

## 注意

これは機械による自動翻訳です。従って翻訳文の明確性、正確性、完全性、信頼性、または特定目的への適合性は保証しかねます。事業に関連したものや金融に関する判断などの重要な判断は、機械翻訳の結果に基づいて行わないようにしてください。日本語に関するPatent Translate (パテント・トランスレート) はただいま開発中です。翻訳品質の向上に努力しております。

## 明細書 EP3006040

### 政府関与

---

#### GOVERNMENT INTERESTS

#### [0001]

この作業は、少なくとも部分的には、米国連邦政府の下にある連邦政府からの資金で支援された。5RO1 NS40745。米国政府は、本発明において一定の権利を有する可能性がある。

---

This work was supported at least in part with funds from the federal government under U.S.P.H.S. 5RO1 NS40745. The U.S. Government may have certain rights in the invention.

### 関連出願データ

---

#### RELATED APPLICATION DATA

#### [0002]

この出願は、35 U.S.C. 2004年6月4日に出願された米国仮出願第60 / 577,233号及び2005年1月4日に出願された米国仮出願第60 / 641,330号に基づく。これらの出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

---

This application claims benefit under 35 U.S.C. § 119(e) to United States Provisional Application Serial No. 60/577,233, filed June 4, 2004 and United States Provisional Application Serial No. 60/641,330, filed January 4, 2005. These applications are incorporated herein in their entireties

by reference.

## フィールド

---

### FIELD

#### [0003]

【発明の詳細な説明】【技術分野】【0001】本発明は、一般に、ニューロンに関連する疾患および状態、より詳細には、神経変性および神経変性を伴う他の疾患および状態を治療または予防するための方法および組成物に関する。また、神経障害を治療または予防するための薬剤を同定する方法も含まれる。

---

This invention relates generally to diseases and conditions involving neurons and, more particularly, to methods and compositions for treating or preventing neuropathies and other diseases and conditions involving neurodegeneration. Also included are methods of identifying agents for treating or preventing neuropathies.

## バックグラウンド

---

### BACKGROUND

#### [0004]

軸索変性は、パーキンソン病およびアルツハイマー病のような様々な神経変性疾患、ならびにニューロンに対する外傷性、毒性または虚血性損傷に生じる。このような疾患および状態は、軸索機能不全を含む軸索障害に関連する。軸索症の一例は、ワレリア変性である（Waller、Philos Trans R.soc. Lond. 140：423-429,1850）、これは軸索の遠位部分が細胞体から切断されたときに起こる。切断された軸索は急速に退化に陥る。従って、軸索不全症は神経因性疾患および状態の重大な特徴であり、軸索欠損は患者の障害の重要な要素となり得る。

---

Axon degeneration occurs in a variety of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases as well as upon traumatic, toxic or ischemic injury to neurons. Such diseases and conditions are associated with axonopathies including axonal dysfunction. One example of axonopathy is Wallerian degeneration (Waller,Philos Trans R. soc. Lond. 140:423-429, 1850), which occurs when the distal portion of the axon is severed from the cell body. The severed axon rapidly succumbs to degeneration. Axonopathy can, therefore, be a critical feature of neuropathic diseases and conditions and axonal deficits can be an important component of the patient's disability.

## 概要

---

### SUMMARY

#### [0005]

したがって、本発明者らは、疾患および/または傷害ニューロンにおけるNAD活性を増加させることによって、軸索変性が減少または予防され得ることを発見することに成功した。増加したNAD活性は、サーチュイン活性を増加させるように作用して、損傷したニューロン細胞の軸索変性を減少させることができると考えられている。従って、軸索変性を予防するための1つのアプローチは、サーチュイン分子を活性化することによるものであり得る。損傷した哺乳動物の軸索におけるSIRT1。SIRT1の活性化は、SIRT1分子に対する直接的な作用によって、またはSIRT1のヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性の基質として作用するニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の供給を増加させることによって可能である。SIRT1の活性化は、軸索変性の重症度の減少または軸索変性の防止をもたらす。また、NAD活性の上昇がサーチュインを伴わない他の機構を介して作用する可能性があると考えられている。したがって、増加するSIRT1活性を介して、または1つ以上の他の機構またはその両方を介して作用し得るNAD活性の増加は、傷害された哺乳類の軸索における軸索変性を軽減または防止し得る。

---

Accordingly, the present inventors have succeeded in discovering that axonal degeneration can be diminished or prevented by increasing NAD activity in diseased and/or injured neurons. It is believed that the increased NAD activity can act to increase sirtuin activity which then produces a decrease in axonal degeneration of injured neuronal cells. Thus, one approach to preventing axonal degeneration can be by activating sirtuin molecules, i.e. SIRT1 in injured mammalian axons. The activation of SIRT1 can be through direct action on the SIRT1 molecule or by increasing the supply of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) which acts as a substrate for the histone/protein deacetylase activity of SIRT1. The activation of SIRT1 results in a decrease in severity of axonal degeneration or a prevention of axonal degeneration. It is also believed possible that the increase in NAD activity could act through other mechanisms not involving sirtuin. Thus, increasing NAD activity, which may act through increasing SIRT1 activity or through one or more other mechanisms or both can diminish or prevent axonal degeneration in injured mammalian axons.

#### [0006]

したがって、様々な実施形態において、本発明は、哺乳動物、特に、それを必要とするヒトにおける神経障害を治療または予防する方法に関する。該方法は、サーチュイン活性、および特に罹患したニューロンおよび/または傷害ニューロンにおけるSIRT1活性を増加させるように作用する作用物質の有効量を投与することを含むことができる。

---

Thus, in various embodiments, the present invention is directed to a method of treating or preventing a neuropathy in a mammal and, in particular, in a human in need thereof. The method can comprise administering an effective amount of an agent that acts to increase sirtuin activity and, in particular, SIRT1 activity in diseased and/or injured neurons.

[0007]

様々な実施形態において、薬剤は、NAD活性の増加を通じてSIRT1活性を増加させることができる。NADがSIRT1の基質として作用することができるので、NAD活性を増加させるとサーチュイン活性を増加させることができると考えられている。そのような薬剤は、NADの前駆体であるNADまたはNADH、NADサルベージ経路における中間体、またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニレートトランスフェラーゼ (NMNAT) またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼをコードする核酸のようなNADを生成する物質を含み得る。ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼは、NMNAT1タンパク質であり得る。

---

In various embodiments, the agent can increase SIRT1 activity through increasing NAD activity. It is believed that increasing NAD activity can increase sirtuin activity because NAD can act as a substrate of SIRT1. Such agents can include NAD or NADH, a precursor of NAD, an intermediate in the NAD salvage pathway or a substance that generates NAD such as a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) or a nucleic acid encoding a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. The nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase can be an NMNAT1 protein.

[0008]

様々な実施形態において、薬剤はまた、SIRT1活性を直接増加させるように作用することができる。そのため、薬剤は、サーチュインポリペプチド、またはサーチュインポリペプチドをコードする核酸、またはスチルベン、カルコン、フラボン、イソフラボン、フラボンまたはカテキン。そのような化合物は、レスベラトロール、ピセアタンノール、デオキシラポボン、トランス-スチルベンおよびラポンチンからなる群から選択されるスチルベン;プテイン、イソリキリティゲンおよび3,4,2', 4', 6'-ペンタヒドロキシカルコンからなる群から選択されるカルコン;フィセチン、5,7,3', 4', 5'-ペンタヒドロキシフラボン、ルテオリン、3,6,3', 4'-テトラヒドロキシフラボン、ケルセチン、7,3', 4', 5' 4,6'-ジヒドロキシフラボン、7,8,3', 4'-テトラヒドロキシフラボン、3,6,2', 4'-テトラヒドロキシフラボン、4,6'-ジヒドロキシフラボン、4'-ヒドロキシフラボン、5,4'-ジヒドロキシフラボン、5,7-ジヒドロキシフラボン、モリン、フラボンおよび5-ヒドロキシフラボン;ダイゼインおよびゲニステインからなる群から選択されるイソフラボン;ナリングニン、3,5,7,3', 4'-ペンタヒドロキシフラボンおよびフラボンからなる群から選択されるフラボン、または(-)-エピカテキン、(-)-カテキン、(-)-(+)-カテキンおよび(+)-エピカテキンである。

In various embodiments, the agent can also act to directly increase SIRT1 activity and as such, the agent can be a sirtuin polypeptide or a nucleic acid encoding a sirtuin polypeptide or a substance such as a stilbene, a chalcone, a flavone, an isoflavanone, a flavanone or a catechin. Such compounds can include a stilbene selected from the group consisting of resveratrol, piceatannol, deoxyrhapontin, trans-stilbene and rhapontin; a chalcone selected from the group consisting of butein, isoliquiritigen and 3,4,2',4',6'-pentahydroxychalcone; a flavone selected from the group consisting of fisetin, 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone, luteolin, 3,6,3',4'-tetrahydroxyflavone, quercetin, 7,3',4',5'-tetrahydroxyflavone, kaempferol, 6-hydroxyapigenin, apigenin, 3,6,2',4'-tetrahydroxyflavone, 7,4'-dihydroxyflavone, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone, 3,6,2',3'-tetrahydroxyflavone, 4'-hydroxyflavone, 5,4'-dihydroxyflavone, 5,7-dihydroxyflavone, morin, flavone and 5-hydroxyflavone; an isoflavone selected from the group consisting of daidzein and genistein; a flavanone selected from the group consisting of naringenin, 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone, and flavanone or a catechin selected from the group consisting of (-)-epicatechin, (-)-catechin, (-)-gallocatechin, (+)-catechin and (+)-epicatechin.

#### [0009]

種々の実施形態において、本発明は、罹患したニューロンおよび/または傷害されたニューロンにおける核NAD活性を増加させることによって作用する作用物質の有効量を哺乳動物および特にヒトに投与することによってニューロパチーを治療する方法、および/または例えばグリア細胞、筋細胞、線維芽細胞などの細胞を支持する。

---

In various embodiments, the invention can also involve methods of treating a neuropathy by administering to a mammal and, in particular, a human, an effective amount of an agent that acts by increasing nuclear NAD activity in diseased and/or injured neurons and/or supporting cells such as, for example, glia, muscle cells, fibroblasts, etc.

#### [0010]

そのような薬剤は、NADまたはNADH、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドまたはその誘導體;またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼなどのNADを生成する酵素、またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼをコードする核酸などのNADを生成する酵素をコードする核酸、または生成する経路で酵素をコードする核酸の発現を増加させる薬剤NADまたはNADを生成する経路の酵素またはNAD活性を増加させる薬剤の活性および/または安定性を増加させる薬剤を含む。ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼは、NMNAT1タンパク質であり得る。

---

Such agent can be NAD or NADH, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide or nicotinamide riboside or derivatives thereof; or an enzyme that generates NAD such as a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase or a nucleic acid encoding an enzyme that

generates NAD such as a nucleic acid encoding a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase or an agent that increases expression of a nucleic acid encoding an enzyme in a pathway that generates NAD or an agent that increases activity and/or stability of an enzyme in a pathway that generates NAD or an agent that increases NAD activity. The nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase can be an NMNAT1 protein.

#### [0011]

様々な実施形態において、本発明は、それを必要とする哺乳動物において視神経障害を治療または予防する方法をも包含し得る。該方法は、哺乳動物に、罹患したニューロンおよび/または傷害されたニューロンにおけるNAD活性を増加させることによって作用する作用物質の有効量を投与することを含むことができる。哺乳動物への投与は、特に、徐放性送達システムを用いて薬剤を投与することによって、または薬剤を含む持続放出ペレットを眼に投与することによって、眼に投与することを含み得る。

---

In various embodiments, the invention can also involve methods of treating or preventing an optic neuropathy in a mammal in need thereof. The methods can comprise administering to the mammal an effective amount of an agent that acts by increasing NAD activity in diseased and/or injured neurons. Administering to the mammal can comprise administering to the eye, in particular by administering the agent with a sustained release delivery system or by administering a sustain release pellet comprising the agent to the eye.

#### [0012]

薬剤は、NADまたはNADH、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドであり得る;またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼのようなNADを生成する酵素;またはニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼをコードする核酸またはNAD活性を増加させる薬剤のようなNADを生成する酵素をコードする核酸を含む。ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼは、NMNAT1タンパク質またはNMNAT3タンパク質であり得る。

---

The agent can be NAD or NADH, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide or nicotinamide riboside; or an enzyme that generates NAD such as a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase; or a nucleic acid encoding an enzyme that generates NAD such as a nucleic acid encoding a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase or an agent that increases NAD activity. The nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase can be an NMNAT1 protein or an NMNAT3 protein.

#### [0013]

本発明の方法の様々な実施形態において、軸索分解に関連する神経障害は、例えば、遺伝性また

は先天性であるか、またはパーキンソン病、アルツハイマー病、ヘルペス感染症、糖尿病に関連する神経障害のいずれかであり得る筋萎縮性側索硬化症、脱髄疾患、虚血または脳卒中、化学的傷害、熱傷、AIDSなどが挙げられる。加えて、上述の疾患のサブセットと同様に上記で言及されていない神経変性疾患も、本発明の方法で治療することができる。そのような疾患のサブセットは、パーキンソン病または非パーキンソン病、アルツハイマー病または非アルツハイマー病などを含み得る。

---

In various embodiments of the methods of the present invention, the neuropathy associated with axonal degradation can be any of a number of neuropathies such as, for example, those that are hereditary or congenital or associated with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Herpes infection, diabetes, amyotrophic lateral sclerosis, a demyelinating disease, ischemia or stroke, chemical injury, thermal injury, AIDS and the like. In addition, neurodegenerative diseases not mentioned above as well as a subset of the above mentioned diseases can also be treated with the methods of the present invention. Such subsets of diseases can include Parkinson's disease or non-Parkinson's diseases, Alzheimer's disease or non-Alzheimer's diseases and so forth.

#### [0014]

種々の実施形態において、本発明はまた、哺乳動物における神経障害を治療するための薬剤をスクリーニングする方法に関する。この方法は、インビトロでインビボで神経細胞にインビボで候補薬剤を投与し、神経細胞の軸索損傷を生じさせ、損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含むことができる。様々な実施形態では、この方法は、候補薬剤によって、細胞内、特に神経細胞内で産生されるNAD活性の増加を検出することを含むことができる。NAD活性の増加は、核NAD活性の増加であり得る。

---

In various embodiments, the present invention is also directed to methods of screening agents for treating a neuropathy in a mammal. The methods can comprise administering to neuronal cells *in vitro* or *in vivo*, a candidate agent, producing an axonal injury to the neuronal cells and detecting a decrease in axonal degeneration of the injured neuronal cells. In various embodiments, the method can comprise detecting an increase in NAD activity produced by a candidate agent, in a cell and, in particular, in a neuronal cell. The increase in NAD activity can be an increase in nuclear NAD activity.

#### [0015]

ニューロンにおけるサーチェイン活性を増加させる薬剤のスクリーニングならびにニューロンにおけるNAD生合成活性を増加させる薬剤のスクリーニングのための方法も提供される。該方法は、候補薬剤をインビトロでインビボで哺乳類のニューロン細胞に投与し、神経細胞の軸索損傷を生じさせ、損傷したニューロン細胞の軸索変性の減少を検出することを含むことができる。そのような方法は、いくつかの実施形態では、二次アッセイがサーチェイン活性またはNADならびにNAD生合成経路またはサルベージ経路の酵素または成分と関連して活性をさらに詳述する一次ス

クリーニング法であり得る。

---

Methods are also provided for screening agents that increase sirtuin activity in neurons as well as for screening agents that increase NAD biosynthetic activity in neurons. The methods can comprise administering to mammalian neuronal cells in vitro or in vivo a candidate agent, producing an axonal injury to the neuronal cells and detecting a decrease in axonal degeneration of the injured neuronal cells. Such methods can in some embodiments be primary screening methods in which secondary assays further delineate activity as associated with sirtuin activity or with NAD and enzymes or components of NAD biosynthetic or salvage pathways.

[0016]

本発明のスクリーニング方法の様々な実施形態において、軸索損傷は、神経細胞を化学的に傷つけること、神経細胞を熱傷すること、神経細胞を酸素欠乏させること、および神経細胞を物理的に損傷させることを含む多くの方法によって産生され得る。

---

In various embodiments of the screening methods of the present invention, axonal injury can be produced by a number of methods including chemically injuring the neuronal cells, thermally injuring the neuronal cells, oxygen-depriving the neuronal cells, and physically injuring the neuronal cells.

[0017]

様々な実施形態において、組換えベクターもまた提供される。ベクターは、哺乳動物NMNAT1タンパク質またはNMNAT3タンパク質をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むことができる。このような実施形態の様々な局面において、組換えベクターは、レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスであり得る。

---

A recombinant vector is also provided in various embodiments. The vector can comprise a promoter operatively linked to a sequence encoding a mammalian NMNAT1 protein or NMNAT3 protein. In various aspects of such embodiments, the recombinant vector can be a lentivirus or an adeno-associated virus.

[0018]

様々な実施形態において提供されるのは、SIRT1タンパク質をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む組換えベクターである。このような実施形態の様々な局面において、組換えベクターは、レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスであり得る。

---

Also provided in various embodiments, is a recombinant vector comprising a promoter operatively linked to a sequence encoding a SIRT1 protein. In various aspects of such



embodiments, the recombinant vector can be a lentivirus or an adeno-associated virus.

## 図面の簡単な説明

---

### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0019]

図1は、Wld s融合タンパク質のNMNAT1活性が、損傷した軸索の遅延変性を生じること示している：A) Wldタンパク質またはEGFPを発現するレンチウイルス感染した後根神経節 (DRG) ニューロン外植体培養物におけるインビトロの内在性変性チューブリン III免疫反応性神経突起は、切断前および切断後12,24,48、および72時間に示される (Scale Bar = 1mmおよび「\*」は除去前の細胞体の位置を示す;およびB) レンチウイルスのin vitroウォリアー変性 (Ufd2a (1-70) -EGFP) に融合したWldタンパク質のUfd2a部分 (70残基)、Cを有するUfd2a (1-70) -EGFP、EGFPのみを発現するDRGニューロン、(Ufd2a (P1140A)) またはUfd2a siRNA構築物である、神経突起の代表的な画像および残りの神経突起数の定量的データ (パーセンテージの百分率) は、EGFPに融合したWldタンパク質のNMNAT1部分切断前と比較して残りの神経突起各構築物で示される時点でS.D.) が (左下) が示されており、「\*」EGFP感染ニューロンと有意差 ( $p < 0.0001$ ) を示しています。導入遺伝子の発現を確認する切断前のEGFPシグナル (下段;スケールバー=50  $\mu\text{m}$ ) およびレンチウイルス遺伝子導入およびUfd2aタンパク質のsiRNAダウンレギュレーションによるタンパク質発現を確認するイムノプロット分析 (右下パネル) を示す。

---

Figure 1 illustrates that NMNAT1 activity of the Wld<s>fusion protein produces a delayed degeneration of injured axons showing: A)in vitroWallerian degeneration in lentivirus-infected dorsal root ganglia (DRG) neuronal explant cultures expressing Wld<s>protein or EGFP wherein tubulin III-immunoreactive neurites are shown before transection and 12,24,48, and 72 hr after transection (Scale Bar=1mm and the "\*" denotes the location of the cell bodies prior to removal; and B)in vitroWallerian degeneration in lentivirus-infected DRG neurons expressing EGFP only, Wld<s>protein, Ufd2a portion (70 residues) of Wld<s>protein fused to EGFP (Ufd2a(1-70)-EGFP), Ufd2a(1-70)-EGFP with C-terminal nuclear localization signal, NMNAT1 portion of Wld<s>protein fused to EGFP, dominant-negative Ufd2a (Ufd2a(P1140A)), or Ufd2a siRNA construct in which representative images of neurites and quantitative analysis data of remaining neurite numbers (percentage of remaining neurites relative to pre-transection  $\pm$  S.D.) at the indicated time-point with each construct (bottom left) are shown and the "\*" indicates significant difference ( $p < 0.0001$ ) with EGFP-infected neurons; also showing EGFP signal before transection confirming transgene expression (bottom row; Scale bar =50 $\mu\text{m}$ ) and immunoblot analysis confirming protein expression by lentiviral gene transfer and siRNA downregulation of Ufd2a protein (bottom right panels).

## [0020]

示されたタンパク質を発現するHEK293細胞から溶解物を調製した野生型および突然変異Wld sおよびNMNAT1タンパク質の酵素活性を、ニコチンアミドを用いてNAD産生についてアッセイした1時間で生成したNADの量をNADHに変換し、蛍光強度で定量し、全タンパク質濃度に対して正規化して、両方の変異体が発現するDRGニューロン、または棒グラフを示すEGFPにおけるインビトロウォーラーの変性は、EGFP感染ニューロンとの有意差 ( $p < 0.0001$ ) を示す、各構築物についての残りの神経突起数 (残りの神経突起のパーセンテージ  $\pm$  SDに対する相対的な時点の残存神経突起数の定量分析データを示す) ; C) 6XHisタグに対する抗体を用いたイムノブロット分析によって検出されたレンチウイルス感染細胞におけるタンパク質発現; ピンクリスチン添加後の表示時間に、神経突起の代表的な画像 (位相差; Bar = 1mm) が示されている、0.5  $\mu$ Mのピンクリスチンと共に培養されたNMNAT1またはEGFP (コントロール) を発現するDRGニューロン外植片。示された時点は、処置前の神経突起によって覆われた領域に対する神経突起によって覆われた領域としてプロットされる。

---

Figure 2 illustrates that increased NAD supply protects axons from degeneration after injury showing: A) Enzymatic activity of wild type and mutant Wld<s> and NMNAT1 proteins in which lysates were prepared from HEK293 cells expressing the indicated protein were assayed for NAD production using nicotinamide mononucleotide as a substrate and the amount of NAD generated in 1 h was converted to NADH, quantified by fluorescence intensity, and normalized to total protein concentration showing that both mutants have essentially no enzymatic activity; and B) In vitro Wallerian degeneration in lentivirus-infected DRG neurons expressing NMNAT1 or Wld<s> protein, mutants of these proteins that lack NAD-synthesis activity NMNAT1(W170A) and Wld<s>(W258A), or EGFP wherein the bar chart shows the quantitative analysis data of the number of remaining neurites at indicated time-point for each construct (percentage of remaining neurites relative to pre-transection  $\pm$  S.D.) and the "\*" indicates significant difference ( $p < 0.0001$ ) with EGFP-infected neurons; C) Protein expression in lentivirus-infected cells detected by immunoblot analysis using antibodies to the 6XHis tag; and D) DRG neuronal explant expressing either NMNAT1 or EGFP (control) cultured with 0.5  $\mu$ M vincristine wherein representative images of neurites (phase-contrast; Bar=1mm) are shown at the indicated times after vincristine addition and quantification of the protective effect at the indicated time points is plotted as the area covered by neurites relative to that covered by neurites prior to treatment.

## [0021]

図3は、軸索保護が損傷前にNADでのニューロンの前処理を必要とすることを示している: A) 軸索切断の24時間前に種々の濃度のNADの存在下で培養したDRG外植片を用いたin vitro壁内変性。およびB) 切断前の4,8,12,24、または48時間、1mMのNADと共にプレインキュベートしたDRG外植片 (棒グラフは、各実験における残りの神経突起の数を示す (横断前の  $\pm$  SDに対する残存神経突起の割合) 「\*」は対照と比較して有意な軸索保護を示す ( $p < 0.0001$ ))。

---

Figure 3 illustrates that axonal protection requires pre-treatment of neurons with NAD prior to injury showing: A) *in vitro* Wallerian degeneration using DRG explants cultured in the presence of various concentrations of NAD added 24 hr prior to axonal transection; and B) DRG explants preincubated with 1mM NAD for 4, 8, 12, 24, or 48 h prior to transection wherein the bar chart shows the number of remaining neurites in each experiment (percentage of remaining neurites relative to pre-transection  $\pm$  S.D.) at each of the indicated time points and the "\*" indicates significant axonal protection compared to control ( $p < 0.0001$ ).

#### [0022]

図4は、NAD依存性軸索保護がSIRT1活性化によって媒介されることを示している：A) 1mMのNAD単独（対照）または100  $\mu$ MのSirtinol（Sir2阻害剤）の存在下でプレインキュベートしたDRG外植片培養物を用いたインビトロウオーラーの変性20mM 3-アミノベンズイミド（3AB、PARP阻害剤）。B) レスベラトロール（10,50または100  $\mu$ M）とともにインキュベートしたDRG外植片培養物を用いたインビトロウオーラーの変性;およびC) 左：SIRTファミリー（SIRT1-7）の各メンバーに特異的なレンチウイルスを発現するレンチウイルス感染したDRG外植片培養物を用いたインビトロウオーラーの変性（棒グラフは、残りの神経突起の相対的なパーセンテージ各条件について示された時点で「\*」は対照と有意に異なる点を示す（ $< 0.0001$ ）。中間の表：感染したNIH3T3細胞におけるqRT-PCRを用いた各SIRT siRNA（野生型mRNAレベルの%として表現される）の有効性。右：SIRT1に対する抗体を用いたイムノブロットは、NAD依存性軸索保護を効果的にブロックするSIRT1 siRNAの存在下でのSIRT1の発現の減少を示す。

---

Figure 4 illustrates that NAD-dependent Axonal Protection is mediated by SIRT1 activation showing: A) *In vitro* Wallerian degeneration using DRG explant cultures preincubated with 1 mM NAD alone (control) or in the presence of either 100  $\mu$ M Sirtinol (a Sir2 inhibitor) or 20 mM 3-aminobenzimidazole (3AB, a PARP inhibitor); B) *in vitro* Wallerian degeneration using DRG explant cultures incubated with resveratrol (10, 50 or 100  $\mu$ M); and C) left : *in vitro* Wallerian degeneration using DRG explant cultures infected with lentivirus expressing siRNA specific for each member of the SIRT family (SIRT1-7) wherein the bar chart shows the quantitative analysis of the number of remaining neurites (percentage of remaining neurites relative to pre-transection  $\pm$  S.D.) at indicated time-point for each condition and the "\*" indicates points significantly different than control ( $< 0.0001$ ); middle table : The effectiveness of each SIRT siRNA (expressed as % of wild type mRNA level) using qRT-PCR in infected NIH3T3 cells; and right: immunoblot using antibodies to SIRT1 to show decreased expression of SIRT1 in the presence of SIRT1 siRNA which effectively blocked NAD dependent axonal protection.

#### [0023]

（略称：QPRT、キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、NaPRT、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、NmPRT、ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ、NrK

、ニコチンアミドリボシドキナーゼ; NMNAT、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ; QNS、NADシンテターゼ)

---

Figure 5 illustrates the mammalian NAD biosynthetic pathway in which predicted mammalian NAD biosynthesis is illustrated based on the enzymatic expression analysis and studies from yeast and lower eukaryotes (Abbreviation used; QPRT, quinolinate phosphoribosyltransferase; NaPRT, nicotinic acid phosphoribosyltransferase; NmPRT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; Nrk, nicotinamide riboside kinase; NMNAT., nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase; QNS, NAD synthetase)

[0024]

【図6】哺乳動物におけるNAD生合成酵素の発現分析を示す図であり、(A)ラットDRGにおける神経切断の1,3,7および14日後のNAD生合成酵素mRNAレベルを、qRT-PCRによって決定した。各試料におけるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの発現を示し、非軸索切断されたDRGにおける発現レベルに対して示されている; (B) インキュベーションにより導入された神経突起変性1時間または0.1  $\mu$ Mロテノン中のDRGおよびNAD合成酵素mRNAレベルは、本文に記載されているようにqRT-PCRによって決定した。

---

Figure 6 illustrates expression analysis of NAD biosynthetic enzymes in mammal showing (A) NAD biosynthesis enzyme mRNA levels after 1, 3, 7, and 14 days after nerve transection in rat DRG were determined by qRT-PCR in which the expression level was normalized to glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase expression in each sample and is indicated relative to the expression level in non-axotomized DRG; (B) neurite degeneration introduced by incubation DRG in 1 or 0.1  $\mu$ M rotenone for indicated time and NAD synthesis enzyme mRNA levels were determined by qRT-PCR as described in the text.

[0025]

NMNAT1、cytNMNAT1、NMNAT3またはnucNMNAT3を発現するレンチウイルス感染DRGニューロン外植体培養物を用いた(A) *in vitro* Wallerian変性アッセイを示す、(A)軸索を保護するNMNAT酵素の細胞内局在化を示す図であり、トランザクションが表示されます。  
(B) HEK293T細胞におけるNMNAT1、cytNMNAT1、NMNAT3またはnucNMNAT3の細胞内局在化は、6xHisタグに対する抗体を用いた免疫組織化学を用いて各タンパク質を検出し、核マーカー(bisbenzimidazole)を比較するために核マーカー色素各タンパク質の細胞質の位置(スケールバー=25  $\mu$ m)。(C) 37  $^{\circ}$ Cで1時間後に生成したNADの量がNADHに変換されたNMNAT1、cytNMNAT1、NMNAT3、nucNMNAT3を発現するHEK293T細胞の溶解液から野生型および変異体NMNAT1およびNMNAT3の酵素活性を精製し、定量し、タンパク質濃度に正規化した。  
(E) NMNAT1を発現するレンチウイルス感染DRGニューロン外植体培養物を用いた*in vitro* Wallerian変性アッセイ、および(E) NMNAT1を発現するレンチウイルス感染DRGニューロン外植体培養物を用いた*in vitro* Wallerian変性アッセイを用いた、レンチウイルス遺伝子導入による

NMNAT1、cytNMNAT1、NMNAT3およびnucNMNAT3の軸索切除後12,24,48、および72時間における残りの神経突起数の定量分析データを示す、cytNMNAT1、NMNAT3、またはnucNMNAT3。

---

Figure 7 illustrates the subcellular localization of NMNAT enzymes and their ability to protect axon showing (A) *in vitro* Wallerian degeneration assay using lentivirus infected DRG neuronal explant cultures expressing NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3, or nucNMNAT3 in which representative pictures taken at 12 and 72 hours after transaction are shown; (B) Subcellular localization of NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3, or nucNMNAT3 in HEK 293T cells using immunohistochemistry with antibody against 6xHis tag to detect each proteins and staining of the cells with the nuclear marker dye (bisbenzimidazole) for comparison to determine the nuclear vs. cytoplasmic location of each protein (Scale bar = 25  $\mu$ m); (C) enzymatic activity of wild type and mutant NMNAT1 and NMNAT3 in which 6xHis tagged each protein was purified from lysate of HEK293T cells expressing NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3, nucNMNAT3 in which the amount of NAD generated after 1 hour at 37 deg was converted NADH, quantified and normalized to protein concentration; (D) protein expression of NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3, and nucNMNAT3 by lentivirus gene transfer confirmed by immunoblot analysis of HEK293T cells infected with each of the virus and (E) *in vitro* Wallerian degeneration assay using lentivirus infected DRG neuronal explant cultures expressing NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3, or nucNMNAT3 showing quantitative analysis data of remaining neurite numbers at 12, 24, 48, and 72 hours after axotomy.

## [0026]

【図8】図8は、NAD、NmRの外因性適用後のDRGニューロン外植体培養を用いた(A) *in vitro* Wallerian変性アッセイ、12,24,48および72時間に撮影された代表的な写真を示す、軸索を保護するNAD生合成基質の外因的適用およびそれらの能力を示す。トランザクション後に表示されます。(B) Na、Nam、NaMN、NMN、NaAD、NADおよびNmRを外因的に適用した後のDRGニューロン外植片培養を用いた*in vitro* Wallerian変性アッセイで、12,24,48、および72時間後の残りの神経突起数の定量分析データを示す軸索切開術が示される。(C) 12時間、24時間、48時間および72時間における残りの神経突起数の定量分析データを示す*in vitro* Wallerian degenerationアッセイにおいて、レンチウイルスを発現するNaPRT感染レンチウイルスに感染させ、1mMのNaを含むか含まないでインキュベートしたDRG神経外植片。軸索切開後。

---

Figure 8 illustrates exogenous application of NAD biosynthetic substrates and their ability to protect axon showing (A) *in vitro* Wallerian degeneration assay using DRG neuronal explant cultures after exogenous application of NAD, NmR with representative pictures taken at 12, 24, 48, and 72 hours after transaction are shown; (B) *in vitro* Wallerian degeneration assay using DRG neuronal explant cultures after exogenous application of Na, Nam, NaMN, NMN, NaAD, NAD, and NmR showing quantitative analysis data of remaining neurite numbers at 12, 24, 48, and 72 hours after axotomy are shown; (C) DRG neuronal explants infected with NaPRT expressing

lentivirus and incubated with or without 1 mM of Na for 24 hours before axotomy, in in vitro Wallerian degeneration assay showing quantitative analysis data of remaining neurite numbers at 12, 24, 48, and 72 hours after axotomy.

[0027]

図9は、NAD生合成基質の硝子体内注射後の視神経横断を示しており、NAD、NMN、NmR、またはNamを左ラット眼の硝子体内区画に注入し、24時間網膜神経節細胞を組み込み、その後、視神経を眼で横切った脱核および左右視神経を切断から4日後に収集し、軸切断前に何の処置もせずにマウスから切除した視神経を陰性対照に使用したウェスタンブロッティングによって分析した。図には、横断されていない $\pm$ S.Dと比較して、横断された視神経からの残りの神経フィラメント免疫反応性のパーセンテージの定量分析データが示されている。

---

Figure 9 illustrates optic nerve transection after intravitreal injection of NAD biosynthetic substrates NAD, NMN, NmR, or Nam was injected into intravitreal compartment of left rat eye and allowed to incorporate retinal ganglion cells for 24 hours after which, left optic nerve was transected by eye enucleation and right and left optic nerves were collected at 4 days after transection and analyzed by Western blotting in which optic nerves transected from mice without any treatment prior to axotomy were used for negative control; showing in the figure, the quantitative analysis data of percentage of remaining neurofilament immunoreactivity from transected optic nerve relative to non-transected  $\pm$  S.D.

詳細な説明

---

DETAILED DESCRIPTION

[0028]

本発明は、神経障害を治療するための方法および組成物を含む。該方法は、哺乳動物に、罹患したニューロンおよび/または傷害されたニューロンにおけるNAD活性を増加させる有効量の物質を投与することを含むことができる。増大したNAD活性は、サーチュイン活性を増加させるように作用し、これにより、治療されていない損傷した神経細胞において生じる軸索変性と比較して、損傷したニューロン細胞の軸索変性が減少すると考えられる。軸索変性におけるそのような減少は、ニューロンへの損傷の完全または部分的な改善を含み得る。NAD活性の増加は、サーチュイン分子の生成を伴わない他のメカニズム、または軸索変性の減少の産生に寄与する可能性もあると考えられている。

---

The present invention involves methods and compositions for treating neuropathies. The methods can comprise administering to a mammal an effective amount of a substance that increases NAD activity in diseased and/or injured neurons. It is believed that the increased NAD

activity can act to increase sirtuin activity which then produces a decrease in axonal degeneration of injured neuronal cells compared to axonal degeneration that occurs in injured neuronal cells not treated with the agent. Such decrease in axonal degeneration can include a complete or partial amelioration of the injury to the neuron. It is also believed possible that the increase in NAD activity could act through other mechanisms not involving sirtuin molecules to produce or to contribute to the production of a decrease in axonal degeneration.

#### [0029]

SIRTとして参照される7種の既知のサーチュイン分子は、哺乳動物においてヒストン/タンパク質デアセチラーゼのSir2ファミリーを構成し、このようなサーチュイン分子の全てが本発明の範囲内に含まれる。7つのヒトサーチュイン、SIRT1-SIRT7は、NCBI LocusLink ID番号23411,22933,23410,23409,23408,51548および51547とそれぞれ関連してより完全に記載されているNAD依存性ヒストン/タンパク質脱アセチル化酵素である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>)。該NCBI LocusLink参照部位は、参照により本明細書に組み込まれる。様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は、いずれか1つまたは複数のサーチュインの活性を増加させることができ、特に、本発明の様々な方法は、SIRT1の活性を増加させる。

---

Seven known sirtuin molecules referenced as SIRT's make up the Sir2 family of histone/protein deacetylases in mammals and all such sirtuin molecules are included within the scope of the present invention. The seven human sirtuins, SIRT1-SIRT7, are NAD-dependent histone/protein deacetylases which are described more fully in connection with NCBI LocusLink ID Nos. 23411, 22933, 23410, 23409, 23408, 51548 and 51547, respectively (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>). Said NCBI LocusLink reference sites are hereby incorporated by reference. In various embodiments, the methods and compositions of the present invention can increase activity of any one or more of the sirtuins and, in particular, various methods of the present invention increase activity of SIRT1.

#### [0030]

物質の活性によって、特定の物質の濃度または物質の機能的有効性のいずれかが参照される。物質の濃縮は、例えば、合成の増加、分解の減少、物質のバイオアベイラビリティの増加または物質の結合の減少、または遊離物質の利用可能な量の増加を含む多くの要因によって増加させることができる。機能的有効性の増加は、例えば、分子立体配座の変化、物質が作用する条件の変化、物質に対する感受性の変化などをもたらすことができる。サーチュイン分子に関する活性の増加は、濃度の増加または機能的有効性の増強、またはNADの利用可能性の増加、またはNADまたはそれらの任意の組み合わせのための1つまたは複数の生合成経路による流入の増加を意味することを意図する。

---

By activity of a substance, reference is made to either the concentration of the particular

substance or functional effectiveness of the substance. Concentration of a substance can be increased by numerous factors including, for example, increasing synthesis, decreasing breakdown, increasing bioavailability of the substance or diminishing binding of the substance or otherwise increasing the available amount of free substance. Increasing functional effectiveness can result, for example, from a change in molecular conformation, a change in the conditions under which the substance is acting, a change in sensitivity to the substance, and the like. Increasing activity with respect to sirtuin molecules is intended to mean increasing concentration or enhancing functional effectiveness or increasing the availability of NAD or increasing the flux through one or more biosynthetic pathways for NAD or any combination thereof.

### [0031]

神経障害には、神経膠細胞、筋細胞、線維芽細胞などのニューロンおよび/または支持細胞、特に軸索損傷を伴う疾患または状態を含む任意の疾患または状態が含まれ得る。軸索損傷は、外傷性損傷または疾患または状態による非機械的損傷によって引き起こされ得、そのような損傷の結果は、軸索の変性または機能不全および機能的な神経活動の喪失であり得る。このような軸索損傷を生じさせるかまたはそれに関連する疾患および状態は、多数の神経障害性疾患および状態の1つである。このような神経障害は、末梢神経障害、中枢神経障害、およびそれらの組み合わせを含み得る。さらに、末梢神経障害症状は、主に中枢神経系に集中している疾患によって生成され得、中枢神経系症状は、本質的に末梢性または全身性疾患によって産生され得る。

---

Neuropathies can include any disease or condition involving neurons and/or supporting cells, such as for example, glia, muscle cells, fibroblasts, etc., and, in particular, those diseases or conditions involving axonal damage. Axonal damage can be caused by traumatic injury or by non-mechanical injury due to diseases or conditions and the result of such damage can be degeneration or dysfunction of the axon and loss of functional neuronal activity. Disease and conditions producing or associated with such axonal damage are among a large number of neuropathic diseases and conditions. Such neuropathies can include peripheral neuropathies, central neuropathies, and combinations thereof. Furthermore, peripheral neuropathic manifestations can be produced by diseases focused primarily in the central nervous systems and central nervous system manifestations can be produced by essentially peripheral or systemic diseases.

### [0032]

末梢神経障害は、末梢神経の損傷を含み、そのようなものは、神経の疾患または全身性疾患の結果として引き起こされ得る。糖尿病、尿毒症、AIDまたはハンセン病などの感染症、栄養欠乏症、アテローム性動脈硬化症などの血管またはコラーゲン障害、全身性エリテマトーデス、強皮症、サルコイドーシス、関節リウマチおよび結節性多発動脈炎などの自己免疫疾患が挙げられます。末梢神経変性はまた、外傷性、すなわち神経への機械的損傷、ならびに神経への化学的または熱的損傷に起因し得る。末梢神経を傷つけるような状態には、緑内障、手根管症候群、直接的な



外傷、浸透性の傷害、挫傷、骨折または脱臼骨のような圧迫または包み込み傷害;長時間の松葉杖の使用または長すぎるまたは腫瘍からの1つの位置に留まることに起因し得る表面神経(尺骨、放射状または腓骨)を含む圧力;内膜出血;虚血;寒さまたは放射線への暴露、あるいは特定の医薬品または有害物質(例えば、薬草または農薬)。

---

Peripheral neuropathies involve damage to the peripheral nerves and such can be caused by diseases of the nerves or as the result of systemic illnesses. Some such diseases can include diabetes, uremia, infectious diseases such as AIDs or leprosy, nutritional deficiencies, vascular or collagen disorders such as atherosclerosis, and autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, scleroderma, sarcoidosis, rheumatoid arthritis, and polyarteritis nodosa. Peripheral nerve degeneration can also result from traumatic, i.e mechanical damage to nerves as well as chemical or thermal damage to nerves. Such conditions that injure peripheral nerves include compression or entrapment injuries such as glaucoma, carpal tunnel syndrome, direct trauma, penetrating injuries, contusions, fracture or dislocated bones; pressure involving superficial nerves (ulna, radial, or peroneal) which can result from prolonged use of crutches or staying in one position for too long, or from a tumor; intraneural hemorrhage; ischemia; exposure to cold or radiation or certain medicines or toxic substances such as herbicides or pesticides.

特に、神経損傷は、例えば、ビンクリスチンのようなビンカアルカロイドのような細胞傷害性抗癌剤による化学的損傷に起因し得る。このような末梢神経障害の典型的な症状には、衰弱、しびれ感、感覚異常(灼熱、くすぐり、穿刺または刺痛などの異常感覚)および腕、手、脚および/または足の痛みが含まれる。神経障害は、ミトコンドリア機能障害と関連している可能性もある。このような神経障害は、エネルギーレベルの低下、すなわちNADおよびATPレベルの低下を示すことがある。

---

In particular, the nerve damage can result from chemical injury due to a cytotoxic anticancer agent such as, for example, a vinca alkaloid such as vincristine. Typical symptoms of such peripheral neuropathies include weakness, numbness, paresthesia (abnormal sensations such as burning, tickling, pricking or tingling) and pain in the arms, hands, legs and/or feet. The neuropathy can also be associated with mitochondrial dysfunction. Such neuropathies can exhibit decreased energy levels, i.e. decreased levels of NAD and ATP.

### [0033]

末梢神経障害はまた、代謝起源の全身性疾患に関連する広範囲の末梢神経障害を含む代謝性および内分泌性ニューロパチーであり得る。糖尿病、低血糖、尿毒症、甲状腺機能低下症、肝不全、真性赤血球増加症、アミロイドーシス、先端巨大症、ポルフィリン症、脂質/糖脂質代謝障害、栄養/ビタミン欠乏症、ミトコンドリア障害などが挙げられる。これらの疾患の共通の特徴は、代謝経路の調節不全に起因するミエリンおよび軸索の構造または機能の変化による末梢神経の関与である。

---

The peripheral neuropathy can also be a metabolic and endocrine neuropathy which includes a wide spectrum of peripheral nerve disorders associated with systemic diseases of metabolic origin. These diseases, some of which are mentioned earlier, include diabetes mellitus, hypoglycemia, uremia, hypothyroidism, hepatic failure, polycythemia, amyloidosis, acromegaly, porphyria, disorders of lipid/glycolipid metabolism, nutritional/vitamin deficiencies, and mitochondrial disorders, among others. The common hallmark of these diseases is involvement of peripheral nerves by alteration of the structure or function of myelin and axons due to metabolic pathway dysregulation.

#### [0034]

神経障害には、緑内障などの視神経障害も含まれる。網膜色素変性症および網膜神経網膜症に関連する網膜神経節変性;視神経神経炎および/または多発性硬化症に関連する変性を含む変性;例えば腫瘍除去中の損傷を含むことができる視神経に対する外傷性損傷;遺伝性視神経症、例えばケアー病およびレーバー遺伝性視神経症;巨細胞性動脈炎に続発するような虚血性視神経症;ビタミンB12または葉酸の欠乏などの栄養欠乏症、およびエタンプトールまたはシアン化物に起因するような毒性などの代謝性視神経症;前立腺肥大症などの神経変性疾患;副作用による神経障害やビタミン欠乏による神経障害などがあります。虚血性視神経症には、非動脈前虚血性視神経症も含まれる。

---

Neuropathies also include optic neuropathies such as glaucoma; retinal ganglion degeneration such as those associated with retinitis pigmentosa and outer retinal neuropathies; optic nerve neuritis and/or degeneration including that associated with multiple sclerosis; traumatic injury to the optic nerve which can include, for example, injury during tumor removal; hereditary optic neuropathies such as Kjer's disease and Leber's hereditary optic neuropathy; ischemic optic neuropathies, such as those secondary to giant cell arteritis; metabolic optic neuropathies such as neurodegenerative diseases including Leber's neuropathy mentioned earlier, nutritional deficiencies such as deficiencies in vitamins B12 or folic acid, and toxicities such as due to ethambutol or cyanide; neuropathies caused by adverse drug reactions and neuropathies caused by vitamin deficiency. Ischemic optic neuropathies also include non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy.

#### [0035]

中枢神経系における神経障害または軸索障害に関連する神経変性疾患には、様々な疾患が含まれる。そのような疾患には、例えば、アルツハイマー病、老人性痴呆、ピック病およびハンチントン病のような進行性痴呆を伴うもの;パーキンソン病などの筋肉機能に影響を及ぼす中枢神経系疾患、運動ニューロン疾患および筋萎縮性側索硬化症などの進行性運動失調;脱髄疾患、例えば多発性硬化症;例えば、エンテロウイルス、アルボウイルスおよび単純ヘルペスウイルスによって引き起こされるものなどのウイルス性脳炎;プリオン病。緑内障または頭部および脊柱への外傷性傷害

のような機械的傷害もまた、脳および脊髄における神経損傷および変性を引き起こし得る。さらに、虚血および脳卒中並びに栄養欠乏および化学療法剤などの化学毒性のような状態は、中枢神経系の神経障害を引き起こし得る。

---

Neurodegenerative diseases that are associated with neuropathy or axonopathy in the central nervous system include a variety of diseases. Such diseases include those involving progressive dementia such as, for example, Alzheimer's disease, senile dementia, Pick's disease, and Huntington's disease; central nervous system diseases affecting muscle function such as, for example, Parkinson's disease, motor neuron diseases and progressive ataxias such as amyotrophic lateral sclerosis; demyelinating diseases such as, for example multiple sclerosis; viral encephalitides such as, for example, those caused by enteroviruses, arboviruses, and herpes simplex virus; and prion diseases. Mechanical injuries such as glaucoma or traumatic injuries to the head and spine can also cause nerve injury and degeneration in the brain and spinal cord. In addition, ischemia and stroke as well as conditions such as nutritional deficiency and chemical toxicity such as with chemotherapeutic agents can cause central nervous system neuropathies.

[0036]

本明細書で使用される「治療」という用語は、神経損傷の発生の前または後のいずれかに介入を含むことを意図する。そのようなものとして、治療は、ニューロンへの主要な傷害が起こる前に投与による神経損傷を予防することができ、ニューロンへの主要な傷害が起こった後に投与による神経損傷を改善する。ニューロンに対するそのような主要な傷害は、ニューロパチーに関連する任意の疾患または状態を含み得るか、または結果として生じ得る。「治療」には、ニューロン損傷の進行の予防も含まれる。本明細書で使用する「治療」は、薬物および/または合成物質の投与、タンパク質、核酸、ウイルスベクターなどの生物学的物質の投与、ならびに栄養補助食品、食品添加物または機能性物質などの物質の投与を含むことができる食べ物。

---

The term "treatment" as used herein is intended to include intervention either before or after the occurrence of neuronal injury. As such, a treatment can prevent neuronal injury by administration before a primary insult to the neurons occurs as well as ameliorate neuronal injury by administration after a primary insult to the neurons occurs. Such primary insult to the neurons can include or result from any disease or condition associated with a neuropathy. "Treatment" also includes prevention of progression of neuronal injury. "Treatment" as used herein can include the administration of drugs and/or synthetic substances, the administration of biological substances such as proteins, nucleic acids, viral vectors and the like as well as the administration of substances such as nutraceuticals, food additives or functional foods.

[0037]

本発明の方法および組成物は、哺乳動物の治療に有用である。そのような哺乳動物には、ヒトならびに非ヒト哺乳動物が含まれる。非ヒト哺乳動物には、例えば、イヌおよびネコなどのコンパ

ニオン動物、ウシ、ウマなどを含む生存ストック、および動物園動物などのエキゾチックな動物が含まれる。

---

The methods and compositions of the present invention are useful in treating mammals. Such mammals include humans as well as non-human mammals. Non-human mammals include, for example, companion animals such as dogs and cats, agricultural animals such live stock including cows, horses and the like, and exotic animals, such as zoo animals.

[0038]

哺乳動物におけるサーチュイン活性を増加させることができる物質には、ポリフェノールが含まれ得、そのいくつかは以前に記載されている（例えば、Howitzら、Nature 425 : 191-196,2003およびその全文を参照により本明細書に援用する）。そのような化合物は、レスベラトロール、ピセアタンノール、デオキシラポボン、トランス - スチルベンおよびラボンチンのようなスチルベン;ブタイン、イソリキリジゲンおよび3,4,2', 4', 6'-ペンタヒドロキシカルコンおよびカルコンなどのカルコン; 5,7,3', 4', 5'-ペンタヒドロキシフラボン、ルテオリン、3,6,3', 4'-テトラヒドロキシフラボン、ケルセチン、7,3', 4', 5'-テトラヒドロキシフラボン、ケンペロール、6-ヒドロキシアパニン、アピゲニン、3,6,2', 4'-テトラヒドロキシフラボン、7,4'-ジヒドロキシフラボン、7,8,3', 4'-テトラヒドロキシフラボン、3,6,2', 3'-テトラヒドロキシフラボン、5,4'-ジヒドロキシフラボン、5,7-ジヒドロキシフラボン、モリン、フラボンおよび5-ヒドロキシフラボン;イソフラボン、例えばダイゼインおよびゲニステイン; ( - ) - エピカテキン、( - ) - カテキン、( - ) - ガロカテキン、( + ) - カテキンおよび( - ) - カテキンのようなフラバノンまたはフラバノンまたはカテキン類のようなフラバノン類;ナリンゲニン、3,5,7,3', 4'-ペンタヒドロキシフラバノン、+ ) - エピカテキン。

---

Substances that can increase sirtuin activity in mammals can include polyphenols some of which have been described earlier (see for example Howitz et al., Nature 425:191-196, 2003 and supplementary information that accompanies the paper all of which is incorporated herein by reference). Such compounds can include stilbenes such as resveratrol, piceatannol, deoxyrhapontin,trans-stilbene and rhapontin; chalcone such as butein, isoliquiritigen and 3,4,2',4',6'-pentahydroxychalcone and chalcone; flavones such as fisetin, 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone, luteolin, 3,6,3',4'-tetrahydroxyflavone, quercetin, 7,3',4',5'-tetrahydroxyflavone, kaempferol, 6-hydroxyapigenin, apigenin, 3,6,2',4'-tetrahydroxyflavone, 7,4'-dihydroxyflavone, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone, 3,6,2',3'-tetrahydroxyflavone, 4'-hydroxyflavone, 5,4'-dihydroxyflavone, 5,7-dihydroxyflavone, morin, flavone and 5-hydroxyflavone; isoflavones such as daidzein and genistein; flavanones such as naringenin, 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone, and flavanone or catechins such as (-)-epicatechin, (-)-catechin, (-)-gallocatechin, (+)-catechin and (+)-epicatechin.

[0039]

サーチュインデアセチラーゼ活性を増加させるさらなるポリフェノールまたは他の物質は、蛍光酵素アッセイ (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, Pennsylvania) のような市販のアッセイと同様に、本明細書に記載のアッセイ系を用いて同定することができる。Sinclair et al. サーチュイン活性を増加させることができる物質も開示している (Sinclairら、国際公開第 2005/02672号パンフレット、その全体が参考として援用される)。

---

Additional polyphenols or other substance that increase sirtuin deacetylase activity can be identified using assay systems described herein as well as in commercially available assays such as fluorescent enzyme assays (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, Pennsylvania). Sinclair et al. also disclose substances that can increase sirtuin activity (Sinclair et al., WO2005/02672 which is incorporated in its entirety by reference).

### [15]

様々な実施形態において、他の物質は、NAD依存性ヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性を介して機能する特定のサーチュインの結果として、NAD活性を増加させることによって間接的にサーチュイン活性を増加させることができる。NAD活性は、NADまたはNADHの投与ならびにNADの合成によって増加させることができる。NADは、トリプトファンからNADが合成される3つの主要な経路、ニコチンアミドのような分解されたNAD生成物をリサイクルすることによってNADが生成されるNADサルベージ経路 (Linら、Curent Opin. Cell Biol. 15 : 241-246,2003; Magniら、Cell Mol. ライフサイエンス61 : 19-34,2004)、およびニコチンアミドリボシドがニコチンアミドリボシドキナーゼによってニコチンアミドモノヌクレオチドに変換されたニコチンアミドリボシドキナーゼ経路 (Bieganowskiら、Cell 117 : 495-502,2004)。このように、例えばトリプトファンまたはニコチン酸のようなノー・ノー・パスウェイのNADの前駆体および/または例えばニコチンアミド、ニコチン酸、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはデアミノ酸のようなNADサルベージ経路の物質の損傷ニューロンへの投与は、NADおよび/または例えばニコチンアミドリボシドまたはニコチンアミドモノヌクレオチドのようなニコチンアミドリボシドキナーゼ経路中の物質は、潜在的にNAD活性を増加させる可能性がある。

---

In various embodiments, other substances can increase sirtuin activity indirectly by increasing NAD activity as a result of the particular sirtuin functioning through NAD-dependent histone/protein deacetylase activity. NAD activity can be increased by administration of NAD or NADH as well as by synthesizing NAD. NAD can be synthesised through three major pathways, the de novo pathway in which NAD is synthesized from tryptophan, the NAD salvage pathway in which NAD is generated by recycling degraded NAD products such as nicotinamide (Lin et al. Curent Opin. Cell Biol. 15:241-246, 2003 ; Magni et al., Cell Mol. Life Sci. 61:19-34, 2004) and the nicotinamide riboside kinase pathway in which nicotinamide riboside is converted to nicotinamide mononucleotide by nicotinamide riboside kinase (Bieganowski et al., Cell 117:495-502, 2004). Thus, administering to injured neurons, a precursor of NAD in the de novo pathway such as, for example, tryptophan or nicotinate and/or substances in the NAD salvage pathway such as, for example, nicotinamide, nicotinic acid, nicotinic acid mononucleotide, or deamido-

NAD and/or substances in the nicotinamide riboside kinase pathway such as, for example, nicotinamide riboside or nicotinamide mononucleotide, could potentially increase NAD activity.

以下に示すように、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドは、NADと同様に軸索変性に対して保護されているが、ニコチン酸およびニコチンアミドはNADに加えて保護しなかった。増加したNAD活性は、損傷したニューロンにおけるサーチュインヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性を増加させ、軸索変性を減少または予防することができる。さらに、他の物質は、酵素活性を増加させることによって、またはNAD、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチンアミドリボシドまたはサーチュイン酵素のレベルを増加させることによって、またはNAD、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチド、ニコチンアミドリボシドまたはサーチュイン酵素。

---

As shown below, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide or nicotinamide riboside, in addition to NAD, protected against axonal degeneration to a similar extent as did NAD, however, nicotinic acid and nicotinamide did not. The increased NAD activity can then increase sirtuin histone/protein deacetylase activity in the injured neurons and diminish or prevent axonal degeneration. In addition, it is believed that other substances can act by increasing enzyme activity or by increasing levels of NAD, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide, nicotinamide riboside or sirtuin enzymes or by decreasing degradation of NAD, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide, nicotinamide riboside or sirtuin enzymes.

[0041]

種々の実施形態において、NADを合成する酵素またはNADを合成する酵素を含む核酸を投与することにより、損傷したニューロンにおいてNADを増加させることができる。そのような酵素は、NADサルベージ経路の酵素であるNAD合成経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素またはNADを合成するためのノボパス中の酵素をコードする核酸を合成するためのノボパス中の酵素を含むことができるまたはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素、および特にNMNAT1のようなニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NMNAT) のようなNADサルベージ経路の酵素である。したがって、非限定的な一例において、NMNAT1またはNMNAT3などのNMNATまたはNMNAT1またはNMNAT3などのNMNATをコードする配列を含む核酸の投与は、傷害ニューロンにおける軸索変性を減少または予防することができる。

---

In various embodiments, NAD can be increased in injured neurons by administering enzymes that synthesize NAD or nucleic acids comprising enzymes that synthesize NAD. Such enzymes can include an enzyme in the de novo pathway for synthesizing NAD, an enzyme of the NAD salvage pathway or an enzyme of the nicotinamide riboside kinase pathway or a nucleic acid encoding an enzyme in the de novo pathway for synthesizing NAD, an enzyme of the NAD salvage pathway or

an enzyme of the nicotinamide riboside kinase pathway and, in particular, an enzyme of the NAD salvage pathway such as, for example, a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) such as NMNAT1. Thus, in one non-limiting example, administration of an NMNAT such as NMNAT1 or NMNAT3 or a nucleic acid comprising a sequence encoding an NMNAT such as NMNAT1 or NMNAT3 can diminish or prevent axonal degeneration in injured neurons.

#### [0042]

ヒトNMNAT1酵素 (E.C.2.7.7.18) は、ヒトNMNAT1遺伝子および/またはタンパク質のGenBank Assession番号に従って表される: NP\_073624; NM\_022787; AAL76934; AF459819; NP\_073624; AF314163。この遺伝子の変異体はNMNAT-2 (KIAA047 9) であり、そのヒト版はGenBank登録番号NP\_055854およびNM\_015039の下に見出すことができる。

---

The human NMNAT1 enzyme (E.C.2.7.7.18) is represented according to the GenBank Assession numbers for the human NMNAT1 gene and/or protein:NP\_073624; NM\_022787; AAL76934; AF459819; and NP\_073624; AF314163. A variant of this gene is NMNAT-2 (KIAA0479), the human version of which can be found under GenBank Accession numbers NP\_055854 and NM\_015039.

#### [0043]

本明細書中で使用される場合、用語「同一性パーセント」または「同一性パーセント」または「同一性%」は、2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間の配列同一性をいう。同一性は、比較のために整列され得る各配列中の位置を比較することによってそれぞれ決定され得る。比較される配列中の同等の位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有される場合、分子はその位置で同一であり;同等または類似のアミノ酸残基(例えば、立体的および/または電子的性質が類似している)によって占有されている等価な部位である場合、その分子はその位置で同種(類似)と呼ぶことができる。相同性、類似性、または同一性のパーセンテージとしての発現は、比較される配列によって共有される位置における同一または類似のアミノ酸の数の関数を指す。FASTA、BLASTまたはENTREZを含む様々なアラインメントアルゴリズムおよび/またはプログラムを使用することができる。FASTAおよびBLASTは、GCG配列解析パッケージ(University of Wisconsin、Madison、Wis。)の一部として入手可能であり、例えば、デフォルト設定で使用することができる。

---

As used herein, the term "percent identical" or "percent identity" or "% identity" refers to sequence identity between two amino acid sequences or between two nucleotide sequences. Identity can each be determined by comparing a position in each sequence which may be aligned for purposes of comparison. When an equivalent position in the compared sequences is occupied by the same base or amino acid, then the molecules are identical at that position; when the equivalent site occupied by the same or a similar amino acid residue (e.g., similar in steric and/or electronic nature), then the molecules can be referred to as homologous (similar) at that position.

Expression as a percentage of homology, similarity, or identity refers to a function of the number of identical or similar amino acids at positions shared by the compared sequences. Various alignment algorithms and/or programs may be used, including FASTA, BLAST, or ENTREZ. FASTA and BLAST are available as a part of the GCG sequence analysis package (University of Wisconsin, Madison, Wis.), and can be used with, e.g., default settings.

[70]

ENTREZは、米国国立衛生研究所、メリーランド州ベテスダのNational Library of Medicineのバイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）を通じて入手可能である。一実施形態では、2つの配列のパーセント同一性は、1のギャップ重みを有するGCGプログラムによって決定することができ、例えば、各アミノ酸ギャップは、あたかも2つの配列間の単一アミノ酸またはヌクレオチドミスマッチであるかのように重み付けされる。アライメントのための他の技術は、Methods in Enzymology、vol. 266: Macromolecular Sequence Analysis（1996）、ed. Doolittle、Academic Press、Inc.、Harcourt Brace & Co.、San Diego、California、USAの一部門。好ましくは、配列中のギャップを可能にするアラインメントプログラムを用いて配列を整列させる。Smith-Watermanは、配列アライメントのギャップを許すアルゴリズムの1つです。Meth. Mol. Biol. 70:173-187（1997）。また、Needleman and Wunschアラインメント法を用いるGAPプログラムを利用して配列を整列させることができる。別の検索方法では、MASPARコンピュータで実行されるMPSRCHソフトウェアが使用されます。

---

ENTREZ is available through the National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md . In one embodiment, the percent identity of two sequences can be determined by the GCG program with a gap weight of 1, e.g., each amino acid gap is weighted as if it were a single amino acid or nucleotide mismatch between the two sequences. Other techniques for alignment are described in Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA . Preferably, an alignment program that permits gaps in the sequence is utilized to align the sequences. The Smith-Waterman is one type of algorithm that permits gaps in sequence alignments. See Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997 ). Also, the GAP program using the Needleman and Wunsch alignment method can be utilized to align sequences. An alternative search strategy uses MPSRCH software, which runs on a MASPAR computer.

MPSRCHは、Smith-Watermanアルゴリズムを使用して、大規模並列コンピュータでシーケンスをスコアリングします。このアプローチは、遠くに関連するマッチを拾う能力を改善し、特に小さなギャップおよびヌクレオチド配列エラーに耐性がある。核酸にコードされたアミノ酸配列を用いて、タンパク質データベースとDNAデータベースの両方を検索することができる。個々の配列を有するデータベースは、Methods in Enzymology、ed. 上記のDoolittle。データベースには、Genbank、EMBL、およびDNAデータベース（DDBJ）が含まれます。



---

MPSRCH uses a Smith-Waterman algorithm to score sequences on a massively parallel computer. This approach improves ability to pick up distantly related matches, and is especially tolerant of small gaps and nucleotide sequence errors. Nucleic acid-encoded amino acid sequences can be used to search both protein and DNA databases. Databases with individual sequences are described in Methods in Enzymology, ed. Doolittle, supra. Databases include Genbank, EMBL, and DNA Database of Japan (DDBJ).

[0044]

ポリペプチドの「変異体」は、1つまたは複数のアミノ酸残基が改変されたポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。変異体は、類似の構造的または化学的性質（例えば、ロイシンとイソロイシンとの置換）を有する「保存的」変化を有し得る。変異体は、「非保存的」変化（例えば、グリシンのトリプトファンによる置換）を有し得る。類似の軽微な変異はまた、アミノ酸の欠失または挿入、またはその両方を含み得る。どのアミノ酸残基が生物学的活性または免疫学的活性を消失させることなく置換、挿入または欠失され得るかを決定するための指針は、当技術分野で周知のコンピュータプログラム、例えばLASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて見出すことができる。

---

A "variant" of a polypeptide refers to a polypeptide having the amino acid sequence of the polypeptide in which is altered in one or more amino acid residues. The variant may have "conservative" changes, wherein a substituted amino acid has similar structural or chemical properties (e.g., replacement of leucine with isoleucine). A variant may have "nonconservative" changes (e.g., replacement of glycine with tryptophan). Analogous minor variations may also include amino acid deletions or insertions, or both. Guidance in determining which amino acid residues may be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity may be found using computer programs well known in the art, for example, LASERGENE software (DNASTAR).

[0045]

用語「変異体」は、ポリヌクレオチド配列の文脈において使用される場合、特定の遺伝子またはそのコード配列のポリヌクレオチド配列に関連するポリヌクレオチド配列を包含し得る。この定義には、例えば、「対立遺伝子」、「スプライス」、「種」または「多型」変異体も含まれ得る。スプライス変異体は、参照分子と有意な同一性を有し得るが、一般に、mRNAプロセッシング中のエクソンの選択的スプライシングのために、より多いまたはより少ない数のポリヌクレオチドを有する。対応するポリペプチドは、さらなる機能的ドメインまたはドメインの不存在を有し得る。種変異体は、ある種から別の種に変化するポリヌクレオチド配列である。得られるポリペプチドは、一般に、互いに対して有意なアミノ酸同一性を有するであろう。多型変異は、特定の種の個体間の特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列における変異である。多型変異体はまた、ポリヌクレオチド配列が1つの塩基によって変化する「一塩基多型」（SNP）を包含し得る。

---

The term "variant," when used in the context of a polynucleotide sequence, may encompass a polynucleotide sequence related to that of a particular gene or the coding sequence thereof. This definition may also include, for example, "allelic," "splice," "species," or "polymorphic" variants. A splice variant may have significant identity to a reference molecule, but will generally have a greater or lesser number of polynucleotides due to alternate splicing of exons during mRNA processing. The corresponding polypeptide may possess additional functional domains or an absence of domains. Species variants are polynucleotide sequences that vary from one species to another. The resulting polypeptides generally will have significant amino acid identity relative to each other. A polymorphic variation is a variation in the polynucleotide sequence of a particular gene between individuals of a given species. Polymorphic variants also may encompass "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) in which the polynucleotide sequence varies by one base.

SNPの存在は、例えば、特定の集団、疾患状態、または疾患状態の傾向を示すことができる。

---

The presence of SNPs may be indicative of, for example, a certain population, a disease state, or a propensity for a disease state.

[0046]

本発明の方法および組成物による神経障害の治療または予防に用いることができる薬剤は、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NMNAT) またはNMNATをコードするポリヌクレオチドによって構成することができる。特に、作用物質は、NMNAT活性およびヒトNMNAT1と少なくとも50%の同一性、またはヒトNMNAT3と少なくとも50%の同一性、ヒトNMNAT1と少なくとも60%の同一性、またはヒトNMNAT3と少なくとも60%ヒトNMNAT1と少なくとも80%の同一性、またはヒトNMNAT3と少なくとも80%の同一性、ヒトNMNAT1と少なくとも90%の同一性、ヒトNMNAT1と少なくとも80%の同一性、または少なくとも90%の同一性、ヒトNMNAT1との少なくとも95%の同一性、またはヒトNMNAT3との少なくとも95%の同一性を有する。さらに、薬剤は、ヒトNMNAT1、ヒトNMNAT3、またはその保存的に置換された変異体で構成することができる。

---

An agent that can be used in treating or preventing a neuropathy in accordance with the methods and compositions of the present invention can be comprised by a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) or a polynucleotide encoding an NMNAT. In particular, the agent can be an enzyme having NMNAT activity and at least 50% identity with a human NMNAT1 or at least 50% identity with a human NMNAT3, at least 60% identity with a human NMNAT1 or at least 60% identity with a human NMNAT3, at least identity with a human NMNAT1 or at least 70% identity with a human NMNAT3, at least 80% identity with a human NMNAT1 or at least 80% identity with a human NMNAT3, at least 90% identity with a human NMNAT1 or at least 90% identity with a human NMNAT3, at least 95% identity with a human

NMNAT1 or at least 95% identity with a human NMNAT3. Moreover, the agent can be comprised by a human NMNAT1, a human NMNAT3 or a conservatively substituted variants thereof.

[0047]

作用物質はまた、ヒトNMNAT1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチド、少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチド、ヒトNMNAT1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド、または少なくとも70%ヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチド、またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチドとの同一性、少なくとも90%ヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも90%の同一性を有するポリヌクレオチド、少なくとも95%同一性を有するポリヌクレオチドヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドとを接触させることを含む。

---

The agent can also be comprised by a polynucleotide having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3, a polynucleotide having at least 60% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 60% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3, a polynucleotide having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3, a polynucleotide having at least 80% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 80% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3, a polynucleotide having at least 90%.identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 90% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3, a polynucleotide having at least 95% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 95% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3.

作用物質は、ヒトNMNAT1、ヒトNMNAT3またはその変異体をコードするポリヌクレオチドであってもよい。

---

The agent can also be a polynucleotide encoding a human NMNAT1, a human NMNAT3 or a variant thereof.

[0048]

薬剤は、サーチュインポリペプチドまたはサーチュインポリペプチドをコードする核酸を含むこ

ともできる。特に、作用物質は、SIRT活性およびヒトSIRT1と少なくとも50%の同一性、ヒトSIRT1と少なくとも60%の同一性、ヒトSIRT1と少なくとも70%の同一性、ヒトSIRT1と少なくとも80%の同一性、ヒトSIRT1と少なくとも90%の同一性、またはヒトSIRT1と少なくとも95%の同一性を有する。さらに、薬剤は、ヒトSIRT1またはその保存的に置換された変異体によって構成され得る。薬剤は、ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチド、ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチド、少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドヒトSIRT1をコードする核酸、ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレオチド、ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも90%の同一性を有するポリヌクレオチド、または少なくとも95%同一性を有するポリヌクレオチドヒトSIRT1をコードする核酸とハイブリダイズする。

---

The agent can also be comprise by a sirtuin polypeptide or a nucleic acid encoding a sirtuin polypeptide. In particular, the agent can comprise an enzyme having SIRT activity and at least 50% identity with a human SIRT1, at least 60% identity with a human SIRT1, at least 70% identity with a human SIRT1, at least 80% identity with a human SIRT1, at least 90% identity with a human SIRT1, or at least 95% identity with a human SIRT1. Moreover, the agent can be comprised by a human SIRT1 or a conservatively substituted variants thereof. The agent can also be comprised by a polynucleotide having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1, a polynucleotide having at least 60% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1, a polynucleotide having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1, a polynucleotide having at least 80% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1, a polynucleotide having at least 90% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1 or a polynucleotide having at least 95% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1.

さらに、薬剤は、ヒトSIRT1またはその変異体をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

---

Moreover, the agent can comprise a polynucleotide encoding a human SIRT1 or a variant thereof.

#### [0049]

眼内、腹腔内、腹腔内、髄腔内、気管内、子宮内、血管内、静脈内、膀胱内、鼻腔内、眼内、経口、腹腔内、腹腔内、腹腔内、直腸、脊髄皮下、舌下、局所、腔内、経皮、尿管、または尿道に投与することを含む。剤形は、計量エアロゾル、チュアブルバー、カプセル、被覆ペレットを含むカプセル、遅延放出ペレットを含有するカプセル、持続放出ペレットを含有するカプセル、濃縮物、クリーム、増強クリーム、坐薬クリーム、円盤、ドレッシング、エリクサー、エマルジョン、吸入剤、注射剤、注射用脂質複合体、注射用リポソーム、インサート、徐放性インサート、子宮内装置、腔内崩壊剤、腔内崩壊剤、ゼリー、液体、徐放性液体、ローション、増強ローション、シャンプーローション、オイル、軟膏、増強軟膏、ペースト、パスタジル、ペレット、粉末

、持続放出粉末、計量粉末、リング、シャンプー、石鹸溶液、スプレー、計量スプレー、座薬、懸濁液、懸濁液/滴、徐放性懸濁液、綿棒、シロップ、錠剤、顆粒剤、散剤、徐放性錠剤、発泡性錠剤、徐放性錠剤、口腔内崩壊錠、タンポン、テープまたはトローチ/ロゼンジの形態で投与することができる。

---

Administration can be by any suitable route of administration including buccal, dental, endocervical, intramuscular, inhalation, intracranial, intralymphatic, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrapleural, intrathecal, intratracheal, intrauterine, intravascular, intravenous, intravesical, intranasal, ophthalmic, oral, otic, biliary perfusion, cardiac perfusion, periodontal, rectal, spinal subcutaneous, sublingual, topical, intravaginal, transermal, ureteral, or urethral. Dosage forms can be aerosol including metered aerosol, chewable bar, capsule, capsule containing coated pellets, capsule containing delayed release pellets, capsule containing extended release pellets, concentrate, cream, augmented cream, suppository cream, disc, dressing, elixer, emulsion, enema, extended release fiber, extended release film, gas, gel, metered gel, granule, delayed release granule, effervescent granule, chewing gum, implant, inhalant, injectable, injectable lipid complex, injectable liposomes, insert, extended release insert, intrauterine device, jelly, liquid, extended release liquid, lotion, augmented lotion, shampoo lotion, oil, ointment, augmented ointment, paste, pastille, pellet, powder, extended release powder, metered powder, ring, shampoo, soap solution, solution for slush, solution/drops, concentrate solution, gel forming solution/drops, sponge, spray, metered spray, suppository, suspension, suspension/drops, extended release suspension, swab, syrup, tablet, chewable tablet, tablet containing coated particles, delayed release tablet, dispersible tablet, effervescent tablet, extended release tablet, orally disintegrating tablet, tampon, tape or troche/lozenge.

#### [0050]

眼内投与には、硝子体内注射、点眼薬および経強膜送達を含む注射による投与が含まれ得る。

---

Intraocular administration can include administration by injection including intravitreal injection, by eyedrops and by trans-scleral delivery.

#### [0051]

投与はまた、ヒトまたはコンパニオン動物のための機能性食品のような哺乳類の食餌に含めることによって可能である。

---

Administration can also be by inclusion in the diet of the mammal such as in a functional food for humans or companion animals.

#### [0052]

サーチイン活性を増加させる組成物を含む特定の製剤を経口投与することも考えられる。そのような製剤は、好ましくはカプセル化され、固体剤形で適切な担体と共に処方される。デンプン、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、メチルセルロース、メチルセルロース、タルク、マグネシウム、ステアリン酸塩、水、鉱物油などを含むが、これらに限定されない。製剤は、潤滑剤、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、保存剤、甘味剤または香味剤をさらに含むことができる。組成物は、当該分野で周知の手順を用いることにより、患者への投与後に活性成分の迅速、持続、または遅延放出を提供するように処方され得る。製剤は、タンパク質分解を減少させ、吸収を促進する物質、例えば界面活性剤を含有することもできる。

---

It is also contemplated that certain formulations containing the compositions that increase sirtuin activity are to be administered orally. Such formulations are preferably encapsulated and formulated with suitable carriers in solid dosage forms. Some examples of suitable carriers, excipients, and diluents include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starches, gum acacia, calcium phosphate, alginates, calcium silicate, microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose, gelatin, syrup, methyl cellulose, methyl- and propylhydroxybenzoates, talc, magnesium, stearate, water, mineral oil, and the like. The formulations can additionally include lubricating agents, wetting agents, emulsifying and suspending agents, preserving agents, sweetening agents or flavoring agents. The compositions may be formulated so as to provide rapid, sustained, or delayed release of the active ingredients after administration to the patient by employing procedures well known in the art. The formulations can also contain substances that diminish proteolytic degradation and promote absorption such as, for example, surface active agents.

#### [0053]

特定用量は、患者のおおよその体重または体表面積、または占有される体空間の体積に従って計算することができる。投与量はまた、選択された特定の投与経路に依存する。処置のための適切な投薬量を決定するために必要な計算のさらなる改良は、当業者によって日常的に行われる。このような計算は、特定の化合物について他の箇所に記載されているようなアッセイ調製物中の活性を考慮して、当業者により過度の実験をすることなく行うことができる（例えば、Howitzら、Nature 425 : 191-196,2003論文に付随する補足情報）。正確な投薬量は、標準的な用量応答試験と組み合わせて決定することができる。実際に投与される組成物の量は、処置すべき1つまたは複数の状態、投与される組成物の選択、年齢、体重、および応答を含む関連状況を考慮して、開業医によって決定されることが理解されるであろう患者の症状の重篤度、および選択された投与経路に依存する。

---

The specific dose can be calculated according to the approximate body weight or body surface area of the patient or the volume of body space to be occupied. The dose will also depend upon the particular route of administration selected. Further refinement of the calculations necessary

to determine the appropriate dosage for treatment is routinely made by those of ordinary skill in the art. Such calculations can be made without undue experimentation by one skilled in the art in light of the activity in assay preparations such as has been described elsewhere for certain compounds (see for example, Howitz et al., Nature 425:191-196, 2003 and supplementary information that accompanies the paper). Exact dosages can be determined in conjunction with standard dose-response studies. It will be understood that the amount of the composition actually administered will be determined by a practitioner, in the light of the relevant circumstances including the condition or conditions to be treated, the choice of composition to be administered, the age, weight, and response of the individual patient, the severity of the patient's symptoms, and the chosen route of administration.

#### [0054]

種々の実施形態において、本発明は、候補薬剤をスクリーニングする方法も提供する。そのようなアッセイ方法の1つでは、傷害された神経細胞の軸索変性を減少または予防する有効性について薬剤を試験する。したがって、候補薬剤は、損傷を受けた神経細胞に投与され、損傷した神経細胞の軸索変性の減少が検出される。典型的には、作用物質は損傷を生じさせる前に添加されるが、場合によっては、候補化合物の添加前に損傷を生じさせることができる。この方法はインビトロでインビボで実施することができる。栄養失調は、傷害が誘発される様々な実験条件下で、いくつかの哺乳動物の神経細胞のいずれかを用いて行うことができる。使用することができる哺乳動物ニューロン細胞型の例は、以下に記載するように、ニューロン細胞体の切断および除去、またはビンクリスチンを含有する培地中での増殖のいずれかによって傷害を受けた一次背根神経節細胞である。例えば、末梢神経再生のマウスモデル (Panら、J.Neurosci.23:11479-11488,2003) または進行性運動ニューロパチーのマウスモデル (Schmalbruch et al. ) のようなインタクトな動物において、J. Neuropathol.

---

In various embodiments, the present invention also provides methods of screening candidate agents. In one such assay method, agents are tested for effectiveness in decreasing or preventing axonal degeneration of injured neuronal cells. Candidate agents are thus administered to neuronal cells subjected to injury and a decrease in axonal degeneration of the injured neuronal cells is detected. Typically, the agent is added prior to producing the injury, however, in some instances, the injury can be produced before addition of the candidate compound. The method can be performed *in vitro* or *in vivo*. Their *in vitro* tests can be performed using any of a number of mammalian neuronal cells under a variety of experimental conditions in which injury is elicited. An example of mammalian neuronal cell-types that can be used are primary dorsal root ganglion cells injured by either transection and removal of the neuronal cell body or growth in media containing vincristine as described below. Their *in vivo* tests can be performed in intact animals such as, for example, a mouse model of peripheral nerve regeneration (Pan et al., J. Neurosci. 23:11479-11488, 2003) or mouse model of progressive motor neuronopathy (Schmalbruch et al., J. Neuropathol.

[13]

Exp. Neurol. 50 : 192-204,1991; Ferriら、Current Biol. 13 : 669-673,2003 )。

---

Exp. Neurol. 50:192-204, 1991 ; Ferri et al., Current Biol. 13:669-673, 2003 )。

[0055]

サーチュイン分子のNAD依存性ヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性の増加に起因するニューロン損傷を減少または防止する機構が存在するため、このアッセイ法は、サーチュイン活性を直接的に増加させる物質またはNADの増加による物質の主要なスクリーニングとしても用いることができるアクティビティ。したがって、上記の方法を用いて、NAD生合成活性を阻害する薬剤またはニューロンにおけるサーチュイン活性を増加させる薬剤をスクリーニングすることができる。

---

Because, the mechanism of decreasing or preventing neuronal injury results from an increase in NAD-dependent histone/protein deacetylase activity of sirtuin molecules, the assay method can also be used as a primary screen for substances that either increase sirtuin activity directly or through increasing NAD activity. Thus the methods above can be used to screen for agents that increase NAD biosynthetic activity or agents that increase sirtuin activity in neurons.

[0056]

サーチュイン分子をコードする核酸またはNADの生合成のための酵素のためのキャリアとして働く組換えベクターもまた、本発明の範囲内である。このような組換えベクターは、哺乳動物NMNAT1タンパク質またはSIRT1タンパク質などの哺乳動物サーチュインタンパク質をコードする配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むことができる。このような組換えベクターは、例えば、レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスなどの任意の適切なベクターであり得る。任意の適切なプロモーター、例えばユビキチンプロモーター、CMVプロモーターまたは  $\alpha$ -アクチンプロモーターを使用することもできる。

---

Recombinant vectors that serve as carriers for a nucleic acid encoding a sirtuin molecule or an enzyme for biosynthesis of NAD are also within the scope of the present invention. Such recombinant vectors can comprise a promoter operatively linked to a sequence encoding a mammalian NMNAT1 protein or a mammalian sirtuin protein such as a SIRT1 protein. Such recombinant vectors can be any suitable vector such as, for example a lentivirus or an adeno-associated virus. Any suitable promoter can be also used such as, for example a ubiquitin promoter, a CMV promoter or a  $\alpha$ -actin promoter.

[0057]



本発明は、以下の実施例を参照することによってさらに理解することができる。

---

The invention can be further understood by reference to the examples which follow.

#### 実施例1

---

##### EXAMPLE 1

##### [0058]

この実施例は、Wldタンパク質を発現するベクターでトランスフェクションされたニューロンから切断された軸索が、制御ニューロンと比較して遅延変性を示すことを実証する。

---

This example demonstrates that transected axons from neurons transfected with a vector expressing Wld protein show a delayed degeneration compared to control neurons.

##### [0059]

マウスには、軸索損傷に応答するWallerian変性が遅れていることが示されている (Gillingwaterら、JPhysiol、534 : 627-639、2001)。遺伝学的分析により、この突然変異はキメラ核分子 (Wldタンパク質) の過剰発現をもたらす85kbのタンデムトリプケーションを含むことが示された。このタンパク質は、NADを生成するNADサルベージ経路の酵素であるニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ1 (NMNAT1) の完全配列に融合されたUfd (ユビキチン融合分解タンパク質) 2aのN末端70AAs、ユビキチン鎖構築因子核内にある。Wldタンパク質はNMNAT活性を有するが、ユビキチンリガーゼ機能を欠いており、軸索保護がNMNAT1活性の増加またはUfd2a機能の「優性阻害」のいずれかに由来することを示唆している。

---

In wld mice, Wallerian degeneration in response to axonal injury has been shown to be delayed ( Gillingwater, et al., JPhysiol, 534:627-639, 2001 ). Genetic analysis has shown that the wld mutation comprises an 85 kb tandem triplication, which results in overexpression of a chimeric nuclear molecule (Wld protein). This protein is composed of the N-terminal 70 AAs of Ufd (ubiquitin fusion degradation protein) 2a, a ubiquitin chain assembly factor, fused to the complete sequence of nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 1 (NMNAT1), an enzyme in the NAD salvage pathway that generates NAD within the nucleus. The Wld protein has NMNAT activity but lacks ubiquitin ligase function, suggesting that axonal protection is derived from either increased NMNAT1 activity or a 'dominant negative' inhibition of Ufd2a function.

##### [0060]

Wldタンパク質によって媒介される遅延軸索変性のメカニズムを同定するために、我々はin vitro in vitro縮退モデルを用いた。一次DRG外植片ニューロンを適切なタンパク質を発現するレンチウイルスに感染させ、ニューロン細胞体の除去（切断）またはビンクリスチン（毒性）中の増殖により軸索を傷つけた。

---

To identify the mechanism of delayed axonal degeneration mediated by the Wld<s>protein, we employed an in-vitro Wallerian degeneration model. Primary DRG explant neurons were infected with lentivirus expressing the appropriate proteins, and axons were injured by either removal of the neuronal cell body (transection) or growth in vincristine (toxic).

[2]

レンチウイルス発現構築物は、D. Baltimore (Loisら、Science 295 : 868-72,2002) によって親切に提供された。我々は、興味のある遺伝子を発現する細胞において増強されたYFP発現を可能にする一般的な発現シャトルFUIV (ユビキチンプロモーター - 目的遺伝子-IRES増強YFP (Venus) ベクター) ベクターを生成するようにFUGWベクターを改変した。C末端にヘキサヒスチジンタグをそれぞれ有する以下のタンパク質をFUIVベクター：Wld sキメラ突然変異タンパク質にクローニングした。野生型Ufd2a機能を「ドミナントネガティブ」(Ufd2a (P1140)) として阻害することが以前に示されている点突然変異 (P1140A) を含むUfd2a。以下の遺伝子をFUGWベクターにクローニングした：1) 核を有するEGFP (Ufd2a (1-70) -EGFP) またはEGFPのN末端に融合したUfd2a (Wldタンパク質に含まれる部分) の最初の70個のAAs C末端の局在化シグナル (Ufd2a (1-70) -nucEGFP)。2) EGFPのC末端に融合したWldタンパク質のNMNAT1部分 (EGFP-NMNAT1)。

---

Lentiviral expression constructs were kindly provided by D. Baltimore (Lois, et al., Science 295:868-72, 2002). We modified the FUGW vector to generate a general expression shuttle FUIV (ubiquitin promoter - gene of interest-IRES-enhanced YFP (Venus)) vector that enables enhanced YFP expression in cells that express the gene-of-interest. The following proteins, each with a hexahistidine tag at the C-terminus, were cloned into the FUIV vector: Wld<s>chimeric mutant protein; Ufd2a containing a point mutation (P1140A), which has previously been shown to inhibit wild-type Ufd2a function as a "dominant-negative"(Ufd2a(P 1140)). The following genes were cloned into FUGW vector: 1) The first 70 AAs of Ufd2a (the portion contained in Wld<s>protein) fused to the N-terminus of EGFP (Ufd2a(1-70)-EGFP) or EGFP with nuclear localization signal at the C-terminal (Ufd2a(1-70)-nucEGFP). 2) The NMNAT1 portion of Wld<s>protein fused to the C-terminus of EGFP (EGFP-NMNAT1).

[0062]

Ufd2a / Ube4b (mKIAA0684) のネズミcDNAは、Kazusa DNA Research Instituteから提供された。NMNAT1 (受入番号：BC038133) のマウスcDNAは、ATCCから購入した。PCR媒介突然変異誘発を使用して、Ufd2a、NMNAT1およびWldsにおける点突然変異を生成した。

---

The murine cDNA for Ufd2a/Ube4b (mKIAA0684) was provided by Kazusa DNA Research Institute. Murine cDNAs for NMNAT1 (accession number: BC038133) were purchased from ATCC. PCR-mediated mutagenesis was used to generate point mutations in Ufd2a, NMNAT1 and Wld<s>.

#### [0063]

本発明者らは、ユビキチンプロモーターおよびGFP cDNAをヒトU6プロモーターおよびPol I終止シグナルで置換し、続いてSV40プロモーター - ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を置換することにより、FUGWバックボーンから生成されたFSP-siベクター中にsiRNA構築物を作製した。 siRNA構築物のクローニングは、siRNAがU6プロモーター (Castanottoら、RNA、8 : 1454-60,2002) から転写されるように、以前に記載されたように実施した。 siRNAのタンパク質発現のダウンレギュレーションに使用された配列は、SIRT1の1692-1710、SIRT2の1032-1050,513-556、SIRT4の1231-1249、SIRT5の37-55,1390-1408のSIRT6、および450-468のSIRT7。 各レンチウイルス発現およびsiRNA構築物の完全性は、DNA配列決定によって確認した。

---

We generated siRNA constructs in the FSP-si vector generated from the FUGW backbone by replacing the ubiquitin promoter and GFP cDNA with the human U6 promoter and Pol I termination signal followed by the SV40 promoter-puromycin-N-acetyl-transferase gene. Cloning of siRNA construct was performed as described previously, so that the siRNA is transcribed from the U6 promoter ( Castanotto, et al., RNA, 8:1454-60, 2002 ). Sequences used for siRNA downregulation of protein expression were 1692-1710 of SIRT1, 1032-1050 of SIRT2, 538-556 of SIRT3, 1231-1249 of SIRT4, 37-55 of SIRT5, 1390-1408 of SIRT6, and 450-468 of SIRT7. The integrity of each lentiviral expression and siRNA construct was confirmed by DNA sequencing.

#### [0064]

E12.5胚由来のマウスDRG外植片を、1nMの神経成長因子の存在下で培養した。 培養培地に5-フルオロウラシルを添加することにより、非神経細胞を培養物から除去した。 神経突起の切断は、神経細胞体を除去するために18ゲージ針を用いて10~20DIVで行った。 -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Sigma) またはSirtinol (Calbiochem) とのインキュベーションは、本文または図に示される条件を用いて行った。

---

Mouse DRG explants from E12.5 embryos were cultured in the presence of 1 nM nerve growth factor. Non-neuronal cells were removed from the cultures by adding 5-fluorouracil to the culture medium. Transection of neurites was performed at 10-20 DIV using an 18-gauge needle to remove the neuronal cell bodies. Incubation with -nicotinamide adenine dinucleotide (Sigma) or Sirtinol (Calbiochem) was performed using conditions indicated in the text or figures.

#### [0065]

レンチウイルス発現ベクターは、上記のようにHEK293T細胞を用いて作製した。レンチウイルス由来タンパク質発現の確認のために、HEK293T細胞をレンチウイルスに感染させ、細胞を感染の3日後に溶解させた。これらの溶解産物を、抗Hisタグモノクローナル抗体 (Qiagen) を用いてイムノブロットにより分析して、それぞれのヘキサヒスチジンタグ付きタンパク質の発現を検出した。DRGニューロンのレンチウイルス感染は、約 $10^6 \sim 10^7$  pfu / mlのウイルスをDRG外植体と共に24時間、軸索切断の3-7日前からインキュベートすることによって実施した。感染したニューロンを倒立蛍光顕微鏡下で検査して、ニューロンの> 95%において検出可能なレンチウイルス媒介導入遺伝子発現を確実にした。

---

Lentiviral expression vectors were generated using HEK293T cells as described above. For confirmation of lentivirus-derived protein expression, HEK293T cells were infected with lentivirus and cells were lysed 3 days after infection. These lysates were analyzed by immunoblot to using anti-His tag monoclonal antibody (Qiagen) to detect expression of the respective hexahistidine-tagged proteins. Lentiviral infection of DRG neurons was performed by incubating  $\sim 10^6 \sim 10^7$  pfu/ml virus with the DRG explant for 24 h beginning 3-7 days prior to axonal transection. The infected neurons were examined under an inverted fluorescent microscope to insure detectable lentivirus-mediated transgene expression in >95% of neurons.

#### [0066]

軸索変性の定量分析は、以前に記載されているように行った (Zhaiら、Neuron 39 : 217-25、2003)。簡潔には、示された時間に位相差顕微鏡法を用いて培養物を検査した。断片化された非屈折性外面を有する軸索を「変性」と命名した。「各時点で、少なくとも200個の一意に識別可能な軸索が、各培養物のいくつかのランダムに撮影された画像から盲目的に採点された。各条件を、各実験において3回の外植片で試験した。結果は、各条件について2-4の独立した実験から得られた。統計分析はスチューデントT検定によって行った。神経突起で覆われた領域の計算のために、2つの独立した実験の4つのサンプルからのデジタル捕捉画像を分析3.1ソフトウェア (Soft Imaging System、CO、Lakewood) を用いて分析した。

---

Quantitative analysis of axonal degeneration was performed as previously described ( Zhai, et al., Neuron 39:217-25, 2003 ). Briefly, the cultures were examined using phase contrast microscopy at the indicated times. Axons with a fragmented, non-refractile appearance were designated as "degenerated. " At each time point, at least 200 singly distinguishable axons were blindly scored from several randomly taken images of each culture. Each condition was tested in triplicate explants in each experiment. Results were obtained from 2-4 independent experiments for each condition. Statistical analysis was performed by Student's T test. For calculations of neurite-covered area, digitally captured images from quadruplicate samples of two independent experiments were analyzed using analysis 3.1 software (Soft Imaging System, Lakewood, CO).

[0067]

本発明者らは、図2に示すように、Wld sタンパク質を発現するニューロンから切断された軸索が、wld sに由来するニューロンの遅い動力学特性で変性されていることを見出した ( Buckmasterら、Eur J Neurosci 7 : 1596-602,1995 ) 1A。

---

We found that transected axons from neurons expressing the Wld<s>protein degenerated with the delayed kinetics characteristic of neurons derived fromwld<s>( Buckmaster, et al., Eur J Neurosci 7:1596-602,1995 ) mice as shown in Figure 1A .

[0068]

次に、Wldタンパク質を過剰発現するニューロンにおける切断後の軸索変性を、EGFPに結合したWldタンパク質を構成するUfd2aまたはNMNAT1部分を発現するものと比較した。結果を図1Bに示す。

---

Next, we compared axonal degeneration after transection in neurons that overexpress Wld<s>protein with those that express the Ufd2a or NMNAT1 portions that make up the Wld<s>protein linked to EGFP. Results are shown in Figure 1B .

[0069]

本発明者らは、EGFP-NMNAT1の発現が、Wldタンパク質自体に匹敵する軸索変性を遅延させる一方で、核または細胞質を標的とするUfd2aのN末端70AA (EGFPに融合した) が軸索変性に影響しないことを見出した。これらの効果の定量は、神経細胞体の除去後の様々な時点での残りの神経突起の割合を計数することによって行った。この分析は、Wldタンパク質自体のようなEGFP-NMNAT1が、損傷後72時間でインタクトな神経突起の> 10倍の増加をもたらしたことを示した。Wldタンパク質による軸索保護におけるUPSの直接関与をさらに排除するために、ドミナントネガティブUfd2a突然変異体またはUfd2a siRNA構築物のいずれかをを用いたUfd2a阻害の効果を調べた。しかしながら、これらの方法のいずれも、軸索切開に应答して軸索の遅延を遅延させなかった。一緒に、これらの実験は、Wldタンパク質のNMNAT1部分が、インビボで観察された遅延軸索変性に関与することを実証した。

---

We found that expression of EGFP-NMNAT1 delayed axonal degeneration comparable to Wld<s>protein itself, whereas the N-terminal 70 AA of Ufd2a (fused to EGFP), either targeted to the nucleus or cytoplasm, did not affect axonal degeneration. Quantification of these effects was performed by counting the percentage of remaining neurites at various times after removal of neuronal cell bodies. This analysis showed that EGFP-NMNAT1, like Wld<s>protein itself, resulted in a >10-fold increase in intact neurites 72 hr after injury. To further exclude direct involvement of the UPS in Wld<s>protein-mediated axonal protection, we examined the effect of Ufd2a

inhibition using either a dominant-negative Ufd2a mutant or an Ufd2a siRNA construct. However, neither of these methods resulted in delayed axonal degradation in response to axotomy. Together, these experiments demonstrated that the NMNAT1 portion of the Wld<s>protein is responsible for the delayed axonal degeneration observed in wld<s>mice.

## 例2

---

### EXAMPLE 2

#### [0070]

この実施例は、全長NMNAT1およびWld sタンパク質における突然変異が、タンパク質の軸索保護効果を無効にすることを示す。

---

This example shows that mutations in the full length NMNAT1 and in Wld<s>protein abolish the axonal protective effects of the proteins.

#### [2]

NMNAT1は、ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) およびニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) のNADおよびニコチン酸アデニンモノヌクレオチド (NaAD) への変換を触媒する核NADサルベージ経路の酵素である。NMNAT1過剰発現ニューロンで観察される軸索保護は、NAD (すなわち、その酵素活性) を合成する能力、または恐らくこのタンパク質の他の未知の機能によって媒介され得る。この問題に取り組むために、我々は基質結合に関与すると予想されるいくつかの残基を同定するためにNMNAT1結晶構造を用いた。これらの残基の1つ (W170A) における突然変異を全長NMNAT1およびWldSタンパク質に操作した。インビトロ酵素アッセイは、これらの変異体タンパク質の両方がNADを合成する能力が著しく制限されていることを確認した (2A)。これらの突然変異体およびそれらのそれぞれの野生型対応物のそれぞれをニューロンに導入して、軸索を分解から保護する能力を評価した。我々は、これらの酵素的に不活性な突然変異体を発現するニューロンは、軸索保護効果を有さないことを見出した (図4)。

---

NMNAT1 is an enzyme in the nuclear NAD salvage pathway that catalyzes the conversion of nicotinamide mononucleotide (NMN) and nicotinate mononucleotide (NaMN) to NAD and nicotinate adenine mononucleotide (NaAD), respectively. The axonal protection observed in NMNAT1 overexpressing neurons could be mediated by its ability to synthesize NAD (i.e. its enzymatic activity), or perhaps, by other unknown functions of this protein. To address this question, we used the NMNAT1 crystal structure to identify several residues predicted to participate in substrate binding. A mutation in one of these residues (W170A) was engineered into full length NMNAT1 and Wld<s>protein. In vitro enzymatic assays confirmed that both of these mutant proteins were severely limited in their ability to synthesize NAD ( Fig. 2A ). Each of

these mutants and their respective wild type counterparts were introduced into neurons to assess their ability to protect axons from degradation. We found that neurons expressing these enzymatically inactive mutants had no axonal protective effects ( Fig.

[2]

2A)、これは、NAD / NaAD産生がNMNAT1の軸索分解を防止する能力の原因であることを示している。

---

2A), indicating that NAD/NaAD-production is responsible for the ability of NMNAT1 to prevent axonal degradation.

### 実施例3

---

#### EXAMPLE 3

[0072]

この実施例は、ビンクリスチンで傷害されたニューロンにおけるNMNAT活性の増加が、軸索の遅延の遅延を示すことを示す。

---

This example illustrates that increased NMNAT activity in neurons injured with vincristine also show a delayed axonal degradation.

[2]

機械的切断に加えて、軸索保護インビボマウスは、虚血および毒素のような他の損傷物質に対しても観察される (Colemanら、Trends Neurosci 25 : 532-37,2002; Gillingwaterら、J Cereb Blood Flow Metab 24 : 62-66,2004)。我々は、増加したNMNAT活性が、よく特徴付けられた軸索毒性を有する癌化学療法試薬であるビンクリスチンのような他のタイプの軸索損傷にตอบสนองして軸索分解を遅延させるかどうかを調べようとした。NMNAT1またはEGFP (コントロール)のいずれかを発現するニューロンを、0.5  $\mu$ Mビンクリスチン中で9日間まで増殖させた。本発明者らは、NMNAT1を発現するニューロンの軸索は、元の長さおよび屈折性を維持したが、EGFPを発現するニューロンから出現する軸索は徐々に収縮し、9日目までにほとんど退化したことを見出した。2B)。これらの結果は、NMNAT活性自体が軸索を多数の傷害から保護し、マウスに観察される防御効果を媒介することができることを示している。

---

In addition to mechanical transection, axonal protection in wild mice is also observed against other damaging agents such as ischemia and toxins (Coleman, et al., Trends Neurosci 25:532-37, 2002 ; Gillingwater, et al., J Cereb Blood Flow Metab 24:62-66, 2004 ). We sought to determine

whether increased NMNAT activity would also delay axonal degradation in response to other types of axonal injury such as vincristine, a cancer chemotherapeutic reagent with well-characterized axonal toxicity. Neurons expressing either NMNAT1 or EGFP (control) were grown in 0.5 $\mu$ M vincristine for up to 9 d. We found that axons of neurons expressing NMNAT1 maintained their original length and refractility, whereas axons emanating from neurons expressing EGFP gradually retracted and had mostly degenerated by day 9 ( Fig. 2B ). These results indicate that NMNAT activity by itself can protect axons from a number of insults and mediate the protective effects observed in wild mice.

#### 例4

---

#### EXAMPLE 4

#### [0074]

この実施例は、外因的に投与されたNADが軸索変性から損傷したニューロンを保護し得ることを示す。

---

This example shows that exogenously administered NAD can protect injured neurons from axonal degeneration.

#### [3]

以前の実験は、ニューロン細胞が、細胞外NADと結合して細胞に輸送することができる膜タンパク質を発現することを示している ( Bruzzoneら、Faseb J 15 : 10-12,2001 )。これは、外因的に投与されたNADが軸索変性を予防できるかどうかを調べることを我々に奨励した。軸索切断の前にニューロン培養物に種々の濃度のNADを添加し、軸索分解の程度を調べた。我々は、外因的に適用されたNADは、レンチウイルス媒介性のNMNAT1発現よりも軸索を保護するのにわずかにあまり効果的ではなかったが、軸索切断の24時間前に0.1-1mMのNADを添加すると軸索変性を有意に遅延させることを見出した。3A )。これらの結果は、NAD供給の増加が軸索の分解を防ぐことができるという考えを直接的に支持する。

---

Previous experiments have shown that neuronal cells express membrane proteins that can bind and transport extracellular NAD into the cell ( Bruzzone, et al., Faseb J 15:10-12, 2001 ). This encouraged us to investigate whether exogenously administered NAD could prevent axonal degeneration. We added various concentrations of NAD to neuronal cultures prior to axonal transection and examined the extent of axonal degradation. We found that 0.1-1 mM NAD added 24 hr prior to axotomy significantly delayed axonal degeneration, although exogenously applied NAD was slightly less effective in protecting axons than lentivirus mediated NMNAT1 expression ( Fig. 3A ). These results provide direct support for the idea that increased NAD supply can



prevent axonal degradation.

## 実施例5

---

### EXAMPLE 5

#### [0076]

この例は、負傷したニューロンを軸索変性から保護するためにニューロン細胞体を除去する前にNADが必要であることを示している。

---

This example illustrates that NAD was required prior to the removal of the neuronal cell bodies to protect the injured neurons from axonal degeneration.

#### [3]

NAD依存性軸索保護 (NDAP) の機構についての洞察を得るために、我々は、神経細胞体の除去前にNADが必要かどうか、または切断された軸索を高レベルのNADに直接曝露して保護 (イチジク。3B)。ニューロン培養物を調製し、軸索切断の時点で、または損傷の前に様々な時間 (4-48時間) に、1mM NADを培地に添加した。

---

To gain insights into the mechanism of NAD-dependent axonal protection (NDAP), we examined whether NAD was required prior to the removal of the neuronal cell bodies, or whether direct exposure of the severed axons to high levels of NAD was sufficient to provide protection ( Fig. 3B ). Neuronal cultures were prepared and 1 mM NAD was added to the culture medium at the time of axonal transection or at various times (4 to 48 hr) prior to injury.

#### [0078]

我々は、軸索切断の時点で、または傷害の8時間前までにNADを投与すると、軸索に対して保護効果がないことを見出した。しかし、損傷前にニューロンをNADと共に長期間インキュベートした場合、有意な軸索予備作用が観察され、少なくとも24時間のNAD前処置後に最大の効果が起こった。これらの結果は、NAD依存性軸索保護 が、軸索自体の中での急速な翻訳後修飾である。

---

We found that administering NAD at the time of axonal transection or, for up to 8 hr prior to injury, had no protective effects on axons. However, significant axon sparing was observed when neurons were incubated with NAD for longer periods of time prior to injury, with the greatest effects occurring after at least 24 h of NAD pre-treatment, These results indicate that NAD dependent axonal protection is not mediated by a rapid post-translational modification within the axons themselves.

[0079]

損傷に応答した軸索分解を予防するためにインタクトなニューロンのNADへの長期暴露に対する必要条件は、保護プロセスが非転写および/または翻訳事象を必要とすることを示唆する。興味深いことに、Wldタンパク質とNMNAT1の両方が核内に位置している（データは示していない）。同様に、酵母でNADサルベージ経路を構成するほとんどの酵素もまた、核内で区画化される。本発明者らは、感受性マイクロスケール酵素アッセイ（Szaboら、Proc Natl Acad Sci USA、93：1753-58,1996）を用いて野生型およびNMNAT1発現DRGニューロンにおけるNADレベルを比較したが、全体の細胞NADレベルの変化は見られなかったデータは示されていない）。これは、この核の活性化がNADの全レベルを変化させなかった酵母における観察と同様である（Andersonら、J Biol Chem、277：18881-90,2002; Huhら、Nature、425：686-91,2003）。さらに、野生型マウスおよび野生型マウスの脳における組織NADのレベルは、野生型マウスにおけるNMNAT活性のレベルの増加にも似ている（Mackら、Nat Neurosci、4：1199-206、2001）。

---

The requirement for extended exposure to NAD of the intact neurons to prevent axonal degradation in response to injury suggests that the protective process requires de novo transcriptional and/or translational events. Interestingly, both the Wld protein and NMNAT1 are located within the nucleus (data not shown). Similarly, most enzymes that make up the NAD salvage pathway in yeast are also compartmentalized in the nucleus. We compared NAD levels in wild type and NMNAT1 expressing DRG neurons using sensitive microscale enzymatic assays ( Szabo, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93:1753-58 ,1996 ), however no changes in overall cellular NAD levels were found (data not shown). This is similar to observations in yeast, in which activation of this nuclear pathway did not change overall levels of NAD ( Anderson, et al., J Biol Chem, 277:18881-90,2002 ; Huh, et al., Nature, 425:686-91, 2003 ). Furthermore, levels of tissue NAD in the brains of wild type and wld mice are similar despite the increased levels of NMNAT activity in wld mice ( Mack, et al., Nat Neurosci, 4:1199-206, 2001 ).

これらのデータは、細胞質NAD依存性プロセスとは対照的に、核におけるNAD依存性酵素活性が、増加したNMNAT活性に応答して観察される軸索保護を媒介するようであることを示唆する。

---

These data suggest that an NAD-dependent enzymatic activity in the nucleus, as opposed to cytoplasmic NAD-dependent processes, is likely to mediate the axonal protection observed in response to increased NMNAT activity.

実施例6

---

EXAMPLE 6

[0080]

この実施例は、Sir2の阻害がNAD依存性軸索保護 に関与することを示す。

---

This example shows that inhibition of Sir2 is involved in NAD-dependent axonal protection.

[0081]

タンパク質デアセチラーゼおよびポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)のSir2ファミリーは、主要なNAD依存性核酵素活性である。Sir2は、ヒストンおよび他のタンパク質のNAD依存性脱アセチル化酵素であり、その活性化は、酵母およびC.エレガンスにおける寿命の延長を促進するための中心である(Bittermanら、Microbiol Mol Biol Rev、67:376-99,2003; Hekimi、et al.、Science 299:1351-54,2003)。PARPはDNA損傷によって活性化され、DNA修復に関与する(S.D. Skaper、Ann NYAcad Sci、993:217-28および287-88,2003)。これらの酵素、特にSir2タンパク質は、カロリー制限と老化プロセスへの影響との間の潜在的な関連性を提供するため、近年大きな関心を集めている。遺伝子活性の調節におけるこれらのNAD依存性酵素の重要性は、軸索分解の自己破壊的過程におけるそれらの役割を調べることを促した。したがって、我々は、Sir2(Sirtinol)およびPARP(3-アミノベンズアミド(3AB))の阻害剤がNAD依存性軸索保護(NDAP)に影響を及ぼし得るかどうかを試験した。

---

The Sir2 family of protein deacetylases and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) are the major NAD-dependent nuclear enzymatic activities. Sir2 is an NAD-dependent deacetylase of histones and other proteins, and its activation is central to promoting increased longevity in yeast and *C. elegans* (Bitterman, et al., Microbiol Mol Biol Rev, 67:376-99, 2003 ; Hekimi, et al., Science 299:1351-54, 2003 ). PARP is activated by DNA damage and is involved in DNA repair ( S.D. Skaper, Ann NYAcad Sci, 993:217-28 and 287-88, 2003 ). These enzymes, in particular the Sir2 proteins, have generated great interest in recent years as they provide a potential link between caloric restriction and its effects on the ageing process. The importance of these NAD-dependent enzymes in regulating gene activity, prompted us to investigate their role in the self-destructive process of axonal degradation. We therefore tested whether inhibitors of Sir2 (Sirtinol) and PARP (3-aminobenzamide (3AB)) could affect NAD-dependent axonal protection (NDAP) ( Fig.

[4]

4A)。ニューロンを、1mMのNADおよびSirtinol(100μM)または3AB(20mM)のいずれかの存在下で培養した。軸索切断は、神経細胞体の除去によって実施され、軸索分解の程度は、12~72時間後に評価された。我々は、SirtinolがNDAPを効果的にブロックし、Sir2タンパク質がこのプロセスのエフェクターである可能性があることを示した。対照的に、3ABはNDAPに影響を及ぼさず、PARPは軸索保護において役割を果たさないことを示している。NDPにおけるSir2タンパク質の役割をさらに調べるために、Sir2活性を増強するポリフェノール化合物であるレスベ

ラトロール (10 ~ 100  $\mu$ M) の効果を試験した (Howitzら、Nature、425 : 191-96,2003)。私たちは、軸索切開前にレスベラトロールで治療したニューロンは、NADを用いて得られたものに匹敵する軸索分解の低下を示したことを見出した。4A)、Sir2タンパク質が増加したNMNAT活性によって媒介される軸索保護のエフェクターであるという考えをさらに支持する。

---

4A). Neurons were cultured in the presence of 1 mM NAD and either Sirtinol (100  $\mu$ M) or 3AB (20 mM). Axonal transection was performed by removal of the neuronal cell bodies and the extent of axonal degradation was assessed 12 to 72 hr later. We found that Sirtinol effectively blocked NDAP, indicating that Sir2 proteins are likely effectors of this process. In contrast, 3AB had no effect on NDAP, indicating that PARP does not play a role in axonal protection. To further examine the role of Sir2 proteins in NDAP, we tested the effects of resveratrol (10-100 $\mu$ M), a polyphenol compound that enhances Sir2 activity ( Howitz, et al., Nature, 425:191-96, 2003 ). We found that neurons treated with resveratrol prior to axotomy showed a decrease in axonal degradation that was comparable to that obtained using NAD ( Fig. 4A ), providing further support for the idea that Sir2 proteins are effectors of the axonal protection mediated by increased NMNAT activity.

#### 実施例7

---

#### EXAMPLE 7

[0082]

この実施例は、SIRT1がNAD依存性軸索保護 に関与していることを示している。

---

This example shows that SIRT1 is involved in NAD-dependent axonal protection.

[4]

ヒトおよびげっ歯類では、Sir2保存ドメイン (サーチュイン (SIRT) 1-7) を共有する7つの分子が同定されているが、これらのタンパク質のいくつかはヒストン/タンパク質デアセチラーゼ活性を有さないようである (Buckら、J Leukoc Biol、S0741-5400,2004)。SIRT1は核内に局在しており、クロマチンリモデリングおよびp53などの転写因子の調節に関与している (J. Smith、Trends Cell Biol、12 : 404-406、2002)。他のSIRTタンパク質の細胞位置はあまり明確ではないが、いくつかは細胞質およびミトコンドリアで見出されている。どのSIRTタンパク質がNAD依存性軸索保護 に関与するかを決定するために、我々は、SIRTファミリーの各メンバーを特異的に標的とするsiRNA構築物を用いてノックダウン実験を行った。ニューロンは、意図された標的の発現を効果的に抑制する特異的なSIRT siRNA構築物を発現するレンチウイルスに感染させた。4B)。感染したニューロンを1mMのNAD中で培養し、細胞体を除去することによって軸索切断を行った。

---

In humans and rodents, seven molecules sharing Sir2 conserved domain (sirtuin (SIRT)1 through 7) have been identified, although some of these proteins do not appear to have histone/protein deacetylase activity ( Buck, et al., J Leukoc Biol, S0741-5400, 2004 ). SIRT1 is located in the nucleus and is involved in chromatin remodeling and the regulation of transcription factors such as p53 ( J. Smith, Trends Cell Biol, 12:404-406, 2002 ). The cellular location of other SIRT proteins is less clear, but some have been found in the cytoplasm and in mitochondria. To determine which SIRT protein(s) is involved in NAD-dependent axonal protection, we performed knockdown experiments using siRNA constructs to specifically target each member of the SIRT family. Neurons were infected with lentiviruses expressing specific SIRT siRNA constructs that effectively suppressed expression of their intended target ( Fig. 4B ). The infected neurons were cultured in 1 mM NAD and axonal transection was performed by removing the cell bodies.

#### [4]

我々は、SIRT1 siRNA構築物が、Sirtinol阻害剤としてのNADの軸索保護効果を阻害するのと同様に有効であることを見出した。対照的に、他のSIRTタンパク質の阻害は、NDAPに有意な影響を及ぼさなかった(図3)。4B)。これらの結果は、SIRT1が、軸索の自己破壊を効果的に防止するNAD供給の増加の主要なエフェクターであることを示している。SIRT1は軸索の安定性に直接関与するタンパク質を脱アセチル化する可能性はあるが、効果的な保護のために損傷の前にNAD-24時間を必要とすることから、SIRT1が軸索保護をもたらす遺伝子プログラムを調節することが示唆される。

---

We found that the SIRT1 siRNA construct was just as effective at blocking the axonal protective effects of NAD as the Sirtinol inhibitor. In contrast, inhibition of the other SIRT proteins did not have significant effects on NDAP ( Fig. 4B ). These results indicate that SIRT1 is the major effector of the increased NAD supply that effectively prevents axonal self destruction. Although, SIRT1 may deacetylate proteins directly involved in axonal stability, its predominantly nuclear location, along with the requirement for NAD -24 hr prior to injury for effective protection, suggest that SIRT1 regulates a genetic program that leads to axonal protection.

#### [0084]

軸索変性は、損傷後および化学療法に反応するだけでなく、老化、糖尿病性ニューロパチーなどの代謝性疾患、および神経変性疾患と関連して観察される活性な自己破壊現象である。本発明者らの結果は、NADサルベージ経路の活性増強およびその結果としてのヒストン/タンパク質デアセチラーゼSIRT1の活性化に起因するNADの供給の増加によるものであることを、その軸索保護の分子機構が示している。

---

Axonal degeneration is an active, self-destructive phenomenon observed not only after injury and in response to chemotherapy, but also in association with aging, metabolic diseases such as

diabetic neuropathy, and neurodegenerative diseases. Our results indicate that the molecular mechanism of axonal protection in the wild mice is due to the increased supply of NAD resulting from enhanced activity of the NAD salvage pathway and consequent activation of the histone/protein deacetylase SIRT1.

#### 実施例8-11

---

#### EXAMPLES 8-11

#### [0085]

実施例8～11では以下の材料および方法を使用した。

---

The following Materials and Methods were used in Examples 8-11.

#### [0086]

発現プラスミドの構築および突然変異誘発。Herculase (Stratagene) を用いてネズミニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ3 (NMNAT3) のネズミNMNAT1およびBC005737のESTクローンBC038133からNAD合成酵素のコード領域をPCR増幅した。ヒトNADシンターゼ (QNS) ヘキサヒスチジンタグ付きcDNAは、N.Hara博士 (島根大学、島根、日本) によって提供された。各cDNAの3'末端にヘキサヒスチジンタグを付加した。PCR媒介部位特異的突然変異誘発により、NMNAT1細胞質ゾル突然変異体 (cytNMNAT1) を生成した。NMNAT3の核型 (nucNMNAT3) は、NMNAT3のC末端に核局在化シグナルを付加することによって生成された。各PCR増幅されたNAD合成酵素断片を、前述のようにFCIVレンチウイルスシャトルベクターにクローニングした。TaqDyeDeoxyターミネーターサイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems) およびApplied Biosystems 373 DNAシーケンサーを用いて、すべての構築物の完全性を配列決定した。

---

Construction of expression plasmids and mutagenesis. Coding regions of the NAD biosynthetic enzymes were PCR amplified from EST clones BC038133 for murine NMNAT1 and BC005737 for murine nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase3 (NMNAT3), using Herculase (Stratagene). Human NAD synthetase (QNS) hexahistidine-tagged cDNA was kindly provided by Dr. N. Hara (Shimane University, Shimane, Japan). Hexahistidine tag was added at the 3'-end of each cDNA. NMNAT1 cytosolic mutant (cytNMNAT1) was generated by PCR-mediated site-directed mutagenesis. Nuclear form of NMNAT3 (nucNMNAT3) was generated by adding a nuclear localization signal to the C-terminal end of NMNAT3. Each PCR amplified NAD synthetic enzyme fragment was cloned into FCIV lentiviral shuttle vector as previously described. The integrity of all the constructs was sequenced using TaqDyeDeoxy Terminator cycle sequencing kits (Applied Biosystems) and an Applied Biosystems 373 DNA sequencer.

[0087]

NAD生合成基質。 NAD生合成酵素の基質はすべてSigma ( Na、 Nam、 NMN、 NaMN、 ニコチン酸 アデニンジヌクレオチド ( NaAD )、 およびNAD ) から購入した。 NmRはNMNから合成した。 NMNのNmRへの変換を、逆相カラムLC-18T ( Supelco ) を使用するHPLC ( Waters ) によって確認した。 NmRは260 ± 10秒で溶出され、NMNは50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>および50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( pH 7.0 ) を含む1ml /分の流速の緩衝液で150 ± 10秒で溶出される。 Charles R. Brenner博士 ( Dartmouth Medical School、 New Hampshire、 USA ) から親切に提供された酵母株を用いて、NmRの生物学的活性に前述のようにアクセスした。

---

NAD biosynthetic substrates. All substrates for NAD biosynthetic enzymes were purchased from Sigma (Na, Nam, NMN, NaMN, nicotininc acid adenine dinucleotide (NaAD), and NAD). NmR was synthesized from NMN. Conversion of NMN to NmR was confirmed by HPLC (Waters) using reverse phase column LC-18T (Supelco). NmR is eluted 260 ± 10 seconds and NMN is eluted 150 ± 10 seconds under 1 ml/min flow rate of buffer containing 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>and 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0). Biological activity of NmR was accessed as previously described by using yeast strains kindly provided from Dr. Charles Brenner (Dartmouth Medical School, New Hampshire, USA).

[0088]

リアルタイム定量的逆転写-PCR分析。 ワシントン大学で実験動物のケアと使用に関する国立衛生研究所のガイドラインに従って、すべての外科手術が行われた。 神経損傷後の発現分析のために、C57BL / 6マウスの坐骨神経を切断し、L4をL5に切断した。 示された時点でDRGを収集し、プールしてRNAを抽出した。 E14.5胚からのラットDRG外植片を、記載の方法に従って14日間培養し、10nMのビンクリスチンを含有する培地で所定期間培養し、RNAを抽出した。 プールされた組織源またはDRG外植体培養物からの全RNAを調製した。 標準的な方法を用いて各RNA1 μgから第1鎖cDNA鋳型を調製した。 2つの独立したcDNA合成を各RNAサンプルについて実施した。 定量的逆転写 ( RT ) -PCRは、SYBR-GREEN色素の蛍光の増加をTaqMan 7700 Sequence Detection System ( Applied Biosystems ) でリアルタイムにモニターすることにより行った。

---

Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis. All the surgical procedures were performed according to National Institute of Health guidelines for care and use of laboratory animals at Washington University. For the expression analysis following nerve injury, the sciatic nerves of a C57BL/6 mouse was transected and L4 to L5. DRGs were collected at indicated time points and pooled to extract RNA. Rat DRG explants from E14.5 embryo were cultured for 14 days according to the method described and cultured with media containing 10 nM vincristin for indicated period and extracted RNA. Total RNAs from pooled tissue sources or DRG explant cultures were prepared. First-strand cDNA templates were prepared from 1 μg of each RNA using standard methods. Two independent cDNA syntheses were performed for each RNA sample.

Quantitative reverse transcription (RT)-PCR was performed by monitoring in real-time the increase in fluorescence of the SYBR-GREEN dye on a TaqMan 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

#### [0089]

細胞培養、インビトロでの軸索切断、および軸索変性の定量。E12.5胚由来のマウスDRG外植片を、10%FCSおよび1nM神経成長因子を含有するDMEM中で培養した。培養培地に5-フルオロウラシルを添加することにより、非神経細胞を培養物から除去した。神経突起の切断は、ニューロン細胞体を除去するために18ゲージ針を用いて14~21DIVで行った。レンチウイルス発現ベクターを作製した。レンチウイルス感染は、軸索切断の3~7日前に24時間行った。神経突起変性の定量分析を行った。

---

Cell culture, in vitro axotomy, and quantification of axonal degeneration. Mouse DRG explants from E12.5 embryos were cultured in the DMEM containing 10% FCS and 1 nM nerve growth factor. Non-neuronal cells were removed from the cultures by adding 5-fluorouracil to the culture media. Transection of neurites was performed at 14-21 DIV using an 18-gauge needle to remove the neuronal cell bodies. Lentiviral expression vectors were generated. Lentiviral infection was performed 3-7 days prior to axonal transection for 24 hr. Quantitative analysis of neurite degeneration was performed.

#### [0090]

タンパク質発現および局在の決定。タンパク質発現の確認のために、HEK293T細胞を、NAD生合成酵素のそれぞれを発現するウイルスに感染させた。感染の5日後に細胞を溶解し、抗6xHisタグモノクローナル抗体 (R&D Systems) によるヘキサヒスチジンタグを有する各タンパク質の発現を検出するイムノブロットによって分析した。各NAD生合成酵素についてウイルスシャトルベクターで一過的にトランスフェクトしたHEK293T細胞を用いて各タンパク質の細胞内局在を分析した。0.1% tween-20 (PBS-T) を含有するPBS中の4%パラホルムアルデヒド中で細胞を固定し、5%BSAを含有するPBS-Tと共に1時間インキュベートし、次いで1:1000希釈した抗6xHisタグ抗体 (R&D Systems 1%BSAを含むPBS-T中、4℃で16時間インキュベートした。細胞をPBS-Tで洗浄し、TBS-T中のAlexa Fluor 594結合二次抗体 (Molecular Probes) と共に1時間インキュベートし、蛍光顕微鏡 (Nikon) で調べた。

---

Determination of protein expression and localization. For confirmation of protein expression, HEK293T cells were infected with a virus that expresses each of NAD biosynthetic enzymes. Cells were lysed 5 days after infection to be analyzed by immunoblot to detect expression of each protein with a hexa-histidine tag by anti-6xHis tag monoclonal antibody (R&D Systems). Subcellular localization of each protein was analyzed using HEK293T cells transiently transfected with a viral shuttle vector for each NAD biosynthetic enzymes. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS containing 0.1% tween-20 (PBS-T) and incubated with PBS-T containing



5% BSA for 1 hour, and then covered with 1:1000 diluted anti-6xHis tag antibody (R&D Systems) in PBS-T containing 1% BSA and for 16 hours at 4 ° C. Cells were washed with PBS-T and incubated with Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody (Molecular Probes) in TBS-T for 1 hour and examined by fluorescence microscopy (Nikon).

#### [0091]

NMNATタンパク質の過剰発現、アフィニティー精製および酵素アッセイ。HEK293T細胞を、リン酸カルシウム沈殿を用いて各酵素の発現プラスミドでトランスフェクトした。3日後、細胞をPBSで2回洗浄した後、50mMリン酸ナトリウム (pH8.0) および300mM NaCl (緩衝液A) を含む緩衝液に懸濁した。次に、細胞をSONIFIRE 450 (BRANSON) によってホモジナイズし、10,000gで10分間遠心分離して上清を回収した。His選択ニッケルアフィニティーゲル (Sigma) を緩衝液Aで洗浄し、0.1mlの50%ゲル懸濁液を1mlの上清に添加し、4 ° Cで10分間インキュベートし、次いでビーズ結合ヘキサヒスチジンタグタンパク質を広範囲に緩衝液Aで洗浄した。50mMのリン酸ナトリウム (pH8.0)、300mMのNaCl、および250mMのイミダゾールを含む100 µlの溶液を添加することにより、タンパク質を溶出させた。相対NMNAT酵素活性を、前述のアフィニティー精製タンパク質を用いて測定し、偽トランスフェクション細胞から得た値を差し引き、デンストメトリーによって決定された組換えタンパク質の量で標準化した。

---

NMNAT protein overexpression, affinity purification and enzymatic assay. HEK293T cells were transfected with an expression plasmid for each enzyme by using calcium phosphate precipitation. Three days later, cells were washed with PBS twice and then suspended in the buffer containing 50 mM Sodium Phosphate (pH8.0), and 300 mM NaCl (buffer A). Cells were then homogenized by SONIFIRE 450 (BRANSON) and supernatant was collected by centrifugation at 10,000 g for 10 min. His-select Nickel Affinity Gel (Sigma) was washed with buffer A and 0.1 ml of 50% gel suspension was added to 1 ml of supernatant and incubated for 10 min at 4 ° C, then beads binding hexa-histidine -tagged protein was extensively washed with the buffer A. Proteins were eluted by adding 100 µl of the solution containing 50 mM Sodium Phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, and 250 mM imidazole. Relative NMNAT enzymatic activity was measured by using affinity purified proteins as described before and subtracted the value obtained from mock transfected cells and normalized by the amount of recombinant protein determined by densitometry.

#### [0092]

NAD生合成基質および視神経切断の投与。ナム、NMN、NmR、またはNADを100mMまたは1Mの濃度でPBSに溶解した。各5 µlの溶液を、麻酔下で毎秒0.5 µlの速度で左硝子体内成分に注入した。硝子体内注射の24時間後に左視神経を切開し、指定された時間に視神経を回復させた。視神経組織を、100mMトリス-HCl (pH6.8)、1%SDS、および1mM DTTを含有する100 µlの緩衝液中でホモジナイズした。抗神経フィラメント抗体2H3 (Developmental Studies Hybridoma Center) およびペルオキシダーゼ結合二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いたウェスタン

プロットングにより、各サンプルについて50 µgのタンパク質を分析した。縮退率は、横断神経対側神経のニューロフィラメント免疫反応性の比から計算した。

---

Administration of NAD biosynthetic substrates and optic Nerve transection. Nam, NMN, NmR, or NAD was dissolved in PBS at the concentration of 100 mM or 1 M. Each of 5 µl solution was injected into left intravitreal component under the anesthesia at a rate of 0.5 µl ml per second. The left optic nerve was transected at 24 hours after intravitreal injection and optic nerve was recovered at indicated time. Optic nerve tissue was homogenized in 100 µl of a buffer containing 100mM tris-HCl (pH 6.8), 1 % SDS, and 1mM DTT. Fifty µg of protein for each sample was analyzed by the Western blotting using anti-neurofilament antibody 2H3 (Developmental Studies Hybridoma Center) and peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). The degeneration rate was calculated from the ratio of the neurofilament immunoreactivity of transected vs. contralateral nerves.

#### 実施例8

---

#### EXAMPLE 8

#### [0093]

この実施例は、哺乳動物NAD生合成酵素のNAD生合成経路および発現分析を例示する。

---

This example illustrates the NAD biosynthetic pathway and expression analysis of mammalian NAD biosynthetic enzymes.

#### [0094]

NADは、原核生物および真核生物の両方の3つの主要経路を介して合成される。デノボ経路では、NADはトリプトファンから合成される(図5)。サルベージ経路では、NADはニコチン酸およびニコチンアミドを含むビタミンから生成される。ニコチンアミドリボシドからの、プリシスハンドラー独立経路と呼ばれる第3の経路が最近発見された。de novo経路の最後の酵素反応は、QPRT (EC 2.4.2.19) によるキノリン酸塩のNaMNへの変換を含む。この時点で、デノボ経路はサルベージ経路と収束する。NaPRT (EC 2.4.2.11) は、NaをNaMNに変換し、NMNAT (EC 2.7.7.1) によってNaADに変換される。QNS1 (EC 6.3.5.1) はNaADをNADに変換する。NmPRT (EC 2.4.2.12); また、ビスファチンとして報告されている) は、NamをNMNに変換する。NMNはまた、NMNATによってNADに変換される。ナムを酵母でNaに変換し、細菌の救済経路を哺乳類で同定していないニコチンアミダーゼ (PNC、EC3.5.1.19)。Preiss-Handlerの独立した経路では、NrK (EC 2.7.1.22) はNmRをNMNに変換し、Salvage経路に収束する。

---

NAD is synthesized via three major pathways in both prokaryotes and eukaryotes. In the de novo

pathway, NAD is synthesized from tryptophan ( Fig.5 ). In the salvage pathway, NAD is generated from vitamins including nicotinic acid and nicotinamide. A third route from nicotinamide riboside called Preiss-Handler independent pathway has recently been discovered. The last enzymatic reaction of the de novo pathway involves the conversion of quinolinate to NaMN by QPRT (EC 2.4.2.19). At this point, the de novo pathway converges with the salvage pathway. NaPRT (EC 2.4.2.11) converts Na to NaMN, which is then converted to NaAD by NMNAT (EC 2.7.7.1). QNS1 (EC 6.3.5.1) converts NaAD to NAD. NmPRT (EC 2.4.2.12); also reported as visfatin) converts Nam to NMN. NMN is also converted to NAD by NMNAT. Nicotinamidase (PNC, EC 3.5.1.19), which converts Nam to Na in yeast and bacteria salvage pathway has not been identified in mammals. In the Preiss-Handler independent pathway, Nrk (EC 2.7.1.22) converts NmR to NMN and converge to salvage pathway.

QPRT、NmPRT、QNS1、Nrk1 / 2およびNMNAT1 / 2/3を含むこれらの哺乳動物酵素のほとんどは、以前にクローン化され特徴付けられている。NaPRTの哺乳動物ホモログもまた、細菌NaPRTの哺乳類相同体としてアノテーションされたESTとして同定された。

---

Most of these mammalian enzymes including QPRT, NmPRT, QNS1, Nrk1/2 and NMNAT1/2/3 have previously cloned and characterized. A mammalian homologue of NaPRT was also identified as an EST annotated as a mammalian homolog of a bacterial NaPRT.

[6]

神経系における哺乳動物NAD生合成酵素の発現を調べるために、E14、P0、P7、P14およびP21の年齢で、マウスの脳、網膜、脊髄およびDRGからのRNAを用いて定量的RT-PCRを行った。全ての酵素は、発達している間および成人期に神経系に遍在して発現するが、Nrk2は例外であり、その発現は検査したすべての組織において非常に低い（データは示さず）。ニューロン損傷に応答するNAD合成酵素の誘導能を同定するために、本発明者らは、損傷を受けていないDRGに対する坐骨神経切断の1,3,7および14日後に、DRG中の各酵素のRNA発現を比較した。図2に示すように、6Aでは、ほとんどの酵素が損傷後2~8倍にアップレギュレートされていた。そのうち、Nrk2の発現は、軸索切断の14日後に非常に高度に誘導される（20倍以上）。我々はまた、培養ラットDRGニューロンにおける神経毒によって引き起こされる軸索変性中のNAD合成酵素の発現を分析した。DRGニューロンを0.1  $\mu$ Mおよび1  $\mu$ Mロテノンで処理して軸索変性を引き起こし、ロテノンの添加後24時間でRNAを収集した。

---

To investigate the expression of mammalian NAD biosynthetic enzymes in the nervous system, we performed quantitative RT-PCR using RNA from mouse brain, retina, spinal code, and DRG at age of E14, P0, P7, P14 and P21. All enzymes are expressed ubiquitously in the nervous system throughout the development and in adulthood, with an exception of Nrk2, whose expression is very low in all examined tissues (data not shown). To identify inducibility of NAD-synthesizing enzymes in response to neuronal insults, we compared the RNA expression of each enzyme in

DRGs at 1, 3, 7, and 14 days after sciatic nerve transection against non-injured DRG. As shown in Fig. 6A, most of the enzymes were up-regulated 2 to 8-fold after injury. Among those, Nr2f1 expression is exceptionally highly induced (more than 20-fold) at 14 days after axotomy. We also analyzed expression of NAD synthetic enzymes during the axonal degeneration caused by neurotoxin in cultured rat DRG neuron. DRG neurons were treated with 0.1  $\mu$ M and 1  $\mu$ M rotenone to cause axonal degeneration and collected RNA at 24 hours after the addition of rotenone.

[6]  
ロテノン処理後、Nr2f1の発現は6倍以上増加した (Fig. 6B)。これらの結果は、NAD合成経路におけるすべての酵素活性が普遍的に存在する一方で、Nr2f1が、ニューロンの傷害後にNAD合成基質を供給することに関与する可能性があることを示唆している。

---

The expression of Nr2f1 was increased more than 6 folds after rotenone treatment ( Fig. 6B ). These results suggest that, while all enzymatic activities in NAD synthesis pathway is ubiquitously present, Nr2f1 may be responsible for supplying NAD synthesizing substrate after neuronal insults.

#### 実施例9

---

#### EXAMPLE 9

[0096]  
この例は、核および細胞質Nmat酵素の両方が、軸索を変性から保護することを示している。

---

This example illustrates that both nuclear and cytoplasmic Nmat enzymes save axons from degeneration.

[7]  
軸索保護を提供するためにNMNAT1の核局在化が必須であるか否かを決定するために、in vitro Wallerian変性アッセイにおけるNMNAT酵素の細胞内分布の影響を分析し、細胞質NMNATと核NMNATの過剰発現の間の軸索保護の程度を比較した。NMNAT1は、NMNAT1タンパク質の211~221個のアミノ酸に推定上の核局在化シグナルPGRKRKWを有する。本発明者らは、この核局在化シグナルがPGAAAWとして変化し、細胞下分布を調べたcytNMNAT1と命名された突然変異体NMNAT1を作製した。図2に示すように、7B、我々が予想した細胞質ゾルに位置するcytNMNAT1の大部分。

To determine whether nuclear localization of NMNAT1 is essential to provide the axonal protection, we analyzed the effect of subcellular distribution of NMNAT enzyme in the in vitro Wallerian degeneration assay and compared the extent of axonal protection between overexpression of cytoplasmic and nuclear NMNAT. NMNAT1 has putative nuclear localization signal PGRKRKW in the 211-217 amino-acids of NMNAT1 protein. We generated a mutant NMNAT1 designated as cytNMNAT1 in which this nuclear localization signal was altered as PGAAAAW and examined subcellular distribution. As shown in Fig. 7B, the majority of cytNMNAT1 located in the cytosol as we expected.

## [7]

次に、いずれかのタンパク質を発現する細胞溶解物から、アフィニティーゲルを用いて cytNMNAT1、NMNAT1およびその変異体cytNMNAT1の酵素活性を精製した。アフィニティー精製したタンパク質の酵素活性を上記のように測定したところ、cytNMNAT1活性はその変異によって変化しなかったことがわかった。7C)。DRGニューロンにおけるcytNMNAT1の過剰発現後、本発明者らは、強力な神経突起保護ならびに核野生型NMNAT1を観察した(図7A、E)。我々はさらに、核局在化シグナルを欠くNMNAT1アイソザイムを用いてこの結果を確認した。2つのNMNATアイソザイムの中で、NMNAT3は、以前に核およびミトコンドリアの外側に位置することが報告されており、NMNAT1に匹敵する酵素活性を有する。我々は、NMNAT3のC末端にヒトトポイソメラーゼIの核局在化シグナルKPKKIKTEDを加えて、核NMNAT3を生成した。本発明者らは、HEK293T細胞においてヘキサヒスチジン標識NMNAT3またはnucNMNAT3を発現させ、細胞下局在化およびその酵素活性を分析した。NMNAT3は核の外側に分布し、以前に報告されているように明るい点状染色を含み、nucNMNAT3は主に核に局在し、細胞質ゾルに何らかの点状の染色を示した(図4)。

---

Next we confirmed enzymatic activity of cytNMNAT1, NMNAT1 and its mutant cytNMNAT1 were purified from the cell lysate expressing either of proteins by using affinity gel. The enzymatic activity of affinity purified proteins was measured as described above and we found that cytNMNAT1 activity did not altered by its mutation ( Fig. 7C ). After the overexpression of cytNMNAT1 in DRG neurons, we observed strong neurite protection as well as nuclear wild NMNAT1 ( Fig.7A, E ). We further confirmed this result by using NMNAT1 isoenzyme that lacks nuclear localization signal. Among two NMNAT isoenzymes, NMNAT3 is previously reported to locate outside nucleus and mitochondria, and have comparable enzymatic activity to NMNAT1. We added nuclear localization signal KPKKIKTED of human topoisomerase I to the C-terminal of NMNAT3 to generate nuclear NMNAT3. We expressed hexa-histidine tagged NMNAT3 or nucNMNAT3 in HEK293T cells and analyzed subcellular localization and its enzymatic activity. NMNAT3 was distributed outside the nucleus including bright punctuate staining as reported before and nucNMNAT3 mainly localized in the nucleus with some punctuate staining in the cytosol ( Fig.

[7]  
7B)。NMNAT3とnucNMNAT3の酵素活性を測定し、両方のタンパク質がNMNAT1と比較して同等の酵素活性を有していた。7C)。NMNAT3とNucNMNAT3の過剰発現は、神経突起変性とNMNAT1の遅延の程度が同じであることがわかった(図7A、E)。各酵素のレンチウイルス媒介性発現は、ウエスタンブロッティングによって確認した(図2)。7D)。これらの実験は、核またはサイトゾルのいずれかに標的化されたNMNATが神経突起を変性から保護することを確認した。

---

7B). The enzymatic activity of NMNAT3 and nucNMNAT3 were measured and both proteins have comparable enzymatic activity compared with NMNAT1 ( Fig. 7C ). Then, in vitro Wallerian degeneration assay was performed after overexpression of these two NMNAT3 enzymes, and we found that overexpression of both NMNAT3 and nucNMNAT3 showed same extent of delay in neurite degeneration as well as NMNAT1 ( Fig. 7A, E ). The lentivirus mediated expression of each enzyme was confirmed by Western blotting ( Fig. 7D ). These experiments confirmed that NMNAT targeted to either the nucleus or cytosol protects neurite from degeneration.

#### 実施例10

---

#### EXAMPLE 10

[0099]  
この実施例は、NAD生合成酵素に対する基質の外因的適用が、軸索を変性から保護することを示す。

---

This example illustrates that exogenous application of substrates for NAD biosynthetic enzymes protects axon from degeneration.

[8]  
本発明者らは、培地中の外因的に適用されたNADがインビトロで軸索保存効果を示すことを以前に示した。ここでは、NmPRTの発現が軸索保護を示し、ニューロンにおけるNAD合成の基質としてNamが使用されていることを示した。図2に示されている基板を決定する。5をニューロン中のNAD合成に使用し、NAD前駆体のいずれかがNADと類似またはおそらく良好に軸索を保存することができるかどうかを同定するために、Na、Nam、NmR、NaMN、NMNまたはNaADを培地に適用し、in vitro Wallerian変性アッセイ。神経突起切断の前に1mMのNMNを24時間適用すると、神経突起は変性から正常に保存された。定量分析は、NMN処置が、外因的に適用されたNADによって達成されるのと同様の範囲で、神経突起保護をもたらすことを明らかにした(図2)。8B)。これらの結果は、他のNAD生合成基質の供給の増加が神経突起を変性から守る能力を有する可能性をさらに示唆した。次いで、Na、Nam、NaMN、NaAD、およびNmRを含む

1mMのNAD生合成基質を外因的にDRGニューロンに24時間適用し、神経突起切除を行った。

---

We have previously shown that exogenously applied NAD in the culture medium shows axonal saving effect in vitro. Here we showed that expression of NmPRT also shows axonal protection suggesting that Nam is used as a substrate for NAD synthesis in neurons. To determine which substrate shown in Fig. 5 is used for NAD synthesis in neurons and to identify whether any of NAD precursors may be able to save axons similar to or possibly better than NAD, we applied Na, Nam, NmR, NaMN, NMN, or NaAD in the culture media and performed in vitro Wallerian degeneration assay. An application of 1 mM NMN for 24 hours before neurite transection successfully saved neurites from degeneration. Quantitative analysis revealed that NMN treatment results in neurite protection to an extent similar to that achieved by exogenously applied NAD ( Fig. 8B ). These results further suggested the possibility that increased supply of other NAD biosynthetic substrates have an ability to save neurites from degeneration. We then exogenously applied 1 mM of NAD biosynthetic substrates including Na, Nam, NaMN, NaAD, and NmR to the DRG neurons for 24 hours and performed neurite transection.

[8]  
図2に示すように、8AおよびB、NaMNまたはNmR処置はまた、神経突起ならびにNADを保存した。NaADは軽度の保護を示したが、Naは神経突起を保存できなかったが、NaおよびNamは効果がなかった。定量分析は、1mMのNaMN、NMN、NmR、またはNADの外因性の適用が、切断後48時間でインタクトな神経突起の匹敵する増加を引き起こしたことを明らかにした。8B)。NaMNの保護効果はNMNに等しいので、QADによるNaADからのNADを合成するステップは、NaADの供給を増やして神経突起を保存するのに十分に活性である。それにもかかわらず、NaADの外因的適用は、NADと比較して、48時間で無傷の神経突起の増加が少ないことを示す(図4)。8B)。これは、細胞への取り込みが不十分であること、またはアッセイ条件においてNaADの不安定性を示す。これらの実験は、NMU、NaMN、およびNmRの外因性適用を含む、神経突起を保存するためのいくつかの異なる方法があることを示唆している。これらの処置のすべては、NADの供給の増加を引き起こすようであり、退化からの神経突起を保存するNAD適用またはNMNAT1過剰発現を示す以前の実験と一致する。

---

As shown in Fig. 8A and B , NaMN or NmR treatment also saved neurites as well as NAD. NaAD showed slight protection but Na failed to save neurites, while Na and Nam had no effect. Quantitative analysis revealed that exogenous application of 1mM NaMN, NMN, NmR, or NAD caused comparable increase in intact neurites at 48 hours after transection ( Fig. 8B ). Because the protective effect of NaMN is equal to NMN, a step synthesize NAD from NaAD by QNS is active enough to save neurites under the increased supply of NaAD. Nevertheless, exogenous application of NaAD shows less increase in intact neurites at 48 hours compared with NAD ( Fig. 8B ). This indicates insufficient incorporation into the cell or instability of NaAD in our assay condition. These experiments suggest that there are several different ways to save neurites including exogenous application of NMN, NaMN, and NmR. All of these treatments seem to cause

increased supply of NAD and it is consistent to the previous experiments showing NAD application or NMNAT1 overexpression save neurites from degeneration.

## 実施例11

---

### EXAMPLE 11

#### [0101]

この実施例は、NAD生合成基質の体内適用が網膜神経節細胞の軸索変性を遅延させることを実証する。

---

This example demonstrates that intravitreal application of NAD biosynthetic substrates delays the axonal degeneration of retinal ganglion cells.

#### [0102]

視神経の切開は、Wallerian変性に至るメカニズムおよび緑内障などのヒト疾患で観察される網膜神経節細胞（RGC）死に続くメカニズムを調べるために使用することができるin vivoモデルである。C57BL/Wldsマウスにおいて、軸索切断後のWallerian変性中の視神経変性は劇的に減速する。さらに、硝子体内注射は、RGC軸索をインビボでの変性から保護する化合物のスクリーニングに使用され、従って、NAD、NMN、NmR、およびNamを含む化合物の眼内注射によって、インビボで各NAD生合成基質の軸索保護効果を確認することができる。in vitro Wallerian変性アッセイから、培地中の1mMのNAD、NMN、およびNmRは、軸索を変性から保護するのに十分である。最初に、100  $\mu$ Mまたは1MのNAD溶液5  $\mu$ lを左硝子体内区画に注入した。24時間のインキュベーション後、左視神経を横切って、切断後3、4、および5日目に対照（右）および軸索切断（左）視神経を収集した。

---

Transection of optic nerve is an in vivo model which can be used to investigate mechanisms leading to Wallerian degeneration and following retinal ganglion cell (RGC) death observed in human diseases such as glaucoma. In the C57BL/Wlds mouse strain, optic nerve degeneration during Wallerian degeneration after axotomy is dramatically slowed. In addition, intravitreal injection is used for screening of compounds that protect RGC axon from degeneration in vivo and thus we can assess the axon protective effect of each NAD biosynthetic substrates in vivo by intraocular injection of compounds including NAD, NMN, NmR, and Nam. From in vitro Wallerian degeneration assay, 1mM of NAD, NMN, and NmR in the culture media is enough to protect axon from degeneration. We initially injected 5  $\mu$ l of 100 mM or 1 M NAD solution into left intravitreal compartment. After 24 hours incubation, left optic nerve was transected and control (right) and axotomized (left) optic nerve were collected at 3, 4, and 5 days after transection.



[9]

軸索切断された視神経からのニューロフィラメント免疫反応性を測定し、視神経の右側から得られた値に対して正規化した。我々は、対照動物はわずか $7 \pm 16\%$ を示した一方、切断後4日での免疫反応性は、非軸索視神経の $77 \pm 27\%$ および $78 \pm 22\%$ であった。9)

---

Neurofilament immunoreactivity from the axotomized optic nerve was measured and normalized against the value obtained from the right side of the optic nerve. We found that the immunoreactivity at 4 days after transection was  $77 \pm 27\%$  and  $78 \pm 22\%$  of non-axotomized optic nerve in 1 M and 100 mM NAD injected rats respectively, while control animal showed only  $7 \pm 16\%$  ( Fig. 9 )

[0103]

その後、左視神経腹腔内に100mM NMN、NmR、Namを5  $\mu$ l注入し、左視神経動作4日後に視神経を採取した。NMNおよびNmR注入視神経から得られた免疫反応性は、非軸索切断神経の $60 \pm 25$ および $72 \pm 19\%$ であった。Namを注射した動物は対照動物と差異を示さなかった。これらの結果は、NAD、NMN、およびNmRが軸索保存活性を有するが、Namはそうではないことを示すインビトロ研究と一致する。本発明者らのインビボ研究は、NAD生合成経路に關与するこれらの小分子が、軸索を変性から退ける有用なツールであることを明らかにした。

---

We then injected 5  $\mu$ l of 100 mM NMN, NmR, and Nam into left intravitreal compartment and collected optic nerves at 4 days after left optic nerve transaction. The immunoreactivity obtained from NMN and NmR injected optic nerve was  $60 \pm 25$  and  $72 \pm 19\%$  of non-axotomized nerve. Nam injected animals did not show any difference from the control animals. These results are consistent with the in vitro study that showed NAD, NMN, and NmR have axon saving activity but Nam does not. Our in vivo study revealed that these small molecules that are involved in the NAD biosynthetic pathway are useful tools to save axon from degeneration.

[0104]

本明細書に引用される全ての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に引用された参考文献の議論は、単にその著者によってなされた主張を要約することを意図しており、いかなる参照またはその部分も關連する先行技術を構成することは認められない。出願人は、引用文献の正確さおよび適切性に挑戦する権利を留保する。

---

All references cited in this specification are hereby incorporated by reference. Any discussion of references cited herein is intended merely to summarize the assertions made by their authors and no admission is made that any reference or portion thereof constitutes relevant prior art. Applicants reserve the right to challenge the accuracy and pertinency of the cited references.

CLAUSES :

---

CLAUSES:

[5]

1. 罹患したニューロンおよび支持細胞におけるサーチュイン活性を増加させることによって作用する作用物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物におけるニューロパチーまたは軸索障害の治療または予防方法。 2. 前記薬剤がSIRT1活性を増加させることによって作用する、請求項1に記載の方法。 3. 前記薬剤がNAD、NADH、NAD合成経路の中間体、ニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の中間体またはそれらの組み合わせである、請求項1に記載の方法。 4. 前記薬剤がNAD、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドである、請求項1に記載の方法。 5. 前記薬剤が、NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するためのNADを合成するためのアデノウロパシーの酵素を含む請求項1に記載の方法。 NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するための、選択的ノボパスウェイの酵素をコードする核酸; NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するための、選択的ノボパスウェイの酵素の発現を増加させる薬剤;またはNADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するための、NADを合成するためのアデノウロパシーの酵素の触媒活性および/または安定性を増加させる薬剤を含む。

---

1. A method of treating or preventing a neuropathy or axonopathy in a mammal in need thereof, the method comprising administering to the mammal an effective amount of an agent that acts by increasing sirtuin activity in diseased and/or injured neurons and supporting cells. 2. A method according to clause 1, wherein the agent acts by increasing SIRT1 activity. 3. A method according to clause 1, wherein the agent is NAD, NADH, an intermediate of adenovopathway for synthesizing NAD, an intermediate of a NAD salvage pathway, an intermediate of a nicotinamide riboside kinase pathway or a combination thereof. 4. A method according to clause 1, wherein the agent is NAD, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide or nicotinamide riboside. 5. A method according to clause 1, wherein the agent comprises an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; a nucleic acid encoding an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; an agent that increases expression of an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; or an agent that increases catalytic activity and/or stability of an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway.

[11]

6. 前記薬剤が、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニレートトランスフェラーゼ (NMNAT) またはNMNATをコードする核酸を含む、請求項5に記載の方法。7. 前記作用物質が、NMNAT活性およびヒトNMNAT1と少なくとも50%の同一性またはヒトNMNAT3と少なくとも50%の同一性を有する酵素を含む、請求項6に記載の方法。8. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1と少なくとも70%の同一性、またはヒトNMNAT3と少なくとも70%の同一性を有する、条項7に記載の方法。9. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1、ヒトNMNAT3、およびその保存的に置換された変異体からなる群から選択される、請求項6に記載の方法。10. 前記薬剤が、ヒトNMNATをコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸、またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも50%同一性を有する核酸を含む、請求項6に記載の方法。11. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも70%同一性を有する核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、条項10に記載の方法。

---

6. A method according to clause 5, wherein the agent comprises a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) or a nucleic acid encoding an NMNAT. 7. A method according to clause 6, wherein the agent comprises an enzyme having NMNAT activity and at least 50% identity with a human NMNAT1 or at least 50% identity with a human NMNAT3. 8. A method according to clause 7, wherein the agent has at least 70% identity with a human NMNAT1 or at least 70% identity with a human NMNAT3. 9. A method according to clause 6, wherein the agent is selected from the group consisting of a human NMNAT1, a human NMNAT3 and conservatively substituted variants thereof. 10. A method according to clause 6, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT or a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 11. A method according to clause 10, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3.

[19]

12. 前記薬剤が、ヒトNMNATまたはヒトNMNAT3またはその核酸変異体をコードする核酸を含む、請求項11に記載の方法。13. 前記薬剤が、サーチュインポリペプチドまたはサーチュインポリペプチドをコードする核酸を含む、請求項1に記載の方法。14. 前記薬剤が、SIRT活性を有し、ヒトSIRT1と少なくとも50%の同一性を有する酵素を含む、請求項6に記載の方法。15. 前記薬剤がヒトSIRT1と少なくとも70%の同一性を有する、請求項14に記載の方法。16. 前記薬剤が、ヒトSIRT1およびその保存的に置換された変異体からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。17. 前記薬剤が、ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸を含む、請求項6に記載の方法。18. 前記薬剤が、ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、請求項17に記載の方法。19. 前記薬剤が、ヒトSIRT1またはその核酸変異体をコードする核酸を含む、請求項18に記載の方法。

---

12. A method according to clause 11 wherein the agent comprises a nucleic acid encoding a

human NMNAT or a human NMNAT3 or a nucleic acid variant thereof. 13. A method according to clause 1, wherein the agent comprises a sirtuin polypeptide or a nucleic acid encoding a sirtuin polypeptide. 14. A method according to clause 6, wherein the agent comprises an enzyme having SIRT activity and at least 50% identity with a human SIRT1. 15. A method according to clause 14, wherein the agent has at least 70% identity with a human SIRT1. 16. A method according to clause 15, wherein the agent is selected from the group consisting of a human SIRT1 and conservatively substituted variants thereof. 17. A method according to clause 6, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1. 18. A method according to clause 17, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1. 19. A method according to clause 18 wherein the agent comprises a nucleic acid encoding a human SIRT1 or a nucleic acid variant thereof.

[21]

20. 前記薬剤が、スチルベン、カルコン、フラボン、イソフラバノン、フラバノンまたはカテキンである、請求項1に記載の方法。21. 前記薬剤が、レスベラトロール、ピセアタンノール、デオキシラポボン、トランス - スチルベンおよびラポンチンからなる群から選択されるスチルベンである、請求項20に記載の方法。ブテイン、イソリキリティゲンおよび3,4,2', 4', 6'-ペンタヒドロキシカルコンからなる群から選択されるカルコン;フィセチン、5,7,3', 4', 5'-ペンタヒドロキシフラボン、ルテオリン、3,6,3', 4'-テトラヒドロキシフラボン、ケルセチン、7,3', 4', 5', 4,6'-ジヒドロキシフラボン、7,8,3', 4'-テトラヒドロキシフラボン、3,6,2', 4'-テトラヒドロキシフラボン、4,6'-ジヒドロキシフラボン、4'-ヒドロキシフラボン、5,4'-ジヒドロキシフラボン、5,7'-ジヒドロキシフラボン、モリン、フラボンおよび5-ヒドロキシフラボン;ダイゼインおよびゲニステインからなる群から選択されるイソフラボン;ナリンゲニン、3,5,7,3', 4'-ペンタヒドロキシフラバノンおよびフラバノンからなる群から選択されるフラバノン、または(-) - エピカテキン、(-) - カテキン、(-) - (+) - カテキンおよび(+)-エピカテキンである。

---

20. A method according to clause 1, wherein the agent is a stilbene, a chalcone, a flavone, an isoflavanone, a flavanone or a catechin. 21. A method according to clause 20, wherein the agent is a stilbene selected from the group consisting of resveratrol, piceatannol, deoxyrhapontin, trans-stilbene and rhapontin; a chalcone selected from the group consisting of butein, isoliquiritigen and 3,4,2',4',6'-pentahydroxychalcone; a flavone selected from the group consisting of fisetin, 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone, luteolin, 3,6,3',4'-tetrahydroxyflavone, quercetin, 7,3',4',5'-tetrahydroxyflavone, kaempferol, 6-hydroxyapigenin, apigenin, 3,6,2',4'-tetrahydroxyflavone, 7,4'-dihydroxyflavone, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone, 3,6,2',3'-tetrahydroxyflavone, 4'-hydroxyflavone, 5,4'-dihydroxyflavone, 5,7-dihydroxyflavone, morin, flavone and 5-hydroxyflavone; an isoflavone selected from the group consisting of daidzein and genistein; a flavanone selected from the group consisting of naringenin, 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone, and flavanone or a catechin selected from the group consisting of (-)-epicatechin, (-)-catechin, (-)-gallocatechin, (+)-catechin and (+)-epicatechin.

[22]

[24]

22. 神経障害、運動ニューロン疾患、新形成、内分泌障害、代謝疾患、栄養欠乏症、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、機械的損傷、化学的または薬物依存性障害に関連する、請求項1に記載の方法。網膜または視神経障害、ミトコンドリア機能不全、進行性痴呆脱髄疾患、虚血および/または卒中感染症のような慢性炎症性障害;または炎症性疾患である。23. ニューロパシーまたは軸索障害が細胞傷害性抗癌剤によって誘導される、請求項22に記載の方法。24. 前記視神経障害が、緑内障、網膜神経節変性、視神経炎および/または変性、黄斑変性症、虚血性視神経症、視神経に対する外傷性障害、遺伝性視神経症、代謝性視神経症、神経性障害によるニューロパシーである項22に記載の方法。毒性物質または副作用またはビタミン欠乏に起因するもの。

---

22. A method according to clause 1, wherein the neuropathy or axonopathy is hereditary or congenital or associated with neurodegenerative disease, motor neuron disease, neoplasia, endocrine disorder, metabolic disease, nutritional deficiency, atherosclerosis, an autoimmune disease, mechanical injury, chemical or drug-induced injury, thermal injury, radiation injury, nerve compression, retinal or optic nerve disorder, mitochondrial dysfunction, progressive dementia demyelinating diseases ischemia and/or stroke infectious disease; or inflammatory disease. 23. A method according to clause 22, wherein the neuropathy or axonopathy is induced by a cytotoxic anticancer agent. 24. A method according to clause 22, wherein the optic neuropathy is glaucoma, retinal ganglion degeneration, optic neuritis and/or degeneration, macular degeneration, ischemic optic neuropathy, traumatic injury to the optic nerve, hereditary optic neuropathy, metabolic optic neuropathy, neuropathy due to a toxic agent or that caused by adverse drug reactions or vitamin deficiency.

[29]

25. ミトコンドリア機能不全に関連する神経障害が、酸化的損傷、ミトコンドリアゲノムまたは核ゲノムのいずれかにコードされたミトコンドリアタンパク質の変異、毒素への曝露、または老化のプロセスから生じる、請求項22に記載の方法。26. 前記哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。27. 罹患したニューロンおよび/または傷害されたニューロンおよび/または支持細胞においてNAD活性を増加させることによって作用する作用物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、その方法を必要とする哺乳動物における神経障害または軸索障害の治療または予防方法。28. 前記薬剤がNAD、NADH、NAD合成経路の中間体、ニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の中間体またはそれらの組み合わせである、請求項27に記載の方法。29. 前記薬剤がNAD、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドである、請求項28に記載の方法。

---

25. A method according to clause 22, wherein the neuropathy associated with mitochondrial dysfunction results from oxidative damage, from mutations in mitochondrial proteins encoded

either in the mitochondrial genome or nuclear genome, from exposure to toxins, or from the process of aging. 26. A method according to clause 1, wherein the mammal is a human. 27. A method of treating or preventing a neuropathy or axonopathy in a mammal in need thereof, the method comprising administering to the mammal an effective amount of an agent that acts by increasing NAD activity in diseased and/or injured neurons and/or supporting cells. 28. A method according to clause 27, wherein the agent is NAD, NADH, an intermediate of adenovopathway for synthesizing NAD, an intermediate of a NAD salvage pathway, an intermediate of a nicotinamide riboside kinase pathway or a combination thereof. 29. A method according to clause 28, wherein the agent is NAD, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide or nicotinamide riboside.

### [31]

30. 前記薬剤が、NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するためのNADを合成するためのアデノウイルスの酵素を含む請求項27に記載の方法。NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するための、選択的ノボパスウェイの酵素をコードする核酸; NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するための、選択的ノボパスウェイの酵素の発現を増加させる薬剤;またはNADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するための、NADを合成するためのアデノウロパシーの酵素の触媒活性および/または安定性を増加させる薬剤を含む。 31. 前記薬剤が、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニレートトランスフェラーゼ (NMNAT) またはNMNATをコードする核酸を含む、請求項30に記載の方法。 32. 前記作用物質が、NMNAT活性およびヒトNMNAT1と少なくとも50%の同一性またはヒトNMNAT3と少なくとも50%の同一性を有する酵素を含む、請求項31に記載の方法。

---

30. A method according to clause 27, wherein the agent comprises an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; a nucleic acid encoding an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; an agent that increases expression of an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; or an agent that increases catalytic activity and/or stability of an enzyme of adenovopathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway. 31. A method according to clause 30, wherein the agent comprises a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) or a nucleic acid encoding an NMNAT. 32. A method according to clause 31, wherein the agent comprises an enzyme having NMNAT activity and at least 50% identity with a human NMNAT1 or at least 50% identity with a human NMNAT3.

### [38]

33. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1と少なくとも70%の同一性またはヒトNMNAT3と少なくとも70%の同一性を有する、項目32に記載の方法。34. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1、ヒトNMNAT3およびその保存的に置換された変異体からなる群から選択される、請求項31に記載の方法。35. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも50%同一性を有する核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸を含む、請求項31に記載の方法。36. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも70%同一性を有する核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、請求項35に記載の方法。37. 前記薬剤が、ヒトNMNAT1またはヒトNMNAT3またはその核酸変異体をコードする核酸を含む、請求項36に記載の方法。38. 神経変性疾患、運動ニューロン疾患、新形成、内分泌障害、代謝疾患、栄養欠乏症、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、機械的損傷、化学的または薬物依存性疾患に関連する、請求項27に記載の方法。網膜または視神経障害、ミトコンドリア機能不全、進行性痴呆脱髄疾患、虚血および/または卒中感染症のような慢性炎症性障害;または炎症性疾患である。

---

33. A method according to clause 32, wherein the agent has at least 70% identity with a human NMNAT1 or at least 70% identity with a human NMNAT3. 34. A method according to clause 31, wherein the agent is selected from the group consisting of a human NMNAT1, a human NMNAT3 and conservatively substituted variants thereof. 35. A method according to clause 31, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 36. A method according to clause 35, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 37. A method according to clause 36 wherein the agent comprises a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a human NMNAT3 or a nucleic acid variant thereof. 38. A method according to clause 27, wherein the neuropathy or axonopathy is hereditary or congenital or associated with neurodegenerative disease, motor neuron disease, neoplasia, endocrine disorder, metabolic disease, nutritional deficiency, atherosclerosis, an autoimmune disease, mechanical injury, chemical or drug-induced injury, thermal injury, radiation injury, nerve compression, retinal or optic nerve disorder, mitochondrial dysfunction, progressive dementia demyelinating diseases ischemia and/or stroke infectious disease; or inflammatory disease.

[40]

[43]

39. ニューロパシーまたは軸索障害が細胞傷害性抗癌剤によって誘導される、請求項38に記載の方法。40. 前記視神経障害が、緑内障、網膜神経節変性、視神経炎および/または変性、黄斑変性症、虚血性視神経症、視神経に対する外傷性障害、遺伝性視神経症、代謝性視神経症、神経性障害によるニューロパシーである項22に記載の方法。毒性物質または副作用またはビタミン欠乏に起因するもの。41. ミトコンドリア機能障害に関連する神経障害が、酸化的損傷、ミトコンドリアゲノムまたは核ゲノムのいずれかにコードされたミトコンドリアタンパク質の変異、毒

素への曝露、または老化のプロセスに起因する、請求項38に記載の方法。42。前記哺乳動物がヒトである、請求項27に記載の方法。43。哺乳動物のニューロパシーを治療するための薬剤をスクリーニングする方法であって、インビトロでインビボで哺乳動物のニューロン細胞にインビボで候補薬剤を投与することを含む方法;神経細胞への軸索損傷を生じる;損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含む。

---

39. A method according to clause 38, wherein the neuropathy or axonopathy is induced by a cytotoxic anticancer agent. 40. A method according to clause 22, wherein the optic neuropathy is glaucoma, retinal ganglion degeneration, optic neuritis and/or degeneration, macular degeneration, ischemic optic neuropathy, traumatic injury to the optic nerve, hereditary optic neuropathy, metabolic optic neuropathy, neuropathy due to a toxic agent or that caused by adverse drug reactions or vitamin deficiency. 41. A method according to clause 38, wherein the neuropathy associated with mitochondrial dysfunction results from oxidative damage, from mutations in mitochondrial proteins encoded either in the mitochondrial genome or nuclear genome, from exposure to toxins, or from the process of aging. 42. A method according to clause 27, wherein the mammal is a human. 43. A method of screening agents for treating a neuropathy in a mammal, the method comprising administering to mammalian neuronal cells in vitro or in vivo, a candidate agent; producing an axonal injury to the neuronal cells; and detecting a decrease in axonal degeneration of the injured neuronal cells.

[47]

44。ニューロン細胞を化学的に傷害し、ニューロン細胞を熱傷し、ニューロン細胞を酸素欠乏させ、神経細胞を物理的に損傷させ、エネルギー代謝またはその組み合わせを阻害することを含む、項目43に記載の方法。45。哺乳動物の神経障害を治療するための薬剤をスクリーニングする方法であって、候補薬剤によって産生されたNAD活性の細胞内での増加を検出することを含む方法。46。ニューロンにおけるサーチュイン活性を増加させる薬剤をスクリーニングする方法であって、インビトロでインビボで哺乳類のニューロン細胞にインビボで候補薬剤を投与することを含む方法;神経細胞への軸索損傷を生じる;損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含む。47。ニューロンにおけるNAD活性を増加させる薬剤をスクリーニングする方法であって、インビトロでインビボで哺乳動物ニューロン細胞にインビボで候補薬剤を投与することを含む方法;神経細胞への軸索損傷を生じる;損傷した神経細胞の軸索変性の減少を検出することを含む。

---

44. A method according to clause 43, wherein producing an axonal injury to the neuronal cells comprises chemically injuring the neuronal cells, thermally injuring the neuronal cells, oxygen-depriving the neuronal cells, physically injuring the neuronal cells, inhibiting energy metabolism or a combination thereof. 45. A method of screening agents for treating a neuropathy in a mammal, the method comprising detecting an increase in NAD activity produced by a candidate agent, in a cell. 46. A method of screening for agents that increase sirtuin activity in neurons, the method comprising administering to mammalian neuronal cells in vitro or in vivo, a candidate



agent; producing an axonal injury to the neuronal cells; and detecting a decrease in axonal degeneration of the injured neuronal cells. 47. A method of screening for agents that increase NAD activity in neurons, the method comprising administering to mammalian neuronal cells in vitro or in vivo, a candidate agent; producing an axonal injury to the neuronal cells; and detecting a decrease in axonal degeneration of the injured neuronal cells.

[53]

48. ヒトNMNAT1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドに作用可能に連結されたプロモーターまたはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも50%同一性を有するポリヌクレオチドを含む組換えベクター。 49. ヒトNMNAT1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドまたはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項48に記載の組換えベクター。 50. ヒトNMNAT1またはヒトNMNAT3またはそのポリヌクレオチド変異体をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項48に記載の組換えベクター。 51. レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを含む、請求項48に記載の組換えベクター。 52. ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも50%の同一性を有するポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含む組換えベクター。 53. ヒトSIRT1をコードする核酸と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチドを含む、請求項52に記載の組換えベクター。

---

48. A recombinant vector comprising a promoter operatively linked to a polynucleotide having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 49. A recombinant vector according to clause 48 comprising a polynucleotide having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a polynucleotide having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 50. A recombinant vector according to clause 48 comprising a polynucleotide encoding a human NMNAT1 or a human NMNAT3 or a polynucleotide variant thereof. 51. A recombinant vector according to clause 48 comprising a lentivirus or an adeno-associated virus. 52. A recombinant vector comprising a promoter operatively linked to a polynucleotide having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1. 53. A recombinant vector according to clause 52 comprising a polynucleotide having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human SIRT1.

[60]

54. ヒトSIRT1またはそのポリヌクレオチド変異体をコードするポリヌクレオチド酸を含む、項目54に記載の組換えベクター。 55. レンチウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを含む、請求項52に記載の組換えベクター。 56. 罹患したニューロンおよび/または損傷したニューロンにおけるNAD活性を増加させることによって作用する作用物質の有効量を哺乳動物に投与することを含む、その方法を必要とする哺乳動物における視神経障害の治療または予防方法。 57. 前記哺乳動物に投与することは、眼内投与を含む、請求項56に記載の方法。 58. 眼内投与が、徐放性送

達システムの眼内投与を含む、請求項57に記載の方法。 59。 眼内投与が、硝子体内注射、点眼剤による投与、または経強膜送達による投与を含む、請求項57に記載の方法。 60。 前記薬剤が、NAD、NADH、NAD合成経路の中間体、ニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の中間体、またはそれらの組み合わせである、請求項56に記載の方法。

---

54. A recombinant vector according to clause 54 comprising a polynucleotide acid encoding a human SIRT1 or a polynucleotide variant thereof. 55. A recombinant vector according to clause 52 comprising a lentivirus or an adeno-associated virus. 56. A method of treating or preventing an optic neuropathy in a mammal in need thereof, the method comprising administering to the mammal an effective amount of an agent that acts by increasing NAD activity in diseased and/or injured neurons. 57. A method according to clause 56, wherein administering to the mammal comprises intraocular administering. 58. A method according to clause 57, wherein intraocular administering comprises intraocular administering of a sustained release delivery system. 59. A method according to clause 57, wherein intraocular administering comprises intravitreal injection, administration by eyedrops or administration by trans-scleral delivery. 60. A method according to clause 56, wherein the agent is NAD, NADH, an intermediate of a de novo pathway for synthesizing NAD, an intermediate of a NAD salvage pathway, an intermediate of a nicotinamide riboside kinase pathway or a combination thereof.

[62]

[63]

61。 薬剤がNAD、ニコチンアミドモノヌクレオチド、ニコチン酸モノヌクレオチドまたはニコチンアミドリボシドである、項目60に記載の方法。 62。 前記薬剤が、NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するためのデノボ経路の酵素を含む、項目56に記載の方法。 NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するためのデノボ経路の酵素をコードする核酸; NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するためのデノボ経路の酵素の発現を増加させる薬剤; NADサルベージ経路の酵素またはニコチンアミドリボシドキナーゼ経路の酵素を合成するためのデノボ経路の酵素の触媒活性および/または安定性を増加させる薬剤を含む。 63。 前記薬剤が、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ (NMNAT) または NMNATをコードする核酸を含む、項目62に記載の方法。 64。

---

61. A method according to clause 60, wherein the agent is NAD, nicotinamide mononucleotide, nicotinic acid mononucleotide or nicotinamide riboside. 62. A method according to clause 56, wherein the agent comprises an enzyme of a de novo pathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; a nucleic acid encoding an enzyme of a de novo pathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; an agent that increases expression of an enzyme of a de novo pathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway; or an agent that

increases catalytic activity and/or stability of an enzyme of a de novo pathway for synthesizing NAD, an enzyme of a NAD salvage pathway or an enzyme of a nicotinamide riboside kinase pathway. 63. A method according to clause 62, wherein the agent comprises a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) or a nucleic acid encoding an NMNAT. 64.

[67]

ヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも50%同一性を有する核酸と少なくとも50%の同一性を有する核酸を含む、項目62に記載の方法。65。前記薬剤が、ヒトNMNAT1をコードする核酸またはヒトNMNAT3をコードする核酸と少なくとも70%同一性を有する核酸と少なくとも70%の同一性を有する核酸を含む、項目64に記載の方法。66。前記薬剤が、ヒトNMNAT1またはヒトNMNAT3またはその核酸変異体をコードする核酸を含む、請求項65に記載の方法。67。前記視神経障害が、緑内障、網膜神経節変性、視神経炎および/または変性、黄斑変性症、虚血性視神経症、視神経に対する外傷性障害、遺伝性視神経症、代謝性視神経症、神経性障害によるニューロパシーである項22に記載の方法。毒性物質または副作用またはビタミン欠乏に起因するもの。

---

A method according to clause 62, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a nucleic acid having at least 50% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 65. A method according to clause 64, wherein the agent comprises a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a nucleic acid having at least 70% identity with a nucleic acid encoding a human NMNAT3. 66. A method according to clause 65 wherein the agent comprises a nucleic acid encoding a human NMNAT1 or a human NMNAT3 or a nucleic acid variant thereof. 67. A method according to clause 22, wherein the optic neuropathy is glaucoma, retinal ganglion degeneration, optic neuritis and/or degeneration, macular degeneration, ischemic optic neuropathy, traumatic injury to the optic nerve, hereditary optic neuropathy, metabolic optic neuropathy, neuropathy due to a toxic agent or that caused by adverse drug reactions or vitamin deficiency.

[68]

68。哺乳動物がヒトである、項目56に記載の方法。

---

68. A method according to clause 56, wherein the mammal is a human.