

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-524158
(P2019-524158A)

(43) 公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 5/0793 (2010.01)	C 1 2 N 5/0793	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-528175 (P2019-528175)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月14日 (2017.6.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月4日 (2019.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2017/053544
 (87) 国際公開番号 W02018/025098
 (87) 国際公開日 平成30年2月8日 (2018.2.8)
 (31) 優先権主張番号 62/369,814
 (32) 優先日 平成28年8月2日 (2016.8.2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 519040739
 9 6 3 6 1 3 7 カナダ インコーポレイ
 テッド
 カナダ国 J 7 A 2 B 6 ケベック ロ
 ズメール パルクビュー 4 2 0
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (72) 発明者 ベルニエ、 ギルバート
 カナダ国 J 7 A 2 B 6 ケベック ロ
 ズメール リュ パルクビュー 4 2 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BMI 1 欠損に基づくアルツハイマー病の皮質神経細胞モデルとその使用

(57) 【要約】

本発明は認知症関連神経性疾患、より具体的にはアルツハイマー病に関連する。本願では、BMI 1 欠損性であり、アルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴を示す霊長類の皮質神経細胞について説明する。このような細胞を含む細胞モデル、このような細胞を使用して抗アルツハイマー薬をスクリーニングする方法、抗アルツハイマー薬を設計する方法、及び/又は抗アルツハイマー薬の生物学的標的候補を特定する方法も説明する。また、BMI 1 活性を評価すること、及び/又はBMI 1 のエピジェネティックサイレンシングを検出することを含む、アルツハイマー病を診断する方法についても説明する。

【選択図】 図 2 A

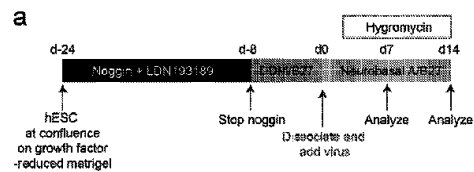


Figure 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

BMI 1 欠損性である霊長類の皮質神経細胞であり、アルツハイマー病の 1 つ以上のフェノタイプ特徴を示す単離細胞。

【請求項 2】

前記 1 つ以上のフェノタイプ特徴が、軸索膨張、軸索セグメントの切断、 β -アミロイド蓄積、C99 断片蓄積、p-Tau 蓄積、シナプス萎縮、神経細胞アポトーシス、H3K9me3 抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮、ファロイジン染色を用いた F-アクチン束形成、及びこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

BMI 1 が欠失しているか、あるいは BMI 1 遺伝的活性、BMI 1 遺伝子発現、BMI 1 タンパク質機能、及び/又は BMI 1 タンパク質発現が低下及び/又は不活化している、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

BMI 1 遺伝子に対するマイクロRNA、BMI 1 遺伝子に対する siRNA、BMI 1 遺伝子に対する shRNA、CRE-loxP を用いた BMI 1 遺伝子の遺伝的不活化、CRISPR/Cas9 を用いた BMI 1 遺伝子の遺伝的不活化、TALEN を用いた BMI 1 遺伝子の遺伝的不活化、ZFN を用いた BMI 1 遺伝子の遺伝的不活化、及びこれらの組合せのうちの一つ以上を用いる遺伝的不活化を介して BMI 1 が不活化されている、請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記霊長類がヒトである、請求項 1 ~ 請求項 4 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 6】

ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞又はヒト胚性幹細胞である、請求項 5 に記載の細胞。

【請求項 7】

前記アルツハイマー病が孤発性アルツハイマー病である、請求項 1 ~ 請求項 6 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 8】

複数の請求項 1 に記載の皮質神経細胞のインビトロ培養物を含む、認知症関連神経性疾患の細胞モデル。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の細胞が 3 次元的に培養される、請求項 8 に記載の細胞モデル。

【請求項 10】

前記細胞モデルが、アミロイドプラーク及び Tau 濃縮物を生じる、請求項 8 又は請求項 9 に記載の細胞モデル。

【請求項 11】

前記神経細胞が 3D マトリゲル (商標) マトリックス中で培養される、請求項 8 ~ 請求項 10 の何れか一項に記載の細胞モデル。

【請求項 12】

星状細胞との共培養物をさらに含む、請求項 8 ~ 請求項 11 の何れか一項に記載の細胞モデル。

【請求項 13】

前記皮質神経細胞及び前記星状細胞がヒト細胞である、12。

【請求項 14】

前記認知症関連神経性疾患がアルツハイマー病である、請求項 8 ~ 請求項 13 の何れか一項に記載の細胞モデル。

【請求項 15】

前記認知症関連神経性疾患が、前頭側頭型認知症又はレビー小体型認知症である、請求項 8 ~ 請求項 14 の何れか一項に記載の細胞モデル。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

(i) 霊長類の皮質神経細胞を提供する工程、及び
 (i i) B M I 1 の発現又は生物活性を不活化又は抑制する工程
 を含む、請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか一項に記載の細胞を調製する方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか一項に記載の神経細胞又は請求項 8 ~ 請求項 15 の何れか
 一項に記載の細胞モデルと、

アッセイ緩衝液、対照、基質、標準物質、検出材料、実験室用品、及び使用者向けマニ
 ュアル又は指示書からなる群より選択される 1 つ以上の追加構成要素と、
 を含む、抗アルツハイマー薬スクリーニング用キット。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか一項に記載の細胞を、被験抗アルツハイマー化合物に曝露
 することと、

前記被験化合物が存在する状態で、アルツハイマー病の 1 つ以上のフェノタイプ特徴に
 ついて前記細胞を評価することと、

アルツハイマー病の前記 1 つの、又は 1 つ以上のフェノタイプ特徴を抑制すること及び
 / 又は減少させることが可能な被験化合物を選択することと、
 を含む、抗アルツハイマー薬をスクリーニングする方法。

【請求項 19】

(i) B M I 1 欠損を有する細胞又は動物を、試験される被験化合物と接触させること
 と、

(i i) アルツハイマー病の 1 つ以上のフェノタイプ特徴に対する前記被験化合物の活
 性を評価することと、

を含む、抗アルツハイマー薬候補を特定するためのスクリーニング方法。

【請求項 20】

前記 1 つ以上のフェノタイプ特徴が、軸索膨張、軸索セグメントの切断、 - アミロイ
 ド蓄積、C 9 9 断片蓄積、p - T a u 蓄積、シナプス萎縮、神経細胞アポトーシス、H 3
 K 9 m e 3 抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮、ファロイジン染色を用いた F - アクチ
 ン束形成、及びこれらの組合せからなる群より選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記被験化合物との接触の存在下で、又は前記被験化合物との接触若しくは曝露の後で
 前記評価が実施される、請求項 18 又は請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記選択が、以下の生物学的効果のうちの 1 つ以上を有する被験化合物を選択すること
 を含む、請求項 18 ~ 請求項 21 の何れか一項に記載の方法：

軸索膨張の防止又は阻害；

軸索セグメントの切断の防止又は阻害；

- アミロイド蓄積の防止又は阻害；

C 9 9 断片蓄積の防止又は阻害；

p - T a u 蓄積の防止又は阻害；

シナプス萎縮の防止又は阻害；

神経細胞アポトーシスの防止又は阻害；

H 3 K 9 m e 3 抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮の防止又は阻害；

ファロイジン染色を用いた F - アクチン束形成の防止又は阻害；及び

核膜異常の防止又は阻害。

【請求項 23】

前記評価が、前記 1 つ以上のフェノタイプ特徴を、前記被験化合物に曝露された、又は
 曝露されていない野生型皮質ニューロンと比較することを含む、請求項 18 ~ 請求項 22
 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記評価が、前記 1 つ以上のフェノタイプ特徴を、前記被験化合物に曝露されていない

10

20

30

40

50

対照の細胞又は動物と比較することを含む、請求項 18 ~ 請求項 23 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 25】

BMI 1 欠損を有する非ヒト動物の、アルツハイマー病の動物モデルとしての使用。

【請求項 26】

前記動物が、軸索膨張、軸索セグメントの切断、 β -アミロイド蓄積、C99断片蓄積、p-Tau蓄積、シナプス萎縮、神経細胞アポトーシス、H3K9me3抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮、ファロイジン染色を用いたF-アクチン束形成、及びこれらの組合せからなる群より選択されるアルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴を示す、請求項 25 に記載の使用。

10

【請求項 27】

前記動物がBMI 1 についてヘミ接合である、請求項 25 又は請求項 26 に記載の使用。

【請求項 28】

前記動物がマウスである、請求項 18 ~ 請求項 27 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 29】

アルツハイマー病の研究のための、及び/又は抗アルツハイマー化合物候補の特定、検査、スクリーニング、及び/又は設計のための請求項 18 ~ 請求項 28 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 30】

(a) 請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか一項に記載の細胞を被験抗アルツハイマー化合物に曝露する工程、

20

(b) アルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴について前記細胞を評価する工程、

(c) アルツハイマー病の前記1つの、又は1つ以上のフェノタイプ特徴を抑制すること及び/又は減少させることが可能な被験化合物を選択する工程、並びに

(d) 工程(c)の被験化合物の化学構造を改変して抗アルツハイマー活性が改善した改变化合物を得る工程

を含む、抗アルツハイマー薬を設計する方法。

【請求項 31】

30

前記改变化合物を用いて工程(a) ~ (c)を再度繰り返すこと、及び所望により工程(d)を再度繰り返すことをさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

(a) 請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか一項に記載の細胞を野生型皮質ニューロンと定量的プロテオーム比較解析又はゲノムワイド発現比較解析する工程、及び

(b) 発現又は翻訳後修飾が異なる遺伝子又はタンパク質を特定する工程、を含む、

工程(b)において特定された遺伝子又はタンパク質は抗アルツハイマー薬の生物学的標的候補である、抗アルツハイマー薬の生物学的標的候補を特定する方法。

【請求項 33】

40

(c) 請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか一項に記載の細胞及び/又は前記野生型皮質ニューロンを抗アルツハイマー薬に曝露する工程、及び

(d) 曝露細胞及び/又は曝露皮質ニューロンを、工程(a)の定量的プロテオーム解析と比較定量的プロテオーム解析又は比較遺伝子発現解析する工程

をさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

対象の脳細胞におけるBMI 1 活性を評価することを含み、

BMI 1 活性の低下又は不在がアルツハイマー病の徴候である、対象におけるアルツハイマー病を診断する方法。

【請求項 35】

50

前記脳細胞が、海馬由来の細胞、前頭皮質由来の細胞、及び嗅内皮質由来の細胞からなる群より選択される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記評価が、BMI1に対する親和性を有する放射性及び/又は蛍光性血液脳関門透過性分子を前記対象に投与することを含む、請求項34又は請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記評価が、陽電子放射断層撮影(PET)脳走査の使用を含む、請求項34～請求項36の何れか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記評価が、組織生検の取得を含む、請求項34～請求項37の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項39】

前記評価が、死後に実施される、請求項34～請求項38の何れか一項に記載の方法。

【請求項40】

前記評価が、BMI1の発現レベルの検出及び/又はBMI1生物活性の検出を含む、請求項34～請求項39の何れか一項に記載の方法。

【請求項41】

前記BMI1の発現レベルの検出及び/又はBMI1生物活性の検出が、qPCR、DNAマイクロアレイ、RNA-シーケンシング、ELISA、免疫組織化学、ウエスタンブロッティング、及び/又はこれらの組合せのうちのいずれか1つによって実施される、請求項40に記載の方法。

20

【請求項42】

対象の海馬、前頭皮質、及び/又は嗅内皮質におけるBMI1のエピジェネティックサイレンシングを検出することを含む、ヒト対象における孤発性アルツハイマー病を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は認知症関連神経性疾患の分野に関し、より具体的にはアルツハイマー病の治療法を開発するための細胞及び方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

孤発性AD(sAD)は最も一般的な認知症であり、2014年ではアメリカ人の推定有病数が520万人である{Hebert, 2013}。sAD及び他の認知症の個人全員に対する2014年の総支出はアメリカ国内で2140億ドルと推定されている(アメリカアルツハイマー協会2014年レポート)。多数の治験にもかかわらず、sAD疾患を停止又は遅延させる治療は現実には存在しない{De Strooper, 2014}。sADにおける脳の変化は症状が現れる20年以上前に始まる{Villemagne, 2013}。65歳以上の人々の11%がsADである。85歳以上の人々の32%がsADである。このように、sADの最大のリスク因子は年齢の進行である{Savva, 2009}。APOLIPOPROTEINのE4アレル又はSORL1のアレル多型の保有者はAD発症のリスクが高くなる{Kanekiyo, 2014}。対照的に、家族性AD(FAD)は30～50歳の間の年齢で発症し、常染色体優性であり、APP、PSEN1、又はPSEN2の突然変異に連鎖しており、AD症例の5%未満である{Blennow, 2006}。ADは一般的に、脳の辺縁領域及び皮質領域の変性に起因する進行性の記憶障害及び行動障害を特徴とする。ADの病理学的特徴としては、アミロイドプラーク、神経原線維リン酸化TAU濃縮体、及びシナプス機能障害の存在が含まれる{Blennow, 2006}。特筆すべきことに、sADの病因は解明されておらず、未だに不明である。

40

【0003】

50

s A D患者の皮膚線維芽細胞から、人工多能性幹 (i P S) 細胞が作製されている。この方法で作製された細胞株の中には、皮質ニューロンに分化させるとA Dの病態をインビトロで示すものもある { I s r a e l , 2 0 1 2 }。これらの細胞を薬品スクリーニング法に使用することもできるが、これらの細胞株では上記疾患の遺伝的又はエピジェネティックな原因が不明のままであることから、新規A D媒介経路に対してこのスクリーニング法を適用することはできない。

【 0 0 0 4 】

したがって、アルツハイマー病 (より具体的には s A D) を含む認知症関連神経性疾患の遺伝的病因をさらに理解する必要があり、アルツハイマー病及び s A D を診断するためのより正確な方法が必要である。

10

【 0 0 0 5 】

また、アルツハイマー病及び s A D を含む認知症関連神経性疾患の有効な実験モデルも必要である。実際に非常に再現性に富み、且つ、堅固なインビトロヒトアルツハイマー病及び / 又は s A D モデルがあれば、製薬業界に対して数百万ドルを節約することができるだろう。

【 0 0 0 6 】

より具体的には、新しい s A D の治療薬を正確に検査、スクリーニング、及び / 又は設計するために、非常に再現性に富み、且つ、堅固であり、上記疾患の遺伝的原因が明らかなインビトロヒト s A D モデルが必要である。

20

【 0 0 0 7 】

また、第 I 相 ~ 第 I I I 相試験において試験中の有望な A D 治療薬の有効性 (又は無効性) を確認するために、非常に再現性に富み、且つ、堅固であり、上記疾患の遺伝的原因が明らかなインビトロヒト皮質神経細胞 s A D モデルも必要である。

【 0 0 0 8 】

本発明はこれらの要求、及び以下の本開示の概要と本発明の特徴の説明から明らかになるような他の要求に関する。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

第 1 の態様によると、本発明は、 B M I 1 欠損性である霊長類の皮質神経細胞であり、アルツハイマー病の 1 つ以上のフェノタイプ特徴を示す単離細胞に関する。

30

【 0 0 1 0 】

本発明の関連する態様は、本明細書において規定される複数の皮質神経細胞のインビトロ培養物を含む、認知症関連神経性疾患の細胞モデルに関する。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様は、

本明細書において規定される皮質神経細胞を、被験抗アルツハイマー化合物に曝露することと、

上記被験化合物が存在する状態で、アルツハイマー病の 1 つ以上のフェノタイプ特徴について上記細胞を評価することと、

アルツハイマー病の上記 1 つの、又は 1 つ以上のフェノタイプ特徴を抑制すること及び / 又は減少させることが可能な被験化合物を選択することと、
を含む、抗アルツハイマー薬をスクリーニングする方法に関する。

40

【 0 0 1 2 】

本発明の別の態様は、

(i) B M I 1 欠損を有する細胞又は動物を試験される被験化合物と接触させることと、

(i i) アルツハイマー病の 1 つ以上のフェノタイプ特徴に対する上記化合物の活性を評価することと、

を含む、抗アルツハイマー薬候補を特定するためのスクリーニング方法に関する。

50

【 0 0 1 3 】

別の態様によると、本発明は、アルツハイマー病の動物モデルとしてのBMI1欠損を有する非ヒト動物の使用に関する。

【0014】

また、本発明は、抗アルツハイマー薬を設計する方法、及び抗アルツハイマー薬の生物学的標的候補を特定する方法にも関する。

【0015】

本発明の別の態様は、対象の脳細胞におけるBMI1活性を評価することを含み、BMI1活性の低下又は不在がアルツハイマー病の徴候である、対象におけるアルツハイマー病を診断する方法に関する。

【0016】

関連する態様は、対象の海馬、前頭皮質、及び/又は嗅内皮質におけるBMI1のエピジェネティックサイレンシングを検出することを含む、ヒト対象における孤発性アルツハイマー病を診断する方法に関する。

【0017】

本発明の利点は、本発明によってヒトにおける認知症（例えばアルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及びレビー小体型認知症）の最も可能性の高い遺伝的病因、特にアルツハイマー病（より具体的にはsAD）の遺伝的病因についての強力な証拠が提供されることである。

【0018】

本発明の別の利点は、本発明が単一の遺伝的引き金、すなわちBMI1の不活化を介して、ヒト皮質ニューロン（インビトロ）におけるsADの急速かつ強力な誘導のために使用可能であることである。

【0019】

本発明に係るsADの生物モデルは、アルツハイマー病（より具体的にはsAD）を含む認知症関連神経性疾患に対する薬品候補の小スループット、中スループット、及び/又は高スループットの薬品スクリーニング並びに有効性確認（又は無効性確認）に使用可能である点で有利である。例えば、sADに対する薬品候補の有効性の確認を非常に高価な治験に移行する前に、信頼でき、且つ、適切なインビトロヒトsADモデルを可能にすることで、製薬業界に対して数百万ドルを節約する可能性が高い。

【0020】

本発明の更なる態様、利点、及び特徴については、例示に過ぎず、且つ、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない好ましい実施形態に関する以下の非限定的な説明を読むことで明らかになる。

【0021】

本発明が容易に理解可能となるように、実施例と添付図面により本発明の実施形態を例示する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】Bmi1^{+/−}マウスがADに類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図1A：15か月齢のWT（n=3）マウス及びBmi1^{+/−}マウス（n=3）由来の皮質抽出物のウエスタンブロットを示す図である。

【図1B】Bmi1^{+/−}マウスがADに類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図1B：20か月齢のWTマウス及びBmi1^{+/−}マウスの皮質切片に対するp-Tau免疫反応性を示す図である。（i）低倍率。スケールバーは20μmである。（ii）高倍率。矢頭はゴースト様ニューロン上のp-TAU沈積物を示す。（iii）Bmi1^{+/−}マウスの皮層白質の神経線維内のp-TAU沈積物（矢頭）を示す。スケールバーは8μmである。

【図1C】Bmi1^{+/−}マウスがADに類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図1C：DE2B4抗体を使用した15か月齢のWTマウス及びBmi1^{+/−}マウスの皮質（可溶性画分）のアミロイド（C99）の免疫沈殿であって、

10

20

30

40

50

F C A 3 5 4 2 抗体によって視覚化された免疫沈殿を示す図である。

【図 1 D】B m i 1 + / - マウスが A D に類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図 1 D : 20 か月齢の W T マウス及び B m i 1 + / - マウスの皮質切片に対する - アミロイド (D E 2 B 4) 免疫反応性を示す図である。(上部) 低倍率。スケールバーは 20 μ m である。(下部) 高倍率。スケールバーは 8 μ m である。

【図 1 E】B m i 1 + / - マウスが A D に類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図 1 E : 15 か月齢の B m i 1 + / - マウスでは上昇するが、24 か月齢の W T マウスでは上昇しなかった皮質抽出物におけるアミロイド (C 9 9)、p - T a u (A T 8)、及び p - J N K の免疫反応性を示す図である。

【図 1 F】B m i 1 + / - マウスが A D に類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図 1 F : I H C を使用した 15 か月齢の W T (n = 5) 及び B m i 1 + / - (n = 5) の前頭皮質における減少した N e u N + 皮質ニューロン数と増加した活性型カスパーゼ - 3 皮質ニューロン数を示す図である。全ての値は平均値 \pm S E M である。(*) はスチューデントの対応の無い t 検定で P < 0 . 0 5 であり、(* *) は P < 0 . 0 1 である。

【図 1 G】B m i 1 + / - マウスが A D に類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図 1 G : アミロイドブランク (M O A B 2) の検出が老齢 W T マウスには無いが 24 か月齢の B m i 1 + / - マウスの皮質 (C t x) と海馬 (H i p) には有ることを示す図である。C b は小脳である。

【図 1 H】B m i 1 + / - マウスが A D に類似の神経病態を提示することを示す写真とグラフを含む図である。図 1 H : 図 1 G において観察されたアミロイド陽性領域の高倍率図である。

【図 2 A】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって A D に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 A : ヒト胚性幹細胞 (h E S) の皮質ニューロンへの分化と B M I 1 ノックダウンのプロトコルを示す図である。

【図 2 B】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって A D に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 B : 分析の 7 日前に s h S c r a m b l e ウイルス (s h C T L) 又は s h B M I 1 ウイルス (s h B M I 1) と感染した分化済みニューロンの B M I 1 と b I I I - チュープリンの共焦点免疫蛍光を示す図である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 2 C】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって A D に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 C : イムノプロットにより、s h C T L ニューロンと比較して、s h B M I 1 ニューロンにおける B M I 1 及び H 2 A u b のレベルが減少したことを示す図である。

【図 2 D】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって A D に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 D : (上部) s h C T L 皮質ニューロン及び s h B M I 1 皮質ニューロンの位相差像である。白色の矢印はジストロフィー性神経突起を示す。(下部) 神経細胞マーカである G A B A 及び v G L U T 1 の発現 (14 日目) を示す図である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 2 E】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって A D に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 E : 神経細胞マーカである G A B A 及び M A P 2 の s h C T L ニューロン及び s h B M I 1 ニューロンにおける発現 (14 日目) を示す図である。白色の矢印は遠位軸索萎縮を示す。スケールバーは 40 μ m である。

【図 2 F】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって A D に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 F : 神経細胞マーカである v G L U T 1、b I I I - チュープリン、及び N e u N の s h C T L ニューロン及び s h B M I 1 ニューロンにおける発現 (14 日目) を示す図である。白色の矢印は軸索膨張と軸索セグメントに沿ったシグナル切断を示す。スケールバーは 40 μ m

10

20

30

40

50

である。

【図 2 G】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって AD に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 G : s h C T L 培養物 (n = 4) 及び s h B M I 1 (n = 4) 培養物における G A B A 陽性ニューロン及び v G L U T 1 陽性ニューロンの定量を示す図である。全ての値は平均値 ± S E M である。(*) はスチューデントの対応の無い t 検定で $P < 0.05$ である。

【図 2 H】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって AD に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 H : 前記培養物における錐体ニューロンの割合 (38 日目) を示す図である。

【図 2 I】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって AD に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 I : 神経細胞マーカー、中胚葉 / 内胚葉マーカー、及び多能性マーカーについての h E S C ニューロン (n = 3)、s h C T L ニューロン (n = 3)、及び s h B M I 1 ニューロン (n = 3) の正規化済み遺伝子発現ヒートマップを示す図である。(上部) 発現レベルについてのカラーコードレジェンド。

【図 2 J】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって AD に関連する遺伝子発現シグネチャが誘導されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 2 J : (左) s h B M I 1 ニューロンと s h C T L ニューロンとの間での A N O V A 統計分析からのボルカノプロットを示す図である。s h B M I 1 ニューロンにおいて有意に上方制御される遺伝子が右上隅に示される。(右) 上方制御された遺伝子の遺伝子オンロジー (P A N T H E R) 分析。

【図 3 A】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 A : p - T a u (P H F 1) の蓄積が (14 日目の) s h C T L ニューロンには無いが s h B M I 1 ニューロンには有ることを示す図である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 3 B】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 B : グルタミン酸作動性 s h B M I 1 ニューロンの切断された軸索セグメントにおける p - T a u (P H F 1) の蓄積 (矢印) と軸索膨張部における p - T a u の v G L U T 1 との共局在 (差込図中の矢印) を示す図である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 3 C】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 C : s h C T L 培養物 (n = 3) 及び s h B M I 1 培養物 (n = 3) における P H F 1 陽性ニューロンの定量及び軸索当たりの p - T a u 輝点 (f o c i) の定量を示す図である。全ての値は平均値 ± S E M である。(*) はスチューデントの対応の無い t 検定で $P < 0.05$ であり、(* *) は $P < 0.01$ である。

【図 3 D】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 D : アポトーシスマーカーである活性型カスパーゼ - 3 の s h C T L 培養物及び s h B M I 1 培養物における共焦点免疫蛍光を示す図である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 3 E】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 E : G A B A + 神経集団及び G A B A - 神経集団における活性型カスパーゼ - 3 陽性細胞の定量を示す図である。全ての値は平均値 ± S E M である。(*) はスチューデントの対応の無い t 検定で $P < 0.05$ である。

【図 3 F】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 F : M O A B 2 抗体又は P A 3 抗体を使用して s h C T L ニューロンと比較した s h B M I 1 ニューロンにおけるアミロイド蓄積を示す図である。スケールバーは 40 μ m である。

【図 3 G】ニューロンにおける BMI 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が

10

20

30

40

50

生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 G : - セクレターゼ阻害剤 (B S I) 又はベヒクル対照で処理された s h C T L ニューロン及び s h B M I 1 ニューロンのアミロイドオリゴマー (N U 1) 及び A b 4 2 (P A 3) の共焦点免疫蛍光を示す図である。

【図 3 H】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 及びアミロイドの蓄積が生じることを示す写真とグラフを有する図である。図 3 H : E L I S A による s h C T L ニューロン (n = 3) 及び s h B M I 1 ニューロン (n = 3) における細胞内及び細胞外の A b 4 2 レベルを示す図である。(右) B S I 又はベヒクル対照で処理された s h C T L ニューロン (n = 3) 及び s h B M I 1 ニューロン (n = 3) における A b 4 2 レベル。全ての値は平均値 ± S E M である。(* *) はスチューデントの対応の無い t 検定で P < 0 . 0 1 である。

10

【図 4 A】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 A : 3 次元での皮質ニューロンの長期培養の実験スキームを示す図である。

【図 4 B】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 B : シナプスマーカーであるシナプトフィジン (S Y N) 及び P S D 9 5 の s h B M I 1 ニューロンにおける低下した免疫反応性を示す図である。スケールバーは 4 0 μ m である。

【図 4 C】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 C : M O A B 2 又は自家蛍光性化合物 K 1 1 4 を使用して s h B M I 1 ニューロンにおけるアミロイドプラーク形成を示す図である。N U 1 抗体を使用して s h B M I 1 ニューロン細胞質におけるアミロイドオリゴマー沈積を示す。スケールバーは 4 0 μ m である。

20

【図 4 D】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 D : s h C T L ニューロンと対照的に、 s h B M I 1 ニューロンにおいて p - T a u (P H F 1 及び 7 6 4 G) の蓄積を広げた細胞外凝集体 (i) 又は濃縮体 (i i) として示す図である。コリン作動性ニューロンマーカーである C h A T との共染色によって大きな p - T a u 濃縮体を含む変性中の C h A T 陽性 s h B M I 1 ニューロンが示されている。スケールバーは 4 0 μ m である。

30

【図 4 E】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 E : s h B M I 1 ニューロンの細胞体に局在する p - T a u 濃縮体の 3 次元 z スタック再構成を示す図である。

【図 4 F】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 F : s h B M I 1 ニューロン溶解物中の凝集型アミロイド (3 0 k D a) 、 C 9 9 断片 (1 4 k D a) 、 及び A b 4 2 ペプチド (4 k D a) の蓄積を示す図である。

【図 4 G】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって p - T a u 濃縮体及びアミロイドプラークが形成されることを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図 4 G : E L I S A により s h C T L ニューロン (n = 4) 及び s h B M I 1 ニューロン (n = 4) における細胞外 A b 4 2 レベルを示す図である。全ての値は平均値 ± S E M である。(* *) はスチューデントの対応の無い t 検定で P < 0 . 0 0 1 である。

40

【図 5 A】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって M A P T 、 G S K 3 b 及び p 5 3 が活性化されることを示す写真とグラフを有する図である。図 5 A : s h C T L ニューロン、 s h B M I 1 ニューロン、及び B M I 1 過剰発現 (B M I 1 O E) ニューロンにおける A D 関連タンパク質のイムノプロットを示す図である。ボンソー染色を使用し、且つ、 s h C T L ニューロンにおける発現を 1 としてタンパク質発現比率を確定した。

【図 5 B】ニューロンにおける B M I 1 欠損によって M A P T 、 G S K 3 b 及び p 5 3 が活性化されることを示す写真とグラフを有する図である。図 5 B : D M S O 、 - セクレ

50

ターゼ阻害剤 (BSI)、 γ -セクレターゼ阻害剤 (GSI)、又は γ -セクレターゼモジュレーター (GSM) で処理された shBMI1 ニューロンにおける F-アクチン (ファロイジン)、アミロイド (PA3)、p-Tau (PHF1)、及び活性型カスパーゼ-3 (Casp3a) の共焦点分析を示す図である。shCTLニューロンを1として定量を確定した。スケールバーは40 μ mである。

【表1】

化合物	会社	名称	カタログ番号	作用濃度	
BSI	SCB	BSI-IV	sc-222304	1 μ M	
GSI	Sigma	DAPT	D5942	0.5 μ M	10
GSM	Millipore	GSM XXII	565791	30 μ M	

【図6A】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6A: CTL患者 (n=2) 及びAD患者 (n=3) の海馬におけるGAPDH、FOXG1、ASCL1、及びNEUROD1に対して正規化されたqPCRでのBMI1遺伝子発現レベルを示す図である。(上部) CTL脳に対してAD脳で減少したBMI1のパーセンテージ。全ての値は平均値 \pm SEMである。(*)はスチューデントの対応の無いt検定でP<0.05であり、(**)はP<0.01である。 20

【図6B】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6B: CTL患者 (n=2) 及びAD患者 (n=3) の海馬における4対の非重複性プライマーペアを使用するGAPDHに対して正規化されたqPCRでのBMI1遺伝子発現レベルを示す図である。全ての値は平均値 \pm SEMである。(*)はスチューデントの対応の無いt検定でP<0.05であり、(**)はP<0.01である。

【図6C】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6C: 2つの独立した起源(ダグラス病院とパナー衛生研究所)に由来するCTL患者 (n=5) 及びAD患者 (n=6) の海馬におけるGAPDHに対して正規化されたqPCRでのBMI1遺伝子発現レベルを示す図である。(**)はスチューデントの対応の無いt検定でP<0.01である。 30

【図6D】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6D: 2つの独立した起源(ダグラス病院とパナー衛生研究所)に由来するCTL患者 (n=5) 及びAD患者 (n=6) の海馬におけるGAPDHに対して正規化されたqPCRでのEZH2遺伝子発現レベルを示す図である。

【図6E】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6E: 同年齢の対照患者とAD患者に由来する前頭皮質切片上でのBMI1(黒色の矢印)及びNeuN(小さい黒色の正方形)の免疫染色を示す図である。リポフスチン沈積(小さい星印)に注目されたい。スケールバーは8 μ mである。 40

【図6F】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6F: BMI1に対するクローンF6を使用した若齢対照患者 (n=3)、FAD患者 (n=4)、及びAD患者 (n=2) に由来する海馬抽出物に対するイムノプロットを示す図である。

【図6G】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6G: BMI1に対するクローンF6を使用した対照患者 (n=6) 及びAD患者 (n=6) に由来する前頭皮質 50

に対するイムノプロットを示す図である。

【図6H】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6H：対照患者、AD患者、前頭側頭型認知症（FTD）患者、レビー小体型認知症（DLB）患者、ピック病（PSP）患者、コルサコフ症候群（KS）患者、及び含シヌクレイン型DLB患者におけるBMI1タンパク質レベルの定量を示す図である。全ての値は平均値±SEMである。（**）は一元配置ANOVAで $P < 0.01$ である。

【図6I】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6I：IgG抗体、H2A^{ub}抗体、及びBmi1クローン1.T.21抗体（ab14389）を使用した対照（428番、89歳）及びAD（1127番、88歳）の前頭皮質試料に対するChIP-qPCRを示す図である。

【図6J】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6J：対照患者（ $n = 2$ ）及びAD患者（ $n = 2$ ）に由来する海馬抽出物に対するイムノプロットを示す図である。

【図6K】脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す模式図、写真、及びグラフを有する図である。図6K：対照患者、FAD患者、及びAD患者に由来する海馬抽出物（Hippo）及び前頭皮質抽出物（Fct）におけるBMI1タンパク質レベル及びH2A^{ub}タンパク質レベルの定量を示す図である。海馬は3人分の若齢対照、4人分のFAD脳、3人分の老齢対照脳、及び5人分のAD脳に由来する。前頭皮質は6人分の老齢対照脳と6人分のAD脳に由来する。全ての値は平均値±SEMである。（*）はスチューデントの対応の無いt検定で $P < 0.05$ であり、（**）は $P < 0.01$ であり、（***）は $P < 0.001$ である。

【図7A】独立した抗体を使用して、脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す写真を含む図である。図7A：Cell Signaling社のBMI1抗体クローンD42B3を使用したWT皮質抽出物及びBmi1皮質抽出物に対するイムノプロットを示す図である。

【図7B】独立した抗体を使用して、脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す写真を含む図である。図7B：クローンD42B3 BMI1抗体を使用した対照患者（ $n = 4$ ）及びAD（ $n = 5$ ）患者に由来する前頭皮質に対するイムノプロットを示す図である。

【図7C】独立した抗体を使用して、脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す写真を含む図である。図7C：クローンD42B3 BMI1抗体を使用した対照患者、AD患者、前頭側頭型認知症（FTD）患者、ピック病（PSP）患者、及びコルサコフ症候群患者（KS）に由来する前頭皮質に対するイムノプロットを示す図である。

【図7D】独立した抗体を使用して、脳でのBMI1の発現がsADでは低下するが、他の関連の認知症では低下しないことを示す写真を含む図である。図7D：クローンD42B3 BMI1抗体を使用した対照患者、AD患者、及びレビー小体型認知症（DLB）患者に由来する前頭皮質に対するイムノプロットを示す図である。

【図8A】AD脳において見られるクロマチン異常がBMI1の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図8A：15か月齢のWTマウス（ $n = 3$ ）及びBmi1^{+/-}マウス（ $n = 3$ ）に由来する皮質抽出物のウエスタンプロットを示す図である。

【図8B】AD脳において見られるクロマチン異常がBMI1の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図8B：15か月齢のWTマウス及びBmi1^{+/-}マウスに由来する皮質抽出物のH3K9me3についての免疫蛍光を示す図である。

【図8C】AD脳において見られるクロマチン異常がBMI1の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図8C：shCTLヒト皮質ニューロン及びshBM

10

20

30

40

50

I 1 ヒト皮質ニューロンの H 3 K 9 m e 3 についての免疫蛍光を示す図である。

【図 8 D】A D 脳において見られるクロマチン異常が B M I 1 の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図 8 D : H 3 K 9 m e 3 抗体を使用した対照患者 (n = 6) 及び A D 患者 (n = 6) に由来する前頭皮質に対するイムノプロットを示す図である。

【図 8 E】A D 脳において見られるクロマチン異常が B M I 1 の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図 8 E : 同年齢の対照患者及び A D 患者に由来する前頭皮質切片上での H 3 K 9 m e 3 の免疫染色を示す図である。

【図 8 F】A D 脳において見られるクロマチン異常が B M I 1 の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図 8 F : 図 E の写真の定量を示す図である。全ての値は平均値 ± S E M である。(*) はスチューデントの対応の無い t 検定で $P < 0.05$ であり、(* *) は $P < 0.01$ である。

【図 8 G】A D 脳において見られるクロマチン異常が B M I 1 の欠損によっても誘導されることを示す写真を含む図である。図 8 G : 図 E の写真の定量を示す図である。全ての値は平均値 ± S E M である。(*) はスチューデントの対応の無い t 検定で $P < 0.05$ であり、(* *) は $P < 0.01$ である。

【図 9 A】ヒトニューロンにおける B M I 1 ノックアウトによって A D 病態が生じることを示す一連の図である。図 9 A : 有糸分裂後のニューロンにおける B M I 1 の不活化のための実験法の模式図である。

【図 9 B】ヒトニューロンにおける B M I 1 ノックアウトによって A D 病態が生じることを示す一連の図である。図 9 B ~ 図 9 F においては、1 か月の成熟後に C R I S P R / C a s 9 ヌクレアーゼ、合成スクランブルガイド RNA (s g R N A - C t r l)、又は B M I 1 のエクソン 1 に対して相補的なガイド RNA (s g R N A - B M I 1) の発現用のプラスミドを 3 回にわたって皮質ニューロンに形質移入した。形質移入されたニューロンを 2 週間培養した後に分析した。図 9 B : B M I 1 座位の 4 か所の異なる場所についての野生型 (s g R N A - C t r l) ニューロン及び B M I 1 ノックアウト (s g R N A - B M I 1) ニューロンに対するゲノム P C R の写真を示す図である。エクソン 3、エクソン 4、又は遺伝子の 3' 末端ではなくエクソン 1 (白色の矢印) 上に欠失があることに注目されたい。

【図 9 C】ヒトニューロンにおける B M I 1 ノックアウトによって A D 病態が生じることを示す一連の図である。図 9 B ~ 図 9 F においては、1 か月の成熟後に C R I S P R / C a s 9 ヌクレアーゼ、合成スクランブルガイド RNA (s g R N A - C t r l)、又は B M I 1 のエクソン 1 に対して相補的なガイド RNA (s g R N A - B M I 1) の発現用のプラスミドを 3 回にわたって皮質ニューロンに形質移入した。形質移入されたニューロンを 2 週間培養した後に分析した。図 9 C : s g R N A - C t r l ニューロン及び s g R N A - B M I 1 ニューロンに対する B M I 1 及び H 2 A u b についてのイムノプロットの写真を示す図である。

【図 9 D】ヒトニューロンにおける B M I 1 ノックアウトによって A D 病態が生じることを示す一連の図である。図 9 B ~ 図 9 F においては、1 か月の成熟後に C R I S P R / C a s 9 ヌクレアーゼ、合成スクランブルガイド RNA (s g R N A - C t r l)、又は B M I 1 のエクソン 1 に対して相補的なガイド RNA (s g R N A - B M I 1) の発現用のプラスミドを 3 回にわたって皮質ニューロンに形質移入した。形質移入されたニューロンを 2 週間培養した後に分析した。図 9 D : s g R N A - C t r l ニューロン及び s g R N A - B M I 1 ニューロンに対する M A P 2 及び H 2 A u b についての免疫蛍光の写真を示す図である。s g R N A - B M I 1 ニューロンにおいて H 2 A u b 陽性細胞核が減少していることに注目されたい。スケールバーは $100 \mu m$ である。

【図 9 E】ヒトニューロンにおける B M I 1 ノックアウトによって A D 病態が生じることを示す一連の図である。図 9 B ~ 図 9 F においては、1 か月の成熟後に C R I S P R / C a s 9 ヌクレアーゼ、合成スクランブルガイド RNA (s g R N A - C t r l)、又は B M I 1 のエクソン 1 に対して相補的なガイド RNA (s g R N A - B M I 1) の発現用の

10

20

30

40

50

プラスミドを3回にわたって皮質ニューロンに形質移入した。形質移入されたニューロンを2週間培養した後に分析した。図9E: s g R N A - C t r lニューロンには無いが s g R N A - B M I 1ニューロンにはある p - T a u (P H F 1) の蓄積の写真を示す図である。s g R N A - B M I 1における濃縮核の存在(白色の矢印)及び特にB M I 1ノックアウトニューロンにおける p - T a u の蓄積(赤色の矢印)に注目されたい。二次抗体だけを使用して染色された s g R N A - B M I 1ニューロンを使用して非特異的バックグラウンド蛍光の可能性についてアッセイした。図9E~図9Hにおいて、スケールバーは40 μ mである。

【図9F】ヒトニューロンにおけるB M I 1ノックアウトによってA D病態が生じることを示す一連の図である。図9B~図9Fにおいては、1か月の成熟後にC R I S P R / C a s 9ヌクレアーゼ、合成スクランブルガイドRNA (s g R N A - C t r l)、又はB M I 1のエクソン1に対して相補的なガイドRNA (s g R N A - B M I 1) の発現用のプラスミドを3回にわたって皮質ニューロンに形質移入した。形質移入されたニューロンを2週間培養した後に分析した。図9F: s g R N A - C t r lニューロンには無いが s g R N A - B M I 1には有るアミロイド (D 9 A 3 A) 蓄積の写真を示す図である。二次抗体だけを使用して染色された s g R N A - B M I 1ニューロンを使用して非特異的バックグラウンド蛍光の可能性についてアッセイした。図9E~図9Hにおいて、スケールバーは40 μ mである。

【図9G】ヒトニューロンにおけるB M I 1ノックアウトによってA D病態が生じることを示す一連の図である。図9G~図9Hにおいては2か月の成熟後に皮質ニューロンに3回形質移入し、1週間培養した後に分析した。図9G: シナプス後マーカーであるP S D 9 5に対する免疫反応性が s g R N A - C t r lニューロンでは低下していないが s g R N A - B M I 1では低下している写真を示す図である。二次抗体だけを使用して染色された s g R N A - B M I 1ニューロンを使用して非特異的バックグラウンド蛍光の可能性についてアッセイした。図9E~図9Hにおいて、スケールバーは40 μ mである。

【図9H】ヒトニューロンにおけるB M I 1ノックアウトによってA D病態が生じることを示す一連の図である。図9G~図9Hにおいては2か月の成熟後に皮質ニューロンに3回形質移入し、1週間培養した後に分析した。図9H: シナプス前マーカーであるシナプトフィジン (S Y N) に対する免疫反応性が s g R N A - C t r lニューロンでは低下していないが s g R N A - B M I 1では低下している写真を示す図である。二次抗体だけを使用して染色された s g R N A - B M I 1ニューロンを使用して非特異的バックグラウンド蛍光の可能性についてアッセイした。(E~H)スケールバーは40 μ mである。図9E~図9Hにおいて、スケールバーは40 μ mである。

【図10】B M I 1 (配列番号1) の遺伝子配列を提示する図である。コード配列は507~1487にわたる。

【図11】B M I 1のアミノ酸配列 (配列番号2) を提示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の更なる詳細及びその利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

【0024】

以下の実施形態の説明において、本発明の実施の基になり得る実施例を例示することにより添付図面を参照する。本発明の開示範囲から逸脱しない限り、他の実施形態が実施可能であることは理解され得る。

【0025】

(概要)

現在まで、s A Dの遺伝的病因は不明であり、したがってs A Dの有効な実験モデルは存在していない。本発明者らは、単一の遺伝的引き金、すなわちB M I 1の不活化が、ヒトにおける認知症(例えば、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及びレビー小体型認知症)、特にアルツハイマー病、より具体的にはs A Dの最も可能性の高い遺伝的病因である、という強力な証拠を提供する。

10

20

30

40

50

【0026】

本発明者らは、ヒト皮質ニューロンにおける遅発型孤発性アルツハイマー病（sAD）の誘導性遺伝的モデルを得た。一実施形態によれば、ヒト多能性幹細胞又はヒト胚性幹細胞を使用して、大量のヒト皮質ニューロンを生成することが可能である。次に、有糸分裂後のニューロン又はそれらの前駆細胞に、BMI1（shBMI1）に対して短ヘアピンRNAを発現するレンチウイルスを感染させる。shBMI1コンストラクトのプラスミドDNA形質移入を複数回用いて同様の結果を得ることが可能である。BMI1ノックダウンのわずか2週間後に、sADの特徴、すなわち軸索膨張、軸索セグメントの切断、-アミロイド及びp-Tau蓄積と、神経細胞アポトーシスを示す神経細胞のフェノタイプを見ることが可能である。

10

【0027】

本願は、ヒト胚性幹細胞の分化により作製されたヒト皮質前駆細胞/ニューロンにおいてBMI1を不活化する方法を説明する。BMI1が欠損すると、ヒト皮質ニューロンは軸索膨張、軸索セグメントの切断、並びにカドヘリン/Wnt及びアルツハイマー病/プレセニリンシグナリングに関連度が高い遺伝子発現シグネチャなどの幾つかの異常を示すことが結果より明らかにされる。

【0028】

また、本発明者らは、ファロイジン染色を使用してshBMI1処理ニューロンにおけるF-アクチン束の形成も観察した。このフェノタイプは、p-Tau蓄積又は総Tau蓄積の副産物と考えられる。同様に、本発明者らは、マトリゲル（商標）中の長期（6～8週間）神経細胞培養物（すなわち、3D培養物）に、細胞外アミロイドプラークの形成、細胞内p-Tau濃縮体、並びにシナプス前及びシナプス後の萎縮及び/又は変性が生じることを観察した。本発明に係る細胞モデルは、このようにsADの特徴を再現している。このことは、shBMI1ニューロンの遺伝子発現プロファイルについても言え、その遺伝子発現プロファイルはsADのシグネチャを提示している。

20

【0029】

特定の実施形態では、本発明は、sADモデリングを（おそらくあらゆる起源の）ヒト皮質ニューロンにおいて誘導することを可能とする方法であって、単一の因子、すなわちBMI1の遺伝的不活化を介すること（例えば、CRISPR/Cas9及び全ての同等物による遺伝子編集法又はCRE/LoxP介在性遺伝的組換え）又は遺伝子ノックダウンを介すること（shRNA又はsiRNA）を特徴とする。

30

【0030】

さらに、複数の実施形態において、本発明は、15日間で非常に急速に生じ、且つ、堅固な（したがって容易に測定可能な）疾患フェノタイプを誘導することを可能とする（図2～3）方法であって、BMI1が制御する分子経路の指向性薬物ターゲティングをそれによって可能にする（図2I～図2J及び図5I）方法を特徴とする。また、今日までに分析されたほぼ全てのsAD脳試料でBMI1発現が欠損していることから（図6）、インビトロでのsADフェノタイプをレスキューすることが可能な薬品が、大半のsAD患者で効率的に作用するであろうことが示唆される。

40

【0031】

本発明によれば、BMI1遺伝子の遺伝的「機能欠損」によって、コリン作動性ニューロンを含むヒト皮質ニューロンにおいてsAD特徴が再現される。したがって、本発明は、薬品スクリーニング法及び薬品効果検証法に適したユニークな手段を提供する。また、本発明は、新しい認知症関連治療法の論理的設計のための、sADに至る分子経路及びカスケードを理解するためのユニークな細胞モデルも提供する。

【0032】

（単離BMI1欠損細胞）

一態様によれば、本発明は、BMI1欠損性であり、且つ、アルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴を示す単離細胞に関する。

【0033】

50

本明細書において使用される場合、「BMI1」という用語は、概して、Polycomb グループRINGフィンガータンパク質4 (PCGF4) 又はRINGフィンガータンパク質51 (RNF51) としても知られるPolycomb 複合体タンパク質BMI-1を指し、ヒトではBMI1 遺伝子 (B細胞特異的モロニー Maus 白血病ウイルス組み込み部位1) によってコードされるタンパク質である

【0034】

知られているように、BMI1は約37~42kDaのタンパク質である。BMI1のヒトcDNA配列のGenBank (商標) 受託番号は、NM_005180.8であり、NCBI Gene ID: 648の番号で引用される。図9は、BMI1の遺伝子配列 (配列番号1) を示している。コード配列は507~1487にわたる。図10は、BMI1のアミノ酸配列 (配列番号2) を示している。ヒトでは、上流遺伝子プロモーター配列によって生成される未だに特徴不明のアイソフォームが存在し、そのアイソフォームは約70kDaのタンパク質 (COMM3-BMI1) を生成する。

10

【0035】

本明細書において使用される場合、「BMI1欠損性」という用語又は「BMI1欠損」などの関連する用語は、BMIの抑制、不活化、阻害等を指す。上記用語は、例えば、BMI1 遺伝子発現、BMI1タンパク質発現及び/又はBMI生物活性の抑制、不活化及び/又は阻害を指す場合がある。複数の実施形態において、上記用語は、BMI1が不活化されているか、欠失しているか、又はその発現が遺伝的レベルでノックダウンされている状況を指す。幾つかの実施形態では、上記用語は、BMI1生物活性が医薬阻害剤によって抑制されている状況を包含する。ある実施形態では、上記用語は、BMIの活性型アイソフォームの抑制、不活化、阻害等を包含する場合がある。

20

【0036】

好ましい実施形態では、上記細胞は霊長類の皮質神経細胞である。本明細書において使用される場合、「霊長類」という用語は、ヒト、並びにチンパンジー、サル、マカク及びゴリラを含むがこれらに限定されない非ヒト霊長類を包含する。霊長類は、ヒトであることが好ましい。

【0037】

本明細書において使用される場合、「アルツハイマー病」又は「AD」という用語は、孤発性及び遺伝性 (すなわち家族性) の両方のアルツハイマー病を包含する。好ましい実施形態では、本発明は、孤発性アルツハイマー病 (sAD) に向けられたものであり、すなわち有効、且つ、堅固なsADモデルである細胞を対象とする。

30

【0038】

複数の実施形態において、本発明の細胞は、軸索膨張、軸索セグメントの切断、アミロイド蓄積、C99断片蓄積、p-Tau蓄積、シナプス萎縮、神経細胞アポトーシス、H3K9me3抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮、ファロイジン染色を用いたF-アクチン束形成、及びこれらの組合せから選択されるアルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴を示す。

【0039】

任意の適切な方法又は技術を用いて、本発明のBMI1欠損性霊長類皮質神経細胞を入手することが可能である。例えば、様々な細胞でBMIを不活化することが可能であり得る。例えば、ヒト胎児由来の初代神経組織、死後ヒト脳組織、ヒト神経幹細胞、又はヒト体細胞由来の人工神経細胞などの様々な起源から、BMI1欠損性霊長類皮質神経細胞を獲得及び/又は誘導することが可能である。好ましい実施形態では、本発明に係るBMI1欠損性霊長類皮質神経細胞は、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞又はヒト胚性幹細胞である。

40

【0040】

また、任意の適切な方法又は技術を用いて、BMI1 遺伝子発現、BMI1タンパク質発現及び/又はBMI生物活性の抑制、不活化及び/又は阻害を達成することが可能である。例えば、BMI1 遺伝子に対するマイクロRNA、BMI1 遺伝子に対するsiRN

50

A、BMI1遺伝子に対するshRNA、CRE-loxPを用いたBMI1遺伝子の遺伝的不活化、CRISPR/Cas9を用いたBMI1遺伝子の遺伝的不活化（例えば、実施例9を参照されたい）、TALENを用いたBMI1遺伝子の遺伝的不活化、ZFNを用いたBMI1遺伝子の遺伝的不活化、又は他の任意の適切な遺伝子編集法若しくは相同組換え法、並びにこれらの組合せのうちの一つ以上を用いる遺伝的不活化を介して、BMI1を不活化することが可能である。好ましい実施形態では、ヒト皮質ニューロンにおけるBMI1のノックダウン又は遺伝的欠失によって、BMI1欠損皮質神経細胞が得られる。複数の実施形態において、BMI1の医薬阻害剤（例えばPTC Therapeutics社のBMI1阻害剤であるPTC-209（Sigma社カタログ番号SML1143から入手可能）及びPTC-596（癌治療について治験中。PTC Therapeutics社のウェブページを参照されたい））を使用して、BMI1生物活性が抑制、不活化及び/又は阻害される。

10

【0041】

したがって、本発明の関連態様は、本発明の細胞を調製する方法に関する。一実施形態では、上記方法は、(i)霊長類の皮質神経細胞を提供する工程、及び(ii)BMI1の発現又は生物活性を不活化又は抑制する工程を含む。

【0042】

（認知症関連神経性疾患の細胞モデル）

本発明の別の態様は、認知症関連神経性疾患の細胞モデルであって、本明細書において規定される複数のBMI1欠損皮質神経細胞のインビトロ培養物を含む細胞モデルに関する。

20

【0043】

一実施形態では、3Dマトリゲル（商標）マトリックスを含むがこれに限定されない、任意の適切なマトリックスを使用して、BMI1欠損皮質神経細胞が3次元的に培養される。

【0044】

細胞モデルは、BMI1欠損皮質神経細胞と共培養物される他の細胞を含んでもよい。このような他の細胞の例としては、例えば星状細胞が挙げられる。一実施形態では、BMI1欠損皮質神経細胞は、支持細胞としての星状細胞と共培養される。複数の実施形態において、皮質神経細胞はヒト細胞であり、星状細胞は哺乳類細胞（例えば、ヒト、霊長類、マウス、ラット等）である。好ましい実施形態では、皮質神経細胞と星状細胞は両方ともヒト細胞である。

30

【0045】

上記細胞モデルは、あらゆる認知症関連神経性疾患（アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及びレビー小体型認知症を含むがこれらに限定されない）との関連で有用であり得る。好ましい実施形態では、認知症関連神経性疾患は、アルツハイマー病（例えば、遺伝性又は孤発性）であり、より好ましくはsADである。

【0046】

（スクリーニング方法）

本発明に係る細胞及び細胞モデルは、薬品スクリーニング法及び薬品効果検証法に特に有用であり得る。これら細胞及び細胞モデルは、sADを含む認知症に至る分子経路及びカスケードの理解、及び新しい認知症関連治療法の論理的設計に適したユニークなモデルでもあり得る。

40

【0047】

したがって、本発明の関連態様は、認知症関連疾患（例えば、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及びレビー小体型認知症）の治療用の薬品及び分子をスクリーニングするための方法に関する。

【0048】

本明細書において使用される場合、特定の疾患の「治療用分子」又は特定の疾患用の「薬品」などの用語（及び/又はあらゆる類似の表現）に対する言及は、疾患若しくは状態

50

、疾患若しくは状態の症状、又は疾患若しくは状態のリスク（罹病性）を安定化させる、治療する、癒す、緩和する、軽減する、変化させる、治療する、悪化を抑える、回復させる、改善する、又は影響を与える必要がある対象に投与され得るあらゆる分子又は化合物（天然物又は化学合成物）を包含する。

【0049】

1つの特定の態様によれば、本発明は抗アルツハイマー薬をスクリーニングするための方法に関する。一実施形態では、この方法は下記を含む：

- ・本明細書において規定されるBMI 1欠損性霊長類皮質神経細胞を、被験抗アルツハイマー化合物に曝露すること；
- ・上記被験化合物が存在する状態で、アルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴について上記細胞を評価すること；
- ・アルツハイマー病の上記1つの、又は1つ以上のフェノタイプ特徴を抑制すること及び/又は減少させることが可能な被験化合物を選択すること。

10

【0050】

別の特定の態様によれば、本発明は、抗アルツハイマー薬候補を特定するためのスクリーニング方法に関する。一実施形態では、この方法は、(i) BMI 1欠損を有する細胞又は動物を、試験される被験化合物と接触させること、及び(ii) アルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴に対する上記化合物の活性を評価すること、を含む。上記細胞は、本明細書において規定されるBMI 1欠損性霊長類皮質神経細胞であることが好ましい。上記動物は、BMI 1欠損を有するか、又はヒトアルツハイマー病に相当する認知症関連疾患（以下参照）を有する可能性がある、任意の動物であり得る。

20

【0051】

フェノタイプ特徴は、軸索膨張、軸索セグメントの切断、 α -アミロイド蓄積、C99断片蓄積、p-Tau蓄積、シナプス萎縮、神経細胞アポトーシス、H3K9me3抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮、ファロイジン染色を用いたF-アクチン束形成、及びこれらの組合せから選択され得る。

【0052】

複数の実施形態において、上記評価は、被験化合物との接触の存在下で、又は被験化合物との接触若しくは曝露の後で実施される。

【0053】

複数の実施形態において、上記選択工程は、下記の生物学的効果のうちの1つ以上を有する被験化合物を選択することを含む：

30

- ・軸索膨張の防止又は阻害；
- ・軸索セグメントの切断の防止又は阻害；
- ・ α -アミロイド蓄積の防止又は阻害；
- ・C99断片蓄積の防止又は阻害；
- ・p-Tau蓄積の防止又は阻害；
- ・シナプス萎縮の防止又は阻害；
- ・神経細胞アポトーシスの防止又は阻害；
- ・H3K9me3抗体を用いたヘテロクロマチン脱凝縮の防止又は阻害；
- ・ファロイジン染色を用いたF-アクチン束形成の防止又は阻害；及び
- ・例えばラミンA/C抗体、又はラミンA/C-GFP、RFP、YFP、mTomato、mCherry融合タンパク質、又はいずれかの蛍光ラミンA/C融合タンパク質を使用することによる、核膜異常の防止又は阻害。

40

【0054】

複数の実施形態において、評価工程は、被験化合物に曝露された、又は曝露されていない野生型皮質ニューロンを、1つ以上のフェノタイプ特徴と比較することを含む。複数の実施形態において、評価工程は、被験化合物に曝露されていない対照の細胞又は動物を、1つ以上のフェノタイプ特徴と比較することを含む。

【0055】

50

本発明の別の態様は、認知症関連疾患の治療のための薬品及び分子（例えば、抗アルツハイマー薬）をスクリーニングするためのキットに関する。一実施形態によれば、このキットは、本明細書において規定されるBMI1欠損性霊長類皮質神経細胞及び/又は本明細書において規定される細胞モデルと、1つ以上の追加構成要素と、を含む。あり得る追加構成要素の例としては、アッセイ緩衝液、対照、基質、標準物質、検出材料（例えば、抗体、フルオレセイン標識誘導体、発光性基質、検出溶液、シンチレーション測定用液等）、実験室用品（例えば、脱塩カラム、反応チューブ又はマイクロプレート（例えば、96ウェル又は384ウェルプレート））、使用者向けマニュアル又は指示書等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0056】

したがって、本発明の関連態様は、認知症関連疾患（例えば、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及びレビー小体型認知症）の動物モデルとしての、BMI1欠損を有する非ヒト動物の使用に関する。このような動物は既に存在する可能性があるが、これら動物は決してそのような目的のために使用されていない。

【0057】

本使用によると、上記動物は、BMI1欠損を有するか、又はヒトアルツハイマー病に相当する認知症関連疾患を有する可能性がある、あらゆる非ヒト動物であり得る。例えば、上記動物は、軸索膨張、軸索セグメントの切断、 α -アミロイド蓄積、C99断片蓄積、p-Tau蓄積、シナプス萎縮、神経細胞アポトーシスファロイジン染色を用いたF-アクチン束形成、及びこれらの組合せを含むがこれらに限定されないアルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴を示し得る。

【0058】

複数の実施形態において、上記非ヒト動物は、BMI1についてヘミ接合である非ヒト哺乳類（好ましくは非ヒト霊長類）である。複数の実施形態において、上記動物は、げっ歯類、例えばBMI1についてヘミ接合であるBMI1欠損マウス（van der Lugt et al. 1994, Chattoo et al. 2009）である。

【0059】

本発明に係るアルツハイマー病の非ヒト動物モデルは、様々なレベルで有用であり得る。例えば、この非ヒト動物モデルは、アルツハイマー病の研究に、及び/又は有望な抗アルツハイマー化合物の特定、検査、スクリーニング及び/又は設計（例えば、論理的薬品設計の実施）に有用であり得る。

【0060】

したがって、本発明に係る細胞、細胞モデル、キット及び非ヒト動物は、例えば下記のような様々な有用な用途に適用可能である：（1）アルツハイマー病（より具体的にはsAD）を含む認知症関連神経性疾患に対する新規薬品を特定するための小スループット、中スループット及び/又は高スループットの薬品スクリーニング法；（2）アルツハイマー病（より具体的にはsAD）を含む認知症関連神経性疾患に対する候補薬品の有効性又は無効性を確認するための小スループット、中スループット及び/又は高スループットの薬品スクリーニング法；（3）ゲノム技法、エピゲノム技法及び/又はプロテオーム技法の使用による、BMI1が制御する経路及び/又はBMI1欠損の誘導後に脱制御される経路の分子解剖を介したアルツハイマー病（より具体的にはsAD）を含む認知症関連神経性疾患に対する論理的薬品設計；（4）正常ヒト皮質ニューロン及びBMI1欠損性ヒト皮質ニューロンに対する、アルツハイマー病（より具体的にはsAD）を含む認知症関連神経性疾患に対する候補薬品の毒性アッセイ及び薬物動態アッセイ；（5）アルツハイマー病（より具体的にはsAD）を含む認知症関連神経性疾患に対する遺伝子療法系（例えば、BMI1又は他の候補遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、MAPT、APP、p53、又はGSK3bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド）、マイクロRNA等）を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）を検査するための細胞性プラットフォーム。

【0061】

10

20

30

40

50

したがって、本発明の追加態様は、アルツハイマー病（より具体的には s A D）を含む認知症関連神経性疾患に対して使用される薬品を設計するための方法に関する。1つの特定の態様によれば、本発明は、抗アルツハイマー薬を設計するための方法であって、下記の工程を含む：

(a) 本明細書において規定される B M I 1 欠損性霊長類皮質神経細胞を、被験抗アルツハイマー化合物に曝露する工程；

(b) アルツハイマー病の1つ以上のフェノタイプ特徴について、上記細胞を評価する工程；

(c) アルツハイマー病の上記1つの、又は1つ以上のフェノタイプ特徴を抑制する及び/又は減少させることが可能な被験化合物を選択する工程；

(d) 工程(c)の被験化合物の化学構造を改変して、抗アルツハイマー活性が改善した（例えば、生物活性、安定性、吸収、血液脳関門移行等のうちの1つ以上が改善された）改変化合物を得る工程。

【0062】

一実施形態では、上記方法は、工程(d)の改変化合物を用いて、工程(a)～(c)を再度繰り返すこと、及び所望により工程(d)も再度繰り返すこと、をさらに含む。したがって、好ましい実施形態では、上記方法を繰り返すたびに上記化合物が改善され、所望の抗アルツハイマー活性を有する化合物が得られるまで工程(a)～(c)（及び所望により工程(d)）が繰り返される。

【0063】

さらに、本発明の追加態様は、アルツハイマー病（より具体的には s A D）を含む認知症関連神経性疾患に対して使用される薬品の生物学的標的候補を特定するための方法に関する。1つの特定の態様によれば、本発明は、抗アルツハイマー薬の生物学的標的候補を特定するための方法であって、

(a) 本明細書において規定される B M I 1 欠損性霊長類の皮質神経細胞を、野生型皮質ニューロンと、定量的プロテオーム比較解析又はゲノムワイド発現比較解析する工程；

(b) 発現又は翻訳後修飾が異なる遺伝子又はタンパク質を（すなわち、B M I 1 欠損性霊長類の皮質神経細胞と野生型皮質ニューロンとの間で）特定する工程；

を含み、

工程(b)において特定された遺伝子又はタンパク質は、抗アルツハイマー薬の生物学的標的候補である、上記方法に関する。

【0064】

上記方法は、追加工程、例えば：

(c) B M I 1 欠損性霊長類の皮質神経細胞及び/又は野生型皮質ニューロンを抗アルツハイマー薬に曝露する工程；

(d) 工程(a)の定量的プロテオーム解析との、曝露細胞及び/又は曝露皮質ニューロンの比較定量的プロテオーム解析又は比較遺伝子発現解析を実施する工程

をさらに含んでよい。

【0065】

(診断応用)

ヒトにおける認知症（例えば、アルツハイマー病、前頭側頭型認知症、及びレビー小体型認知症）の遺伝的病因、より具体的にはアルツハイマー病及び s A D の遺伝的病因の特定によって、これら疾患の診断に新しい道が開かれる。

【0066】

したがって、本発明の別の態様は、対象におけるアルツハイマー病（より具体的には s A D）を含む認知症関連神経性疾患の診断方法に関する。

【0067】

本明細書において使用される場合、「対象」という用語には、アルツハイマー病が発症し得る生物が含まれる。「対象」という用語には、動物（例えば、哺乳類（例えば、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類（例えば、マウス又はラット）、ウ

10

20

30

40

50

サギ、リス、クマ、霊長類（例えば、チンパンジー、サル、ゴリラ及びヒト）、及び鳥類（例えば、ニワトリ、カモ、アヒル、ガチョウ）、並びにこれらの遺伝子導入種が含まれる。対象は、ヒト又は非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー、サル、マカク、ゴリラ）であることが好ましい。対象はヒトであることがより好ましい。

【0068】

1つの特定の態様によれば、本発明は、対象におけるアルツハイマー病を診断するための方法に関する。一実施形態では、この方法は、対象の脳細胞におけるBMI1活性を評価することを含み、ここで、BMI1活性の低下又は不在がアルツハイマー病の徴候である。複数の実施形態において、脳細胞は、海馬由来の細胞、前頭皮質由来の細胞、嗅内皮質由来の細胞及び/又はこれらの混合物である。

10

【0069】

本発明の追加関連態様は、ヒト対象における孤発性アルツハイマー病を診断する方法に関する。一実施形態では、この方法は、対象の海馬、前頭皮質及び/若しくは嗅内皮質において、並びに/又はこれらから単離された細胞におけるBMI1のエピジェネティックサイレンシングを検出することを含む。

【0070】

任意の適切な方法又は技術が、対象の脳及び/又は単離脳細胞におけるBMI1活性の評価及び/又はBMI1のサイレンシングに使用可能である。例えば、上記評価は、BMI1に対する親和性を有する放射性及び/又は蛍光性血液脳関門透過性分子を、対象に投与することを含み得る。BMI1に対する親和性を有する分子の例としては、PTC Therapeutics社のBMI1阻害剤であるPTC-596及びPTC-209（上記参照）が挙げられる。脳細胞におけるBMI1活性及び/又はBMI1サイレンシングの評価は、例えばBMI1に対する親和性を有する放射性及び/又は蛍光性血液脳関門透過性分子を検出するための、陽電子放射断層撮影（PET）脳走査の使用を含み得る。

20

【0071】

代替法として、脳細胞におけるBMI1活性及び/又はBMI1サイレンシングの評価は、生きている対象からの組織生検の取得を含んでもよいし、又は死後に実施されてもよい。

【0072】

また、脳細胞におけるBMI1活性及び/又はBMI1サイレンシングの評価は、BMI1の発現レベルの検出及び/又はBMI1生物活性の検出を含んでもよい。例えば、BMI1の発現レベルの検出、BMI1生物活性の検出、及び/又はBMI1サイレンシングの検出は、qPCR、DNAマイクロアレイ、RNA-シーケンシング、ELISA、免疫組織化学、ウエスタンブロッティング及び/又はこれらの組合せなどの方法及び技術を伴い得る。

30

【実施例】

【0073】

（実施例1：ヒト胚性幹細胞の皮質ニューロンへの分化）

ヒト胚性幹細胞を皮質ニューロンに分化させた。その分化プロトコルは、以前の研究（Espuny-Camacho, I., et al., *Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo*. *Neuron* 77, 440-456, (2013)）に基づくものであった。しかし、組換え体ノギンの濃度を低下させるために、ノギンアゴニストLDN193189を使用した。Accutase（商標）（Innovative Cell Technology社番号AT-104）を使用して、H9細胞株（WiCell（商標））及びHUES9細胞株（Harvard Stem Cell Institute）を解離し、ROCK（商標）阻害剤（Y-27632；10µM、Cayman Chemical社番号10005583）を添加したPeprGrow（商標）hES細胞培地（PeprTech社番号BM-h

40

50

ESC)中の増殖因子低減マトリゲル(商標)(Corning社番号356231)にこれら細胞株を播種した。70%の集密度になったところで、培地を、B27(最終1x)、ノギン(10ng/ml、Peprotech社番号120-10C)及びLDN193189(0.5μM、Sigma社番号SML0559)を添加したDDMに変更した。培地は毎日交換した。16日間の分化の後に、培地をDDM/B27に交換し、毎日補充した。24日の時点で、神経前駆細胞を手作業でプレートから解離し、レンチウイルス上清と37で30分間にわたって混合した。その後、感染済み神経前駆細胞を、ROCK(商標)阻害剤(Y-27632、10μM)添加したDDM/B27の中に混合し、そして増殖因子低減マトリゲル(商標)被覆プレート又はチャンバースライド(LabTek(商標)社番号154534)上に播種した。解離/感染から5日後に、培地の半分を、B27(最終1x)を添加したNeurobasal(商標)A培地に交換し、3日毎に培地を交換した。3D培養物のために、24日目の神経前駆細胞を氷冷増殖因子低減マトリゲル(商標)(1:20希釈)と混合し、そして8ウェルチャンバースライドに播種した。37で30分間培養した後、新しいNeurobasal(商標)A/B27を添加した。

10

【0074】

BMI1のORF(受託番号BC011652)を標的とするように設計された配列特異的オリゴヌクレオチド伸長物shRNAを合成した。Oligo#1(ヌクレオチド番号1061~1081)5'-CCTAATACTTTCAGATTGAT-3'(配列番号3)及びoligoScramble(ヌクレオチド番号573~591)5'-GGTACTTCAATTGATGCCAC-3'(配列番号4)を本試験に使用した。これらの配列にはループ配列(TTCAAGAGA)(配列番号5)が続き、最終的に標的配列の逆相補鎖が続く。AgeI、SmaI、及びXbaIクロニング部位を使用して、H1P-UbqC-HygroEGFPプラスミドのH1Pプロモーターの下流に二重鎖shRNA配列をクロニングした。製造業者の指示に従ってLipofectamin(商標)(Invitrogen)を使用して、これらshRNA発現レンチウイルスプラスミドをpCMVdR8.9プラスミド及びpHCMV-Gプラスミドと共に293FTパッケージング細胞に形質移入した。ウイルス含有培地を収集し、濾過し、そして超遠心分離により濃縮した。293T細胞に対してウイルスタイターを段階希釈とそれに続く48時間後の顕微鏡観察分析により測定した。ウイルス形質導入のために、播種する前に解離細胞にレンチウイルスベクターを添加した。ハイグロマイシン選択(150μg/ml)を48時間後に加えた。

20

30

【0075】

皮質ニューロンを作製するためにヒト人工多能性幹(iPS)細胞を使用する場合にも、同様の結果を得ることが可能である。また、BMI1ノックダウンのためにヒトBMI1cDNAに対して異なるshRNA配列を使用する場合でも、同様の結果を得ることが可能である。

【0076】

(実施例2: BMI1についてヘミ接合であるマウスが老化と共にADの病態を発症する)

40

15~24か月齢のBmi1^{+/-}マウスのAD様脳(皮質)病態を、WTの同腹兄弟に対して比較した。図1は、Bmi1^{+/-}マウスにおけるp-Tau、C99断片及びアミロイドプラークの蓄積、神経細胞の欠損、並びにシナプス萎縮を示している。これらは認識されているADの特徴である。

【0077】

(実施例3: ヒトニューロンにおけるBMI1の不活化がADに関連する遺伝子発現シグネチャを誘導する)

ヒトニューロンにおけるBMI1欠損により、類似の神経病態が生じるかどうかを試験するため、本発明者らは、ヒト胚性幹(hES)細胞の分化から作製された皮質ニューロン{Espuny-Camacho, 2013}においてBMI1活性を阻害した。2

50

4日間の神経誘導の後に、前駆細胞を解離し、有糸分裂後のニューロンに分化させる前に、スクランブル配列を含む短ヘアピンRNA (shRNA) を発現するレンチウイルス (shCTL+Hygro-/GFP) か、又はBMI1指向性shRNAを発現するレンチウイルス (shBMI1+Hygro/GFP) に感染させた (図2A~図2C) {Abdough, 2009}。14日後に、前方神経/皮質マーカーであるFOXG1、総合神経マーカーであるb-III-チューブリン、MAP2及びNeuN、並びにグルタミン酸作動性及びGABA作動性神経マーカーであるvGLUT1及びGABAのそれぞれについて、大多数の細胞が陽性であった (図2D~図2G)。PMIインデックスを使用する形態計測分析により、bIII-チューブリンニューロンの約60%が皮質錐体ニューロンであることが明らかになった (図2H) {Espuny-Camacho, 2013; Hand, 2005}。vGLUT1陽性及びGABA陽性のニューロンの割合は、精製済み神経細胞培養物について報告された割合 {Israel, 2012} と同等であった (図2G) {deSilva, 2003}。ADの最も初期の段階に軸索膨張部が存在する {Stokin, 2005}。特筆すべきことに、BMI1ノックダウンから7~15日後にジストロフィー性神経突起及び軸索膨張を容易に観察することができた (図2D)。また、本発明者らは、ジストロフィー性神経突起と軸索膨張部を有するGABA陽性ニューロン、及び軸索セグメントに沿った分断されているvGLUT1又はbIII-チューブリンの標識も観察した (図2E~図2F)。比較遺伝子発現プロファイル分析により、これらの培養物の効率的な神経細胞分化が確認された (図2I)。BMI1は転写抑制因子として作用するので、shBMI1ニューロンにおいて対照と比較して上方制御されている遺伝子の大半を抽出した。バイアス無し遺伝子オントロジー分析により、これらの遺伝子は主にAD関連シグナル伝達経路、すなわちカドヘリン、WNT及びADプレセニリン {Jackson, 2002; Ando, 2011; Fraser, 2001}、並びにハンチントン病及びニコチン性アセチルコリン受容体経路と関連付けられることが明らかになった (図2J)。本発明者らは、上位14の最も有意な上方制御遺伝子にアノテーションを付けた。トランスサイレチン (TTR) はAb42凝集を阻害し、神経細胞ストレス応答タンパク質として挙動する {Wang, 2014}。DNAJA4 (HSP40としても知られる) は、タンパク質ミスフォールディング及びアミロイド凝集を防止する分子シャペロンである {Torrente, 2013}。UBR1は、ポリユビキチン化及びプロテアソーム分解のための正常タンパク質とミスフォールドタンパク質の認識とターゲティングに關与するユビキチンリガーゼである {Kim, 2014}。これらの結果より、BMI1の不活化によって、ADに關連度が高い遺伝子発現シグネチャが生じ、この遺伝子発現シグネチャにはタンパク質ミスフォールディングに対する細胞応答の早期活性化も含まれることが明らかになった。

【0078】

まとめると、BMI1が欠損すると、ヒト皮質ニューロンが、軸索膨張、軸索セグメントの切断、並びにカドヘリン/Wnt及びアルツハイマー病/プレセニリンシグナリングに關連度が高い遺伝子発現シグネチャなどの幾つかの異常を示すことがこれらの結果から示される。

【0079】

(実施例4: ヒト皮質ニューロンにおけるBMI1欠損によってADの病理学的特徴、すなわちp-Tau及びアミロイドの蓄積が再現される)

AD関連のp-Tauは正常型Tauを捕捉し、且つ、濃縮体形成及び微小管分解を引き起こすことができる {Alonso, 1996}。本発明者らは、PHF1とS422を使用して、shBMI1ニューロンにおけるp-Tau免疫反応性を観察し (図3A~図3C)、軸索セグメント及び細胞体部分の両方にこれを認めた (データを示さず)。これと一致するように、vGLUT1又はbIII-チューブリンの分布が乱れている軸索セグメントにもp-Tau輝点の蓄積が提示された (図3B)。広がったPHF1免疫反応物も軸索膨張部内に認められた (図3B差込図)。対照的に、幾つかの対照ニューロンの軸索はPHF1によって弱く色づけられた (図3A~図3C)。アポトーシス核の頻

10

20

30

40

50

度もshBMI1ニューロンにおいて有意に高かった(図3D~図3E)。Ab42に対する抗体を使用して、shBMI1ニューロンの細胞体及び神経突起において対照と比較して堅固な免疫反応性が観察され(図3F)、BACE阻害剤(BSI)に曝露するとアミロイド免疫反応体が著しく減少した(図3G)。アミロイドオリゴマーを認識するNU1を使用して同様の観察を行った(図3G){Lambert, 2007; Kondou, 2013}。ELISAを用いて、Ab42を対照ニューロン抽出物及び培地の中に検出したが、対応するBMI1ノックダウン試料において相対的アミロイド濃度が7日目と14日目に上昇し、BSI処理されるとアミロイド濃度が正常化した(図3H)。BMI1がノックダウンされた非神経細胞ではアミロイド免疫反応物が観察されなかった(データを示さず)。別の抗BMI1n性shRNA配列を使用したとき(データを示さず)、又はKi67陰性、Nestin陰性及びPCNA陰性の有糸分裂後のニューロンにshBMI1 DNAコンストラクトを導入したとき(データを示さず)にも神経病態が観察された。

10

【0080】

(実施例5:ヒト皮質ニューロンにおけるBMI1欠損によってADの病理学的特徴、すなわちp-Tau濃縮体の形成及びアミロイドプラーク形成が再現される)

3次元で培養されたFAD遺伝子発現性神経細胞培養物は、アミロイドプラーク及びTau濃縮物を生成し得ることが示された{Choi, 2014}。この方法(図4A)を適用することにより、シナプス前成熟(シナプトフィジン)とシナプス後成熟(PSD-95)を経た対照培養物と対照的に、BMI1欠損神経細胞培養物では顕著な量のシナプトフィジン及びPSD-95が発現しなかったことを発見した(図4B)。アミロイド線維及びアミロイドプラークに結合する特異的抗体又は自家蛍光性化合物K114を使用して明らかにされるように、BMI1ノックダウンによって細胞外アミロイドプラークも形成された(図4C)。これらの条件によって、広がった細胞外p-TAU沈積物及びニューロンの細胞体中に局在する大きなp-Tau濃縮体も形成された(図4D~図4E)。ADにおいて影響を受ける神経細胞種であるChAT陽性コリン作動性ニューロンの変性しているものに、p-Tau凝集体の存在が認められた(図4D){Baskin, 1999}。細胞抽出物を使用するイムノプロット、又は細胞培養上清を使用するELISAによって明らかにされるように、BMI1欠損培養物は約30kDa、約14kDa、及び約4kDaのアミロイド種の蓄積も特徴とした(図4F~図4G)。このことから、ヒトニューロンにおけるBMI1の不活化がADの病理学的特徴を再現することが明らかになった。

20

30

【0081】

(実施例6: BMI1欠損によりMAPT、GSK3b及びp53の病態関連活性化が生じる)

疾患機序を洞察するために、神経細胞培養物におけるAD関連遺伝子の発現を分析した。BMI1が欠損すると上方制御される対照遺伝子として、CDKN2A(p16)及びCDKN1A(p21)を使用した{Abdouh, 2009; Chatoor, 2009}。BMI1が欠損すると、MAPT(Tauをコードする)及びLRP2だけが増加した一方、APPの発現が低下した(データを示さず)。MAPTの二倍化は病原性である{Rovelet-Lecrux, 2010}ので、BMI1によるMAPTの制御が可能か調査した。それによると、未処理の(naive)ニューロンにおいてBMI1が過剰発現すると、MAPT発現が低下し(データを示さず)、特異的BMI1抗体を使用するクロマチン免疫沈殿(ChIP)によって測定したところ、対照ニューロンのプロモーター領域を含むMAPT座位の幾つかの部分にBMI1が濃縮され(データを示さず)、このことから直接的な転写抑制が示唆された。BMI1はDNA損傷応答(DDR)を調節することが可能である{Facchino, 2010; Ismail, 2010}。BMI1/RING1a/bはp14^{ARF}(CDKN2Aにコードされる第2の転写物)の転写抑制を介してMDM2ユビキチンリガーゼの活性の抑制を解除し、p53の分解を促進し{Sherr, 2001}、且つ、p53との相互作用を介して

40

50

p 5 3 のモノユビキチン化を引き起こすことも可能である { C a l a o , 2 0 1 3 } 。このことを考慮して、本発明者らは、観察された病態の幾つかは転写非依存性機構によって説明可能であると推測した。同様に、G S K 3 b は (P H F 1 で検出されるように) S e r 3 9 6 / 4 0 4 において T a u をリン酸化することができ、G S K 3 b の発現と活性は転写機構及び翻訳後機構によって制御される { M e d i n a , 2 0 1 4 } 。

【 0 0 8 2 】

本発明者らは、イムノプロットによって、B M I 1 欠損性ニューロンにおいて T a u レベル、p - T a u レベル、G S K 3 b レベル、p - G S K 3 b (S e r 9) レベル、及び p - p 5 3 (S e r 1 5) レベルの劇的な上昇を検出した (図 5 A) 。逆に、未処理ニューロンにおける B M I 1 過剰発現によって、T a u 、 p - T a u 、 G S K 3 b 、 p - G S K 3 b 、及び p - p 5 3 の基線レベルを低下させることができた (図 5 A) 。また、B M I 1 ノックダウンによって、A P P 、 B A C E 1 、及び β - アクチンの発現も対照と比較して上昇した一方、B M I 1 過剰発現では反対の傾向が生じた (図 5 A) 。このように、B M I 1 ノックダウンニューロンにおいて、C 9 9 の蓄積及び 2 種類の大型アミロイド関連断片の蓄積が観察された (図 5 A) 。特筆すべきことに、ファロイジンを使用する I F によって可視化されるように、 β - アクチン単量体レベルの上昇は B M I 1 ノックダウンニューロンにおける F - アクチン束形成と関連した (図 5 B) 。F - アクチン束の形成は A D 及びタウオパチーにおいて存在し、且つ、T a u が持つ F - アクチン及びチューブリン二量体との架橋活性に大いに依存する { E l i e , 2 0 1 5 } 。本発明者らは次に、B S I 、 β - セクレターゼ阻害剤 (G S I) 、及び β - セクレターゼモジュレーター (G S M) の B M I 1 欠損性ニューロンに対する影響を分析した { C h o i , 2 0 1 4 } 。B S I によってアポトーシス及びアミロイド免疫反応体が減少したが、p - T a u 及び F - アクチンの免疫反応体は部分的にしか減少しなかった (図 5 B) 。このことから、C 9 9 の生産及び毒性を、p - T a u の蓄積から部分的に切り離すことが可能であることが示唆された。他方、大半の病態パラメーターは G S I と G S M によって改善されなかった (図 5 B) 。G S I は p - T a u の強度を低下させたが、ニューロンの細胞体への p - T a u の再局在からは濃縮体形成が示唆された (図 5 B) 。さらに、G S I で処理されると、おそらく C 9 9 の蓄積に起因して、アミロイド免疫反応性が飽和レベルに達した (図 5 B) { M o o r e , 2 0 1 5 } 。

【 0 0 8 3 】

(実施例 7 : B M I 1 は A D 脳においてサイレンシングを受け、正常な脳では M A P T 座位に濃縮される)

本発明者らは、ヒトの脳における B M I 1 発現を調査するために、A D 試料及び対照試料の海馬を比較するとき使用される最適な正規化遺伝子を確定した。本発明者らは、同量の総 R N A について、全ての試料の間で C t 値の最も強い変動を示す A S C L 1 、 N E U R O D 1 、 A C T B 、 N G N 2 、 N e u N 、及び R P L 1 3 (データを示さず) と比較すると、G A P D H と F O X G 1 は変動を示さないことを発見した。G A P D H 、 F O X G 1 、 A S C L 1 、又は N E U R O D 1 に対して正規化されると、B M I 1 の発現は A D 試料において著しく低下し、B M I 1 c D N A を範囲とする別々のプライマーペアを使用したときに同等の結果が得られた (図 6 A ~ 図 6 C) 。対照的に、別の P o l y c o m b グループ遺伝子である E Z H 2 の発現は、A D 試料で変化しなかった (図 6 D) 。B M I 1 の発現は A D 試料の前頭皮質でも低下したが、F A D 試料の前頭皮質では低下しなかった (データを示さず) 。前頭皮質切片については、B M I 1 発現が対照試料の N e u N 陽性錐体ニューロンにおいて認められ、A D 試料では低下した (図 6 E) 。遺伝子発現の結果と一致して、B M I 1 タンパク質の発現 (F 6 抗体を使用した) は対照 (n = 3 、 5 9 歳の年齢中央値) と比較すると F A D 患者 (n = 4 、 6 1 歳の年齢中央値) の海馬において影響を受けなかった (図 6 F 及び図 6 K) 。対照的に、B M I 1 は対照 (n = 3 、 8 7 歳の年齢中央値) と比較すると A D 患者 (n = 5 、 8 2 歳の年齢中央値) の海馬において著しく減少した (図 6 F 及び図 6 J ~ 図 6 K) 。対照試料 (n = 6 、 8 7 歳の年齢中央値) において異なるリン酸化型の B M I 1 である B M I 1 トリプレットの存在が前頭皮質

で観察された(図6G) { Voncken, 1999 }。対照的に、BMI1発現はAD試料(n=6、87歳の年齢中央値)では存在しないに近かった(図6G及び図6K)。ヒストンH2AはBMI1/RING1a/b活性の主要な標的である { Buchwald, 2006; Li, 2006 }。H2A^{ub}レベルはAD脳では著しく低下したが、FAD脳では低下しなかった(図6F~図6G及び図6K)。第2の特異的BMI1抗体(D42B3)を使用すると同等の結果が得られた(図7A~図7B)。BMI1レベルは、他の認知症を有する患者に由来する前頭皮質試料では少数の例外を除いてあまり低下しなかった(図6H及び図7A~図7B)。本発明者らは、第3のBMI1抗体(1.T.21)を使用して、BMI1及びH2A^{ub}が認知症ではないヒトの皮質のMAPT座位及びINK4A座位に濃縮され、AD皮質では激減する(図6I)ことを確認することができた。

【0084】

(実施例8: BMI1サイレンシングによって神経変性の特徴であるヘテロクロマチン異常が引き起こされる)

BMI1の欠損が、神経変性障害に見られるようなヘテロクロマチン異常を引き起こし得るか判定するために、本発明者らは老齢(24か月齢)のBmi1^{+/-}マウスとBMI1がノックダウンされたhES細胞由来皮質ニューロン(shBMI1)を分析した。ヒストンH3のリシン9のトリメチル化(H3K9me3)は、ヘテロクロマチンのマーカーである。WTの同腹兄弟と比較して、Bmi1^{+/-}マウスの皮質ではH3K9me3レベルが低下した(図8A)。特筆すべきことに、凝縮したクロマチンからH3K9me3輝点が解離した(図8B)。shCTLニューロンと比較すると、shBMI1ヒト皮質ニューロンにおいて同様の結果が得られた(図8C)。同様にsADヒト皮質試料も低下したH3K9me3レベルを有する(図8D~図8G)。

【0085】

(実施例9: CRISPR/Cas9を使用する皮質ニューロンにおけるBMI1の不活化)

本発明者らは、本発明者らの発見をさらに検証するために、クラスター化規則的間隔配置短鎖回文性反復配列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR)/CRISPR関連(Cas)システム(CRISPR/Cas)という遺伝的アプローチを使用して、BMI1座位の両アレルにヌル欠失を導入した(Mali et al., 2013)。製造業者の指示に従ってMirus TransIT-X2(商標)(カタログ番号MIR6003)を使用したCas9発現プラスミド(Dharmacon社番号CAS10140)、合成ガイドRNA(sgRNA)スクランブル(Dharmacon社番号U-007501)又はBMI1に相補的な合成ガイドRNA(標的: AACGTGTAATTGTTTCGTTACC; 配列番号6)、及び合成トランス活性化crRNA(Dharmacon社番号U-002005)の多重送達によってCRISPR/Cas9を使用するBMI1の不活化を実施した。

【0086】

簡単に説明すると、多重送達薬剤を使用して、対照ガイドRNA(sgRNA-Ctrl)又はBMI1エクソン1を標的とするガイドRNA(sgRNA-BMI1)と共にCas9ヌクレアーゼをコードするプラスミドを30日齢の未処理ヒト有糸分裂後ニューロンに形質移入した(図9A)。10日後に、ゲノムPCRによってニューロンを分析した。これにより、sgRNA-BMI1に曝露されたニューロンだけにBMI1のエクソン1内の約400bpの欠失(BMI1^{KO})の存在が示された(図9B)。特筆すべきことに、BMI1及びH2A^{ub}に対する抗体を使用して明らかにされるように、BMI1活性の欠損がBMI1^{KO}培養物の細胞の90%超において認められた(図9C~図9D)。他の方法と対照的に、このアプローチはウイルス感染、薬剤選択及び/又は細胞選別を必要としなかった(Rubio et al., 2016)。特筆すべきことに、BMI1^{KO}神経細胞培養物は濃縮核の存在とp-Tau及び -アミロイドの蓄積を特

10

20

30

40

50

徴とした(図9E~図9F)。p-Tau免疫反応性が低H2A^{ub}(BMI1^{KO})ニューロンにおいて単一細胞レベルでさらに可視化されたが、高H2A^{ub}(野生型)ニューロンでは可視化されなかった。このことから、細胞自律的効果が示唆された(図9E)。シナプス維持におけるBMI1の役割を試験するために、BMI1ノックアウトを60日齢のニューロンに導入し、7日後にそれらのニューロンを分析した。PSD-95及びシナプトフィジンに対する免疫反応性が対照ニューロンで認められたが、BMI1^{KO}ニューロンでは大きく減少した(図9G~図9H)。このことから、BMI1はシナプスの完全性に必要であることが明らかになった。

【0087】

(結論)

本データは、BMI1遺伝子の機能欠損によって、老齢のマウス及びヒトの皮質ニューロンにおけるアルツハイマー病の全ての神経病理学的特徴を再現することができたことを証明している。ヒトニューロンにおけるBMI1の障害には、軸索セグメントに沿ったp-Tauの蓄積、細胞外アミロイドプラーク及び神経細胞内p-Tau濃縮体の形成、シナプス変性、並びに神経細胞死が付随した。非常に類似した神経病態が老齢のBmi1^{+/-}マウスに見られた。本分子分析により、BMI1はMAPTを抑制し得ることも明らかになり、BMI1欠損によって、APP/アミロイド経路と無関係にタウオパチーを引き起こし得ることが示唆された。したがって、BSIによって、BMI1欠損性ニューロンにおけるアポトーシス及びC99/アミロイド蓄積が防止されたが、p-Tauレベル及びF-アクチンレベルについては部分的にしかレスキューされなかった。このことから、2つの並行疾患媒介経路が存在することが示唆された。しかし、C99蓄積を生じる-セクレターゼ活性の障害によって、未だ不明な機序によるTau蓄積を促進することができるので、特定の状況ではこれらの経路は相互に関連し得る{Moore, 2015}。

【0088】

sADに対する薬品候補の効果確認のために本発明を使用する原理の証拠として、本発明者らはすでに試験されたものの、sAD患者における高い神経毒性のために2014年に放棄された-セクレターゼ阻害剤(GSI)を試験している{De Strooper, 2014}。このGSIは、APPのC99断片の蓄積の誘導を介してBMI1ノックダウンヒト皮質ニューロンにも有毒であることが本研究の結果から示されている(図5B)。

【0089】

本発明者らは、BMI1(PCGF4とも呼ばれる)がsAD脳において優先的にサイレンシングを受けること、及びマウスと培養ヒト皮質ニューロンにおいてBMI1欠損によってADが生じることも発見した。このことは、エピジェネティックBMI1サイレンシングが可能性の高いsADの原因であることを示している。得られた結果により、BMI1がシナプスの完全性の維持に必要であることがさらに確認された。したがって、本発明は、sADの有効な実験モデルが存在しないことに関連したsADの広大な知識ギャップと治療についての空白部分を埋めるのに役立ち得る。

【0090】

(参照文献)

Abdoh, M., Facchino, S., Chatoo, W., Balasingam, V., Ferreira, J., and Bernier, G. (2009). BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J. Neurosci.* 29, 8884-8896.

Abdoh, M., et al. (2012). Bmi1 is down-regulated in the aging brain and displays antioxidant and protective activities in neurons. *PLoS One* 7(2): e31870.

Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2, 783-787.

Ando, K., Uemura, K., Kuzuya, A., Maesako, M., Asada-Utsugi, M., Kubota, M., Aoy

10

20

30

40

50

- agi, N., Yoshioka, K., Okawa, K., Inoue, H., et al. (2011). N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286, 7619-7628.
- Baskin, D.S., Browning, J.L., Pirozzolo, F.J., Korporaal, S., Baskin, J.A., and Appel, S.H. (1999). Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 56, 1121-1123.
- Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.
- Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M., and Sixma, T.K. (2006). Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J.* 25, 2465-2474.
- Calao, M., Sekyere, E.O., Cui, H.J., Cheung, B.B., Thomas, W.D., Keating, J., Chen, J.B., Raif, A., Jankowski, K., Davies, N.P., et al. (2013). Direct effects of Bmi1 on p53 protein stability inactivates oncoprotein stress responses in embryonal cancer precursor cells at tumor initiation. *Oncogene* 32, 3616-3626.
- Chatoo, W., Abdouh, M., David, J., Champagne, M.P., Ferreira, J., Rodier, F., and Bernier, G. (2009). The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J. Neurosci.* 29, 529-542.
- Choi, S.H., Kim, Y.H., Hebisch, M., Sliwinski, C., Lee, S., D'Avanzo, C., Chen, H., Hooli, B., Asselin, C., Muffat, J., et al. (2014). A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* 515, 274-278.
- De Silva, R., Lashley, T., Gibb, G., Hanger, D., Hope, A., Reid, A., Bandopadhyay, R., Utton, M., Strand, C., Jowett, T., et al. (2003). Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29, 288-302.
- De Strooper, B., and Chavez Gutierrez, L. (2014). Learning by Failing: Ideas and Concepts to Tackle gamma-Secretases in Alzheimer's Disease and Beyond. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, 419-437.
- Elie, A., Prezel, E., Guerin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lieuvin, A., Blanchoin, L., and Arnal, I. (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci Rep* 5, 9964.
- Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., et al. (2013). Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* 77, 440-456.
- Facchino, S., Abdouh, M., Chatoo, W., and Bernier, G. (2010). BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J. Neurosci.* 30, 10096-10111.
- Fraser, P.E., Yu, G., Levesque, L., Nishimura, M., Yang, D.S., Mount, H.T., Westaway, D., and St George-Hyslop, P.H. (2001). Presenilin function: connections to Alzheimer's disease and signal transduction. *Biochem. Soc. Symp.*, 89-100.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., et al. (2005). Phosphorylation of neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45-62.
- Hebert, L.E., Weuve, J., Scherr, P.A., and Evans, D.A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778-1783.

- Ismail, I.H., Andrin, C., McDonald, D., and Hendzel, M.J. (2010). BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J. Cell Biol.* 191, 45-60.
- Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., et al. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482, 216-220.
- Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., and Geschwind, D.H. (2002). Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34, 509-519. 10
- Kim, H.K., Kim, R.R., Oh, J.H., Cho, H., Varshavsky, A., and Hwang, C.S. (2014). The N-terminal methionine of cellular proteins as a degradation signal. *Cell* 156, 158-169.
- Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., et al. (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12, 487-496.
- Lambert, M.P., Velasco, P.T., Chang, L., Viola, K.L., Fernandez, S., Lacor, P.N., Khuon, D., Gong, Y., Bigio, E.H., Shaw, P., et al. (2007). Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J. Neurochem.* 100, 23-35. 20
- Li, Z., Cao, R., Wang, M., Myers, M.P., Zhang, Y., and Xu, R.M. (2006). Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 281, 20643-20649.
- Mali, P., Esvelt, K.M., and Church, G.M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10, 957-963.
- Medina, M., and Avila, J. (2014). New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* 18, 69-77.
- Moore, S., Evans, L.D., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T.B., Saurat, N., McGlade, A., Kirwan, P., Blennow, K., et al. (2015). APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons. *Cell Rep* 11, 689-696. 30
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Guillain, O., Legallic, S., Jurici, S., Wallon, D., Frebourg, T., and Campion, D. (2010). Frontotemporal dementia phenotype associated with MAPT gene duplication. *J Alzheimers Dis* 21, 897-902.
- Rubio, A., Luoni, M., Giannelli, S.G., Radice, I., Iannielli, A., Cancellieri, C., Di Bernardino, C., Regalia, G., Lazzari, G., Menegon, A., Taverna, S., and Broccoli, V. (2016). Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene inactivation in human neurons during human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Sci Rep* 6, 37540.
- Savva, G.M., Wharton, S.B., Ince, P.G., Forster, G., Matthews, F.E., and Brayne, C. (2009). Age, neuropathology, and dementia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2302-2309. 40
- Sherr, C.J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 731-737.
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307, 1282-1288.
- Torrente, M.P., and Shorter, J. (2013). The metazoan protein disaggregase and amyloid depolymerase system: Hsp110, Hsp70, Hsp40, and small heat shock proteins. *Prion* 7, 457-463. 50

van der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., van Lohuizen, M., et al. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev.* 8, 757-769.

Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoeke, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., et al. (2013). Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357-367.

Voncken, J.W., Schweizer, D., Aagaard, L., Sattler, L., Jantsch, M.F., and van Lohuizen, M. (1999). Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 24), 4627-4639.

Wang, X., Cattaneo, F., Ryno, L., Hulleman, J., Reixach, N., and Buxbaum, J.N. (2014). The systemic amyloid precursor transthyretin (TTR) behaves as a neuronal stress protein regulated by HSF1 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and APP23 Alzheimer's disease model mice. *J. Neurosci.* 34, 7253-7265.

【 0 0 9 1 】

見出しは参照のため、及びある特定の節の場所の提示に役立たせるために本明細書に含まれている。これらの見出しは、それらの節の中で説明される考えの範囲を限定する意図を持っておらず、これらの考えは本明細書全体の中の他の節でも適用可能性を有する可能性がある。したがって、本発明は、本明細書において示された実施形態に限定されるように意図されておらず、本明細書において開示された原理と新規特徴と一致する最も広い範囲と一致するものとする。

【 0 0 9 2 】

単数形の「 a 」、 「 an 」、 及び 「 the 」 は文脈から別段の指示が無い限り対応する複数の指示物を含む。したがって、例えば「 (単数の) 化合物 」 の参照はそのような化合物のうちの一つ以上を含み、「 上記方法 」 の参照は本明細書に記載される方法に対して改変可能又は置換可能である当業者に知られている同等の工程及び方法への参照を含む。

【 0 0 9 3 】

特段の指示が無い限り、本明細書及び特許請求の範囲において使用される成分、反応条件、濃度、特性等の量を表す全ての数は全ての例で「 約 」 という用語によって修飾されているものと理解されたい。少なくとも各数値パラメータは少なくとも報告されている有効桁数を考慮し、且つ、通常の上切り法を適用して解釈されるべきである。したがって、反対のことを指示されない限り本明細書及び添付されている特許請求の範囲において示されている数値パラメータは獲得することが求められている特性に応じて変化し得る近似値である。本実施形態の広い範囲を表している数値範囲及び数値パラメータは近似値であるのだが、特定の例において示されている数値は可能な限り正確に報告されている。しかしながらどの数値も実験、検査測定値、統計分析等の変動から生じるある特定の誤差を本質的に含む。

【 0 0 9 4 】

本明細書に記載される実施例及び実施形態は例示だけを目的としており、当業者はそれらの実施例及び実施形態を考慮した様々な改変又は変更を思いつき、それらの様々な改変又は変更が本発明及び添付されている特許請求の範囲内に含まれることが理解される。

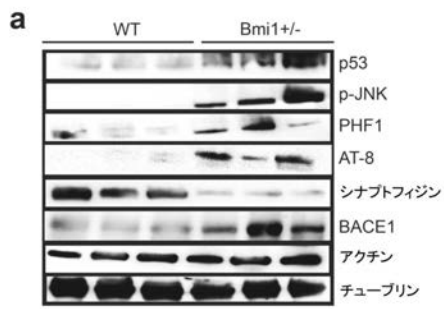
10

20

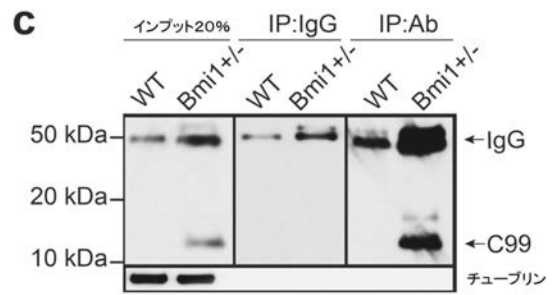
30

40

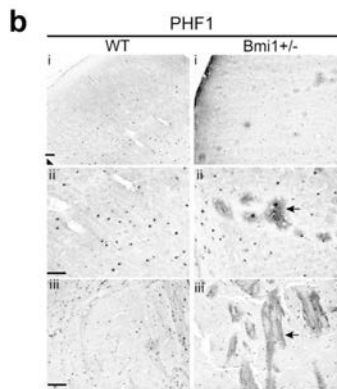
【 図 1 A 】



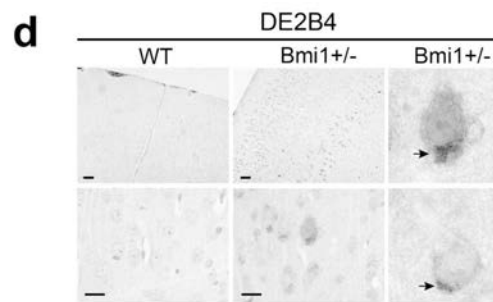
【 図 1 C 】



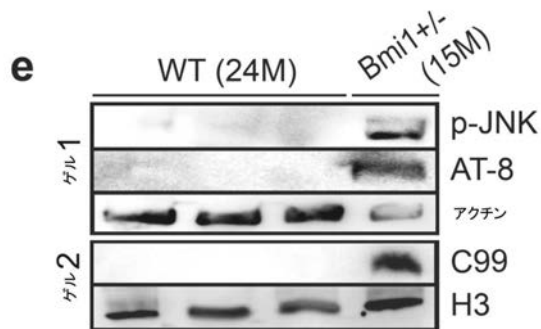
【 図 1 B 】



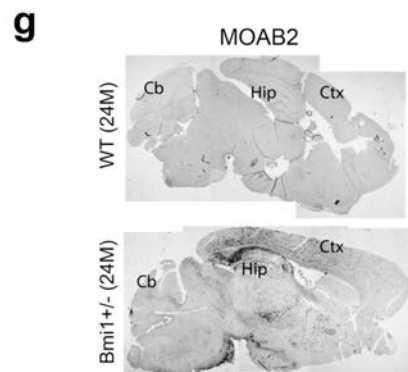
【 図 1 D 】



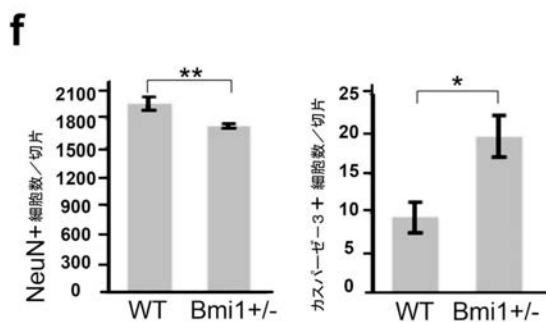
【 図 1 E 】



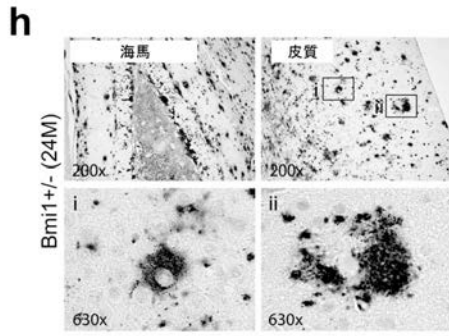
【 図 1 G 】



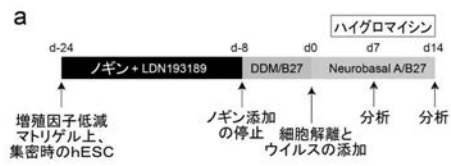
【 図 1 F 】



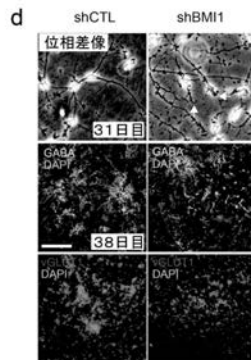
【 図 1 H 】



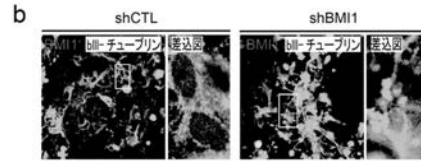
【 図 2 A 】



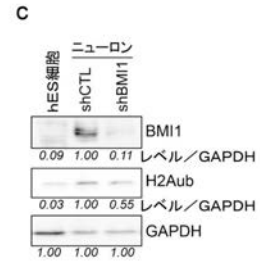
【 図 2 D 】



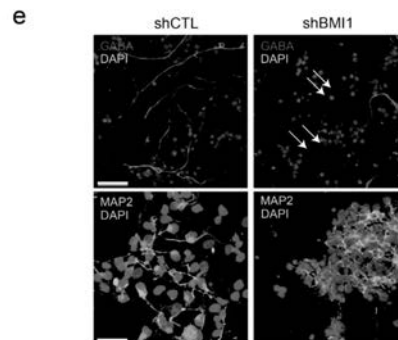
【 図 2 B 】



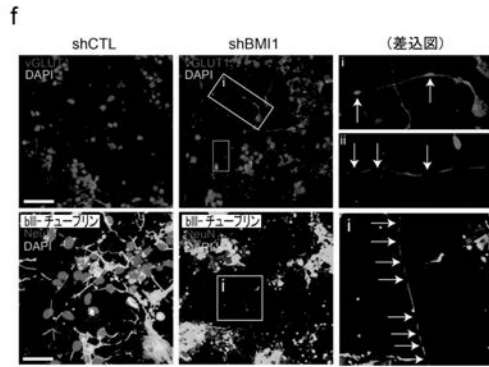
【 図 2 C 】



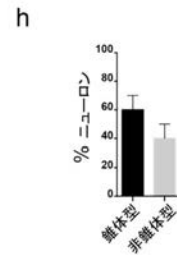
【 図 2 E 】



【 図 2 F 】

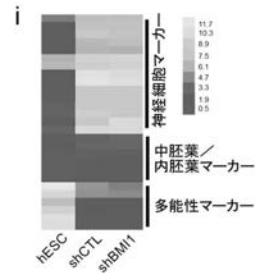
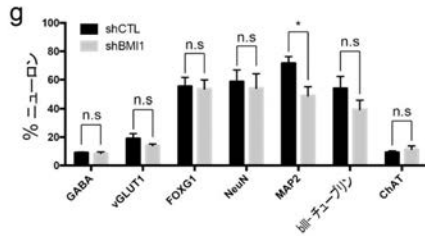


【 図 2 H 】

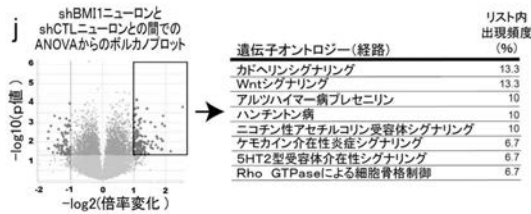


【 図 2 I 】

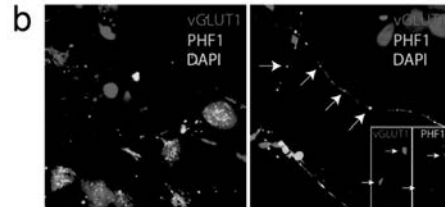
【 図 2 G 】



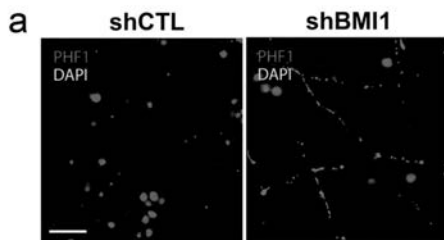
【 図 2 J 】



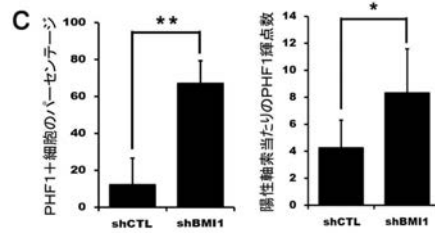
【 図 3 B 】



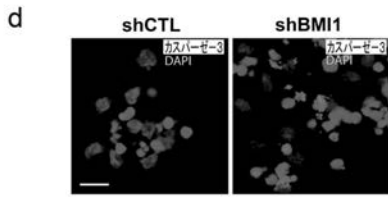
【 図 3 A 】



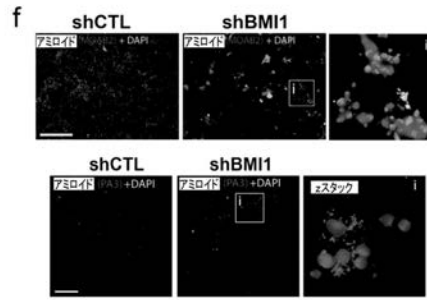
【 図 3 C 】



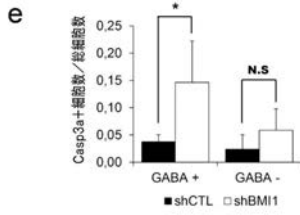
【 図 3 D 】



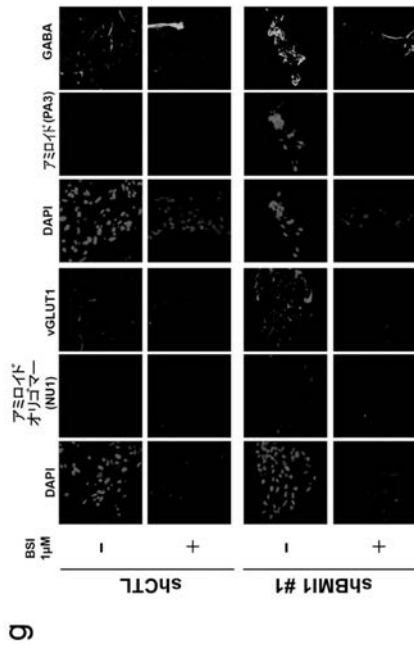
【 図 3 F 】



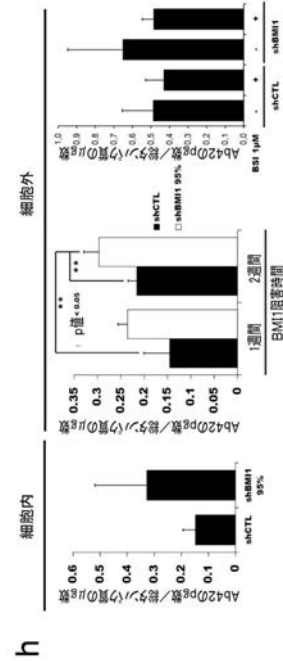
【 図 3 E 】



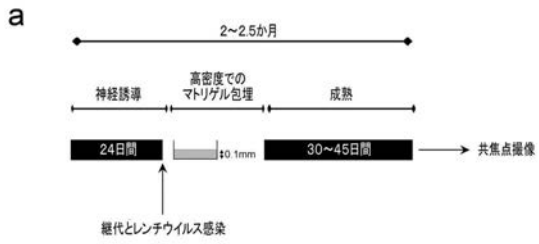
【 図 3 G 】



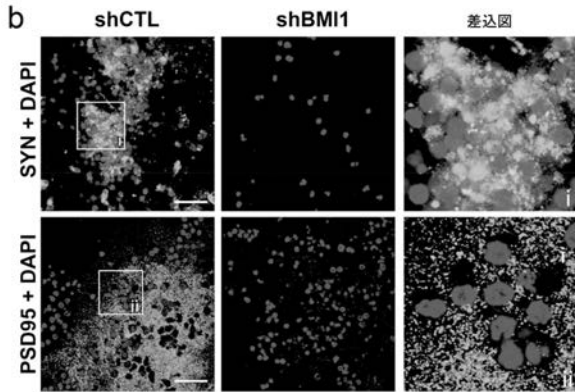
【 図 3 H 】



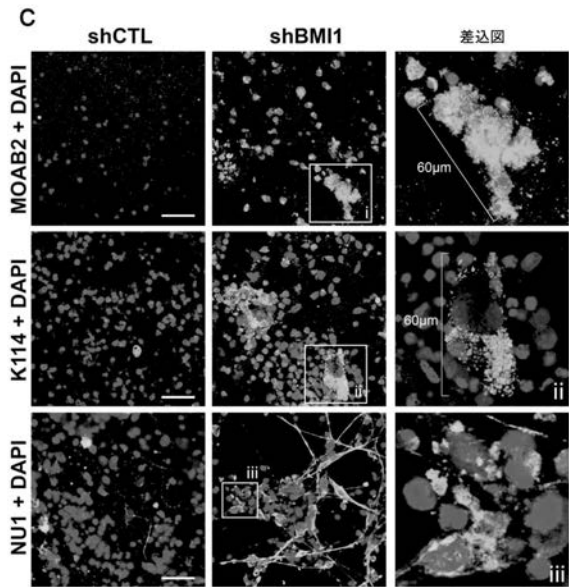
【 図 4 A 】



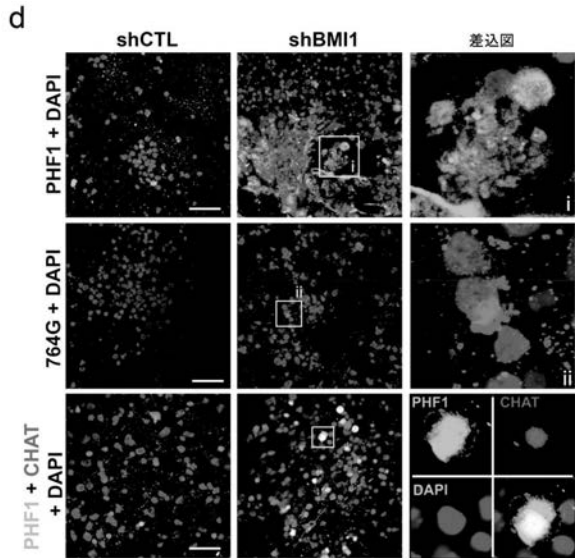
【 図 4 B 】



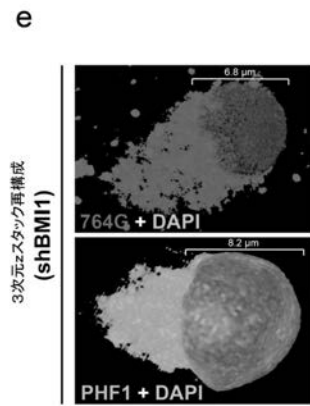
【 図 4 C 】



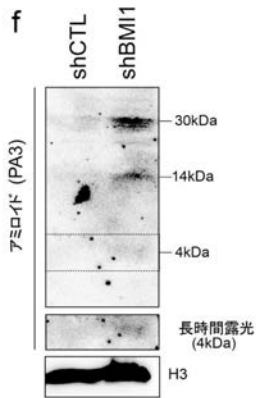
【 図 4 D 】



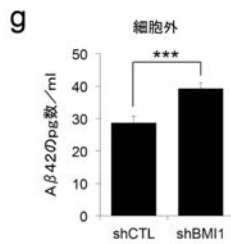
【 図 4 E 】



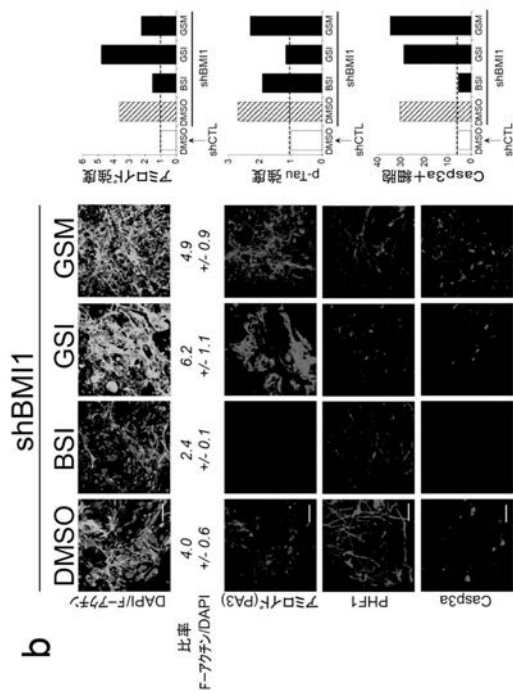
【 図 4 F 】



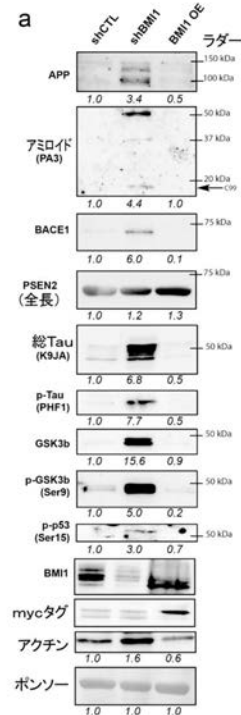
【 図 4 G 】



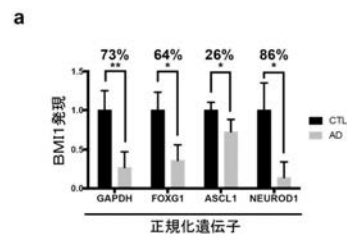
【 図 5 B 】



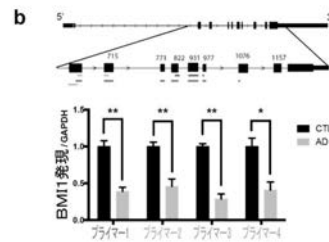
【 図 5 A 】



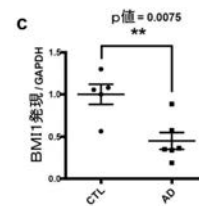
【 図 6 A 】



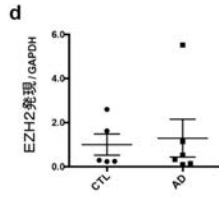
【 図 6 B 】



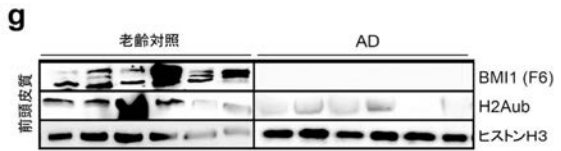
【 図 6 C 】



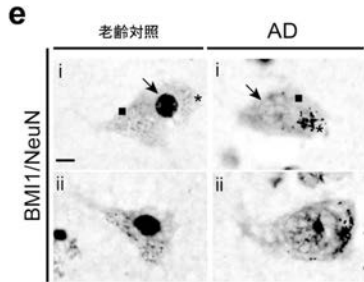
【 図 6 D 】



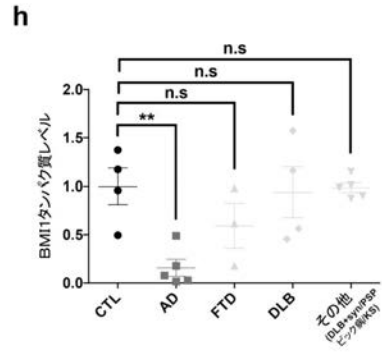
【 図 6 G 】



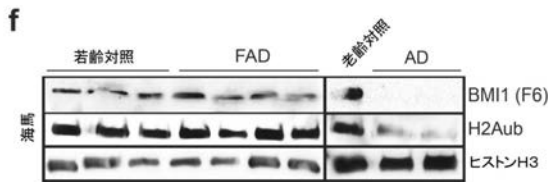
【 図 6 E 】



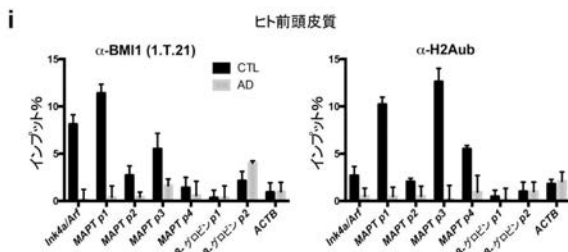
【 図 6 H 】



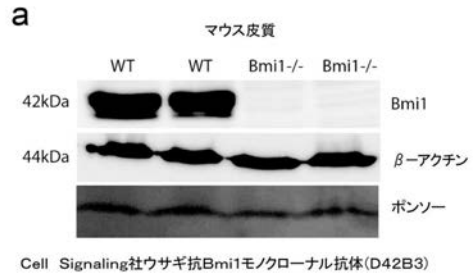
【 図 6 F 】



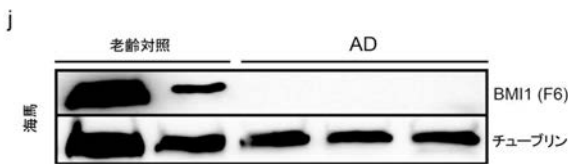
【 図 6 I 】



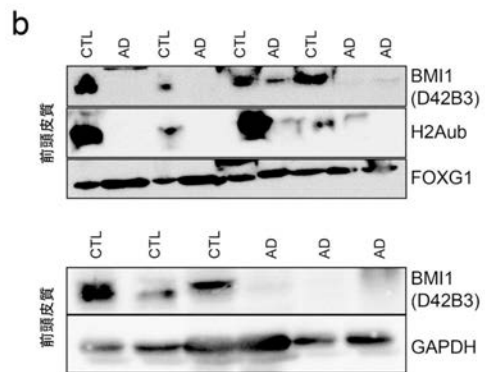
【 図 7 A 】



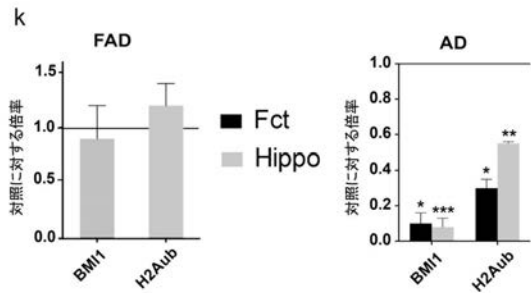
【 図 6 J 】



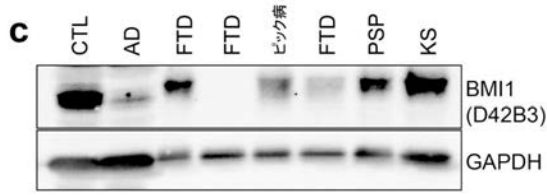
【 図 7 B 】



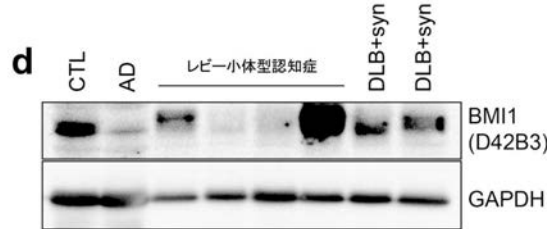
【 図 6 K 】



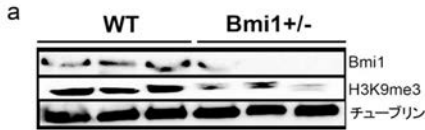
【 図 7 C 】



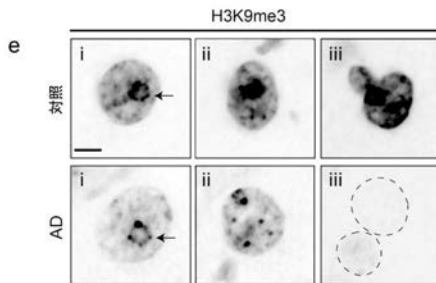
【 図 7 D 】



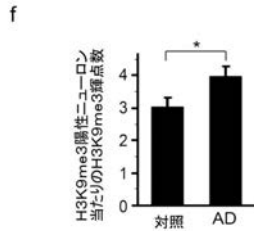
【 図 8 A 】



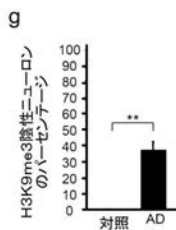
【 図 8 E 】



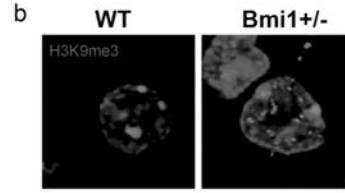
【 図 8 F 】



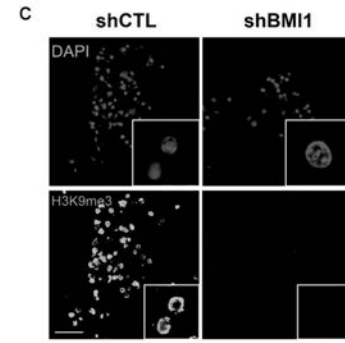
【 図 8 G 】



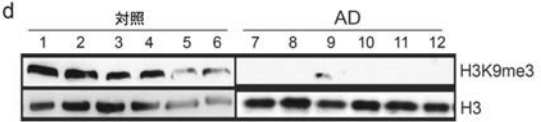
【 図 8 B 】



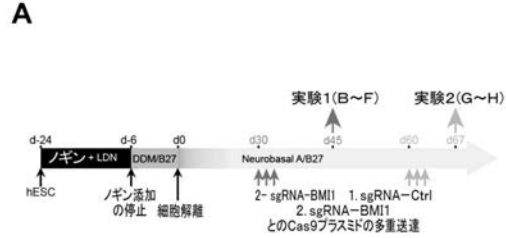
【 図 8 C 】



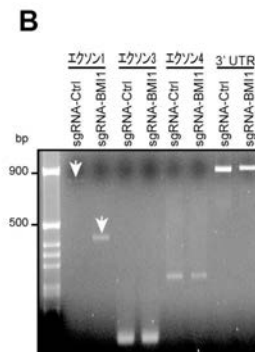
【 図 8 D 】



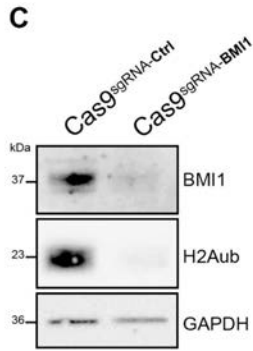
【 図 9 A 】



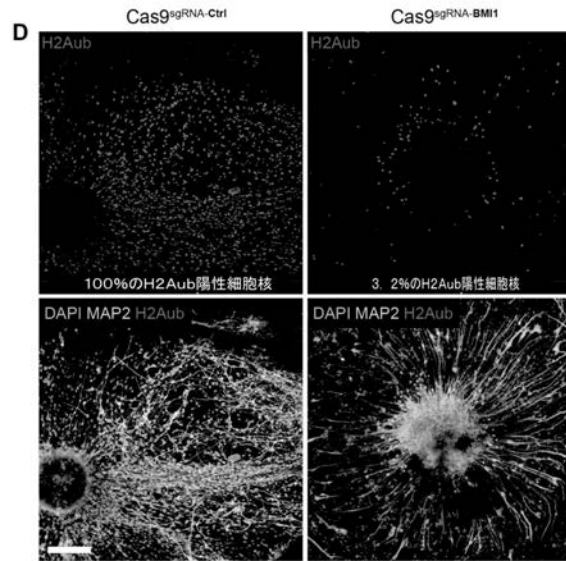
【 図 9 B 】



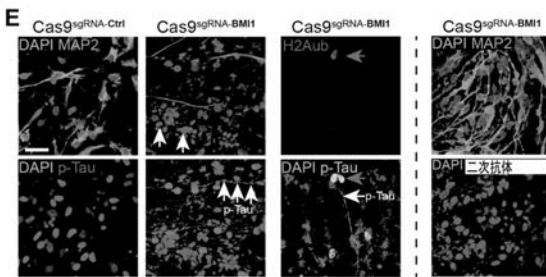
【 図 9 C 】



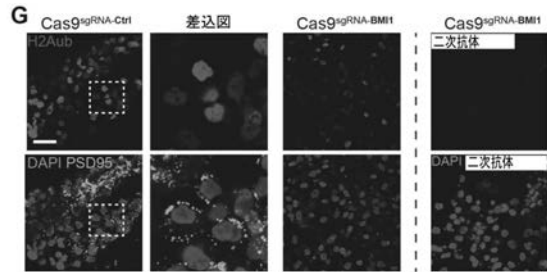
【 図 9 D 】



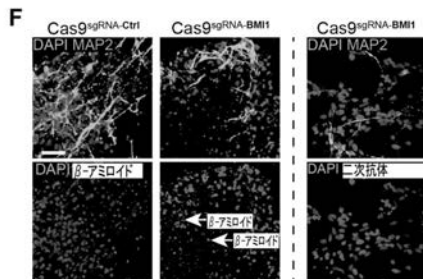
【 図 9 E 】



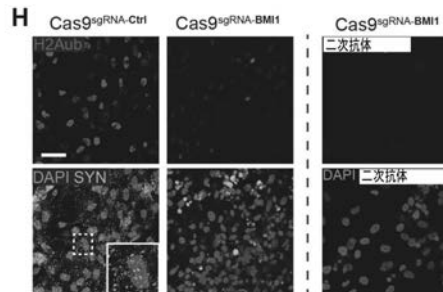
【 図 9 G 】



【 図 9 F 】



【 図 9 H 】



【 10 】

```

1 acagcaacta tgaataatc gtagtatgag aggcagagat cggggcgaga caatggggat
61 tggggcgagg gagccocggt cccggttagc agcaactccc agcccccag aataaaaacc
121 atcgcgccc ctccgpggc gccctccccc gactgcgag cgggagagg cggcgcgcc
181 cgaggaggag gaagagagg ccccggagga ggaagcgttg gaggctcagc cggagcgcca
241 ggaggaggag gccgagpgcc cggagagagc cgaagcggcc gagcaggaag agcccgccgc
301 gagcggccat gagcagagcc tggcggccgc ggctcctcgg gcccgcgctg gttgccatt
361 gacagagggc tctcagagtc gctccaagat ggccgcttgg ctgcattca tttctgtgt
421 aacgactttt aactttcaat gtctttccc cccgcttoga tgcctcgcg cccgctgtgc
481 tttccgggat tttttatcaa gcagaaatgc atcgaacaac gagaatcaag atcaactgagc
541 taaatcccca cctgatgtgt gtgctttgtg gaggttaact cattgatgcc acaaccataa
601 tagaatgtct acattctctc tctcaaacgt gtattgttcg ttaactggag accgccaagt
661 attgtcctat ttgtgatgtc caagttcaca agaccagacc actactgaat ataagtcag
721 ataaactctt ccaagatatt gtatacaaat tagttccagg gcttttcaaa aatgaaatga
781 agagaagaag ggatttttat gcagctcctc ctctcgtcga tgcctcaaat ggctcaatg
841 aagatagagg agaggttgca gatgaagata agagaattat aactgatga gagataataa
901 gcttatccat tgaattcttt gaccagaaca gattggatcg gaaagtaaac aaagacaaa
961 agaaatctaa ggaggaggtg aatgataaaa gatacttacg atgccagca gcaatgactg
1021 tgatgcactt aagaaagttt ctcaagaagta aaatggacat acctaatact ttccagattg
1081 atgctatgta tgaagagaa cctttaaag atattatata actaatggat attgcctaca
1141 tttatacctg gagaaggaat ggtccaactc cattgaaata cagagtgcga cctactgta
1201 aaagaatgaa gatcagtcac cagagagatg gactgacaaa tgcctgagaa ctggaaagt
1261 actctggagg tgacaagccc aacagcccag caggaggtat tccctcaacc tctcttgtt
1321 tgcctagccc cagtactcca gtgcagttct ctcatccaca gtttctcaac atttccagta
1381 ctatgaatgg aaccgcaaac agccccagcg gtaaccacca atctctcttt gccaatagac
1441 ctgaaaaatc atcagtaaat gggctcatcg caactctctc tggttgatac ctgagactgt
1501 taaggaaaaa aattttaaac cccctgatta tatagatata ttcattgcat tacagcttcc
1561 tagatgctaa tacatgtgac tatgcctcaa ttgcttctt ttgtatgga catlaaattt
1621 ggctataaaa gatggactac atgtgatact cctatggacg ttaattgaaa agaaagattg
1681 ttgtataaaa gaattgtttt cttgaaagcc agccaagact tttctctgtt gttaggaaa
1741 atgggaaatg gtttctgtaa ccattgtttg gatitggaag tactctgcaq tggacataag
1801 cattggccca tagtttgtta atctcaacta acgctcaat tacattctcc ttgatgcttc
1861 ttgtattac gctgtttgtt gaacctgtag aaaaacaagt ctttttatct tgaattcaa
1921 ccaacggaaa gaatatgcat agaataatgc attctatgta gccatgcaac tgtgaaatac
1981 gattctctgc atattagccc attttgattc ctgtttgatt tataactctc tgttgctaac
2041 caaaaacpat caaagaaaag tgaactcag ttttacaatc tgtatgcta aaagcgggta
2101 ctacocgtta tttactgac ttgtttaat gatctgcttt tgaagaactc agatggcaat
2161 atgctgtttg tacaatgcca tattgtata tgacataaca ggaacagta ttgtatgata
2221 tattataaaa tgcataaag aatatgtgtt ttcatgcat tcagaaatga ttgttaaat
2281 tctcccaact ggttcagact ttgcagatac ccaataacta tgttgagcct tgcataccag
2341 caaagaatat ttttaatgtg gatataatct tcaaaagctc gttccattag aagcaattgg
2401 cacatcttcc tatactttat atacttttct ccaagtaaac atgtttactt taagattgt
2461 tgcagtagag aaaaaccttt aactgagaaa tatggaacc gctctaattt tccattggct
2521 atgatggaat taatattgta ttttaaaat gcatattgat cactataatt ctaaaaaat
2581 ttttaataa aaccagaggg ttgtcaaaag aaggaatttt atctaaagt attttatag
2641 gtgtatagc agtaatttta aatttaagag ttgctttac agttaacaat ggaatatgcc
2701 tctctgcta tgtctgaaaa tagaagctat ttattatgag ctctacag tatttttaa
2761 tagagaagc atgtgaatt taaaatgata ataaccacc ccaacaattt tcaatttat
2821 tttgtgttg gtcgaacttg gtgtgtgttc atcaaccatc agttattgt gagggtgtt
2881 attctatag aatattgttt catgtttgta tgggaaaatt gtatgtaaac atttcaattg
2941 cccagctcg caaaagaagc acaattctat tgcctgtctc tgcctatagt cattaatca
3001 ttaactttac atatatctct attactctc ctctctttaa aaatataata aagatgttt
3061 tatgaagca caagatacat atattttat ttgactcaa attttgacg tccattgta
3121 agtgtgttt cttaattatg atgaaatg aaattctatt tgaattgga aaaaatccaa
3181 taaaaggat attcatttag aaaaatgcta agactttaa taaaatttg atatgaaaag
3241 cacaatgagc agaattatg gaaaacctat agaggattac aacaggtaaa cgttaagag
3301 aatacattgc tgaactatag tgatgtgctc aagaagtaca tgcctgttg taaaattgtc
3361 tgaagccca ttgaaagatg tatctgttta tttacagctc ttgaaatgaa agttaccaat
3421 gtttccaat aaaaa

```

【 11 】

```

MHRTRIKITELNPHLMCVLGGYFIDATTIIECLHSFKTCIVRYLETSKYCPICDVVHKRPLLNIR
SDKTLQDIVYKLVPLFKMKRRDFAAHPSADANSGNEDEGEVADEKRIITDEIISLSIEFFDQ
NRLDRKVNKDEKSEEVNKRRLRCPAAMVHLRFLRSKMDIPNTFQIDWYEEELPKDYITLMDIA
YIYTWRRNGPLPKYRVRFPTCKRMKISHORDGLTNAGELESDDSGDKANSFAGGIPSTSSCLPSPSTFVQ
SPHPQFPHISSTMNGTNSPFGNSQSSFANRRKRSVNGSSATSSG

```

【 配列表 】

201952415800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2017/053544
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>CI2N 5/079</i> (2010.01), <i>CI2N 15/00</i> (2006.01), <i>CI2N 15/113</i> (2010.01), <i>CI2N 15/12</i> (2006.01), <i>CI2N 5/10</i> (2006.01), <i>CI2Q 1/02</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Keywords searched across whole IPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Questel Orbit (FAMPAT), SCOPUS, PubMed (Medline), GenomeQuest (SEQ ID NOs: 1 and 2) Keywords: BMI1, neuron, dementia, Alzheimer's		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GU et al. "Heterozygous knockout of the Bmi-1 gene causes an early onset of phenotypes associated with brain aging". AGE. February 2014 (02-2014), vol. 36, no. 1, pages 129-139, ISSN: ISSN:0161-9152	19 to 29
Y	CAO et al. "Bmi-1 Absence Causes Premature Brain Degeneration". PLOS ONE. February 2012 (02-2012), vol. 7, no. 2, page e32015, ISSN: 1932-6203 (Electronic)	19 to 29
A	ABDOUH et al. "Bmi1 Is Down-Regulated in the Aging Brain and Displays Antioxidant and Protective Activities in Neurons". PLOS ONE. February 2012 (02-2012), vol. 7, no. 2, page e31870, ISSN: 1932-6203 (Electronic)	1 to 42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 3 October 2017 (03-10-2017)		Date of mailing of the international search report 19 October 2017 (19-10-2017)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Cynthia Bruce-Payne (819) 639-7765

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2017/053544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHATOO et al. "The Polycomb Group Gene Bmi1 Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing p53 Pro-Oxidant Activity". THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE. 14 January 2009 (14-01-2009), vol. 29, no. 2, pages 529-542, ISSN:0270-6474	1 to 42
A	CHOI et al. "A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease". NATURE. 13 November 2014 (13-11-2013), vol. 515, no. 7526, pages 274-278, ISSN:0028-0836	1 to 42
A	ISRAEL et al. "Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells" NATURE. 25 January 2012 (25-01-2012), vol. 482, no. 7384, pages 216-220, ISSN:0028-0836	1 to 42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2017/053544**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2017/053544

Continuation of Box No. III:

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1 to 18 and 30 to 33 are directed to an isolated BMI1-deficient primate cortical neural cell, an in vitro culture of said cell, a method of preparing said cell, a method and kit for screening anti-Alzheimer drugs using said cell;

Group B - Claims 19 to 29 are directed to a screening method for identifying a potential anti-Alzheimer drug comprising contacting a cell or animal having BMI1-deficiency with a compound to be tested and the use of a non-human animal having a BMI1-deficiency as an animal model of Alzheimer's disease; and

Group C - Claims 34 to 42 are directed to methods for diagnosing Alzheimer's disease.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13. Presently, group B claims encompass the BMI1 homozygous (-/-) and heterozygous (+/-) animal models disclosed in Gu et al. and Cao et al. Notably, axonal swelling, axonal segment breaks, synaptic atrophy and neuronal apoptosis have been demonstrated in the brains of these animals. Notably, these features fall within the scope of the "*phenotypic hallmark of Alzheimer's disease*" set forth in the claims. Consequently, a single general inventive concept over the prior art, linking the above group of claims, is absent.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2017/053544

C12Q 1/68 (2006.01), *G01N 33/48* (2006.01), *G01N 33/53* (2006.01), *G01N 33/543* (2006.01),
C07K 14/82 (2006.01), *C40B 30/06* (2006.01)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	G 0 1 N 33/50	P
	C 1 2 N 15/09	Z
	C 1 2 N 15/09	1 1 0
	C 1 2 N 15/113	Z

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

(72)発明者 フラミエ、 アンソニー

カナダ国 H 1 T 4 B 6 ケベック モントリオール アパルトメント ビー 1 1 0 1 リュ
 シェルブルーク エスト 5 3 3 3

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B063 QA07 QA18 QA19 QQ91 QR77 QS40

4B065 AA90X AB01 BA01 CA44 CA46

专利名称(译)	基于BMI1缺陷的阿尔茨海默病皮层神经元模型及其应用		
公开(公告)号	JP2019524158A	公开(公告)日	2019-09-05
申请号	JP2019528175	申请日	2017-06-14
发明人	ヘルニエ、ギルバート フラミエ、アンソニー		
IPC分类号	C12N5/10 C12N5/0793 C12N5/074 C12N5/0735 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09 C12N15/113		
CPC分类号	C12N5/0619 C12N15/113 C12N2310/14 C12N2310/20 C12N2310/531 C12N2501/65 C12N2501/727 C12N2501/998 C12N2501/999 C12N2503/02 C12N2506/02 C12N2510/00 C12N2513/00 C12N2533 /90 G01N33/5058 G01N33/5088 G01N33/6896 C12N5/0062 C12N5/0606 C12N5/0696 C12Q1/025 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N5/10.ZNA C12N5/0793 C12N5/074 C12N5/0735 C12Q1/02 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33 /53.D G01N33/53.Y G01N37/00.102 G01N33/50.P C12N15/09.Z C12N15/09.110 C12N15/113.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ91 4B063/QR77 4B063/QS40 4B065 /AA90X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	62/369814 2016-08-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及痴呆症相关的神经系统疾病，更具体地涉及阿尔茨海默氏病。本申请描述了BMI1缺陷的灵长类动物皮质神经元，并表现出一种或多种阿尔茨海默氏病的表型特征。还包括含有此类细胞的细胞模型，使用此类细胞筛选抗阿尔茨海默氏病药物的方法，设计抗阿尔茨海默氏病药物的方法和/或鉴定抗阿尔茨海默氏病药物的生物学靶标的方法。解释一下还描述了一种诊断阿尔茨海默氏病的方法，其包括评估BMI1活性和/或检测BMI1的表观遗传沉默。[选择图]图2A

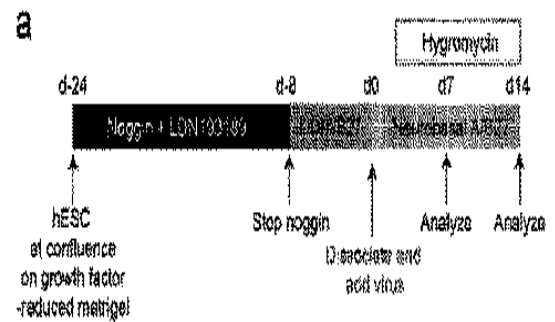


Figure 2