

明 細 書

発明の名称：

脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法及び脳梗塞治療用医薬組成物 技術分野

[0001] 脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル及びその作製方法、前記動物モデルを用いる脳梗塞治療剤のスクリーニング方法、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療方法、及び穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 脳主幹動脈とは、脳に酸素や栄養を送っている複数の太い血管の総称であり、大脳に血液を送っている内頸動脈、中大脳動脈や前大脳動脈、及び小脳や脳幹に血液を送っている椎骨動脈や脳底動脈がこれに含まれる。脳主幹動脈を構成する中大脳動脈から分岐した細い動脈である穿通枝は、脳の深部にある大脳基底核、視床及び内包に酸素や栄養を送り届けている。大脳基底核及び視床は、神経細胞の細胞体が集まる灰白質であるが、内包は、神経細胞の細胞体に乏しく主に神経線維が集積し走行している白質である。大脳半球の表面は大脳皮質という層に覆われており、大脳皮質は大脳基底核及び視床と同様に神経細胞の細胞体が集まる灰白質である。

[0003] 脳梗塞とは脳の血管が詰まり、血液が運ばれなくなった部分の神経細胞死が起きた状態である。脳卒中治療ガイドラインでは、前兆症状の時点又は脳梗塞発作を起こしてから4、5時間以内であれば、脳へのダメージを最小限に抑えるための脳梗塞治療剤による処置を行うことが推奨されている。このように急性期の脳梗塞に対する治療方法は存在する一方で、亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する治療方法は存在していない。

[0004] げっ歯類脳梗塞モデルとして、ラットを開頭し、中大脳動脈の表面に、強い血管収縮作用のあるエンドセリンを投与することにより虚血を誘発するモデルが知られている（非特許文献1）。過去の多くの急性期脳梗塞治療剤の

研究においては、非特許文献1に記載のげっ歯類脳梗塞モデルをはじめとする複数のげっ歯類脳梗塞モデルが使用されてきた。これらのげっ歯類脳梗塞モデルでの有効性を基に急性期脳梗塞治療剤の臨床試験が実施されてきたが、臨床試験において治療剤としての有効性が証明されたものは殆どない（非特許文献2～3）。げっ歯類脳梗塞モデルを用いた非臨床試験における有効性と臨床試験における有効性との乖離の原因として、げっ歯類では脳血管及び脳構造における微小循環、及び大脳に占める白質の大きさ等がヒトと相違していることが挙げられる。そのため、国際脳卒中学会のガイドラインでは、脳梗塞治療剤の開発において、非臨床と臨床の間の結果の乖離を少なくする目的で、脳血管及び組織構造がよりヒトに近い霊長類での評価が推奨されている。

[0005] 非ヒト霊長類脳梗塞モデルとしては、ヒトでの血管閉塞の好発部位である中大脳動脈を人為的に閉塞するモデルであるmiddle cerebral artery occlusion (MCAO) モデルが一般的に使用されている。MCAOモデルは、大脳皮質、内包、及び大脳基底核に広範な障害を惹起することが知られており、それらはヒトの脳梗塞における障害部位と近似している（非特許文献4）。MCAOモデルは、ヒトの脳卒中神経学的重症度の評価スケールであるNational Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) を非ヒト霊長類モデルに適合させた改変評価スケールであるNon-Human Primate Stroke Scale (NHPSS) を用いた評価において、高プラトー (plateau high) に梗塞誘導後3～5日で到達し、低プラトー (plateau low) に梗塞誘導後28～30日で到達すると報告されている（非特許文献4）。上記結果は、非ヒト霊長類MCAOモデルは、徐々に自然回復するモデルであることを示しており、よって、本モデルは慢性期の脳梗塞の薬剤評価には適していないと考えられる。

[0006] エンドセリン等の血管障害誘導剤を用いて脳の内包領域に局限して血管障害を引き起こすことによる非ヒト霊長類の脳卒中モデルの作製方法が知られ

ている（特許文献1）。この脳卒中モデルにおいて、内包領域の血管障害に起因する障害が自然治癒力により時間経過とともに回復するため、多くの個体で歩行や前後肢の動きなどの障害が損傷後2週間程度で損傷前と同程度にまで回復したことが示されている（特許文献1）。また、特許文献1では、当該脳卒中モデルについてNHPS等の運動機能障害スコアリングは行われていないが、その実施例は、当該脳卒中モデルにおいて重症度の高い運動機能障害が長期に維持されないことを示している。

[0007] 非ヒト霊長類を用いた白質梗塞モデルの作製を目的として、光感受性色素ローズベンガル及び緑色光照射を用いて脳の内包後脚に血栓を生じさせる方法が報告されている（非特許文献5）。この脳梗塞モデルにおいては、手の運動神経を完全に障害させると持続的な手の運動障害と歩行障害をもたらすことができることが示されているものの、障害部位が内包後脚のターゲット部位からわずかに逸脱すると持続的な運動障害を誘導することができないことも報告されている（非特許文献5）。このことは、当該モデルの作製方法は血栓を生じさせる部位の制御が難しく、再現性高く持続的な運動障害を誘導することが困難であることを示している。

[0008] これまでに、再現性高く作製可能な、重症度の高い運動機能障害が長期に維持される脳梗塞モデル、及び当該モデルを用いた脳梗塞発症の72時間後以降の亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤の有効性評価に関する報告はなされていない。また、穿通枝に支配される大脳基底核や視床に血管障害誘導剤を投与し、穿通枝に支配される領域特異的に障害を誘導する脳梗塞モデルの報告もなされていない。

[0009] 亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療分野において、神経再生を可能にする薬剤は長年望まれてきた。これまでに、細胞移植や内在性幹細胞の賦活化による神経再生アプローチが追求されてきたが、臨床試験で成功した例は無い。それらの2種類の神経再生アプローチとは一線を画するアプローチとして、*in vivo*ダイレクトリプログラミング（Direct reprogramming; DR）を利用した方法がある。DRとは、iPS細胞等の

多能性幹細胞を介さずに体細胞から目的とする細胞に分化誘導させることを意味する。

[0010] 脳内でアストロサイトを神経細胞に変換することができるDRを達成する因子の1つとして、転写因子のNeuroD1が知られている。マウスにおいて、脳内のアストロサイトにおいてNeuroD1を強制発現させることにより、アストロサイトから神経細胞へのDRが生じたことが報告された（特許文献2、非特許文献6）。また、マウスにおいて、NeuroD1がミクログリアを神経細胞に変換させること、神経幹細胞や神経前駆細胞を神経細胞へと成熟させることも報告されている（非特許文献7～9）。

[0011] げっ歯類大脳皮質梗塞モデルにおいて、脳損傷の7～9日後の亜急性期に脳内のアストロサイトにNeuroD1を強制発現させ、DRにより神経細胞を補充することによって、エサ取り行動等の細かい運動技能（fine motor skills）の障害が回復すること、並びに、一過性の中大脳動脈閉塞モデルマウスにおいて、脳損傷の1週間後にNeuroD1を強制発現させたところ、ミクログリア／マクロファージが神経細胞に変換されたこと及び細かい運動技能の障害が回復したことが報告されている（非特許文献10～13）。さらに、霊長類の大脳皮質においても、脳損傷の10～30日後にNeuroD1を強制発現させたところ、アストロサイトがDRにより神経細胞に変換されたことが報告されている（非特許文献14）。このように、NeuroD1による神経変換の事例は複数報告されているものの、NeuroD1による機能回復の報告事例としては、げっ歯類の脳梗塞モデルにおいて、急性期～亜急性期にNeuroD1を発現させたことにより細かい運動技能が回復したことのみに留まっており、（1）NeuroD1による歩行や前後肢の動き等の総合的運動技能（gross motor skills）の回復の事例、（2）NeuroD1を慢性期に投与した場合の機能回復の事例、及び（3）NeuroD1による非ヒト霊長類での機能回復の事例は報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：特開2015-231338号公報

特許文献2：国際公開WO2014/015261

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Sharkey J et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., vol. 13, pp. 865-871, 1993

非特許文献2：Clark WM et al., Neurology, vol. 57, pp. 1595-1602, 2001

非特許文献3：Diener HC et al., Stroke, vol. 31, pp. 2543-2551, 2000

非特許文献4：Ramirez-Garcia G. et al., Neurosci., vol. 397, pp. 41-55, 2019

非特許文献5：Hyung-Sun K. et al., Exp. Neurobiol., vol. 30, pp. 356-364, 2021

非特許文献6：Guo Z et al., Cell Stem Cell, vol. 14, pp. 188-202, 2014

非特許文献7：Taito M et al., Neuron, vol. 101, pp. 472-485, 2019

非特許文献8：Kevin R et al., Brain, vol. 138, pp. 440-455, 2015

非特許文献9：Zhengliang G et al., Nat. Neurosci., Vol. 12, pp. 1090-1092, 2009

非特許文献10：Chen YC et al., Mol. Ther., vol. 28, pp. 217-234, 2020

非特許文献11：Livingston J et al., bioRxiv, 2020, doi:https://doi.org/10.1101/2020.02.02.929091

非特許文献12: Jiang MQ et al., Front. Aging Neurosci., vol. 13, 612856, 2021

非特許文献13: Irie T et al., bioRxiv, 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.26.461831>

非特許文献14: Ge LJ et al. Front. Cell Dev. Biol., vol. 5, 590008, 2020

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 本発明の一つの課題は、脳梗塞治療剤、特に、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療剤のスクリーニング又は評価に使用可能な脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル、及び該動物モデルの作製方法を提供することである。本発明の別の課題は、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療剤又は治療方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0015] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、大脳基底核障害及び視床障害に加えて内包障害を誘導することができること、得られる大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する非ヒト霊長類が脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルになり得ること、その脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルとして特に有用であることを見出した（実施例1）。また、当該非ヒト霊長類動物モデルを用いて、NeuroD1が、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療剤として有効であることを見出した（実施例2～実施例5、実施例11及び実施例12）。本発明はこのような知見を基にして完成されたものである。
- [0016] 即ち、本発明は以下の態様を提供する。

[0017] [1] 非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法。

[2] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される1又は2以上の神経核にエンドセリンを投与する、上記[1]に記載の方法。

[3] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも3つの神経核にエンドセリンを投与する、上記[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも4つの神経核にエンドセリンを投与する、上記[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の5つ全ての神経核にエンドセリンを投与する、上記[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 脳梗塞が亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、上記[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 脳梗塞が穿通枝梗塞である、上記[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 脳梗塞が穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、上記[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[10] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記[8]又は[9]に記載の方法。

[11] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記[8]又は[9]に記載の方法。

[12] 前記神経核を標的とするように投与部位を定め、当該投与部位にエ

ンドセリンを投与することを含む、上記〔2〕～〔11〕のいずれかに記載の方法。

〔13〕非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（a）脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも4つの神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（b）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

〔14〕非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

（a）脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の5つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

（b）当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

〔15〕前記投与部位が少なくとも3か所である、〔13〕又は〔14〕に記載の方法。

〔16〕非ヒト霊長類がカニクイザルである、上記〔1〕～〔15〕のいずれかに記載の方法。

〔17〕投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも $10\mu\text{g}$ 、好ましくは少なくとも $20\mu\text{g}$ である、上記〔1〕～〔16〕に記載の方法。

〔18〕エンドセリンがエンドセリン-1である、上記〔1〕～〔17〕のいずれかに記載の方法。

〔19〕上記〔1〕～〔18〕のいずれかに記載の方法で作製された、脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル。

〔20〕亜急性期～慢性期の脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法で

あって、カニクイザルにエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含み、エンドセリンの投与部位が下記を含む方法：

ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、(ii) B : 4 ~ 6 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、及び (iii) B : 8 ~ 12 mm、L : 4 ~ 13 mm、D : 12 ~ 20 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[21] エンドセリンの投与部位が下記 (1) ~ (3) のいずれか1つを含む、上記 [20] に記載の方法：

(1) ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、(ii) B : 4 ~ 6 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、(iii) B : 8 ~ 10 mm、L : 4 ~ 6 mm、D : 12 ~ 14 mm、及び (iv) B : 8 ~ 10 mm、L : 11 ~ 13 mm、D : 14 ~ 16 mm にそれぞれ位置する投与部位、

(2) ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、(ii) B : 4 ~ 6 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、及び (iii) B : 8 ~ 10 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm にそれぞれ位置する投与部位、及び

(3) ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、(ii) B : 4 ~ 6 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm、及び (iii) B : 10 ~ 12 mm、L : 7 ~ 9 mm、D : 18 ~ 20 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[22] エンドセリンの投与部位が下記 (1) ~ (3) のいずれか1つを含む、上記 [20] 又は [21] に記載の方法：

(1) ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(iii) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び (iv) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位、

(2) ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、及び (iii) B : 9 mm、L : 8 mm、D : 19 mm にそれぞれ位置する投与部位、及び

(3) ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、及び (iii) B : 11 mm、L : 8 mm、D : 19 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[23] エンドセリンの投与部位が下記の投与部位を含む、上記 [20] ~ [22] のいずれかに記載の方法：

ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(iii) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び (iv) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[24] エンドセリンの投与部位が下記の投与部位である、上記 [20] ~ [23] のいずれかに記載の方法：

ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(iii) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び (iv) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[25] 脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、上記 [20] ~ [24] のいずれかに記載の方法。

[26] 脳梗塞が穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、上記 [20] ~ [25] に記載の方法。

[27] 投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも $10\mu\text{g}$ 、好ましくは少なくとも $20\mu\text{g}$ である、上記 [20] ~ [26] に記載の方法。

[28] エンドセリンがエンドセリン-1 である、上記 [20] ~ [27] のいずれかに記載の方法。

[29] 上記 [20] ~ [28] のいずれかに記載の方法で作製された、亜

急性期～慢性期の脳梗塞カニクイザルモデル。

〔30〕上記〔19〕又は〔29〕に記載の非ヒト霊長類動物モデルに、被験物質を投与する工程、及び該非ヒト霊長類動物モデルにおける脳梗塞に対する該被験物質の効果を判定する工程を含む、脳梗塞治療剤のスクリーニング方法。

〔31〕NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物。

〔32〕NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物。

〔33〕穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記〔31〕又は〔32〕に記載の医薬組成物。

〔34〕穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔31〕～〔33〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔35〕亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔31〕に記載の医薬組成物。

〔36〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔31〕～〔35〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔37〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列に対して70%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記〔31〕～〔36〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔38〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔31〕

～ [37] のいずれかに記載の医薬組成物。

[39] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドがNeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、上記[31]～[38]のいずれかに記載の医薬組成物。

[40] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含む、上記[39]に記載の医薬組成物。

[41] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' UTR及び／又は3' UTRを含む、上記[39]又は[40]に記載の医薬組成物。

[42] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号11又は13の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、上記[39]～[41]のいずれかに記載の医薬組成物。

[43] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、上記[39]～[42]のいずれかに記載の医薬組成物。

[44] ポリA配列の長さが50～200ヌクレオチドである、上記[43]に記載の医薬組成物。

[45] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' キャップ構造を有する、上記[39]～[44]のいずれかに記載の医薬組成物。

[46] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むmRNAである、上記[39]～[45]のいずれかに記載の医薬組成物。

[47] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、上記[46]に記載の医薬組成物。

[48] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記[47]に記載の医薬組成物。

[49] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システ

ム（DDS）中に内封されている、上記〔39〕～〔48〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔50〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記〔39〕～〔49〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔51〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドがDNAである、上記〔31〕～〔38〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔52〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、上記〔31〕～〔38〕及び〔51〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔53〕発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターのいずれかである、上記〔52〕に記載の医薬組成物。

〔54〕発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記〔53〕に記載の医薬組成物。

〔55〕上記〔31〕～〔54〕のいずれかに記載の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療方法。

〔56〕上記〔31〕～〔54〕のいずれかに記載の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療方法。

〔57〕穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記〔55〕又は〔56〕に記載の方法。

〔58〕穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔55〕～〔57〕のいずれかに記載の方法。

〔５９〕亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔５５〕に記載の方法。

〔６０〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔５５〕～〔５９〕のいずれかに記載の方法。

〔６１〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記〔５５〕～〔６０〕のいずれかに記載の方法。

〔６２〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔５５〕～〔６１〕のいずれかに記載の方法。

〔６３〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、上記〔５５〕～〔６２〕のいずれかに記載の方法。

〔６４〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含む、上記〔６３〕に記載の方法。

〔６５〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、５′UTR及び／又は３′UTRを含む、上記〔６３〕又は〔６４〕に記載の方法。

〔６６〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、上記〔６３〕～〔６５〕のいずれかに記載の方法。

〔６７〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、上記〔６３〕～〔６６〕のいずれかに記載の方法。

〔６８〕ポリA配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、上記〔６７〕に記載の方法。

[69] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' キャップ構造を有する、上記[63]～[68]のいずれかに記載の方法。

[70] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むmRNAである、上記[63]～[69]のいずれかに記載の方法。

[71] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、上記[70]に記載の方法。

[72] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記[71]に記載の方法。

[73] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム(DDS)中に内封されている、上記[63]～[72]のいずれかに記載の方法。

[74] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記[63]～[73]のいずれかに記載の方法。

[75] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドがDNAである、上記[55]～[62]のいずれかに記載の方法。

[76] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを対象に投与する工程を含む、上記[55]～[62]及び[75]のいずれかに記載の方法。

[77] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、上記[76]に記載の方法。

[78] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記[77]に記載の方法。

[79] 穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療に使用するための、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポ

リヌクレオチド。

〔８０〕穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療に使用するための、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔８１〕穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、〔７９〕又は〔８０〕に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

〔８２〕穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔７９〕～〔８１〕のいずれかに記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

〔８３〕亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔７９〕に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。

〔８４〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号８に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔７９〕～〔８３〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔８５〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列に対して７０％以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記〔７９〕～〔８４〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔８６〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号７又は１０に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔７９〕～〔８５〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔８７〕前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、上記〔７９〕～〔８６〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔８８〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号１１又は１３の４４位～１１１４位又は４４位～１１２０位の、NeuroD1タ

ンパク質をコードする塩基配列を含む、上記〔８７〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔８９〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' UTR及び／又は3' UTRを含む、上記〔８７〕又は〔８８〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９０〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号１１又は１３の１位～１２３１位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、上記〔８７〕～〔８９〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９１〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、上記〔８７〕～〔９０〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９２〕ポリA配列の長さが５０～２００ヌクレオチドである、上記〔９１〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９３〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' キャップ構造を有する、上記〔８７〕～〔９２〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９４〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むポリヌクレオチドである、上記〔８７〕～〔９３〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９５〕修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、上記〔９４〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９６〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記〔９５〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔９７〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム（DDS）中に内封されている、上記〔８７〕～〔９６〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔 9 8 〕 N e u r o D 1 タンパク質をコードする m R N A が脂質ナノ粒子中に封入されている、上記〔 8 7 〕～〔 9 7 〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔 9 9 〕 前記ポリヌクレオチドが D N A である、上記〔 7 9 〕～〔 8 6 〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔 1 0 0 〕 前記ポリヌクレオチドが、N e u r o D 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、上記〔 7 9 〕～〔 8 6 〕及び〔 9 9 〕のいずれかに記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔 1 0 1 〕 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、上記〔 1 0 0 〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔 1 0 2 〕 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記〔 1 0 1 〕に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

〔 1 0 3 〕 穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、N e u r o D 1 タンパク質又は N e u r o D 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

〔 1 0 4 〕 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、N e u r o D 1 タンパク質又は N e u r o D 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

〔 1 0 5 〕 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、上記〔 1 0 3 〕又は〔 1 0 4 〕のいずれかに記載の使用。

〔 1 0 6 〕 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔 1 0 3 〕～〔 1 0 5 〕のいずれかに記載の使用。

〔 1 0 7 〕 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記〔 1 0 3 〕に記載の使用。

〔 1 0 8 〕 N e u r o D 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む

ポリヌクレオチドである、上記〔103〕～〔107〕のいずれかに記載の使用。

〔109〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列に対して70%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、上記〔103〕～〔108〕のいずれかに記載の使用。

〔110〕NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、上記〔103〕～〔109〕のいずれかに記載の使用。

〔111〕前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、上記〔103〕～〔110〕のいずれかに記載の使用。

〔112〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含む、上記〔111〕に記載の使用。

〔113〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5'UTR及び／又は3'UTRを含む、上記〔111〕又は〔112〕に記載の使用。

〔114〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号11又は13の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、上記〔111〕～〔113〕のいずれかに記載の使用。

〔115〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、上記〔111〕～〔114〕のいずれかに記載の使用。

〔116〕ポリA配列の長さが50～200ヌクレオチドである、上記〔115〕に記載の使用。

〔117〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5'キャップ構造を有する、上記〔111〕～〔116〕のいずれかに記載の使用。

〔118〕NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むmRNAである、上記〔111〕～〔117〕のいずれかに記載

の使用。

[119] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、上記[118]に記載の使用。

[120] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、上記[119]に記載の使用。

[121] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム(DDS)中に内封されている、上記[111]～[120]のいずれかに記載の使用。

[122] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、上記[111]～[121]のいずれかに記載の使用。

[123] 前記ポリヌクレオチドがDNAである、上記[103]～[110]のいずれかに記載の使用。

[124] 前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、上記[103]～[110]及び[123]のいずれかに記載の使用。

[125] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、上記[124]に記載の使用。

[126] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、上記[125]に記載の使用。

[127] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として8, 8'-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピペリジン-4-イル]アザンジイル}ジ(オクタン酸)ジ(ヘプタデカン-9-イル)又はその塩を含む、上記[50]に記載の医薬組成物。

[128] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として7, 7'-[({ [1-(N, N-ジメチルグリシル)ピペリジン-4-イル]オキシ}カルボニル)

アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2-ノニルウンデシル) 又はその塩を含む、上記 [50] に記載の医薬組成物。

[129] 脂質ナノ粒子がさらにDSPC、コレステロール及びDMG-PEG2000を含む、上記 [127] 又は [128] に記載の医薬組成物。

[130] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として8, 8' - { [1 - (2-ヒドロキシエチル) ピペリジン-4-イル] アザンジイル} ジ (オクタン酸) ジ (ヘプタデカン-9-イル) 又はその塩を含む、上記 [74] に記載の方法。

[131] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として7, 7' - [({ [1 - (N, N-ジメチルグリシル) ピペリジン-4-イル] オキシ} カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2-ノニルウンデシル) 又はその塩を含む、上記 [74] に記載の方法。

[132] 脂質ナノ粒子がさらにDSPC、コレステロール及びDMG-PEG2000を含む、上記 [130] 又は [131] に記載の方法。

[133] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として8, 8' - { [1 - (2-ヒドロキシエチル) ピペリジン-4-イル] アザンジイル} ジ (オクタン酸) ジ (ヘプタデカン-9-イル) 又はその塩を含む、上記 [98] に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[134] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として7, 7' - [({ [1 - (N, N-ジメチルグリシル) ピペリジン-4-イル] オキシ} カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2-ノニルウンデシル) 又はその塩を含む、上記 [98] に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[135] 脂質ナノ粒子がさらにDSPC、コレステロール及びDMG-PEG2000を含む、上記 [133] 又は [134] に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[136] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として8, 8' - { [1 - (2-ヒドロキシエチル) ピペリジン-4-イル] アザンジイル} ジ (オクタン酸) ジ (ヘプタデカン-9-イル) 又はその塩を含む、上記 [122] に記載

の使用。

[137] 脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として7, 7' - [({ [1 - (N, N-ジメチルグリシル) ピペリジン-4-イル] オキシ} カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2-ノニルウンデシル) 又はその塩を含む、上記[122]に記載の使用。

[138] 脂質ナノ粒子がさらにDSPC、コレステロール及びDMG-PEG2000を含む、上記[136]又は[137]に記載の使用。

[0018] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2022-106308号、2022-211994、及び2023-041345号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルを作製することができる。この脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルとして特に有用である。また、本発明では、穿通枝梗塞若しくは穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療に特に有用な治療剤、治療用医薬組成物、又は治療方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1 (A～C) は、実施例1の検討実験5でエンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の脳の冠状断面のTTC染色の結果を示す写真である。Aは尾状核、被殻及び淡蒼球、Bは被殻、淡蒼球及び内包、Cは視床外側腹側核及び視床後腹側核、並びに内包における障害巣を示している。円形枠は障害巣を示す。

[図2]図2 (A～C) は、実施例1の検討実験6でエンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の脳の冠状断面のTTT染色の結果を示す写真である。Aは尾状核、被殻及び内包、Bは内包及び視床外側腹側核、Cは視床外側腹側核及び視床後腹側核における障害巣を示している。円形枠は障害巣を示す。

。

[図3]図3は、実施例1の検討実験6でエンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の経時的なmRS評価結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はmRSの値（最大値6）を示す。

[図4]図4は、実施例1の検討実験6でエンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の経時的なNHPSの運動系スコアリングの評価結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はNHPS（運動系スコア）の値（最大値32）を示す。

[図5]図5は、実施例5のAAV-NeuroD1群（AAV-NeuroD1）及びコントロール群（AAV-Control）のエンドセリン-1処置後の運動機能障害の経時的变化をmRSで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はmRSの値（最大値6）を示す。白丸、黒丸はそれぞれ、AAV-NeuroD1群、コントロール群の各評価時点におけるmRSの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（SEM）を示す。エンドセリン-1注入後21日目にAAVベクターを投与した。

[図6]図6は、実施例5のAAV-NeuroD1群（AAV-NeuroD1）及びコントロール群（AAV-Control）のエンドセリン-1処置後の運動機能障害の経時的变化をNHPSの運動系スコアリングで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はNHPS（運動系スコア）の値（最大値32）を示す。白丸、黒丸はそれぞれAAV-NeuroD1群、コントロール群の各評価時点におけるNHPS（運動系スコア）の平均値を示す。エラーバーは標準誤差（SEM）を示す。エンドセリン-1注入後21日目にAAVベクターを投与した。

[図7]図7は、実施例5のAAV-NeuroD1群（AAV-NeuroD1）及びコントロール群（AAV-Control）の体重の推移を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸は体重を示す。白丸、黒丸はそれぞれAAV-NeuroD1群、コントロール群の各評価時点における体重の平均値を示す。エラーバーは標準誤差（SEM）を示す。

[図8]図8は、実施例5のAAV-NeuroD1群（AAV-NeuroD1）及びコントロール群（AAV-Control）の摂餌行動の推移を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の週数を、縦軸は摂餌スコアを示す。白丸、黒丸はそれぞれAAV-NeuroD1群、コントロール群の各評価時点における摂餌スコアの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（SEM）を示す。

[図9A]図9は、実施例6で得られた、エンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の経日的な脳の画像を示す。図9Aは実施例6（a）の水平断T2強調画像を示す。図9A中の（a）～（e）は、それぞれエンドセリン-1注入後1日目、7日目、21日目、41日目、69日目の結果を示す。Lは左脳、Rは右脳を表す。エンドセリン-1は左脳に注入した。図中の（i i i）及び（i v）は、実施例2に記載のエンドセリン-1注入部位（i i i）及び（i v）を示す。

[図9B]図9は、実施例6で得られた、エンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の経日的な脳の画像を示す。図9Bは実施例6（a）の水平断フレーア画像を示す。図9B中の（a）～（e）は、それぞれエンドセリン-1注入後1日目、7日目、21日目、41日目、69日目の結果を示す。Lは左脳、Rは右脳を表す。エンドセリン-1は左脳に注入した。図中の（i i i）及び（i v）は、実施例2に記載のエンドセリン-1注入部位（i i i）及び（i v）を示す。

[図9C]図9は、実施例6で得られた、エンドセリン-1処置されたカニクイザル個体の経日的な脳の画像を示す。図9Cは実施例6（b）の水平断灌流画像を示す。図9C中の（a）～（e）は、それぞれエンドセリン-1注入後1日目、7日目、21日目、41日目、69日目の結果を示す。Lは左脳、Rは右脳を表す。エンドセリン-1は左脳に注入した。図中の（i i i）及び（i v）は、実施例2に記載のエンドセリン-1注入部位（i i i）及び（i v）を示す。

[図9D]図9は、実施例6で得られた、エンドセリン-1処置されたカニクイ

ザル個体の経日的な脳の画像を示す。図9Dは実施例6(c)の冠状断DTIを示す。図9D中の(a)～(e)は、それぞれエンドセリン-1注入後1日目、7日目、21日目、41日目、69日目の結果を示す。Lは左脳、Rは右脳を表す。エンドセリン-1は左脳に注入した。

[図10]図10は、実施例12(a)のNeuroD1 mRNA-LNP群(ND1 mRNA)及びコントロール群(Control mRNA)のエンドセリン-1処置後の運動機能障害の経日的変化をmRSで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はmRSの値(最大値6)を示す。白丸は、NeuroD1 mRNA-LNP群の各評価時点におけるmRSの平均値を示す。なお、エンドセリン-1注入後28日目以降は2週間毎にmRSを評価したが、56日目の結果は57、58又は59日目にそれぞれの個体を評価した結果の平均値を示す。エラーバーは標準誤差(SEM)を示す。黒丸はコントロール群1個体の各評価時点におけるmRSを示す。なお、56日目の結果は、58日目に評価した結果を示す。エンドセリン-1注入後21日目にmRNA-LNPを投与した。

[図11]図11は、実施例12(b)のDTIによる解析の結果を示す。A及びBは、mRNA-LNPで処置したカニクイザル個体の脳のDTI画像をもとにテンソル解析を行い取得した拡散テンソルトラクトグラフィ(Diffusion Tensor Tractography; DTT)を示す。図中のRは右脳(非障害側。mRNA-LNP投与無し)、Lは左脳(障害側。mRNA-LNP投与有り)を示す。画像中に、計測したFA値を描出した。Aは、コントロール群(Control mRNA)のエンドセリン-1注入後114日目の結果を示し、BはNeuroD1 mRNA-LNP群(ND1 mRNA)のエンドセリン-1注入後114～115日目にFA値の解析を行った3個体中の代表的な結果を示す。CはDTIによるFA値の定量結果を示す。Cのグラフの縦軸は障害側のFA値を非障害側のFA値で除した値(相対値)を示す。白丸は、NeuroD1 mRNA-LNP群の相対値の個々値を示し、バーでそれらの平均値を示す。エラーバ

ーは標準誤差（S E M）を示す。黒丸はコントロール群 1 個体の相対値を示す。

[図12]図 1 2 は、実施例 1 2 （c）の側脳室の容積の解析結果を示す。A 及び B は、m R N A - L N P で処置したカニクイザル個体の脳の T 2 強調画像を示す。図中の R は右脳（非障害側。m R N A - L N P 投与無し）、L は左脳（障害側。m R N A - L N P 投与有り）を示す。A は、コントロール群（C o n t r o l m R N A）のエンドセリン-1 注入後 1 1 4 日目の結果を示し、B は N e u r o D 1 m R N A - L N P 群（N D 1 m R N A）のエンドセリン-1 注入後 1 1 4 ~ 1 1 5 日目に解析を行った 3 個体中の代表的な結果を示す。C は側脳室の容積の定量結果を示す。C のグラフの縦軸は障害側の側脳室の容積を非障害側の側脳室の容積で除した値（相対値）を示す。白丸は、N e u r o D 1 m R N A - L N P 群の相対値の個々値を示し、バーでそれらの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（S E M）を示す。黒丸はコントロール群 1 個体の相対値を示す。

[図13]図 1 3 は実施例 1 2 （d）のドパミントランスポーターの発現解析の結果を示す。A 及び B は、m R N A - L N P で処置したカニクイザル個体の脳の冠状断切片のドパミントランスポーターの免疫染色の結果を示す写真である。図中の R は右脳（非障害側。m R N A - L N P 投与無し）、L は左脳（障害側。m R N A - L N P 投与有り）を示す。矢印は線条体を示す。A は、コントロール群（C o n t r o l m R N A）のエンドセリン-1 処置（脳虚血誘導）後 1 1 8 日目の結果を示し、B は N e u r o D 1 m R N A - L N P 群（N D 1 m R N A）のエンドセリン-1 注入後 1 1 9 ~ 1 2 2 日目にドパミントランスポーターの免疫染色を行った 3 個体中の代表的な結果を示す。C はドパミントランスポーターの発現強度を解析した結果を示す。C のグラフの縦軸は障害側の蛍光染色強度を非障害側の蛍光染色強度で除した値（相対値）を示す。白丸は、N e u r o D 1 m R N A - L N P 群の相対値の個々値を示し、バーでそれらの平均値を示す。エラーバーは標準誤差（S E M）を示す。黒丸はコントロール群 1 個体の相対値を示す。

[図14]図14は実施例14のNeuroD1 mRNA-LNP (ND1-2-L7) 群 (ND1 mRNA) 及びコントロール群 (Control mRNA) のエンドセリン-1処置後の運動機能障害の経日的変化をmRSで評価した結果を示す。横軸はエンドセリン-1注入後の日数を、縦軸はmRSの値 (最大値6) を示す。白丸は、NeuroD1 mRNA-LNP 群の各評価時点におけるmRSの平均値を示す。なお、エンドセリン-1注入後28日目以降は2週間毎にmRSを評価した。黒丸はコントロール群の各評価時点におけるmRSの平均値を示す。なお、70日目の結果は、69又は70日目に評価した結果の平均値を示す。エンドセリン-1注入後21日目にmRNA-LNPを投与した。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0022] 1. 非ヒト霊長類動物モデルの作製

本発明は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法 (以下、「本発明の動物モデル作製方法」とも称する) を提供する。

[0023] a) 非ヒト霊長類

本明細書において、「非ヒト霊長類」とは、ヒトを除く任意の霊長類 (霊長目) の動物を指す。本発明において用いる非ヒト霊長類 (サル) は、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害をはじめとする脳機能障害に関して、modified Rankin Scale (mRS、後述の表1参照) や Non-Human Primate Stroke Scale (NHPSS (Ben Ret al., J. Neurol. Res., vol. 25 (1), pp. 68-78, 2003)、後述の表2参照) 等を用いた運動機能障害スコアリングで評価を行うことが可能な非ヒト霊長類であることが好ましい。本発明に従ってエンドセリンを投与する非ヒト霊長類としては、例えば、類人猿、オナガザル科に属するサル、オマキザル科に属するサ

ルを挙げることができる。「類人猿」とは霊長目（霊長類）ヒト上科に属するサルを指す。類人猿としては、例えば、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、ボノボ、テナガザル等を挙げることができる。オナガザル科に属するサルとしては、以下に限定されないが、例えば、マカク属に属するニホンザル、アカゲザル、カニクイザル、タイワンザル、ブタオザル、ボンネットモンキー等のサル（マカクザル）、ヒヒ属に属するマントヒヒ、ゲラダヒヒ等のサル（ヒヒ）、マンドリル属に属するマンドリル、ドリル等のサルを挙げることができる。オマキザル科に属するサルとしては、以下に限定されないが、例えば、オマキザル属に属するフサオマキザル等のサル（オマキザル）、リスザル属に属するコモンリスザル等のサル（リスザル）、マーモセット属に属するコモンマーモセット等のサル（マーモセット）を挙げることができる。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、カニクイザルである。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、3歳以上のカニクイザルである。本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、雄又は雌であってよいが、一実施形態では、雄であることが好ましい。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法で用いられる非ヒト霊長類は、雄のカニクイザルである。

[0024] 「カニクイザル」 (*Macaca fascicularis*) は哺乳綱霊長目オナガザル科マカク属に分類される霊長類である。カニクイザルは、ヒトと同じように二足歩行を行う。そのため、内頸動脈が大きく彎曲するなど、血管走行がヒトと極めて類似している。また、脳高次機能を持ち、運動機能だけではなく、ヒトに対する警戒心等の意識レベル及び認知機能を観察することが可能である。

[0025] b) エンドセリン

「エンドセリン」（成熟型）は、21アミノ酸残基からなり、分子内に2個のジスルフィド結合を有するペプチドである。エンドセリンは、203アミノ酸残基からなる前駆体がプロセッシングを受けて生成する。エンドセリ

ンには、異なる遺伝子にコードされるエンドセリンー１、エンドセリンー２、及びエンドセリンー３というアミノ酸配列及び構造のよく似た３種類のペプチドアイソフォームが存在する。ほとんどの哺乳類がこれら３種のエンドセリンを有しており、これら３種のエンドセリンの機能は生物種間で保存されている。さらに、エンドセリンー１は、そのアミノ酸配列が生物種間で高度に保存されていることも知られている。３種のエンドセリンは一過性の血管拡張作用と、それに引き続く持続的な血管収縮作用を有する。ラットを開頭し中大脳動脈の表面にエンドセリンを投与することにより虚血を誘発できることが知られている（非特許文献１）。本発明において用いられるエンドセリンは、例えば、エンドセリンー１又はエンドセリンー２である。一実施形態において、非ヒト霊長類に投与されるエンドセリンは、ヒトエンドセリンー１又はヒトエンドセリンー２である。本発明において用いられるエンドセリンは、エンドセリン活性（血管収縮作用）を有する限りにおいて配列は限定されないが、例えば、エンドセリンー１は、例えば、配列番号９に示すアミノ酸配列に対して９０％以上、好ましくは９５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、より好ましくは配列番号９に示すアミノ酸配列を含むペプチドであってよい。

[0026] c) 非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与と脳障害の誘導

本明細書において「脳基底核・視床領域」は、脳基底核と視床からなる領域を指す。脳基底核は、線条体、淡蒼球、視床下核、及び黒質から構成される神経核集合体である。脳基底核は、小脳と共に大脳皮質とループ回路を形成し、大脳皮質、特に前頭葉の活動を制御している。線条体は、尾状核と被殻からなり、それらの間に内包が存在している。淡蒼球は外節と内節に分けられる。黒質は網様部と緻密部からなる。被殻と淡蒼球を合わせると凸レンズ状に見えることから、これをレンズ核と呼ぶ。脳基底核は内包により尾状核とレンズ核（被殻及び淡蒼球）に分けられており、基底核よりも内側には視床が存在する。脳基底核は日常生活や習慣に関与する。視床

は大腦半球の中心部の、中脳の上部に位置する左右対称の2つの構造体であり、多数の神経核から構成されている。左右それぞれの視床は外側部と内側部に分けることができ、外側部は、視床後腹側核、視床外側腹側核、視床前腹側核、視床背側外側核、視床後外側核、視床枕及び視床外側膝状体核からなり、内側部は、視床前核群、視床内側核群及び視床内側膝状体核からなる。視床は、視覚、聴覚、体性感覚等の感覚入力を大腦皮質へ中継する役割を担い、また、運動の調節に関する情報も小脳や大腦基底核から視床を経由して運動に関連する領域に伝えられる。

[0027] 本発明の動物モデル作製方法においては、非ヒト霊長類の大腦基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導する。エンドセリンは、強力な血管収縮作用を有し、エンドセリンを投与することにより投与部位周辺の血管を収縮させ虚血を誘発し、梗塞巣（障害巣）を誘導することができる。本発明において「障害を誘導する」とは、エンドセリンの投与により投与部位周辺の虚血が誘発され、神経細胞の壊死が起こり、壊死した部位の機能が損傷されることを意味する。一実施形態では、非ヒト霊長類の大腦基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより大腦基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導する。本発明において「大腦基底核・視床領域にエンドセリンを投与」とは、大腦基底核・視床領域を標的として（すなわち、大腦基底核・視床領域にエンドセリンが到達するように）エンドセリンを投与することを意味する。本発明において、例えば、神経核に「エンドセリンを投与」という記載も、同様に、その神経核を標的として（すなわち、その神経核にエンドセリンが到達するように）エンドセリンを投与することを意味する。

[0028] 本明細書において「投与部位」とは、エンドセリンを大腦基底核・視床領域に投与（好ましくは、注入）する際の頭蓋骨表面上（頭蓋上）の位置及び頭蓋上のその投与位置の直下の硬膜からの深さからなる三次元座標で特定される場所をいう。

[0029] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、大腦基底核・視床

領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される神経核に、エンドセリンを投与することを含む。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ又は5つ全て（被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核）の神経核にエンドセリンを投与することを含む。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域内を標的とする少なくとも1か所、少なくとも2か所、少なくとも3か所、少なくとも4か所、又は少なくとも5か所の投与部位（典型的には、注入部位）にエンドセリンを投与することを含む。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核、及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は5つ全ての神経核を標的とする、合計で少なくとも1か所、少なくとも2か所、少なくとも3か所、少なくとも4か所、又は少なくとも5か所の投与部位（典型的には、注入部位）にエンドセリンを投与することを含む。一実施形態では、非ヒト霊長類の大脳基底核、視床外側腹側核及び視床後腹側核にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導してもよい。一実施形態では、非ヒト霊長類の被殻、淡蒼球、及び視床（例えば、視床外側腹側核及び視床後腹側核）にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導してもよい。一実施形態では、非ヒト霊長類の被殻、尾状核、淡蒼球、及び視床（例えば、視床外側腹側核及び視床後腹側核）にエンドセリンを投与し、それにより脳障害を誘導してもよい。

[0030] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域、例えば、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ又は5つ全ての神経核を標的とするように

投与部位を定め、当該投与部位にエンドセリンを投与することを含む。

[0031] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の5つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定め、当該投与部位にエンドセリンを投与することを含む。

[0032] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

(a) 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも4つの神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

(b) 当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法、であってよい。

[0033] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

(a) 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の5つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

(b) 当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法、であってよい。

[0034] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

(a) 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及

び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも4つ又は5つ全ての神経核を標的とするように、少なくとも3か所又は4か所の投与部位を定めるステップと、

(b) 当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法、であってよい。

[0035] エンドセリンの投与部位（典型的には、注入部位）は、当業者であれば、公知の情報や、コンピューター断層撮影（CT）、若しくは核磁気共鳴画像法（MRI）により得られた脳内の画像、又は本明細書に記載のブレグマを基点とする方法等を用いて適宜定めることができる。

[0036] 一実施形態では、大脳基底核・視床領域、例えば、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核等の神経核に対する、エンドセリンの投与部位（典型的には、注入部位）の位置は、頭蓋骨表面の前方にある矢状縫合と冠状縫合との交差点であるブレグマ（Bregma）を基点（B：0 mm、ML座標：0 mm（正中））として定めることができる。より具体的には、投与部位（典型的には、注入部位）の位置は、頭蓋上の投与位置（投与のための頭蓋骨の穴に相当）を指定する、ブレグマを基点とした仮想水平面上の前後軸方向の距離B及び左右軸方向の距離L（左）又はR（右）と、その頭蓋上の投与位置の直下の硬膜からの深さ（垂直距離）Dとで表される座標で定めることができる。前後軸方向の距離Bは、前方の距離をプラスの数値で、後方の距離をマイナスの数値で表す。本発明では、典型的には、前後左右軸方向の距離で指定される頭蓋上の投与位置（頭蓋骨の穴の位置）から、鉛直下向き方向（すなわち、重力方向）に向かって針を挿入し、その針を通じてエンドセリンを脳内に投与することができる。したがって、本発明において投与部位を規定する深さDは、頭蓋上の投与位置の直下の硬膜から鉛直下向き方向（すなわち、重力方向）への脳内での深さを指す。本発明では、ブレグマを投与部位（典型的には、注入部位）の基点として用いることにより、個体間のブレを低減し、所定の神経核における投与部位をより安定した位置に定めることを可能にすることができる。本発明において、投与部位

の位置は、非ヒト霊長類の頭部が固定された状態で定められる。非ヒト霊長類の頭部の固定には、例えば脳定位固定装置を用いることができる。具体的には、非ヒト霊長類の両耳に脳定位固定装置のイヤバーを挿入し、頭部が左右に動かないように固定した後、上顎用のバー及び眼窩用のバーを用いて頭部が上下に動かないように固定する。イヤバーを挿入して頭部を固定することにより、非ヒト霊長類の頭部を再現良く定位固定することが可能である。それにより、非ヒト霊長類の頭部は、投与の際、頭頂部が上側になり、両耳を結ぶ直線が水平となり、顔が正面を向くように固定される。

[0037] ブレグマを基点として定められる所定の位置の投与部位（典型的には、注入部位）が、脳内のどの領域、例えば、どの神経核に対してエンドセリンを投与するものであるか（すなわち、どの領域又はどの神経核を投与の標的とするか）について、予め確認してもよい。所定の位置の投与部位について投与の標的となる領域や神経核は、例えば、染色液を投与部位に注入し、注入直後の脳において染色された領域を調べることにより、決定することができる。使用する染色液としては、以下に限定されないが、例えば、エバンスブルー（CAS番号：314-13-6）が挙げられる。目的の領域又は神経核を投与の標的とすることが確認された投与部位に、エンドセリンを投与してもよい。

[0038] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（i）B：0～4 mm、L：7～9 mm、D：15～21 mm、及び（ii）B：4～14 mm、L：3～14 mm、D：12～23 mmに位置する少なくとも合計3か所（例えば、3か所、4か所、又は5か所）の投与部位を含むものであってよい。これらの投与部位は、マカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。各投与部位へのエンドセリンの投与は、同時に行ってもよいし、逐次的に行ってもよいし、複数回に分けて行ってもよい。1つの投与部位へのエンドセリンの投与は、1回のみ行ってもよいし、複数回行ってもよい。例えば、ある投与部位にエンドセリンを投与した後、時間を空

けて他の投与部位及び／又は同じ投与部位にエンドセリンを投与してもよい。一実施形態では、ある投与部位にエンドセリンを投与した後、その翌日又はそれよりも後に、他の投与部位及び／又は同じ投与部位にさらにエンドセリンを投与してもよい。

[0039] 一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、カニクイザルに、ブレグマを基点とした本明細書に記載のエンドセリンの投与部位にエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む方法である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、カニクイザルの頭蓋上に投与位置を指定し、当該投与位置の直下の投与部位にエンドセリンを投与することを含み、そのエンドセリンの投与部位が本明細書に記載の、ブレグマを基点とした投与部位を含む、方法である。これらの実施形態において、本発明の動物モデル作製方法は、亜急性期～慢性期、例えば慢性期の脳梗塞（例えば、穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞）の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法でありうる。

[0040] カニクイザルを例にとって説明すると、ブレグマを基点として、B：0～4 mm、L：7～9 mm、D：15～21 mmに位置する投与部位は、視床を標的としている。同様に、ブレグマを基点として、B：4～14 mm、L：3～14 mm、D：12～23 mmに位置する投与部位は、大脳基底核（特に、線条体及び淡蒼球）を標的としている。

[0041] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として（i）B：1～3 mm（例えば、2 mm）、L：7～9 mm（例えば、8 mm）、D：18～20 mm（例えば、19 mm）、（ii）B：4～6 mm（例えば、5 mm）、L：7～9 mm（例えば、8 mm）、D：18～20 mm（例えば、19 mm）、及び（iii）B：8～12 mm（例えば、9 mm、又は11 mm）、L：4～13 mm（例えば、5 mm、8 mm、12 mm又は13 mm）、D：12～20 mm（例えば、13 mm、15 mm、又は19 mm）にそれぞれ位置する投与部位（少なくとも合計3か所、例えば、3か所、4か所、又は5か所の投与部位）を含むものであってよい。

- [0042] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm (例えば、2 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(ii) B : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、及び (iii) B : 8 ~ 12 mm (例えば、9 mm、又は 11 mm)、L : 7 ~ 14 mm (例えば、8 mm、又は 13 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) にそれぞれ位置する投与部位 (少なくとも合計 3 か所、例えば、3 か所又は 4 か所の投与部位) を含むものであってよい。
- [0043] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm (例えば、2 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(ii) B : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(iii) B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、D : 12 ~ 14 mm (例えば、13 mm)、及び (iv) B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 11 ~ 13 mm (例えば、12 mm)、D : 14 ~ 16 mm (例えば、15 mm) にそれぞれ位置する投与部位 (少なくとも合計 4 か所の投与部位) を含むものであってよい。
- [0044] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm (例えば、2 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(ii) B : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、及び (iii) B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) にそれぞれ位置する投与部位 (少なくとも合計 3 か所の投与部位) を含むものであってよい。
- [0045] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として (i

) B : 1 ~ 3 mm (例えば、2 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(i i) B : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、及び(i i i) B : 10 ~ 12 mm (例えば、11 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) にそれぞれ位置する投与部位(少なくとも合計3か所の投与部位)を含むものであってよい。

[0046] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として(i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(i i) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(i i i) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び(i v) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位(少なくとも合計4か所の投与部位)を含むものであってよい。

[0047] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として(i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(i i) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、及び(i i i) B : 9 mm、L : 8 mm、D : 19 mm にそれぞれ位置する投与部位(少なくとも合計3か所の投与部位)を含むものであってよい。

[0048] より好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として(i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(i i) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、及び(i i i) B : 11 mm、L : 8 mm、D : 19 mm にそれぞれ位置する投与部位(少なくとも合計3か所の投与部位)を含むものであってよい。

[0049] さらに好ましい実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として(i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(i i) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(i i i) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び(i v) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位(少なくとも合計4か所の投与部位)であってよい。

[0050] 一実施形態では、エンドセリンの投与部位は、ブレグマを基点として (i) B : 1 ~ 3 mm (例えば、2 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(ii) B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、D : 12 ~ 14 mm (例えば、13 mm)、(iii) B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 12 ~ 14 mm (例えば、13 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、(iv) B : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm)、及び (v) B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) にそれぞれ位置する投与部位 (少なくとも合計5か所の投与部位) を含むものであってよい。一実施形態では、一個体において、(i)、(ii) 及び (iii) の投与部位にエンドセリンを投与した後、その翌日に (iv) 及び (v) の投与部位にさらにエンドセリンを投与してもよい。

[0051] カニクイザルを例にとって説明すると、ブレグマを基点として、B : 1 ~ 3 mm (例えば、2 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) に位置する投与部位は、視床外側腹側核及び視床後腹側核を標的としている。同様に、ブレグマを基点として、B : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) に位置する投与部位は、淡蒼球を標的としている。ブレグマを基点として、B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 4 ~ 6 mm (例えば、5 mm)、D : 12 ~ 14 mm (例えば、13 mm) に位置する投与部位は、尾状核を標的としている。そして、ブレグマを基点として、B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 11 ~ 13 mm (例えば、12 mm)、D : 14 ~ 16 mm (例えば、15 mm) に位置する投与部位は、被殻を標的としている。同様に、ブレグマを基点として、B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 12 ~ 14 mm (例えば、13 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) に位置する投与部位は、被殻

を標的としている。また、ブレグマを基点として、B : 8 ~ 10 mm (例えば、9 mm)、L : 7 ~ 9 mm (例えば、8 mm)、D : 18 ~ 20 mm (例えば、19 mm) に位置する投与部位は、被殻 (特には、被殻の深部) を標的としている。これらの投与部位は内包に隣接しているため、これらの投与部位へのエンドセリンの投与は、内包においても障害をもたらす得る。

[0052] 上記の投与部位は、好ましくはマカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。これらの投与部位へのエンドセリンの投与は、同時に行ってもよいし、逐次的に行ってもよいし、複数回に分けて行ってもよい。

[0053] 本発明の動物モデル作製方法では、右半身に運動機能障害を惹起するために左脳にのみエンドセリンを投与してもよく、左半身に運動機能障害を惹起するために右脳にのみエンドセリンを投与してもよい。上述の、ブレグマを基点としたエンドセリンの投与部位は、左脳にエンドセリンを投与する例を示しているが、左右対称な右脳の該当部位 (すなわち、上記の左脳内のエンドセリンの投与部位に対し、前後軸方向の距離B及び深さDは同じであるが、左右軸方向は同じ距離をL (左) の代わりにR (右) 方向で定めた座標を有する投与部位) にエンドセリンを投与する方法も、本発明に含まれる。また、左半身及び右半身に運動機能障害を惹起するために、エンドセリンの投与量等を適宜調節し、左脳及び右脳の両方にエンドセリンを投与する方法も、本発明に含まれる得る。

[0054] 本発明の動物モデル作製方法では、投与部位 (典型的には、注入部位) あたりのエンドセリンの投与量 (典型的には、注入量) は、例えば、少なくとも0.1 μ g、少なくとも1 μ g、少なくとも4 μ g、又は少なくとも10 μ gであってよく、少なくとも20 μ g、少なくとも30 μ g、少なくとも50 μ g、少なくとも55 μ g、又は少なくとも60 μ gであることが好ましく、かつ、200 μ g以下、150 μ g以下、100 μ g以下、90 μ g以下、又は70 μ g以下であることが好ましい。一実施形態では、投与部位 (典型的には、注入部位) あたりのエンドセリンの投与量は、0.1 μ g ~

200 μ g、10 μ g $\sim$ 200 μ g、20 μ g $\sim$ 200 μ g、30 μ g $\sim$ 200 μ g、0.1 μ g $\sim$ 150 μ g、10 μ g $\sim$ 150 μ g、20 μ g $\sim$ 150 μ g、30 μ g $\sim$ 150 μ g、10 μ g $\sim$ 100 μ g、20 μ g $\sim$ 100 μ g、30 μ g $\sim$ 100 μ g、20 μ g $\sim$ 90 μ g、30 μ g $\sim$ 90 μ g、50 μ g $\sim$ 90 μ g、60 μ g $\sim$ 90 μ g、20 μ g $\sim$ 70 μ g、30 μ g $\sim$ 70 μ g、50 μ g $\sim$ 70 μ g、60 μ g $\sim$ 70 μ g、20 μ g $\sim$ 60 μ g、30 μ g $\sim$ 60 μ g、又は50 μ g $\sim$ 60 μ gであってもよく、例えば、60 μ gであってもよい。一実施形態では、好ましくは、投与部位（典型的には、注入部位）あたりのエンドセリンの投与量は20 μ g $\sim$ 70 μ g、20 μ g $\sim$ 60 μ g、又は30 μ g $\sim$ 60 μ gであり、さらに好ましくは50 μ g $\sim$ 60 μ gである。

[0055] これらの投与部位（典型的には、注入部位）あたりのエンドセリンの投与量（典型的には、注入量）は、好ましくはマカク属に属するサル、例えばカニクザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。投与又は注入するエンドセリンの投与量（典型的には、注入量）は、使用する生物種に応じて（例えば、生物種の体重に応じて）、当業者が適切に定めることができる。

[0056] 本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンは水性媒体（水、生理食塩水、緩衝液、生理学的に許容可能な有機溶媒等）中の溶液（例えば、水溶液）の形態で投与してもよい。一実施形態では、エンドセリンは、酢酸水溶液（例えば、0.05 $\sim$ 5%酢酸、好ましくは0.1 $\sim$ 1%酢酸）で希釈したエンドセリンの溶液として投与してもよい。エンドセリンを溶液の状態に投与する場合、投与は注入により行うことができるが、それに限定されない。注入は、以下に限定されないが、マイクロシリンジ等の注射器、投与用カニューレ、及び／又はマイクロインジェクションチューブ等の任意の脳内注入手段を用いて行うことができる。

[0057] 投与又は注入するエンドセリン溶液の量（体積）は、以下に限定するものではないが、投与部位あたり、2 μ L以上であってよく、4 μ L以上である

ことが好ましく、 $10\mu\text{L}$ 以上、 $12\mu\text{L}$ 以上、 $20\mu\text{L}$ 以上、又は $30\mu\text{L}$ 以上であることがより好ましい。投与又は注入するエンドセリン溶液の量はまた、投与部位あたり、 $100\mu\text{L}$ 以下、 $50\mu\text{L}$ 以下、 $40\mu\text{L}$ 以下、又は $30\mu\text{L}$ 以下であってよい。一実施形態では、投与又は注入するエンドセリン溶液の量は、投与部位あたり、 $2\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}\sim 40\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}\sim 30\mu\text{L}$ 、 $20\mu\text{L}\sim 40\mu\text{L}$ 、 $20\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ 、 $25\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ 、 $30\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ 、又は $30\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ であってよく、例えば、 $30\mu\text{L}$ であってもよい。一実施形態において、投与部位（典型的には、注入部位）あたり少なくとも $20\mu\text{g}$ のエンドセリンを投与する場合、投与又は注入するエンドセリン溶液の量は、投与部位あたり、 $10\mu\text{L}$ 以上、又は $12\mu\text{L}$ 以上、例えば $10\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ であってよい。一実施形態において、投与部位（典型的には、注入部位）あたり少なくとも $50\mu\text{g}$ のエンドセリンを投与する場合、投与又は注入するエンドセリン溶液の量は、投与部位あたり、 $20\mu\text{L}$ 以上、又は $30\mu\text{L}$ 以上、例えば $20\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ であってよい。

[0058] 上記の投与又は注入するエンドセリン溶液の量（体積）は、好ましくはマカク属に属するサル、例えばカニクイザルに適用する上で特に好適であるが、それらの生物種への適用に限定されるものではない。投与又は注入するエンドセリン溶液の量（体積）は、使用する生物種に応じて、当業者が適切に定めることができる。

[0059] 投与又は注入する溶液中のエンドセリンの濃度は、以下に限定されないが、少なくとも $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ であってよく、少なくとも $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、又は少なくとも $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ が好ましく、かつ、 $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以下、 $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以下、又は $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以下が好ましい。一実施形態では、当該エンドセリン濃度は、例えば、 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}\sim 10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ であってよく、 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}\sim 5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ が好ましく、 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}\sim 3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ がより好ましく、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}\sim 3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ がさらに好ましく、例えば $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ であってよい。

[0060] 一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位（典型的には、注入部位）に、濃度 $0.5 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、好ましくは濃度 $1 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、例えば、濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のエンドセリン溶液を、投与部位あたり $10 \mu\text{L}$ 以上、好ましくは $10 \mu\text{L} \sim 50 \mu\text{L}$ 投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度 $0.5 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、好ましくは濃度 $1 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、例えば、濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のエンドセリン溶液を、投与部位あたり $12 \mu\text{L}$ 以上、好ましくは $12 \mu\text{L} \sim 40 \mu\text{L}$ 投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度 $0.5 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、好ましくは濃度 $1 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、例えば、濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のエンドセリン溶液を、投与部位あたり $20 \mu\text{L}$ 以上、好ましくは $20 \mu\text{L} \sim 50 \mu\text{L}$ 投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度 $0.5 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、好ましくは濃度 $1 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、例えば、濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のエンドセリン溶液を、投与部位あたり $30 \mu\text{L}$ 以上、好ましくは $30 \mu\text{L} \sim 50 \mu\text{L}$ 、又は $30 \mu\text{L} \sim 100 \mu\text{L}$ 投与することを含み得る。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法は、投与部位に、濃度 $0.5 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、好ましくは濃度 $1 \sim 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、例えば、濃度 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のエンドセリン溶液を、投与部位あたり $20 \mu\text{L} \sim 40 \mu\text{L}$ 、好ましくは $25 \mu\text{L} \sim 35 \mu\text{L}$ 、例えば $30 \mu\text{L}$ 投与することを含み得る。これらは、使用する生物種に応じて、当業者が適切に定めることができる。

[0061] エンドセリンの濃度及び投与量（典型的には、注入量）を適切に選択することにより、エンドセリンによる効果が、投与部位から、隣接した脳領域（例えば、内包、視床下核等）まで拡がることを容易にすることができる。

[0062] 本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域に、上記のようにしてエンドセリンを投与することにより、脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することができる。一実施形態では、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び／又は視床後腹側核に、上記のようにしてエンドセリンを投与することにより、脳基底核障害、視床障害及び内

包障害を誘導することができる。

- [0063] 本発明では、大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与により、脳虚血が誘導され、投与部位周辺において壊死が生じ、障害が誘導される。
- [0064] 本発明に関して「大脳基底核障害」とは、大脳基底核に生じた障害を指す。大脳基底核に障害を生じると、パーキンソン病等にみられるように、意図する運動だけでなく、日常的な自然な動作や行動も困難となる。
- [0065] 大脳基底核を構成する被殻は、尾状核と共に背側線条体を形成しており、また、レンズ核の最外部を形成している。被殻は強化学習における役割を持っていると考えられる。大脳基底核を構成する尾状核は、脳の中心付近で視床の両側に存在する。尾状核は学習と記憶、特にフィードバック処理に強く関わっていることが証明されている。大脳基底核を構成する淡蒼球は、外節と内節とに区別されるが、どちらも共にGABA作動性の大型投射ニューロンを含んでいる。これらの神経核の障害は大脳基底核障害を引き起こす。
- [0066] 本発明に関して「視床障害」とは、脳の視床に生じた障害を指す。大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与が、視床（例えば、視床外側腹側核及び／又は視床後腹側核）への投与を含む場合、当該投与は視床障害を誘導することができる。一実施形態では、大脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与は、それが大脳基底核のみに対する投与である場合も、視床障害を誘導することができる。視床は大脳半球の中心部、中脳の上部に左右2つあり、それぞれの視床を外側部と内側部に分けることができる。「視床外側腹側核」は、視床の外側部の領域の1つであり、淡蒼球、黒質からのGABA入力を受け、主に大脳皮質の運動野へと投射する。「視床後腹側核」は、視床の内側部の領域の1つであり、主に上行性知覚路からの感覚情報を受け、これを中継して大脳皮質の感覚野に投射する。
- [0067] 本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、エンドセリン投与部位の障害に加えて、内包障害を誘導することができる。
- [0068] 本発明に関して「内包障害」とは、脳の内包に生じた障害を指す。内包は

、核（神経細胞体）ではなく、神経線維の集合体である。内包は前脚と後脚に分けられる。内包前脚には視床と前頭葉を結ぶ神経線維、内包後脚には側頭葉、頭頂葉、及び後頭葉と脳幹とを結ぶ神経線維が走行している。内包障害が起こると障害部位の反対側の片麻痺（半身不随）が特徴的に生じる。内包障害が生じた場合の急性期には、まず筋肉の部分的痙攣が起こり、上下肢の運動麻痺が現れる。内包後脚の障害では、躯幹、四肢、頭部の知覚減弱又は消失が加わる。

[0069] 一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、さらに、視床下核障害を誘導することができる。視床下核は、脳基底核を構成する神経核の1つであり、淡蒼球外節から抑制性の出力を受けると共に、淡蒼球外節及び淡蒼球内節・黒質網様部へ興奮性の入力を行う。

[0070] 本発明の動物モデル作製方法において、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与により、脳基底核障害や視床障害に加えて内包障害も誘導されるのは、脳基底核・視床領域に投与されたエンドセリンの効果が内包にまで及ぶことによる。エンドセリンの効果が内包にまで及ぶ場合としては、例えば、脳基底核・視床領域を標的として投与されたエンドセリンが内包にも直接投与されていてもよく、脳基底核・視床領域に投与されたエンドセリンが内包にまで拡散していてもよく、脳基底核・視床領域に投与されたエンドセリンにより生じた壊死が内包にまで広がっていてもよい。本発明の動物モデル作製方法においては、エンドセリンの効果が直接的又は間接的に内包まで及ぶことにより、内包障害が誘導されていればよい。同様に、脳基底核・視床領域へのエンドセリンの投与により、視床下核等の投与部位以外の周囲領域の障害が誘導されるのも、投与されたエンドセリンの効果が当該領域まで及ぶことによる。

[0071] 脳基底核及びそれを構成する各神経核、視床、内包等が障害されていることは、2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTTC; CAS番号: 298-96-4）染色によって確認できる。TTTCはミトコン

ドリアで発生する水素により還元されることで水に不溶な赤色を呈するトリフェニルホルマザン（TPF）を生成するため、障害を受けていない組織は赤く染まるのに対して、障害を受けた組織は染色されない。

[0072] 本発明は、上記の本発明の動物モデル作製方法で作製された、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル（以下、「本発明の非ヒト霊長類動物モデル」とも称する）も提供する。

[0073] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、本発明の動物モデル作製方法において誘導（作製）された大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有し、脳梗塞のモデル（動物モデル）として有用である。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、急性期の脳梗塞モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、比較的長期（例えば、2週間～3か月又はそれ以上）にわたり障害を維持することができる。そのため、亜急性期～慢性期の脳梗塞のモデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞のモデルとして有用である。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞のモデルとして特に有用である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、急性期～慢性期の脳梗塞を誘導することができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期の脳梗塞を誘導することができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、慢性期の脳梗塞を誘導することができる。

[0074] カニクイザルをはじめとする非ヒト霊長類において、急性期は脳梗塞の発症直後から72時間未満までの、症状が悪化する可能性のある時期を指す。亜急性期は脳梗塞発症後72時間から2週間未満まで、慢性期は脳梗塞発症の2週間後以降の期間を指す。本発明において、非ヒト霊長類動物モデルの

脳梗塞の評価又は非ヒト霊長類の治療等を行う亜急性期～慢性期は、脳梗塞発症の72時間後以降、例えば脳梗塞発症の2週間後以降の期間であってもよく、また、脳梗塞発症の3週間後以降又は1か月後以降、例えば脳梗塞発症の3週間後～6か月後若しくは1か月後～6か月後、又は脳梗塞発症の3週間後～3か月後若しくは1か月後～3か月後の期間であってもよい。本明細書において、カニクイザルをはじめとする非ヒト霊長類の脳梗塞における「亜急性期～慢性期」とは脳梗塞発症の72時間後以降の期間をいい、「慢性期」とは脳梗塞発症の2週間後以降の期間をいう。本明細書において「1週間後」は7日後を、「2週間後」は14日後を、「3週間後」は21日後を意味する。

[0075] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、穿通枝梗塞の動物モデルとしても有用である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、穿通枝梗塞を誘導することができる。穿通枝梗塞は、特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞であってもよく、例えば、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞が挙げられる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の動物モデルとしても用いることができる。なお、特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞には、当該特定の領域のみに脳障害を有する穿通枝梗塞だけでなく、当該特定の領域以外にも脳障害を有する穿通枝梗塞も含まれる。

[0076] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態にお

いて、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞であって、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞）を誘導することができる。

[0077] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の穿通枝梗塞の動物モデルとして特に有用である。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の穿通枝梗塞であって、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、慢性期の穿通枝梗塞（例えば、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞）を誘導することができる。

[0078] 脳の血管が詰まったり、破れたりすることによって脳が障害を受ける病気を脳卒中という。その中で、脳を養う血管が詰まって起こる病気が脳梗塞である。脳梗塞 (c e r e b r a l i n f a r c t i o n) は虚血性脳卒中 (i s c h e m i c s t r o k e) と呼ばれることもある。脳梗塞は、心

原性脳塞栓症、アテローム血栓性脳梗塞、ラクナ梗塞、及びそれらに分類されないもの（分類不能）を含めた4タイプに大きく分類される。「穿通枝」とは脳主幹動脈を構成する中大脳動脈から分岐した細い動脈であり、大脳基底核・視床領域及び内包を支配している。なお脳内領域が血管により「支配される」とは、その血管によって当該脳内領域に血液が供給されていることを意味し、当該脳内領域はその血管の血管支配領域（vascular territory）内にある。「穿通枝梗塞」とは、穿通枝に支配される視床、尾状核、被殻、淡蒼球及び/又は内包に梗塞が起こり、梗塞が起きた部位の機能が損傷されている疾患である。穿通枝梗塞で梗塞が起こりやすい神経核としては、被殻及び尾状核が知られている。穿通枝梗塞として、単一の深部穿通枝の閉塞による脳梗塞である、ラクナ梗塞が広く知られてきた。一方、近年、大径穿通枝の母動脈からの分岐部近傍のアテロームプラークを基盤とした血栓により穿通枝全域に及ぶ梗塞がbranch atheromatous disease（BAD）という穿通枝梗塞の一病型として提起されている。穿通枝梗塞としては、他にも、線条体内包梗塞、内包梗塞、前脈絡叢動脈梗塞、視床梗塞等が知られている。穿通枝梗塞は、穿通枝に支配される領域（穿通枝支配領域）に梗塞が起こる脳梗塞としても知られている。「穿通枝支配領域」とは、穿通枝に支配される領域であり、大脳基底核・視床領域及び内包を意味する。

[0079] ラクナ梗塞は一般的な脳梗塞と同様、半身の脱力（運動麻痺）、半身のしびれ（感覚障害）、しゃべりにくさ（構音障害）が主な症状となるが、穿通枝が詰まったときに壊死に陥る範囲は一般的に15mm未満とされる。

[0080] BADは上記の分類不能タイプの梗塞の1つである。アテローム血栓性脳梗塞は太い血管が動脈硬化で詰まることが原因の脳梗塞である。BADはラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞のちょうど中間のタイプであり、太い血管は狭窄を起こしていないが、そこから分岐する穿通枝が根元で詰まることでラクナ梗塞に比べて広い範囲で脳梗塞を生じる。BADの症状は脳梗塞の生じた場所により様々であるが、ラクナ梗塞と同じように運動麻痺、感覚障

害、構音障害が主な症状である。症状の経過はアテローム血栓性脳梗塞と似ており、発症後数日かけて徐々に脳梗塞の範囲が広がり、進行することが多い。

[0081] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、ラクナ梗塞及び／又はB A Dの動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、ラクナ梗塞及び／又はB A Dを誘導することができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はB A Dの動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はB A Dを誘導することができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期のラクナ梗塞及び／又はB A Dの動物モデルとして特に有用である。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、慢性期のラクナ梗塞及び／又はB A Dを誘導することができる。

[0082] ラクナ梗塞又はB A Dは、特定の領域に脳障害を有するラクナ梗塞又はB A Dであってもよく、例えば、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはB A D、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはB A D、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはB A D、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有するラクナ梗塞若しくはB A Dが挙げられる。特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞は、特定の領域に脳障害を有するラクナ梗塞及びB A Dであってもよい。

[0083] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。本明細書において「穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞」とは、梗塞により生じた脳障害 (b r a

i n d a m a g e) が主に穿通枝支配領域に生じている脳梗塞をいう。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞には、穿通枝支配領域に生じた梗塞によって穿通枝支配領域に脳障害が生じた脳梗塞だけでなく、例えば、穿通枝支配領域周辺に生じた梗塞によって引き起こされた細胞の壊死が穿通枝支配領域に広がることでその部位の機能が損傷された場合のように、二次的に穿通枝支配領域に脳障害が生じた脳梗塞も含まれる。本明細書において脳障害とは、梗塞により生じた細胞壊死による脳の機能障害 (f u n c t i o n a l d a m a g e) を意味する。脳障害は、通常、当該脳障害を有する領域における細胞壊死を有する。「穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞」は、穿通枝支配領域に細胞壊死を有する脳梗塞であってよい。

[0084] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞としては、例えば穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞、B A D、又は特定の領域に脳障害を有する穿通枝梗塞）が挙げられる。

[0085] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞としては、穿通枝支配領域の一部又は全部が障害された脳梗塞が含まれ、例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞が挙げられる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害を含む脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは

は視床の脳障害を含む脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害を含む脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害を含む脳障害である脳梗塞) を誘導することができる。

[0086] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与することにより、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) を誘導することができる。

[0087] 一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。一実施形態において、本発明の動物モデル作製方法では、非ヒト霊長類の大脳基底核・視床領域にエン

ドセリンを投与することにより、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害が i）大脳基底核・視床領域の脳障害、i i）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）を誘導することができる。

[0088] 穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞においては、大脳基底核に加えて内包にも障害が生じていることがよく認められる。大脳基底核及び視床は、神経細胞の細胞体が集まる灰白質であるが、内包は、神経細胞の細胞体に乏しく主に神経線維が集積し走行している白質である。内包を形成する神経線維の束の一つとして、皮質脊髓路が挙げられる。皮質脊髓路は大脳皮質の運動野から脊髓を経て下位運動ニューロンに至る軸索（神経線維）の束のことであり、皮質脊髓路を構成するのは、ほとんどが上位運動ニューロンの軸索である。

[0089] 穿通枝支配領域の内包が障害されると、皮質脊髓路が損傷される。皮質脊髓路が損傷されていることは、例えば、核磁気共鳴画像法（MRI）を用いた拡散テンソル画像（diffusion tensor image; DTI）解析により評価することができる。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、皮質脊髓路の損傷を伴う。

[0090] 穿通枝支配領域の大脳基底核が障害されると、主に線条体のドパミントランスポーターの発現低下が認められる。ドパミントランスポーターは、脳内の黒質から線条体に向かう神経（ドパミン神経）の線条体の終末部に存在し、線条体に放出されたドパミンを再取り込みする働きを有する。大脳基底核やドパミン作動系の異常により、随意運動や姿勢筋緊張、及び歩行の異常等、大脳基底核障害に特有の運動機能障害が出現する。ドパミントランスポーターの発現が低下していることは、例えば、抗ドパミントランスポーター抗体を用いた免疫染色により評価可能である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、ドパミントランスポーターの発現低下を伴う。

[0091] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、局所的な脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとしても用いることができる。局所的な脳障害を有する脳梗塞には、例えば中大脳動脈に梗塞が生じることにより大脳皮質、内包、大脳基底核等に障害が生じた脳梗塞のように、脳障害が脳の広範囲に渡って生じている脳梗塞は含まれない。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、局所的な脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。一実施形態において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、慢性期の脳梗塞であって、局所的な脳障害を有する脳梗塞の動物モデルとして用いることができる。

[0092] 脳梗塞において、慢性期に重い後遺症が残る原因としては、哺乳類の中樞神経では損傷部の周囲でアストロサイトが反応してグリア瘢痕と呼ばれるかさぶたのような組織を形成し、神経の再生を妨げることが挙げられる。グリア瘢痕が形成される慢性期の脳梗塞モデルは、慢性期の脳梗塞治療剤の開発のために非常に有用である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、脳梗塞の慢性期において神経細胞の脱落とアストロサイトの集積を示す。

[0093] d) 脳梗塞の確認方法及び評価方法

本発明の非ヒト霊長類動物モデルが、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルであること及び／又は穿通枝梗塞の非ヒト霊長類動物モデルであることは、例えば、TTC染色やヘマトキシリン・エオジン（HE）染色のような組織学的な手法、又は、ヒトの脳梗塞、例えば穿通枝梗塞の診断方法と同様に、当該非ヒト霊長類動物モデルの梗塞巣（障害巣）をコンピューター断層撮影（CT）、又はMRIを用いて判断することができる。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の動物モデルであることも、同様の手法により判断することができる。亜急性期～慢性期の脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルであることは、上記の方法に加えて、障害の持続性に基づいて確認することができる。例えば、運動機能障害が、脳梗塞発症から少なくとも4週間にわたって持続する場合、当該脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の

脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルとして有用であると判断してもよいが、障害の持続性の確認方法はこれのみに限定されず、評価方法に応じて変更することができる。

[0094] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の状態（症状、重症度、障害の持続性等）を評価する際に用いる指標としては、当該動物の運動機能障害の状態を評価できるものであれば特には限定されず、例えばNHPS及び／又は本明細書に記載のmRS（サル用）を用いて評価することができる。本発明の非ヒト霊長類動物モデルに誘導される運動機能障害は、総合的運動技能（gross motor skills）の障害であってよい。

[0095] mRSを用いた評価は、後述の表1に基づくスコアリングにより実施することができる。表1に記載のmRS（ヒト臨床用）は、脳卒中診療において身体障害の指標として広く使われている指標であり、当該指標をサル用に修正した表1に記載のmRS（サル用）は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の状態（症状、重症度、障害の持続性等）の評価に用いることができる。NHPSを用いた評価は、後述の表2の基準に従ったスコアリングにより実施することができる。NHPSを用いた評価は、運動系、意識障害、筋制御系、及び知覚系のうち1～4つの項目のスコアリングに基づいて行うことができるが、好ましくは、当該項目は少なくとも運動系を含む。知覚系は個体間の反応性のばらつきが生じやすいため、スコアリングを行わなくてもよい。亜急性期や慢性期は、主に運動機能障害が観察されることから、それらの時期におけるNHPSを用いた評価は運動系スコアリングのみに基づいて行ってもよい。

[0096] 運動機能障害の重症度の判断にmRSを用いる場合、例えば、mRSが3以上であれば、中等度～重度の運動機能障害を有していると判断してもよい。重症度の判断にはNHPSを用いることも可能であり、例えば、NHPSの運動系スコア（下記表2の項目Aの合計スコア；以下同様）において、障害側のスコアが12以上であれば中等度～重度の運動機能障害を有していると判断してもよい。本明細書において、重症度が高い運動機能障害とは

、中等度～重度の運動機能障害を意味する。

- [0097] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、例えば m R S が 2 以上であり、m R S が 3 ～ 5 であることが好ましい。
- [0098] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、例えば N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 4 以上であり、障害側のスコアが 1 2 以上であることが好ましく、1 4 以上であることがより好ましく、1 6 であることが特に好ましい。
- [0099] 一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、m R S が 2 以上である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、m R S が 3 ～ 5 である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 4 以上である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 1 2 以上である。一実施形態では、本発明の動物モデル作製方法において、エンドセリンを投与し誘導される運動機能障害の重症度は、m R S が 3 ～ 5 及び N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 1 2 以上である。
- [0100] 一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、m R S が 2 以上である。一実施形態では、本発明の作製方法で得られる動物モデルの運動機能障害の重症度は、m R S が 3 ～ 5 である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 4 以上である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 1 2 以上である。一実施形態では、本発明の非ヒト霊長類動物モデルの運動機能障害の重症度は、m R S が 3 ～ 5 及び N H P S S の運動系スコアにおいて、障害側のスコアが 1

2以上である。

[0101] 本発明の非ヒト霊長類動物モデルでは、m R Sのスコアは脳梗塞発症後2週間以降において比較的安定する。よって、運動機能障害の持続性の判断にm R Sを用いる場合、例えば、脳梗塞発症2週間後以降で任意に定めた期間にわたるm R Sのスコアに基づいて運動機能障害の持続性を判断してもよい。同様に、運動機能障害の持続性の判断にN H P S Sの運動系スコアを用いる場合、例えば、脳梗塞発症2週間後以降で任意に定めた期間にわたるN H P S Sの運動系スコアに基づいて運動機能障害の持続性を判断してもよい。

[0102] [表1]

スコア	m R S (ヒト臨床用)	m R S (サル用)
0	まったく症候がない	まったく症候がない
1	症候はあっても明らかな障害はない； 日常の勤めや活動は行える	障害側の前肢又は後肢の軽度麻痺 ¹
2	軽度の障害： 発症以前の活動がすべて行えるわけではないが、自分の身の回りのことは介助なしに行える	軽度自発運動低下 ³ 、又は障害側の前後肢（前肢及び後肢の両方）の軽度麻痺
3	中等度の障害： 何らかの介助を必要とするが、歩行は介助なしに行える	(i) 自発運動低下 ⁴ 、又は(ii) 座位姿勢（起立不全含む）、又は(iii) 障害側の前後肢の麻痺 ² 。意識レベル ⁵ の低下なし
4	中等度から重度の障害： 歩行や身体的要求には介助が必要である	(i) 自発運動低下及び(ii) 座位姿勢／横臥位姿勢 ⁶ （起立不全含む）、並びに(iii) 障害側の前後肢の麻痺若しくは意識レベルの軽度低下 ⁷
5	重度の障害： 寝たきり、失禁状態、常に介護と見守りを必要とする	横臥位姿勢（起立不全含む）、及び障害側の前後肢の麻痺、及び意識レベルの低下 ⁸
6	死亡	死亡

¹軽度麻痺：明らかな麻痺は認められないが、麻痺の症候がわずかに認められる場合。

²麻痺：明らかな麻痺が認められる場合。

³軽度自発運動低下：明らかな自発運動の低下は認められないが、自発運動低下の症候がわずかに認められる場合。

⁴自発運動低下：明らかな自発運動の低下が認められる場合。

⁵意識レベル（サル）：ヒトに対する反応性レベルに基づいて判断。

⁶座位姿勢／横臥位姿勢：座位姿勢又は横臥位姿勢の少なくとも一方。

⁷意識レベルの軽度低下：明らかな意識レベルの低下は認められないが、意識レベルの低下の症候がわずかに認められる場合。

⁸意識レベルの低下：明らかな意識レベルの低下が認められる場合。

[0103] [表2]

<NHPS S>	
A. 運動系 (Motor system)	
障害側及び非障害側のそれぞれの肢について、該当するスコア（括弧内）を選択し、1～4の合計スコアを算出する。	
1. 手（握れる／動く、障害側／非障害側）	・ 正常（0／0） ・ 握る力の低下／動作の不調和（2／2） ・ 麻痺、握ることができない（4／4）
2. 脚（握れる／動く、障害側／非障害側）	・ 正常（0／0） ・ 膝を曲げて持ち上げる（2／2） ・ 動かすことはできるが、持ち上げられない（4／4） ・ 麻痺、動かすことができない（6／6）
3. 上腕の筋緊張（障害側／非障害側）	・ 正常（0／0） ・ 明らかな筋の弛緩（痙攣性）（3／3）
4. 下肢の筋緊張（障害側／非障害側）	・ 正常（0／0） ・ 明らかな筋の弛緩（痙攣性）（3／3）
合計スコア（A）	
B. 意識障害 (Consciousness)	
該当するスコア（括弧内）を1つ選択する。	
・ 正常動物と同様、活発に行動（0） ・ 覚醒状態、攻撃的（4） ・ 覚醒状態、逃避可能（6） ・ 覚醒状態であるが反応が鈍い（8） ・ 傾眠（軽度）、刺激に対して反応（10） ・ 傾眠（重度）、強い刺激により開眼（16） ・ 知覚消失、持続的な刺激により反応（20） ・ 昏睡（軽度）、反射運動のみ（24） ・ 昏睡（重度）、動かない（28）	
合計スコア（B）	
C. 筋制御系 (Musculoskeletal coordination)	
該当するスコア（括弧内）を1つ選択する。	
・ 正常、歩行可能（0） ・ 運動失調（軽度）、歩行障害有り（4） ・ 運動失調、止まり木に登ることができない（6） ・ 自発的に立つことが可能、歩行困難（10） ・ 床で座位、刺激により回転運動をする（12） ・ 床で横臥位（16） ・ 動かない（18）	
合計スコア（C）	

D. 知覚系 (Sensory system)
障害側及び非障害側のそれぞれについて、該当するスコア (括弧内) を選択し、1～3の合計スコアを算出する。
1. 顔面の感覚 (障害側／非障害側) ・顔面への刺激に対して正常に反応 (0／0) ・顔面への刺激に対して正常に反応しない (3／3)
2. 耳介の反応 (障害側／非障害側) ・耳を引っ張ると反応する (0／0) ・耳を引っ張っても反応しない (3／3)
3. 痛覚反射 (下肢、障害側／非障害側) ・足指をつかむとすばやく引っ込める (0／0) ・足指をつかむとゆっくりと引っ込める (3／3) ・足指をつかんでも引っ込めない (5／5)
合計スコア (D)
合計スコア (評価した項目A～Dのスコアの合計)

[0104] 2. 脳梗塞治療剤のスクリーニング方法

本発明は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルを用いた、脳梗塞治療剤のスクリーニング方法 (以下、「本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法」とも称する) も提供する。より具体的には、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルに、被験物質を投与する工程、及び該非ヒト霊長類動物モデルにおける脳梗塞に対する該被験物質の効果を判定する工程を含む。

[0105] 一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、脳梗塞、好ましくは、亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、穿通枝梗塞 (例えば、大脳基底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、若しくは大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはBAD) 又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞 (例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、 i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障

害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はi v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝梗塞（例えば、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはi v) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはBAD) 又は亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がi) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はi v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の、穿通枝梗塞及び穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞以外の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。本発明のスクリーニング方法は、後述する本発明の治療方法等を適用する対象と同じ対象における脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法であってよい。

- [0106] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ヒトの亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝梗塞（例えば、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはi v) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはBAD) 又はヒトの亜急性期～慢性期（特には、慢性期）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がi) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核

・視床領域及び内包の脳障害、又はi v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) に対する脳梗塞治療剤の評価やスクリーニングに特に有用である。同様に、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、ヒトの亜急性期～慢性期（特に、慢性期）の、穿通枝梗塞以外の脳梗塞（即ち、心原性脳塞栓症、及びアテローム血栓性脳梗塞）に対する脳梗塞治療剤の評価やスクリーニングにも有用である。

[0107] 脳梗塞は、その発症部位によって、大脳皮質梗塞、脳幹梗塞、皮質下梗塞（例えば、穿通枝梗塞）、及び小脳梗塞に分類することができる。本明細書において、脳梗塞とは、大脳皮質梗塞、脳幹梗塞、皮質下梗塞（例えば、穿通枝梗塞）及び／又は小脳梗塞であってもよい。

[0108] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、重症度が高い脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニングにも用いることができる。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、m R Sが2以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、m R Sが3～5の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、N H P S Sの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが4以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、N H P S Sの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが12以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、m R Sが3～5及びN H P S Sの運動系スコアにおいて、障害側のスコアが12以上の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。

[0109] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニングにも用いることができる。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一

実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、亜急性期～慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。一実施形態では、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤のスクリーニング方法である。

[0110] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法において、本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与する被験物質は、核酸（DNA又はRNA（例えば、メッセンジャーRNA（messenger RNA；mRNA）、small interfering RNA（siRNA）、short hairpin RNA（shRNA）、microRNA（miRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド等））であってよい。核酸は、天然核酸又は人工核酸（例えば、天然の核酸塩基及び／又は人工の核酸塩基を含む核酸）であってもよい。さらに、被験物質は、ペプチド、タンパク質、細胞、低分子化合物、中分子化合物をはじめとする任意の物質であってよく、例えば、神経再生活性のある物質、各種転写因子、各種神経栄養因子、神経細胞成長因子、神経細胞成長促進物質、ダイレクトリプログラミング因子、神経幹細胞、神経細胞、間葉系幹細胞等が挙げられる。本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法において、被験物質を投与する手段としては、以下に限定されないが、例えば、被験物質の経口投与、注射（静脈内注射、皮下注射、筋肉注射等）、脳障害部位（例えば、障害巣）への直接投与、移植等が挙げられる。被験物質は、本発明の非ヒト霊長類動物モデルに対し、任意の時期に投与することができるが、亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤をスクリーニングする目的では、亜急性期～慢性期（例えば、脳梗塞発症の3週間後）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに被験物質を投与することが好ましい。同様に、慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤をスクリーニングする目的では、慢性期（例えば、脳梗塞発症の2週間後又は3週間後）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに被験物質を投与することが好ましい。

[0111] 本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法は、本発明の非ヒト霊長類動

物モデルに投与された被験物質の効果を判定する工程を含む。本発明の非ヒト霊長類動物モデルの脳梗塞に対する、投与された被験物質の効果の判定は、例えば、動物モデル個体における移動能力、回転運動能力、座位の保持、起立行動、跳躍運動能力、ものを取ろうとする能力、餌を取る能力、ものを握る能力等の運動機能の観察、CT、若しくはMRIによる診断、筋電図、又はNHPS及び／若しくはmRSに基づく評価等を行い、被験物質の投与前と比較した改善の有無を決定することにより、実施することができる。被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質を、脳梗塞治療剤として同定することができる。また、亜急性期～慢性期の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤として同定することができる。穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はBAD）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はBAD）の脳梗塞治療剤として同定することができる。亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はBAD）の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はBAD）の脳梗塞治療剤として同定することができる。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の本発明の非ヒト霊長類動物モデルに投与した結果、被験物質の投与前と比較した改善有りと判定された被験物質は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞に対する脳梗塞治療剤として同定することができる。

[0112] 3. 医薬組成物及び治療方法等

本発明は、本発明の脳梗塞治療剤のスクリーニング方法により同定された脳梗塞治療剤、又は、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞、若しくは亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する脳梗塞治療剤を含む、脳梗塞治療用の医薬組成物（脳梗塞の治療に用いるための医薬組成物）を提供する

。本発明は、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞治療用、又は慢性期の穿通枝梗塞治療用）の医薬組成物、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用（例えば、慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、局所的な脳障害を有する脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、mRSが2以上の脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物、NIHSSが5以上の脳梗塞治療用（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、又は慢性期の脳梗塞治療用）の医薬組成物も提供する。後段で詳細に記述するが、本明細書において、「NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド」とは、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを意味する。本明細書において「NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列」とは、NeuroD1タンパク質へと翻訳可能な塩基配列を意味する。なお「NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列」は、例えば、NeuroD1タンパク質をコードするCDS（Coding sequence；開始コドンから終止コドンまでの配列（開始コドンと終止コドンを含む））であってよい。典型的な実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、NeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードする。本発明において「発現可能な状態でコードする」とは、mRNAへの転写又はmRNAの翻訳を可能にする又は促進する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、コザック配列、転写応答配列、ターミネーター、ポリA配列付加シグナル、mRNAの5'末端のキャップ構造、mRNAの3'末端のポリA配列等）の制御下にNeuroD1タンパク質をコードする塩基配列が機能可能な状態で（例えば、イン・フレームで）配置されていることを意味する。本明細書において、例えば、NeuroD1タンパク質又はNeuroD

1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む穿通枝梗塞治療用、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用、局所的な脳障害を有する脳梗塞治療用、mRSが2以上の脳梗塞治療用又はNIHSSが5以上の脳梗塞治療用の医薬組成物を、「本発明の医薬組成物」とも称する。さらに、本発明は、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて医薬組成物を製造することを含む、穿通枝梗塞治療用の医薬組成物、亜急性期～慢性期の脳梗塞治療用の医薬組成物、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞治療用の医薬組成物、局所的な脳障害を有する脳梗塞治療用の医薬組成物、mRSが2以上の脳梗塞治療用の医薬組成物及び／又はNIHSSが5以上の脳梗塞治療用の医薬組成物の製造方法を提供する。

[0113] 「NeuroD1」(Neuronal differentiation 1) は、NeuroDファミリーに属する塩基性ヘリックスループヘリックス(basic helix-loop-helix; bHLH) 転写因子である。NeuroD1タンパク質はE-boxとして知られる特異的なDNA配列を含む遺伝子の転写を活性化する。すなわちNeuroD1タンパク質は転写因子活性を有する。NeuroD1は神経幹細胞から神経細胞への分化を誘導する中心的な機能をもつ。アストロサイトやNG2細胞等のグリア細胞においてNeuroD1を異所発現することで、グリア細胞を神経に変換できることが知られている(特許文献2)。グリア細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、上衣細胞、ミクログリアの4種類の細胞に分類される。

[0114] NeuroD1タンパク質は、以下の(i)又は(ii)のタンパク質であってよい：

(i) 配列番号6又は8に示すアミノ酸配列、又は配列番号6又は8に示すアミノ酸配列に対して90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、例えば、99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質、

(i i) 配列番号 6 又は 8 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 5 0 個（例えば、1 ～ 2 個、1 ～ 3 個、1 ～ 5 個、1 ～ 7 個、1 ～ 1 0 個、又は 1 ～ 3 5 個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[0115] 本発明の医薬組成物に用いられる NeuroD1 タンパク質は、好ましくは転写因子活性を有する。なお、配列番号 6 又は 8 はそれぞれマウス NeuroD1 タンパク質又はヒト NeuroD1 タンパク質のアミノ酸配列であり、それぞれマウス NeuroD1 遺伝子の CDS 又はヒト NeuroD1 遺伝子の CDS によってコードされるポリペプチド配列である。

[0116] 一実施形態では、NeuroD1 はヒト NeuroD1 である。ヒト NeuroD1 タンパク質は、以下の (i) 又は (i i) のタンパク質である：

(i) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 8 に示すアミノ酸配列に対して 9 8 % 以上、好ましくは 9 9 % 以上、より好ましくは 9 9 . 4 % 以上又は 9 9 . 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質、

(i i) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 1 0 個（例えば、1 ～ 2 個、1 ～ 3 個、1 ～ 5 個、又は 1 ～ 7 個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質。

[0117] 一実施形態では、NeuroD1 はマウス NeuroD1 である。マウス NeuroD1 タンパク質は、以下の (i) 又は (i i) のタンパク質である：

(i) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 6 に示すアミノ酸配列に対して 9 8 % 以上、好ましくは 9 9 % 以上、より好ましくは 9 9 . 4 % 以上又は 9 9 . 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質、

(i i) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 1 0 個（例えば、1 ～ 2 個、1 ～ 3 個、1 ～ 5 個、又は 1 ～ 7 個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換

、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質。

[0118] あるタンパク質が転写因子活性を有するか否かは、当業者であれば、例えば、任意のプロモーターを有するベクターに、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドを組み込んだ組換えベクターを作製し、該ベクターを細胞に導入し、当該タンパク質を発現させて、当該タンパク質が転写因子として機能することによって発現（転写）が調節される遺伝子（本明細書において、制御下遺伝子とも称する）の発現量を測定し、当該ベクターを導入しない細胞と比較して当該制御下遺伝子遺伝子の発現量が変化（増大又は減少）しているか否かを評価することによって容易に判断し得る。例えば、NeuroD1をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを導入した細胞において、NeuroD1が転写因子として機能することによって発現が亢進することが知られている制御下遺伝子の発現量が増大している場合、NeuroD1タンパク質は転写因子活性を有すると判断できる。

[0119] 本発明の医薬組成物に含まれるNeuroD1タンパク質は、目的とする細胞にタンパク質を送達される限りは、どのような薬物送達システム（DDS）に内封されていてもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質を含み、かつ、該タンパク質がDDS中に内封されている。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質を含み、且つ、該タンパク質が薬物送達キャリア中に封入されたものであってよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質を含み、且つ、該タンパク質が脂質ナノ粒子、エクソソームなどのナノ粒子に封入されたものであってよいが、それに限定されない。

[0120] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の（i）～（iv）からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

（i）配列番号6若しくは8に示すアミノ酸配列、又は配列番号6若しくは8に示すアミノ酸配列に対して90%以上、好ましくは95%以上、より好

ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、例えば、99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(ii) 配列番号6又は8に示すアミノ酸配列において1~50個(例えば、1~2個、1~3個、1~5個、1~7個、1~10個、又は1~35個)のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び/又は付加を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(iii) 配列番号5、7若しくは10に示す塩基配列を含むか、又は配列番号5、7若しくは10に示す塩基配列に対して90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、例えば、99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

(iv) 配列番号5、7又は10に示す塩基配列において1~50個(例えば、1~2個、1~3個、1~5個、1~7個、1~10個、又は1~35個)の塩基の挿入、欠失、置換、及び/又は付加を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0121] これらのポリヌクレオチドによってコードされるNeuroD1タンパク質は、好ましくは転写因子活性を有する。なお、配列番号5に示す塩基配列は、マウスNeuroD1遺伝子のCDSであり、配列番号7又は10に示す塩基配列は、ヒトNeuroD1遺伝子のCDSである。配列番号10に示す塩基配列は、配列番号7に示す塩基配列と終止コドンのみが異なる塩基配列である。

[0122] 一実施形態では、ヒトNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の(i)~(iv)からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

(i) 配列番号8に示すアミノ酸配列、又は配列番号8に示すアミノ酸配列に対して98%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転

写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(i i) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 1 0 個（例えば、 1 ～ 2 個、 1 ～ 3 個、 1 ～ 5 個、又は 1 ～ 7 個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(i i i) 配列番号 7 若しくは 1 0 に示す塩基配列を含むか、又は配列番号 7 若しくは 1 0 に示す塩基配列に対して 9 8 % 以上、好ましくは 9 9 % 以上、より好ましくは 9 9 . 4 % 以上又は 9 9 . 5 % 以上の配列同一性を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

(i v) 配列番号 7 又は 1 0 に示す塩基配列において 1 ～ 1 0 個（例えば、 1 ～ 2 個、 1 ～ 3 個、 1 ～ 5 個、又は 1 ～ 7 個）の塩基の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0123] 一実施形態では、マウス *NeuroD1* タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の (i) ～ (i v) からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

(i) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列、又は配列番号 6 に示すアミノ酸配列に対して 9 8 % 以上、好ましくは 9 9 % 以上、より好ましくは 9 9 . 4 % 以上又は 9 9 . 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(i i) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列において 1 ～ 1 0 個（例えば、 1 ～ 2 個、 1 ～ 3 個、 1 ～ 5 個、又は 1 ～ 7 個）のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(i i i) 配列番号 5 に示す塩基配列を含むか、又は配列番号 5 に示す塩基

配列に対して98%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

(iv) 配列番号5に示す塩基配列において1~10個(例えば、1~2個、1~3個、1~5個、又は1~7個)の塩基の挿入、欠失、置換、及び/又は付加を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0124] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、NeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。コドン最適化は、当該分野で公知の方法を使用することができる。

[0125] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下の(i)~(iii)からなる群から選択されるポリヌクレオチドである：

(i) 配列番号10に示す塩基配列に対して60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上又は95%以上の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(ii) 配列番号7に示す塩基配列に対して60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上又は95%以上の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び

(iii) 配列番号5に示す塩基配列に対して60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上又は95%以上の配列同一性を有し、かつ配列番号6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[0126] 本明細書において、「配列同一性」とは、基準とする生物学的配列(塩基配列又はアミノ酸配列等)と目的の生物学的配列とをアラインメントしたと

きに、配列間で一致する残基の割合(%) (通常は、目的の配列の全長に対する一致する残基の割合%)を意味する。「配列同一性」は、例えば、EMBOS Needle (Weizhong L et al., Nucleic Acids Res., vol. 43, pp. W580-W584, 2015)を用いて、デフォルトで用意されているパラメータによって得られた同一性(identity)の値として算出できる。前記のパラメータは以下のとおりである。

Gap Open Penalty = 10

Gap Extend Penalty = 0.5

Matrix = EBLOSUM62

End Gap Penalty = false

[0127] 本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、本発明の医薬組成物は以下の(i)～(xiii)からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む：

(i) 配列番号6若しくは8に示すアミノ酸配列に対して98%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(ii) 配列番号6若しくは8に示すアミノ酸配列において1～10個(例えば、1～2個、1～3個、1～5個、又は1～7個)のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなり、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(iii) 配列番号6又は8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(iv) 配列番号5、7若しくは10に示す塩基配列を含むか、又は配列番号5、7若しくは10に示す塩基配列に対して98%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を

有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

(v) 配列番号 5, 7 又は 10 に示す塩基配列において 1 ~ 10 個 (例えば、1 ~ 2 個、1 ~ 3 個、1 ~ 5 個、又は 1 ~ 7 個) の塩基の挿入、欠失、置換、及び/又は付加を有し、かつ転写因子活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

(v i) 配列番号 7 又は 10 に示す塩基配列に対して 70 % 以上の配列同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(v i i) 配列番号 7 又は 10 に示す塩基配列に対して 70 % 以上の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(v i i i) 配列番号 7 に示す塩基配列に対して 70 % 以上の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(i x) 配列番号 10 に示す塩基配列に対して 70 % 以上の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(x) 配列番号 7 又は 10 に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(x i) 配列番号 7 に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(x i i) 配列番号 10 に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド、並びに

(x i i i) 配列番号 11 又は 13 の 44 位 ~ 1114 位の塩基配列、44 位 ~ 1120 位の塩基配列、若しくは 1 位 ~ 1231 位の塩基配列に対して 70 % 以上 (例えば、80 % 以上、90 % 以上、又は 95 % 以上) の配列同一性を有する塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、好ましくは配列番号 8 に示すアミノ酸配列に対して 90 % 以上 (例えば、95 % 以上) の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質 (好ましくは、転写因子活性を有するタンパク質) をコードするポリヌクレオチド。

[0128] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、NeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドは、以下に限定するものではないが、DNA、若しくはmRNA等のRNAであってよいし、又はそれらの組み合わせ（キメラ核酸）であってよい。また、ポリヌクレオチドは、天然核酸又は人工核酸（例えば、天然の核酸塩基及び／又は人工の核酸塩基を含む核酸）であってよい。

[0129] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターに含まれていてもよい。本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、mRNAへの転写又はmRNAの翻訳を可能にする又は促進する配列の制御下にNeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド（例えば、DNA又はRNA）を機能可能な状態で含んでおり、すなわち、当該発現ベクターはNeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドを含んでいる。本発明において、mRNAへの転写又はmRNAの翻訳を可能にする又は促進する配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、コザック配列、転写応答配列、ターミネーター、ポリA配列付加シグナル、mRNAの5'末端のキャップ構造、mRNAの3'末端のポリA配列等）は、治療対象の生体内で機能可能なものであれば特に限定されない。プロモーターは、使用目的に合わせて、構成的プロモーター、細胞特異的プロモーター、組織特異的プロモーター、一過性プロモーター、又は誘導性プロモーター等の任意のプロモーターであってよい。例えば、ヒト生体内で機能し得るプロモーターとして、ヒトGFAPプロモーター、CMVプロモーター、EF-1 α プロモーター、PGKプロモーター、MSCVプロモーター等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ヒトGFAPプロモーターは配列番号14に示す塩基配列を含むものであってよい。アストロサイトへのNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達のためには、GFAPプロモーターを用いることが特に好ましい。

- [0130] 本発明において、発現ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター等の任意のベクターであってよい。本発明において用いる発現ベクターは、以下に限定するものではないが、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターであってよく、AAVベクターであることが特に好ましい。発現ベクターがウイルスベクターである場合、発現ベクターは、mRNAの転写又は翻訳を可能にする又は促進する配列 (プロモーター等) の制御下に *NeuroD1* タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、ウイルス粒子にパッケージングされた核酸ベクターとして含むものであってよい。
- [0131] 本発明では、宿主細胞において *NeuroD1* が発現され得る限り、AAVベクターの血清型は特に限定されず、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10等を使用することができる。一実施形態では、AAVの血清型はAAV9であってよい。
- [0132] 発現ベクターは、当該分野で公知の方法を使用して製造することができる。AAVベクターの製造方法の一例としては、市販のベクタープラスミド (例えば、pAAV-CMV Vector (タカラバイオ社)) に、任意のプロモーター配列 (例えば、ヒトGFAPプロモーター配列) 及び任意の核酸分子配列 (例えば、*NeuroD1* タンパク質をコードする塩基配列) を挿入したAAVベクタープラスミドを作製する。また、AAVヘルパー機能を補完するAAVのRep遺伝子及びCap遺伝子を含むプラスミド、及び、AAVの複製を促進するヘルパーウイルス付属遺伝子 (例えば、領域VA、E2A、E4) を含むプラスミドを準備する。これらの3つのプラスミドをパッケージング細胞にコトランスフェクトすることで該細胞内に組換えAAV (即ち、AAVベクター) が産生される。その後、パッケージング細胞を培養して、AAVベクターを生成し、当該分野において公知の標準的技術

を使用して、AAVベクターを精製する。使用されるパッケージング細胞の例としては、哺乳動物細胞、具体的には、293T細胞、A549細胞、HeLa細胞、HEK293細胞が挙げられるが、これらに限定されない。精製方法としては、塩化セシウム密度勾配遠心分離法、ベンゾナーゼを用いたDNA及びRNAの消化、ショ糖勾配遠心分離法、イオジキサノール（Iodixanol）密度勾配遠心分離法、限外ろ過法、ダイアフィルトレーション法、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ポリエチレングリコール沈殿法や硫酸アンモニウム沈殿法等を用いることができる。

[0133] 一実施形態において、本発明の医薬組成物はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むAAVベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターを含む。一実施形態において、本発明の医薬組成物はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むAAVベクターを含む。一実施形態において、本発明の医薬組成物はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むAAV9ベクターを含む。

[0134] 「mRNA」は、（少なくとも1つの）ポリペプチド（例えば、天然に存在するポリペプチド、天然に存在するポリペプチドに対してアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチド、又は天然には存在しないポリペプチド）をコードする塩基配列を、mRNAの翻訳を可能にする又は促進する配列（例えば、コザック配列、開始コドン、mRNAの5'末端のキャップ構造、5'非翻訳領域（untranslated region; UTR）、3'UTR、mRNAの3'末端のポリA配列等）の制御下に含むRNAを指す。mRNAは、翻訳されて、コードされたポリペプチドを、例えば、インビトロで、又はインビボで産生し得る。一実施形態では、mRNAはインビボで翻訳されて、コードされたポリペプチドを産生し得る。

[0135] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチ

ドは、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAであってもよい。本発明において、「NeuroD1タンパク質をコードするmRNA」は、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、mRNAの翻訳を可能にする又は促進する配列の制御下に含むRNAを意味する。本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、典型的には、mRNAの翻訳を可能にする又は促進する配列の制御下にNeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを機能可能な状態で含み、すなわち、NeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードするポリヌクレオチドを含んでいる。一実施形態では、本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、NeuroD1タンパク質を発現させるための機能性配列（例えばCDS、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、及びポリA配列が含まれるがこれに限らない）を含むNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

[0136] 本明細書に記載のポリヌクレオチドは、代表的なDNA配列として「T」を含む塩基配列で特定されたポリヌクレオチドで記載されることがあるが、当該ポリヌクレオチドがRNA（例えば、mRNA）である場合、「T」は、「U」で置き換えられる。したがって、例えば、特定の配列番号によって特定される塩基配列を含むRNA（例えば、mRNA）において、当該特定の配列番号によって特定される塩基配列がDNA配列を表している場合は、当該塩基配列は、DNA配列の各「T」を「U」で置き換えたRNA配列として理解される。塩基配列（例えば、配列番号1～3、5、7、10～14に示す塩基配列）を構成する塩基「アデニン（A）」、「チミン（T）」、「グアニン（G）」、「シトシン（C）」、及び「ウラシル（U）」、並びにそれらを含むヌクレオシド及びヌクレオチドは、配列表において特に記載がない場合、個々の塩基、ヌクレオシド及びヌクレオチド毎に、天然型又はそれに対応する修飾型であってよく、及び／又は他の修飾（メチル化など）を有していてもよい。

[0137] mRNAには、CDS、5' UTR、3' UTR、5' キャップ構造、及びポリA配列が含まれ得る。NeuroD1タンパク質をコードするmRNAに含まれるCDSは、コドン最適化されていてもよい。CDSの3'末端に位置する終止コドンは、mRNAからNeuroD1タンパク質への翻訳を停止できる限り特に限定されず、TAA、TGA、TAGのいずれの終止コドンを用いてもよい。また、CDSに含まれる終止コドンに連続して、さらに複数の終止コドンを用いてもよい（例えば、CDSに含まれる終止コドンTAAに連続してTGATAGを用いてもよい）。NeuroD1タンパク質をコードするmRNAに含まれるUTRは、NeuroD1タンパク質が発現可能な限りにおいて、特に限定されないが、例えば、NeuroD1遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRであってもよく、異種遺伝子（例えば、ヒト α グロビン遺伝子やヒト β グロビン遺伝子等）由来の5' UTR及び／又は3' UTRであってもよい。5' UTR及び3' UTRは、同一の異種遺伝子由来であってもよく、それぞれが異なる異種遺伝子由来であってもよい。UTRは、天然型であってもよいし、天然型UTRに対して1個又は数個（例えば、2、3、4、5、又は6個）のヌクレオチドの挿入、欠失、置換、及び／又は付加によって配列が変更された改変型であってもよい。本明細書における「遺伝子由来のUTR」には、天然型UTRだけでなく、このような改変型UTRも含まれる。5' UTR及び／又は3' UTRは、複数のUTRが直接又はスペーサー配列をはさんで連なっているもよい。5' UTRは、コザック配列の一部（例えば、コザック配列中の開始コドンより5'側の配列）を含んでもよい。5' キャップ構造としては、例えば、Cap-0、Cap-1、Cap-2等が挙げられる（Anand R et al., Nucleic Acids Res., vol. 44(16), pp. 7511-7526, 2016）。Cap-0は、mRNAの5'末端に三リン酸結合を介してグアノシンが結合（5'-5'結合）し、かつグアノシンのグアニン塩基の7位がメチル化された構造であり、7-メチルグアニル酸キャップとも呼ばれる。Cap-1は、Cap-0に

加えて、mRNAの5'末端の1番目のヌクレオチド(Cap-0のグアノシンが5'-5'結合したヌクレオチド)のリボースの2位がメチル化されている構造であり、Cap-2は、Cap-0に加えて、mRNAの5'末端から1番目及び2番目のヌクレオチドのリボースの2位がメチル化されている構造である。ポリA配列の長さは、mRNAの安定化、核外輸送、翻訳等への機能を有する限りにおいて、特に限定されないが、例えば20~1000ヌクレオチド(例えば、30~500、50~200、60~150、70~130、70~120、70~90、70~85、70~80、75~85、少なくとも70、少なくとも75、又は79ヌクレオチド)であってもよい。ポリA配列は、複数のポリAがA以外のヌクレオチドからなるスペーサー配列をはさんで連なっているてもよい(国際公開WO2016/05004等)。

[0138] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、以下の(i)又は(ii)のmRNAである：

(i) 配列番号6若しくは8に示すアミノ酸配列、又は配列番号6若しくは8に示すアミノ酸配列に対して90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、例えば、99.4%以上又は99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNA；又は

(ii) 配列番号6又は8に示すアミノ酸配列において1~50個(例えば、1~2個、1~3個、1~5個、1~7個、1~10個、又は1~35個)のアミノ酸の挿入、欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNA。当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質(NeuroD1タンパク質)は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。

[0139] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードす

る mRNA は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して 90%以上（例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上、又は 99.5%以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む mRNA である。当該 mRNA によりコードされる NeuroD1 タンパク質は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。

[0140] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 7 又は 10 に示す塩基配列に対して 70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は 95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 7 又は 10 に示す塩基配列に対して 70%以上（例えば、80%以上、90%以上、95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して 90%以上（例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上、又は 99.5%以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 10 に示す塩基配列に対して 70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は 95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 10 に示す塩基配列に対して 70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は 95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して 90%以上（例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上、又は 99.5%以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 10 に示す塩基配列を含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 7 に示す塩基配列に対して 7

0%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号7に示す塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して90%以上（例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上、又は99.5%以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号7に示す塩基配列を含むmRNAである。当該mRNAによりコードされるNeuroD1タンパク質は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。

[0141] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質に対して90%以上（例えば、95%以上、98%以上、99%以上、99.4%以上、又は99.5%以上）の配列同一性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むmRNAである。当該タンパク質は、転写因子活性を有するものであることが好ましい。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位に示す塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含むmRNAである。配列番号11又は13の44位～1114位の塩基配列は、ヒトNeuroD1遺伝子のCDSであり、配

列番号11又は13の44位～1120位の塩基配列は、ヒトNeuroD1遺伝子のCDS及び複数の終止コドンを含む。

[0142] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5' UTR及び／又は3' UTRを含む。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、異種遺伝子（例えば、ヒト α グロビン遺伝子やヒト β グロビン遺伝子等）由来の5' UTR及び／又は3' UTRを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～43位の塩基配列からなる5' UTR及び／又は配列番号11又は13の1121位～1231位の塩基配列からなる3' UTRを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列に対して70

%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNAである。

[0143] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、ポリA配列を含む。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、50～200ヌクレオチドからなるポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、70～90ヌクレオチドからなるポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、75～85ヌクレオチドからなるポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、120ヌクレオチドからなるポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、79ヌクレオチドからなるポリA配列を含むmRNAである。

[0144] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、ポリA配列の長さが、30～500ヌクレオチド（例えば、40～200、50～200、50～150、50～100、50～90、60～150、60～100、60～90、70～130、70～120、70～100、70～90、70～85、70～80、75～130、75～120、75～100、75～90、好ましくは74～84、75～85、75～83、又は76～82ヌクレオチド）である。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、ポリA配列の長さが、74～84ヌクレオチドである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、ポリA配列の長さが、75～85ヌクレオチドである。

[0145] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含む。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号

11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAである。

[0146] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～43位の塩基配列からなる5' UTR及び／又は配列番号11又は13の1121位～1231位の塩基配列からなる3' UTR並びにポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするm

RNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAである。

[0147] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号7又は10に示す塩基配列を含むmRNAであって、配列番号11又は13の4位～43位の塩基配列からなる5' UTR及び／又は配列番号11又は13の1121位～1231位の塩基配列からなる3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAである。

[0148] mRNAは、当該分野で公知の方法を使用して製造することができる。mRNAの製造方法の一例としては、市販のプラスミド（例えば、大腸菌用のhigh copyプラスミド（例えば、pUC18やpCU18等））に、任意のUTR（例えば、ヒト α グロビンの5' UTR及び3' UTR）及び任意の核酸分子の塩基配列（例えば、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列）を挿入したプラスミドを作製する。作製したプラスミドは、例えば、大腸菌を用いて増幅させ、当該分野で公知の方法を用いて精製され得る。精製したプラスミドは、例えば、制限酵素及び緩衝液を用いた方法等であるが、これらに限定されない当該分野で公知の方法を用いて線形化され得る。線形化反応物は、例えば、PureLink（登録商標）（Thermo Fisher Scientific）を用いた方法により精製され得る。精製方法は、線形化反応物の大きさに応じて変更され得る。精製した

線形反応物はそのまDNA鋳型としてもよく、又は線形反応物にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に供することによってDNA鋳型を生成してもよい。生成されたDNA鋳型は、インビトロ転写（*in vitro transcription*；IVT）系を用いて転写され得る。この系は、典型的には、転写緩衝液、ヌクレオシド三リン酸（NTP）、RNase阻害剤、及びポリメラーゼ（例えば、T7 RNAポリメラーゼ）を含む。本発明において、NTPは、天然型であっても非天然型（修飾型）であってもよい。DNA鋳型は、デオキシリボヌクレアーゼI（DNase I）での処理等であってもよいが、これに限定されない当技術分野で公知の方法を用いて除去され得る。転写されたRNAの精製には、例えばシリカカラム等を用いてもよい。RNAがポリA配列を含む場合は、例えば、Oligo dTカラムを用いて精製してもよい。mRNAは、キャッピング反応及び／又はポリA付加反応を経て作製してもよい。キャッピング反応は、IVTによって転写された配列の5'末端に5'キャップ構造を付加する又はIVTの際に5'末端に5'キャップ構造を付加する当技術分野で既知の方法を用いて行われ得る。キャッピングのための方法には、ワクシニアキャッピング酵素及び2'-O-メチルトランスフェラーゼを用いた方法やCleanCap（登録商標）（TriLink BioTechnologies社）を用いた方法等であってもよいが、これらに限定されない当該分野で公知の方法を用いて行われ得る。IVTによって転写された配列がポリA配列を含まない場合、ポリA付加反応を行ってもよい。構築されたmRNAは、当該分野で公知の方法を用いて精製され得る。

[0149] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、キャップ構造を有してもよく、キャッピングの方法に適した5'末端配列を含んでもよい。例えば、CleanCap（登録商標）Reagent AG（TriLink BioTechnologies社）を用いたキャッピングの方法を用いる場合、5'末端に塩基配列AGGを含んでもよい。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側か

ら、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列（AGG）、5' UTR、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列（AGG）、5' UTR、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列（AGG）、5' UTR、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列、3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。

[0150] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列（AGG）、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、ヒト α グロビン遺伝子由来の3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列（AGG）、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、ヒト α グロビン遺伝子由来の3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列（AGG）、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩

基配列、ヒト α グロビン遺伝子由来の3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列(AGG)、配列番号11又は13の4位～43位の塩基配列からなる5' UTR、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列、配列番号11又は13の1121位～1231位の塩基配列からなる3' UTR、及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列を含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'側から、配列番号11又は13の1位～3位の塩基配列(AGG)、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上(例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上)の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAである。

[0151] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13に示す塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるmRNAである。

[0152] 本発明において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、修飾されたmRNAであってもよい。例えば、mRNAの製造に修飾型NTPを用いることで、修飾されたmRNAを製造することができる。修飾されたmRNAは、ヌクレオチドの核酸塩基上、糖部分上、及び／又はリン酸上に位置する修飾(例えば、化学修飾)を有し得る。修飾されたmRNAは、例えば、修飾ヌクレオシドを含む。「修飾ヌクレオシド」とは、修飾されたヌクレオシドである。例えばメチル化、原子交換、二重結合の飽和、脱アミノ化、又は酸素原子等が硫黄原子に置換されるなどの修飾を受けたヌクレオシドである。修飾ヌクレオシドは、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン(1-メチルシュードウリジンとも称される)、5-メチルシチジン

、7-メチルグアノシン、N6-メチルアデノシン、1-メチルアデノシン、ジヒドロウリジン、イノシン、4-チオウリジン等であってよいがこれらに限定されない。「一部又は全ての」特定の種類のヌクレオシドが修飾ヌクレオシドに置換されたポリヌクレオチドは、元のポリヌクレオチド配列（具体的には、NeuroD1タンパク質をコードするmRNA）中に含まれる当該種類のヌクレオシドのうちの一部が修飾ヌクレオシドに置換されており他は修飾ヌクレオシドに置換されていないポリヌクレオチド、及び、元のポリヌクレオチド配列中に含まれる当該種類のヌクレオシドの全てが修飾ヌクレオシドに置換されたポリヌクレオチドを包含する。修飾ヌクレオシドを含むポリヌクレオチドの配列において特定の種類のヌクレオシドが修飾ヌクレオシドに置換されている割合に関する「一部」は、1個又はそれ以上のヌクレオシドを包含し、特定の種類のヌクレオシドの全残基数に対する置換割合として、例えば、60～99%、70～99%、80～99%、90～99%、95～99%、60～99.9%、70～99.9%、80～99.9%、90～99.9%、又は95～99.9%であってよいが、これらに限定されない。一実施形態において、本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、修飾ヌクレオシドを含んでもよい。一実施形態において、本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、N1-メチルシュードウリジンを含んでもよい。一実施形態において、本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAにおいては、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されていてもよい。一実施形態において、本発明における、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されていてもよい。

[0153] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパ

ク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列に対して 70% 以上（例えば、80% 以上、90% 以上、又は 95% 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列を含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含む mRNA である。

[0154] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列に対して 70% 以上（例えば、80% 以上、90% 以上、又は 95% 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列を含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA である。

[0155] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR 及び／又は 3' UTR をさらに含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA

は、配列番号 11 又は 13 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列に対して 70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は 95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR 及び／又は 3' UTR をさらに含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含む mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列を含み、5' UTR 及び／又は 3' UTR をさらに含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含む mRNA である。

[0156] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR 及び／又は 3' UTR をさらに含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列に対して 70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は 95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR 及び／又は 3' UTR をさらに含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の塩基配列を含み、5' UTR 及び／又は 3' UTR をさらに含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA である。

[0157] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含

み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。

[0158] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、5' UTR及び／又は3'

’ U T R並びにポリ A 配列をさらに含む m R N A であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N 1 -メチルシュードウリジンに置換されている m R N A である。

[0159] 一実施形態では、N e u r o D 1 タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の 5’ U T R 及び／又は 3’ U T R をさらに含む m R N A であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N 1 -メチルシュードウリジンを含む m R N A である。一実施形態では、N e u r o D 1 タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 1 1 又は 1 3 の 4 4 位～1 1 1 4 位又は 4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列に対して 7 0 % 以上（例えば、8 0 % 以上、9 0 % 以上、又は 9 5 % 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の 5’ U T R 及び／又は 3’ U T R をさらに含む m R N A であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N 1 -メチルシュードウリジンを含む m R N A である。一実施形態では、N e u r o D 1 タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 1 1 の 4 4 位～1 1 1 4 位又は 4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の 5’ U T R 及び／又は 3’ U T R をさらに含む m R N A であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N 1 -メチルシュードウリジンを含む m R N A である。

[0160] 一実施形態では、N e u r o D 1 タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の 5’ U T R 及び／又は 3’ U T R をさらに含む m R N A であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N 1 -メチルシュードウリジンに置換されている m R N A である。一実施形態では、N e u r o D 1 タンパク質をコードする m R N A は、配列番号 1 1 又は 1 3 の 4 4 位～1 1 1 4 位又は 4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列に対して 7 0 % 以上（例えば、8 0 % 以上、9 0 % 以上、又は 9 5 % 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする

塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。

[0161] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。

[0162] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。

リA配列をさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の44位～1114位又は44位～1120位の塩基配列を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。

- [0163] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、修飾ヌクレオシドを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているNeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、例えば、配列番号13に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドであってよい。

[0164] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAであって、修飾ヌクレオシドを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11又は13の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAであって、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAであって、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11の4位～1231位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリA配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンであるmRNAである。

[0165] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'キャップ構造（例えば、Cap-0、Cap-1、又はCap-2）を有する。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAに含まれる5'キャップ構造は、Cap-1である。

[0166] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例

例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含むmRNAであって、5'キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5'UTR及び／又は3'UTRをさらに含むmRNAであって、5'キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5'UTR及び／又は3'UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、5'キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5'UTR及び／又は3'UTRをさらに含むmRNAであって、5'キャップ構造を有する

mRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、5' キャップ構造を有するmRNAである。

[0167] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列、又は、配列番号11若しくは13の44位～1114位若しくは44位～1120位の塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号11若しくは13の44位～

1 1 1 4 位若しくは4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列、又は、配列番号1 1 若しくは1 3 の4 4 位～1 1 1 4 位若しくは4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列に対して7 0 %以上（例えば、8 0 %以上、9 0 %以上、又は9 5 %以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号1 1 若しくは1 3 の4 4 位～1 1 1 4 位若しくは4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列、又は、配列番号1 1 若しくは1 3 の4 4 位～1 1 1 4 位若しくは4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列に対して7 0 %以上（例えば、8 0 %以上、9 0 %以上、又は9 5 %以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTRをさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列（例えば、配列番号1 1 若しくは1 3 の4 4 位～1 1 1 4 位若しくは4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列、又は、配列番号1 1 若しくは1 3 の4 4 位～1 1 1 4 位若しくは4 4 位～1 1 2 0 位の塩基配列に対して7 0 %以上（例えば、8 0 %以上、9 0 %以上、又は9 5 %以上）の配列同一性を有する塩基配列）を含み、ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR及び／又は3' UTR並びにポリA配列をさらに含むmRNAであって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造を有するmRNAである。

[0168] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号1 1 又は1 3 の1 位～1 2 3 1 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列を含むmRNAであって、5' キャップ構造としてCap

ー 1 を有する mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 4 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 4 位～1231 位の塩基配列に対して 70% 以上（例えば、80% 以上、90% 以上、又は 95% 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリ A 配列を含む mRNA であって、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。

[0169] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 4 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 4 位～1231 位の塩基配列に対して 70% 以上（例えば、80% 以上、90% 以上、又は 95% 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリ A 配列を含む mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含み、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。

[0170] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチ

ド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されており、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 4 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されており、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 又は 13 の 4 位～1231 位の塩基配列に対して 70% 以上（例えば、80% 以上、90% 以上、又は 95% 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリ A 配列を含む mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されており、5' キャップ構造として Cap-1 を有する mRNA である。

[0171] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 11 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、

(i) 配列番号 11 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチドの 5' 末端に三リン酸結合を介して 7-メチルグアノシンが結合（5' - 5' 結合）し、

(ii) 配列番号 11 の 1 位のアデノシンが 2' -O-メチルアデノシンであり、及び

(iii) 一部又は全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換された、mRNA である。

[0172] 一実施形態では、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA は、配列番号 13 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA であって、

(i) 配列番号 13 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチ

ドの5'末端に三リン酸結合を介して7-メチルグアノシンが結合(5'-5'結合)し、及び

(ii) 配列番号13の1位のアデノシンが2'-O-メチルアデノシンである、mRNAである。

[0173] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号13に示す塩基配列を含むmRNAであって、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNAである。

[0174] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、

(i) 配列番号11に示す塩基配列の5'末端に三リン酸結合を介して7-メチルグアノシンが結合(5'-5'結合)し、

(ii) 配列番号11の1位のアデノシンが2'-O-メチルアデノシンであり、及び

(iii) 一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換された、mRNAである。

[0175] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号13に示す塩基配列を含むmRNAであって、

(i) 配列番号13に示す塩基配列の5'末端に三リン酸結合を介して7-メチルグアノシンが結合(5'-5'結合)し、及び

(ii) 配列番号13の1位のアデノシンが2'-O-メチルアデノシンである、mRNAである。

- [0176] 一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、5'キャップ構造を含まないmRNAであってもよい。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列からなるmRNAであって、修飾ヌクレオシドを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列からなるmRNAであって、N1-メチルシュードウリジンを含むmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列からなるmRNAであって、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。一実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、配列番号11に示す塩基配列からなるmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNAである。全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているNeuroD1タンパク質をコードするmRNAは、例えば、配列番号13に示す塩基配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。
- [0177] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含む本発明の医薬組成物は、該mRNAがDDSに内封されていてもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが「薬物送達システム」(drug delivery system; DDS)中に内封されたものであってよい。
- [0178] 本発明において使用され得るDDSとしては、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAの体内での分布を制御し、該mRNAの効果を高め、副作用を抑えるものであることが好ましい。一実施形態では、DDSは、薬物送達キャリアであってよい。薬物送達キャリアとしては、例えば、脂質ナノ粒子、ポリマー粒子(例えば、ポリエチレングリコールと生体適合性カチオンポリマーが連結されたブロック共重合体からなるナノミセル型キャリア)等のナノ粒子が挙げられる。一実施形態において、本発明の医薬組成物は

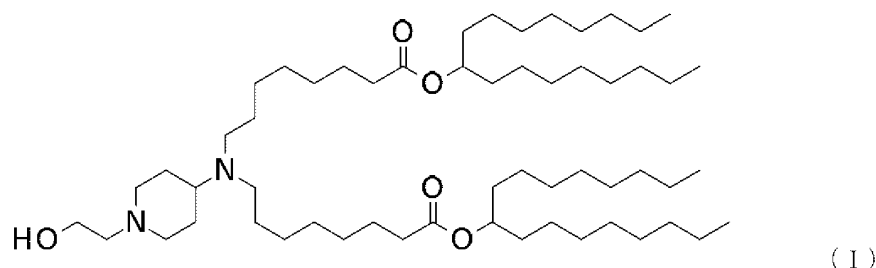
、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAは薬物送達キャリア中に封入されている。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAはナノ粒子中に封入されている。

[0179] 「脂質ナノ粒子」(lipid nano particle; LNP) は、直径が10nm~1000nm(10nm以上かつ1000nm未満)の範囲内の脂質で構成されるナノ粒子であり、核酸医薬等を内封するDDSとして用いられる。タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物として、例えば、LNP封入RNAワクチン(例えば、L. R. Baden et al., The New England Journal of Medicine, vol 384, No. 5, pp. 403-416, 2021、Fernando et al., The New England Journal of Medicine, vol 383, No. 27, pp 2603-2615, 2020)が知られている。脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、PEG化脂質、ステロール、中性リン脂質等の任意の脂質を含む。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質を含む。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、中性リン脂質、ステロール、及びPEG化脂質を含む。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性リン脂質、ステロール、及びPEG化脂質を含む。PEG化脂質としては、例えば、DSPE-mPEG、ALC-0159、DMG-mPEG、DMG-PEG2000等が挙げられる。ステロールとしては、例えば、コレステロールが挙げられる。中性リン脂質としては、例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、1,2-ジオレオイル-3-sn-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)等が挙げられる。カチオン性脂質(又はイオン化(ionizable)脂質)としては、例えば、siRNAを封入する脂質ナノ粒子に用いられるDLin-MC3-DMAが挙げられる。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、DSP

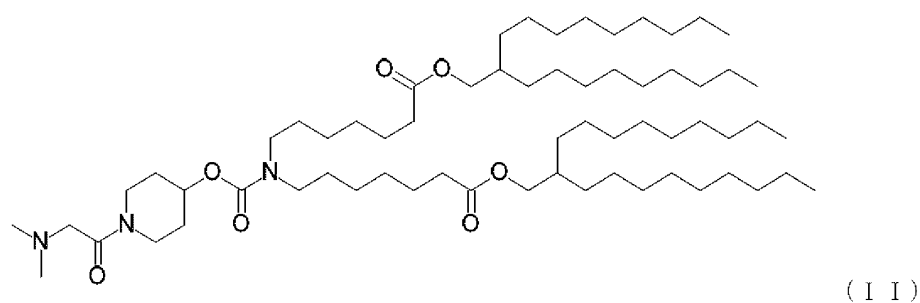
C、コレステロール及びDMG-PEG2000を含む。一例では、RNAを含む脂質ナノ粒子は、PEG化脂質（例えば、DSPE-mPEG、ALC-0159、DMG-mPEG、DMG-PEG2000）、ステロール（例えば、コレステロール）、中性リン脂質（例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、1,2-ジオレオイル-3-sn-ホスファチジルエタノールアミン（DOPE等））、及びカチオン性脂質（又はイオン化（ionizable）脂質）（例えば、siRNAを封入する脂質ナノ粒子に用いられるDLin-MC3-DMA）で構成される外側の脂質層と、それによって取り囲まれた、RNAを囲むカチオン性脂質のコアによって構成され得る。そのようなRNAを含む脂質ナノ粒子は、典型的には、脂質を含むエタノールと、RNAを含む低pHバッファーとをミキサーで急速に混合（例えば、マイクロ流体混合）し、それによってRNAカプセル化を促進し、さらに、pHを徐々に中性付近（例えば、pH7.4）に上げるように調整し、エタノールを除去して、脂質ナノ粒子を形成させることにより、製造することができる。脂質ナノ粒子を構成する、上記PEG化脂質、ステロール、中性リン脂質及びカチオン性脂質は、当該分野で公知の方法を用いて製造することができる。

[0180] 脂質ナノ粒子に用いることができるカチオン性脂質の他の例として、例えば、式(1)で示される化合物1 (E x 1)（すなわち、8, 8' - { [1 - (2-ヒドロキシエチル) ピペリジン-4-イル] アザンジイル } ジ (オクタン酸) ジ (ヘプタデカン-9-イル) ）（実施例15参照）若しくはその塩、又は式(11)で示される化合物2 (E x 2)（すなわち、7, 7' - [({ [1 - (N, N-ジメチルグリシル) ピペリジン-4-イル] オキシ } カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2-ノニルウンデシル) ）（実施例16参照）若しくはその塩等が挙げられる。

[化1]



[化2]



[0181] また、本発明において化合物の塩とは、製薬学的に許容される塩であり、置換基の種類によって、酸付加塩を形成する場合がある。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩等が挙げられる。

[0182] 一実施形態において、本発明の医薬組成物はNeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAは脂質ナノ粒子中に封入されている。

[0183] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は以下の(i)～(xx)からなる群から選択されるmRNAを含み、かつ、該mRNAは脂質ナノ粒子中に封入されている：

(i) 配列番号8に示すアミノ酸配列からなるNeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むmRNA、

(ii) 配列番号7又は10に示す塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるNeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むmRNA、

(iii) 配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位に示す塩基配列に対して70%以上（例えば、80%以上、90%以上、又は95%以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列からなるNeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含むmRNA、

(iv) 配列番号7又は10に示す塩基配列を含むmRNA、

(v) 配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位に示す塩基配列を含むmRNA、

(vi) 配列番号11又は13に示す塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるmRNA、

(vii) 配列番号11に示す塩基配列を含むか又はその塩基配列からなるmRNAであって、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA、

(viii) 配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA、

(ix) 配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA（配列番号13に示す塩基配列を含むmRNAであって、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA）、

(x) 上記(i)～(v)のいずれかのmRNAであって、5'UTR及び／又は3'UTRをさらに含むmRNA、

(x i) 上記 (i) ~ (v) のいずれかの mRNA であって、ポリ A 配列をさらに含む mRNA、

(x i i) 上記 (i) ~ (v) のいずれかの mRNA であって、5' UTR 及び／又は 3' UTR 並びにポリ A 配列をさらに含む mRNA、

(x i i i) 上記 (x) 又は (x i i) の mRNA であって、5' UTR 及び／又は 3' UTR が、ヒト α グロビン遺伝子由来の 5' UTR 及び／又は 3' UTR である mRNA、

(x i v) 上記 (i) ~ (v) のいずれかの mRNA であって、配列番号 11 又は 13 の 4 位 ~ 43 位の塩基配列からなる 5' UTR 及び／又は配列番号 11 又は 13 の 1121 位 ~ 1231 位の塩基配列からなる 3' UTR 並びにポリ A 配列をさらに含む mRNA、

(x v) 配列番号 11 又は 13 の 4 位 ~ 1231 位の塩基配列に対して 70% 以上（例えば、80% 以上、90% 以上、又は 95% 以上）の配列同一性を有し、かつ配列番号 8 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列及びポリ A 配列を含む mRNA、

(x v i) 配列番号 11 又は 13 の 1 位 ~ 1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリ A 配列を含む mRNA、

(x v i i) 上記 (x i) ~ (x v i) のいずれかの mRNA であって、ポリ A 配列の長さが 50 ~ 200 ポリヌクレオチドである mRNA、

(x v i i i) 上記 (i) ~ (v) 又は (x) ~ (x v i i) のいずれかの mRNA であって、5' キャップ構造、好ましくは、Cap-1 を有する mRNA、及び

(x i x) 上記 (i) ~ (v) 又は (x) ~ (x v i i i) のいずれかの mRNA であって、修飾ヌクレオシド、好ましくは、N1-メチルシュードウリジンを含む mRNA、

(x x) 上記 (i) ~ (v) 又は (x) ~ (x i x) のいずれかの mRNA であって、一部又は全て、好ましくは全てのウリジンが N1-メチルシュードウリジンに置換されている mRNA。

- [0184] 脂質ナノ粒子は、mRNAを目的とする細胞に送達可能であれば特に限定されない。例えば、mRNAをグリア細胞（例えば、アストロサイト、又はミクログリア）に送達する場合は、グリア細胞（例えば、アストロサイト）に送達可能な脂質ナノ粒子を選択すればよい。その脂質ナノ粒子がmRNAをグリア細胞に送達可能であるか否かは、例えば、CleanCap（登録商標）eGFP mRNA（TriLink BioTechnologies社）を用いて評価することができる。具体的には、前記mRNAを評価対象である脂質ナノ粒子で封入し、グリア細胞に前記脂質ナノ粒子中に封入されたmRNAを導入する。続いて、グリア細胞内で発現したeGFPの発現強度を測定し、脂質ナノ粒子中に封入されたmRNAの代わりにPBSを導入した細胞と比較してeGFPの発現強度が変化（増大又は減少）しているか否かを検討することによって判断し得る。例えば、脂質ナノ粒子中に封入されたmRNAを導入した場合にeGFPの発現強度が増大している場合、当該脂質ナノ粒子は、mRNAをグリア細胞に送達可能であると判断できる。なお、eGFPの発現強度を指標とする代わりに、例えば、eGFPを発現する細胞数を指標として評価を行うことも可能である。
- [0185] 一実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるmRNAは、グリア細胞に送達可能な脂質ナノ粒子中に封入されており、グリア細胞に送達されうる。一実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるmRNAは、アストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子中に封入されており、アストロサイトに送達されうる。一実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるmRNAは、ミクログリアに送達可能な脂質ナノ粒子中に封入されており、ミクログリアに送達されうる。
- [0186] mRNAを封入する脂質ナノ粒子に含まれるカチオン性脂質、例えば、mRNAをアストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子に含まれるカチオン性脂質としては、例えば、化合物1（Ex1、実施例15）若しくはその塩、又は、化合物2（Ex2、実施例16）若しくはその塩等が挙げられる。一実施形態において、mRNAをアストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子は、

カチオン性脂質を含む。一実施形態において、mRNAをアストロサイトに送達可能な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質として化合物1 (E x 1) 若しくはその塩、及び／又は、化合物2 (E x 2) 若しくはその塩を含む。

[0187] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質を含む。一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子が化合物1 (E x 1) 若しくはその塩、及び／又は、化合物2 (E x 2) 若しくはその塩を含んでもよい。一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質が化合物1 (E x 1) 又はその塩であってもよい。一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子中のカチオン性脂質が化合物2 (E x 2) 又はその塩であってもよい。

[0188] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として8, 8' - { [1 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペリジン - 4 - イル] アザンジイル } ジ (オクタン酸) ジ (ヘプタデカン - 9 - イル) 若しくはその塩、及び／又は、7, 7' - [({ [1 - (N, N - ジメチルグリシル) ピペリジン - 4 - イル] オキシ } カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2 - ノニルウンデシル) 若しくはその塩を含んでもよい。

[0189] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として8, 8' - { [1 - (2 - ヒドロキシエチル) ピペリジン - 4 - イル] アザンジイル } ジ (オクタン

酸) ジ (ヘプタデカン-9-イル) 又はその塩を含んでもよい。

[0190] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている本発明の医薬組成物は、当該脂質ナノ粒子がカチオン性脂質として7, 7'-[({[1-(N, N-ジメチルグリシル) ピペリジン-4-イル] オキシ} カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2-ノニルウンデシル) 又はその塩を含んでもよい。

[0191] 本発明は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物1 (Ex1) 若しくはその塩、及び／又は、化合物2 (Ex2) 若しくはその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物1 (Ex1) 又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物2 (Ex2) 又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されている医薬組成物も含む。本発明は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNA及び化合物1 (Ex1) 又はその塩を含む医薬組成物も含む。本発明は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNA及び化合物2 (Ex2) 又はその塩を含む医薬組成物も含む。

[0192] 一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物1 (Ex1) 又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにDMG-PEG2000、コレステロール及びDSPCを含んでもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物1 (Ex1) 又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにDMG-PE

G 2 0 0 0、コレステロール及びD S P Cを含み、カチオン性脂質、D S P C、コレステロール及びDMG-PEG 2 0 0 0が4 0 : 1 2 : 4 6, 5 : 1. 5の割合で含まれていてもよい。

[0193] 一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物2 (E x 2) 又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにDMG-PEG 2 0 0 0、コレステロール及びD S P Cを含んでもよい。一実施形態において、本発明の医薬組成物は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み、かつ、該mRNAが化合物2 (E x 2) 又はその塩を含む脂質ナノ粒子中に封入されており、脂質ナノ粒子がさらにDMG-PEG 2 0 0 0、コレステロール及びD S P Cを含み、カチオン性脂質、D S P C、コレステロール及びDMG-PEG 2 0 0 0が5 0 : 1 0 : 3 8, 5 : 1. 5の割合で含まれていてもよい。

[0194] 本発明の医薬組成物は、複数種のNeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含み得る。例えば、一部のウリジンがN1-メチルシュドウリジンに置換されているmRNA、全てのウリジンがN1-メチルシュドウリジンに置換されているmRNA、5' キャップ構造を有するmRNA、及び／又は5' キャップ構造を有しないmRNAを含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

[0195] 例えば、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含有する本発明の医薬組成物には、以下の(i) ~ (iv) のうち2以上のNeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

(i) 配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、一部のウリジンがN1-メチルシュドウリジンに置換されており、5' キャップ構造としてCap-1を有するmRNA。

(ii) 配列番号11に示す塩基配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュドウリジンに置換されており、5' キャップ構造

としてCap-1を有するmRNA（配列番号13に示す塩基配列を含むmRNAであって、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA）。

（iii）配列番号11に示す塩基配列からなるmRNAであって、一部のウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA。

（iv）配列番号11に示す塩基配列からなるmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA（配列番号13に示す塩基配列からなるmRNA）。

[0196] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含有する本発明の医薬組成物は、以下の（i）～（iv）のうち2以上のNeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含有する医薬組成物である。

（i）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列を含むmRNAであって、一部のウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA。

（ii）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA。

（iii）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列からなるmRNAであって、一部のウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA。

（iv）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列からなるmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA。

[0197] 一実施形態において、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含有する本発明の医薬組成物は、以下の（i）～（iv）のうち2以上のNeuroD1タンパク質をコードするmRNAであってポリA配列の長さが

40～200ポリヌクレオチド（例えば、50～200、50～150、50～100、50～90、60～150、60～100、60～90、70～130、70～120、70～100、70～90、70～85、70～80、75～130、75～120、75～100、75～90、好ましくは74～84、75～85、75～83、又は76～82ヌクレオチド）であるmRNA、を含有する医薬組成物である。

（i）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列を含むmRNAであって、一部のウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA。

（ii）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列を含むmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されており、5'キャップ構造としてCap-1を有するmRNA。

（iii）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列からなるmRNAであって、一部のウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA。

（iv）配列番号11の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチド及びポリA配列からなるmRNAであって、全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されているmRNA。

[0198] 本発明の医薬組成物には、ポリA配列の長さが異なる複数種のNeuroD1タンパク質をコードするmRNAを含む医薬組成物も含まれ得る。

[0199] 本発明の医薬組成物には、mRNAをDDS中に内封（例えば、薬物送達キャリア中に封入）することなく製剤化した医薬組成物も含まれ得る。

[0200] 本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される補助剤、例えば、不活性な担体（固体や液体担体）、賦形剤、界面活性剤、溶解補助剤、懸濁化剤、着色剤、矯味矯臭剤、保存剤、緩衝剤、pH調整剤等を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される補助剤、例えば、通常用いられる薬剤用

賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製又は製剤化することができる。本発明でいう「医薬組成物」とは、医薬として利用可能な組成物を意味する。

[0201] 本発明の医薬組成物は、脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はBAD）の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がi) 大脳基底核・視床領域の脳障害、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。

[0202] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はBADの治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞であって、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の脳梗塞で

あって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。

[0203] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のラクナ梗塞及び／又はBADの治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の穿通枝梗塞であって、i) 大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であり、当該脳障害がi) 大脳基底核・視床領域の脳障害、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞の治療用に用いることができる。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用に用いることができる。

[0204] 好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳梗塞を発症した対象、例えば、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）を発症した対象、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（

例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）及び／又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を発症した対象の運動機能を顕著に改善することができる。

[0205] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、mRSが2以上（例えば、2～5、3～5、又は3若しくは4）の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、亜急性期～慢性期のmRSが2以上（例えば、2～5、3～5、又は3若しくは4）の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のmRSが2以上（例えば、2～5、3～5、又は3若しくは4）の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のmRSが3～5の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のmRSが3又は4の脳梗塞の治療用の医薬組成物である。

[0206] ヒトの脳卒中神経学的重症度の評価スケールであるNIHSSのスコアは0～42であり、スコアが大きいほど重症であることを表す。脳梗塞治療剤の臨床試験において、NIHSSは患者をリクルートする際の指標や、薬剤の有効性を評価する際の指標にも設定されている。慢性期の脳梗塞治療剤の臨床試験では、例えば、NIHSSのスコアが8～30 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04088149>)、6～20 (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04590118>) 又は5～14 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03202147>) の患者を臨床試験の対象としている。

[0207] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、NIHSSが5以上（例えば、8以上）の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期のNIHSSが8以上の脳梗塞の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、mRSが3～5でありN

Ⅰ H S S が 8 以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、m R S が 3 又は 4 であり N Ⅰ H S S が 8 以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。

[0208] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の m R S が 2 ～ 5 （例えば、3 ～ 5 又は 3 若しくは 4）の穿通枝梗塞（例えば、i）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、i i）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、i i i）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくは i v）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくは B A D）の治療用の医薬組成物である。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の N Ⅰ H S S が 5 以上（例えば、8 以上）の穿通枝梗塞（例えば、i）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、i i）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、i i i）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくは i v）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくは B A D）の治療用の医薬組成物である。

[0209] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の m R S が 2 ～ 5 （例えば、3 ～ 5 又は 3 若しくは 4）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i）大脳基底核・視床領域の脳障害、i i）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療用の医薬組成物であってよい。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の N Ⅰ H S S が 5 以上（例えば、8 以上）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i）大脳基底核・視床領域の脳障害、i i）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i

v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) の治療の医薬組成物であってよい。

[0210] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の m R S が 2 ～ 5 (例えば、3 ～ 5 又は 3 若しくは 4) の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物である。

[0211] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳梗塞 (例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) に伴う穿通枝支配領域の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。穿通枝支配領域の脳障害としては、i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳梗塞 (例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) に伴うi) 大脳基底核・視床領域の脳障害、ii) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、iii) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はiv) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。

[0212] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の m R S が 2 ～ 5 (例えば、3 ～ 5 又は 3 若しくは 4) の脳梗塞に伴う穿通枝支配領域の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。

[0213] 一実施形態では、本発明の医薬組成物は、慢性期の N I H S S が 5 以上 (例えば、8 以上) の脳梗塞に伴う穿通枝支配領域の脳障害の治療用の医薬組成物であってよい。

[0214] 本発明はまた、本発明の医薬組成物、NeuroD1 タンパク質又は NeuroD1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法 (以下、「本発明の治療方法」とも称する) を提供する。一実施形態では、本発明の治療方法は、本発明の医薬組成物、NeuroD1 タンパク質、又は NeuroD1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの治療有効量を対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法で

あってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの治療有効量を対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの治療有効量を対象に投与する工程を含む、脳梗塞の治療方法であってよい。典型的な実施形態では、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、NeuroD1タンパク質を発現可能な状態でコードする。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするDNAを対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするDNAの治療有効量を対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの治療有効量を対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法において使用される発現ベクターは、AAVベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターであり、一実施形態では、本発明の治療方法において使用される発現ベクターは、AAVベクターである。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAを対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法は、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAの治療有効量を対象に投与する工程を含む。一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるmRNAは、DDS中に内封されており、一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるmRNAは、薬物送達キャリア中に封入されており、一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるmRNAは、ナノ粒子中に封入されており、一実施形態では、本発明の治療方法において使用されるmRNAは、脂質ナノ粒子中に封入されている。

[0215] 一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝梗塞（例えば、i）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはiv）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはBAD）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞（例えば、i）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはiv）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはBAD）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期のラクナ梗塞及び／又はBADの治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の穿通枝梗塞（例えば、i）大脳基底核・視床領域に脳障害を有する、ii）大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する、iii）大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する、若しくはiv）大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、並びに／又はラクナ梗塞及び／若しくはBAD）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がi）大脳基底核・視床領域の脳障害、ii）大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、iii）大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又はiv）大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞）の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害がi）大脳基底核・視床領域の脳障害、ii）大脳基底核及び／若しくは視床

の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の脳梗塞であって、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞であって、当該脳障害が i) 大脳基底核・視床領域の脳障害、i i) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、i i i) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は i v) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞) の治療方法であってよい。

[0216] 一実施形態では、本発明の治療方法は、局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の局所的な脳障害を有する脳梗塞の治療方法であってよい。

[0217] 一実施形態では、本発明の治療方法は、m R S が 2 以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、m R S が 3～5 の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、N I H S S が 5 以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、N I H S S が 8 以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) の治療方法であってよい。一実施形態では、本発明の治療方法は、m R S が 3～5 及び N I H S S が 8 以上の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞) の治療方法であってよい。

[0218] 本発明の医薬組成物が用いられる又は本発明の治療の対象となる（以下、「本発明における治療の対象となる」とも称する）m R S が 2 以上の脳梗塞は、脳梗塞発症後のいずれかの期間に、m R S が 2 以上と評価された脳梗塞を含む。本発明における治療の対象となる m R S が 3～5 の脳梗塞は、脳梗

塞発症後のいずれかの期間に、m R S が 3 ～ 5 と評価された脳梗塞を含む。例えば、脳梗塞発症から m R S のスコアが安定するまでの期間に m R S が 3 と評価され、その後症状が回復して m R S が 2 に改善した場合も、本発明における治療の対象となる m R S が 3 ～ 5 の脳梗塞に含まれる。同様に、本発明における治療の対象となる N I H S S が 5 以上の脳梗塞は、脳梗塞発症後のいずれかの期間に、N I H S S が 5 以上と評価された脳梗塞を含む。本発明における治療の対象となる N I H S S が 8 以上の脳梗塞は、脳梗塞発症後のいずれかの期間に、N I H S S が 8 以上と評価された脳梗塞を含む。例えば、脳梗塞発症から N I H S S のスコアが安定するまでの期間に N I H S S が 8 以上と評価され、その後症状が回復して N I H S S のスコアが改善した場合も、本発明における治療の対象となる N I H S S が 8 以上の脳梗塞に含まれる。本発明における治療の対象となる脳梗塞は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又は B A D）であってもよく、例えば、亜急性期～慢性期、又は慢性期の穿通枝梗塞であってもよい。あるいは、本発明における治療の対象となる脳梗塞は、穿通枝梗塞以外の脳梗塞、例えば、亜急性期～慢性期の、穿通枝梗塞以外の脳梗塞であってもよい。

[0219] 本発明の治療方法及び医薬組成物等を適用する対象は、霊長類（ヒト及び非ヒト霊長類）、家畜（ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等）、愛玩動物（イヌ、ネコ、ウサギ等）、実験（試験）動物（マウス、ラット等）等を含む任意の哺乳類（被験体）であってよい。好ましい対象は霊長類であり、特に好ましい対象はヒトである。本発明の治療方法及び医薬組成物等を適用する対象は、その治療方法及び医薬組成物等の適用を必要とする対象であることが好ましく、例えば、脳梗塞、例えば穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）若しくは亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を有する対象であるか、又は脳梗塞、例えば穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）若しくは亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を有することが疑われる対象であってよい。穿通枝梗塞としては、i）大脳基

底核・視床領域に脳障害を有する穿通枝梗塞、*i i*) 大脳基底核及び／若しくは視床に脳障害を有する穿通枝梗塞、*i i i*) 大脳基底核・視床領域及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞、又は *i v*) 大脳基底核、視床及び内包に脳障害を有する穿通枝梗塞が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の治療方法及び医薬組成物等を適用する対象はまた、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）を有する対象であるか、又はそれを有することが疑われる対象であつてよい。穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞としては、当該脳障害が *i*) 大脳基底核・視床領域の脳障害、*i i*) 大脳基底核及び／若しくは視床の脳障害、*i i i*) 大脳基底核・視床領域及び内包の脳障害、又は *i v*) 大脳基底核、視床及び内包の脳障害、を含む脳障害である脳梗塞が挙げられるが、これらに限定されない。

[0220] ヒトにおいて、脳梗塞の発症直後から72時間未満までの、症状が悪化する可能性のある時期を「急性期」と呼ぶ。ヒトにおいて発症後72時間から1か月未満までを「亜急性期」（回復期ともいう）、発症の1か月後以降を「慢性期」と呼ぶ。亜急性期は、慢性期と比べ高い麻痺回復度が期待できる時期である。ヒトにおいて、脳梗塞の亜急性期～慢性期は、脳梗塞発症の72時間後以降の時期を指し、例えば脳梗塞発症の1か月後以降の期間であつてもよく、また、脳梗塞発症の3か月後以降、例えば脳梗塞発症の6か月後以降の期間であつてもよい。非ヒト動物である対象における「急性期」、「亜急性期」及び「慢性期」は、ヒトの「急性期」、「亜急性期」及び「慢性期」にそれぞれ相当する時期として、当業者が適切に定めることができる。

[0221] 本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの、対象への投与量及び投与回数は、治療対象の疾患、重症度、対象の年齢、体重及び状態等に応じて適宜調節できる。投与量は、例えば、投与1回当たり、NeuroD1タンパク質として0.0001mg～15mg/kg体重とすることができる。

[0222] 本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タ

ンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への投与方法は特に限定されず、外科的手段による局所投与、心臓カテーテル投与、超音波造影剤（マイクロバブル）を用いた投与、静脈内投与、下肢穿刺投与、局所注入投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与等が挙げられるが、対象の梗塞巣又は障害巣への外科的手段による局所投与（例えば、頭蓋内投与、脳実質内投与、脳室内投与等）が好ましい。

[0223] 一実施形態において、本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、外科的手段による局所投与によって対象に投与される。一実施形態において、本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、頭蓋内投与によって対象に投与される。一実施形態において、本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、脳実質内投与によって対象に投与される。一実施形態において、本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、脳室内投与によって対象に投与される。

[0224] 本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への投与方法は、対象の梗塞巣又は障害巣の少なくとも1か所の投与部位への本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与を含む。梗塞巣又は障害巣が複数存在する場合は、それぞれの梗塞巣又は障害巣の少なくとも1か所の投与部位に本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを投与してもよい。一実施形態において、本方法では、対象の1つ又は複数の梗塞巣又は障害巣に対し、梗塞巣又は障害巣あたり1か所の投与部位に、本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを投与してもよい。

[0225] 本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タ

ンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への投与回数は特に限定されず、単回投与、複数回投与のいずれであってもよい。単回投与の時期は、脳梗塞発症後の任意の時期、例えば亜急性期～慢性期、又は慢性期であってよく、特に限定されないが、例えば、発症の1か月後、3か月後、6か月後、1年後、1年半後、2年後、3年後、5年後、7年後、10年後等であってもよい。複数回投与の場合、例えば、初回投与は脳梗塞発症後の任意の時期、例えば亜急性期～慢性期、又は慢性期であってよく、初回投与後は一定期間毎、例えば半年ごとの投与であってもよい。

[0226] 本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの対象への脳内投与に用いるデバイスは、目的とする部位に投与可能であれば特に限定されないが、例えば、バイオプシー／インジェクションニードルキット（MIZUHO、MES—CG07—200—01）や穿刺針（国際公開WO2020/241833）等を用いてもよい。

[0227] 本発明の治療方法は、脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期の脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、慢性期の脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝梗塞（例えば、ラクナ梗塞及び／又はBAD）を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期（特に、慢性期）の穿通枝梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期（特に、慢性期）のラクナ梗塞及び／又はBADを効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞を効果的に治療できる。一実施形態では、本発明の治療方法は、亜急性期～慢性期（特に、慢性期）の穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞を効果的に治療できる。好ましい実施形態では、本発明の治療方法は、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、特に慢性期の穿通枝梗塞）、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、特

には慢性期の脳梗塞）を発症した対象及び／又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）を発症した対象の運動機能を顕著に改善することができる。本発明において脳梗塞の「治療」とは、脳梗塞の原因である血栓又はそれによる脳血流の途絶それ自体を消失又は軽減することに限定されず、脳梗塞の症状（例えば、運動機能障害）の消失、緩和、改善、又は進行の阻止若しくは遅延を含む。一実施形態では、本発明における脳梗塞の「治療」は、脳梗塞の症状（例えば、運動機能障害）の治療であってよい。

[0228] 本発明の治療方法及び医薬組成物は、好ましくは、大脳基底核・視床領域の障害と内包の障害の両方の回復をもたらすことができる。大脳基底核・視床領域の障害及びその回復は、例えば、後述の実施例に示すように、ドパミントランスポーターの発現レベルを指標として示すことができる。内包の障害及びその回復は、例えば、後述の実施例に示すように、D T I 解析等により、皮質脊髄路を示すF A 値を指標として示すことができる。本発明の治療方法及び医薬組成物はまた、好ましくは、脳障害に伴う側脳室の容積の増大の抑制をもたらすことができる。側脳室の容積の増大の抑制は、脳実質の萎縮の抑制又は脳実質組織の損傷の回復を示す。側脳室の容積は、任意の脳画像解析、例えば、後述の実施例に示すような、M R I 撮像で得られるT 1 強調画像及び／又はT 2 強調画像の解析により、判定することができる。本発明の治療方法及び医薬組成物は、好ましくは、運動機能障害の回復を促進することもできる。

[0229] 本発明は、脳梗塞、好ましくは、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、局所的な脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）の治療に使用するための、本発明の医薬組成物、N e u r o D 1 タンパク質、又はN e u r o D 1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。本発明は、さらに、m R S が 2 以上（例えば、3 ～ 5 ） 及び／又はN I

HSSが5以上（例えば、8以上）の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療に使用するための、本発明の医薬組成物、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドも提供する。

[0230] 本発明は、脳梗塞、好ましくは、穿通枝梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞、又は慢性期の穿通枝梗塞）、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、局所的な脳障害を有する脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞（例えば、慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物の製造における、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用も提供する。本発明は、さらに、mRSが2以上（例えば、3～5）及び／又はNIHSSが5以上（例えば、8以上）の脳梗塞（例えば、亜急性期～慢性期の脳梗塞、又は慢性期の脳梗塞）の治療用の医薬組成物の製造における、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用も提供する。

[0231] 上述の通り、本発明には、本発明の治療方法、脳梗塞の治療に使用するための、NeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及び脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用も含まれる。これらNeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの医薬用途の治療対象となる脳梗塞には、前述の「本発明の医薬組成物」に記載の脳梗塞が挙げられる。本発明のNeuroD1タンパク質、又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの医薬用途は、当業者であれば「本発明の医薬組成物」に関する記載を参照して容易に実施することが可能である。

実施例

[0232] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の

技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

- [0233] 特に断りがない場合は、以下の実施例に記載の各工程の操作は、公知の技術を用いて実施可能であった。また、市販のキット又は試薬等を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコールに従って実験を行った。
- [0234] なお、本明細書に記載した化合物の命名に A C D / N a m e (登録商標、Advanced Chemistry Development, Inc.) 等の命名ソフトを使用している場合がある。
- [0235] 便宜上、濃度の単位 mol/L を M として表す。例えば、1 M 水酸化ナトリウム水溶液は 1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液であることを意味する。
- [0236] 脳梗塞治療剤の開発において、過去の多くの急性期脳梗塞治療剤の研究ではげっ歯類脳梗塞モデルが使用されてきた。一方、国際脳卒中学会のガイドラインでは、非臨床と臨床の間の結果の乖離を少なくする目的で、脳血管及び組織構造がヒトにより近い非ヒト霊長類での評価が推奨されている。非ヒト霊長類を用いた脳梗塞モデルでは、M C A O モデルや内包を障害したモデル等が報告されているが、これらは重症度が高い運動機能障害が維持されるモデルではない。
- [0237] 本発明者らは、げっ歯類脳梗塞モデルでは、N H P S S 等の運動機能障害スコアリングによる総合的な運動技能の評価をすることができず、運動機能障害を回復させる脳梗塞治療剤の研究に用いることは難しいと考えた。また、これまでに報告されているげっ歯類や非ヒト霊長類等を用いた脳梗塞モデルにおいては N H P S S 等による総合的な運動技能の評価が亜急性期～慢性期まで再現性高く可能な事例は報告されておらず、本発明者らは、既存の脳梗塞モデルは亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤を十分に評価できるとは言えないと考えた。そこで、非ヒト霊長類を用いて、運動機能障害スコアリングによる評価が可能であり、長期的な運動機能障害を維持できる脳梗塞モデルの構築を行うこととした。本発明者らは、大脳皮質梗塞は意識レベルの低下

が症状として表れやすいこと、一方、穿通枝梗塞の一態様であるBADでは大脳基底核での梗塞が起こりやすく、脳梗塞後の運動麻痺が持続する傾向があるという知見から、運動機能障害には大脳基底核における梗塞が重要なのではないかと考えた。さらに本発明者らのこれまでの知見から、本発明者らは長期的な運動機能障害の維持には視床障害が重要ではないかと考えた。また、本発明者らは、内包は神経線維の集合体であることから、目的とする脳梗塞モデルにおいて内包障害も重要であると考えた。これらの知見及び考察から、本発明者らは、非ヒト霊長類において穿通枝に支配される領域（大脳基底核、視床及び内包）を障害することで、長期的な運動機能障害を維持できる脳梗塞のモデル（特に穿通枝梗塞のモデル又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞のモデル）の構築が可能であると予想し、以下の検討を実施した。

[0238] なお、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製においては、非ヒト霊長類の右脳又は左脳のいずれかに脳障害を惹起したモデルを検討することとした。脳梗塞患者では、右脳又は左脳のいずれか一方に梗塞が生じている場合が多いことから、同様に右脳又は左脳のいずれか一方に脳障害を誘導した脳梗塞の動物モデルは、臨床により近い脳梗塞の動物モデルであると考えた。本実施例では、左脳にエンドセリンを注入して左脳における脳障害を誘導し、それにより右半身に運動機能障害を惹起した。

[0239] （実施例1）カニクイザルの脳梗塞モデル構築のための検討

雄性カニクイザル（3歳以上、新日本科学）を用いて運動機能障害が3か月以上持続する大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞モデル（脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル）を作製する方法を検討した。血管収縮作用のあるエンドセリン-1を大脳基底核領域及び視床領域に注入することにより注入部位での血管収縮を誘導し、局所脳虚血を生じ神経細胞死を引き起こすことができると考えた。そこで、エンドセリン-1（ヒト由来；ペプチド研究所、製品コード：4198-v、Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-

T y r - P h e - C y s - H i s - L e u - A s p - I l e - I l e - T r p
（C y s¹とC y s¹⁵の間、及びC y s³とC y s¹¹の間にジスルフィド結合を有する；配列番号9））を、以下の各種注入部位、注入量及び注入速度でカニクイザルの脳に注入し、神経細胞死に伴い、運動機能障害の症状が誘導される程度を調べた。

[0240] まず、雄性カニクイザルに対して約10mg/kg体重となる量で筋肉注射（intramuscular；以下、「i. m. 」と称する）にて全身麻酔剤である塩酸ケタミン（ケタラル筋注用500mg；第一三共プロファーマ、承認番号：21600AMZ00252；以下、「塩酸ケタミン」と称する）を導入した。麻酔下にある当該カニクイザルに気管チューブ（コヴィディエンジャパン、301-40G）を気管挿管し、人工呼吸又は自発呼吸下にてイソフルラン（イソフルラン吸入麻酔液「VTRS」；マイラン製薬株式会社、承認番号：22700AMX00134；以下、「イソフルラン」と称する）の吸入による維持麻酔を行った。麻酔下のカニクイザルの頭部の毛をバリカンで剃毛した後、当該カニクイザルを脳定位固定装置（ナリシゲ、SN-3N）に固定した。その後、出血に配慮しながらカニクイザルの頭部皮膚を切開した。ここまでの工程は、以下の全ての検討実験において同様の手順で行った。

[0241] 公知のカニクイザルのブレインマップ（J. Szabo et al. , J. Comp. Neurol. , vol. 222 (2) , pp. 265-300, 1984）を参考に、エンドセリン-1の脳内への注入部位を検討することとした。カニクイザルのブレインマップは、前後軸はAnterior-Posterior (AP) 座標を、左右軸はMidline (ML) 座標を用いていることから、エンドセリン-1の脳内への注入部位の座標としては、前後軸はAP座標を、左右軸はML座標を用いた。最初は、両外耳道を結ぶ線（interaural line）と頭蓋の矢状縫合との交差点を注入部位の基点（AP座標：0mm、ML座標：0mm（正中））とした。注入部位は、下記のように表す。

- ・ A : A P 座標の基点から前方の距離
- ・ L : M L 座標の基点から左方の距離
- ・ D : 硬膜から鉛直下向き方向への脳内での深さ

[0242] (a) 検討実験 1

エンドセリン-1 の脳内への注入部位と注入量を検討した。カニクイザル 2 個体のうちの 1 個体の頭蓋骨に対し、(i) A : 20.0 mm、L : 7.0 mm、(ii) A : 20.0 mm、L : 9.0 mm、及び (iii) A : 20.0 mm、L : 11.0 mm の位置に、もう 1 個体の頭蓋骨に対しては、前述の (i) ~ (iii) の位置に加えて、(iv) A : 15.0 mm、L : 7.0 mm、(v) A : 15.0 mm、L : 9.0 mm、及び (vi) A : 15.0 mm、L : 11.0 mm の位置に、ドリル (室町機械工業、HSD-1000 ; 以下、「ドリル」と称する) で直径 1 mm 程度の穴を開けた (合計 3 又は 6 か所)。各々の穴からカニユーレ (トップスパイナル針 ; 株式会社トップ、02036 (25 G × 89 mm) ; 以下、「カニユーレ」と称する) とチューブ (Plastics One、C312VT ; 以下、「チューブ」と称する) を挿入し、深さ (D) 19.0 mm にカニユーレ先端が来るように留置した。留置したカニユーレを用いて、1 個体あたり上記の各位置に対応する合計 3 又は 6 か所に 0.1 % 酢酸 (酢酸 (Wako、017-00256) を M i l l i - Q (登録商標) 水で希釈して調製) で希釈したエンドセリン-1 を注入した。エンドセリン-1 は、 $2.0 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ の濃度で、 $2 \mu\text{L} / \text{部位}$ 、注入速度 $1 \mu\text{L} / \text{min}$ で注入した。3 か所注入、6 か所注入、それぞれ N = 1 で実施した。

[0243] 本検討実験 1 において上記のとおり処置されたカニクイザル 2 個体のうち、3 か所注入処置した個体では翌日には軽度の運動機能障害が見られたが、処置後 1 週間では障害は消失していた。6 か所注入処置した個体では、右前後肢の運動機能障害の症状が処置後 2 週間までは明確に認められたが、4 週間後には軽度麻痺が見られる程度まで自然回復した。

[0244] (b) 検討実験 2

検討実験1で用いた条件から、エンドセリン-1の注入部位、及び注入するエンドセリン-1の濃度を変更した。カニクイザルの頭蓋骨に対し、(i) A: 22.0 mm、L: 11.0 mm、(ii) A: 19.0 mm、L: 11.0 mm、(iii) A: 16.0 mm、L: 11.0 mm、(iv) A: 22.0 mm、L: 8.0 mm、(v) A: 19.0 mm、L: 8.0 mm、及び(vi) A: 16.0 mm、L: 8.0 mmの位置に、ドリルで直径1 mm程度の穴を開けた(合計6か所)。各々の穴からマイクロインジェクター(ナリシゲ、IMS-20; 以下、「マイクロインジェクター」と称する)に接続したマイクロシリンジ(HAMILTON、1705RN; 以下、「マイクロシリンジ」と称する)を挿入し、深さ(D) 19.0 mmに針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置に対応する合計6か所に0.1%酢酸で希釈したエンドセリン-1を注入した。エンドセリン-1は、 $4.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で、 $2 \mu\text{L}/\text{部位}$ 、注入速度 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。N=2で実施した。

[0245] 上記のとおり処置されたカニクイザルが示した運動機能障害の症状は、1個体では障害側(機能障害側)である右前後肢の軽度な麻痺で、他の個体は無症状であった。

[0246] 検討実験2においてエンドセリン-1溶液の残検体に析出がみられたことから、検討実験3以降においては、溶液中でエンドセリン-1が析出しないようにエンドセリン-1の濃度を $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ に下げることとした。

[0247] (c) 検討実験3

検討実験1及び検討実験2の結果から、両外耳道を結ぶ線をAP座標の基点にした場合には、個体差のために、必ずしも目的とする領域にエンドセリン-1を注入できないことが判明した。そこで、発明者らのこれまでの知見を基に、頭蓋骨表面の前方にある矢状縫合と冠状縫合との交差点であるブレグマ(Bregma)を基点とすることを想到した。検討実験3以降は、ブレグマを注入部位の基点(B: 0 mm、ML座標: 0 mm(正中))とした。注入部位は下記のように表す。

- ・ B : ブレグマを基点とした前後軸方向の距離 (プラスの数値は前方の距離を表す。)

- ・ L : ML 座標の基点から左方の距離

- ・ D : 硬膜から鉛直下向き方向への脳内での深さ

[0248] ブレグマを基点とするカニクイザルのブレインマップは存在しないことから、発明者らのこれまでの知見に基づき注入部位を検討することとした。

[0249] また、検討実験 3 では、注入するエンドセリン-1 の注入部位あたりの注入量を検討実験 2 の条件より増やした。検討実験 3 においては、カニクイザルの頭蓋骨に対し、(i) B : 2.0 mm、L : 8.0 mm、(ii) B : 5.0 mm、L : 8.0 mm、及び (iii) B : 9.0 mm、L : 8.0 mm の位置に、ドリルで直径 1 mm 程度の穴を開けた (合計 3 か所)。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、深さ (D) 19.0 mm に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1 個体あたり上記の各位置に対応する合計 3 か所に 0.1 % 酢酸で希釈したエンドセリン-1 を注入した。エンドセリン-1 は、 $2.0 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ の濃度で、 $10 \mu\text{L} / \text{部位}$ の量を、注入速度 $1 \mu\text{L} / \text{min}$ で注入した。N = 2 で実施した。

[0250] 処置されたカニクイザルのうちの 1 個体では、処置翌日の評価スケール mRS (表 1) は 5 であり、横臥位姿勢、意識レベル低下、自発運動低下、及び障害側である右前後肢の完全麻痺が認められた。当該個体は術後 1 週間においても mRS は 4 であった。同様に処置を行ったもう 1 匹のカニクイザル個体では、処置翌日の mRS は 3 であり、意識レベル低下はなかったものの、自発運動低下及び障害側である右前後肢の完全麻痺が認められ、さらに、当該個体では処置後 1 週間においても自発運動低下及び障害側である右前後肢の完全麻痺が持続して見られた。以上の結果から、検討実験 3 の条件でエンドセリンを注入することにより、個体の運動機能障害を誘導でき、かつ、誘導される症状が検討実験 1 及び 2 に比べて安定的に持続することが示された。検討実験 3 で処置されたカニクイザル 2 個体は、少なくとも亜急性期ま

で運動機能障害が持続することが明らかになった。

[0251] (d) 検討実験4

検討実験3の条件を基に、以下の検討を行った。より確実に脳障害を誘導するため、エンドセリン-1の注入量を $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ で $30 \mu\text{L}/\text{部位}$ に増量した。カニクイザル2個体の頭蓋骨に対し、ブレグマを基点として (i) B: 2.0 mm 、L: 8.0 mm 、(ii) B: 5.0 mm 、L: 8.0 mm 、及び (iii) B: 9.0 mm 又は 11.0 mm 、L: 8.0 mm の位置にドリルで直径 1 mm 程度の穴を開けた(合計3か所。(iii)の注入部位のみ各個体で異なる。)。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、深さ(D) 19.0 mm (硬膜から)に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置に対応する合計3か所にエンドセリン-1を注入した。エンドセリン-1は、 $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で、 $30 \mu\text{L}/\text{部位}$ の量を、注入速度 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。(iii)の注入部位のみ異なる条件で、それぞれ $N=1$ で実施した。

[0252] 処置されたカニクイザル2個体では、処置から約1か月後のmRS(表1)は4であり重度の障害が見られ、自発運動低下と、横臥位又は座位姿勢(起立不可)状態を示し、さらに、NHPSの運動系スコア(表2)が19(障害側/非障害側= $14/5$)又は17(障害側/非障害側= $14/3$)であった。なお、スコア16が片側の前後肢の最大スコアである。2個体はその後、軽度の自然回復を示したが、1個体の処置後91日目又はもう1個体の処置後92日目においても、mRSが3又は4であり、NHPSの運動系スコア(表2)は12(障害側/非障害側= $12/0$)又は14(障害側/非障害側= $14/0$)であった。

[0253] 検討実験4の結果から、非ヒト霊長類の脳梗塞モデルとしてカニクイザルを用いる場合に、注入部位1か所あたり、濃度 $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ で $30 \mu\text{L}/\text{部位}$ (注入部位あたり $60 \mu\text{g}$)でエンドセリン-1を注入する条件は、障害を長期に維持するのに十分であることが確認された。また、検討実験4

で処置されたカニクイザル2個体は、ヒトの亜急性期～慢性期の脳梗塞の評価が可能なモデルであると考えられた。

[0254] (e) 検討実験5

検討実験5では、エンドセリンの注入による障害巣（梗塞巣）の特定を行った。カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブレグマを基点として(i) B: 2.0 mm、L: 8.0 mm、(ii) B: 9.0 mm、L: 5.0 mm、及び(iii) B: 9.0 mm、L: 13.0 mmの位置にドリルで直径1 mm程度の穴を開けた(合計3か所)。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ(D) 19.0 mm(上記(i)及び(iii))又は深さ(D) 13.0 mm(上記(ii))に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置に対応する合計3か所にエンドセリン-1を注入した。さらに、翌日に、(iv) B: 5.0 mm、L: 8.0 mm及び(v) B: 9.0 mm、L: 8.0 mmの位置にドリルで直径1 mm程度の穴を開け、上記(iv)及び(v)の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ(D) 19.0 mmに針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置(上記(iv)及び(v))に対応する合計2か所にエンドセリン-1を注入した。本実験において、エンドセリン-1は、 $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で、 $30 \mu\text{L}/\text{部位}$ の量を、注入速度 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。N=1で実施した。

[0255] 処置されたカニクイザル個体の脳について、初回注入処置3日後(追加注入処置2日後)の障害巣を2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド(ナカライテスク、35317-32)の2%溶液(生理食塩水に溶解して調製)を用いた染色法(TTC染色)で確認した。その結果、尾状核、被殻、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核に障害巣が認められ、それに加え、内包にも障害巣が及んでいた(図1)。また、(i)の部位への注入により視床外側腹側核及び視床後腹側核に、(ii)の部位への注入により尾状核に、(iii)の部位への注入により被殻に、(iv)の部位への

注入により淡蒼球に、及び（v）の部位への注入により被殻深部に、それぞれエンドセリンを注入していると考えられた。

[0256] 検討実験4の（i）及び検討実験5の（i）、検討実験4の（i i）及び検討実験5の（i v）、並びに検討実験4の（i i i）B：9.0 mm、L：8.0 mm及び検討実験5の（v）の注入部位は同一である。よって、今回の結果から、検討実験5の少なくとも1個体には、被殻深部、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核にエンドセリンを注入していると考えられた。

[0257] （f）検討実験6

検討実験4及び5の結果を受け、尾状核、被殻、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核への投与により適した注入部位の検討を行った。

[0258] カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブレグマを基点として、（i）B：2.0 mm、L：8.0 mm、（i i）B：5.0 mm、L：8.0 mm、（i i i）B：9.0 mm、L：5.0 mm、及び（i v）B：9.0 mm、L：12.0 mmの位置にドリルで直径1 mm程度の穴を開けた（合計4か所）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ（D）19.0 mm（上記（i）及び（i i））、深さ（D）13.0 mm（上記（i i i））、又は深さ（D）15.0 mm（上記（i v））に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置に対応する合計4か所にエンドセリン-1を注入した。エンドセリン-1は、 $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度で、 $30 \mu\text{L}/\text{部位}$ の量を、注入速度 $1.5 \mu\text{L}/\text{min}$ で注入した。N=2で実施した。なお、各注入は、以下の神経核を標的として行った：（i）視床外側腹側核及び視床後腹側核、（i i）淡蒼球、（i i i）尾状核、又は（i v）被殻。

[0259] 処置されたカニクイザル1個体は、処置翌日にmRS（表1）が5であり重篤な障害を呈し、その後、状態悪化が起こり、呼吸停止状態で死亡した。当該個体から、速やかに脳を摘出し、脳切片標本作製し、検討実験5と同様のTTTC染色法により障害巣の観察を行った。その結果、標的の神経核に

障害巣が生じたこと、さらに内包にも障害巣が生じたことが確認された。図2は、得られた脳切片の染色像の例を示す。当該染色像には、標的である、尾状核、被殻、視床外側腹側核及び視床後腹側核における障害巣、さらに内包における障害巣が示されている。このことから、プレグマを基点とすることにより、標的とする部位にエンドセリン溶液を成功裏に注入できること、さらにそのような注入によって内包にもエンドセリンの効果を及ぼすことができることが明らかになった。

[0260] 生存した他の処置個体も、処置翌日のmRS（表1）は5であり重篤な障害を呈し、NHPS（表2）のスコアも49（内訳：運動系23（障害側／非障害側＝16／7）、意識障害10、筋制御系16）であって障害側の前後肢の完全麻痺及び軽度意識障害が観察された。その後、その処置個体は、mRSが3以上、及び障害側の前後肢の完全麻痺を示すNHPSの運動系スコアが16の状態（「障害側の前後肢の完全麻痺」）を処置後ほぼ3か月間持続した（図3、4）。即ち、検討実験6の条件においても、少なくとも3か月続く長期運動機能障害を誘導できることが示された。また、NHPSは急性期の脳梗塞の重症度の評価スケールとして用いられているものの、本検討実験の結果から、NHPSの運動系スコアを指標とすることで、本モデルの運動機能障害の持続性を評価できることが明らかとなった。さらに、mRSを指標とした場合においてもNHPSと同様に運動機能障害の持続性が評価できていることから、本モデルの運動機能障害の持続性の評価には、mRSを用いることができることが示された。

[0261] 穿通枝に支配される神経核及び内包において障害巣が確認されていること、及び運動機能障害が4週間以上持続することが確認されたことから、検討実験6の条件で作製されたモデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞（特には、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞）の評価が可能なモデルであると考えられた。

[0262] 検討実験1～6の結果から、非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与（注入）することにより、脳基底核、視床及び内包に障害

巣が生じ、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することができること、そのようにして大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を起こした非ヒト霊長類動物モデルは、亜急性期～慢性期の脳梗塞（特に、穿通枝梗塞、又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞）の評価が可能であることが明らかになった。

[0263] （実施例2）脳内へのAAV投与試験に用いるエンドセリンー1誘導大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞モデルの作製

雄性カニクイザル（3歳以上、新日本科学）6個体に対して、約10mg/kg体重となる量の塩酸ケタミンを用いてi.m.による導入麻酔を行った。麻酔下にあるカニクイザルに気管挿管し、人工呼吸又は自発呼吸下にて、気管からのイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。麻酔下のカニクイザルの頭部の毛をバリカンで剃毛した後、当該カニクイザルを脳定位固定装置に固定した。その後、出血に配慮しながらカニクイザルの頭部皮膚を切開し、ブregマを確認した。

[0264] 実施例1の検討実験6に記載の方法に従い、雄性カニクイザル6個体に対してエンドセリンー1溶液を注入した。具体的には、カニクイザルの頭蓋骨に対し、ブregマを注入部位の基点として、(i) B: 2.0mm、L: 8.0mm、(ii) B: 5.0mm、L: 8.0mm、(iii) B: 9.0mm、L: 5.0mm、及び(iv) B: 9.0mm、L: 12.0mmの位置にドリルで直径1mm程度の穴を開けた（合計4か所）。各々の穴からマイクロインジェクターに接続したマイクロシリンジを挿入し、硬膜からの深さ(D) 19.0mm（上記(i)及び(ii)）、深さ(D) 13.0mm（上記(iii)）、又は深さ(D) 15.0mm（上記(iv)）に針先端が来るように留置した。マイクロシリンジを用いて、1個体あたり上記の各位置に対応する合計4か所にエンドセリンー1を注入した。エンドセリンー1は、2.0µg/µLの濃度で、30µL/部位の量を、注入速度1.5µL/minで注入した。注入終了後、液漏れを防止するために約20分間シリンジを静置した。このようにして大脳基底核障害、視床障害及

び内包障害を有する脳梗塞モデルを作製した。

[0265] (実施例3) AAV投与試験に用いる発現ベクターの作製

AAV9ベクターを用いて、マウスNeuroD1及びGFPを共発現する発現ベクター(AAV-GFAP-NeuroD1-IRES-GFP、配列番号1、以下「NeuroD1発現ベクター」とも称する)、及びコントロールとして、GFP(緑色蛍光タンパク質)のみを発現する発現ベクター(AAV-GFAP-GFP、配列番号2、以下「コントロールベクター」とも称する)を作製した(タカラバイオ社に委託)。配列番号1に示す発現ベクターAAV-GFAP-NeuroD1-IRES-GFPの塩基配列中、171位~1842位の塩基配列はヒトGFAPプロモーターの塩基配列(配列番号14)に相当し、2355位~3428位の塩基配列(配列番号5)はマウスNeuroD1遺伝子の塩基配列(CDS)に相当しマウスNeuroD1タンパク質(配列番号6)をコードしており、4033位~4752位の塩基配列(配列番号3)はGFP遺伝子の塩基配列(CDS)に相当しGFP(配列番号4)をコードしている。発現ベクター中のGFAPはヒトGFAPプロモーターであり、マウスNeuroD1遺伝子(配列番号5)はヒトGFAPプロモーターの制御下に配置されている。GFAPプロモーターを用いることで、アストロサイト特異的にプロモーターの下流に位置する遺伝子を発現させることができる。

[0266] NeuroD1発現ベクター及びコントロールベクターは具体的には以下の方法で作製した。pAAV-CMVベクター(タカラバイオ社、6230)のCMVプロモーター領域にヒトGFAPプロモーターの塩基配列を挿入し、マルチクローニングサイトにマウスNeuroD1遺伝子の塩基配列、IRES及びGFP遺伝子の塩基配列を挿入することにより、pAAVプラスミド(pAAV-hGFAP-mNeuroD1-IRES-GFP)を作製した。またpAAV-CMV Vector(タカラバイオ社、6230)のCMVプロモーター領域にヒトGFAPプロモーターの塩基配列を挿入し、マルチクローニングサイトにGFP遺伝子の塩基配列を挿入すること

により、pAAVプラスミド（pAAV-hGFAP-GFP）を作製した。作製した2種のpAAVプラスミド、pRC__AAV9（配列番号12）及びpHelper（タカラバイオ社、6230）をそれぞれ大量調製した。続いて、293T細胞（ATCC、CRL-3216）をハイパーフラスコ（Corning社、10034）に播種し、セミコンフルエントまで培養した293T細胞に対して、トランスフェクション試薬PEIpro（PolyPlus-transfection社、115）を用いて、pRC__AAV9、pHelper及びpAAVプラスミド（pAAV-hGFAP-mNeuroD1-IRES-GFP又はpAAV-hGFAP-GFP）を共導入し、さらに約72時間培養した。AAV9ベクター産生細胞培養液にTriton X-100（Merck社、1.08643.1000）を添加後、37℃で1時間処理し、遠心後の上清を回収した。回収した上清は、POROS CaptureSelect AAV9 Affinity Resin（Thermo Fisher Scientific社、A27353）を用いたアフィニティー精製によりAAV9を吸着させ、50mM グリシン-HCl（pH2.7）により溶出し、複数の画分を回収した。回収液は2M Tris-HCl（pH8.0）を用いて中和した。続いて、塩化セシウム密度勾配遠心法により、以下のように精製した。回収したAAV9ベクター溶液に塩化セシウム（ナカライテスク社、07807-11）を添加し、溶液の屈折率を1.371に調整後、148,500×g、21℃、42時間で超遠心を行った。遠心後、遠心管上部より順次、溶液を分取した。回収した溶液を0.22μmフィルターで濾過し、NeuroD1発現ベクター又はコントロールベクターをそれぞれ得た。

[0267]（実施例4）脳内へのNeuroD1発現ベクター投与

実施例2で作製した脳梗塞モデルの6個体を、エンドセリン-1注入後21日目に、mRS（表1参照）及びNHPSS（表2参照）に関して群間で差が生じないように2群（それぞれN=3）に振り分けた。それぞれの群は、NeuroD1発現ベクターを投与するAAV-NeuroD1群と、コ

ントロールベクターを投与するコントロール群とした。

[0268] 各群の脳梗塞モデル個体に、 $15 \sim 50 \text{ mg} / 0.3 \sim 1.0 \text{ mL} / \text{head}$ の塩酸ケタミン及び $1 \sim 4 \text{ mg} / 0.05 \sim 0.2 \text{ mL} / \text{head}$ のキシラジン（セラクター2%注射液；バイエル薬品、承認指令書番号：27動薬第2679号）を用いてi. m. による導入麻酔及び同麻酔の反復投与による維持麻酔を行った。麻酔持続下にて頭部の毛をバリカンで剃毛した後、モデル個体を脳定位固定装置に固定した。次に、術野を消毒し、出血に配慮しながら頭部皮膚を切開してブレグマを露出した。

[0269] 各群の脳梗塞モデル個体において、実施例2で脳梗塞モデル作製時にエンドセリンー1を注入した合計4か所の穴のそれぞれに、実施例2と同じ深さ（D）に針先端が来るようにマイクロシリンジを留置し、実施例3で作製したAAVベクターを投与した。3個体にNeuroD1発現ベクター、3個体にコントロールベクターを投与した。AAVベクターは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で $1.05 \times 10^{12} \text{ vg (vector genome)} / \text{mL}$ となるように調製し、AAVベクター溶液を $30 \mu\text{L} / \text{部位}$ 、投与速度 $1.5 \mu\text{L} / \text{min}$ で投与した。投与終了後、約20分間シリンジを静置した。

[0270] （実施例5）運動機能の観察

実施例4においてAAVベクターで処置したAAV-NeuroD1群及びコントロール群各個体に関して、エンドセリンー1注入処置前（0日目）、並びにエンドセリンー1注入後1、7、14、21、28、42、56、70及び84日目に、mRS（表1）及びNHPSの運動系スコアリング（表2）に基づく観察を実施した。

[0271] その結果、AAV-NeuroD1群及びコントロール群のいずれにおいても、AAVベクター投与後7日目は運動機能に差がなくAAVベクター投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリンー1注入後84日目（AAVベクター投与後63日目）時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、AAV-NeuroD1

群ではエンドセリン-1 注入後5 6 日目（AAVベクター投与後3 5 日目）以降より運動機能の回復を示し、エンドセリン-1 注入後8 4 日目（AAVベクター投与後6 3 日目）時点では運動機能の顕著な回復が確認された（図5、6）。

[0272] 一方、コントロール群とAAV-NeuroD1 群の間で、体重及び摂餌状態に差は認められなかった（図7、8）。摂餌状態は、以下の基準に従って一週間単位で摂餌スコアリングを行うことにより評価した。

- 0 : 摂餌なし
- 1 : 給餌量の半分未満を摂取
- 2 : 給餌量の半分以上、全量未満を摂取
- 3 : 給餌量の全量を摂取

[0273] （実施例6）カニクイザルの脳梗塞モデルの画像解析

実施例2 に記載の方法で作製した脳梗塞モデル1 個体の脳を以下の方法にて解析した。なお、本実施例では麻酔前投薬としてアトロピン硫酸塩水和物（田辺三菱製薬株式会社、アトロピン硫酸塩注0. 5 mg「タナベ」）を0. 01 mg/kg 体重でi. mにより処置し、その後、10 mg/kg 体重の塩酸ケタミンを用いてi. mによる導入麻酔を行った。その後はイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。

[0274] （a）エンドセリン-1 注入領域における組織画像評価

脳梗塞モデルの脳を経日的にMRI 装置（MAGNETOM Trio、3 T、SIEMENS）を用いて非侵襲的に画像化した。臨床においても広く用いられるT2 強調画像法とフレアー（Fluid attenuated inversion recovery; FLAIR）法による撮像を行った。T2 強調画像では水は白く高信号で描出され、炎症や障害巣が高信号で描出されることが知られている。フレアー法で得られる画像は脳脊髄液をはじめとした水の信号を抑制したT2 強調画像であり、通常のT2 強調画像よりも明瞭に障害巣を描出できる。

[0275] 経日的な脳のT2 強調画像を図9 A に、経日的な脳のフレアー画像を図9

Bに示す。脳障害惹起後1日目（エンドセリンー1注入後1日目、すなわち、エンドセリンー1注入の翌日）の脳梗塞モデルではエンドセリンー1注入領域がT2強調画像及びフレアー画像のいずれにおいても高信号で描出され、注入領域に障害が生じていることが示された。また脳障害惹起後7日目、21日目、41日目及び69日目にも撮像したところ、T2強調画像及びフレアー画像のいずれにおいても高信号領域が検出されたが、経日的に高信号領域が縮小していることが明らかになった（図9A及びBのL）。一方、非障害側ではT2強調画像及びフレアー画像のいずれにおいても変化は認められなかった（図9A及びBのR）。さらに、T2強調画像において側脳室に着目し経日変化を観察したところ、エンドセリンー1注入後1日目において障害側の側脳室が非障害側に比べ縮小していることが確認された（図9A（a））。これは臨床の脳梗塞でも観察されるように、脳障害に伴う血管性浮腫が生じ、障害側の側脳室を圧迫することで生じる変化によるものであると考えられた。またエンドセリンー1注入後7日目以降は側脳室の縮小が緩和していることから脳障害に伴う急性期の浮腫が軽減していると考えられた。一方、エンドセリンー1注入後21日目、41日目及び69日目でのT2強調画像では障害側の側脳室は非障害側の側脳室よりも拡大していることが確認された。これは障害巣での神経細胞の脱落に伴う障害側の脳実質の萎縮を反映する変化と考えられ、臨床の脳梗塞でも生じる変化と類似していた。以上の画像解析結果より、本モデルは臨床で確認されているのと同様に、脳障害惹起後の急性期には浮腫を伴い、さらに脳梗塞部位の経日的な浮腫領域の縮小及び障害巣での神経細胞の脱落に伴う脳実質の萎縮を表現している脳梗塞モデルであると考えられた。

[0276] (b) エンドセリンー1注入領域における灌流画像評価

脳梗塞モデルに対しガドリニウム造影剤（ブラッコ・エーザイ、プロハンス静注10mL）を静脈内注入し、MRI灌流画像法により血流を経日的に画像化した。経日的な脳の灌流画像を図9Cに示す。脳障害惹起後1日目の脳梗塞モデルではエンドセリンー1注入領域が低信号となり、血流が低下し

ていることが示された。また脳障害惹起後 7 日目、21 日目、41 日目及び 69 日目に撮像したところ、低信号を示すエンドセリンー 1 注入領域が経日的に縮小し、低下していた血流が回復していることが示された。一方、非障害側では血流の変化は認められなかった。障害巣における急性期の及び経日的な画像解析結果から、本モデルは、臨床でも報告例があるように、脳障害惹起後の急性期には虚血を示し、さらに、脳虚血部位で低下した血流が血管新生等により亜急性期にかけて回復することを表現しているモデルであると考えられた。

[0277] (c) 神経白質線維の画像評価

脳梗塞モデルに対し拡散テンソル画像 (DTI) を撮像し、テンソル解析を行った。脳障害惹起後 1 日目に、エンドセリンー 1 注入領域近傍の内包を含むように、大脳脚を始点に、中心前回及び中心後回を終点に Region of Interest (ROI) を設定し、異方性比率 (Fractional Anisotropy; FA) を測定した。上記 ROI における DTI 解析の FA 値は白質を通過する皮質脊髄路を主に反映していると考えられる。

[0278] 経日的な脳の DTI を図 9D に示す。測定の結果、障害側では FA 値が低値であったことから (図 9D、矢印)、障害側では皮質脊髄路の神経線維が断裂、損傷していることが示された。FA 値の低下は、脳障害惹起後 1 日目、7 日目、21 日目、41 日目及び 69 日目のいずれの撮像においても観察されていることから、神経線維の断裂は急性期から慢性期まで維持されていることが示された。一方、非障害側では皮質脊髄路が全体に描出され変化は認められなかった。これは臨床の脳梗塞でも観察されるように、脳障害領域における皮質脊髄路の断裂を示すものと考えられる。このことから、本モデルは、皮質脊髄路の損傷を伴う脳梗塞のモデルとしても有用であることが示された。

[0279] (実施例 7) カニクイザルの脳梗塞モデルの脳の障害巣周囲におけるアストロサイトの集積及び神経細胞の脱落

実施例 2 に記載の方法で作製した脳梗塞モデル 1 個体をエンドセリンー 1 注入後 21 日目に安楽死させ、脳を摘出し 4 % パラホルムアルデヒド（富士フィルム和光純薬社、163-20145）を用いて固定した。その後、スクロース（ナカライテスク社、30404-45）を PBS（富士フィルム和光純薬社、045-29795）に溶解したスクロース溶液（10、20 及び 30 %）を用いて、固定した脳組織中の水分をスクロース溶液に置換した後、10 μ m 厚の凍結脳切片を作製した。この脳切片を用いてアストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗 GFAP 抗体（Abcam 社、ab53554）と神経細胞マーカーである NeuN に対する抗 NeuN 抗体（Sigma-Aldrich 社、MAB377）を用いた免疫組織染色を行った。

[0280] その結果、GFAP 陽性細胞が障害巣周囲に集積していること、また、障害巣では、非障害側の同じ部位と比べて NeuN 陽性細胞が減少していることを見出した。この結果は、障害巣周囲にアストロサイトが集積し、神経細胞が減少していることを示す。

[0281] （実施例 8）ヒト脳梗塞患者の脳梗塞部位周囲におけるアストロサイトの集積及び神経細胞の脱落

脳梗塞発症の 10 か月後の大脳基底核脳梗塞患者由来のホルマリン固定されたヒト脳サンプル（Life Net Health 社）を、実施例 7 と同様に、PBS に溶解したスクロース溶液で処理して組織中の水分を置換し、10 μ m 厚の凍結脳切片を作製した。この脳切片を用いて抗 GFAP 抗体（Cell Signaling Technology 社、12389S）と抗 NeuN 抗体（Sigma-Aldrich 社、MAB377）を用いた免疫組織染色を行った。

[0282] その結果、GFAP 陽性細胞が脳梗塞部位周囲に集積していること、また、梗塞部位では、非梗塞側の同じ部位と比べて NeuN 陽性細胞が減少していることを確認した。この結果も、障害巣周囲にアストロサイトが集積し、神経細胞が減少していることを示す。

[0283] 実施例7及び実施例8の結果から、実施例2に記載の方法で作製した脳梗塞モデルは、ヒト慢性期脳梗塞と同様に神経細胞の脱落とアストロサイトの集積を表現している脳梗塞モデルであることが示された。

[0284] (実施例9) mRNA-LNPの調製

ヒトNeuroD1タンパク質をコードする2種のNeuroD1 mRNAとして、(i) TriLink BioTechnologies社が提供する5' UTR及び3' UTR、ヒトNeuroD1遺伝子のCDS (配列番号7)、及び120ヌクレオチドのポリA配列を含む塩基配列からなり、かつ5' キャップ構造がCap-1であるmRNA (以下「ND1-1」と称する) と、(ii) ヒト α グロビン遺伝子由来の5' UTR、ヒト α グロビン遺伝子由来の3' UTR、ヒトNeuroD1遺伝子のCDS (配列番号10) 及び79ヌクレオチドのポリA配列を含む塩基配列 (配列番号11) において全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されている塩基配列 (配列番号13) からなり、かつ5' キャップ構造がCap-1であるmRNA (以下「ND1-2」と称する) を作製した (TriLink BioTechnologies社に委託)。なお配列番号11及び13に示す塩基配列中、ヌクレオチド1~3位がCleanCap (登録商標) Reagent AG (TriLink BioTechnologies社) を用いたキャッピングの方法に適した5' 末端配列、4~43位が5' UTR、44~1114位がヒトNeuroD1遺伝子のCDS (配列番号10)、1115~1120位が連続する2つの終止コドン、1121~1231位が3' UTR、1232~1310位がポリA配列に相当する。コントロールとして、eGFP mRNA (TriLink BioTechnologies社、L-7601) を用いた。

[0285] 上記(i)及び(ii)のmRNAをそれぞれ表3に記載の組成の脂質ナノ粒子 (L1又はL6) と混合し、脂質ナノ粒子中に封入されたmRNA (以下、「mRNA-LNP」と称する。) を調製した。

[0286]

[表3]

		L 1	L 6
脂質組成 (モル%)	カチオン性脂質 (化合物 1 (Ex1))	50	40
	DSPC	10	12
	コレステロール	38.5	46.5
	DMG-PEG2000	1.5	1.5
緩衝液		10mM クエン酸緩衝液 (pH4)	10mM クエン酸緩衝液 (pH6)

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリン
DMG: ジミリストイルグリセロール
PEG2000: ポリエチレングリコール2000

- [0287] mRNA-LNPの調製は、具体的には、以下の方法で実施した。カチオン性脂質である化合物 1 (Ex1; 製造方法は実施例 15 に示す)、DSPC (NOF Corporation 社、COATSOME (登録商標) MC-8080)、コレステロール (日本精化株式会社、Cholesterol HP)、DMG-PEG2000 (NOF Corporation 社、SUNBRIGHT (登録商標) GM-020) を N/P 比=6 でエタノールに溶解させ、油相を得た。上記の mRNA を含む 10mM クエン酸緩衝液 (pH4 又は 6) を水相とし、水相と油相の体積比が水相:油相=3:1 となるように油相を加えてマイクロ流体デバイス (NanoAssembler (登録商標)、Precision NanoSystems 社) で混合し、混合液を PBS で希釈して mRNA-LNP の分散液を得た。この分散液の透析又は限外ろ過によりエタノール除去を行った。続いて限外ろ過により濃縮し、任意の濃度に調整した mRNA-LNP を得た。なお、「N/P 比」とは、mRNA-LNP 中のカチオン性脂質のアミノ基のモル数 (N) を mRNA のリン酸のモル数 (P) で除した値である。
- [0288] mRNA-LNP として調製された、脂質ナノ粒子 L1 中に封入された ND1-1 を ND1-1-L1 と称し、脂質ナノ粒子 L6 中に封入された ND1-2 を ND1-2-L6 と称する。
- [0289] 同様に、mRNA-LNP として、脂質ナノ粒子 L1 中に封入された eGFP mRNA を調製した。これを eGFP mRNA-L1 と称する。
- [0290] 上記と同様の方法で、ND1-2 又は eGFP mRNA を表 4 に記載の

組成の脂質ナノ粒子（L 7）とそれぞれ混合し、mRNA－LNPを調製した。L 7に含まれるカチオン性脂質は化合物 2（Ex 2；製造方法は実施例 1 6 に示す）である。mRNA－LNPとして調製された、脂質ナノ粒子 L 7 中に封入されたND 1－2又はeGFP mRNAを、それぞれND 1－2－L 7又はeGFP mRNA－L 7と称する。

[0291] [表4]

		L 7
脂質組成 (モル%)	カチオン性脂質 (化合物 2(Ex2))	50
	DSPC	10
	コレステロール	38.5
	DMG-PEG2000	1.5
緩衝液		10mM クエン酸緩衝液(pH4)

[0292] （実施例 1 0）インビトロにおけるNeuroD1 mRNAによるラットプライマリーアストロサイトから神経細胞への変換

1. ラットプライマリーアストロサイトへのmRNA－LNPの添加

ラットプライマリーアストロサイトはLynette C. Foo. らの論文（Purification of Rat and Mouse Astrocytes by Immunopanning: Cold Spring Harbor Protocols, vol. 5, pp. 421－432, 2013）に従って取得し使用した。ただし、細胞のリカバリーは、5%CO₂下で行った。ラットはウイスターラットの新生仔（日本クレア、P1－P10）を使用した。ポリ－D－リジンコートされた96ウェルプレート（Corning社、356640）に、取得したラットプライマリーアストロサイトを10,000～40,000細胞／ウェルで播種し、5%CO₂下、37℃で一晩培養した。培養には、2% B－27（登録商標）サプリメント（Thermo Fisher Scientific社、A1895601）、10% ウシ胎児血清(FBS)（Cytiva社、SH30084.03）及び1% ペニシリン－ストレプトマイシン（PS）（Thermo Fisher Scientific社、15070063

）を含有するDMEM／F－12培地（Thermo Fisher Scientific社、11320-033）を200 μ L／ウェルで使用した。なお実施例10では、B－27（登録商標）サプリメント、FBS及びPSを含有するこのDMEM／F12培地を、下記においても、培養培地として用いた。翌日、PBS及び培養培地で希釈したmRNA-LNP（ND1-1-L1又はND1-2-L6）を終濃度0.5 μ g／mLとなるようにそれぞれウェルに添加し24時間培養した。コントロールのウェルにはPBS及び培養培地を添加した。

[0293] 2. NeuroD1タンパク質の発現確認

上記のmRNA-LNP添加の24時間後に、培養培地を除去し、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定処理した。その後PBSで洗浄し、抗NeuroD1抗体（Santa Cruz Biotechnology社、sc46684）を用いて免疫細胞染色を行い、NeuroD1タンパク質の発現を検出した。結果、ND1-1-L1又はND1-2-L6を添加したウェルにおいて、NeuroD1タンパク質陽性細胞が、PBSを添加したウェル（コントロール）に比べて顕著に増加していることが示された。この結果は、mRNA-LNPがアストロサイトに取り込まれ、アストロサイトにてNeuroD1タンパク質に翻訳されていることを示す。

[0294] 3. 神経細胞マーカーの発現確認

上記のmRNA-LNP添加の24時間後に、培養培地を除去し分化転換培地に変更し、2～3日ごとに培地交換した。分化転換培地は2% B－27（登録商標）サプリメント、1% GlutaMAX（商標）サプリメント（Thermo Fisher Scientific社、35050-061）、1% PS及び0.02% BDNF（brain derived neurotrophic factor；脳由来神経栄養因子）溶液を含有するDMEM／F12培地であり、当該培地を200 μ L／ウェル添加した。BDNF溶液は、100 μ g／mLとなるようにBDNF粉末（Pepr oTech、450-02）を純水で溶解することにより調製した。

。mRNA-LNP添加後6～7日目において分化転換培地を除去し、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定処理した。その後PBSで洗浄し、未成熟な神経細胞マーカーであるダブルコルチン(Doublecortin; DCX)の発現を確認するため、抗DCX抗体(Cell Signaling Technology社、4604S)を用いて免疫細胞染色を行った。

[0295] ND1-1-L1又はND1-2-L6を添加したウェルにおいて、PBSを添加したウェル(コントロール)に比べてDCX陽性細胞が顕著に増加していることが明らかになった。この結果は、NeuroD1 mRNAによりラットプライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されたことを示す。

[0296] (実施例11) カニクイザル脳梗塞モデルの脳内へのNeuroD1 mRNA-LNP投与

実施例2に記載の方法で作製した脳梗塞モデルの4個体を、エンドセリン-1注入後21日目(慢性期)に、mRS(表1参照)に関して群間で差が生じないように2群(コントロール群:N=1、薬剤投与群:N=3)に振り分けた。

[0297] 各群の脳梗塞モデル個体に、約10mg/kg体重となる量の塩酸ケタミンを用いて、i.m.による導入麻酔及びイソフルラン吸入による維持麻酔を行った。麻酔持続下にて頭部の毛をバリカンで剃毛した後、モデル個体を脳定位固定装置に固定した。次に、術野を消毒し、出血に配慮しながら頭部皮膚を切開してブレグマを露出した。

[0298] 各群の脳梗塞モデル個体において、実施例2に記載の方法で脳梗塞モデル作製時にエンドセリン-1を注入した合計4か所の穴のそれぞれに、実施例2と同じ深さ(D)に針先端が来るようにマイクロシリンジを留置し、mRNA-LNPの投与に用いた。mRNA-LNPとして、薬剤投与群(NeuroD1 mRNA-LNP群)の3個体にND1-1-L1を、コントロール群の1個体にeGFP mRNA-L1を、エンドセリン-1注入後

21日目（慢性期）に投与した。mRNA-LNPは、PBSで0.3mg/mLとなるように調製し、30 μ L/部位、投与速度1.5 μ L/minで投与した。投与終了後、約20分間シリンジを静置した。

[0299] （実施例12）NeuroD1 mRNAの作用

（a）運動機能の観察

実施例11においてmRNA-LNPで処置したNeuroD1 mRNA-LNP群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン-1注入処置前（0日目）、並びにエンドセリン-1注入後1、7、14、21、22、28、42、56、70及び84日目に、mRS（表1）に基づく観察を実施した。なお、前述のように、エンドセリン-1注入後28日目以降は2週間毎に行動評価を実施することとしたが、NeuroD1 mRNA-LNP群のエンドセリン-1注入後56日目（mRNA-LNP投与後35日目）の行動評価としては、各個体をエンドセリン-1注入後57、58又は59日目（mRNA-LNP投与後36、37又は38日目）にそれぞれ評価した。コントロール群のエンドセリン-1注入後56日目（mRNA-LNP投与後35日目）の行動評価としては、コントロール群の1個体をエンドセリン-1注入後58日目（mRNA-LNP投与後37日目）に評価した。これらの結果を、本実施例においてはエンドセリン-1注入後56日目（mRNA-LNP投与後35日目）の結果とした。

[0300] その結果、NeuroD1 mRNA-LNP群及びコントロール群のいずれにおいても、mRNA-LNP投与後1日目は運動機能に差がなくmRNA-LNP投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリン-1注入後84日目（mRNA-LNP投与後63日目）時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、NeuroD1 mRNA-LNP群ではエンドセリン-1注入後56日目（mRNA-LNP投与後35日目）以降より運動機能の回復を示し、エンドセリン-1注入後84日目（mRNA-LNP投与後63日目）時点では運動機能の顕著な回復が確認された（図10）。このことから、タンパク質を持続

的に発現することが知られているAAVベクターを用いてNeuroD1を投与した場合（実施例5）だけでなく、タンパク質を一過性に発現させることが知られているmRNAによりNeuroD1を投与した場合においても、脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが明らかになった。

[0301] (b) DTIによるFA値の解析

実施例11においてmRNA-LNPで処置したNeuroD1 mRNA-LNP群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン-1注入後114日～115日目においてMRIによる脳の撮像を行った。ROIを実施例6(c)と同様に設定し、DTI解析を行った。またDTI解析をもとに連続的な神経線維の走行を3次的に画像化したDTTを取得した。

[0302] DTI解析により、コントロール群では非障害側（右脳）と比較して障害側（左脳）のFA値が低値であり、DTTにおいて神経線維の断裂が確認された（図11A）。一方、NeuroD1 mRNA-LNP群では障害側のFA値が回復しており、DTTにおいて神経線維の回復が認められた（図11B、矢印）。図11Cは、コントロール群及びNeuroD1 mRNA-LNP群におけるDTI解析によるFA値の定量結果を、非障害側と比較した障害側のFA値の比率（相対値）として示す。この結果は、損傷された皮質脊髓路が、NeuroD1の投与により回復したことを示している。

[0303] (c) 側脳室の容積の解析

実施例11においてmRNA-LNPで処置したNeuroD1 mRNA-LNP群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン-1注入後114日～115日目にMRIによる脳の撮像を行った。

[0304] T2強調画像を用いた画像評価解析により、コントロール群では非障害側（右脳）と比較して障害側（左脳）の側脳室の容積が増大していることが確認された（図12A）が、NeuroD1 mRNA-LNP群では障害側の側脳室の容積の増大の抑制が確認された（図12B、矢印）。図12Cは、コントロール群及びNeuroD1 mRNA-LNP群における側脳室

の容積の定量結果を、T1強調画像をもとに非障害側と比較した障害側の側脳室の容積の比率（相対値）として示す。T1強調画像は側脳室を満たす脳脊髄液を低信号で検出し、T1強調画像の解析により側脳室の容積を算出することができる。側脳室の容積の増大は脳実質の萎縮を反映していると考えられる。したがって、NeuroD1 mRNA-LNP群において側脳室の容積の増大が抑制されていることは、NeuroD1の投与による脳実質の萎縮の抑制又は脳実質組織の損傷の回復を示していると考えられた。

[0305] (d) ドパミントランスポーターの発現解析

本脳梗塞モデルは脳基底核障害を有していることから、線条体においてドパミントランスポーターの発現が低下していると考えられた。そこで、以下の実験を行った。

[0306] 実施例11においてmRNA-LNPで処置したNeuroD1 mRNA-LNP群及びコントロール群の各個体を、エンドセリン-1注入後118日～122日目に安楽死させ、脳を摘出し4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後スクロースをPBSに溶解したスクロース溶液（10、20及び30%）で組織中の水分を置換し、10 μ m厚の凍結脳切片を作製し、次いでドパミントランスポーターの免疫組織染色を実施した。免疫組織染色では、まず、抗原賦活のため、脳切片を10mMクエン酸緩衝液に浸し、98℃で5分間加熱した。クエン酸緩衝液はクエン酸（ナカライテスク社、09108-95）を純水で溶解し、水酸化ナトリウム水溶液（富士フィルム和光純薬社、192-02175）を用いてpH6.2になるよう調製した。加熱後、抗ドパミントランスポーター（DAT）抗体（Abcam社、ab5990）を用いて免疫組織染色を実施した。

[0307] その結果、コントロール群の障害側（左脳）の線条体では非障害側（右脳）に比べて明らかにドパミントランスポーターの染色強度が低下していた（図13A）が、NeuroD1 mRNA-LNP群の障害側の線条体ではドパミントランスポーターの染色強度はコントロール群のような明らかな低下は認められなかった（図13B）。これは、障害によって生じたドパミン

トランスポーターの発現低下が、NeuroD1の投与によって回復した結果を示していると考えられた。また、ドパミントランスポーターの染色強度の回復は線条体に投射するドパミン神経路の回復を反映していると考えられた。図13Cは、コントロール群及びNeuroD1 mRNA-LNP群におけるドパミントランスポーターの発現強度を、非障害側と比較した障害側のドパミントランスポーター染色強度の比率（相対値）として示す。ドパミントランスポーターの発現解析の結果から、本モデルはドパミントランスポーターの発現低下を伴う脳梗塞のモデルとして有用であることが明らかとなった。

[0308] 実施例6、7及び本実施例から、本発明の方法で作製される大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞動物モデルは、（1）急性期において浮腫及び虚血を示し、（2）経日的に浮腫領域の縮小、側脳室の拡大及び血流の回復を示し、（3）慢性期において障害巣周囲においてアストロサイトの集積及び神経細胞の脱落を呈し、さらに（4）急性期～慢性期において皮質脊髓路の損傷を伴う脳梗塞動物モデルであり得ることが明らかになった。これらは、臨床で報告されている脳梗塞の病態と類似していた。したがって、本モデルは、脳梗塞（急性期、亜急性期～慢性期、特に慢性期）のモデルとして有用であることが示された。

[0309] また、上記実施例において、AAV-NeuroD1又はNeuroD1 mRNAを障害巣へ投与することにより、脳実質の萎縮が抑制又は回復すること、内包において皮質脊髓路の損傷が回復することが示されていること、及び線条体においてドパミン神経路の回復が示されていることから、NeuroD1タンパク質に依存してアストロサイト等の障害巣周辺の細胞が神経細胞に変換されたことにより、脳の機能が回復し、その結果として脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができたと考えられる。なお、実施例10においてND1-1-L1と同様にND1-2-L6もアストロサイトを神経細胞へ変換したことが示されたことから、ND1-2-L6を投与した場合においてもND1-1-L1と同様にNeuroD1による同様の効

果が示されることが期待される。

[0310] 以上の実施例 1 ～ 12 の結果から、本発明の方法で作製した大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する脳梗塞動物モデルを用いることにより、脳梗塞、特に、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞、及び亜急性期～慢性期の脳梗塞に対する治療効果について被験物質を評価又はスクリーニングできることが示された。さらに、NeuroD1 投与により、
(1) 脳梗塞（穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞）に対し治療効果を示すこと、及び(2) 重症度が高い運動機能障害を呈する脳梗塞に対しても治療効果を示すことが明らかになった。

[0311] (実施例 13) インビトロにおける NeuroD1 mRNA-LNP (ND1-2-L7) によるラットプライマリーアストロサイトから神経細胞への変換

実施例 10 における ND1-1-L1 及び ND1-2-L6 と同様に、ND1-2-L7 によりラットプライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されるか評価した。

[0312] 1. ラットプライマリーアストロサイトへの mRNA-LNP (ND1-2-L7) の添加及び分化誘導

実施例 10 の「1. ラットプライマリーアストロサイトへの mRNA-LNP の添加」に記載の方法に従い、ラットプライマリーアストロサイトを取得し、一晩培養した。翌日、培養培地で希釈した mRNA-LNP (ND1-2-L7) を終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、培養したラットプライマリーアストロサイトを含むウェルに添加し 24 時間培養した。コントロールのウェルには培養培地を添加した。なお、実施例 10 の「1. ラットプライマリーアストロサイトへの mRNA-LNP の添加」に記載の B-27 (登録商標) サプリメント、FBS (Cytiva 社、SH30070.03) 及び PS を含有する DMEM/F12 培地を、培養培地として用いた。

[0313] mRNA-LNP 添加の 24 時間後に、培養培地を除去し分化転換培地に

変更し、2～3日ごとに培地交換した。分化転換培地には、実施例10の「3. 神経細胞マーカーの発現確認」に記載の分化転換培地を使用し、当該培地を200 μ L／ウェル添加した。

[0314] 2. イムノブロット法によるNeuroD1タンパク質及びDCXタンパク質の発現確認

上記のmRNA-LNP添加前(0日目)、並びに添加後8時間、1日目、2日目、4日目、6日目に、培養培地を除去し、PBSで洗浄し、RIPA Buffer (SIGMA-Aldrich社、R0278-50ML)を用いて細胞を溶解した。なお、mRNA-LNP添加の24時間後の培地交換前に、mRNA-LNP添加後1日目の細胞溶解を実施した。ロウリー法によるタンパク定量後、各5 μ gのタンパク質を電気泳動し、抗NeuroD1抗体 (Santa Cruz Biotechnology社、sc46684)を用いたイムノブロット法によりNeuroD1タンパク質の発現を検出した。また、抗DCX抗体 (Cell Signaling Technology社、4604S)を用いたイムノブロット法によりDCXタンパク質の発現を検出した。

[0315] その結果、NeuroD1タンパク質は、mRNA-LNP添加後8時間において最大の発現量を示し、添加後1日目には発現が減少することが明らかになった。この結果はmRNA-LNPがラットプライマリーアストロサイトに取り込まれ、ラットプライマリーアストロサイトにおいてNeuroD1タンパク質が一過性に発現していることを示す。また、DCXタンパク質は、mRNA-LNP添加後1日目から発現が上昇し、mRNA-LNP添加後6日目においても発現が上昇していることが明らかになった。これらの結果は、カチオン性脂質として化合物1 (Ex1)を含むLNPを用いた場合(実施例10)だけでなく、化合物2 (Ex2)を含むLNPを用いた場合においても、NeuroD1 mRNAをラットプライマリーアストロサイトに送達することができること、そのNeuroD1 mRNAからNeuroD1タンパク質がラットプライマリーアストロサイトにおいて発現

し、当該タンパク質が機能を発揮したことにより *NeuroD1* mRNA によりラットプライマリーアストロサイトが神経細胞へ変換されたことを示す。

[0316] (実施例 14) カニクイザル脳梗塞モデルの脳内への *NeuroD1* mRNA-LNP (ND1-2-L7) 投与及び運動機能の観察

実施例 11 及び 12 と同様に、カニクイザル脳梗塞モデルにおいて、ND1-2-L7 を評価した。本実施例では、コントロール群：N=2、薬剤投与群：N=2 とし、mRNA-LNP として、薬剤投与群 (*NeuroD1* mRNA-LNP (ND1-2-L7) 群) の 2 個体に ND1-2-L7 を、コントロール群の 2 個体に eGFP mRNA-L7 を、エンドセリン-1 注入後 21 日目 (慢性期) に投与した。

[0317] mRNA-LNP で処置した *NeuroD1* mRNA-LNP (ND1-2-L7) 群及びコントロール群の各個体に関して、エンドセリン-1 注入処置前 (0 日目)、並びにエンドセリン-1 注入後 1、7、14、21、22、28、42、56、70 及び 84 日目に、mRS (表 1) に基づく観察を実施した。なお、実施例 12 と同様に、エンドセリン-1 注入後 28 日目以降は 2 週間毎に行動評価を実施することとしたが、コントロール群のエンドセリン-1 注入後 70 日目 (mRNA-LNP 投与後 49 日目) の行動評価としては、コントロール群の各個体をエンドセリン-1 注入後 69 又は 70 日目 (mRNA-LNP 投与後 48、又は 49 日目) に評価した。この結果を、本実施例においてはコントロール群のエンドセリン-1 注入後 70 日目 (mRNA-LNP 投与後 49 日目) の結果とした。

[0318] その結果、*NeuroD1* mRNA-LNP (ND1-2-L7) 群及びコントロール群のいずれにおいても、mRNA-LNP 投与後 1 日目は運動機能に差がなく mRNA-LNP 投与前と同様の運動機能障害が認められた。しかしながら、コントロール群ではエンドセリン-1 注入後 84 日目 (mRNA-LNP 投与後 63 日目) 時点においても運動機能が改善されなかったのに対し、*NeuroD1* mRNA-LNP (ND1-2-L7) 群

ではエンドセリンー1注入後56日目(mRNA-LNP投与後35日目)以降より運動機能の回復を示し、エンドセリンー1注入後84日目(mRNA-LNP投与後63日目)時点では運動機能の顕著な回復が確認された(図14)。このことから、実施例11及び12で評価したND1-1-L1だけでなく、ND1-2-L7を用いても、NeuroD1 mRNA-LNP投与により脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが明らかになった。

[0319] ND1-1-L1及びND1-2-L7に含まれるmRNAは、UTRの配列、ポリA配列の長さ、修飾ヌクレオシドの有無等が異なる。また、ND1-1-L1及びND1-2-L7は、異なるカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子中にmRNAがそれぞれ封入されている。実施例11、12及び本実施例の結果から、mRNAの配列等及び脂質ナノ粒子の成分が異なっても、NeuroD1 mRNA-LNPがヒトNeuroD1タンパク質を目的の細胞において発現させることが可能である限りにおいて、NeuroD1 mRNA-LNPの投与により、脳障害に伴う運動機能障害を回復させることができることが示された。

[0320] (実施例15) カチオン性脂質 化合物1 (Ex1) の製造

窒素雰囲気下にて、氷冷下、8-ブロモオクタン酸(75.5g)及び9-ヘプタデカノール(86.8g)のN,N-ジメチルホルムアミド(755mL)の混合物に、N,N-(ジメチルアミノ)ピリジン(61.9g)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(97.2g)を加えた。その後、室温で28時間攪拌した。反応混合物を氷水に加え、トルエンで抽出した。水層をトルエンで抽出し、合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。洗液をトルエン及び酢酸エチルで抽出し、合わせた有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。有機層を減圧下で濃縮した後、ヘキサンを加え、再び減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製して、8-クロロオクタン酸ヘプタデカン-9-イル(80.3g; 以下「

[0323] 中間体 1 (PE x 1) 及び化合物 1 (E x 1) について、プラスの高電圧をイオン化に使用してエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) を行った。得られた質量電荷比 (m/z) は以下のとおりである。

中間体 1 (PE x 1) ESI+ m/z : 440

化合物 1 (E x 1) ESI+ m/z : 906

[0324] また、化合物 1 (E x 1) の NMR スペクトル解析を行った。その結果を以下に示す (^1H -NMR スペクトルにおける代表的なシグナル値を示す。t: 三重線、quin: 五重線、td: 三重二重線、m: 多重線、brd: ブロード二重線)。

NMR (500 MHz, CDCl_3): δ : 0.88 (t, $J=7.00\text{ Hz}$, 12 H), 1.23–1.42 (m, 66 H), 1.45–1.74 (m, 14 H), 2.04 (td, $J=11.80$, 1.98 Hz, 2 H), 2.27 (t, $J=7.57\text{ Hz}$, 4 H), 2.36–2.52 (m, 7 H), 2.94 (brd, $J=11.47\text{ Hz}$, 2 H), 3.58 (t, $J=5.43\text{ Hz}$, 2 H), 4.86 (quin, $J=6.23\text{ Hz}$, 2 H)

[0325] (実施例 16) カチオン性脂質 化合物 2 (E x 2) の製造

7, 7'-アザンジイルジ (ヘプタン酸) ジエチル (10.7 g) とジクロロメタン (107 mL) の混合物に 1, 1'-カルボニルジイミダゾール (7.35 g) を室温に加え、室温で 16 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル) で精製し、7, 7'-[(1H-イミダゾール-1-カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ジエチル (13.5 g; 以下「中間体 2a (PE x 2a)」とも称する) を油状物として得た。表 6 に中間体 2a (PE x 2a) の化学構造式を示す。

[0326] 7, 7'-[(1H-イミダゾール-1-カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ジエチル (3 g) とアセトニトリル (30 mL) の混合物にヨウ化メチル (2.2 mL) を室温に加え、室温で 2 時間攪拌した。反応混合物にヨウ化メチル (2.2 mL) を室温で追加し、室温で 16 時間攪拌し

た。反応混合物を減圧下で濃縮し、1-〔ビス(7-エトキシ-7-オキソヘプチル)カルバモイル〕-3-メチル-1H-イミダゾール-3-イウム=ヨージド(4.2g;以下「中間体2b/I(PE×2b/I)」とも称する)を油状物として得た。表6に中間体2b/I(PE×2b/I)の化学構造式を示す。

[0327] 1-〔ビス(7-エトキシ-7-オキソヘプチル)カルバモイル〕-3-メチル-1H-イミダゾール-3-イウム=ヨージド(4.2g)とN,N-ジメチルホルムアミド(10mL)の混合物に、2-(ジメチルアミノ)-1-(4-ヒドロキシピペリジン-1-イル)エタン-1-オン(1.45g)とテトラヒドロフラン(10mL)の混合物を室温に加え、次いで水素化ナトリウム(60% in oil, 310mg)を室温に加え、室温で3時間攪拌した。反応混合物に1M塩酸を加えてpH7程度にした。酢酸エチルで希釈後、水を加え、有機層を分離し、水層を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水/水(1/1)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。得られた残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、7,7'-〔(〔1-(N,N-ジメチルグリシル)ピペリジン-4-イル〕オキシ)カルボニル)アザンジイル〕ジ(ヘプタン酸)ジエチル(1.93g;以下「中間体2c(PE×2c)」とも称する)を油状物として得た。表6に中間体2c(PE×2c)の化学構造式を示す。

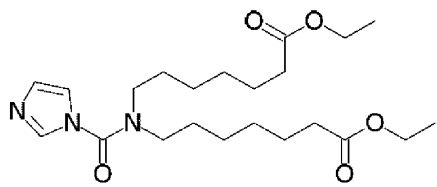
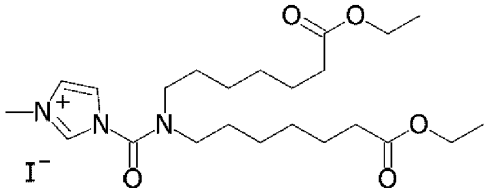
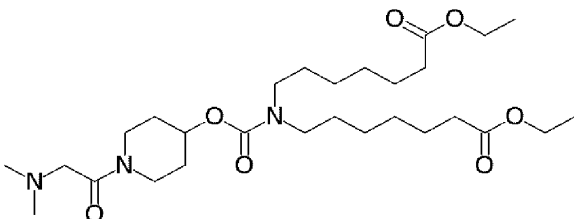
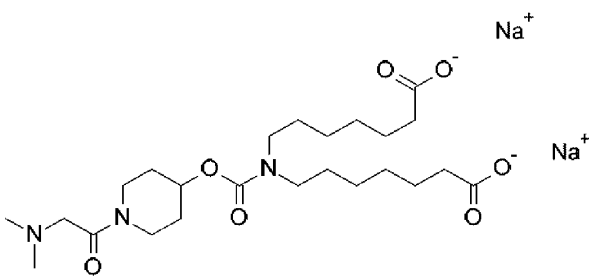
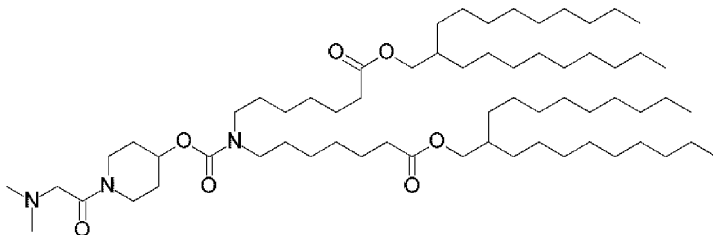
[0328] 7,7'-〔(〔1-(N,N-ジメチルグリシル)ピペリジン-4-イル〕オキシ)カルボニル)アザンジイル〕ジ(ヘプタン酸)ジエチル(1.13g)、テトラヒドロフラン(17mL)及びエタノール(17mL)の混合物に、1M水酸化ナトリウム水溶液(4.17mL)を室温に加え、室温で72時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、エタノール(100mL)を加えて濃縮することで、7,7'-〔(〔1-(N,N-ジメチルグリシル)ピペリジン-4-イル〕オキシ)カルボニル)アザンジイル〕ジ(ヘプタン酸)ナトリウム(1.21g;以下「中間体2d/Na(P

E x 2 d / N a) 」とも称する)を固体として得た。表6に中間体2 d / N a (P E x 2 d / N a) の化学構造式を示す。

[0329] 7, 7' - [({ [1 - (N, N - ジメチルグリシル) ピペリジン - 4 - イル] オキシ} カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ナトリウム (2 0 0 m g) とジクロロメタン (3 m L) の混合物に2 - ノニルウンデカン - 1 - オール (2 7 0 m g) 、 1 - [ビス (ジメチルアミノ) メチレン] - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾロ [4, 5 - b] ピリジニウム3 - オキシドヘキサフルオロホスファート (4 3 0 m g) 、 N, N - ジイソプロピルエチルアミン (0. 4 m L) 及びN, N - ジメチルアミノピリジン (1 0 m g) を室温に加え、室温で1 6 時間攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、室温で1 0 分間攪拌した。ジクロロメタンで希釈し、水を加え、フェーズセパレータを用いて抽出操作を行い、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール) で精製後、粗精製物をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル) で精製することで、7, 7' - [({ [1 - (N, N - ジメチルグリシル) ピペリジン - 4 - イル] オキシ} カルボニル) アザンジイル] ジ (ヘプタン酸) ビス (2 - ノニルウンデシル) (1 9 7 m g ; 以下「化合物2 (E x 2) 」と称する) を油状物として得た。表6に化合物2 (E x 2) の化学構造式を示す。

[0330]

[表6]

化合物名	化学構造式
中間体2a (PEx2a)	
中間体2b/I (PEx2b/I)	
中間体2c (PEx2c)	
中間体2d/Na (PEx2d/Na)	
化合物2 (Ex2)	

[0331] 中間体 2 a (P E x 2 a)、中間体 2 b / I (P E x 2 b / I)、中間体 2 c (P E x 2 c)、中間体 2 d / N a (P E x 2 d / N a) 及び化合物 2 (E x 2) について、プラスの高電圧をイオン化に使用してエレクトロスプレ

レーイオン化質量分析 (ESI-MS) を行った。得られた質量電荷比 (m/z) は以下のとおりである。

中間体 2 a (PE x 2 a) ESI+ m/z : 424.5

中間体 2 b/l (PE x 2 b/l) ESI+ m/z : 438.5

中間体 2 c (PE x 2 c) ESI+ m/z : 542.7

中間体 2 d/Na (PE x 2 d/Na) ESI+ m/z : 486.

5

化合物 2 (E x 2) ESI+ m/z : 1047.3

[0332] また、化合物 2 (E x 2) の NMR スペクトル解析を行った。その結果を以下に示す (^1H -NMR スペクトルにおける代表的なシグナル値を示す。m : 多重線、d : 二重線)。

NMR (500 MHz, CD_3OD) : δ : 0.86–0.93 (m, 12 H), 1.23–1.41 (m, 72 H), 1.52–1.73 (m, 12 H), 1.85–1.99 (m, 2 H), 2.28–2.35 (m, 10 H), 3.21–3.27 (m, 6 H), 3.47–3.54 (m, 2 H), 3.69–3.80 (m, 2 H), 3.99 (d, $J=5.50\text{ Hz}$, 4 H), 4.85–4.91 (m, 1 H)

産業上の利用可能性

[0333] 本発明の方法により、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞（特に、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞及び穿通枝支配領域に脳障害を有する亜急性期～慢性期の脳梗塞）などの脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルを作出することができる。本発明の非ヒト霊長類動物モデルは、脳梗塞治療剤、特に、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞治療剤の探索及び開発において、有効な動物モデルとなることが期待される。また、本発明の医薬組成物又は治療方法は、穿通枝梗塞、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞及び亜急性期～慢性期の脳梗塞（特に、亜急性期～慢性期の穿通枝梗塞及び穿通枝支配領域に脳障害を有する亜急性期～慢性期の脳梗塞）などの脳梗

塞の治療に有用であると期待される。

- [0334] 配列番号1 : NeuroD1発現ベクター AAV-GFAP-NeuroD1-IRES-GFP
- 配列番号2 : コントロールベクター AAV-GFAP-GFP
- 配列番号3 : GFP遺伝子 (CDS)
- 配列番号4 : GFP
- 配列番号5 : マウスNeuroD1遺伝子 (CDS)
- 配列番号6 : マウスNeuroD1タンパク質
- 配列番号7 : ヒトNeuroD1遺伝子 (CDS)
- 配列番号8 : ヒトNeuroD1タンパク質
- 配列番号9 : エンドセリン-1 (ヒト由来)
- 配列番号10 : ヒトNeuroD1遺伝子 (CDS)
- 配列番号11 : ヒトNeuroD1 mRNA配列 (ND1-2)
- 配列番号12 : pRC-AAV9
- 配列番号13 : 修飾ヌクレオシドを含むヒトNeuroD1 mRNA配列 (ND1-2)
- 配列番号14 : ヒトGFAPプロモーター

- [0335] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法。
- [請求項2] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される1又は2以上の神経核にエンドセリンを投与する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも3つの神経核にエンドセリンを投与する、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも4つの神経核にエンドセリンを投与する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の5つ全ての神経核にエンドセリンを投与する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 脳梗塞が亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 脳梗塞が穿通枝梗塞である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 脳梗塞が、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項8又は9に記載の方法。
- [請求項11] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期

の脳梗塞である、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

[請求項12] 前記神経核を標的とするように投与部位を定め、当該投与部位にエンドセリンを投与することを含む、請求項 2 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] 非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

(a) 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群から選択される少なくとも 4 つの神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

(b) 当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

[請求項14] 非ヒト霊長類の脳基底核・視床領域にエンドセリンを投与し、それにより脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含む、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、

(a) 脳基底核・視床領域の、被殻、尾状核、淡蒼球、視床外側腹側核及び視床後腹側核からなる群の 5 つ全ての神経核を標的とするように投与部位を定めるステップと、

(b) 当該投与部位にエンドセリンを投与するステップを含む、方法。

[請求項15] 前記投与部位が少なくとも 3 か所である、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

[請求項16] 非ヒト霊長類がカニクイザルである、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項17] 投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも $10 \mu\text{g}$ である、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項18] エンドセリンがエンドセリン-1 である、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項19] 請求項1～18のいずれか一項に記載の方法で作製された、大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を有する、脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデル。
- [請求項20] 亜急性期～慢性期の脳梗塞の非ヒト霊長類動物モデルの作製方法であって、カニクイザルにエンドセリンを投与し、それにより大脳基底核障害、視床障害及び内包障害を誘導することを含み、エンドセリンの投与部位が下記を含む方法：
- ブレグマを基点として (i) B : 1～3 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、(ii) B : 4～6 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、及び (iii) B : 8～12 mm、L : 4～13 mm、D : 12～20 mm にそれぞれ位置する投与部位。
- [請求項21] エンドセリンの投与部位が下記 (1)～(3) のいずれか1つを含む、請求項20に記載の方法：
- (1) ブレグマを基点として (i) B : 1～3 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、(ii) B : 4～6 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、(iii) B : 8～10 mm、L : 4～6 mm、D : 12～14 mm、及び (iv) B : 8～10 mm、L : 11～13 mm、D : 14～16 mm にそれぞれ位置する投与部位、
- (2) ブレグマを基点として (i) B : 1～3 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、(ii) B : 4～6 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、及び (iii) B : 8～10 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm にそれぞれ位置する投与部位、及び
- (3) ブレグマを基点として (i) B : 1～3 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、(ii) B : 4～6 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm、及び (iii) B : 10～12 mm、L : 7～9 mm、D : 18～20 mm にそれぞれ位置する投与部位。
- [請求項22] エンドセリンの投与部位が下記 (1)～(3) のいずれか1つを含む、請求項20又は21に記載の方法：

(1) ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(iii) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び (iv) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位、

(2) ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、及び (iii) B : 9 mm、L : 8 mm、D : 19 mm にそれぞれ位置する投与部位、及び

(3) ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、及び (iii) B : 11 mm、L : 8 mm、D : 19 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[請求項23] エンドセリンの投与部位が下記の投与部位を含む、請求項20～22のいずれか一項に記載の方法：

ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(iii) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び (iv) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[請求項24] エンドセリンの投与部位が下記の投与部位である、請求項20～23のいずれか一項に記載の方法：

ブレグマを基点として (i) B : 2 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(ii) B : 5 mm、L : 8 mm、D : 19 mm、(iii) B : 9 mm、L : 5 mm、D : 13 mm、及び (iv) B : 9 mm、L : 12 mm、D : 15 mm にそれぞれ位置する投与部位。

[請求項25] 脳梗塞が慢性期の脳梗塞である、請求項20～24のいずれか一項に記載の方法。

[請求項26] 脳梗塞が穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞である、請求項20～25のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項27] 投与部位あたりのエンドセリンの投与量が少なくとも $10\mu\text{g}$ である、請求項20～26のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項28] エンドセリンがエンドセリン-1である、請求項20～27のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項29] 請求項20～28のいずれか一項に記載の方法で作製された、亜急性期～慢性期の脳梗塞カニクイザルモデル。
- [請求項30] 請求項19又は29に記載の非ヒト霊長類動物モデルに、被験物質を投与する工程、及び該非ヒト霊長類動物モデルにおける脳梗塞に対する該被験物質の効果を判定する工程を含む、脳梗塞治療剤のスクリーニング方法。
- [請求項31] NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物。
- [請求項32] NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物。
- [請求項33] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項31又は32に記載の医薬組成物。
- [請求項34] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、上記請求項31～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項35] 急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項31に記載の医薬組成物。
- [請求項36] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項31～35のいずれか一項に記載の医薬組成物。

- [請求項37] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列に対して70%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項31～36のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項38] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項31～37のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項39] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドがNeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、請求項31～38のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項40] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項39に記載の医薬組成物。
- [請求項41] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' UTR及び／又は3' UTRを含む、請求項39又は40に記載の医薬組成物。
- [請求項42] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号11又は13の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、請求項39～41のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項43] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、請求項39～42のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項44] ポリA配列の長さが50～200ヌクレオチドである、請求項43に記載の医薬組成物。
- [請求項45] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが5' キャップ構造を有する、請求項39～44のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項46] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシ

ドを含むmRNAである、請求項39～45のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項47] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、請求項46に記載の医薬組成物。

[請求項48] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項47に記載の医薬組成物。

[請求項49] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム(DDS)中に内封されている、請求項39～48のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項50] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項39～49のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項51] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項31～38のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項52] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項31～38及び51のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項53] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターのいずれかである、請求項52に記載の医薬組成物。

[請求項54] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項53に記載の医薬組成物。

[請求項55] 請求項31～54のいずれか一項に記載の医薬組成物、又はNeuroD1タンパク質、若しくはNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝梗塞、又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療方法。

- [請求項56] 請求項31～54のいずれか一項に記載の医薬組成物、又はNeuroD1タンパク質、若しくはNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含む、穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療方法。
- [請求項57] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項55又は56に記載の方法。
- [請求項58] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項55～57のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項59] 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項55に記載の方法。
- [請求項60] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項55～59のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項61] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列に対して70%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項55～60のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項62] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項55～61のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項63] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、請求項55～62のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項64] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項63に記載の方

法。

- [請求項65] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' UTR及び／又は3' UTRを含む、請求項63又は64に記載の方法。
- [請求項66] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号11又は13の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、請求項63～65のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項67] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、請求項63～66のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項68] ポリA配列の長さが50～200ヌクレオチドである、請求項67に記載の方法。
- [請求項69] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' キャップ構造を有する、請求項63～68のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項70] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むmRNAである、請求項63～69のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項71] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、請求項70に記載の方法。
- [請求項72] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項71に記載の方法。
- [請求項73] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム（DDS）中に内封されている、請求項63～72のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項74] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項63～73のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項75] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に投与する工程を含み、前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項

55～62のいずれか一項に記載の方法。

- [請求項76] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを対象に投与する工程を含む、請求項55～62及び75のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項77] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、請求項76に記載の方法。
- [請求項78] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項77に記載の方法。
- [請求項79] 穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療に使用するための、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項80] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療に使用するための、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項81] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項79又は80に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。
- [請求項82] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項79～81のいずれか一項に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。
- [請求項83] 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項79に記載の、上記使用のためのタンパク質又はポリヌクレオチド。
- [請求項84] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項79～83のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項85] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番

号 7 又は 10 に示す塩基配列に対して 70% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項86] NeuroD1 タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号 7 又は 10 に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 79～85 のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項87] 前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA である、請求項 79～86 のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項88] NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA が配列番号 11 又は 13 の 44 位～1114 位又は 44 位～1120 位の、NeuroD1 タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項 87 に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項89] NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA が、5' UTR 及び／又は 3' UTR を含む、請求項 87 又は 88 に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項90] NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA が、配列番号 11 又は 13 の 1 位～1231 位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含む mRNA である、請求項 87～89 のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項91] NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA が、ポリ A 配列を含む、請求項 87～90 のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項92] ポリ A 配列の長さが 50～200 ヌクレオチドである、請求項 91 に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。

[請求項93] NeuroD1 タンパク質をコードする mRNA が、5' キャップ構造を有する、請求項 87～92 のいずれか一項に記載の、上記使用

のためのポリヌクレオチド。

- [請求項94] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むポリヌクレオチドである、請求項87～93のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項95] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、請求項94に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項96] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項95に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項97] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム(DDS)中に内封されている、請求項87～96のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項98] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項87～97のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項99] 前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項79～86のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項100] 前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、請求項79～86及び99のいずれか一項に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項101] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、請求項100に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項102] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項101に記載の、上記使用のためのポリヌクレオチド。
- [請求項103] 穿通枝梗塞又は亜急性期～慢性期の脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパ

ク質をコードするポリヌクレオチドの使用。

- [請求項104] 穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞の治療用の医薬組成物の製造における、NeuroD1タンパク質又はNeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用。
- [請求項105] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、亜急性期～慢性期の脳梗塞である、請求項103又は104に記載の使用。
- [請求項106] 穿通枝梗塞又は穿通枝支配領域に脳障害を有する脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項103～105のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項107] 亜急性期～慢性期の脳梗塞が、慢性期の脳梗塞である、請求項103に記載の使用。
- [請求項108] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号8に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項103～107のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項109] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列に対して70%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項103～108のいずれかに記載の使用。
- [請求項110] NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが配列番号7又は10に示す塩基配列を含むポリヌクレオチドである、請求項103～109のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項111] 前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするmRNAである、請求項103～110のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項112] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが配列番号11又は13の44位～1114位又は44位～1120位の、NeuroD1タンパク質をコードする塩基配列を含む、請求項111に記載の

使用。

- [請求項113] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' UTR及び／又は3' UTRを含む、請求項111又は112に記載の使用。
- [請求項114] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、配列番号11又は13の1位～1231位の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むmRNAである、請求項111～113のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項115] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、ポリA配列を含む、請求項111～114のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項116] ポリA配列の長さが50～200ヌクレオチドである、請求項115に記載の使用。
- [請求項117] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、5' キャップ構造を有する、請求項111～116のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項118] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが修飾ヌクレオシドを含むmRNAである、請求項111～117のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項119] 修飾ヌクレオシドがN1-メチルシュードウリジンである、請求項118に記載の使用。
- [請求項120] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが、一部又は全てのウリジンがN1-メチルシュードウリジンに置換されたポリヌクレオチドである、請求項119に記載の使用。
- [請求項121] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが薬物送達システム（DDS）中に内封されている、請求項111～120のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項122] NeuroD1タンパク質をコードするmRNAが脂質ナノ粒子中に封入されている、請求項111～121のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項123] 前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項103～110のい

ずれか一項に記載の使用。

[請求項124] 前記ポリヌクレオチドが、NeuroD1タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターである、請求項103～110及び123のいずれか一項に記載の使用。

[請求項125] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターである、請求項124に記載の使用。

[請求項126] 発現ベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項125に記載の使用。