

明 細 書

発明の名称：

ＴＡＵスプライススイッチングオリゴヌクレオチドおよびＴＡＵ関連疾患を治療または予防するための医薬組成物

技術分野

[0001] 本出願は、日本国特許出願第２０２３－０１９３０５号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、ＴＡＵ p r e－m R N Aを標的とするスプライススイッチングオリゴヌクレオチド、および前記スプライススイッチングオリゴヌクレオチドを含むＴＡＵ関連疾患を治療または予防するための医薬組成物を含む。

背景技術

[0002] ＴＡＵは、中枢神経系の神経細胞に多く発現する微小管結合タンパク質であり、軸索の微小管安定化に関与する。ＴＡＵの異常は、軸索変性や神経原線維変化、ＴＡＵの異局在につながり、タウオパチーなどの疾患をもたらす。ＴＡＵの発現低下を目的として、g a p m e rと呼ばれるアンチセンスオリゴヌクレオチドが多く開発されている。G a p m e rは、リボヌクレアーゼH（R N a s e H）によるDNA／RNA二本鎖を利用した標的RNAの切断を誘導することにより、標的タンパク質の発現を調節する。

[0003] スプライシングは遺伝子から転写されたmRNA前駆体（p r e－m R N A）からイントロンが除かれエクソンが連結されるプロセスであり、これを経てp r e－m R N Aからタンパク質をコードする成熟mRNAが生じる。スプライシングを調節し機能的なタンパク質を回復するスプライシング調節薬の開発が進められており、脊髄性筋萎縮症を対象として実用化されている。しかしながら、スプライシングの調節によりＴＡＵの発現を低下させる薬剤はこれまで上市されていない。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本開示は、T A U p r e - m R N A を標的とするスプライススイッチングオリゴヌクレオチド、およびこれを含むT A U関連疾患を治療または予防するための医薬組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0005] 一態様において、本開示は、T A U p r e - m R N A のイントロン1 B に結合するスプライススイッチングオリゴヌクレオチドを提供する。
- [0006] 一態様において、本開示は、前記スプライススイッチングオリゴヌクレオチドを含む、T A U 関連疾患を治療または予防するための医薬組成物を提供する。

発明の効果

- [0007] 本開示は、T A U p r e - m R N A のスプライシングを変更してT A U の発現を低下させることによりT A U 関連疾患を治療または予防することを可能とする。

図面の簡単な説明

- [0008] [図1A]エクソン1 B を挿入させるセンス配列の同定(1)。オリゴヌクレオチドが相補するT A U p r e - m R N A のセンス鎖配列(配列番号38)とR T - P C R に用いたプライマー(118、120)の位置、および代表的なT A U 転写物を示す。
- [図1B]エクソン1 B を挿入させるセンス配列の同定(2)。i P S 神経細胞に1 μ M のオリゴヌクレオチド(比較例化合物1、S c r a m b l e、化合物2~5)を15日間処置し、T A U (上)とコントロールのA C T B (下)に対するR T - P C R を実施した。P C R の陽性対照には鋳型合成D N A を用いた(右端)。分子量から想定される転写物を右に記載した。
- [図2A]サンガーシーケンスによるエクソン構成の確認(1)。図1 B の化合物4 処置サンプルで認められた335 b p 付近、235 b p 付近、200 b p 付近の3つのバンドをゲルからそれぞれ切り出し、プラスミドヘクロー

ニングし、インサートが挿入されているかどうかをPCRおよび電気泳動で確認した。

[図2B]サンガーシーケンスによるエクソン構成の確認(2)。サンガーシーケンスにて評価した図2A(上)のクローン2番の塩基配列。フォワードプライマーからのsingle endの結果を示す。エクソン1Bの中に含まれる終止コドン(TGA)を下線および「STOP」でハイライトした。

[図2C]サンガーシーケンスによるエクソン構成の確認(3)。サンガーシーケンスにて評価した図2A(中)のクローン10番の塩基配列。フォワードプライマーからのsingle endの結果を示す。エクソン1Bの中に含まれる終止コドン(TGA)を下線および「STOP」でハイライトした。

[図2D]サンガーシーケンスによるエクソン構成の確認(4)。サンガーシーケンスにて評価した図2A(下)のクローン24番の塩基配列。フォワードプライマーからのsingle endの結果を示す。

[図3A]TAU productive mRNAとTAU nonproductive mRNAとを選択的に定量するqPCRの構築(1)。(上)TAU nonproductive mRNAを選択的に検出するために設計したプライマー(矢印)とプローブ(線)の位置を示す。(下)各種鋳型合成DNAを段階希釈して、TAU nonproductive mRNA検出用セットにてqPCRを実施し、得られたCt値とコピー数をグラフに示した。10⁶コピーでCt値が40より大きくて算出されない場合はNDと記載した。

[図3B]TAU productive mRNAとTAU nonproductive mRNAとを選択的に定量するqPCRの構築(2)。(上)TAU productive mRNAを選択的に検出するために設計したプライマー(矢印)とプローブ(線)の位置を示す。(下)各種鋳型合成DNAを段階希釈して、TAU productive mRNA検出用

セットにてqPCRを実施し、得られたCt値とコピー数をグラフに示した。

[図3C]TAU productive mRNAとTAU nonproductive mRNAとを選択的に定量するqPCRの構築(3)。(上)TAU pre-mRNAを選択的に検出するために設計したプライマー(矢印)とプローブ(線)の位置を示す。(下)各種鋳型合成DNAを段階希釈して、TAU pre-mRNA検出用セットにてqPCRを実施し、得られたCt値とコピー数をグラフに示した。

[図4A]オリゴヌクレオチドのスプライススイッチング活性の精査(1)。化合物1～6が相補するTAU pre-mRNAのセンス鎖配列(配列番号38)とTAU転写物(エクソン4に繋がるproductive mRNAとnonproductive mRNA)を示す。

[図4B]オリゴヌクレオチドのスプライススイッチング活性の精査(2)。iPS神経細胞に1μMのオリゴヌクレオチド(Scramble、比較例化合物1、化合物1～6)を15日間処置し、nonproductive mRNAとproductive mRNA、およびACTBのコピー数を定量した。ACTBで補正した後、非処置を100%になるようにグラフを作成した。

[図5]TAUタンパク質の絶対定量。(上)中枢神経系に発現するTAUタンパク質のバリエーションを示す。N末端インサートが2、1、または0個挿入するパターンとC末端の微小管結合ドメインが4または3個挿入するパターンとの組合せで、合計6種類のバリエーションとなる。一般的な略称とアミノ酸数を記載した。(下)市販のHTRF(登録商標)キットにて最も長い2N4R TAU組換えタンパク質(バツ、点線)と最も短いON3R TAU組換えタンパク質(丸、実線)を定量し、組換えタンパク質の濃度と得られた蛍光のシグナルをグラフにプロットした。

[図6A]濃度依存性試験I(1)。iPS神経細胞に所定濃度の化合物7を15日間処置し、各種発現量を定量した。

[図6B]濃度依存性試験 I (2)。i P S 神経細胞に所定濃度の化合物 8 を 15 日間処置し、各種発現量を定量した。

[図6C]濃度依存性試験 I (3)。i P S 神経細胞に所定濃度の *gapmer* (比較例化合物 1) を 15 日間処置し、各種発現量を定量した。

[図7A] *TAU nonproductive mRNA* が増加する神経細胞の同定 (1)。i P S 神経細胞に 3 μ M の化合物 7 または 8 を 15 日間処置した後、*TAU nonproductive mRNA* を可視化した。スケールバーは 10 μ m を示す。

[図7B] *TAU nonproductive mRNA* が増加する神経細胞の同定 (2)。図 7 A の操作後、成熟神経のマーカーの *NeuN* と抑制性神経のマーカーの *GABA* に対する抗体で細胞を免疫染色した。スケールバーは 10 μ m を示す。

[図8A] *scRNA-seq* (1)。i P S 神経細胞へのオリゴヌクレオチド処置のスケジュールを示す。

[図8B] *scRNA-seq* (2)。各細胞の遺伝子発現プロファイルを次元圧縮することで、2 次元にクラスタリングを実施した結果を示す。

[図8C] *scRNA-seq* (3)。各クラスターにおけるマーカー遺伝子の発現のヒートマップを示す。

[図8D] *scRNA-seq* (4)。興奮性神経と抑制性神経の集団における、*gapmer* (比較例化合物 1)、化合物 7、または化合物 8 処置群の *TAU (MAPT)* 発現量をバイオリンプロットで示す。

[図8E] *scRNA-seq* (5)。ブートストラップ法による化合物処置群が興奮性神経と抑制性神経の *TAU (MAPT)* の発現量を低下させた割合の差の平均値および 95% 信頼区間を示す。

[図9A] 内在性 *TAU* タンパク質の減少による過剰な神経活動の同期の抑制 (1)。i P S 神経細胞と i P S アストロサイトの培養系へのオリゴヌクレオチド処置のスケジュールを示す。

[図9B] 内在性 *TAU* タンパク質の減少による過剰な神経活動の同期の抑制 (

2)。KCI処理のpre（左）とpost（右）のラスタプロットを示す。個別の細い線：スパイク、個別の太い線：バースト（＝数秒間持続する連続スパイクによって発生）、四角：ネットワークバースト、棘：spike histogramを示す。

[図9C]内在性TAUタンパク質の減少による過剰な神経活動の同期の抑制（3）。Preでのネットワークバースト数を100%になるように補正して、postの割合を示した。N=6ウェル。Paired T-tests： $* < 0.05$ 、 $** < 0.01$ 。

[図10A]濃度依存性試験II（1）。iPS神経細胞に所定濃度の化合物7を15日間処置し、各種発現量を定量した。

[図10B]濃度依存性試験II（2）。iPS神経細胞に所定濃度の化合物8を15日間処置し、各種発現量を定量した。

[図10C]濃度依存性試験II（3）。iPS神経細胞に所定濃度のgapmer（比較例化合物2）を15日間処置し、各種発現量を定量した。

[図10D]濃度依存性試験II（4）。iPS神経細胞に所定濃度のgapmer（比較例化合物3）を15日間処置し、各種発現量を定量した。

発明を実施するための形態

[0009] 特に具体的な定めのない限り、本明細書で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されたとおりの意味を有する。以下にいくつかの本明細書で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本明細書において、一般的な理解に優先する。

[0010] 本開示は、TAU pre-mRNAのスプライシングを変更することにより、TAUタンパク質の量を低下させることができるオリゴヌクレオチドに関する。

[0011] TAUは、中枢神経系の神経細胞に多く発現する微小管結合タンパク質であり、軸索の微小管安定化に関与する。TAUは、N末端から、N末端領域、プロリン・リッチ領域、微小管結合領域、およびC末端領域の4つの領域

に分けられる。ヒトのT A U遺伝子は17番染色体に存在する遺伝子であり、MAPT (microtubule-associated protein tau) 遺伝子とも呼ばれる。T A U pre-mRNAとは、T A U遺伝子から転写されスプライシングを受けてないmRNAを意味する。ヒトT A U遺伝子は少なくとも16個のエクソンを有することが報告され、T A U pre-mRNAの選択的スプライシングにより、ヒトでは352～441アミノ酸長の6種類のT A Uタンパク質のバリエーションが生じる。N末端領域にはN1とN2の2種類のインサートがあり、それぞれエクソン2およびエクソン3にコードされる。微小管結合領域はR1～R4の4つのドメインに分けられ、R2がエクソン10にコードされる。N末端領域にはエクソン2およびエクソン3の両方が欠損した0N型、エクソン2のみが存在する1N型、エクソン2およびエクソン3の両方が存在する2N型の3種類があり、微小管結合領域にはエクソン10が欠損した3R型とエクソン10が存在する4R型の2種類があり、これらの組み合わせでバリエーションは6種類となる。

[0012] スプライシングは、遺伝子から転写されたpre-mRNAからイントロンが除かれエクソンが連結されるプロセスである。スプライシングでは、エクソンまたはイントロン中のエクソン内スプライシングエンハンサー (ESE) 配列、エクソン内スプライシングサイレンサー (ESS) 配列、イントロン内スプライシングエンハンサー (ISE) 配列、またはイントロン内スプライシングサイレンサー (ISS) 配列をRNA結合タンパク質 (RBP) が認識し、エクソンまたはイントロンのスキッピングまたはインクルージョン (挿入) を調節することが知られている。

[0013] 本発明者らは、ENST00000571311.5としてデータベースに登録されている、本来イントロンとして認識されるはずの135ヌクレオチド (nt) (配列番号1) がエクソンとして認識されエクソン1とエクソン2との間に挿入された転写物に着目した。本明細書において、この挿入配列に対応するDNAまたはRNA上の領域をエクソン1Bと呼ぶ。エクソン

1 Bの挿入により未成熟終止コドン (premature termination codon) が出現するため、エクソン1 Bを含むmRNAからTAUタンパク質は生じない。このmRNAはNMD (nonsense-mediated mRNA decay) により分解されると想定される。本開示において、遺伝子にコードされるタンパク質を生じるmRNAをproductive mRNA、生じないmRNAをnonproductive mRNAとも称する。

- [0014] 本明細書において、TAU pre-mRNAのエクソン1 B (TAU エクソン1 Bとも称する) とは、TAU pre-mRNAと配列番号1の配列とを最適な状態に (一致が最大となる状態に) アライメントしたときに配列番号1の配列に対応するTAU pre-mRNAの領域を意味し、配列番号1の配列からなるものに限定されない。本明細書において、塩基配列がRNAの配列を表す場合、当該塩基配列中のTはUを意味すると理解し、RNA配列を本明細書に記載の塩基配列とアライメントする場合、当該塩基配列中のTはUとみなす。

TAU エクソン1 B

AGGGGAGTGAATTCAGCTGAGAGCTGAGGA
ACCATTTGATCTGATGGCTGAGACACCACTGGGAA
GACTGGAGAGGCTTTTCTGGGCATGCAGTGCCAG
GCACAGGAGGAGCTGAGGGAAGATGACTAAGAG (配列番号1)

- [0015] 本開示のオリゴヌクレオチドは、TAU pre-mRNAに結合し、そのスプライシングを変更することができ、その結果、エクソン1 Bを含むTAU mRNAの量を増加させ、TAUタンパク質の量を低下させることができる。オリゴヌクレオチドは、そのヌクレオシドの塩基と相補的なpre-mRNAのヌクレオシドの塩基との間の水素結合により、pre-mRNAに結合する。オリゴヌクレオチドがpre-mRNAに結合することができるという場合、オリゴヌクレオチドが当該pre-mRNAと二本鎖を形

成できる程度の相補性を有することを意味し、オリゴヌクレオチドは *pre-mRNA* の配列と完全に相補的な配列を有する必要はない。相補的な塩基対としては、アデニン (A) とチミン (T)、アデニン (A) とウラシル (U)、シトシン (C) とグアニン (G) が挙げられる。

[0016] 本開示において、スプライシングを変更することができるオリゴヌクレオチドを、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO; *splice-switching oligonucleotide*) と称する。すなわち、本明細書における「オリゴヌクレオチド」なる用語は SSO を包含し、本明細書の「オリゴヌクレオチド」についての記載は SSO にも適用される。SSO として機能するオリゴヌクレオチドは RNase H による TAU *pre-mRNA* の分解を誘導しない。RNase H は DNA/RNA 二本鎖の RNA 鎖を特異的に切断する酵素である。SSO と異なり、*gapmer* と呼ばれるアンチセンスオリゴヌクレオチドはこの RNase H による標的 mRNA の分解を誘導する。実施例の実験 5 に記載のように、オリゴヌクレオチドを処置した細胞で *nonproductive mRNA* が増加する一方で *productive mRNA* が減少する場合、そのオリゴヌクレオチドは SSO として機能し、RNase H による TAU *pre-mRNA* の分解を誘導しないことがわかる。

[0017] 本明細書において、エクソン 1B とエクソン 2 との間のイントロンをイントロン 1B と称する。本開示のオリゴヌクレオチドは、TAU *pre-mRNA* のイントロン 1B に結合する。オリゴヌクレオチドは、エクソン 1B を含む TAU mRNA の量を増加させるようにスプライシングを変更することができる限り、イントロン 1B のいずれの領域に結合してもよい。TAU *pre-mRNA* のイントロン 1B のセンス鎖の代表的配列を配列番号 2 に示す。TAU *pre-mRNA* のイントロン 1B は、TAU *pre-mRNA* と配列番号 2 の配列とを最適な状態に (一致が最大となる状態に) アライメントしたときに配列番号 2 の配列に対応する TAU *pre-mRNA* の領域を意味し、配列番号 2 の配列からなるものに限定されない。あ

ATCCAGTTATACATTTCATACATGCATCTAATCAT
TCAATTATACATACACACATCCATATAATTCTAC
ATCCAATTATACCTCCATCCAATTACACATTTCAT
ACACCCACCTAATAAATTATTAATTTCATATATCC
ATCCATATAATTATACATCAATTATACATCCATC
TAATCATTTCAGTAATTCACCCACCATCCAGTCAT
CTATCCAATAATACATTTCATCCAATCATCCATCC
ATCCATCCACCCATTTCATCCATCCATCCGTCCGT
CCACCCATCATGGTATGAGCCATGATTTACCACG
ATGGTCCCCTGTGGACAGCCCAGGTGGGGCAGAA
CTGAAGGGAAGCCCAGGGCTGCCCCCATAAACAT
TTGCCTCCTTTACATGGATGAGAACTAGATCCAC
ATGTATAAATCCTCATGATTTGAAGGTGCTTTTA
CCAACATTCACTCATGGGATTCTCCCAGGAGCTC
TAGGAGGAGGCAGGTAGAGTTGAGGTCATCTCAC
GCATTTTACAGATGAGGAAACGGAGGCCCTGAGA
GGCAGGTCCAAGGCCACCTGACCAGAAAGAAGTG
GAACTGGGACTTGAACCCAGCCATCTTGCCCCTT
GGTCCCATGCTCTCTAGCCTGTAACCTCCTGCTTC
CTGGTGGGGCATCTCCAGGAGGACCCTATCGGCT
GGCCATGGGCCTGCCCTGGAGTCTTTTGCTCTGT
GTGGCCATCCTTCCTCCCTCAGGAGAGTGTGTGC
TCCCAGAGCACAGGCTGTATCTTCTGAGCATTTT
GTCCCTTCCCAGTACCTAGCACTCAGCTCTGTAT
ACATTGGGCTCTCAAGAATTCTCAACCTTCCAGA
GTGTAAGGCCTTGACCTGCTCAGCCCTGGATACT
GCATGATGCATTGATAAGCCCATAAAATAACCAG
GGCAGATTGACTCCCAGTGGCCAAAGTGCCACAG

GGAAGGGACAATTTCAGCCCTTCTAGGAGGAGGAG
GAGGTAGTTTTTCTCATTTTCTATTAAGGCAACAAA
AGCTGCCTTACTAAGGACATTCTTGGTGGAGGGC
GTGACTGTCAACCACTGTGATCATTTGGGCCTCT
CTTGCCCAGGCTTCCCATTCTGAAAGGACAGTTT
TATTGTAGGTACACATGGCTGCCATTTCAAATGT
AACTCACAGCTTGTCCATCAGTCCTTGGAGGTCT
TTCTATGAAAGGAGCTTGGTGGCGTCCAAACACC
ACCCAATGTCCACTTAGAAGTAAGCACCGTGTCT
GCCCTGAGCTGACTCCTTTTCCAAGGAAGGGGTT
GGATCGCTGAGTGTTTTTCCAGGTGTCTACTTGT
TGTTAATTAATAGCAATGACAAAGCAGAAGGTTC
ATGCGTAGCTCGGCTTTTCTGGTATTTGCTGCCCG
TTGACCAATGGAAGATAAACCTTTGCCTCAGGTG
GCACCACTAGCTGGTTAAGAGGCACTTTGTCCTT
TCACCCAGGAGCAAACGCACATCACCTGTGTCCT
CATCTGATGGCCCTGGTGTGGGGCACAGTCGTGT
TGGCAGGGAGGGAGGTGGGGTTGGTCCCCTTTGT
GGGTTTGTGCGAGGCCGTGTTCCAGCTGTTTCC
ACAGGGAGCGATTTTTCAGCTCCACAGGACACTGC
TCCCCAGTTCTCCTGAGAACAAAAGGGGGCGCT
GGGGAGAGGCCACCGTTCTGAGGGCTCACTGTAT
GTGTTCCAG (配列番号2)

[0018] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、

5' - GGCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号3) の配
列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同
一性を有する配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる；または
5' - GGCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号3) の配

列に相補的な配列、または配列番号3の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる。

配列番号3の配列は、配列番号2に示すT A U p r e - m R N Aのイントロン1Bのセンス鎖の配列の6番目から24番目までの配列に相当する。

[0019] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号3)の配列中の連続する少なくとも13塩基(すなわち、13、14、15、16、17、18、または19塩基)からなる配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる。

[0020] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、
5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T - 3' (配列番号4)または
5' - G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号5)の配列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有する配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる；または
5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T - 3' (配列番号4)または
5' - G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号5)の配列に相補的な配列、または5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T - 3' (配列番号4)または5' - G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号5)の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる。

[0021] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T - 3' (配列番号4)または5' - G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号5)の配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる。

[0022] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5' - G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号5)の配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる。

[0023] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、

5' - A T T T C T G A A T T C T T T G C C - 3' (配列番号6) または 5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7) の配列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有する配列を含むか、前記配列からなる、または

5' - A T T T C T G A A T T C T T T G C C - 3' (配列番号6) または 5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7) の配列、または配列番号6または配列番号7の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列を含むか、前記配列からなる。

[0024] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5' - A T T T C T G A A T T C T T T G C C - 3' (配列番号6) または 5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7) の配列を含むか、前記配列からなる。

[0025] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7) の配列を含むか、前記配列からなる。

[0026] 本明細書において、オリゴヌクレオチドとは、ヌクレオシド間結合により互いに結合した複数のヌクレオシドを含む化合物を意味する。ヌクレオシドは、糖成分および塩基成分を含む化合物を意味する。ヌクレオシドには、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドが含まれる。本開示のオリゴヌクレオチドは、当業界で知られるいずれのヌクレオシドおよびヌクレオシド間結合を含んでもよく、公知の核酸合成技術により製造することができる。本開示のオリゴヌクレオチドにおいて、ヌクレオシドは天然のヌクレオシドであっても非天然のヌクレオシドであってもよく、また、ヌクレオシド間結合は天然のヌクレオシド間結合であっても非天然のヌクレオシド間結合であってもよい。非天然のヌクレオシドおよび／または非天然のヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドは修飾オリゴヌクレオチドとも呼ばれる。

。

[0027] ヌクレオシドは、天然または非天然のヌクレオシドでありうる。天然のヌクレオシドとは、天然の糖成分および天然の塩基成分を含む化合物を意味し、非天然のヌクレオシドとは、非天然の糖成分および／または非天然の塩基成分を含む化合物を意味する。

[0028] 天然の糖成分は、フラノース型のリボースまたは2'-デオキシリボースである。非天然の糖成分は、リボフラノース環の1以上の原子（例えば、2'位、4'位、および5'位から選択される1以上の位置）の修飾、リボフラノース環の2つの原子の架橋（二環式糖）、リボフラノース環の酸素原子（O）の別の原子（例えば、S、N、またはC）への置換、並びにリボフラノース環の別の構造への置換、およびこれらの任意の組み合わせを含むうる。

。

[0029] リボフラノース環の修飾としては、ハロゲン、アミノ、チオ、アルキル、アルケニル、アルキニル、O-アルキル、O-アルケニル、O-アルキニル、S-アルキル、S-アルケニル、S-アルキニル、N-アルキル、N-アルケニル、N-アルキニル、アリル、O-アリル、S-アリル、N-アリル、O-アルキル-O-アルキル（ここで、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアリルは置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、およびアリルでありうる）などが挙げられる。ある実施形態において、リボフラノース環の修飾は、2'-F、2'-OCH₃（O-メチル）、2'-O(CH₂)₂OCH₃（MOE）、4'-S、5'-ビニル、および5'-メチルから選択される。

[0030] 二環式糖を含むヌクレオシドとしては、2'位の原子と4'位の原子が架橋されたヌクレオシド、例えばLNA（Locked Nucleic Acid/2'-O,4'-C-Methylene-bridged Nucleic Acid）、AmNA（Amido-Bridged Nucleic Acid）、ENA（Ethylene-bridged Nucleic Acid）が挙げられる。

[0031] 非天然のヌクレオシドは、ペプチド核酸（PNA）などの、糖成分が非環状構造に置換された化合物であってもよい。

- [0032] 天然の塩基は、アデニン（A）、チミン（T）、シトシン（C）、グアニン（G）、ウラシル（U）である。非天然の塩基としては、天然の塩基の置換体が挙げられ、例えば、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、4-チオウラシル、5-フルオロウラシルなどがある。本明細書では、特に記載する場合を除き、天然の塩基でオリゴヌクレオチドの配列を表すが、そのような配列で規定されたオリゴヌクレオチドは、その天然の塩基に対応する非天然の塩基を含むオリゴヌクレオチドを包含する。
- [0033] ヌクレオシド間結合は、天然または非天然のヌクレオシド間結合でありうる。天然のヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合である。非天然のヌクレオシド間結合には、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート、ボラノホスフェート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホネート、ホスホリルグアニジン、メチルホスホネート、メチレンメチルアミノ（ $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ ）、チオジエステル（ $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{S}-$ ）、チオノカルバメート（ $-\text{O}-\text{C}(\text{O})(\text{NH})-\text{S}-$ ）、シロキサン（ $-\text{O}-\text{Si}(\text{H})_2-\text{O}-$ ）、およびN, N'-ジメチルヒドラジン（ $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-$ ）が含まれる。
- [0034] オリゴヌクレオチドは、2種類以上のヌクレオシドおよび／または2種類以上のヌクレオシド間結合を含んでもよい。オリゴヌクレオチドが2種類以上のヌクレオシドおよび／または2種類以上のヌクレオシド間結合を含む場合、各ヌクレオシドおよびヌクレオシド間結合の割合および順序は任意である。
- [0035] オリゴヌクレオチドをSSOとして機能させるために、RNase HによるRNAの分解を誘導しないようにヌクレオシドの種類および／またはヌクレオシド間結合を選択することができる。当業者は、オリゴヌクレオチドをSSOとして機能させるために必要なヌクレオシドおよびヌクレオシド間結合の種類および位置を適宜選択することができる。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、6個以上、5個以上、4個以上、3個以上、また

は2個以上、好ましくは6個以上、5個以上、または4個以上の連続する天然のデオキシリボヌクレオシドを含まない。Gapmerは、4個以上、5個以上、または6個以上の連続する天然のデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域と、その5'末端および3'末端に配置される、少なくとも1種の非天然のヌクレオシドを含む2塩基長以上（例えば2～10塩基長、3～7塩基長、または4～5塩基長）の領域（5'ウイング領域および3'ウイング領域と称する）からなるオリゴヌクレオチドでありうる。それゆえ、ある実施形態において、本開示のオリゴヌクレオチドは、4個以上、5個以上、または6個以上の連続する天然のデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域と、その5'末端および3'末端に配置される、少なくとも1種の非天然のヌクレオシドを含む2塩基長以上（例えば2～10塩基長、3～7塩基長、または4～5塩基長）の領域からなるオリゴヌクレオチドではない。

[0036] オリゴヌクレオチドは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50塩基長以上、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50塩基長以下であってよく、ここで上限および下限は独立に選択することができる。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、13～23、14～22、15～21、または16～20塩基長、例えば、16、17、18、19、または20塩基長である。

[0037] 本明細書において、所定の塩基配列を「含む」配列とは、その所定の塩基配列に1以上の塩基が付加された配列と、その所定の塩基配列からなる配列とを包含する意味で用いられる。

[0038] 塩基配列に関して、配列同一性とは、最適な状態に（一致が最大となる状

態に) アラインメントされた2つの配列間で一致する塩基の割合を意味する。配列同一性は以下の式により算出される: 配列同一性 (%) = [(2つの配列間で一致する塩基) / (アライメント長)] × 100。配列同一性は、FASTA、BLASTなどのプログラムを用いて算出することができる。

[0039] 塩基の改変には、塩基の欠失、置換、挿入、および付加が含まれる。改変は、欠失、置換、挿入、および付加のいずれかであっても、これらの2以上の組み合わせであってもよい。例えば、2個以上の塩基の改変において、各改変は欠失、置換、挿入、および付加から独立に選択される。

[0040] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、エクソン1Bを含むTAU mRNAの量を、対照と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、または400%増加させる。

[0041] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、TAUタンパク質の量を、対照と比較して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%低下させる。

[0042] オリゴヌクレオチドがエクソン1Bを含むTAU mRNAの量を増加させるようにスプライシングを変更することができるかは、実施例の実験5に記載のように定量的PCR (qPCR) により確認することができる。qPCRには、エクソン1Bとエクソン4の間に跨って設計したフォワードプライマーとエクソン4内に設計したリバースプライマーのセット、およびエクソン1とエクソン4に跨って設計したフォワードプライマーとエクソン4内に設計したリバースプライマーのセットとを用いる。オリゴヌクレオチドの処置により前者のプライマーセットの増幅産物が増加し、後者のプライマーセットの増幅産物が減少する場合、そのオリゴヌクレオチドはエクソン1Bを含むTAU mRNAの量を増加させるようにスプライシングを変更することができるかと判断される。

[0043] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、興奮性神経選択的にエクソン1Bを含むTAU mRNAの量を増加させる。本明細書において、オ

リゴヌクレオチドが興奮性神経選択的にエクソン 1 B を含む T A U m R N A の量を増加させるとは、オリゴヌクレオチドによる興奮性神経におけるエクソン 1 B を含む T A U m R N A の量の増加が抑制性神経における増加よりも大きいことを意味する。興奮性神経としてはグルタミン酸作動性神経が、抑制性神経としては G A B A 作動性神経が挙げられる。オリゴヌクレオチドが興奮性神経選択的にエクソン 1 B を含む T A U m R N A の量を増加させることができるかは、例えば、実施例の実験 8 に記載のようにエクソン 1 B を含む T A U m R N A を検出可能なプローブを用いて、興奮性神経と抑制性神経における T A U m R N A を可視化することにより、確認することができる。

[0044] オリゴヌクレオチドが T A U タンパク質の量を低下させることができるかは、q P C R などのタンパク質の量を反映すると考えられる通常の定量方法により確認することができる。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、興奮性神経選択的に T A U タンパク質の量を低下させることができる。興奮性神経選択的に T A U タンパク質の量を低下させることにより、過剰な神経活動同期による神経変性を抑制しつつ、不必要な T A U の抑制による副作用を回避することができる。本明細書において、オリゴヌクレオチドが興奮性神経選択的に T A U タンパク質の量を低下させるとは、オリゴヌクレオチドによる興奮性神経における T A U タンパク質の量の低下が抑制性神経における低下よりも大きいことを意味する。興奮性神経としてはグルタミン酸作動性神経が、抑制性神経としては G A B A 作動性神経が挙げられる。オリゴヌクレオチドが興奮性神経選択的に T A U タンパク質の量を低下させることができるかは、例えば、実施例の実験 9 に記載のように *single cell RNA sequencing (scRNA-seq)* により T A U タンパク質の量と相関すると考えられる T A U m R N A の発現量を測定し、興奮性神経と抑制性神経におけるオリゴヌクレオチド処置群間での発現変化を比較することにより確認することができる。

[0045] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドによる興奮性神経におけるエ

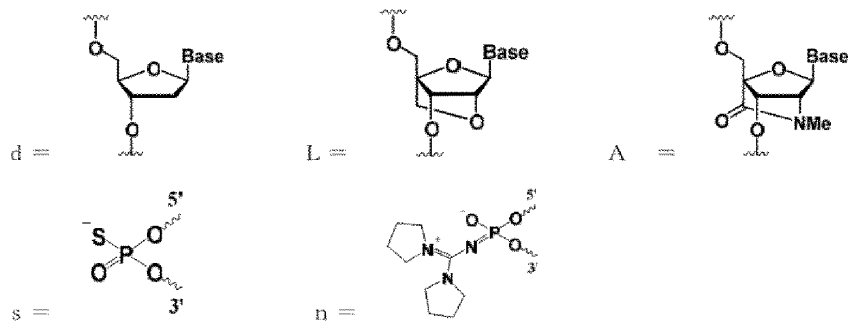
クソン1Bを含むTAU mRNAの量の増加またはTAUタンパク質の量の低下は、抑制性神経における増加または低下よりも、少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、310%、320%、330%、340%、350%、360%、370%、380%、390%、または400%大きい。

[0046] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドによる興奮性神経におけるエクソン1Bを含むTAU mRNAの量の増加またはTAUタンパク質の量の低下は、抑制性神経における増加または低下よりも、少なくとも1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、または3.0倍大きい。

[0047] ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下から選択される。

配列 (5' → 3')	配列番号
$A_{Ls}T_{ds}T_{Ls}T_{ds}^mC_{Ls}T_{ds}G_{Ls}A_{ds}A_{Ls}T_{ds}T_{Ls}^mC_{ds}T_{Ls}T_{ds}T_{Ls}G_{ds}^mC_{Ls}^mC_d$	1 2
$A_{Ls}A_{ds}T_{Ls}T_{ds}T_{Ls}^mC_{ds}T_{Ls}G_{ds}A_{Ls}A_{ds}T_{Ls}T_{ds}^mC_{Ls}T_{ds}T_{Ls}T_{ds}G_{Ls}^mC_d$	1 3
$A_{As}T_{dn}T_{As}T_{dn}^mC_{As}T_{ds}G_{As}A_{ds}A_{As}T_{ds}T_{As}^mC_{ds}T_{As}T_{dn}T_{As}G_{dn}^mC_{As}^mC_d$	1 6
$A_{As}A_{dn}T_{As}T_{dn}T_{As}^mC_{ds}T_{As}G_{ds}A_{As}A_{ds}T_{As}T_{ds}^mC_{As}T_{dn}T_{As}T_{dn}G_{As}^mC_d$	1 7

“d” = DNA、“L” = LNA、“A” = AmNA、“s” = ホスホロチオエート、“n” = ホスホロアミデート、“^mC” = 5-メチルシトシン。



[0048] 本開示のオリゴヌクレオチドは、T A Uタンパク質の量を低下させることができ、T A U関連疾患の治療または予防に用いることができる。本明細書において、T A U関連疾患とは、T A Uの蓄積または異局在がその発症または進展に関与する疾患または状態を意味する。

[0049] T A U関連疾患としては、タウオパチーおよびてんかんが挙げられる。T A U関連疾患としては、また、認知症、例えばアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's dementia; AD)、血管性認知症 (Vascular dementia)、およびレビー小体型認知症 (Dementia with Lewy bodies; DLB)、パーキンソン病 (Parkinson's disease)、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)、ダウン症候群 (Down syndrome; Down)、ピック病 (Pick's disease; Pick)、慢性外傷性脳症 (Chronic traumatic encephalopathy; CTE)、進行性核上

性麻痺 (Progressive supranuclear palsy ; PSP)、大脳基底核変性症 (Corticobasal degeneration ; CBD)、および筋強直性ジストロフィー1型 (Myotonic dystrophy type 1 ; DM1) が挙げられる。TAU関連疾患としては、また、ドラベ症候群 (Dravet syndrome)、結節性硬化症 (Tuberous sclerosis complex ; TSC)、周期性失調症 (episodic ataxia ; EA) (例えばEA-1およびEA-2)、大脳皮質-焦点性てんかん (cortical dysplasia-focal epilepsy ; CDFE) 症候群、および発達性およびてんかん性脳症 (Developmental and epileptic encephalopathy ; DEE) 14または18が挙げられる。TAU関連疾患としては、また、緑内障 (Glaucoma)、加齢黄斑変性 (Age-related macular degeneration ; AMD) 等の眼科疾患が挙げられる。

[0050] TAU関連疾患の治療には、当該疾患の1以上の症状または所見の改善および進行の抑制が含まれる。TAU関連疾患の予防には、当該疾患の発症の抑制および遅延が含まれる。

[0051] オリゴヌクレオチドは、所望の効果 (例えば、TAU関連疾患の治療または予防効果) を発揮しうる量 (本明細書において有効量という) で対象に投与される。投与量は、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。オリゴヌクレオチドは、例えば、体重1kgあたり0.01mg~10mg、0.01mg~5mg、0.01mg~1mg、0.01mg~0.5mg、または0.05mg~0.5mgの用量で投与されうる。オリゴヌクレオチドは複数回投与してもよく、投与は連日であっても、1日または数日に1回、1週間または数週間に1回、1ヵ月または数ヵ月に1回、または数年または生涯に1回であってもよい。投与期間中、投与量を変更してもよい。1日量は、1回で投与しても複数回 (例えば、2~4回) にわけて投与してもよい。

[0052] 投与方法は、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。投与方法は、経口投与であっても非経口投与であってもよいが、非経口投与が好ましい。非経口投与としては、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、髄腔内投与、くも膜下投与、脳実質投与、脳室内投与、硝子体内投与、脈絡膜上腔投与または網膜下投与などが挙げられる。オリゴヌクレオチドは、例えば注射により投与される。

[0053] 医薬組成物は、オリゴヌクレオチドに加えて、滅菌水、生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤、結合剤などの、医薬上許容される担体または添加剤を含むことができる。オリゴヌクレオチドは、核酸医薬の投与に適したリポソームなどのキャリアに封入されていてもよい。剤型は、限定はされないが、例えば注射剤である。注射剤には、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、および用時調製型注射剤（例えば、凍結乾燥注射剤）が含まれる。医薬組成物はキットとして提供されてもよく、キットは用時調製に用いる緩衝液や使用説明書などをさらに含んでもよい。

[0054] 対象は、哺乳動物、例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物でありうる。非ヒト哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、およびサルが挙げられる。ある実施形態において、対象はヒトである。

[0055] ある態様において、本開示は、T A U p r e - m R N A のイントロン 1 B に結合するスプライススイッチングオリゴヌクレオチドの有効量を対象に投与することを含む、T A U 関連疾患を治療または予防する方法に関する。

ある態様において、本開示は、T A U 関連疾患の治療または予防に使用するための、T A U p r e - m R N A のイントロン 1 B に結合するスプライススイッチングオリゴヌクレオチドに関する。

ある態様において、本開示は、T A U 関連疾患を治療または予防するための医薬を製造するための、T A U p r e - m R N A のイントロン 1 B に結合するスプライススイッチングオリゴヌクレオチドの使用に関する。

[0056] 本開示の例示的实施形態を以下に記載する。

[1]

T A U p r e - m R N A のイントロン 1 B に結合するスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[2]

T A U エクソン 1 B を含む T A U m R N A の量を増加させることができる、前記 1 に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[3]

T A U タンパク質の量を低下させることができる、前記 1 または 2 に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[4]

T A U p r e - m R N A のイントロン 1 B の一部に相補的な配列を含む、前記 1 ～ 3 のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[5]

配列番号 2 の 6 ～ 2 4 番目の少なくとも一部に相補的な配列を含む、前記 1 ～ 4 のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[6]

5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号 3) の配列と 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 以上の配列同一性を有する配列に相補的な配列を含む；または

5' - G G C A A A G A A T T C A G A A A T T - 3' (配列番号 3) に相補的な配列または配列番号 3 の配列において 1 ～ 6 個、1 ～ 5 個、1 ～ 4 個、1 ～ 3 個、1 または 2 個の塩基が改変された配列に相補的な配列を含む、

前記 1 ～ 5 のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[7]

5' - GGCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号3) の配列中の連続する少なくとも13塩基からなる配列に相補的な配列を含む、前記1～6のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[8]

5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または 5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有する配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる；または

5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または 5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列に相補的な配列、または5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる、

前記1～7のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[9]

5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または 5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる、前記1～8のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[10]

5' - ATTTCTGAATTCTTTGCC - 3' (配列番号6) または 5' - AATTTCTGAATTCTTTGC - 3' (配列番号7) の配列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有する配列を含むか、前記配列からなる、または

5' - A T T T C T G A A T T C T T T G C C - 3' (配列番号6) または 5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7) の配列、または配列番号6または配列番号7の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列を含むか、前記配列からなる、

前記1～9のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[11]

5' - A T T T C T G A A T T C T T T G C C - 3' (配列番号6) または 5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7) の配列を含むか、前記配列からなる、前記1～10のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[12]

6個以上、5個以上、または4個以上の連続する天然のデオキシリボヌクレオシドを含まない、前記1～11のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[13]

4個以上、5個以上、または6個以上の連続する天然のデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域と、その5'末端および3'末端に配置される、少なくとも1種の非天然のヌクレオシドを含む2塩基長以上の領域からなるオリゴヌクレオチドではない、前記1～12のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[14]

16～20塩基長である、前記1～13のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[15]

興奮性神経選択的にTAUエクソン1Bを含むTAU mRNAの量を増加させることができる、前記1～14のいずれかに記載のスプライスス

ツチングオリゴヌクレオチド。

[16]

興奮性神経におけるTAU エクソン1Bを含むTAU mRNAの量を、抑制性神経における増加よりも少なくとも5%大きく増加させることができる、前記1～15のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[17]

興奮性神経選択的にTAUタンパク質の量を低下させることができる、前記1～16のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[18]

興奮性神経におけるTAUタンパク質の量を、抑制性神経における低下よりも少なくとも5%大きく低下させることができる、前記1～17のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。

[19]

5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有する配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる；または5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列に相補的な配列、または5' - GGCAAAGAATTTCAGAAAT - 3' (配列番号4) または5' - GCAAAGAATTTCAGAAATT - 3' (配列番号5) の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列に相補的な配列を含むか、前記配列からなる、オリゴヌクレオチド。

[20]

5' - ATTTCTGAATTCTTTGCC - 3' (配列番号6) また

は5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7)の配列と70%、75%、80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有する配列を含むか、前記配列からなる、または

5' - A T T T C T G A A T T C T T T G C C - 3' (配列番号6)または5' - A A T T T C T G A A T T C T T T G C - 3' (配列番号7)の配列、または配列番号6または配列番号7の配列において1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1または2個の塩基が改変された配列を含むか、前記配列からなる、オリゴヌクレオチド。

[21]

前記1～18のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチドまたは前記19または20に記載のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物。

[22]

T A U関連疾患を治療または予防するための、前記21に記載の医薬組成物。

[23]

前記T A U関連疾患が、タウオパチーまたはてんかんである、前記22に記載の医薬組成物。

[24]

前記T A U関連疾患が、アルツハイマー型認知症、血管性認知症、レビー小体型認知症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ダウン症候群、ピック病、慢性外傷性脳症、進行性核上性麻痺、大脳基底核変性症、および筋強直性ジストロフィー1型からなる群から選択される、前記22に記載の医薬組成物。

[25]

前記T A U関連疾患が、ドラベ症候群、結節性硬化症、周期性失調症、C D F E症候群、およびD E E 14または18からなる群から選択される、前記22に記載の医薬組成物。

[2 6]

前記 T A U 関連疾患が、緑内障および加齢黄斑変性からなる群から選択される、前記 2 2 に記載の医薬組成物。

[2 7]

過剰な神経活動同期による神経変性を抑制するための、前記 2 1 に記載の医薬組成物。

[2 8]

有効量の前記 1 ～ 1 8 のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド、前記 1 9 または 2 0 に記載のオリゴヌクレオチド、または前記 2 1 ～ 2 7 のいずれかに記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、T A U 関連疾患を治療または予防する方法。

[2 9]

T A U 関連疾患の治療または予防に使用するための、前記 1 ～ 1 8 のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド、または前記 1 9 または 2 0 に記載のオリゴヌクレオチド。

[3 0]

T A U 関連疾患を治療または予防するための医薬を製造するための、上記 1 ～ 1 8 のいずれかに記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド、または前記 1 9 または 2 0 に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

実施例

[0057] 1. オリゴヌクレオチドの合成および精製

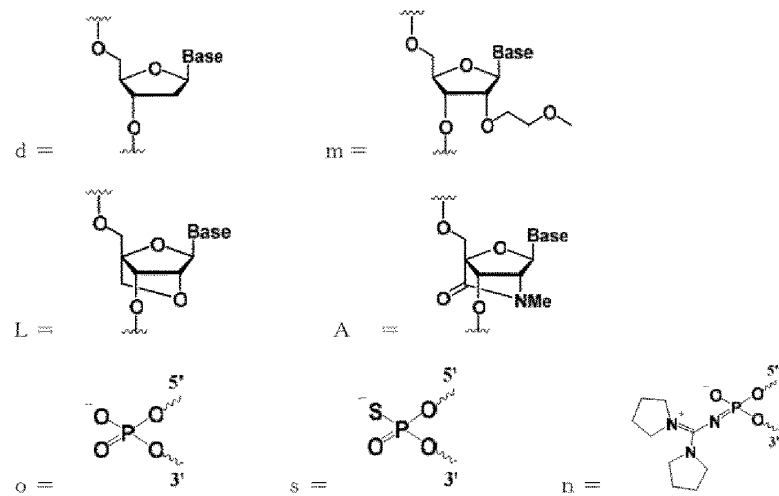
表 1 に示すオリゴヌクレオチドを合成した。

[0058]

[表1]

化合物番号	配列 (5' → 3')	配列番号
Scramble	G _{ms} G _{mo} G _{ms} ^m C _{ms} G _{ms} T _{ds} A _{ds} T _{ds} A _{ds} G _d sA _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ms} G _{mo} T _{ms} T _{ms} A _m	8
比較例化合物 1	^m C _{ms} ^m C _{mo} G _{ms} T _{ms} T _{ms} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ms} ^m C _{mo} ^m C _{ms} ^m C _{ms} T _m	9
1	T _{ls} T _{ds} ^m C _{ls} T _{ds} G _{ls} A _{ds} A _{ls} T _{ds} T _{ls} ^m C _d dsT _{ls} T _{ds} T _{ls} G _{ds} ^m C _{ls} ^m C _{ds} A _{ls} G _d	10
2	T _{ls} T _{ds} T _{ls} ^m C _{ds} T _{ls} G _{ds} A _{ls} A _{ds} T _{ls} T _d s ^m C _{ls} T _{ds} T _{ls} T _{ds} G _{ls} ^m C _{ds} ^m C _{ls} A _d	11
3	A _{ls} T _{ds} T _{ls} T _{ds} ^m C _{ls} T _{ds} G _{ls} A _{ds} A _{ls} T _d sT _{ls} ^m C _{ds} T _{ls} T _{ds} T _{ls} G _{ds} ^m C _{ls} ^m C _d	12
4	A _{ls} A _{ds} T _{ls} T _{ds} T _{ls} ^m C _{ds} T _{ls} G _{ds} A _{ls} A _d sT _{ls} T _{ds} ^m C _{ls} T _{ds} T _{ls} T _{ds} G _{ls} ^m C _d	13
5	G _{ls} A _{ds} A _{ls} T _{ds} T _{ls} T _{ds} ^m C _{ls} T _{ds} G _{ls} A _d sA _{ls} T _{ds} T _{ls} ^m C _{ds} T _{ls} T _{ds} T _{ls} G _d	14
6	A _{ls} G _{ds} A _{ls} A _{ds} T _{ls} T _{ds} T _{ls} ^m C _{ds} T _{ls} G _d sA _{ls} A _{ds} T _{ls} T _{ds} ^m C _{ls} T _{ds} T _{ls} T _d	15
7	A _{As} T _{dn} T _{As} T _{dn} ^m C _{As} T _{ds} G _{As} A _{ds} A _{As} T _d sT _{As} ^m C _{ds} T _{As} T _{dn} T _{As} G _{dn} ^m C _{As} ^m C _d	16
8	A _{As} A _{dn} T _{As} T _{dn} T _{As} ^m C _{ds} T _{As} G _{ds} A _{As} A _d sT _{As} T _{ds} ^m C _{As} T _{dn} T _{As} T _{dn} G _{As} ^m C _d	17

“d” = DNA、“m” (下付き) = 2'-MOE、“L” = LNA、
“A” = AmNA、“o” = ホスホジエステル、“s” = ホスホロチオエート、
“n” = ホスホロアミデート、“^mC” = 5-メチルシトシン。



[0059] <方法>

化合物 1、2、3、4、5、6、7、および 8 (表 1) の合成を表 2 に示す手順に従い実施した。市販の 5'-O-DMTrヌクレオシドCPG (1 μmolスケール) を用いて、核酸自動合成機 (日本テクノサービス製M-

8-MX) により、表2のステップ1-8を繰り返すことにより鎖を伸長させ、その後、 CH_2Cl_2 中の3%DCAで5'-O-DMTr基を除去した。化合物1、2、3、4、5、および6の核酸塩基保護基およびリン酸保護基の脱保護およびリンカーの切断は、25% NH_3 水溶液で55℃で5時間処理することで達成された。一方、化合物7および8の核酸塩基保護基およびリン酸保護基の脱保護およびリンカーの切断は、MeCN中の20%ジエチルアミンで25℃で1時間処理した後、TEA-MeOH-water (1:1:2、v/v/v)の混合液で65℃で20時間処理することで達成された。得られた粗生成物は、イオン交換HPLC (Thermo Scientific製DNAPac PA100) で精製した。目的とするオリゴヌクレオチドを含むフラクションを集め、簡易逆相カラム (Waters社製Sep-Pak) により精製し、凍結乾燥した。収量は、260nmでのUV定量 (島津製作所製Shimadzu UV-1800) によって決定し、組成は、LC-MS (Waters製Xevo G2-XS Qtof) によって同定した。

[0060] <結果>

化合物1 : 収量 1.2 mg、ESI-MS : m/z calcd 6031.6、found 6030.7.

化合物2 : 収量 1.1 mg、ESI-MS : m/z calcd 6006.5、found 6005.7.

化合物3 : 収量 0.2 mg、ESI-MS : m/z calcd 6006.5、found 6006.0.

化合物4 : 収量 1.0 mg、ESI-MS : m/z calcd 6016.5、found 6015.7.

化合物5 : 収量 0.7 mg、ESI-MS : m/z calcd 6042.5、found 6041.7.

化合物6 : 収量 1.4 mg、ESI-MS : m/z calcd 6026.5、found 6025.9.

化合物7：収量 0.8 mg、ESI-MS： m/z calcd 6768.2、found 6768.3.

化合物8：収量 2.6 mg、ESI-MS： m/z calcd 6775.3、found 6777.9.

[0061] [表2]

工程	操作	ホスホロチオエート修飾 合成サイクル		ホスホロアミデート修飾 合成サイクル	
		試薬	時間	試薬	時間
1	脱トリチル化	3% TCA CH ₂ Cl ₂ 溶液	7s	3% TCA CH ₂ Cl ₂ 溶液	7s
2	洗浄	CH ₃ CN	-	CH ₃ CN	-
3	縮合	0.07 M モノマー および 0.25 M BTT CH ₃ CN 溶液	9min	0.07 M モノマー および 0.25 M BTT CH ₃ CN 溶液	9min
4	洗浄	CH ₃ CN	-	CH ₃ CN	-
5	キャッピング	Ac ₂ O および 16% NMI THF 溶液	40s	Ac ₂ O および 16% NMI THF 溶液	40s
6	洗浄	CH ₃ CN	-	CH ₃ CN	-
7	硫化/ イミド化	0.05 M POS CH ₃ CN 溶液	8min	1 M 1-(アジド-1-ピロリ ジニル-メチレン) ピロリジニウム ヘキサ フルオロホスフェート CH ₃ CN 溶液	30min
8	洗浄	CH ₃ CN	-	CH ₃ CN	-

[0062] Scramble および比較例化合物1も同様に合成した。Scramble は陰性対照である。比較例化合物1は、TAU mRNA に対する gapmer 型のアンチセンスオリゴヌクレオチドの一例である。

[0063] 2. エクソン1Bを挿入させるセンス配列の同定

SSO型アンチセンスオリゴヌクレオチドの同定を目的として、化合物2、3、4、または5を処置したヒトiPS細胞由来神経細胞（以下、「iPS神経細胞」とする）由来のcDNAをRT-PCRおよび電気泳動し、スプライススイッチング活性を定性的に評価した。

[0064] <方法>

グルタミン酸作動性神経（興奮性神経）とGABA作動性神経（抑制性神経）が混在する商品であるiCell GlutaNeurons 01279（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.）を添付文書に従って用いた。具体的には、Corning（登録商標）BioCoat™ポリDリシン384ウェルブラック透明平底TC処理済マイクロプレート（Corning）をPoly-L-オルニチン（Sigma-Aldrich）とCorning（登録商標）マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクター リデュースト（Corning）でコーティングした後、iPS神経細胞を（抗生物質を加えない）Complete BrainPhys培地（以後、培地）に懸濁して播種した（26,000個から30,000個/well、終容量40μL/well）。翌日に、培養液中のオリゴヌクレオチドが終濃度1μMになるように2倍濃度の2μMのオリゴヌクレオチド含有培地を等容量、細胞に添加した（終容量80μL/well）。オリゴヌクレオチドを処置しない条件には、蒸留水（以下、d.w.と記載、株式会社大塚製薬工場）が0.1%になるように添加した。培地交換のため、培養上清40μLを破棄し、新しい40μLの1μMのオリゴヌクレオチド含有培地を加える操作を3日毎に繰り返した。

[0065] 播種後16日目にライセートを回収するため、培地を全量取り除き、7μLのRIPA Buffer 1×調製済み溶液 プロテアーゼ阻害剤不含（ナカライテスク）を加えて、攪拌後、凍結融解することで細胞を可溶化させた（RIPAライセート）。次に、以下の手順でcDNAを合成した。SuperPrep（登録商標）11 Cell Lysis & RT Kit for qPCR（TOYOBO）の添付文書を参考に、Lysis 緩衝液（8.75μLのLysis Solution、0.2μLのRNase Inhibitor、および0.05μLのgDNA Removerの混合液）の9μLとRIPAライセートの1μLを混合させて、常温で5分静置してゲノムDNAを分解し、RNA含有溶液を得た。次に、逆転写するため、5X RT Master MixとRNA含有溶液とd.w

．を混合し、37℃（15分）、50℃（5分）、98℃（5分）で反応させて、cDNA溶液を得て、d. w. で10倍希釈した。

[0066] PCRを行うため、PrimeSTAR（登録商標）GXL Premix（TAKARA）に、終濃度で200nMになるようにTAUのプライマーを、または終濃度100nMになるようにβアクチン（ACTB）のプライマーを、d. w. で希釈して加えた。プライマーは以下のものを合成し、用いた（Integrated DNA Technologies, Inc. / IDT）。

<TAU mRNA検出用>

118（118-Fw-Mapt-Exon1）（5' -CATGCACC AAGACCAAGAGG-3'）（配列番号18）、120（120-Rv-Mapt-Exon4）（5' -TCACGTGACCAGCAGCTTC-3'）（配列番号19）

<ACTB mRNA検出用>

IDTのHs. PT. 39a. 22214847に含まれるプライマーである（5' -ACAGAGCCTCGCCTTTTG-3'）（配列番号20）、（5' -CCTTGCACATGCCGGAG-3'）（配列番号21）

[0067] RT-PCRの陽性対照の各鋳型合成DNAは、以下の配列で合成した（gBLOCKS、IDT）。

110-TAU nonproductive mRNA（DNA-standard）（E1B-E4）：エクソン1とエクソン4の間にエクソン1Bの配列を有する。

110（5' -TCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAGGGAGTGAAATTCAGTGAAGCTGAGAGCTGAGGAACCATTGATCTGATGGCTGAGACACCACTGGGAAGACTGGAGAGGGCTTTTCTGGGCATGCAGTGCCAGGCACAGGAGGAGCTGAGGGAAGATGACTAAGAGCTG

AAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGA
AGACGAAGCTGCTGGTCACTGACCCAA-3') (配
列番号22)

111-TAU productive mRNA (DNA-standard)
(E1-E4): エクソン1の次にエクソン4になる配列を有す
る。

111 (5'-TCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGA
CCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCT
GAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGG
AAGACGAAGCTGCTGGTCACTGACCCAAAG-3')
(配列番号23)

ACTB (5'-GCATCGACATCGACTAACCGCCGAGA
CCGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTT
TGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCCAG
CTCACCATTGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTCG
TCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTT
CGCGGGGCGACGATGCCCCCGGGCCGTCTTCCCC
TCCATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGCGTGA
TGGTGGGCATGGGTCAAGAGGATTCTATGTGGG
CGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTCACC
CTGAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCA
ACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCCACAC
-3') (配列番号24)

[0068] タッチダウンPCRにはサーマルサイクラー GeneAmp PCR
System 9700 (Applied Biosystems) を用い
、3サイクル [変性: 98°C (10秒); 66°C (15秒); 68°C (15
秒)]、次に3サイクル [変性: 98°C (10秒); 64°C (15秒); 6
8°C (15秒)]、次に10サイクル [変性: 98°C (10秒); 62°C (

15秒) ; 68℃ (15秒)]、最後に40サイクル [変性 : 98℃ (10秒) ; 60℃ (15秒) ; 68℃ (15秒)] で反応させた。そして、5 μ LのPCR増幅産物に1 μ LのGel Loading Dye, Purple (6X) (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社) を混合し、3%アガロース21 (低分子量核酸分離用) (富士フイルム和光純薬株式会社) とTAE (ニッポンジーン) で電気泳動した。マーカーには100bp DNAラダーワン (ナカライテスク) を用いた。バンドを検出するため、TAEで10,000倍希釈したSYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (10,000X Concentrate in DMSO) (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で遮光下染色したゲルをAmersham™ ImageQuant™ 800シリーズ (IQ800) (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社) の蛍光 (Cy2) で可視化した。

[0069] <結果>

イントロンとして認識されてきた135ヌクレオチド (nt) がエクソンとしてENST00000571311.5で登録されていた。135ヌクレオチド (nt) はエクソン1とエクソン2の間に挿入される (図1A)。以後、本135ntのエクソンをエクソン1Bと呼ぶ。エクソン1B挿入で未成熟終止コドン (premature termination codon) が出現するため、本転写物はNMD (nonsense-mediated mRNA decay) で分解すると想定されることから、non productive mRNAと呼ぶ。ヒトでTAUタンパクの基となるproductive mRNAには、N末端領域のバリエーションとして、エクソン2を含みエクソン3を含まない「1N TAU」、エクソン2と3を含む「2N TAU」、エクソン2と3を共に含まない「0N TAU」の3種類が報告されている (Wang JZ et al., Prog Neurobiol. 85. 148-75. 2008、図5)。このことから、エクソン1Bを含むnon productive mRNAも3パ

ターンが考えられるものの、今回は i P S 神経で 2 パターンの *non productive mRNA* 発現が R T - P C R で主に検出されたため、図 1 A には本試験で実際に検出された転写物のみを示す。

[0070] 我々は、S S O によってエクソン 1 B を強制的に挿入させ、*non productive mRNA* を増加させる *pre-mRNA* 側にあるセンス配列を同定するため、18 塩基からなるオリゴヌクレオチドを導入試薬を用いずに (*free uptake* で) i P S 神経に 1 μ M で取り込ませて、T A U の *mRNA* バリエーション (転写物) を評価した。転写物を明らかにするため、フォワードプライマーの 118 をエクソン 1、リバープライマーの 120 をエクソン 4 に設計し、R T - P C R 産物の分子量の違いを評価した。その結果、オリゴヌクレオチド非処置では、約 100 bp (*base pair*) と約 200 bp でバンドが検出された (図 1 B、上)。約 100 bp に認められたバンドは 0 N T A U の陽性対照の鋳型合成 DNA と同じ分子量に検出されたことから、エクソン 1 の次にエクソン 4 がつながる *productive mRNA* であると考えられた。約 200 bp に認められたバンドは 1 N T A U に相当する分子量と考えられた。次にオリゴヌクレオチドを処置したところ、化合物 3 と 4 では、上述の約 100 bp と約 200 bp のバンドに 135 bp が加わった新たなバンドが検出された (図 1 B、上)。約 235 bp のバンドは、104 bp の 0 N T a u に 135 bp のエクソン 1 B が挿入された陽性対照の鋳型合成 DNA と同じ分子量であったことから、*non productive mRNA* に相当すると考えられた。約 335 bp に認められるバンドは、191 bp の 1 N T A U に 135 bp が挿入された *non productive mRNA* に相当すると考えられた。なお、 β アクチンを *loading control* に用い、T A U 以外の c D N A が存在することを確認した (図 1 B、下)。

[0071] 3. サンガーシーケンスによるエクソン構成の確認

135 nt のエクソン 1 B がどこエクソン-エクソンのジャンクションに挿入されているのかを調べるため、化合物 4 処置サンプルで認められた約

235bpと約335bpのバンドを切り出し、クローニング後、サンガーシーケンスを行った。

[0072] <方法>

実験2に従い得た化合物4処置サンプル由来のcDNAをプライマー118と120でPCRした後、電気泳動した。335bp付近、235bp付近、200bp付近のバンドをゲルから切り出し、GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) を用いて、マニュアルに従って精製した。10×A-attachment Mix (TOYOBO) を用いてdAを付加するため、精製サンプル4.5μLに10×A-attachment Mixを0.5μL加え、60℃で30分間反応させた。pT7Blue T-vector (Novagen) にクローニングするため、pT7Blue T-Vector 0.5μLに対してサンプルを2μLずつ加えて混合し、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TAKARA) を2.5μL加えて16℃で30分間反応させた。溶液全量を調製済みのコンピテントセル（大腸菌JM109株）に熱処理（42℃、30秒）により形質転換し、X-galおよびIPTG添加済みアンピシリン含有LB寒天培地プレート（ユニテック（株）、Cat. No. LBA-Op）にプレーティングした。37℃で一晩培養後、白または薄青のコロニーをピックアップし、100μLのアンピシリン含有LB培地（終濃度100μg/mL、ユニテック（株））で培養した。懸濁し始めたLB培地2μLをPrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA) およびプライマー（終濃度0.2または0.3μM）と混合してPCR反応液を調整した（反応スケールは15μL）。プライマーは以下のものを用いた。pT7Blue-F-m13r（5'-CAGGCTTTACACTTTATGCTTCC-3'）（配列番号25）；pT7Blue-R2-u19（5'-CGATTTCGGCCTATTGGTTA-3'）（配列番号26）。PCRにはサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (A

pp l i e d B i o s y s t e m s) を用い、30 サイクル [変性: 98 °C (10 秒) ; 60 °C (15 秒) ; 68 °C (30 秒)] で反応させた。各クローンのコロニーPCR (5 μL) をアガロースゲル (2 %) で電気泳動することにより、バンドサイズを確認した。選定したクローンを1 mL スケールのアンピシリン含有LB培地で培養し、一般的なアルカリSDS法でプラスミドを抽出した。シーケンス解析を実施するため、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied biosystems) を用いて、精製プラスミド (テンプレート) と上記のどちらかのプライマー (pT7Blue-F-m13 r または pT7Blue-R2-u19) でpaired-endでシーケンス解析した。シーケンス反応は、25 サイクル [変性: 96 °C (10 秒) ; 50 °C (5 秒) ; 60 °C (2 分)] で実施した。測定には、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

[0073] <結果>

化合物4 処置サンプル由来RT-PCRで認められた335 bp 付近のバンドを切り出して精製した後、プラスミドにクローニングした (図2 A、上、24 クローン)。目的の約335 bp が挿入されたバンドを含むクローンは750 bp 付近に2 クローン (2 および10 番) 検出された一方で、何も挿入しないプラスミドに相当するバンド (450 bp) が3 クローンで検出された (6、7、および11 番)。そこで、2 番のクローンをサンガーシーケンスで確認したところ、図2 B のエレクトロフェログラムで示すようにエクソン1 の次に135 nt のエクソン1 B が存在し、次に87 nt のエクソン2、その次にエクソン4 が連結していた。次に、化合物4 処置サンプル由来RT-PCRで認められた235 bp 付近のバンドも同様に解析した (図2 A、中、16 クローン)。16 クローンの内、解析対象の約235 bp のPCR産物を含むと想定したクローン (約700 bp) の10 番をサンガーシーケンスしたところ、図2 C に示すようにエクソン1 の次に135 n

tのエクソン1Bが存在し、エクソン4が連結していた。最後に、化合物4処置サンプル由来RT-PCRで認められた200bp付近のバンドも同様に解析した(図2A、下、24クローン)。解析対象の約200bpのPCR産物を含むと想定したクローンの24番をサンガーシーケンスしたところ、図2Dに示すようにエクソン1の次にエクソン2、その次にエクソン4が連結していた。以上はフォワードプライマー側からのsingle-endの解析であったが、リバースプライマー側からのpaired-end解析でも同じ配列が確認できた(データ非提示)。

[0074] 4. TAU productive mRNAとTAU nonproductive mRNAとを選択的に定量するqPCRの構築

エクソン1とエクソン4の間に135ntのエクソン1Bが挿入した「TAU nonproductive mRNA」またはエクソン1とエクソン4が繋がった「TAU productive mRNA」に相当する合成DNAを鋳型として用い、設計したプライマーおよびプローブがqPCRで機能することを確認した。

[0075] <方法>

鋳型の合成DNAとして、実験2の<方法>に記載の110-TAUおよび111-TAUと、下記の117-TAUを合成した(gBLOCKS、IDT)。以下、110-TAU、111-TAU、および117-TAUをそれぞれ単に110、111、および117と称することがある。

117-TAU pre-mRNA (DNA-standard) (13-E4) : イントロン3の次にエクソン4になる配列を有する。

117 (5' - t c t a g t a a a c a a t a a c t g t c t t g c t t t
t a c c c c c c t t c a t t t g c t g a c a c a t a c a c c a g C T
G A A G A A G C A G G C A T T G G A G A C A C C C C C A G C C T G G
A A G A C G A A G C T G C T G G T C A C G T G A C C C A A G - 3')
(配列番号27)。

[0076] qPCRのため、鋳型の合成DNA(110、111、または117)と

THUNDERBIRD (登録商標) PROBE qPCR MIX (TOYOBO)、qPCRプローブ (終濃度 $0.15\mu\text{M}$)、プライマー (終濃度 $0.4\mu\text{M}$) を含むPCR反応液を添付文書に従って調製した ($15\mu\text{L}$ のPCR反応溶液)。PCRの増幅効率を正確に評価し、且つコピー数を絶対値として定量するため、コピー数が既知の110、111、または117をyeast RNA含有d.w. (終濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、invitrogen) で段階希釈し、得られたCt値で検量線を作成した。反応に供したコピー数 (X軸) と得られたCt (Y軸) をグラフにプロットした (図3A、3B、3C、下)。GraphPad PRISM version 6.07にて作図した。qPCRにはViiA7 (Applied Biosystems) を用い、初期変性: 95°C (1分)、40サイクル [95°C (15秒); 60°C (45秒)] を行った。プライマーとプローブは以下のものを用いた。

<TAU nonproductive mRNA検出用>

112 (Fw-Mapt-Exon1B-4) ($5' - \text{AGGGAAGATGACTAAGAGCTGA} - 3'$) (配列番号28)

114 (Rv-Mapt-Exon4) ($5' - \text{TCACGTGACCAGCAGCTT} - 3'$) (配列番号29)

113 (Probe-Mapt-Exon4) ($5' - /56 - \text{FAM} / \text{AGACACCCC} / \text{ZEN} / \text{CAGCCTGGAAGA} / 31 \text{ABkFQ} / - 3'$) (配列番号30)

<TAU productive mRNA検出用>

115 (Fw-Mapt-Exon1-4) ($5' - \text{GCTGGCCTGAAAGCTGA} - 3'$) (配列番号31)

114 (上記参照)

113 (上記参照)

<TAU pre-mRNA検出用>

116 (Fw-Mapt-Intron3) ($5' - \text{CTTCATTT}$

GCTGACACATACACC-3') (配列番号32)

114 (上記参照)

113 (上記参照)

[0077] <結果>

発現量が高い、エクソン1の次にエクソン4が連結するTAU productive mRNAと、これにエクソン1Bが挿入されたTAU nonproductive mRNAとの絶対定量系を構築した。まず、図3Aで示すように、エクソン1Bとエクソン4の間に跨って設計したフォワードプライマー112を含むTAU nonproductive mRNA検出用セットでqPCRしたところ、エクソン1Bを有さずエクソン1とエクソン4が繋がったproductive mRNAに相当する鋳型合成DNAの111やイントロン3を含むpre-mRNAに相当する鋳型合成DNAの117では40サイクルまでにCt値が算出されない一方で、エクソン1Bの次にエクソン4に繋がるnonproductive mRNAに相当する鋳型合成DNAの110ではCt値がコピー数に応じて算出された。また、本条件でCt値と鋳型DNAのコピー数が相関を示し、測定対象サンプルのCt値から反応溶液に含まれているcDNAのコピーを算出できることが明らかになった。曲線の傾きからPCRの増幅効率を算出したところ94.4%であり、試験最小濃度の5copies/wellから定量可能であった。

[0078] 次に、TAU productive mRNAを定量するため、図3Bで示すように、エクソン1とエクソン4に跨って設計したフォワードプライマー115を含むTAU productive mRNA検出用セットでqPCRしたところ、productive mRNAに相当する111で低コピー数までCt値が算出できた。一方で、nonproductive mRNAに相当する110において、試験最大濃度のDNAコピー数(500,000copies/well)のみで、Ct値が35.8で検出され、非常に僅かな交差反応を示した。しかし、測定目的のproducti

ve mRNAに対して、100,000倍以上の選択性があると考えられた。PCRの増幅効率 $\geq 91.3\%$ であり、試験最小濃度の5 copies/wellから定量可能であった。

[0079] さらに、図3Cで示すように、イントロン3内に設計したフォワードプライマー116を含むTAU pre-mRNA検出用セットでqPCRしたところ、pre-mRNAに相当する鋳型合成DNAの117でのみCt値が算出された。PCRの増幅率は 98.7% であり、試験最小濃度の5 copies/wellから定量可能であった。

[0080] 以上のように、実験4のqPCRの条件で、TAU転写物のproductive mRNAと、nonproductive mRNAとを選択的に検出および定量できる系を構築できた。

[0081] 5. オリゴヌクレオチドのスプライススイッチング活性の精査

スプライススイッチング活性を精査するため、productive mRNAとnonproductive mRNAとをqPCRで定量した。

[0082] <方法>

実験2の方法に記載したiPS神経細胞培養法で6種のオリゴヌクレオチド（化合物1、2、3、4、5、および6）（図4A）（ $3\mu\text{M}$ 、 $N=2$ ウェル、2回の生物的反復）をそれぞれfree uptakeで処置した後（15日間処置）、cDNAサンプルを調製した。非処置サンプルにはd.w.を終濃度で0.1%になるように処置した（ $N=6$ ウェル）。次に、実験4に記載したqPCR法にて、iPS神経細胞サンプルのTAUのcDNA量を定量した。TAUの定量値をACTBの定量値で補正した。ACTBのプライマーとプローブはready-madeのHs.PT.39a.22214847（IDT）を用いた。

プライマー1（5'-ACAGAGCCTCGCCTTTG-3'）（配列番号20）

プライマー2（5'-CCTTGACACATGCCGGAG-3'）（配列番号21）

プローブ (5' - / 56 - FAM / TCATCCATG / ZEN / GTGA
GCTGGCGG / 31ABkFQ / - 3') (配列番号33)

ACTBの検量線のための鋳型合成DNAには実験2の方法に記載の配列番号24を用いた。非処置を100%になるように補正して、グラフを作成した。

[0083] <結果>

本実験では、各オリゴヌクレオチドを用いた場合のnonproductive mRNAおよびproductive mRNAの変化量をqPCRで定量した。その結果、化合物3および4でnonproductive mRNAはそれぞれ2.9倍および2.3倍増加した(図4B、左)。一方で、productive mRNAはそれぞれ28%および38%低下した(図4B、右)。以上から、化合物3および4を用いるとTAUのスプライシングを調節できると分かった。作用機序が異なる陽性対照として用いたgapmer型の比較例化合物1では、nonproductive mRNAとproductive mRNAはそれぞれ82%と81%低下したことから、比較例化合物1はスプライススイッチングではないメカニズムでTAUを低下させると確認した。

[0084] 6. TAUタンパク質の絶対定量

6種類のバリエーションが存在するTAUタンパク質を同等に定量する系を構築した。

[0085] <方法>

TAUタンパク質を定量するために、Homogeneous time resolved fluorescence (HTRF (登録商標)) アッセイ (64NTAUPEG、Cisbio / パーキンエルマージャパン) を用いた。添付文書を参考に以下の通り実施した。1X RIPA bufferにて、Tau 441 (2N4R) (SP-495-100) と Tau 352 (ON3R) (SP-497-100) のTAU組換えタンパク質 (R&D Systems) を段階希釈した。1.9 μLのDetect

ion bufferに0.1 μ LのTotal-Tau Eu Cryptate Antibody溶液を加えた（溶液A）。次に1.9 μ LのDetection bufferに0.1 μ LのTotal-Tau d2 Antibody溶液を加えた（溶液B）。溶液Aと溶液Bを2 μ Lずつ混合させた4 μ Lの抗体溶液をTAU組換タンパク質が含まれる16 μ Lに加えた（プレートはMICROPLATE、384 WELL、PS、F-BOTTOM、SMALL VOLUME、HIBASE、MED. BINDING、WHITE／Greiner Bio-One）。遮光下、23～25℃で一晩反応させた。HTRF（登録商標）マイクロプレートリーダー（ARTEMIS）にて、320nmで励起させ、620nmと665nm（検出フィルター）の蛍光のシグナルをそれぞれ測定した。665nmでの検出値を620nmでの検出値で割り、10,000を掛けた値をグラフ上で縦軸にプロットした（N=2ウェル）。横軸には組み換えタンパク濃度と総アミノ酸数の分子量から算出したモル濃度をプロットした。GraphPad PRISM version 6.07にて作図した。

[0086] <結果>

中枢神経系においてはTAU productive mRNAには合計6種類のスプライシングバリエーションが存在するため（Wang JZ et al., Prog Neurobiol. 85. 148-75. 2008）、6種類の分子量の異なるTAUタンパク質が発現すると考えられた（図5、上）。本実験では、抗TAU抗体の詳細が開示されていないCisbio／パーキンエルマージャパンより市販されるHTRF（登録商標）キットが全てのTAUタンパク質を同等に認識するかを評価した。最も長いTAU productive mRNA由来のTAU組換タンパク質（2N4R TAU／441 a. a.）と最も短いTAU productive mRNA由来のTAU組換タンパク質（ON3R TAU／352 a. a.）について、濃度を変化させて測定したところ、両者は同等に検出された（図5、下）。

[0087] 7. 濃度依存性試験 I

オリゴヌクレオチドの濃度依存性試験を実施し、*productive* mRNAおよび*nonproductive* mRNAとTAUタンパク質とを定量し、スプライススイッチング活性とTAUタンパク質のノックダウン活性を精査した。

[0088] <方法>

実験2のiPS神経細胞培養法でSSOの化合物7（配列は化合物3と同一）もしくは化合物8（配列は化合物4と同一）またはgapmer型オリゴヌクレオチドの比較例化合物1をそれぞれ*free uptake*で処置した後（15日間処置）、RIPA Buffer 1×調製済み溶液 プロテアーゼ阻害剤不含で可溶化した。これに逆転写酵素加えて反応させてcDNAサンプルを調製した。非処置サンプルにはd.w. を終濃度で0.1%になるように処置した。次に、実験4に記載したqPCR法にて、TAUとACTBのcDNA量を定量した。ACTBの定量値が「全測定値の平均値±2倍の標準偏差」に収まるウェルの値のみ解析した。コントロールとしてNeurofilament light polypeptide (NfL) を定量した。NfLのプライマーとプローブ、検量線のための鋳型合成DNAは以下を用いた (IDT)。TAUおよびNfLの定量値をACTBの定量値で補正した。非処置を100%になるようにしてグラフにプロットした。

<NfL mRNA検出用>

プライマー (5' -CCATCAGCAACGACCTCAA-3') (配列番号34)

プライマー (5' -GCTTCCAGGACCTTGTTCT-3') (配列番号35)

プローブ (5' -/56-FAM/CTTCGCCAG/ZEN/CTTCATCGAGCG/31ABkFQ/-3') (配列番号36)

NfL (5' -CGACCTGAGCCAGGTAGCCGCCATCAG

CAACGACCTCAAGTCCATCCGCACGCAGGAGAAAG
GCGCAGCTCCAGGACCTCAATGACCGCTTCGCCA
GCTTCATCGAGCGCGTGCACGAGCTGGAGCAGCA
GAACAAGGTCTTGGAAAGCCGAGCTGCTGGTGCTG
CGCCAGAAGCACTCC-3') (配列番号37)。

[0089] 次に、総タンパク質量をBCA kit (ナカライテスク) で測定するため、RIPA Buffer 1×調製済み溶液 プロテアーゼ阻害剤不含で可溶化したライセートの2 μ Lを8 μ Lのd. w. と混合した後、200 μ LのBCA溶液(4 μ LのB液と196 μ LのA液)を加えて、60℃で約30分間インキュベートした。総タンパク質の検量線のため、クイックスタートウシ血清アルブミンスタンダードセット(BIO-RAD)で500 ng/mLから段階希釈したBSA溶液で検量線を作成した。562 nmで吸光度を測定し、ライセートの総タンパク質量を定量した。次に、TAUタンパク質の濃度をHTRF (登録商標) アッセイで測定するため、RIPA Buffer 1×調製済み溶液 プロテアーゼ阻害剤不含で可溶化したライセートを1 X RIPA buffer プロテアーゼ阻害剤カクテル含有(ナカライテスク)で40倍希釈して15 μ L/wellを添加できるように準備し、抗体溶液の4 μ L/well (実験6の方法記載の溶液Aと溶液Bの等量混合液)を混合させた。TAUタンパク質の検量線には、Tau 441 (2N4R) (SP-495-100、R&D Systems)をRIPA bufferで段階希釈したものを用いた。遮光下、23~25℃で一晩反応させた。HTRF (登録商標) マイクロプレートリーダー (ARTEMIS) にて、320 nmで励起させ、620 nmと665 nm (検出フィルター) の蛍光のシグナルをそれぞれ測定した。665 nmでの検出値を620 nmでの検出値で割り、10,000を掛けた値を算出し、Tau 441 (2N4R) の検量線からiPS神経由来ライセートのTAUタンパク質の濃度を定量した。TAUタンパク質の定量値をBCAによる総タンパク質の定量値で割った値において、非処置を100%になるよう

に補正して、グラフにプロットした。GraphPad PRISM version 6.07にて作図した。

[0090] <結果>

オリゴヌクレオチドの修飾を改変した化合物7（配列は化合物3と同一）と化合物8（配列は化合物4と同一）で濃度依存性を評価したところ、数nMオーダーからTAU nonproductive mRNAが増加し、10nM程度からTAU productive mRNAが低下した（図6Aおよび6B）。さらに、化合物7および8はTAUタンパク質の量を低下させた（図6Aおよび6B）。一方で、gapmer型の比較例化合物1ではnonproductive mRNAおよびproductive mRNAがnMオーダーから共に低下した（図6C）。すべてのオリゴヌクレオチドでNFLの低下が認められないことから、化合物7および8はTAU productive mRNAを選択的に低下できる可能性が示された。

[0091] 8. TAU nonproductive mRNAが増加する神経細胞の同定

SSOが影響を与える細胞を細胞染色で確認した。

[0092] <方法>

実験2のiPS神経細胞培養法でSSOの化合物7（N=2ウェル）または化合物8（N=2ウェル）をそれぞれfree uptakeで処置した後（15日間処置）、10%中性緩衝ホルマリン液で細胞を16時間程度常温で固定した。ただし、固定による細胞の剥離を低減させるため、Poly-L-オルニチン（Sigma-Aldrich）から0.1%ポリエチレンジアミン溶液にコーティング剤を実験2の方法から変更した。また、抑制性神経の集団の割合を増加させるため、iCell（登録商標）GABA作動性神経細胞（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.）とiCell GlutaNeurons 01279を約20:約80で混合させて播種した。Advanced Cell Diagno

stics, Inc. (ACD社)より購入したTarget Probe-BA-Hs-MAPT-211-2EJ-O1-C1 (1201211-C1)とBaseScope™ Reagent Kit v2-RED (323900)の添付文書を参考に、TAU nonproductive mRNAを可視化した。具体的には固定した細胞をD-PBS (-) (PBS、富士フイルム和光純薬)で洗浄後、PBSで15倍希釈したProtease plusで常温にて10分間消化反応させた。次に、PBSで洗浄後、プローブを40℃にて2時間反応させた。1 x wash bufferで2回洗浄後、AMP 1試薬を40℃にて15～30分間反応させた。この操作をAMP 2、3、4、5、および6でも繰り返した。続いて、1 x wash bufferで2回洗浄後、AMP 7を常温にて15～30分間反応させた。次にこの操作をAMP 8でも実施した。1 x wash bufferで2回洗浄後、発色試薬であるBaseScope™ Fast RED-B含有BaseScope™ Fast RED-溶液 (B溶液をA溶液で60倍希釈した溶液)を常温にて約30分間反応させた。PBSで洗浄後、4℃、遮光下で保存した。

[0093] 次に、抗体で細胞を免疫染色するため、以下操作を実施した。PBSで洗浄後、0.1% Triton X-100含有PBS溶液で常温にて10分間透過処理した。PBSで洗浄後、Pierce™ Protein-Free T20 (TBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific)で常温にて1時間ブロッキング処理した。PBSで洗浄後、ブロッキング剤で1,000倍希釈した抗Neuronal nuclei antigen (NeuN) 抗体 (ab104224、Abcam)と1,000倍希釈した抗Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) 抗体 (A2052-100UL、Sigma-Aldrich)で常温にて1時間反応させた。PBSで洗浄後、ブロッキング剤で1,000倍希釈した2次抗体のDonkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor (登録商標) 4

88) (ab150105、Abcam) と 1,000 倍希釈した Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor (登録商標) 647) (ab150075、Abcam)、10,000 倍希釈した DAPI (同仁化学研究所) で常温にて 1 時間反応させた。PBS で洗浄し、ハイスループット細胞機能探索システム Cell Voyager CV8000 (YOKOGAWA) にて、405 nm、488 nm、561 nm、および 640 nm で励起させ、445/45 nm、525/50 nm、600/37 nm、および 676/29 nm の bandpass filter でシグナルを検出した (それぞれ DAPI、NeuN、TAU nonproductive mRNA、GABA に由来するシグナル)。ハイコンテンツ解析ソフトウェア Cell Pathfinder で画像を出力した。

[0094] <結果>

TAU nonproductive mRNA を検出するプローブを作成するため、エクソン 1 とエクソン 1 B のジャンクション、エクソン 1 B とエクソン 4 のジャンクションに相補するプローブを ACD 社で合成した (図 7 A、上)。TAU nonproductive mRNA (図 7 A、下) と、NeuN タンパク質および GABA (図 7 B) を蛍光染色により可視化した。化合物 7 および 8 では、TAU nonproductive mRNA を有する細胞が非処置に比べて多かった (図 7 A、下)。TAU nonproductive mRNA を有する細胞は NeuN 陽性かつ GABA 陰性細胞で主に認められたことから (図 7 B)、興奮性神経で TAU nonproductive mRNA が増加する傾向が示された。

[0095] 9. Single cell RNA-seq

神経細胞を興奮性神経と抑制性神経に分けて SSO による TAU (MAP T) の発現変化を確認するため、single cell RNA sequencing (scRNA-seq) を行った。

[0096] <方法>

実験2のiPS神経細胞培養法で3 μ Mの化合物7、化合物8、および比較例化合物1をそれぞれfreeuptakeで処置した後（17日間処置）、Papain Dissociation System (Worthington Biochemical Corporation)で神経細胞を分散し、回収した。なお、抑制性神経の集団の割合を増加させるため、iCell（登録商標）GABA作動性神経細胞（FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.）とiCell Glut aNeurons 01279とを混合して播種した。プレートにはCorning（登録商標）BioCoat（登録商標）ポリDリシン96ウェル透明平底TC処理済マイクロプレート（Corning）を用い、130,000 cells/wellのGlut aNeuronと42,900 cells/wellのGABA作動性神経細胞を播種した。200 μ L/well培地で培養し、3日毎に半量で培地交換した。培養18日目に、パパイン（vial2）にAccumaxとDNaseを加えた消化液を神経細胞に加えて、30分間、37℃、5%CO₂下にて細胞を分散した。ウェルを再懸濁液（DNase、vial4、および5 μ M Y-27632含有HBSS）で洗浄し、集めた細胞懸濁液をpluriStrainer-Mini 40 μ m（pluriSelect USA）で500 x g、5分間遠心ろ過し、デブリを取り除いた。上清を取り除き、沈殿した細胞を再懸濁液で懸濁し、5倍量のvial4を下層に加え、500 x g、5分間遠心分離した。上清を取り除き、沈殿した細胞を0.04%BSA（Mitenyi Biotec）含有PBSで懸濁した。500 x g、5分間遠心分離し、上清を取り除き、沈殿した細胞を0.04% BSA含有PBSで改めて懸濁し、生細胞をカウントした。Next GEM Single Cell 3' GEM Kit v3.1、Next GEM Single Cell 3' Library Kit v3.1、およびSingle Index Kit T Set A (10x Genomics)を用いて、Chromium Single Cell 3' R

agent Kitsユーザーガイド (v3.1 Chemistry Dual Index、10x Genomics) に従い、10,000 live cells／反応でChromium controller (10x Genomics) で懸濁液を作成した。逆転写反応は、50 μ L／wellにて37℃ (15分)、53℃ (45分)、85℃ (5分) で反応させて、cDNA溶液を得た (C1000 Touch サーマルサイクラー、Bio-Rad Laboratories, Inc.)。cDNAとGEX libraryを増幅させるPCR反応回数はそれぞれ11と14回とした。両ライブラリの品質とフラグメントサイズをHigh Sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent) とTapeStation (Agilent) にて測定した。DNBSEQ-G400 sequencing system (MGI Tech) により、R1では28bp、R2では100bpのリード長で測定した。1サンプルあたり4億リード以上をFastQC (v. 0.11.9) を用いて品質評価した。シーケンスデータをCell Ranger 7.0.1で処理し、デフォルトのパラメータとGRCh38参照ゲノムを用いてリードマッピングした。Cell Rangerを用いて算出されたカウントマトリックスに対して、R (version 3.6.1) のSeuratパッケージ(version 3.1.4)を用いて解析を実施した。各細胞で検出されたRNA分子の内、ミトコンドリア遺伝子の割合を算出した。検出RNA分子数が2500より大きい、かつ、ミトコンドリア遺伝子の割合が10%未満の細胞を抽出することで、遺伝子発現量の測定クオリティが特に低い細胞を除いた。次に、発現量正規化を行い、4サンプル (非処置群、化合物7処置群、化合物8処置群、比較例化合物1処置群) のデータを結合した。結合データ内で発現量の分散が大きい2,000遺伝子を抽出し、発現量の標準化を行った。標準化された2,000遺伝子を用いて主成分分析 (PCA) を実施し、上位30成分を用いて、Uniform Manifold Approximation and Projection (UMA

P) による次元圧縮、およびクラスタリングを行った。クラスター毎の遺伝子検出数から、遺伝子発現量の測定クオリティが低い集団を特定し、除いた。SLC17A6の発現パターンから興奮性神経の集団を推定した。GAD1およびGAD2の発現パターンから抑制性神経の集団を推定した。また、各クラスターに特異的な遺伝子を抽出した。細胞を興奮性神経、抑制性神経、ISL1高発現細胞、LHX8高発現細胞へと分類し、分類毎の遺伝子発現量の平均を算出し、SLC17A6、TBR1、GAD1、GAD2、ISL1、PCDH11Y、LHX8、CRABP1の発現量をヒートマップで描画した。興奮性神経と推定された集団を抽出し、非処置群とオリゴヌクレオチド処置群のTAU(MAPT)の発現量を比較した。抑制性神経と推定された集団を抽出し、非処置群とオリゴヌクレオチド処置群のTAU(MAPT)の発現量を比較した。各オリゴヌクレオチド処置群において、興奮性神経と抑制性神経とでTAU(MAPT)の発現量を低下させた割合の差を算出した。非処置群のTAU発現量とオリゴヌクレオチド処置群のTAU発現量についてそれぞれ重複を許して100細胞をランダムに抽出し、細胞間での差を求めた。本試行をブートストラップ法に従い、10回繰り返し、その平均値と95%信頼区間をSAS Software for Windows、Release 9.4 (SAS Institute Japan Ltd.) を用いて算出した。

[0097] <結果>

興奮性神経と抑制性神経のそれぞれの集団でのTAUの発現の変化をscRNA-seqで評価した(図8A)。各細胞の遺伝子発現プロファイルを次元圧縮することで、2次元にクラスタリングを実施した結果を図8Bに示す。左の集団(四角で囲んだ集団)では、グルタミン酸を細胞内に取り込むトランスポーターであるSLC17A6/VGLUT2の発現が認められたことから、興奮性神経の集団であると我々は定義した(図8B、C)。右下の集団(丸で囲んだ集団)では、GABA産生に関与する酵素のGAD1やGAD2が発現することから抑制性神経と定義した(図8B、C)。興奮性

神経の集団でのT A U (M A P T) 発現変化の平均値 (K n o c k d o w n (K D) レベル) を算出したところ、比較例化合物 1 では非処置に比べて 54.2%低下した (図 8 D、一番左)。次に抑制性神経の集団での K D レベルを算出したところ、比較例化合物 1 では非処置に比べて 49.4%低下した (図 8 D、左から 2 番目)。このことから比較例化合物 1 における両集団の K D レベルの差は 4.8%であった ($4.8\% = 54.2\% - 49.4\%$)。化合物 7 は興奮性神経の集団で T A U を 20.4%低下させ、抑制性神経の集団で 6.4%低下させた。このことから化合物 7 における両集団の K D レベルの差は 14.0%であり、比較例化合物 1 よりも大きかった ($14.0\% = 20.4\% - 6.4\%$) (図 8 D、左から 3 番目および 4 番目)。化合物 8 は興奮性神経の集団で T A U を 29.0%低下させ、抑制性神経の集団で 18.2%低下させた。このことから化合物 8 における両集団の K D レベルの差は 10.8%であり、比較例化合物 1 よりも大きかった ($10.8\% = 29.0\% - 18.2\%$) (図 8 D、左から 5 番目および 6 番目)。以上から、両集団の K D レベルの差は比較例化合物 1 よりも化合物 7 および 8 で大きく、抑制性神経の集団よりも興奮性神経の集団において T A U の低下が強いと分かった。次に、非処置群とオリゴヌクレオチド処置群からそれぞれ 100 細胞をランダムに抽出し、K D レベルの差を求めた。本試行をブートストラップ法に従い、10 回繰り返し、その平均値と 95%信頼区間を算出したところ、比較例化合物 1 と化合物 7 および 8 との間に統計的な有意差 (有意水準 5%) が確認された (図 8 E)。以上から、化合物 7 および 8 は、比較例化合物 1 と比較して有意にかつ選択的に興奮性神経集団の T A U を低下させることを明らかにした。

[0098] 10. 内在性 T A U タンパク質の減少による過剰な神経活動の同期の抑制

S S O による内在性 T A U タンパク質の減少が過剰な神経活動の同期を抑制するかを評価した。

[0099] <方法>

M a e s t r o P r o 多点電極アレイ (M E A) を、i C e l l G

lutaNeurons 01279 (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.) の添付文書を参考に実施した。具体的には、プレートのCytoView MEA 24 (Axion BioSystems) を0.1% ポリエチレンイミン溶液で常温にて一晩コーティングし、d. w. で洗浄し、乾燥させた。次に、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ラミニン (Sigma-Aldrich) を含む培地でさらに 4°C で一晩コーティングした。翌日、5% CO_2 インキュベータ (37°C) でさらに1時間静置した。iCell (登録商標) GABA作動性神経細胞とiCell GlutaNeurons 01279を等量の細胞数で混合させて、電極部に $9.9 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$ になるように播種した。翌日、XCL-1 Mature Astrocyte (AM-001-1V) を電極部に $2.2 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$ になるように添加した。2日後に比較例化合物1または化合物7を所定濃度になるように培地で希釈して添加した ($600 \mu\text{L}/\text{well}$)。非処置群には何も加えず、培地で培養した。各群は $N=6$ ウェルとした。半量の培地交換を4日毎に実施した。培養25日目で、KClを添加する前に15分間、 37°C 、5% CO_2 下にて、Maestro Proで (Pre) 自発神経活動を測定した (Axion BioSystems)。過剰な神経同期を惹起させるため、 10 mM 程度のKClを含む条件になるようにするため、 $600 \mu\text{L}/\text{well}$ の培養液に $3 \mu\text{L}$ の 1 M KClを添加した (BrainPhys培地には 5 mM より少ないKClがbasal条件で含まれているとの開示に留まるため、正確にKCl終濃度を設定できないことから、 $<10 \text{ mM}$ と記載する) (Bardy C et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2015. 112. E2725-E2734.)。解析は、Axis Navigator (version 2.0.4.21) とNeural Metric Tool (version 2.4.12) を用いた。Burst Detector Settingのネットワークバーストの検出設定としては、Burst Detection Algori

thmはInter-Spike Interval (ISI) Threshold、Minimum Number of Spikes (network bursts)は50、Maximum Inter-Spike Interval (network bursts)は100 ms、Minimum Participating Electrodes (%)は35を用いた(デフォルト設定)。

[0100] <結果>

図9Aに示すように約22日間かけて内在性のTAUを2種のオリゴヌクレオチドでノックダウンした後、Preの自発発火を測定したところ、オリゴヌクレオチド処置有無にかかわらず自発的な神経活動が認められた(図9B、左)。次に、病的な過剰な神経活動の同期を惹起させるためKCIを添加した。オリゴヌクレオチドを処置していない(no treatment)群では、四角で囲まれるネットワークバーストの回数が有意に増加した(図9B、右、および図9C)。ネットワークバーストとは、一つのウェルの中で複数の電極で同時に神経活動が観測される現象を指す(検出の定義を方法に記載した)。ネットワークバーストの慢性的な増加は、神経変性を引き起こす可能性があると考えられる。そこで、内在性TAUノックダウンがネットワークバーストの異常な増加を是正できるか調べたところ、事前に0.3 μ Mの比較例化合物1を処置した条件では増加を抑制できなかったが、3 μ Mの比較例化合物1を処置した条件ではネットワークバーストの増加を抑制できた(図9C)。また、化合物7においては1 μ Mでネットワークバーストの増加を抑制できた(図9C)。以上から、化合物7によるTAU nonproductive mRNAの増加を通じたTAU productive mRNAの減少によっても、過剰な神経活動の同期を抑制できることが分かった。

[0101] 11. 濃度依存性試験II

配列が同じSSO型オリゴヌクレオチドとgapmer型オリゴヌクレオチドの濃度依存性試験を実施し、productive mRNAおよびn

onproductive mRNAとTAUタンパク質とを定量し、スプライススイッチング活性とTAUタンパク質のノックダウン活性を精査した。

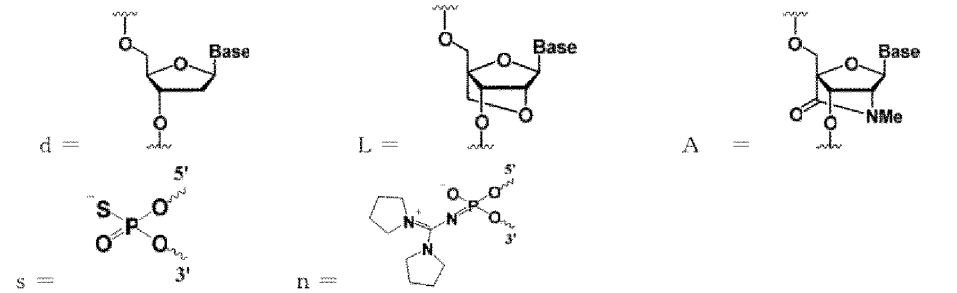
[0102] <方法>

実験2のiPS神経細胞培養法で、SSOの化合物7もしくは化合物8、またはそれぞれをgapmer型にしたオリゴヌクレオチドの比較例化合物2もしくは比較例化合物3をfree uptakeで処置した（15日間処置）。非処置サンプルにはd. w. を終濃度で0.1%になるように処置した。比較例化合物2および3は実験1と同様に合成した。

[表3]

化合物番号	配列（5' → 3'）	配列番号
7	A _{As} T _{dn} T _{As} T _{dn} ^m C _{As} T _{ds} G _{As} A _{ds} A _{As} T _d sT _{As} ^m C _{ds} T _{As} T _{dn} T _{As} G _{dn} ^m C _{As} ^m C _d	16
8	A _{As} A _{dn} T _{As} T _{dn} T _{As} ^m C _{ds} T _{As} G _{ds} A _{As} A _d sT _{As} T _{ds} ^m C _{As} T _{dn} T _{As} T _{dn} G _{As} ^m C _d	17
比較例化合物2	A _{Ls} T _{Ls} T _{Ls} T _{Ls} C _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{Ls} G _{Ls} C _{Ls} C _L	39
比較例化合物3	A _{Ls} A _{Ls} T _{Ls} T _{Ls} T _{ds} C _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} C _{ds} T _{ds} T _{Ls} T _{Ls} G _{Ls} C _L	40

“d”=DNA、“L”=LNA、“A”=AmNA、“s”=ホスホロチオエート、“n”=ホスホロアミデート、“^mC”=5-メチルシトシン。



[0103] qPCRを実施するため、SuperPrep（登録商標）II Cell Lysis & RT Kit for qPCR（TOYOBO）の添付文書を参考に、lysis緩衝液（9.78μLのLysis Solution、0.17μLのRNase Inhibitor、および0.05μLのgDNA Removerの混合液）の10μLを細胞に加えて

、常温で5分静置してゲノムDNAを分解し、RNA含有溶液を得た。次に、逆転写するため、5X RT Master MixとRNA含有溶液とd. w. を混合し、37℃（15分）、50℃（5分）、98℃（5分）で反応させて、cDNA溶液を得て、d. w. で4倍希釈した。次に、実験4に記載したqPCR法にて、TAUとACTB、NfLを定量した。TAUおよびNfLの定量値をACTBの定量値で補正した。非処置を100%になるようにしてグラフにプロットした。

[0104] TAUタンパク質の量を定量するため、細胞をRIPA Buffer 1×調製済み溶液 プロテアーゼ阻害剤不含で可溶化した。実験7に記載した方法で、総タンパク質量とTAUタンパク質の濃度をBCA kit（ナカライテスク）とHTRF（登録商標）キットで測定した。EnVisionマルチモードプレートリーダー（パーキンエルマー）にて、320nmで励起させ、620nmと665nm（検出フィルター）の蛍光のシグナルをそれぞれ測定した。TAUタンパク質の定量値をBCAによる総タンパク質の定量値で割った値において、非処置を100%になるように補正してグラフにプロットした。

[0105] <結果>

SSOの化合物7と化合物8では数nMオーダーからTAU nonproductive mRNAが増加し、10nM程度からTAU productive mRNAが低下した（図10Aおよび10B）。一方で、配列はそれぞれ同じでgapmer型である比較例化合物2および3ではnonproductive mRNAおよびproductive mRNAがnMオーダーから共に低下した（図10Cおよび10D）。配列が同じでもgapmer型のオリゴヌクレオチドではnonproductive mRNAであるかproductive mRNAであるかに関わらず減少させてしまうのに対し、本発明のSSO型のオリゴヌクレオチドではスプライシングを介してproductive mRNAを選択的に減少させることが確認できた。

[0106] 以上の実験により、エクソン1Bを含むTAU nonproductive mRNAを増加させるSSOはTAUタンパク質の量を低下させること、この作用は興奮性神経選択的でありうること、また過剰な神経活動の同期を抑制できることが示された。かかるSSOはTAU関連疾患の治療または予防に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] TAU pre-mRNAのイントロン1Bに結合するスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項2] TAU エクソン1Bを含むTAU mRNAの量を増加させることができる、請求項1に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項3] TAUタンパク質の量を低下させることができる、請求項1に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項4] TAU pre-mRNAのイントロン1Bの一部に相補的な配列を含む、請求項1に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項5] 配列番号2の6～24番目の少なくとも一部に相補的な配列を含む、請求項1に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項6] 16～20塩基長である、請求項1に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項7] 興奮性神経選択的にTAUタンパク質の量を低下させることができる、請求項1に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項8] 興奮性神経におけるTAUタンパク質の量を、抑制性神経における低下よりも少なくとも5%大きく低下させることができる、請求項7に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチド。
- [請求項9] 請求項1～8のいずれか一項に記載のスプライススイッチングオリゴヌクレオチドを含む、TAU関連疾患を治療または予防するための医薬組成物。
- [請求項10] 前記TAU関連疾患が、タウオパチーまたはてんかんである、請求項9に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 前記TAU関連疾患が、アルツハイマー型認知症、血管性認知症、レビー小体型認知症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ダウン症候群、ピック病、慢性外傷性脳症、進行性核上性麻痺、大脳基底核

変性症、および筋強直性ジストロフィー 1 型からなる群から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

[請求項12] 前記 T A U 関連疾患が、ドラベ症候群、結節性硬化症、周期性失調症、C D F E 症候群、および D E E 1 4 または 1 8 からなる群から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。

[請求項13] 前記 T A U 関連疾患が、緑内障および加齢黄斑変性からなる群から選択される、請求項 9 に記載の医薬組成物。