅｔ ａｌ．は、マイクロＲＮＡ－１９５によるサイクリンＥ１発現の下方制御が、肝星細胞増殖のインターフェロン－β誘導型阻害の主要因であると報告した（Ｓｅｋｉｙａ Ｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｖｏｌ．２２６，Ｎｏ．１０，ｐｐ．２５３５－２５４２，２０１１）（非特許文献８）。

【０００５】

米国特許出願第１２／６３５，１７８号（２００９年１２月１０日出願）（特許文献１）は、マイクロＲＮＡ－１９５が粥状動脈硬化の治療に使用できることを開示している。複数の危険因子が脳卒中の危険性を高める可能性があるが、これらの危険因子を減らすことで、脳卒中を防ぐことができる。Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ，Ｖｏｌｕｍｅ １７，Ｎｕｍｂｅｒｓ ７／８，Ａｐｒｉｌ ２０１２，ｐｐ．２９６－３０９（非特許文献９）では、脳卒中を予防するアプローチが述べられている。しかしながら、この参照文献では、急性脳卒中については有効な治療がほんの少ししかないことも示されている（２９９ページを参照）。当業者には、脳卒中の予防が急性脳卒中の治療

と等しくはないことがわかっている。脳卒中治療についてのさらなる情報は、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｓｔｒｏｋｅ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ(全米脳卒中協会)（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓｔｒｏｋｅ．ｏｒｇ／ｓｉｔｅ／ＰａｇｅＳｅｒｖｅｒ？ｐａｇｅｎａｍｅ＝ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）のウェブサイトで得ることができる。したがって、ｍｉＲ－１９５の抗粥状動脈硬化効果の発見から、急性脳卒中に対するｍｉｒ－１９５の治療効果を推定することはできない。

【０００６】

Ｋａｎｄｉａｈ　Ｊｅｙａｓｅｅｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．は、中大脳動脈閉塞（ＭＣＡｏ）が関連する脳の病理発生におけるｍｉＲＮＡ制御の関与を報告し、対応するＤＮＡマイクロアレイデータとの比較から標的ｍＲＮＡ発現がｍｉＲＮＡの制御と相関することが明らかになったと示す（Ｋａｎｄｉａｈ　Ｊｅｙａｓｅｅｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓｔｒｏｋｅ，　Ｍａｒｃｈ　２００８，　ｐｐ．９５９－９６６）（非特許文献１０）。この参照文献は、虚血下の脳で大量に発現されるｍｉＲＮＡの中には血液試料で検出可能なものがあることも報告する；例えば、マイクロＲＮＡ－１９５は、再灌流して４８時間の時点で、血液試料および脳試料の両方で見つかった。しかしながら、マイクロＲＮＡ－１９５は、発現において反対の傾向を示した。したがって、マイクロＲＮＡ－１９５が虚血性脳卒中後に神経保護性を有し得るかどうかは、当業者であっても予測できないだろう。

【０００７】

上記を考慮すると、マイクロＲＮＡ－１９５の量が増加することによりもたらされる神経保護効果を教示または示唆する先行技術文献は、ない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】米国特許出願第１２／６３５，１７８号

【特許文献２】米国特許第４，２３５，８７１号

【特許文献３】米国特許第４，５０１，７２８号

【特許文献４】米国特許第４，８３７，０２８号

【特許文献５】米国特許第５，０１９，３６９号

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｙ．Ｓｕａｒｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　１０５，　１４０８２，　２００８

【非特許文献２】Ｌ．　Ｐｏｌｉｓｅｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｂｌｏｏｄ　１０８，　３０６８，　２００６

【非特許文献３】Ｘ．　Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｉｒｃ．　Ｒｅｓ．　１０４，　４７６，　２００９

【非特許文献４】Ｙ．　Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｉｒｃ．　Ｒｅｓ．　１０５，　１５８，　２００９

【非特許文献５】Ｙ．Ｄ'Ａｌｅｓｓａｎｄｒａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｅｕｒ．　Ｈｅａｒｔ　Ｊ．　３１，　２７６５，　２０１０

【非特許文献６】Ｘｕ　Ｔ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ．　２００９　Ｊｕｌ；　５０（１）：　１１３－２１

【非特許文献７】Ｘｕ　Ｔ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ（２０１１）

【非特許文献８】Ｓｅｋｉｙａ　Ｙ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｃｅｌｌ．　Ｐｈｙｓｉｏｌ．　Ｖｏｌ．　２２６，　Ｎｏ．１０，　ｐｐ．２５３５－２５４２，　２０１１

【非特許文献９】Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｔｏｄａｙ，　Ｖｏｌｕｍｅ　１７，　Ｎｕｍｂｅｒｓ　７／８，　Ａｐｒｉｌ　２０１２，　ｐｐ．２９６－３０９

【非特許文献１０】Ｋａｎｄｉａｈ　Ｊｅｙａｓｅｅｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓｔｒｏｋｅ，　Ｍａｒｃｈ　２００８，　ｐｐ．９５９－９６６

【非特許文献１１】Ｎｉｅｌｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．３１３，１５６－１６４（１９９９）
【非特許文献１２】Ｅｌａｙａｄｉ，ｅｔ ａｌ，同上
【非特許文献１３】Ｂｒａａｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４１，４５０３－４５０９（２００２）
【非特許文献１４】Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５４，１４９７－１５００（１９９１）
【非特許文献１５】Ｋｕｒｒｅｃｋ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７０，１６２８－１６４４（２００３））
【非特許文献１６】Ｋｕｒｒｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３０，１９１１－１９１８（２００２）
【非特許文献１７】Ｅｌａｙａｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｒｕｇｓ ２，５５８－５６１（２００１）
【非特許文献１８】Ｏｒａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．３，２３９－２４３（２００１）
【非特許文献１９】Ｋｏｓｈｋｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ５４，３６０７－３６３０（１９９８）
【非特許文献２０】Ｏｂｉｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３９，５４０１－５４０４（１９９８）
【非特許文献２１】Ｇａｂｉｚｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８８），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，１８：６９４９－５３
【非特許文献２２】Ｆｏｌｋｅｒｔｈ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｐａｔｈ．Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏ．，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ１９９９，５８：９
【非特許文献２３】Ｃａｎｄｅｌａｒｉｏ－Ｊａｌｉｌ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅ－２ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｎｉｍｅｓｕｌｉｄｅ ｏｎ ｃｅｒｅｂｒａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ ｄｅｆｉｃｉｔｓ ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ ｐｅｒｍａｎｅｎｔ ｍｉｄｄｌｅ ｃｅｒｅｂｒａｌ ａｒｔｅｒｙ ｏｃｃｌｕｓｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｒａｔ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ ２，３，２００５
【非特許文献２４】Ｓｐｒａｔｔ，Ｎ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｔｈｒｅａｄ ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｅ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｓｔｒｏｋｅ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｒａｔｅ ａｎｄ ｒｅｄｕｃｅｓ ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ａｆｔｅｒ ｔｈｒｅａｄ－ｏｃｃｌｕｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｍｉｄｄｌｅ ｃｅｒｅｂｒａｌ ａｒｔｅｒｙ ｉｎ ｙｏｕｎｇ ｏｒ ａｇｅｄ ｒａｔｓ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １５５，２８５－２９０，２００６
【非特許文献２５】Ｊｏｓｈｉ，Ｃ．Ｎ．，Ｊａｉｎ，Ｓ．Ｋ．＆Ｍｕｒｔｈｙ，Ｐ．Ｓ．Ａｎ ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ｔｒｉｐｈｅｎｙｌｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ ｃｈｌｏｒｉｄｅ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｅｒｅｂｒａｌ ｉｎｆａｒｃｔｓ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．１３，１１－１７，２００４
【非特許文献２６】Ｌｉｎ，Ｔ．Ｎ．，Ｈｅ，Ｙ．Ｙ．，Ｗｕ，Ｇ．，Ｋｈａｎ，Ｍ．＆Ｈｓｕ，Ｃ．Ｙ．Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｂｒａｉｎ ｅｄｅｍａ ｏｎ ｉｎｆａｒｃｔ ｖｏｌｕｍｅ ｉｎ ａ ｆｏｃａｌ ｃｅｒｂｒａｌ ｉｓｃｈｅｍｉａ ｍｏｄｅｌ ｉｎ ｒａｔｓ．Ｓｔｒｏｋｅ ２４，１１７－１２１，１９９３

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明は、被験体に、ｍｉＲＮＡ－１９５、修飾ｍｉＲＮＡ－１９５、およびそれらの

組み合わせから選択されるマイクロＲＮＡを有効量で投与することを含む、神経保護の提供方法も提供する。

【００１１】

１つの実施形態において、神経保護は、Ｓｅｍａ３Ａの発現または蓄積の阻害を通じたものである。

【００１２】

別の実施形態において、神経保護は、ニューロンアポトーシスの阻害または予防を通じたものである。

【００１３】

別の実施形態において、神経保護は、細胞ストレスからニューロンを保護する抗炎症効果を通じたものである。

【００１４】

別の実施形態において、神経保護は、ＮＯの過剰産生の減少を通じたものである。

【００１５】

さらなる実施形態において、本発明に記載されるｍｉＲＮＡは、フリーラジカル消去剤または抗炎症薬として用いられる。

【００１６】

さらに別の実施形態において、神経保護は、神経もしくは脳の損傷または神経変性疾患と関係する。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１Ａ】図１Ａは、３時間および６時間の酸素およびグルコース欠乏（ＯＧＤ）による細胞生存率の低下を示す。

【図１Ｂ】図１Ｂは、ＯＧＤを誘導したＳＨ－Ｓ５Ｙ５細胞における内在性ＭｉＲ－１９５の減少（パネルＢ）を示す。

【図２】図２は、３時間および６時間のＯＧＤ後の細胞生存率を増加させるｍｉＲ－１９５の効果を示す。細胞生存率は、２４時間後に測定した。

【図３】図３は、ｍｉＲ－１９５が、アポトーシス経路に関与する複数の遺伝子の発現に影響することを示す。ｍｉＲ－１９５は、抗アポトーシス遺伝子（ＢＣＬ２）発現を増加させるが、２種のアポトーシス遺伝子（カスパーゼ３およびＦａｓＬ）を阻害する。また、ｍｉＲ－１９５は、これらの遺伝子に対して、用量依存的に効果を示す。

【図４】図４は、アストロサイトにおけるＬＰＳ誘導型炎症誘発性反応へのｍｉＲＮＡ－１９５の効果を示す。

【図５】図５は、ナノ粒子（ＮＰ）に担持されたｍｉＲ－１９５が、ＯＧＤ後の細胞死を用量依存的に予防する効果を有することを示す。

【図６】図６は、Ｓｅｍａ３ＡおよびＣｄｃ４２のノックダウンが、ＳＨ－Ｓ５Ｙ５細胞生存率を向上させることを示す。

【図７】図７は、ＭｉＲ－１９５が、Ｓｅｍａ３ＡおよびＣｄｃ４２をタンパク質レベルで用量依存的に制御する効果を示す。

【図８】図８は、脳卒中の誘導から３０分後に、脳卒中ラットにリポソーム担持型ｍｉＲ－１９５を静脈内注射（１．６５－６．６ナノモル／ｋｇ；本発明において、５０ｎＭは３．３ナノモル／ｋｇと等しい）した後の、脳のダメージを用量依存的に減少させる効果を示す。梗塞体積は全脳体積に占める割合として定量的に示す。ＮＣは、スクランブルをかけたｍｉＲを示す。

【図９】図９は、脳卒中の誘導から１２０分後に、脳卒中ラットにリポソーム担持型ｍｉＲ－１９５を静脈内注射（３．３ナノモル／ｋｇ；本発明において、５０ｎＭは３．３ナノモル／ｋｇと等しい）した結果を示す。

【図１０】図１０は、脳卒中ラットにＬＮＡ１を静脈内注射した結果を示す。梗塞体積は全脳体積に占める割合として定量的に示す。ＮＣは、スクランブルをかけたｍｉＲを示す。

【発明を実施するための形態】
【００１８】
本発明は、驚いたことに、マイクロＲＮＡ－１９５の増加が神経保護を提供できることを見いだした。
【００１９】
特に記載がないかぎり、本明細書中で用いられる技術用語、表記法、およびその他の科学用語または用語法は全て、本発明が関連する技術分野の当業者により通常認められている意味を有するものとする。場合によっては、通常認められている意味を有する用語を、明確にするためおよび／または参考までに、本明細書中で定義するが、本明細書中にそのような定義が含まれることは、当該分野で一般に認められるものと実質的に異なることを表すとは必ずしも解釈されないはずである。本明細書中で記載または参照される技術および手順の多くは、十分に理解されたものであり、従来の方法論を用いて当業者により通常採用されるものである。市販されているキットおよび試薬の使用を含む手順は、特に記載がないかぎり、適宜、一般に製造元の指定するプロトコルおよび／またはパラメーターに従って行なわれる。
【００２０】
「ａ」および「ａｎ」という用語は、その冠詞の文法上の目的語が１つまたは１つより多い（すなわち、少なくとも１つ）ということを示す。
【００２１】
本明細書中使用される場合、請求項における「または」という用語は、択一的選択肢だけであることを示すと明確に示されない限り、または選択肢が互いに排他的であるのではない限り、「および／または」であることを示す。
【００２２】
「治療する」、「治療」、または「治療の」という用語は、患者が経験しているニューロンまたは神経系のダメージの症候の頻度、規模、重篤度、および／または期間を減少させることを意味する。
【００２３】
「予防する」、「予防」、または「予防の」という用語は、ニューロンまたは神経系の疾患を招く可能性を低下させることを意味する。
【００２４】
本明細書中使用される場合、「被験体」という用語は、マイクロＲＮＡもしくはマイクロＲＮＡ模倣物を用いる治療または本明細書中記載されるのと同様な目的で与えられる治療を受ける任意の対象を示す。
【００２５】
ｍｉＲＮＡ、ｍｉＲ、およびマイクロＲＮＡという用語は、互換して使用することができ、遺伝子発現の転写後レギュレーターとして働く内在遺伝子に由来する、２１～２３ｎｔの非翻訳ＲＮＡを示す。これらは、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡと名付けられたもっと長い（約７０～８０ｎｔ）ヘアピン様前駆体がリボヌクレアーゼＩＩＩ酵素ダイサーにより加工されることで生じる。ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＰと名付けられたリボ核タンパク質複合体に集まっていて、各自の標的部位をアンチセンス相補性により認識し、それにより、各自の標的遺伝子の下方制御を仲介する。ｍｉＲＮＡとその標的部位の間の相補性がほぼ完璧または完璧な場合は、目的とするｍＲＮＡ切断をもたらすが、ｍｉＲＮＡとその標的部位の間の相補性が限られている場合は、標的遺伝子の翻訳阻害をもたらす。本明細書中において互換的に使用されるとおり、「ｍｉＲ遺伝子産物」、「マイクロＲＮＡ」、「ｍｉＲ」、「ｍｉＲ」、または「ｍｉＲＮＡ」は、ｍｉＲ遺伝子の未加工または加工ＲＮＡ転写物を示す。ｍｉＲ遺伝子産物はタンパク質に翻訳されないので、「ｍｉＲ遺伝子産物」という用語はタンパク質を含まない。未加工ｍｉＲ遺伝子転写物は、「ｍｉＲ前駆体」とも呼ばれ、典型的には、長さが約７０～１００ヌクレオチドあるＲＮＡ転写物を含む。ｍｉＲ前駆体はリボヌクレアーゼ（例えば、ダイサー、アルゴノート、リボヌクレアーゼＩＩＩ（例えば、大腸菌リボヌクレアーゼＩＩＩ））による消化で加工されて活性な２１～２３

ヌクレオチドのＲＮＡ分子になる。この活性な２１～２３ヌクレオチドのＲＮＡ分子は、「加工」ｍｉＲ遺伝子転写物または「成熟」ｍｉＲＮＡとも呼ばれる。

【００２６】

ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡは、一次ｍｉＲＮＡ転写物を示す。最初に、ｍｉＲＮＡ遺伝子は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩにより転写されて、長い一次ｍｉＲＮＡ（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）になる。これらのｐｒｉ－ｍｉＲＮＡから最終成熟ｍｉＲＮＡへの加工は、段階的かつ区画化されて起こる。動物ではｐｒｉ－ｍｉＲＮＡは、核内でリボヌクレアーゼＩＩＩ酵素ドローシャにより加工されて７０～８０ヌクレオチドの前駆体ｍｉＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）になる。

【００２７】

「ｍｉＲＮＡ前駆体」という用語は、ゲノムＤＮＡに由来しかつ１つ以上のｍｉＲＮＡ配列を含む非翻訳の構造的ＲＮＡを含む転写物を意味する。例えば、特定の実施形態において、ｍｉＲＮＡ前駆体はｐｒｅ－ｍｉＲＮＡである。特定の実施形態において、ｍｉＲＮＡ前駆体はｐｒｉ－ｍｉＲＮＡである。「ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ」または「ｐｒｅ－ｍｉＲ」は、ｍｉＲＮＡを含有しヘアピン構造を有する非翻訳ＲＮＡを意味する。特定の実施形態において、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、ｐｒｉ－ｍｉＲがドローシャとして知られる二本鎖ＲＮＡ特異的リボヌクレアーゼにより切断された産物である。

【００２８】

「有効量」という用語は、ニューロンまたは神経系のダメージを阻害および／または治療および／または予防するのに有効な、ｍｉＲＮＡまたはその模倣物の量を意味する。例えば、有効量のｍｉＲＮＡは、ニューロンまたは神経系のダメージを阻害すること、および／またはニューロンまたは神経系のダメージにより引き起こされる疾患に関連した１種以上の徴候をある程度まで軽減することができる。

【００２９】

１つの態様において、本発明は、被験体に、ｍｉＲＮＡ－１９５、修飾ｍｉＲＮＡ－１９５、およびそれらの組み合わせから選択されるマイクロＲＮＡを有効量で投与することを含む、神経保護を提供する方法を提供する。

【００３０】

本発明に従って、本明細書中記載されるｍｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＡ－１９５、またはその修飾マイクロＲＮＡ、またはそれらの組み合わせを示す。

【００３１】

１つの実施形態において、少なくとも１つの修飾部分は、骨格単位としてアミノ酸残基に結合した塩基を含む。アミノ酸残基に結合した少なくとも１つの塩基を有する修飾部分は、本明細書中、ペプチド核酸（ＰＮＡ）部分と称することにする。そのような部分は、ヌクレアーゼ耐性があり、当該分野で既知である。ＰＮＡ部分を有する分子は、一般に、ペプチド核酸と称する（Ｎｉｅｌｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．３１３，１５６－１６４（１９９９）；Ｅｌａｙａｄｉ，ｅｔ ａｌ，ｉｄ．；Ｂｒａａｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４１，４５０３－４５０９（２００２）；Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５４，１４９７－１５００（１９９１））（非特許文献１１～１４）。

【００３２】

修飾ｍｉＲＮＡ－１９５として、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１９５またはｍｉＲＮＡの全ピリミジンヌクレオチドがｍｉＲＮＡ安定性を改善するためにそれらの２'－Ｏ－メチル類似体で置き換えられている）またはｍｉＲＮＡ－１９５の模倣物（例えば、合成ｍｉＲＮＡ－１９５二重鎖）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３３】

１つの実施形態において、本発明で有用なｍｉＲ－１９５模倣物の設計、特に、ｍｉＲ－１９５模倣物の標的配列の選択は、細胞内で切断されてｍｉＲ－１９５を形成することができる１種の既存ＲＮＡと、本明細書中に記載される修飾でこれに適合するものに基づいて行なうことができる。修飾ｓｈＲＮＡとして、ヌクレオチド類似体を含有する分子（

核酸塩基、糖、または骨格に、付加、除去および／または置換がある分子が挙げられる）；および架橋したまたはいずれにしろ化学的に修飾された分子が挙げられる。修飾ヌクレオチドは、ｍｉＲ－１９５分子の一部に収まるものでもよいし、全体にわたるものでもよい。例えば、ｍｉＲ－１９５分子は、その５'末端、３'末端、もしくはその両方の領域で、および／またはガイド鎖、パッセンジャー鎖、もしくはその両方の鎖内で、および／または５'末端、３'末端、もしくはその両方のヌクレオチドオーバーハング内で、修飾されている、すなわちその部分に修飾核酸を含有することができる。

【００３４】

１つの実施形態において、ｍｉＲＮＡ－１９５は、本来のヒトｍｉＲＮＡ－１９５（本来のヒトｍｉＲＮＡ－１９５の配列はＵＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＵＡＵＵＧＧＣ；配列番号１）、修飾ヒトｍｉＲＮＡ－１９５、例えば、ヒトｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１９５（ヒトｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ－１９５の配列はＡＧＣＵＵＣＣＣＵＧＧＣＵＣＵＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＵＡＵＵＧＧＣＡＣＡＧＧＧＡＡＧＣＧＡＧＵＣＵＧＣＣＡＡＵＡＵＵＧＧＣＵＧＵＧＣＵＧＣＵＣＣＡＧＧＣＡＧＧＧＵＧＧＵＧ；配列番号２）、またはヒトｍｉＲＮＡ－１９５の模倣物を含むことができる。

【００３５】

１つの実施形態において、修飾一本鎖マイクロＲＮＡ分子は、修飾分子が少なくとも１つの修飾部分を含む（すなわち、少なくとも１つの部分は、未修飾デオキシリボヌクレオチド部分でも未修飾リボヌクレオチド部分でもない）ことを除けば、上記で記載される、マイクロＲＮＡ分子、ヘアピン前駆体分子、またはそれらの等価物のどれでも可能である。この実施形態において、修飾マイクロＲＮＡ分子は、最少でも１０の部分、好ましくは最少でも１３、より好ましくは最少でも１５、さらにより好ましくは最少でも１８、および特に好ましくは最少でも２１の部分を含む。

【００３６】

修飾マイクロＲＮＡ分子は、好ましくは、最大でも５０の部分、より好ましくは最大でも４０、さらにより好ましくは最大でも３０、特に好ましくは最大でも２５、および最適には最大でも２３の部分を含む。部分の個数の適切な最小最大範囲は、上記の最小値のいずれかと上記の最大値のいずれかを組み合わせることで決めることができる。

【００３７】

各修飾部分は、骨格単位と結合した塩基を含む。骨格単位は、安定して塩基と結合することができかつオリゴマー鎖を形成することができる分子単位ならなんでもよい。本明細書において、修飾部分の骨格単位は、天然のＤＮＡまたはＲＮＡ分子に通常見られる骨格単位を含まない。

【００３８】

そのような修飾マイクロＲＮＡ分子は、ヌクレアーゼ耐性が向上している。したがって、分子のヌクレアーゼ耐性は、未修飾リボヌクレオチド部分のみ、未修飾デオキシリボヌクレオチド部分のみ、またはその両方のみを含有する配列と比較して向上する。そのような修飾部分は、当該分野で既知であり、例えば、過去に総説が書かれている（Ｋｕｒｒｅｃｋ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７０，１６２８－１６４４（２００３））（非特許文献１５）。

【００３９】

修飾部分は、マイクロＲＮＡ分子のどの位置にも存在することができる。例えば、マイクロＲＮＡ分子を３'→５'エキソヌクレアーゼから保護するために、この分子の３'末端において、この分子に、少なくとも１つの修飾部分を、好ましくは少なくとも２つの修飾部分を持たせることができる。分子を５'→３'エキソヌクレアーゼら保護することが望ましい場合は、マイクロＲＮＡ分子の５'末端において、この分子に、少なくとも１つの修飾部分を、好ましくは少なくとも２つの修飾部分を持たせることができる。マイクロＲＮＡ分子は、分子の５'と３'末端の間に、少なくとも１つの修飾部分、好ましくは少なくとも２つの修飾部分を持つことにより、分子のエンドヌクレアーゼ耐性を構造させることもできる。好ましくは、部分の少なくとも約１０％、より好ましくは少なくとも約２５％、

さらにより好ましくは少なくとも約５０％、いっそうより好ましくは少なくとも約７５％、特に好ましくは少なくとも約９５％が修飾されている。１つの実施形態において、全ての部分が修飾されている（例えば、ヌクレアーゼ耐性になる）。

【００４０】

修飾マイクロＲＮＡ分子の１つの例において、この分子は、少なくとも１つの修飾デオキシリボヌクレオチド部分を含む。適切な修飾デオキシリボヌクレオチド部分は当該分野で既知である。そのような修飾デオキシリボヌクレオチド部分は、骨格単位として、例えば、ホスホロチオアートデオキシリボース基を含む。修飾デオキシリボヌクレオチド部分の別の適切な例は、Ｎ'３－Ｎ'５ホスホロアミダートデオキシリボヌクレオチド部分であるが、これは骨格単位としてＮ'３－Ｎ'５ホスホロアミダートデオキシリボース基を含む。

【００４１】

修飾リボヌクレオチド部分の適切な例は、２'－酸素原子と４'－炭素原子の間にメチレン架橋を有するリボヌクレオチドである。２'－酸素原子と４'－炭素原子の間にメチレン架橋を有するリボヌクレオチド部分を含むオリゴリボヌクレオチド分子は、一般にロックト核酸（ＬＮＡ）と称する。例えば、以下を参照：Ｋｕｒｒｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３０，１９１１－１９１８（２００２）;Ｅｌａｙａｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｒｕｇｓ ２，５５８－５６１（２００１）；Ｏｒａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．３，２３９－２４３（２００１）；Ｋｏｓｈｋｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ５４，３６０７－３６３０（１９９８）；Ｏｂｉｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３９，５４０１－５４０４（１９９８）（非特許文献１６～２０）。ロックト核酸は、Ｐｒｏｌｉｇｏ社（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ ａｎｄ Ｂｏｕｌｄｅｒ，Ｃｏｌｏ．，ＵＳＡ．）から市販されている。本発明におけるｍｉｒ－ＲＮＡおよびそれらの模倣物は、少なくとも１つまたは複数のＬＮＡ単量体を含有する「ＬＮＡ修飾型オリゴマー」であることが可能である。いくつかの実施形態において、ＬＮＡ修飾型ｍｉＲ－１９５配列は、以下の配列を含むが、これらに限定されない。以下の配列において、ＬＮＡ修飾されたヌクレオチドには下線を付してある。

ｍｉＲ－１９５ＬＮＡ１：ＵＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＵＡＵＵＧＧＣ（配列番号３）
ｍｉＲ－１９５ＬＮＡ２：ＴＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＵＡＵＵＧＧＣ（配列番号４）
ｍｉＲ－１９５ＬＮＡ３：ＴＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＴＡＴＴＧＧＣ（配列番号５）
ｍｉＲ－１９５ＬＮＡ４：ＴＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＴＡＴＴＧＧＣ（配列番号６）
ｍｉＲ－１９５ＬＮＡ５：ＴＡＧＣＡＧＣＡＣＡＧＡＡＡＴＡＴＴＧＧＣ（配列番号７）

【００４２】

別の実施形態において、ｍｉＲＮＡは、ナノ粒子と組み合わせることができる。したがって、本発明は、ナノ粒子を組み合わせたｍｉＲＮＡまたはその修飾ｍｉＲＮＡを含む薬学的混合物を提供する。好ましくは、ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、金属ナノ粒子、または高分子ナノ粒子である。ナノ粒子は、粒子径が１０～１０００ｎｍの範囲の粒子分散液または固形粒子と定義される。ナノ粒子は、脂質、タンパク質、多糖類、および合成高分子などの多様な材料から調製することができる。調製方法に応じて、ナノ粒子、ナノ球体、またはナノカプセル剤を得ることができる。ナノカプセル剤は、独特の高分子膜で取り囲まれた空間に薬剤を閉じ込めた系であり、一方ナノ球体は、薬を物理的に均一に分散させたマトリクス系である。ナノ粒子は、これまで以下の３通りの方法で調製されることがほとんどであった：（１）予め形成させた高分子の分散化；（２）単量体の重合化；および（３）親水性高分子のイオン性ゲル化またはコアセルベーション。しかしながら、超臨界流体技術および非濡れテンプレートを用いた粒子複製法（ＰＲＩＮＴ）などの他の方法も、ナノ粒子の製造として文献で記載されている。

【００４３】

本発明のｍｉＲＮＡ分子は、ｍｉＲ前駆体から、自然の加工経路を通じて（例えば、無

傷細胞または細胞溶解物を用いて）または合成加工経路（例えば、単離されたダイサー、アルゴノート、またはリボヌクレアーゼＩＩＩなどの単離された加工酵素を用いて）により得ることができる。当然ながら、ｍｉＲＮＡ分子は、ｍｉＲ前駆体から加工しなくても、生物学的または化学的合成により直接生成させることもできる。本明細書中ｍｉＲＮＡを名前で示す場合、特に記載がない限り、その名前は、前駆体型と成熟型の両方に対応する。

【００４４】

ＭｉｃｒｏＲＮＡは、ダイサーおよびドローシャと呼ばれる、長いｐｒｅ－ｍｉＲＮＡを特異的に処理して機能性ｍｉＲＮＡにする酵素により、ｉｎ　ｖｉｖｏでｐｒｅ－ｍｉＲＮＡから発生させることができる。本発明で取り上げるｍｉＲＮＡまたは前駆体ｍｉＲＮＡは、細胞ベースのシステムによりｉｎ　ｖｉｖｏで合成することもできるし、化学合成することもできる。ｍｉＲＮＡは、所望の特性を付与する修飾を有するように合成することができる。例えば、修飾は、安定性、標的核酸とのハイブリダイゼーション熱力学、特定組織または細胞型を標的とすること、あるいは細胞浸透性（例えば、エンドサイトーシス依存性または独立性の機構によるもの）を改善することができる。修飾は、配列特異性も向上させることができ、その結果標的が的外れになることを減少させることができる。合成および化学修飾の方法は、以下でより詳細に説明する。

【００４５】

ｍｉＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、二重鎖を形成するのに十分な相補性がある領域（例えば、７、８、９、１０、または１１ヌクレオチド長の領域）の脇に非相補性領域（例えば、３、４、５、または６ヌクレオチド長の領域）を含むように設計および合成することができる。ヌクレアーゼ耐性および／または標的に対する結合親和性を向上させるため、ｍｉＲＮＡ配列に、２'－Ｏ－メチル、２'－フッ素、２'－Ｏ－メトキシエチル、２'－Ｏ－アミノプロピル、２'－アミノ、および／またはホスホロチオアート結合を持たせることができる。オリゴヌクレオチド骨格にフラノース糖が含まれていることも、ヌクレオチド鎖切断を減少させることができる。ｍｉＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、３'－カチオン性基を含むことにより、または３'－末端でヌクレオシドを３'－３'結合で反転させることにより、さらに修飾することができる。別の代替形態では、３'－末端を、アミノアルキル基、例えば、３'－Ｃ５－アミノアルキルｄＴで封鎖することができる。他の３'－複合体は、３'－５'エキソヌクレアーゼ切断を阻害することができる。

【００４６】

１つの実施形態において、ｍｉＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、標的化を改善する修飾、例えば上記の標的化修飾を含む。ｍｉＲＮＡ分子が特定の分子型を標的とするようにする修飾の例として、炭水化物糖（ガラクトース、Ｎ－アセチルガラクトサミン、マンノースなど）；ビタミン（葉酸など）；他のリガンド（ＲＧＤおよびＲＧＤ模倣物など）；および小分子または他の既知のタンパク質結合分子が挙げられる。

【００４７】

ｍｉＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、化学合成および／または酵素による連結反応を用いて、当該分野で既知の手順により構築することができる。例えば、ｍｉＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、天然のヌクレオチドを用いて、あるいは分子の生体安定性を向上させるように、またはｍｉＲＮＡもしくはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡと標的核酸とで形成される二重鎖の物理的安定性を向上させるように設計された様々な修飾ヌクレオチドを用いて化学合成することができ、例えば、ホスホロチオアート誘導体およびアクリジン置換したヌクレオチドを用いることができる。他の適切な核酸修飾は、本明細書中に記載される。あるいは、ｍｉＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ核酸は、核酸をアンチセンス方向にサブクローニングしてある発現ベクターを用いて生物学的に産生させることができる、すなわち、挿入された核酸から転写されるＲＮＡは、注目している標的核酸に対してアンチセンス方向にあるものとなるだろう。

【００４８】

本発明によれば、ｍｉＲＮＡまたはその修飾物は、神経保護を提供するのに有用である

。神経保護とは、例えば、脳、中枢神経系、もしくは末梢神経系にとって病的または有害な状況があった後の、ニューロンおよびグリアを含む神経細胞の死もしくはダメージを予防するまたは減少させる能力、あるいは神経細胞を救出、蘇生、または復活させる能力を示す。神経保護には、神経細胞の再生、すなわち疾患または外傷後の神経細胞集団の再増殖が含まれる。神経保護は、急性疾患（例えば、脳卒中、または脳もしくは神経系の損傷／外傷、低酸素、脊椎損傷、または末梢神経損傷）後の、または慢性神経変性疾患（例えばパーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症）の結果としての神経系における脳／ニューロン損傷または変性に対する保護として用いられる機構および戦略である。神経保護の目的は、神経系損傷後のニューロン機能障害／死を制限することであり、脳での細胞相互作用の完全性を可能な限り高く維持することで乱れていない神経機能をもたらそうとすることである。神経保護を提供することにより、ｍｉＲＮＡまたはその変異体を用いて、ニューロン損傷（脳卒中、特に虚血性脳卒中、脳損傷、低酸素、脊椎損傷、または末梢神経損傷など）を治療すること、および神経変性疾患を治療／予防することができる。なので、１つの実施形態において、本発明は、神経細胞の再生用医薬の製造における、活性成分としてのｍｉｃｒｏ－ＲＮＡの使用に関する。言い換えると、本発明は、神経細胞の保護および／または再生に用いるためのｍｉｃｒｏ－ＲＮＡに関する。同様に、本発明は、神経細胞の保護および／または再生の必要がある被験体に、ｍｉｃｒｏ－ＲＮＡまたはその模倣物を有効量で投与することを含む、神経細胞の保護および／または再生方法に関する。

【００４９】

神経保護は、例えば、ニューロン死の遅れまたは予防を、例えば、大脳皮質培養物におけるストレス後のアポトーシスニューロンの減少により測定することで、直接求めることができる。神経保護はまた、例えば、中大脳動脈（ＭＣＡＯ）閉塞または再灌流損傷後の脳閉塞の大きさの低下を測定することで、例えば、そのようなストレス後の神経系の組織または器官に対するダメージの重篤度もしくは程度、または神経系の組織または器官の機能損失を測定することにより、直接求めることもできる。また、神経保護は、核磁気共鳴画像法（脳体積測定、トラクトグラフィー、Ｎ－アセチル－アスパラギン酸濃度の分光分析）により、あるいは光学コヒーレント結像での網膜画像化（網膜神経線維層菲薄化）または網膜分光測定（シトクロムｃ、オキシヘモグロビン、乳酸、グルタミン酸、ｉＮＯＳの濃度）により、同定することができる。あるいは、神経保護は、ニューロンを保護する生体機構の１つ以上の活性化を検出することにより間接的に求めることもできる。そのような活性化の検出としては、Ｓｅｍａ３経路の活性化またはニューロンにおけるｉＮＯＳを介して発生するＮＯの過剰産生が減少してニューロン細胞死が止まることの検出が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５０】

本発明に従って、ｍｉＲＮＡ－１９５は、配列番号１または配列番号２に示すとおりの配列を有する。別の実施形態において、ｍｉＲＮＡまたはその変異体は、ナノ粒子と組み合わされている。好ましくは、ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、金属ナノ粒子、または高分子ナノ粒子である。

【００５１】

特定の実施形態において、リポソームを用いてｍｉＲＮＡ産物を被験体に送達する。リポソームは、核酸の血中半減期も延ばすことができる。本発明での使用に適したリポソームは、標準的な小胞形成脂質から形成されたものが可能であり、小胞形成脂質として一般に中性または負電荷を帯びたリン脂質およびステロール（コレステロールなど）が挙げられる。脂質の選択は、一般に、複数の要因（所望のリポソームの大きさおよび血流中のリポソームの半減期など）を考慮して行なわれる。リポソームを調製する多様な方法が知られており、例えば、米国特許第４，２３５，８７１号、第４，５０１，７２８号、第４，８３７，０２８号、および第５，０１９，３６９号（特許文献２～５）に記載されている。これらの開示は全体が、本明細書中参照として援用される。

【００５２】

オプソニン化阻害部分で修飾されたリポソームは、未修飾リポソームよりもはるかに長く血液循環にとどまる。この理由から、そのようなリポソームは「ステルス」リポソームと呼ばれることもある。ステルスリポソームは、多孔質すなわち「漏れやすい」微小脈管構造により供給を受けている組織に蓄積することが知られている。したがって、そのような微小脈管構造欠陥があることを特徴とする組織（例えば、固形腫瘍）には、こうしたリポソームが効率的に蓄積するだろう；Ｇａｂｉｚｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８８），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，Ｕ．Ｓ．Ａ．，１８：６９４９－５３（非特許文献２１）を参照。

【００５３】

本発明の方法で使用するためのリポソームは、そのリポソームが標的細胞を狙うようにするリガンド分子を含むことができる。本発明の方法で使用するためのリポソームは、単核マクロファージ系（「ＭＭＳ」）および細網内皮系（「ＲＥＳ」）によるクリアランスを回避するように修飾することもできる。そのような修飾リポソームは、オプソニン化阻害部分を、表面に有するかまたはリポソーム構造に組み込んでいる。特に好適な実施形態において、本発明のリポソームは、オプソニン化阻害部分およびリガンドの両方を含むことができる。

【００５４】

結果として、本発明は、ｍｉＲＮＡ－１９５が神経保護を提供するのに有益な複数の効果および機能を有することを見いだしたので、ｍｉＲＮＡ－１９５を用いて、ニューロンまたは脳の損傷を治療すること、および急性または慢性神経変性疾患を含む神経変性疾患を治療／または予防することができる。

【００５５】

「神経変性疾患」という用語は、本明細書中、中枢神経系のダメージにより引き起こされる急性、進行性、または慢性の疾患を記載するのにも用いられ、そのダメージは、患者の脳および／または脊椎の損傷領域に直接でもよいが好ましくは細胞またはその可溶性因子がそこに到達できるような全身性経路を介した、本発明によるマイクロＲＮＡ治療を介して回復および／または軽減させることができる。「急性神経変性疾患」という用語は、突然の侵襲に関連し、関連ニューロン死または不全をもたらす疾患または障害を意味する。急性神経変性疾患の例として、脳血管不全、局所性または散在性脳外傷、脊椎損傷、脳虚血または脳閉塞（塞栓性閉塞および血栓性閉塞を含む）、周産期低酸素性虚血、新生児低酸素性虚血性脳症、周産期窒息、心停止、頭蓋内出血、くも膜下出血、脳卒中、および外傷性脳損傷が挙げられる。１つの実施形態において、神経変性疾患は、頭蓋内出血またはくも膜下出血である。くも膜下出血（ＳＡＨ）は、血液がくも膜下腔（脳を取り囲むくも膜と軟膜の間の領域）に流入することを意味する。ＳＡＨは、通常は脳動脈瘤破裂から、自然発生的に生じることもあるし、頭部損傷によることもある。ＳＡＨの症候として、急激に始まる重篤な頭痛、嘔吐、混乱または意識レベルの低下が挙げられ、けいれんを起こすこともある。診断は、一般に、頭部ＣＴ検査で確認されるが、腰椎穿刺により確認されることもある。治療は、迅速な神経系外科手術または放射線透視下のインターベンションにより行なわれ、合わせて投薬および他の治療を行なうことで再出血および合併症を防ぐのに役立てる。ＳＡＨは、救急疾患であり、たとえ初期段階で見つかり治療されたとしても、死または重篤な障害につながる恐れがある。ＳＡＨを生き延びた患者は、神経機能障害または認知機能障害を有することが多い。

【００５６】

本発明による方法を用いて治療することができる神経変性疾患の例として、例えば、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、レット症候群、リソソーム蓄積症（例えば、Ｆｏｌｋｅｒｔｈ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｐａｔｈ．Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏ．，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ１９９９，５８：９（非特許文献２２）に記載されるとおりの「白質疾患」またはグリア脱髄疾患であり、サンフィリポ、ゴーシェ病、テイ・サックス病（βヘキソサミニダーゼ欠乏）が挙げられる）、他の遺伝病、多発性硬化症、虚血、事故、環境性侵襲などにより引き起こされる脳の損傷もしくは外傷、脊椎

ダメージ、運動失調、およびアルコール依存症が挙げられる。また、本発明は、患者において、脳卒中または心臓発作によるか、さもなくばこの患者の脳のある部位への血流が欠乏するすなわち虚血により引き起こされるか、あるいは脳および／または脊椎への物理的損傷により引き起こされた、中枢神経系への影響を減少および／または除去するのに用いることができる。神経変性疾患として、数あるなかでも特に、神経発達障害、例えば、脳性麻痺、自閉症、および関連神経疾患（統合失調症など）なども挙げられる。

【００５７】

本発明はさらに、ニューロン変性疾患（アルツハイマー型認知症（ＡＤ）またはパーキンソン病（ＰＤ）など）の予防または治療法も提供し、本方法は、ｍｉｒ－ＲＮＡ、ｍｉｒ－１９５模倣物を提供して被験体または患者におけるＳｅｍａ３Ａの発現、蓄積、または活性化を阻害することを含む。

【００５８】

ＡＤまたはＰＤの予防または治療法は、そのような治療を必要とする患者にＳｅｍａ３Ａの発現、蓄積、または活性化を阻害する有効量のｍｉ－ＲＮＡまたはその実質を投与することを含む。

【００５９】

「被験体」または「患者」は、診断への適用に関連して上記で記載したとおり、ＡＤまたはＰＤを発症する可能性が高いヒトまたは動物、より詳細にはほ乳類、好ましくはヒト、齧歯類、または霊長類である。「予防」という用語は、ＡＤまたはＰＤの発症を予防することを示し、これは疾患をもたらす病態形成機序に予防的に干渉することを意味する。本発明の文脈において、そのような病態形成機序としては、Ｓｅｍａ３Ａの発現の増加または蓄積が可能である。患者は、疾患を発症する危険性が高まっている被験体かもしれないし、例えば、ＡＤに関して、そのような被験体は、家族が家族性ＡＤ（ＦＡＤ）である人物などのように、アミロイドーシスを発症する遺伝的素因を持っているかもしれない。あるいは、人によっては、その人が７０歳代または８０歳代のときに加齢性ＡＤの危険性が高まる。

【００６０】

「治療上有効量」という用語は、本明細書中、ｍｉＲＮＡ（例えばｍｉｒ－１９５）がＳｅｍａ３Ａ活性のレベルを例えば、約１０％、好ましくは約５０％）、およびより好ましくは約９０％＞の割合で減少させるのに十分な量または投薬量を意味するものとして用いられる。好ましくは、治療上有効量は、Ｓｅｍａ３Ａの活性、機能、および効果を、寛解させる、またはそれらに臨床上有意義な不足を示させることができる。あるいは、治療上有効量のｍｉＲＮＡ（例えばｍｉｒ－１９５）は、それが投与された被験体の状態に臨床上有意義な改善をもたらすのに十分である。

【００６１】

ｍｉｒ－１９５の阻害活性は、他の細胞内情報伝達パートナー（ＣＤＣ４２）およびその下流エフェクター（上方制御されるＢＣＬ２および下方制御されるカスパーゼ３など）によりＳｅｍａ３Ａに直接対抗することで、ニューロンアポトーシスを防ぐことができる。

【００６２】

１つの実施形態において、本発明のｍｉＲＮＡは、ニューロンを、様々な細胞ストレス（興奮毒性および酸化ストレスなど）、脊椎ダメージ、運動失調、およびアルコール依存症から保護する抗炎症性質を示すことにより、ほ乳類ＣＮＳにおいて最大集団の非興奮性星状細胞を保護することを実証する。

【００６３】

活性化アストロサイトが仲介するニューロン細胞死に関するさらなる実験において、本発明のｍｉＲＮＡは、ニューロンのｉＮＯＳを介して発生するＮＯの過剰産生を減少させることによりニューロン細胞死を止める。

【００６４】

本発明のｍｉＲＮＡは、酸化ストレスと名付けられた、活性酸素種の発生と抗酸化剤の

活性との間の不均衡に作用し、ＬＰＳ誘導型ｉＮＯＳ発現検査で活性の減弱化を実証する、強力なフリーラジカル消去剤であり抗炎症薬でもある。従って、本発明のｍｉＲＮＡは、ニューロンダメージから生じる、多様なヒトＣＮＳ変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病を含む）および病態（虚血など）に関与する低酸素性損傷を軽減する。

【００６５】

本発明のｍｉＲＮＡは、さらに、治療に適していればどのような虚血でもその治療に向かう。虚血は、本明細書中使用される場合、器官および／または組織への血流が減少した状態である。血流の減少は、それを引き起こすにふさわしい任意の機構により、とりわけ器官および／または組織に血液を供給する１本以上の血管の、部分的もしくは完全な遮断（閉塞）、狭小化（狭窄）、および／または漏出／破裂などの機構により引き起こされる可能性がある。したがって、虚血は、血栓症、塞栓症、粥状動脈硬化、高血圧、出血、動脈瘤、手術、外傷、投薬などにより作り出される可能性がある。したがって、血流の減少は、慢性、一過性、急性、散発性などの可能性がある。

【００６６】

本発明のさらなる目的は、脳卒中の治療を提供することである。脳卒中は、本明細書中使用される場合、脳の一部（または全体）への血液供給が減少することで生じる脳虚血である。脳卒中で生じる症候は、突然の場合もあるし（意識消失など）、数時間または数日にわたって徐々に発症することもある。そのうえさらに、脳卒中は、中でもとりわけ、大規模な虚血性発作（完全脳卒中）かもしれないし、それより小規模な一過性虚血性発作かもしれない。脳卒中で生じる症候として、例えば、不全片麻痺、片麻痺、片側のしびれ、片側の脱力、片側の麻痺、一過性四肢脱力、四肢刺痛、錯乱、発話困難、音声理解困難、片目または両目のかすみ目、視力減退、視力消失、歩行困難、めまい、転倒傾向、運動失調、突然の重篤な頭痛、喘音、および／または意識消失を挙げることができる。これ以外に、またはこれに加えて、症候は、より容易に、すなわち試験および／または装置だけで、例えば、虚血性血液検査（例えば、アルブミン変化、特定タンパク質アイソフォーム、ダメージタンパク質などの検査）、心電図、脳波、運動負荷試験などだけで検出可能なものであるかもしれない。

【００６７】

本発明のｍｉＲＮＡは、被験体の虚血性損傷を減らすための虚血性被験体の治療法を提供する。虚血性被験体とは、本明細書中使用される場合、虚血、虚血関連症状、虚血歴、および／または治療の開始後および治療が有効である期間中に虚血を発症するかなりの可能性を有する、任意の人物（ヒト被験体）または動物（動物被験体）である。

【００６８】

治療される虚血性被験体は、任意の適切な基準で選択することができる。基準の例として、任意の検出可能な虚血症候、虚血歴、虚血の危険性を高める（または虚血を誘導する）事象（外科手技、外傷、投薬など）などを挙げることができる。虚血歴として、１つ以上の過去の虚血出現が挙げられる。場合によっては、治療に選ばれた被験体は、治療を開始する少なくとも約１時間前、２時間前、または３時間前に虚血を発症しているかもしれないし、生じてから治療を開始するまでが約１日未満、１２時間未満、または６時間未満である複数の虚血出現（一過性虚血性発作など）を有しているかもしれない。

【００６９】

当業者は、複数の要因（被験体の大きさおよび体重；疾患の進入度；被験体の年齢、健康状態、および性別；投与経路；および投与が局所的なのか全身的なのかなど）を考慮することで、所定の被験体に投与されるｍｉＲＮＡ産物の有効量を容易に決めることができる。例えば、単離されたｍｉＲＮＡ産物の有効量は、投与される被験体のおおよその体重に基づくことができる。被験体の体重に基づく単離されたｍｉＲＮＡ産物の有効量は、約１．０ナノモル／ｋｇ～約１５．０ナノモル／ｋｇの範囲が可能である。好ましくは、この量は、約３．０～約１０．０ナノモル／ｋｇ、または約３．０～約７．０ナノモル／ｋｇであり、より好ましくは約３．３～約６．６ナノモル／ｋｇである。

【００７０】

当業者は、所定の被験体に単離されたｍｉＲＮＡ産物を投与するのに適切な投薬レジメンも容易に決めることができる。例えば、ｍｉＲＮＡ産物は、被験体に１回または２回投与することができる。投薬レジメンが複数回の投与を含む場合、当然ながら、被験体に投与されるｍｉＲＮＡ産物の有効量は、投薬レジメン全体にわたって投与されたｍｉＲＮＡ産物の合計量からなるものであり得る。

【００７１】

ｍｉＲＮＡは、任意の適した経腸または非経口の投与経路により被験体に投与することもできる。本方法に適切な経腸投与経路として、例えば、経口、直腸内、または鼻腔内送達が挙げられる。適切な非経口投与経路として、例えば、血管内投与（例えば、静脈内ボーラス注射、静脈内注入、動脈内ボーラス注射、動脈内注入、および脈管構造へのカテーテル滴下）；組織周囲または組織内注入（例えば、筋肉内注入、腫瘍周囲および腫瘍内注入、網膜内注入、または網膜下注入）；皮下注射または沈着、これは皮下輸液（浸透圧ポンプによるものなど）を含む；例えばカテーテルまたは他の留置装置（例えば、網膜ペレットまたは坐剤または多孔質、非多孔質、もしくはゼラチン質材料を含むインプラント）による、目的の組織への直接使用；および吸入が挙げられる。特に適切な投与経路は、注入、輸液、および標的への直接注入である。

【００７２】

本明細書中に引用される全ての文献の関連教示は、それらが参照として明らかに援用されていなくても、その全体が本明細書中に参照として援用される。本発明は本発明の好適な実施形態に関して具体的に提示および記載されてきたものの、それらに対して、形状および詳細における様々な改変が、付属する請求項により包含される本発明の範囲から逸脱することなくなされ得ることが当業者には理解されるだろう。

【実施例１】

【００７３】

ＭｉＲ－１９５の神経保護アッセイ

ニューロン損傷のｉｎ　ｖｉｔｒｏモデルとして神経芽腫細胞株（ＳＨ－ＳＹ５Ｙ）で酸素グルコース欠乏（ＯＧＤ）した場合のｍｉＲ－１９５の神経保護効果を調べた。ｍｉＲ－１９５の内在性発現は、６時間のＯＧＤで顕著に減少（６２％）し（図１Ｂを参照）、ＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞生存率は、対照群と比較して、３時間のＯＧＤで３５％および６時間のＯＧＤで５５％減少した（図１Ａを参照）。ＯＧＤ下のＳＨ－ＳＹ５Ｙ保護効果におけるｍｉＲ－１９５の役割を明らかにするため、リポフェクタミン２０００試薬（インビトロゲン，ＣＡ，ＵＳＡ）を用いてｍｉＲ－１９５模倣物を細胞に導入した。ｍｉＲ－１９５により誘導される細胞生存率の度合いは、ジメチルチアゾリルジフェニルテトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ；シグマアルドリッチ，ＭＯ，ＵＳＡ）で評価した。３時間および６時間のＯＧＤでの細胞生存率に対するｍｉＲ－１９５模倣物（濃度は２５～１００ｎＭ）の治療効果を図２に示す。図２からわかるとおり、ｍｉＲ－１９５は、ダメージ細胞の救済について用量依存性の効果を有する。従って、このｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究から、ｍｉＲ－１９５の神経保護の可能性が示された。

【００７４】

ｍｉＲ－１９５のアポトーシスシグナル経路への影響を調べるため、ＯＧＤ誘導型ＳＨ－ＳＹ５Ｙ細胞死における、Ｂ細胞リンパ腫２（Ｂｃｌ－２）、Ｆａｓリガンド（ＦａｓＬ）、およびカスパーゼ３のタンパク質レベルの変化も、ウェスタンブロットで評価した。ｍｉＲ－１９５処理がＳＨ－ＳＹ５Ｙ中のＢｃｌ－２（抗アポトーシス因子）のタンパク質レベルを上げることがわかった。ＭｉＲ－１９５処理はまた、アポトーシス因子であるＦａｓＬおよびカスパーゼ３のタンパク質レベルを実質的に減少させた（図３）。

【００７５】

リポ多糖類（ＬＰＳ）誘導型アストログリオーシス：アストロサイトの初代培養物のＬＰＳ刺激は、脳卒中をはじめとする脳損傷中のアストロサイト再賦活を模倣するｉｎ　ｖｉｔｒｏモデルとして広く認められている。アストロサイトの誘導型一酸化窒素合成酵素（ｉＮＯＳ）は、脳での炎症に寄与する。ｉＮＯＳは、虚血性脳卒中後に新たに誘導され

得る。虚血性脳卒中の齧歯類モデルにおけるｉＮＯＳ活性の阻害またはｉＮＯＳ遺伝子の欠失は、神経保護をもたらす。ＣＯＸ－２は、虚血に反応して誘導され、ＣＯＸ－２は脳損傷後には神経興奮毒性である。初代アストロサイトにおけるｍｉＲ－１９５の効果を調べるため、マウスに麻酔をかけてから斬首した。大脳皮質をていねいに取り出し、ホモジナイズした。細胞懸濁液を希釈し、細胞をフラスコに播種した。フラスコを軌道回転式に震盪してマイクログリアおよびオリゴデンドロサイトを除去した。懸濁した細胞をデカンテーションして、底に付着した純粋なアストロサイト層を得た。精製したアストロサイトを継代培養し、次いでＬＰＳで１時間処理した。リアルタイムＰＣＲを用いて、誘導型一酸化窒素合成酵素（ｉＮＯＳ）およびＣＯＸ－２のｍＲＮＡレベルを測定した。ウエスタンブロット法を用いて、ｉＮＯＳおよびＣＯＸ－２のタンパク質発現を測定した（図４を参照）。ｍｉＲ－１９５は、アストロサイトにおいて有害なｉＮＯＳおよびＣＯＸ－２を減少させて神経保護効果を発揮し得ることがわかった。

【００７６】

続いて、本発明者らは、ｍｉＲ－１９５を担持するナノ粒子（ＮＰ－ｍｉＲ－１９５）を用いて、同じＯＧＤ細胞実験を繰り返した。６時間のＯＧＤ後、細胞障害検出キット（ラクトースデヒドロゲナーゼ、ＬＤＨ；ロシュ）により細胞死の特性を分析した。６時間のＯＧＤは、ＬＤＨ分泌を強力に促進し、基準レベルより４７％高かった。しかしながら、ＮＰ－ｍｉＲ－１９５の存在下（２５ｎＭ；図５）では、ＬＤＨは効果的に４９％減少した。

【００７７】

そのうえさらに、Ｓｅｍａ３Ａを標的とするｓｈＲＮＡ（ｓｈＳｅｍａ３Ａ）を用いて、Ｓｅｍａ３Ａおよびその下流のＣｄｃ４２をノックダウンすると、細胞生存率が上がることがわかった。これらの結果は、Ｓｅｍａ３ＡのノックダウンがＳＨ－Ｓ５Ｙ５細胞生存率を向上させることを示す（図６を参照）。図６において、（Ａ）Ｓｅｍａ３ＡのｍＲＮＡレベルの変化は、定量的リアルタイムＰＣＲにより決定された。（ＢおよびＣ）ＯＧＤ処理した細胞の生存率は、細胞計数およびＬＤＨ放出により測定した。（Ｄ）３時間および６時間ＯＧＤ処理した細胞において、ｓｈＳｅｍａ３Ａは、定量的リアルタイムＰＣＲによりわかるとおり、Ｃｄｃ４２ｍＲＮＡをノックダウンした。データは、３回の実験による平均＋ＳＤである；＊Ｐ＜０．０５、および＊＊Ｐ＜０．０１は、ＯＧＤに曝されなかった参照細胞と比べたものである。スクランブルをかけたｓｈＲＮＡを遺伝子導入対照として用いた。３時間または６時間ＯＧＤ処理したＳｈ－Ｓ５Ｙ５細胞に、ｍｉＲ－１９５模倣物またはＮＣ－ｍｉＲを導入した。２４時間インキュベーション後に、細胞中のＳｅｍａ３Ａ、Ｃｄｃ４２、およびＮｒｐ－１のタンパク質レベルをウェスタンブロットで検出した。図７は、ＭｉＲ－１９５がＳｅｍａ３ＡおよびＣｄｃ４２をタンパク質レベルで制御することを示す。

【実施例２】

【００７８】

ナノ粒子担持型ｍｉＲ－１９５についてのｉｎ　ｖｉｖｏ神経保護アッセイ

オスのＳＤラット（２８０～３５０ｇ）を用い、先に報告された外科的アプローチ（Ｃａｎｄｅｌａｒｉｏ－Ｊａｌｉｌ，Ｅ．ｅｔ ａｌ．Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｔｈｅ ｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅ－２ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｎｉｍｅｓｕｌｉｄｅ ｏｎ ｃｅｒｅｂｒａｌ ｉｎｆａｒｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｎｅｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ ｄｅｆｉｃｉｔｓ ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ ｐｅｒｍａｎｅｎｔ ｍｉｄｄｌｅ ｃｅｒｅｂｒａｌ ａｒｔｅｒｙ ｏｃｃｌｕｓｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｒａｔ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ ２，３，２００５）（非特許文献２３）で中大脳動脈閉塞（ＭＣＡＯ）を誘導した。端をケイ素修飾した３－０ナイロンフィラメント（Ｓｐｒａｔｔ，Ｎ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ ｔｈｒｅａｄ ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｅ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｓｔｒｏｋｅ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｒａｔｅ ａｎｄ ｒｅｄｕｃｅｓ ｍｏｒｔａｌｉｔｙ ａｆｔｅｒ ｔｈｒｅａｄ－ｏｃｃｌｕｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｍｉｄｄｌｅ ｃｅ

ｒｅｂｒａｌ ａｒｔｅｒｙ ｉｎ ｙｏｕｎｇ ｏｒ ａｇｅｄ ｒａｔｓ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １５５，２８５－２９０，２００６）（非特許文献２４）を、右総頸動脈（ＣＣＡ）の小さな切れ目から入れ、頸動脈分岐より約２２ｍｍ先まで挿入した。その後、縫合糸をＣＣＡに沿って切れ目から吻側に連結させることで、ナイロンフィラメントを係留して血管を封鎖した。皮膚切開を縫合糸で閉じ、抗生剤軟膏で局所的に処理した。ナノ粒子は、中枢神経系の疾患にとって理想的な薬物担体と提唱されてきた。なぜならその粒子径が小さいことにより、ナノ粒子はより容易に脳血液関門を通り抜けられるからである。より理想的な薬物担体としてリポソームナノ粒子にｍｉＲ－１９５を担持させた。この実験では、市販のリポソームにｍｉＲ－１９５を担持させた。市販のリポソームナノ粒子は、ｍｉＲ－１９５を、天然脂質、非イオン性洗浄剤、油、および小分子からなる半乾燥配合物に組み込むものであり、この配合物は、ＭａｘＳｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｉｎ ｖｉｖｏ ＲＮＡＬａｎｃｅｒｌｌキット（ＢＩＯＯ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．）に含まれる。簡単にいうと、このキットの１つのグラス内で、リポソーム乳濁液とｍｉＲ－１９５（１００μｇ）を、滅菌リボヌクレアーゼを含まない１０倍ＰＢＳの存在下（１：２ｗ／ｗのｍｉＲ－１９５－リン脂質－油乳濁液）で混合して、濃度が１０～２０ｍｇ／ｍＬの原液とする。カプセル化効率を高めるとともにリポソームの大きさを小さくするため、リポソーム乳濁液を、室温で超音波水浴に入れて５分間超音波処理する。

【００７９】

ナノ粒子実験の結果は、有望で興奮するものである。詳細な手順は以下のとおり－ＭＣＡＯによる脳卒中の誘導から３０分後または２時間後、リポソームに担持されたｍｉＲ－１９５の配合物を、尾静脈注入（体積１５０ｍｍ^3）により静脈内（ｉ．ｖ．）投与した。

【００８０】

処置の２４時間後、ラットを安楽死させて斬首した。ラットの脳を集め、スライスして２ｍｍの冠状切片とし、０．１％２，３，５－トリフェニルテトラゾリウムクロリド（ＴＴＣ）で染色した（Ｊｏｓｈｉ，Ｃ．Ｎ．，Ｊａｉｎ，Ｓ．Ｋ．＆Ｍｕｒｔｈｙ，Ｐ．Ｓ．An optimized triphenyltetrazolim chloride method for identification of cerebral infarcts．Brain Res．１３，１１－１７，２００４）（非特許文献２５）。染色した脳切片をフラットベッドスキャナーでスキャンした。Ｌｉｎらの方法（Ｌｉｎ，Ｔ．Ｎ．，Ｈｅ，Ｙ．Ｙ．，Ｗｕ，Ｇ．，Ｋｈａｎ，Ｍ．＆Ｈｓｕ，Ｃ．Ｙ．Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerbral ischemia model in rats．Stroke ２４，１１７－１２１，１９９３）（非特許文献２６）に従って、ＩｍａｇｅＪ（ｖｅｒｓｉｏｎ １．４０，ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，ＵＳＡ）を用いて梗塞領域を測定および処理した。

【００８１】

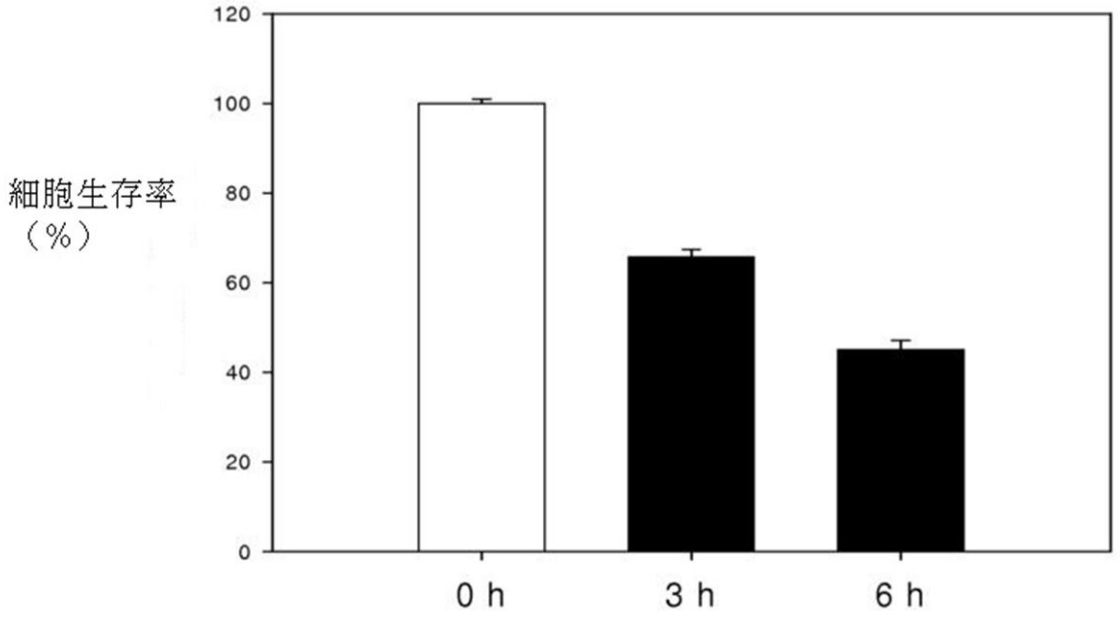
梗塞領域を測定した。脳卒中の誘導から３０分後にｍｉＲ－１９５を投与した場合、この処置は、梗塞体積を、３．３ナノモル／ｋｇの用量で４０％、および６．６ナノモル／ｋｇの用量で６０％減少させることができる（図８を参照）。脳卒中の誘導から２時間後にｍｉＲ－１９５を投与した場合、この処置は、それでも、梗塞体積を、３．３ナノモル／ｋｇの用量で４０％減少させることができる（図９）。

【００８２】

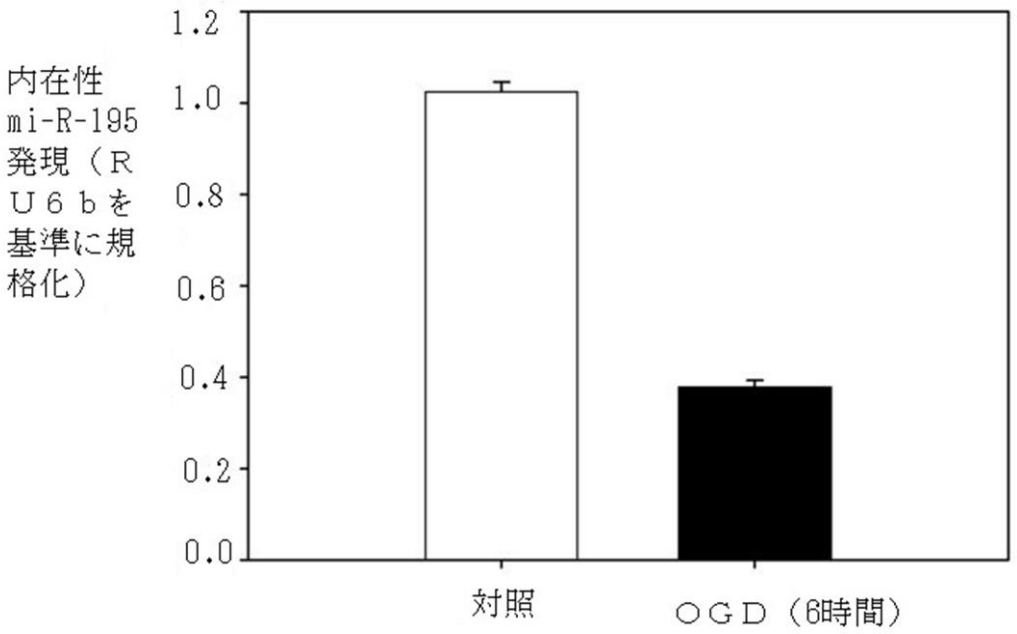
本発明のＬＮＡ修飾型マイクロＲＮＡ１９５が、上記のラットにおけるｉｎ ｖｉｖｏ神経保護アッセイに従って、脳卒中ラットの治療に用いられた。結果は、ＬＮＡ修飾型マイクロＲＮＡ１９５（ＬＮＡ１、ＬＮＡ２、ＬＮＡ３、ＬＮＡ４およびＬＮＡ５など）が、顕著な治療有効性を提供することを示す。図１０に示すとおり、スクランブルをかけたＬＮＡ－ＮＣ－ｍｉＲと比較して、ＬＮＡ１による平均治療効果は、梗塞体積を３０％減

少させるものであり、ＬＮＡ５にいたっては梗塞体積を５８％も減少させることができる。

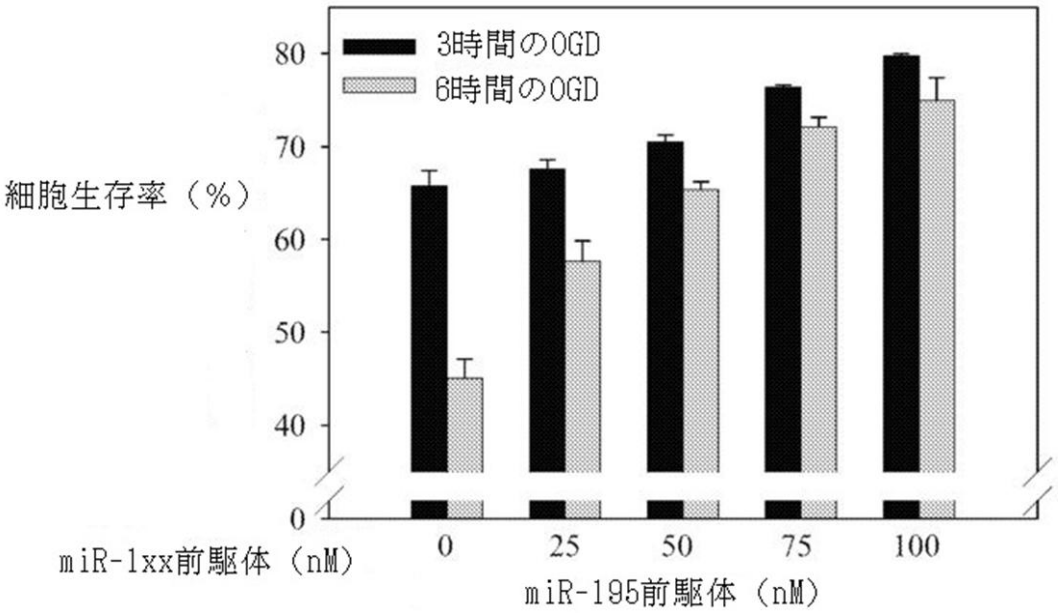
【図１Ａ】



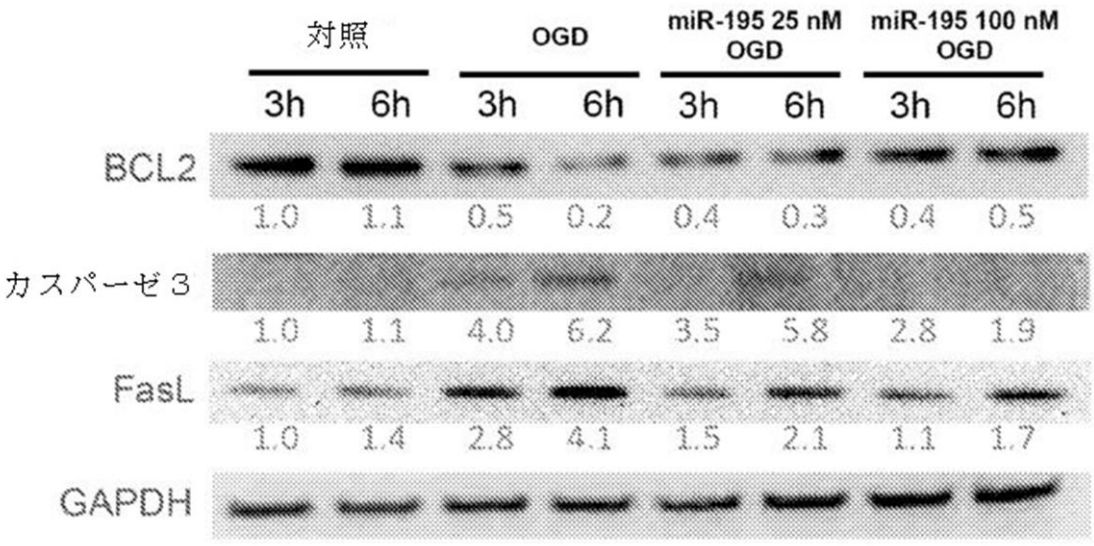
【図１Ｂ】


内在性
mi-R-195
発現（Ｒ
Ｕ６ｂを
基準に規
格化）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
対照
ＯＧＤ（6時間）

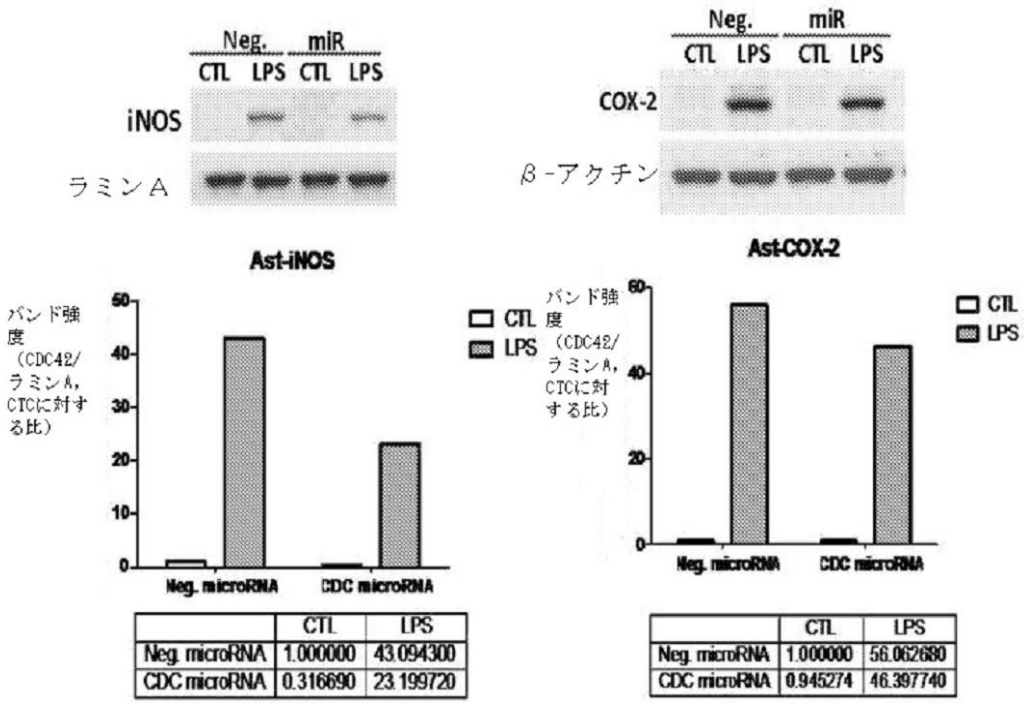
【図２】


3時間のOGD
6時間のOGD
細胞生存率（％）
80
70
60
50
40
0
miR-1xx前駆体（nM）
0
25
50
75
100
miR-195前駆体（nM）

【図３】



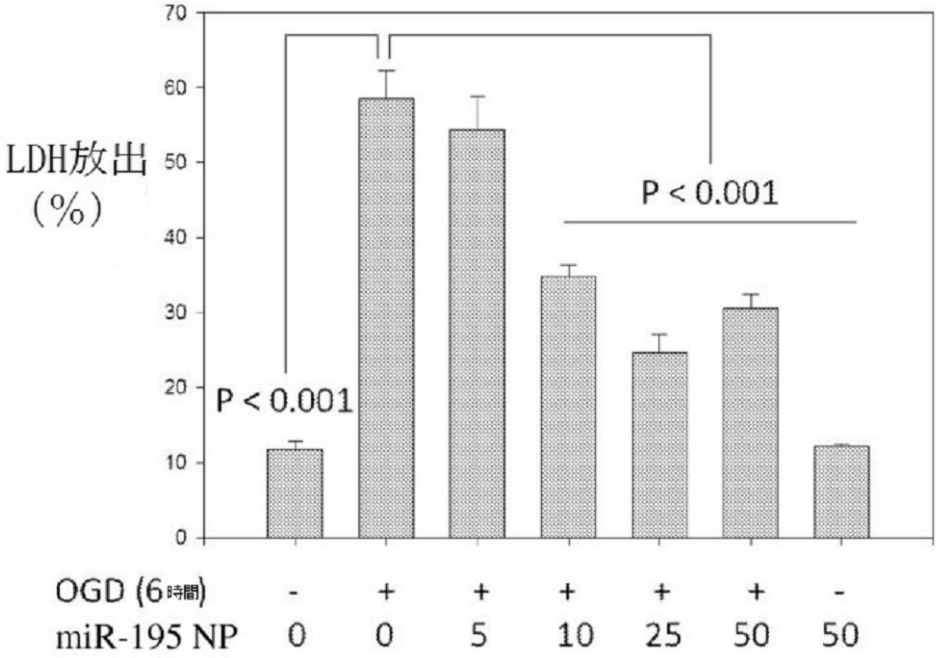
【図４】



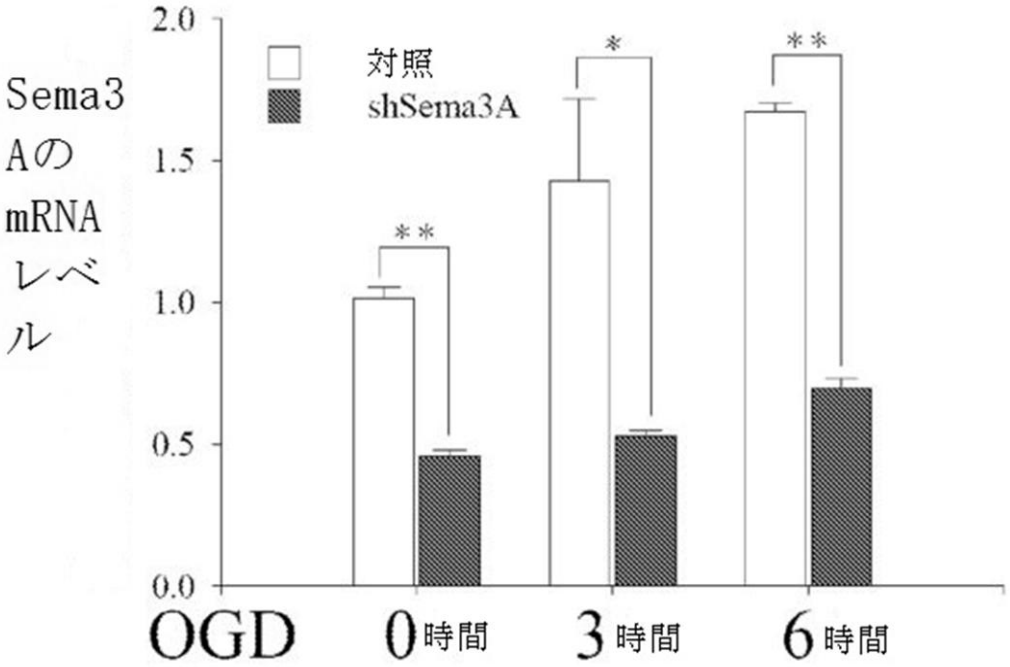
	CTL	LPS
Neg. microRNA	1.000000	43.094300
CDC microRNA	0.316690	23.199720

	CTL	LPS
Neg. microRNA	1.000000	56.062680
CDC microRNA	0.945274	46.397740

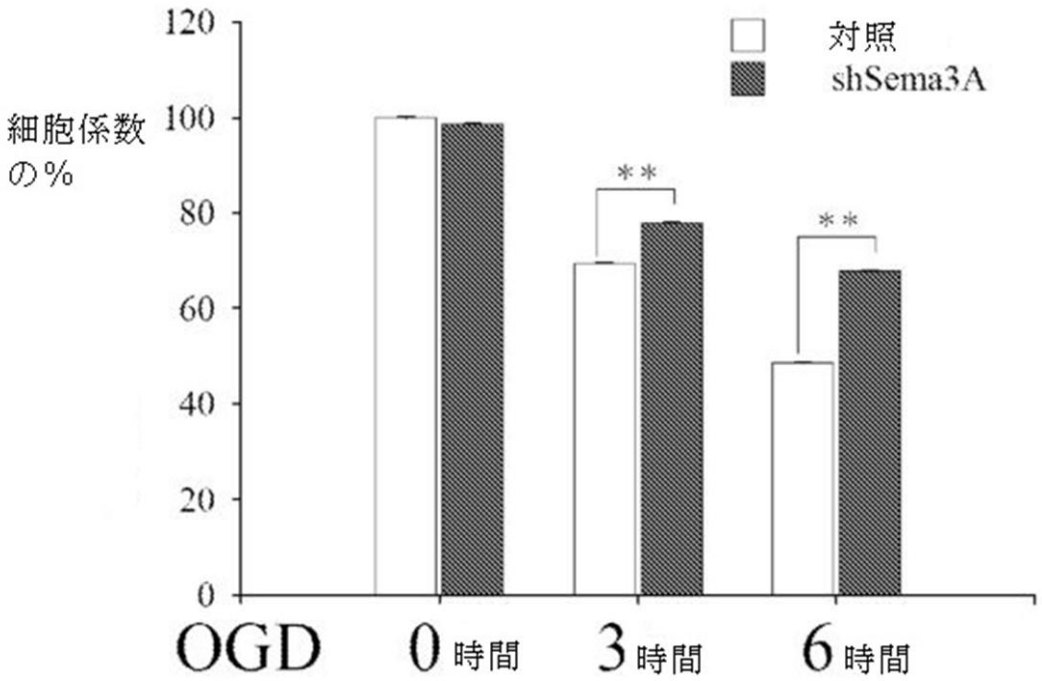
【図５】


LDH放出
（%）
70
60
50
40
30
20
10
0
P < 0.001
P < 0.001
OGD (6時間) - + + + + + -
miR-195 NP 0 0 5 10 25 50 50

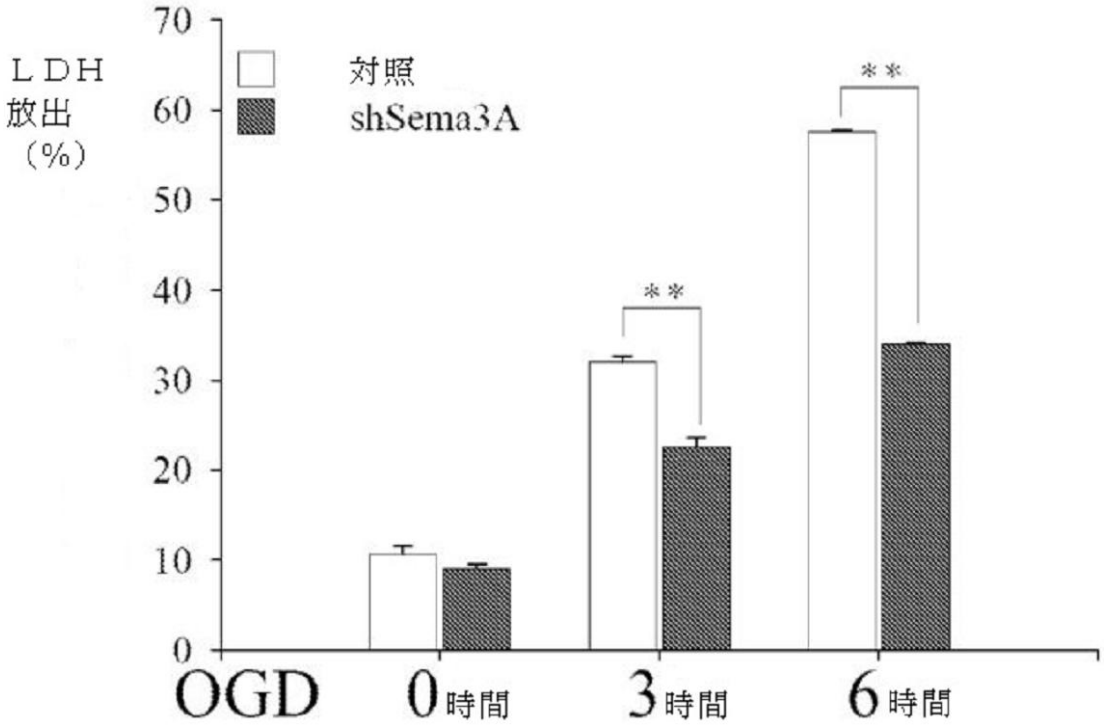
【図６Ａ】


Sema3
Aの
mRNA
レベ
ル
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
対照
shSema3A
＊＊
＊
＊＊
OGD
0時間
3時間
6時間

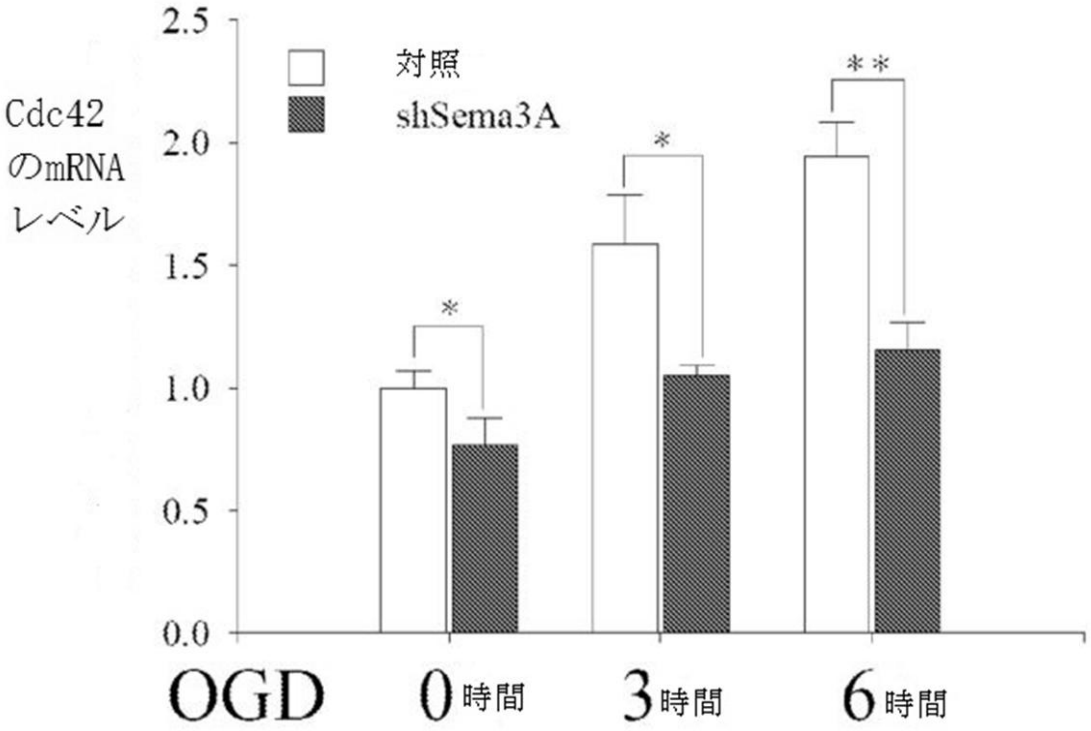
【図６Ｂ】


120
100
80
60
40
20
0
細胞係数
の％
対照
shSema3A
＊＊
＊＊
OGD
0時間
3時間
6時間

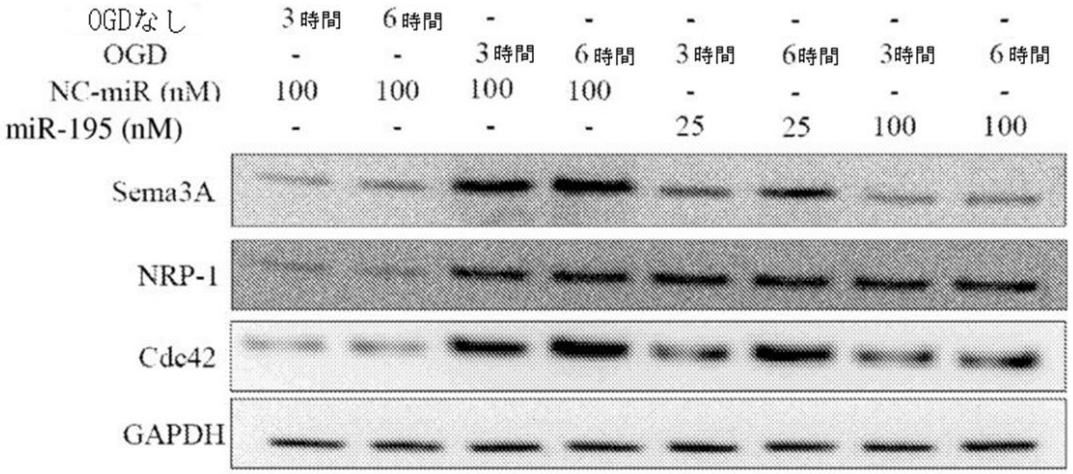
【図６Ｃ】


70
60
50
40
30
20
10
0
ＬＤＨ
放出
（％）
対照
shSema3A
＊＊
＊＊
OGD
0時間
3時間
6時間

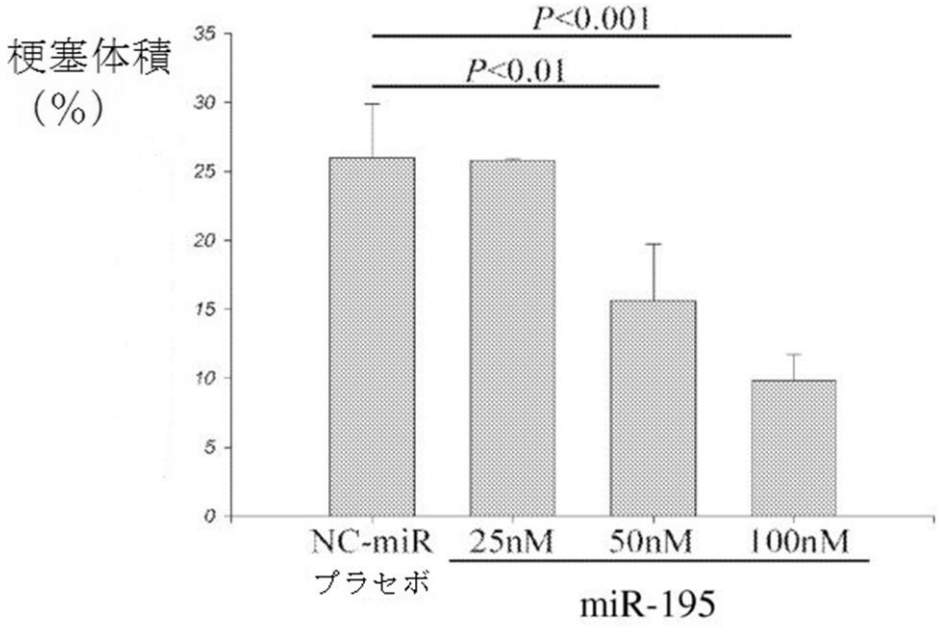
【図６Ｄ】


Cdc42
のmRNA
レベル
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
対照
shSema3A
＊
＊
＊＊
OGD
0時間
3時間
6時間

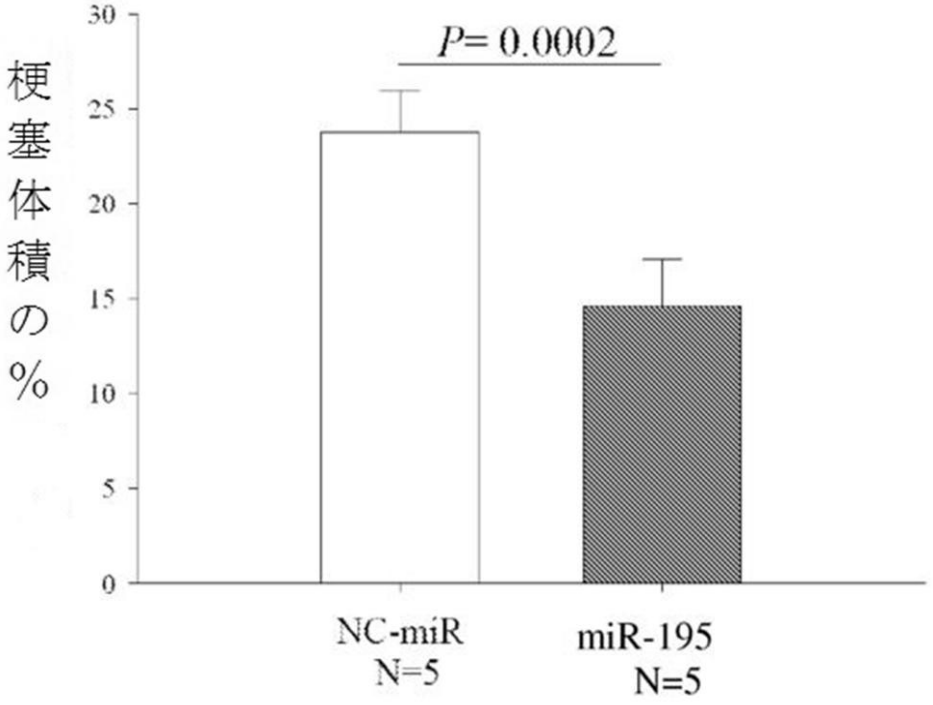
【図７】


OGDなし 3時間 6時間 - - - - - -
OGD - - 3時間 6時間 3時間 6時間 3時間 6時間
NC-miR (nM) 100 100 100 100 - - - -
miR-195 (nM) - - - - 25 25 100 100
Sema3A
NRP-1
Cdc42
GAPDH

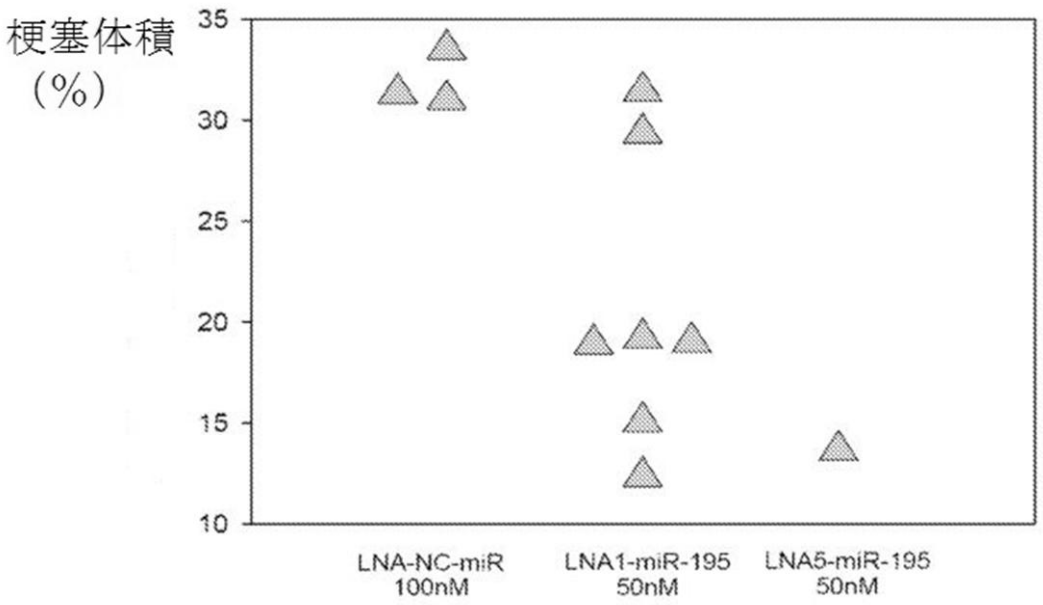
【図８】


梗塞体積
(%)
P<0.001
P<0.01
35
30
25
20
15
10
5
0
NC-miR
プラセボ
25nM
50nM
100nM
miR-195

【図９】


梗塞体積の%
P= 0.0002
30
25
20
15
10
5
0
NC-miR
N=5
miR-195
N=5

【図１０】



【配列表】
0005888572000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K	*9/127*	*(2006.01)*	A61K	9/127	
A61K	*9/14*	*(2006.01)*	A61K	9/14	
A61K	*9/51*	*(2006.01)*	A61K	9/51	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	105
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00	
A61P	*25/32*	*(2006.01)*	A61P	25/32	
A61P	*25/30*	*(2006.01)*	A61P	25/30	
A61P	*39/06*	*(2006.01)*	A61P	39/06	
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	9/10	
C12N	*15/113*	*(2010.01)*	C12N	15/00	ZNAG

(72)発明者　チェン，シンーユン
台湾　カオシウング，ウェイレン　ロード，ナンバー　150

審査官　▲高▼岡　裕美

(56)参考文献　国際公開第2009／120877（WO，A1）
欧州特許出願公開第02112235（EP，A1）
特表2012－523000（JP，A）

(58)調査した分野(Int.Cl.，DB名)
A61K　31／00－31／80
JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）
CAplus／REGISTRY／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS（STN）