

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-535473

(P2010-535473A)

(43) 公表日 平成22年11月25日(2010.11.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 9
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-519269 (P2010-519269)  
 (86) (22) 出願日 平成20年8月4日 (2008.8.4)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年3月25日 (2010.3.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/072081  
 (87) 国際公開番号 W02009/020905  
 (87) 国際公開日 平成21年2月12日 (2009.2.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/963, 329  
 (32) 優先日 平成19年8月3日 (2007.8.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510025821  
 ズィ、オハイオウ、ステイト、ユニヴァーサティ、リサーチ、ファウンデーション  
 アメリカ合衆国オハイオ州43212、カラムバス、キニア・ロウド 1216番  
 (74) 代理人 100073841  
 弁理士 真田 雄造  
 (74) 代理人 100104053  
 弁理士 尾原 静夫  
 (72) 発明者 クロウス、カーロ、エム  
 アメリカ合衆国オハイオ州43221、カラムバス、ケイムブリッジ・ブーラヴァード  
 2140番  
 Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA14 FB01 FB02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ncRNAをコードする超保存領域

## (57) 【要約】

ヒトの癌を区別する方法であって、一つ又は複数の転写された超保存領域(T-UCR)発現プロファイルを用いることを含み、UCRのゲノム位置と分析された癌関連ゲノムエレメントとの間の関連が統計的に高度に有意であり、miRNAに関して報告されたものと比較するものである方法が本明細書で記載される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト癌を区別する方法であって、一つ又は複数の転写された超保存領域(T-UCR)発現プロファイルを用いることを含み、UCRのゲノム位置と分析された癌関連ゲノムエレメントとの間の関連が、統計的に高度に有意であり、miRNAに関して報告されたものと比較するものである、前記方法。

**【請求項 2】**

ヒト癌で差示的に発現される一つ又は複数のT-UCRが、その種類の癌に特異的に関連する癌関連ゲノム領域(CAGR)に位置する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

7個のUCR(uc.347~uc.353)のクラスターが前記CAGRの中に位置する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

2個のUCR、uc.349A(P)及びuc.352(N)が、正常と悪性のB-CLL CD5陽性細胞の間で差示的に発現される前記T-UCRに含まれる、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記UCRの一つ又は複数が、悪性の過程で改変されるゲノム領域に位置する、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

一つ又は複数のT-UCRが癌感受性の候補遺伝子である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

二つのCLL予後群を区別するために、5個のUCR、uc.269A(N)、uc.160(N)、uc.215(N)、uc.346A(P)及びuc.348(N)のサインが用いられる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記5個のUCR中3個が、前記サインからの13個のmiRNA中5個と、有意なアンチセンス相補性を有し、6個の可能な相互作用対、uc.160::miR-24、uc.160::miR-155、uc.160::miR-223、uc.160::miR-146a、uc.346A::miR-155及びuc.-348::miR-29bを生成する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記UCRが、悪性の過程で標的にされるゲノム領域に位置し、ヒト腫瘍形成での推定上の関与を示す、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

uc.246(E)に対応するcDNA。

**【請求項 11】**

標準の方法によってクローン化及び発現される、請求項10に記載のcDNA。

**【請求項 12】**

uc.269A(N)に対応するcDNA。

**【請求項 13】**

標準の方法によってクローン化及び発現される、請求項12に記載のcDNA。

**【請求項 14】**

前記T-UCRが結腸癌でuc.73(P)の発癌機能を有し、その過剰発現の減少が、アポトーシスを誘導し、前記T-UCRを異常に発現する結腸癌細胞で抗増殖性作用をもたらす、請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

2種類以上のncRNAが相互作用して表現型に影響を及ぼす機能的調節経路を調査する方法であって、癌患者でUCRとmiRNAの発現の相関を決定することを含む、前記方法。

**【請求項 16】**

前記癌がCLLである、請求項15に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記相関がmiRNA::T-UCR相互作用の存在を含む、請求項16に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 18】**

癌患者で一つ又は複数のnc-UCGがゲノムレベルで改変される、請求項15に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記癌患者が白血病を有する、請求項18に記載の方法。

**【請求項 20】**

コード遺伝子及び非コード遺伝子の両方が、一つ又は複数のUCRを含むヒト腫瘍形成に  
関与及び協力するモデル。

**【請求項 21】**

対象が、癌関連染色体特徴部と関連付けられる癌を有するか、それを発症するリスクが  
あるかどうかを診断する方法であって、癌関連染色体特徴部に近接して位置する少なくと  
も一つのUCR遺伝子の対象での状態を、

10

(i)前記対象からの試験試料で、試験試料中のUCR遺伝子に由来する少なくとも一つのUC  
R遺伝子産物のレベルを測定することであって、対照試料中の対応するUCR遺伝子産物のレ  
ベルと比較した試験試料中のUCR遺伝子産物のレベルの変化が、癌を対象が有するかそれ  
を発症するリスクがあることを示すこと、

(ii)試験試料中の少なくとも一つのUCR遺伝子を欠失、突然変異又は増幅について分析  
することであって、対照試料中の対応するUCR遺伝子と比較したUCR遺伝子における欠失、  
突然変異及び/又は増幅の検出が、前記癌を対象が有するかそれを発症するリスクがある  
ことを示すこと、並びに/又は

(iii)試験試料中の少なくとも一つのUCR遺伝子のコピー数を測定することであって、女  
性での体細胞性染色体若しくは性染色体の上のUCR遺伝子については2個以外のコピー数、  
又は男性での性染色体の上のUCR遺伝子については1個以外のコピー数が、癌を対象が有す  
るかそれを発症するリスクがあることを示すこと

20

によって評価することを含む、前記方法。

**【請求項 22】**

前記癌関連染色体特徴部が、癌関連ゲノム領域、染色体脆弱部位、ヒト乳頭腫ウイルス  
組込み部位、及び、ホメオボックス遺伝子又は遺伝子クラスターからなる群から選択され  
る、請求項21に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記癌が、膀胱癌、食道癌、肺癌、胃癌(stomach cancer)、腎臓癌(kidney cancer)、  
子宮頸癌、卵巣癌、乳癌、リンパ腫、ユーイング肉腫、造血腫瘍、固形腫瘍、胃癌(gastr  
ic cancer)、結腸直腸癌、脳癌、上皮癌、鼻咽頭癌、子宮癌、肝癌、頭頸部癌、腎臓癌(r  
enal cancer)、雄胚細胞腫瘍、悪性中皮腫、骨髓異形成症候群、膵臓若しくは胆管の癌、  
前立腺癌、甲状腺癌、尿路上皮性癌、腎臓癌(renal cancer)、ウィルムス腫瘍、小細胞肺  
癌、黒色腫、皮膚癌、骨肉腫、神経芽細胞腫、白血病(急性リンパ球性白血病、急性骨髄  
性白血病、慢性リンパ球性白血病)、多形神経膠芽腫、髄芽細胞腫、赤血球無色症様リン  
パ腫、及び横紋筋肉腫からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 24】**

前記癌関連染色体特徴部が染色体脆弱部位である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記UCR遺伝子が、7個のUCR(uc.347~uc.353)のクラスター及びそれらの組合せからな  
る群から選択される、請求項10に記載の方法。

40

**【請求項 26】**

前記癌が白血病である、請求項17に記載の方法。

**【請求項 27】**

対象が癌を有するか、それを発症するリスクがあるかどうかを診断する方法であって、  
(1)対象から得られた試験試料由来のRNAを逆転写して一組の標的オリゴデオキシヌクレオ  
チドを提供すること、(2)標的オリゴデオキシヌクレオチドを、一つ又は複数のUCR特異的  
プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズして、試験試料のハ  
イブリダイゼーションプロファイルを提供すること、及び(3)試験試料のハイブリダイゼ

50

ーションプロファイルを、対照試料から生成されるハイブリダイゼーションプロファイルと比較することを含み、シグナルの変化が、癌を対象が有するかそれを発症するリスクがあることを示す、前記方法。

【請求項 28】

前記癌が、癌関連染色体特徴部に関連する癌である、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記癌がB細胞慢性リンパ性白血病である、請求項27に記載の方法。

【請求項 30】

対象が、対象の一つ又は複数の悪い予後マーカーに関連する癌を有するか、それを発症するリスクがあるかどうかを診断する方法であって、(1)対象から得られた試験試料由来のRNAを逆転写して一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供すること、(2)標的オリゴデオキシヌクレオチドを、一つ又は複数のUCR特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズして、前記試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供すること、及び(3)試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料から生成されるハイブリダイゼーションプロファイルと比較することを含み、シグナルの変化が、癌を対象が有するかそれを発症するリスクがあることを示す、前記方法。

【請求項 31】

前記癌がB細胞慢性リンパ性白血病である、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

対象が癌を有するか、それを発症するリスクがあるかどうかを診断する方法であって、前記対象からの試験試料において癌と関連する少なくとも一つのUCR遺伝子又は遺伝子産物を分析することを含み、対照試料中の対応するUCR遺伝子又は遺伝子産物と比較したUCR遺伝子又は遺伝子産物における突然変異の検出は、対象が、癌を有するかそれを発症するリスクがあることを示す、前記方法。

【請求項 33】

前記UCR遺伝子が、7個のUCR(uc.347 ~ uc.353)のクラスター及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項46に記載の方法。

【請求項 34】

前記癌がB細胞慢性リンパ性白血病である、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

UCR遺伝子産物及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であって、単離されたUCR遺伝子産物が、癌関連染色体特徴部に近接して位置するUCR遺伝子に由来する、前記医薬組成物。

【請求項 36】

前記癌関連染色体特徴部が、癌関連ゲノム領域及び染色体脆弱部位からなる群から選択される、請求項35に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

癌関連染色体特徴部に近接して位置するUC遺伝子に由来する単離UCR遺伝子産物をコードする核酸、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 38】

前記癌関連染色体特徴部が、癌関連ゲノム領域、染色体脆弱部位、ヒト乳頭腫ウイルス組込み部位、及び、ホメオボックス遺伝子又は遺伝子クラスターからなる群から選択される、請求項37に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

対象で癌を治療する方法であって、

(1)癌関連染色体特徴部に近接して位置するUCR遺伝子由来の少なくとも一つの単離UCR遺伝子産物が、対照細胞と比較して対象の癌細胞で下方制御又は上方制御されている、癌関連染色体特徴部に関連する癌を有する対象を提供すること、及び

(2)(a)少なくとも一つの単離miR遺伝子産物が癌細胞で下方制御される場合に、癌細胞の増殖が対象で抑制されるように、少なくとも一つのUCR遺伝子からの少なくとも一つの

10

20

30

40

50

単離miR遺伝子産物の有効量を対象に投与すること、又は(b)少なくとも一つの単離UCR遺伝子産物が癌細胞で上方制御される場合に、癌細胞の増殖が対象で抑制されるように、少なくとも一つのUCR遺伝子の発現を抑制する少なくとも一つの化合物の有効量を対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 4 0】

前記癌関連染色体特徴部が、癌関連ゲノム領域及び染色体脆弱部位からなる群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 1】

癌関連染色体特徴部と関連する癌を治療する方法であって、

(1)対照細胞と比較して、対象からの癌細胞中の癌関連染色体特徴部に近接して位置する少なくとも一つのUCR遺伝子から発現されるUC遺伝子産物の量を決定すること、及び

10

(2)癌細胞中で発現されるUC遺伝子産物の量を、

(i)癌細胞で発現されるUCR遺伝子産物の量が対照細胞で発現されるmiR遺伝子産物の量より少ない場合には、UCR遺伝子からの少なくとも一つの単離miR遺伝子産物の有効量を対象に投与すること、又は

(ii)癌細胞で発現されるUCR遺伝子産物の量が対照細胞で発現されるUCR遺伝子産物の量より多い場合には、癌細胞の増殖が対象で抑制されるように、少なくとも一つのUCR遺伝子の発現を抑制する少なくとも一つの化合物の有効量を対象に投与すること

によって改変することを含む、前記方法。

【請求項 4 2】

20

前記癌関連染色体特徴部が、癌関連ゲノム領域及び染色体脆弱部位からなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記癌関連染色体特徴部が染色体脆弱部位である、請求項42に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記癌関連染色体特徴部が癌関連ゲノム領域である、請求項43に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記癌が、白血病、肺癌、食道癌、胃癌(gastric cancer)、結腸直腸癌、脳癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、上皮癌、鼻咽頭癌、リンパ腫、子宮癌、肝癌、頭頸部癌、腎臓癌(renal cancer)、雄胚細胞腫瘍、悪性中皮腫、骨髓異形成症候群、卵巣癌、膵臓若しくは胆管の癌、前立腺癌、甲状腺癌、及び尿路上皮性癌からなる群から選択される、請求項1から44のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 4 6】

少なくとも一つの肺癌関連疾患の開始、進行、重症度、病状、攻撃性、段階、活性、障害、死亡率、罹患率、疾患細分類又は他の根底にある病原性若しくは病理学的特徴のうちの少なくとも一つに寄与する一つ又は複数の代謝経路を調べるためのマーカーであって、一つ又は複数のUCR遺伝子産物を含む、前記マーカー。

【請求項 4 7】

請求項1から46のいずれかに記載のマーカーの一つ又は複数を含む組成物。

【請求項 4 8】

40

対象で少なくとも一つの癌関連疾患の開始又は発症の可能性を特定する方法であって、請求項1から47のいずれかに記載のマーカーの一つ又は複数を測定することを提供する、前記方法。

【請求項 4 9】

前記一つ又は複数のマーカーが単離された試料に存在し、方法の全ステップがin vitroで実施される、請求項48に記載の方法。

【請求項 5 0】

癌関連疾患について試験するための試薬であって、請求項1から49のいずれかに記載の少なくとも一つのマーカーのヌクレオチド配列、又は前記マーカーのヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む、前記試薬。

50

**【請求項 5 1】**

癌関連疾患について試験するための試薬であって、請求項1から50のいずれかに記載の少なくとも一つのマーカーによってコードされるタンパク質を認識する抗体を含む、前記試薬。

**【請求項 5 2】**

癌関連疾患について試験するためのDNAチップであって、請求項1から51のいずれかに記載の少なくとも一つのマーカーを分析するためにプローブが固定化されている、前記DNAチップ。

**【請求項 5 3】**

少なくとも一つの肺癌関連疾患を予防、診断及び/又は治療するための療法の有効性を評価する方法であって、

10

(1) その有効性を評価する療法を動物に施すこと、及び

(2) 請求項1から52のいずれかに記載の少なくとも一つのマーカーを評価することによって、試験する治療法の、肺癌関連疾患の治療又は予防における有効性のレベルを決定することを含む、前記方法。

**【請求項 5 4】**

候補治療剤が、医薬組成物、機能性食品組成物及びホメオパシー組成物の一つ又は複数を含む、請求項53に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

前記評価する療法がヒト対象で使用するためのものである、請求項54に記載の方法。

20

**【請求項 5 6】**

ヒト又は動物の体の手術又は療法による治療の方法でない、請求項55に記載の方法。

**【請求項 5 7】**

動物モデルで癌関連疾患応答を開始する能力について少なくとも一つの物質の可能性を評価する方法であって、

(1) 動物で癌関連疾患応答を開始するのに十分な量の一つ又は複数の物質に動物を曝露した後に、請求項1から56のいずれかに記載の上方制御又は下方制御されたマーカーの一つ又は複数測定すること、及び

(2) 上方制御又は下方制御されたマーカーの少なくとも一つが癌関連疾患応答を開始する能力を有するかどうか決定することを提供する、前記方法。

30

**【請求項 5 8】**

癌関連疾患を治療するための医薬組成物であって、

7個のUCR(uc.347 ~ uc.353)のクラスター及びそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも一つのUCR遺伝子産物、及び

薬学的に許容される担体  
を含む、前記医薬組成物。

**【請求項 5 9】**

少なくとも一つのmiR遺伝子産物が、適する対照細胞と比較して癌細胞で上方制御又は下方制御されているUCR遺伝子産物に対応する、請求項59に記載の医薬組成物。

**【請求項 6 0】**

前記肺癌関連疾患が腺癌である、請求項59に記載の医薬組成物。

40

**【請求項 6 1】**

肺癌を治療するための医薬組成物であって、

少なくとも一つのUCR発現抑制化合物、及び  
薬学的に許容される担体を含み、

前記少なくとも一つのUCR発現抑制化合物が、7個のUCR(uc.347 ~ uc.353)のクラスター及びそれらの組合せからなる群から選択されるmiR遺伝子産物に特異的である、前記医薬組成物。

**【請求項 6 2】**

少なくとも一つのUCR発現抑制化合物が、適する対照細胞と比較して癌細胞で上方制御

50

又は下方制御されているUCR遺伝子産物に特異的である、請求項61に記載の医薬組成物。

【請求項 6 3】

請求項1から62のいずれかに記載のマーカの少なくとも一つから選択される、癌関連疾患のマーカに結合する少なくとも一つの捕捉試薬を含む製造品。

【請求項 6 4】

癌関連疾患を治療するための治療剤の候補化合物についてスクリーニングするためのキットであって、

請求項1から63のいずれかに記載の少なくとも一つのマーカの一つ又は複数の試薬、及び

少なくとも一つのマーカを発現する細胞を含む、前記キット。

10

【請求項 6 5】

マーカの存在が、少なくとも一つのマーカに特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを含む試薬を用いて検出される、請求項64に記載のキット。

【請求項 6 6】

前記試薬が、標識、放射標識又はビオチン標識され、及び/又は抗体又は抗体フラグメントが、放射標識、発色団標識、蛍光団標識又は酵素標識される、請求項65に記載のキット。

【請求項 6 7】

前記マーカの少なくとも一つを含む容器をさらに含む、請求項66に記載のキット。

20

【請求項 6 8】

前記試薬が、抗体、該試薬が結合しているか結合することができるプローブ、及び固定化金属キレートの一つ又は複数を含む、請求項67に記載のキット。

【請求項 6 9】

肺癌関連疾患のためのスクリーニング試験であって、

請求項1から68のいずれかに記載のマーカの一つ又は複数を、そのようなマーカの基質及び試験剤と接触させること、及び

該試験剤がマーカの活性を調節するかどうか決定することを含むスクリーニング試験。

【請求項 7 0】

方法の全ステップがin vitroで実施される、請求項69に記載のスクリーニング試験。

30

【請求項 7 1】

請求項1から70のいずれかに記載の少なくとも一つのマーカに対する抗体を含む、対象で癌関連疾患の存在を予測するためのマイクロアレイ。

【請求項 7 2】

前記マーカの発現レベルが、転写されたポリヌクレオチド又はその部分の存在を検出することによって評価され、該転写されたポリヌクレオチドはマーカのコード領域を含む、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

試料が癌関連体液又は組織である、請求項72に記載の方法。

40

【請求項 7 4】

試料が患者から得られる細胞を含む、請求項73に記載の方法。

【請求項 7 5】

癌関連疾患合併症を、必要とする個体において治療するか、予防するか、回復させるか、又はその重症度を制限するための方法であって、

少なくとも一つの癌関連疾患応答シグナル伝達経路を妨害する作用物質を、そのようなシグナル伝達を妨害するのに十分な量で個体に投与することを含み、

前記作用物質が、少なくとも一つのUCR遺伝子産物を含む、前記方法。

【請求項 7 6】

個体において癌関連疾患合併症を治療するか、予防するか、回復させるか、又はその重

50

症度を制限するための医薬の製造のための、少なくとも一つの肺癌関連疾患応答シグナル伝達経路を妨害する作用物質の使用であって、

前記作用物質が、少なくとも一つのUCR遺伝子産物を含む、前記使用。

【請求項 77】

癌関連疾患合併症を、必要とする個体において治療するか、予防するか、回復させるか、又はその重症度を制限するための方法であって、

少なくとも一つの癌関連疾患応答カスケードを妨害する作用物質を個体に投与することを含み、

該作用物質が、少なくとも一つのUCR遺伝子産物を含む、前記方法。

【請求項 78】

個体において癌関連疾患合併症を治療するか、予防するか、回復させるか、又はその重症度を制限するための医薬の製造のための、少なくとも一つの癌関連疾患応答カスケードを妨害する作用物質の使用であって、

該作用物質が、少なくとも一つのUCR遺伝子産物を含む、前記使用。

【請求項 79】

複数のデジタルコード化された参照プロファイルを有するデータベースを含むコンピュータ可読媒体であって、少なくとも第一の参照プロファイルが、癌関連疾患応答の兆候を示している一又は複数の対象に由来する一つ又は複数の試料中の少なくとも第一のマーカのレベルを表し、

該マーカが、一つ又は複数のUCR遺伝子産物を含む、前記コンピュータ可読媒体。

【請求項 80】

癌関連疾患応答の兆候を示している一又は複数の対象、又は癌関連疾患を有する対象に由来する一つ又は複数の試料中の少なくとも第二のマーカのレベルを表す少なくとも第二の参照プロファイルを含む、請求項79に記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項 81】

対象が、癌関連疾患を有するか、その素因があるか、又はそれに関して生存期間の不良な予後を有するかどうか決定するためのコンピュータシステムであって、

請求項1から80のいずれかに記載のデータベース、及び

コンピュータに対象のプロファイルを受け取らせ、対象プロファイルに診断上関連している適合する参照プロファイルをデータベースから特定させ、対象が癌関連疾患を有するか、その素因があるかどうかの表示を生成させるための、コンピュータ実行可能コードを含むサーバー

を含む、前記コンピュータシステム。

【請求項 82】

対象で癌関連疾患の存在、非存在、性質又は程度を評価するためのコンピュータを利用した方法であって、

(1)対象から得た試料からのデータを分類するためのモデル又はアルゴリズムを含むコンピュータを提供することであって、

前記分類が、少なくとも一つのマーカの存在、非存在又は量についてデータを分析することを含み、

前記マーカが、一つ又は複数のmiR遺伝子産物を含むこと、

(2)対象から得た生体試料からのデータを入力すること、及び

(3)癌関連疾患の存在、非存在、性質又は程度を表示するために生体試料を分類することを含む、前記方法。

【請求項 83】

少なくとも一つのUCR遺伝子産物及びその組合せが、その単離された変異体又は生物学的活性断片又は機能同等物、又はそれに結合する抗体を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項 84】

UCR遺伝子産物が、7個のUCR(uc.347~uc.353)のクラスター及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項83に記載の方法。

10

20

30

40

50



## 【請求項 85】

一つ又は複数のUCR遺伝子産物の変化した発現の少なくとも一つが存在する、癌の動物モデル。

## 【請求項 86】

前記動物モデルがヒト以外の脊椎動物である、請求項85に記載の動物モデル。

## 【請求項 87】

前記動物モデルがマウス、ラット、ウサギ又は霊長類である、請求項86に記載の動物モデル。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2007年8月3日出願の米国仮出願第60/963,329号、及び2008年xxxxxに出願のPCT/US2008/xxxxxの利益を請求し、それらの全開示は参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

連邦助成研究に関する記載

本発明は、何らかの政府助成によってなされたものではなく、政府は本発明にいかなる権利も有しない。

## 【背景技術】

## 【0002】

20

全体として見ると、癌は、米国及び世界全体で死亡率及び罹病率の重要な原因である。しかし、癌は、多様な病因を有する、大きく多様なクラスの疾患である。したがって、研究者は、多くの種類の癌をカバーする治療法又は診断検査を開発することができていない。

## 【0003】

例えば、癌は、多くの異なるクラスの染色体特徴部と関連している。そのような一つのクラスの染色体特徴部は、ある遺伝子のゲノム構造の摂動、例えば腫瘍抑制遺伝子の欠失又は突然変異である。遺伝子増幅又はプロモーター活性化(例えば、ウイルスの組込みによる)によるプロトオンコジンの活性化、エピジェネティックな修飾(例えば、DNAメチル化の変化)及び染色体転位も、発癌を引き起こすことができる。癌の病因にかかわるゲノム構造のそのような摂動は、「癌関連ゲノム領域」すなわち「CAGR」と呼ばれる。

30

## 【0004】

染色体脆弱部位は、癌の病因に関連付けられる、別のクラスの染色体特徴部である。染色体脆弱部位は、中期にDNA合成がかき乱されるときに、ギャップ又は切断の異常に高い発生を示すゲノムDNA領域である。これらの脆弱部位は、「稀」又は「一般的」に分類される。それらの名称が示唆するように、稀な脆弱部位は珍しい。そのような部位は、ジヌクレオチド又はトリヌクレオチドリピートと関連し、葉酸欠乏によって中期染色体で誘導することができ、メンデル方式で分離する。例示的な稀な脆弱部位は、脆弱X部位である。

## 【0005】

40

DNAポリメラーゼを抑制するアフィドコリン(aphidocolin)又は5-アザシチジンの存在下で細胞が増殖する場合、一般的な脆弱部位が現れる。少なくとも89個の一般的な脆弱部位が同定され、少なくとも一つのそのような部位があらゆるヒト染色体で見出される。したがって、それらの機能は十分に理解されていないが、一般的な脆弱部位はヒト染色体構造の基本成分をなす。

## 【0006】

脆弱部位のin vitro誘導は、姉妹染色分体交換反応の増加、並びに高い割合の染色体欠失、増幅及び転位をもたらすが、脆弱部位は、in vivoで染色体破壊点と共存している。また、腫瘍細胞で研究された最も一般的な脆弱部位は、大きな、遺伝子座内の欠失又は転位を含み、複数の脆弱部位の欠失を有するいくつかの腫瘍が特定されている。したがって

50

、染色体脆弱部位は、癌細胞で普通に見られる染色体病変の多くの生成に機械学的に関与する。

【 0 0 0 7 】

すべての悪性細胞は、腫瘍性タンパク質又は腫瘍サプレッサーの遺伝子をコードするDNA遺伝子座で、特異的变化を有する(Balmainら、2003; Wooster and Weber、2003)。この共通する特徴は近年拡張され、癌の開始及び進行に同様に關与する、マイクロRNA(miRNA)(Ambros、2004)と呼ばれる大きなクラスの非コードRNA(ncRNA)を含む(Calinら、2002; Croce and Calin、2005; Berezikov and Plasterk、2005a; Esquela-Kerscher and Slack、2006; Calin and Croce、2006a)。miRNAは、転写レベル及び転写後レベルの両方で、遺伝子発現の調節に影響を及ぼす(Ambros、2003; Ambros、2004)。

10

【 0 0 0 8 】

ヒト腫瘍形成におけるmiRNAの關与及び他のクラスのncRNAの關与の程度は、未知である。したがって、癌で変化している分子機構及びシグナル伝達経路のさらなる研究の必要性がある。

【 0 0 0 9 】

新しい分子マーカー及び可能な治療剤を同定する、さらなる必要性がある。

【 0 0 1 0 】

ヒトゲノムの超保存領域(UCR)(Bejeranoら、2004b)も、様々な種でほぼ完全に保存されているmiRNAである(Berezikovら、2005b)。例えば、miR-16-1/miR-15aクラスターの活性分子は、慢性リンパ球性白血病(CLL)の開始で必要不可欠な役割を果たすこと(Calinら、2005a)、及び、それらがヒト、マウス及びラットで完全に保存され、配列決定された霊長類10種中9種で高度に保存されていることが分かっている(Berezikovら、2005b)。比較配列解析は、いくつかの高度に保存されているゲノム配列を同定した。これらの領域のいくつかはタンパク質に翻訳される転写産物を生成せず、したがって、非遺伝子であると考えられる。様々な名称が、このクラスの配列に適用されている:保存非遺伝子配列(CNG)(Dermitzakisら、2005)、保存非コード配列(CNS/CNC)(Meisler、2001)、複数種保存配列(MCS)(Thomasら、2003)又は高度保存領域(HCR)(Duretら、1993)。

20

【 0 0 1 1 】

UCRは、遺伝子間及び遺伝子内の両方の領域に位置する、保存配列のサブセットである。それらは、ヒト、ラット及びマウスゲノムの相同分子種の領域の間で完全に保存されている(100%)(Bejeranoら、2004b)。保存配列の他の領域と対照的に、UCRの53%は非エクソン(『N』、256/481、タンパク質をコードしている証拠はない)と分類されているが、他の47%は、エクソン(『E』、111/481、既知のタンパク質コード遺伝子のmRNAと重複)又は推定エクソン(『P』、114/481、タンパク質コード遺伝子との重複の非確定的証拠)と称されている。

30

【 0 0 1 2 】

非コード機能的ゲノム領域の転写産物の大部分は、重要なRNA二次構造を有し、機能的非コード重要性を有する他の配列を含むクラスターの成分である(Bejeranoら、2004a)。UCRは、おそらく機能的であるが、タンパク質をコードしていないヒトゲノムの小分画を表し、ヒトゲノムの「ダークマター」と呼ばれている(Bejeranoら、2004a)。高度の保存のため、UCRは、哺乳動物及び他の脊椎動物の個体発生及び系統学のために、基本的な機能的な重要性を有するかもしれない。このことは、400,000,000年以上前の総鰭及び陸生脊椎動物で活性であって、「生きている化石」シーラカンスで活性が維持されている、新規レトロポゾンに由来する遠位エンハンサー及び超保存エクソンの最近の知見によって例示された(Bejeranoら、2006)。

40

【 0 0 1 3 】

UCRの機能的な重要性のさらなる実験的証明は、標的突然変異を有するマウスの分析に基づく。超保存エレメント及び高度保存配列を欠く遺伝子砂漠のメガベース欠失は、見かけ上検出可能な表現型なしで発達した生存可能なマウスをもたらした(Nobregaら、2004)。

50

対照的に、いくつかのUCRを含む遺伝子砂漠(例えば、ヒト染色体13q21.33上のDA CHI 遺伝子を囲む二つの遺伝子砂漠)は、そのいくつかはUCR配列で構成される、長距離エンハンサーを含むことが示された(Nobregaら、2003)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

癌関連疾患の療法のかなりの研究にもかかわらず、これらの疾患の診断及び効果的治療は困難なままである。したがって、癌を診断及び/又は治療するための改善された方法の必要性が、当技術分野にある。本発明はこれらの必要性を満たし、他の関連する利点をさらに提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

大きな一団のヒト白血病及び癌腫における、UCRの状態の完全なゲノム調査が、本明細書で記載される。

【0016】

様々な正常試料及び癌試料において、UCRのゲノム全体での発現を調査し、これらの配列のゲノム内の位置と癌に關与する既知の領域との間の関係を調べた。

【0017】

さらに、癌関連UCRの転写調節における、miRNAの機能的役割を特定した。

20

【0018】

差示的に発現されるUCRが悪性細胞の機能的特性を変化させることができるであろうという、癌系での証拠も本明細書で記載される。

【0019】

これらのデータを、ヒト腫瘍形成におけるmiRNAを含む精巧モデルと組み合わせることによって、コードRNA及び非コードRNAの両方の変化が悪性腫瘍の開始及び進行において協力するモデルも、本明細書で記載される。

【0020】

広い一態様では、ヒト癌を区別する方法であって、一つ又は複数の転写された超保存領域(T-UCR)発現プロファイルを用いることを含み、UCRのゲノム位置と分析された癌関連ゲノムエレメントとの間の関連が、統計的に高度に有意であり、miRNAに関して報告されたものと比較しうるもの(comparable)である方法が本明細書で記載される。

30

【0021】

添付の図に照らして読めば、以下の好ましい実施形態の詳細な説明から、本発明の様々な目的及び利点が当業者に明らかになる。

【0022】

本特許又は出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも一つの図面を含む。一つ又は複数のカラー図面を有する本特許又は特許出願公開公報の写しは、請求及び必要な料金の支払いにより当局から提供される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

40

【図1A】様々なタイプのUCRの転写の特徴を示す図である。正常組織における様々なUCRの発現を示すノーザンプロット。uc.246(E)及びuc.269A(N)の場合、RACEクローン化実験により長い転写物の存在が確認された。いくつかの組織に関して、再現性を確認するために二組の試料を調達した。標準化はU6を用いて行った。左側の矢印は同定した転写物を示す。

【図1B】正常なCD5+/CD19+リンパ球及び悪性CLL試料において、T-UCR291及び73Aの発現(18S rRNAを基準にした)を、qRT-PCR(グラフ)及びマイクロアレイ解析(標準化した数はグラフの下)により確認した。P値はqRT-PCR及びマイクロアレイの両データの統計比較について有意であった。各ボックスは正常(青)及びCLL患者(赤)について測定した発現の分布を表しており、ボックスの端は25th及び75thパーセンタイルを定義し、線は中央値を示し

50

、パーは10th及び90thパーセンタイルを定義している。

【図1C】マイクロアレイ解析により明らかになった、19組織の一つ又は複数で発現しているUCRの数。UCRタイプ(E、N、P)の数を対象としている。次の四タイプの転写が見つかった:(19の異なる組織のうち18又は19で)偏在的に発現するUCR、大部分の組織(10から17)で発現するUCR、一部の組織(2から9)で発現するUCR、及び組織特異的に発現するUCR。

【図1D】分析したすべての組織において、(一方向及び双方向の両方で)偏在的に転写された各UCRタイプ(E、N、P)の割合。各UCRタイプの絶対数はボックスの中に示す。

【図1E】異なる三人のドナーに由来するCD19+B細胞における、18S rRNAと比較したときの、センス又はアンチセンス鎖のUCR73、133及び269の発現。センス/アンチセンス鎖特異的リアルタイムRT-PCRは、マイクロアレイ解析で観察されたUCRの鎖特異的発現を検証するのに用いた。CDS+試料に関するマイクロアレイ結果の平均+1-標準偏差は、各グラフの下に示す。マイクロアレイのプロープについて、センスゲノムのプロープは「+」、一方、相補配列のプロープは「A+」と名付ける。

【図2A】UCR発現による組織及び腫瘍の階層的クラスター化を示す図である。22の正常なヒト組織(図2A)、及び非エクソンのUCRチップを用いて作られる133の白血病及び癌腫(図2A/B)の監督のないクラスター。組織のタイプ(図2A)又は癌腫と白血病(図2B)とをはっきりと区別するいくつかのT-UCRは右に展開している。試料は柱に、T-UCRは列に示す。緑色の遺伝子は、すべての試料における発現の中央値と比較して下方制御であり、赤は上方制御、黄色は変化がないことを意味する。組織及び腫瘍の完全なUCRのプロファイルは、図5及び6で見出すことができる。

【図2B-1】UCR発現による組織及び腫瘍の階層的クラスター化を示す図である。22の正常なヒト組織(図2A)、及び非エクソンのUCRチップを用いて作られる133の白血病及び癌腫(図2A/B)の監督のないクラスター。組織のタイプ(図2A)又は癌腫と白血病(図2B)とをはっきりと区別するいくつかのT-UCRは右に展開している。試料は柱に、T-UCRは列に示す。緑色の遺伝子は、すべての試料における発現の中央値と比較して下方制御であり、赤は上方制御、黄色は変化がないことを意味する。組織及び腫瘍の完全なUCRのプロファイルは、図5及び6で見出すことができる。

【図2B-2】図2B-1の続きである。

【図3A】T-UCRはmiRNAの直接標的であることを示す図である(上から順にそれぞれ配列番号1~3、2、4~8及び2)。T-UCR::miRNAの相補部位の例。uc.348::miR-155対は、より高レベルの相補性が見出された他の四つの相互作用遺伝子対とは対照的に、低レベルの相補性の例として示す。

【図3B】九人のCLL患者におけるmiR-155、uc.160及びuc.346A発現に関する、qRT-PCRによる相関。四人の異なる個体に由来するリンパ球を正常対照として使用した。

【図3C】直接的なmiRNA::T-UCRの相互作用。ホタルルシフェラーゼ発現の相対的な抑制をトランスフェクション対照ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼに基準化した。pGL-3(Promega)を空のベクターとして使用した。すべての実験はトリプリケートで四から八回行った(n=12-24)。

【図3D】MEG-01細胞へのmiR-155のトランスフェクションによるuc.160及びuc.346Aの発現レベルへの影響。影響は、トランスフェクトして0、24、48時間後にqRT-PCRにより測定した。

【図3E】mir-24-1とuc.160の発現値との、及びmiR-155とuc.346Aの発現値との二つの散布図を示す。回帰直線はこれらの二遺伝子間の負の相関を示す。対応するアレイプロープの名前はY及びX軸上に示す。両プロープによりmiRNA遺伝子の成熟形態が認識される。

【図4A】T-UCR73A(P)は結腸癌細胞においてオンコジーンとして働くことを示す図である。COLO-320細胞における様々なsiRNAによる発現抑制。基準値として発明者らはDharmacon社製のsiRNA対照を用いた。最も効果的な二つのsiRNA、及びこれら二つを含む四つの異なるsiRNAプールを用いた。

【図4B】COLO-320結腸直腸癌細胞におけるsiRNA-uc73Aを使用したuc.73A(P)遺伝子発現の減少の抗増殖効果。すべての結果は個々のトリプリケートの三実験の中央値を表してい

10

20

30

40

50

る。uc.73A(P)の発現レベルはRT-PCRにより測定した。二個のアスタリスクは $P<0.01$ で統計的に有意な効果を示し、一個のアスタリスクは $P<0.05$ である。

【図4C】COLO-329細胞におけるアネクシン-V染色アッセイにより示されるように、(様々なsiRNAを用いた)uc.73A(P)レベルの減少により、アポトーシスが增強する結果となる。基準値として発明者らはDharmacon社製のsiRNA対照を用いた。

【図4D】様々なsiRNAによるuc.73A(P)の阻害は、SW620結腸癌細胞の生存には影響を与えなかった。すべての結果は、個々のトリプリケートの三実験の中央値を表している。

【図5】ノーザンブロットによる、ヒトの正常及び悪性組織におけるUCR発現を示す図である。正常な単核細胞(MNC)及びCLL試料におけるuc.192(N)及びuc.246(E)についての発現を示す。標準化はU6プローブを用いて行った。左側の矢印は同定した転写物を示す。ゲル画像の下にあるのは、マイクロアレイ実験による、CLL及びMNC試料における標準化したUCRの平均発現値である。P値はANOVA統計から得た。

【図6】qRT-PCRによる、ヒトの正常及び悪性組織におけるUCR発現を示す図である。qRT-PCRによる、CD5+/CD19+陽性リンパ球及びヒト慢性リンパ球性白血病(CLL)試料における相対的な遺伝子発現。CLL及びCD5+試料のUCRマイクロアレイ値は、グラフの下に示す。P値はANOVA統計から得た。

【図7】22個の正常なヒト組織のT-UCR発現プロファイルを示す図である。組織及びUCRのクラスター化により、正常なヒト組織における異なるUCR発現パターンが明らかになった。試料は柱に、T-UCRは列に示す。緑色の遺伝子は、すべての試料における発現の中央値と比較して下方制御であり、赤は上方制御、黄色は変化がないことを意味する。

【図8】173の癌及び対応する正常組織のT-UCR発現プロファイルを示す図である。白血病及び正常な血液細胞に由来する試料は、上皮起源の癌及び組織とは区別される。試料は柱に、T-UCRは列に示す。緑色の遺伝子は、すべての試料における発現の中央値と比較して下方制御であり、赤は上方制御、黄色は変化がないことを意味する。

【図9】定量的RT-PCRによる、様々な結腸癌細胞系におけるuc.73A(P)遺伝子の発現を示す図である。正常な結腸での発現は、四つの異なる試料の中央値として表す。標準化のため発明者らはベータ-アクチンを使用した。

【図10】48時間での、COLO-320及びSW-620細胞におけるsiRNA1によるuc.73A(P)の阻害を示す図である。対照のsiRNA(Dharmacon)と比較して、両タイプの細胞で、阻害はかなりのレベルに達した。これにも関わらず、生物学的な影響はCOLO-320細胞でのみ確認され、正常結腸での発現と比較したときにT-UCRは約2.5倍過剰発現する。

【図11】uc.73A(P)の低分子干渉による下方制御によって、SW-620細胞ではなく、COLO-320細胞でアポトーシスを引き起こすことを示す図である。COLO-320(上のパネル)においてカスパーゼ-3アッセイを用いて得たデータであり、アポトーシス性細胞の有意な増加が見られ、対照細胞SW620(下のパネル)では差が見られなかった。COLO-320は高レベルのuc.73A(P)を発現し、SW620での発現は正常結腸のレベルと同程度である。

【図12-1】表1。白血病及び癌腫において最も有意に差示的に発現したUCR。

【図12-2】図12-1の続きである。

【図13】表2。UCRと対象とする領域との関連としての混合効果ボワソン回帰結果。

【図14】表3。CLL患者において差示的に発現する相補miRNAと逆相関する発現を有するT-UCR。

【図15-1】表4。22のヒト正常組織におけるT-UCR発現(三つの組織は重複しており、二人の異なる個体に由来する)。

【図15-2】図15-1の続きである。

【図15-3】図15-2の続きである。

【図15-4】図15-3の続きである。

【図15-5】図15-4の続きである。

【図15-6】図15-5の続きである。

【図15-7】図15-6の続きである。

【図15-8】図15-7の続きである。

10

20

30

40

50

- 【図 15 - 9】図 15 - 8 の続きである。
- 【図 15 - 10】図 15 - 9 の続きである。
- 【図 16 - 1】表5。ANOVA解析 (GeneSpring GX software) により  $P < 0.005$  で同定された CLL、CRC 及び HCC において差示的に発現する T-UCR。
- 【図 16 - 2】図 16 - 1 の続きである。
- 【図 17 - 1】表6。UCR のゲノム位置は CAGR ((Bejerano ら、2004) 及び (Calin ら、2004) などのデータベース) と相関する。
- 【図 17 - 2】図 17 - 1 の続きである。
- 【図 17 - 3】図 17 - 2 の続きである。
- 【図 17 - 4】図 17 - 3 の続きである。
- 【図 17 - 5】図 17 - 4 の続きである。
- 【図 17 - 6】図 17 - 5 の続きである。
- 【図 17 - 7】図 17 - 6 の続きである。
- 【図 17 - 8】図 17 - 7 の続きである。
- 【図 18 - 1】表7。CLL 患者における miRNA の発現と T-UCR との負の相関。すべてについて FDR 法により 0.01 閾値で負の相関を検証し、或いは 1% の偽陽性結果、及び R 相関が 0.40 より低いものは考慮した。
- 【図 18 - 2】図 18 - 1 の続きである。
- 【図 18 - 3】図 18 - 2 の続きである。
- 【図 18 - 4】図 18 - 3 の続きである。
- 【図 18 - 5】図 18 - 4 の続きである。
- 【図 18 - 6】図 18 - 5 の続きである。
- 【図 18 - 7】図 18 - 6 の続きである。
- 【図 18 - 8】図 18 - 7 の続きである。
- 【図 18 - 9】図 18 - 8 の続きである。
- 【図 18 - 10】図 18 - 9 の続きである。
- 【図 18 - 11】図 18 - 10 の続きである。
- 【図 18 - 12】図 18 - 11 の続きである。
- 【図 18 - 13】図 18 - 12 の続きである。
- 【図 18 - 14】図 18 - 13 の続きである。
- 【図 18 - 15】図 18 - 14 の続きである。
- 【図 18 - 16】図 18 - 15 の続きである。
- 【図 18 - 17】図 18 - 16 の続きである。
- 【図 18 - 18】図 18 - 17 の続きである。
- 【図 18 - 19】図 18 - 18 の続きである。
- 【図 18 - 20】図 18 - 19 の続きである。
- 【図 18 - 21】図 18 - 20 の続きである。
- 【図 18 - 22】図 18 - 21 の続きである。
- 【図 18 - 23】図 18 - 22 の続きである。
- 【図 18 - 24】図 18 - 23 の続きである。
- 【図 18 - 25】図 18 - 24 の続きである。
- 【図 18 - 26】図 18 - 25 の続きである。
- 【図 18 - 27】図 18 - 26 の続きである。
- 【図 18 - 28】図 18 - 27 の続きである。
- 【発明を実施するための形態】
- 【0024】

本明細書で用いるように、「CAGR」は、正常な DNA とは異なる、癌と相関している遺伝的又はエピジェネティックな変化 (又は遺伝的又はエピジェネティックな変化の可能性) を含む、ゲノム DNA の任意の領域を含む。例示的な遺伝的变化には、一本鎖及び二本鎖の切断 (可能なオンコジーン又は腫瘍抑制遺伝子の中又はその近くの一般的な破壊点領域を含

む);染色体転位;DNA内の突然変異、欠失、挿入(ウイルス、プラスミド又はトランスポゾンの組込みを含む)及び増幅(遺伝子複製を含む);腫瘍抑制遺伝子の存在を示唆するヘテロ接合性の喪失(LOH)の最小限の領域;並びに、オンコジーンが存在を示唆する増幅の最小限の領域が含まれる。例示的なエピジェネティックな変化には、DNAメチル化パターンの任意の変化(例えば、特にプロモーター領域でのDNAの高メチル化又は低メチル化)が含まれる。

【0025】

ヒトゲノム中の既知のmiR遺伝子の多くは、CAGRの中又はその近くにあり、それらには、LOHの最小限の領域又は様々な癌と相関する増幅の最小限の領域に正確に位置する、80個のmiR遺伝子が含まれる。他のmiR遺伝子は、破壊点領域、欠失領域又は増幅領域の中又はその近くに位置する。

10

【0026】

例えば、CAGRと関連する癌には、白血病(例えば、AML、CLL、前リンパ性白血病)、肺癌(例えば、小細胞及び非小細胞肺癌)、食道癌、胃癌(gastric cancer)、結腸直腸癌、脳癌(例えば、神経膠星状細胞腫、神経膠腫、グリア芽細胞腫、髄芽細胞腫、髄膜腫、神経芽細胞腫)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、上皮癌、鼻咽頭癌(例えば、口若しくは喉頭の扁平上皮癌)、リンパ腫(例えば、濾胞性リンパ腫)、子宮癌(例えば、悪性の線維性組織球腫)、肝臓癌(例えば、肝細胞癌)、頭頸部癌(例えば、頭頸部扁平上皮癌)、腎臓癌(renal cancer)、雄胚細胞腫瘍、悪性中皮腫、骨髓異形成症候群、卵巣癌、膵臓若しくは胆管の癌、前立腺癌、甲状腺癌(例えば、散発的な濾胞性甲状腺腫瘍)及び尿路上皮癌が含まれる。

20

【0027】

本明細書で用いるように、「FRA」は、染色体の任意の稀であるか一般的な脆弱部位、例えば、DNA複製の間に細胞にストレスを与えることによって誘導することができるものを含む。例えば、稀なFRAは、DNA複製の間、細胞に葉酸欠乏を起こさせることによって誘導することができる。一般的なFRAは、DNA複製の間、細胞をアフィドコリン又は5-アザシチジンで処理することによって誘導することができる。染色体脆弱部位の同定又は誘導は、当分野の技術の範囲内である。例えば、その全開示が参照により本明細書に組み込まれる、Arltら(2003)、Cytogenet.

Genome Res. 100:92-100及びArltら(2002)、Genes, Chromosomes and Cancer 33:82-92を参照。

30

【0028】

既知のヒトmiR遺伝子の約20%は、クローン化FRAの(13個のmiR)に、又は3Mb(22個のmiR)内に位置する。実際、脆弱部位の中のmiR遺伝子の相対的な発生は、非脆弱部位でよりも9.12倍高い割合で起こる。さらに、ヒト核型で113個の脆弱部位を研究した後に、61個のmiR遺伝子がFRAと同じ染色体バンドに位置することが判明した。

【0029】

例えば、FRAと関連する癌には、膀胱癌、食道癌、肺癌、胃癌(stomach cancer)、腎臓癌(kidney cancer)、子宮頸癌、卵巣癌、乳癌、リンパ腫、ユーイング肉腫、造血腫瘍、固形腫瘍及び白血病が含まれる。

本発明の好ましい実施形態を示すために、以下の実施例が含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分機能することが発明者によって発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましい形態を構成するとみなすことができることを、当業者は理解するべきである。しかし、当業者は、本開示に照らし、開示されている具体的な実施形態に多くの変更を加えることができること、それにもかかわらず、本発明の精神と範囲から逸脱することなく同様の又は類似した結果を得ることができることを理解するべきである。

40

【実施例1】

【0030】

ゲノム全域のプロファイリングにより、正常なヒト組織における超保存領域(UCR)の広範な転写を明らかにする。

50

## 【 0 0 3 1 】

ヒト癌へのUCRの関与を詳しく調べるために、発明者らはノーザンブロット、定量的PCR (qRT-PCR) 及びマイクロアレイにより、200bp(Bejeranoら、2004b)より長い481のゲノム領域を解析した。

## 【 0 0 3 2 】

エクソン(E)及び非エクソン(N)の両UCRのプロープにより、種々の正常組織に由来する、多岐にわたる長さの(センス又はアンチセンス-A方向の)転写物を検出した(図1A及び図5)。

## 【 0 0 3 3 】

正常のヒト大腸由来のエクソンのuc.246(E)及び正常のヒト骨髄由来の非エクソンのuc.269A(N)に関して5'-及び3'-RACE法によりcDNAをクローン化することにより、転写物の二つの長さを確認した。これらのcDNAはどちらも有意な長さのオープンリーディングフレーム(ORF)を含まず、これらはおそらく非タンパク質コードのものと確認した。発明者らが非コード超保存遺伝子、つまりnc-UCGと名付けたこれらの非スプライス全長cDNAは様々な長さである(超保存遺伝子UCG.246に関しては約0.8kbであり、超保存遺伝子UCG.269Aに関しては約1.8kb及び2.8kbである)。

## 【 0 0 3 4 】

最近、マウス由来のいくつかの長さのncRNAに関して提案されたように(Furunoら、2006)、これらのnc-UCGの転写はポリ-アデニンリッチなゲノム領域から始まる可能性がある。

## 【 0 0 3 5 】

発明者らは、マイクロアレイ解析を用いて正常及び疾患組織由来のいくつかのUCRの転写レベルを比較した後、qRT-PCR及びノーザンブロットによる確認を行った。uc.291(P)及びuc.73A(P)の発現は、CLL細胞中より正常CD5+/CD19+リンパ球中の方が有意に高かった( $P < 0.05$ )(図1B)。このマイクロアレイプラットフォームを用いて得られたデータは、様々な研究で確認されている(Calinら、2005a; Yanaiharaら、2006; Voliniaら、2006)。

## 【 0 0 3 6 】

発明者らのデータの信頼性は、正常なCD5細胞の二つの独立のセットがマイクロアレイ及び定量的RT-PCR実験に含まれるという事実により強化される。uc.291(P)及びuc.73A(P)の両方を、CD5/CD19陽性B細胞及び悪性B細胞の二つの異なるセットにおいてqRT-PCR及びマイクロアレイにより詳しく調べたとき、差示的発現が両アッセイにより統計的に有意であった(図1B)。

## 【 0 0 3 7 】

さらに、11及び六つのUCRそれぞれについてのqRT-PCR及びノーザンブロットの結果は、マイクロアレイの結果と一致した(図5及び図6)。

## 【 0 0 3 8 】

マイクロアレイ解析を用いて、(発明者らがここでT-UCRと名付けた)転写されたUCRの大部分が、正常なヒト組織において、偏在的及び組織特異的な様式の両方で発現することを発明者らは発見した(図1C)。

## 【 0 0 3 9 】

推定T-UCRの約34%(325/962)は、すべての19の組織試料において、バックグラウンドにわたり強度を伴うハイブリダイゼーションシグナルを有した(空スポット+2SDの平均シグナルとして計算した)。T-UCRはB細胞で最も多く見つかり、卵巣で最も少なかった。UCRの約93%(962のうち890)は、少なくとも一つの試料のバックグラウンドにわたり発現し、したがって発明者らはこれらをT-UCRと考えた。三つの異なるタイプのUCRは、類似の頻度：エクソンのUCRの41%、推定エクソンのUCRの33%、及び非エクソンのUCRの30%で転写された。

## 【 0 0 4 0 】

マイクロアレイプラットフォームには、センス及びアンチセンスの両方向の推定T-UCRが含まれる。解析したすべての正常組織において、962のうち84のUCR(9%)は双方向的に転写されたが、241は一本鎖のみから転写された(図1D、図1E及び表4)。



## 【0041】

マイクロアレイ解析による双方向の転写の識別は、ゲノムDNAを含む微量な混入物により妨害されている可能性があるため、発明者らはuc.269(N)、uc.233(E)及びuc.73(P)に関して、マイクロアレイの結果と鎖特異的qRT-PCRとの比較を行った。三例すべてにおいてデータは一致し、一本鎖からの転写が優勢であることが示された(図1E)。

## 【0042】

注目すべきことに、19組織すべてにおいて発現した156の非エクソンのT-UCRの中で、92(60%)は遺伝子間のものであり、64はイントロンのものであった。後者のうち37は、ホスト遺伝子と比べてアンチセンスの方向であり、これは、非エクソンのT-UCRの約83%(129/156)が、既知ホスト遺伝子の長い前駆体転写物のイントロンの転写ではなく、正真正銘独立した非コードの転写物に相当することを示唆する。

10

## 【0043】

miRNA(Liuら、2004)と同様に、発明者らは造血組織(二人の健常者からそれぞれ採取した、Bリンパ球、Tリンパ球及び単核細胞に代表される)、及び非造血組織におけるT-UCR発現の階層的クラスター化を行った。異なる個体由来の同じタイプの組織は、最も近い仲間としてクラスター化した(図2A及び図7)。

## 【0044】

これらの発見は、かなりの割合のケースにおいて、正常なヒト組織でUCRが非コード転写物に相当し、かつこれらのT-UCRの発現が組織特異的であることを、実際に示している。

20

ヒト白血病及び癌腫において異なるUCRの特徴

癌細胞における広範な遺伝子発現の変化は、タンパク質コード遺伝子及びmiRNAの両方で幅広く説明されているため(Esquelea-Kerschler及びSlack、2006;Calin及びCroce、2006a;Calin及びCroce、2006b;Luら、2005)、発明者らは133のヒト癌及び対応する40の正常組織を含む173試料のパネルにおいて、UCR発現を詳しく調べた。

## 【0045】

試料の階層的クラスター化により、様々なタイプの癌がそれらの発生起源に従って別々にクラスター化され、白血病(CLL)及び正常な造血組織は、結腸直腸性(CRC)及び肝細胞性癌腫(HCC)とは別に、それらの正常な組織とともに分岐することが示され(図8)、その上、特定のUCRグループが腫瘍のタイプにより差示的に発現しているように見えた(図2B)。

30

## 【0046】

異なる組織は特異的なUCRサインを有するため、このクラスター化様式は、腫瘍の異なる組織特異的な起源の結果となる可能性がある。したがって、発明者らは同じ起源の正常細胞と腫瘍細胞との間でUCR発現を比較した。962の有力なT-UCRのうち88(9.1%)は、少なくとも一つのタイプの癌で、統計的に有意に高いレベル( $P<0.005$ )で差示的に発現した(表1及び表5)。

## 【0047】

発明者らは、対応する正常組織での発現と比較して、癌におけるT-UCRの下方制御及び上方制御の両方を発見した。各癌タイプと対応する正常組織とを比較することにより、発明者らは、CLLサインが19のUCR(8が上方制御、11が下方制御)、CRCサインが61のUCR(59が上方制御、2が下方制御)、HCCサインが8のUCR(3が上方制御、5が下方制御)で構成されていることを見出した(表5)。

40

## 【0048】

18の転写物のサインはエクソンのUCR(20%)、28は推定エクソンのUCR(32%)、及び42は非エクソンのUCR(48%)であった。18のエクソンのT-UCRのうち9は、アンチセンス方向の既知ホストタンパク質コード遺伝子転写物を表した。したがって発明者らは、T-UCR発現プロファイルがヒト癌を区別するのに使用することができることを実際に示した。

UCRは高頻度で脆弱部位及び癌関連ゲノム領域に位置する

発明者らは、記載のように(Calinら、2004b)、以前に報告されている、ヒト腫瘍及びクロン化脆弱部位(FRA)で特定された非ランダムな遺伝子変異のゲノム位置と、UCRのゲノ

50

ム位置とを比較した。発明者らは、以前に報告した186のmiRNAセット(Calinら、2004b)、及び癌との関連が示されている既知の転写因子ファミリーである、297のジンクフィンガータンパク質コード遺伝子(ZNF)(genome.ucsc.edu)のセットを使用した(Huntleyら、2006)。

#### 【0049】

発明者らは、miRNA遺伝子が高頻度に、FRA部位、HOX遺伝子クラスター、及び最小ヘテロ接合性欠失(LOH)領域や最小増幅領域などの癌関連ゲノム領域(CAGR)と包括的に名付けられた癌に関連するゲノム領域に位置することを以前に報告した(Calinら、2004b)。

#### 【0050】

高解像度アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)を用いた最近の研究では、miRNA座位がヒト癌において高頻度でゲノム変異を示すことを確認した(Zhangら、2006)。さらに、別のグループは、NCI-60細胞系でのmiRNA発現の解析により、候補腫瘍抑制因子及び腫瘍形成性miRNAがCAGRに位置していることを見出した(Gaurら、2007)。

#### 【0051】

ここで発明者らは、UCRのゲノム位置と解析した癌関連ゲノムエレメントとの関連が統計的に極めて有意であり、miRNAについて報告したものに匹敵することを示す。ZNF転写因子は解析したいかなる対象とする領域とも任意の有意な関連を示さなかった(表2及び表6)。

#### 【0052】

RNAスプライシングに関係するタンパク質コード遺伝子(80遺伝子、データは示していない)の比較的小さなファミリーについて類似の関連欠如があった。例えば、UCR又はmiRNAと、非欠失ゲノム領域に対する最小LOH領域との関連についての確率は、両例において0.01より低かった(それぞれIRRは2.02及び4.08)。内部対照として、発明者らはFRA部位で頻繁に生じる、ヒトパピローマウイルス16(HPV16)組込み部位を用いた。もしUCRが有意にFRAと関連していれば、そのとき発明者らはHPV16組込み部位との関連を発見することを期待した。これはまさに、発明者らが、ZNFタンパク質コード遺伝子又はRNAスプライシング関係タンパク質コード遺伝子についてではなく(データは示していない)、UCRとmiRNAの両方について観察したことである(表2)。

#### 【0053】

追加のデータはUCRのゲノム位置の重要性を例証する。第一に、発明者らは偏在的に発現するT-UCR(図1C。18又は19の正常組織で発現する)が、他のすべてのUCRと比較したときに、有意により高頻度でCAGRに位置することを発見した( $P < 0.005$ 、Fisher直接確率検定)(292中71に対して189中97)。第二に、ヒト癌において差示的に発現するT-UCRは、特に癌タイプのものと関連するCAGRに位置する。例えば、染色体領域13q21.33-q22.2は、家族性CLLに対する感受性と関係がある(Ngら、2007)。この区間において、スクリーニングした13のどのタンパク質コード遺伝子も変異は見られなかった。

#### 【0054】

発明者らはこのCAGR内に位置する七つのUCRクラスター(uc.347からuc.353)を特定した。それらのうち二つ、つまりuc.349A(P)及びuc.352(N)は、正常と悪性B-CLL CD5陽性細胞との間で差示的に発現するT-UCRの中にある。

#### 【0055】

このことは、少なくともこのケースにおいて、CAGRに位置する「未知」犯人を演じているのは、タンパク質コード遺伝子ではなくUCRであることを示唆する。同時にこれらのデータは、UCRが悪性経過の間に変異するゲノム領域に位置するという証拠を提供し、T-UCRが癌感受性についての候補遺伝子である可能性を示唆する。

マイクロRNAとの直接相互作用によるT-UCRの負の調節

ヒト癌に関係するいくつかのUCRの機能的な特徴付けを始めるために、発明者らは上記で詳しく調べたのと同じCLL試料セットで、ゲノム全体の発現試験を行った。発明者らは五つのUCR、つまりuc.269A(N)、uc.160(N)、uc.215(N)、uc.346A(P)及びuc.348(N)のサインが、70kDaゼータ関連タンパク質(ZAP-70)の発現によってそれより前に区別される、二

10

20

30

40

50

つの主なCLL予後グループに区別することができることを発見した。

【0056】

これらの五つのT-UCRは、CLLに関して報告された(Cahnら、2005a)miRNA発現サインと負の相関をもつ、それらの発現レベルの変動を示した(表3)。

【0057】

理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書の発明者は現在、これがmiRNAとT-UCRとの複合体調節機構の可能性を高める発見であると考えている。発明者らは配列アラインメントにより、六つの有力な相互作用対:uc.160::miR-24、uc.160::miR-155、uc.160::miR-223、uc.160::miR-146a、uc.346A::miR-155及びuc.-348::miR-29bを生じさせるサインから、五つのUCRのうち三つが、13のmiRNAのうち五つと有意なアンチセンス相補性を有することを確認した(図3A)。

10

【0058】

この解析したmiRNA::UCR対のセットにおいて、miRNA::mRNA相互作用について説明されている5'末端「6塩基シード」相補性ルールが妥当であり、さらに、3'末端の相補性レベルは、可変:miR-24::uc160対又はmiR-155::uc.346A対については60%より高い相補性、miR-155::uc.160対については25%より低い相補性であった。対照として、ランダムに生じさせた五つのUCRと13のmiRNAの組合せを比較したとき、センス及びアンチセンス相補性は有意ではなかった。

【0059】

特定のT-UCRと予測した相互作用物質miRNAのマイクロアレイ発現値の負の相関は、CLL患者及び正常対照の個々のセットのリンパ球から選択したT-UCR及びmiRNAについて、qRT-PCRにより確認した(図3B)。

20

【0060】

発明者らは、高悪性形態のCLL(Calinら、2005)のいくつかのリンパ腫及び癌腫(Eisら、2005;Kluiverら、2005;Voliniaら、2006)で過剰発現するmiR-155、CLL患者(Calinら、2005a)由来の主な転写物において変異を保有するmiR-24-1及びmiR29-bに関係するmiRNA::UCR相互作用のin vitroアッセイを行った。

【0061】

発明者らは、ルシフェラーゼレポーターベクターにuc.160(N)、uc.346A(P)及びuc.348(N)のUCRをクローン化し、miR-155、miR-24-1又はmiR-29-bとの直接相互作用の可能性を評価した。発明者らは、in vitroで起こる相互作用と一致する四つのmiR::T-UCR対と、一致しかつ再現性のあるルシフェラーゼ発現の減少を観察した(図3C)。

30

【0062】

対比により、ルシフェラーゼアッセイにより示されるようにuc.348(N)はmiR155と相互作用せず、CLL患者でのこれら二つの遺伝子の正の発現相関、及び低い配列相補性と一致する結果である(図3A)。

in vivoでの相互作用

これらの相互作用がin vivoで起こるかどうかを決定するために、発明者らはMEG01白血病細胞にmiR-155をトランスフェクトし、uc.346A及びuc.160(両方ともこの細胞系でよく発現する)のレベルを評価した。トランスフェクトして24時間後、miR-155は両T-UCRの発現レベルを著しく低下させ、48時間後、外来性miR-155レベルの低下はT-UCR発現の上昇により同等になった(図3D)。

40

【0063】

この可逆的な影響により、特定のmiRNAによるT-UCRの調節は支持される。この相互作用が「ZAP-70サイン」の遺伝子について証明されたため、発明者らはCLL患者50人すべてにおいて、ゲノム全域レベルですべてのmiRNAとT-UCRの発現との間の相関を詳しく調べた。興味深いことに、発明者らは87のmiRNA(チップ上にスポットした235のうちの37%)とT-UCR発現レベルとの間に有意な負の相関(誤検出率(FDR)は0.01未満)を見出した(表7)。

【0064】

さらに、発明者らが同定した相関遺伝子のうち、miR-24-1::uc.160及びmiR155::uc346A

50

(P)対は、実験的に相互作用していることが証明された(図3E)。

【0065】

その上、実験的に相互作用していなかったmiR-155及びuc.348は、このリストのメンバーではなかった。発明者らがルシフェラーゼアッセイで陽性と特定した有力な相互作用物質の他の対は、miR-15-a::uc.78及びmiR16::uc.78(データは示していない)であった。したがって、非コードT-UCRはmiRNAの有力な標的として機能し、これらの相互作用は癌患者にとって生物学的及び予後に関する重要な意味をもつ可能性がある。

T-UCRはオンコジーンとして働く可能性がある

T-UCRの機能的特徴付けを発展させるため、発明者らは癌モデルにおいてuc.73A(P)の生物学的影響を調べた。これは統計的に最も有意な結腸癌でのT-UCRの上方制御の一つであるため( $P<0.001$ )、発明者らはuc.73A(P)が高レベルで発現するCOLO-320結腸直腸癌細胞でこの下方制御の影響を詳しく調べることにした。対照として、発明者らはこの遺伝子の発現が正常結腸細胞と区別されないSW620結腸癌細胞を使用した(図9)。

【0066】

二つの小分子干渉RNA(siRNA1及びsiRNA3)、及び四つのsiRNAのプール(siRNAプール)を、uc.73A(P)を標的にするようにデザインし、COLO-320及びSW620細胞にトランスフェクトした。siRNA1、3及びプールで処理したCOLO-320細胞において、48時間後(図4A及び図10)、72及び144時間後に(データは示していない)、uc.73A(P)発現の有意な低下が見られた。SW-620細胞についても同じことが見られた(図6)。

【0067】

COLO-320細胞の成長は、非処理(ヌル)又はsiRNA処理対照細胞の両方と比較して、特定のsiRNAで処理して144時間後に有意に低下した(96時間後は $P<0.05$ 、144時間後は $P<0.005$ )(図4B)。

【0068】

相対的に、SW620対照細胞の増殖には有意な変化がなかった(96及び144時間後はそれぞれ $P=0.83$ 及び $P=0.23$ )(データは示していない)。細胞周期の試験により、SW620細胞ではなく、COLO-320細胞において細胞のsub-G1分画が増加することが明らかになった(アポトーシス性細胞の存在が示唆される。データは示していない)。結果はアポトーシス特異的アネクシンVアッセイ(図4C及び図4D)及びカスパーゼ-3アッセイ(図11)により確認した。

【0069】

さらに、細胞の増殖及び生存への影響の強さは、siRNAによる阻害の度合と比例した(図4)。

【0070】

これらのデータは、結腸直腸癌において、アポトーシスの低下の結果として悪性細胞の数が増加することにより、uc.73A(P)がオンコジーンのように振舞うことを示唆する。

考察

分子腫瘍学の定説によれば、癌は腫瘍抑制因子及び発癌性タンパク質に関係する遺伝的疾患である(Bishop、1991;Hunter、1991;Weinberg、1991)。最近の知見では、解析した癌の大部分の病理発生において、マイクロRNAの関係が強く支持されており、ヒト癌の分子構築に複雑な新しい層を加える(Calinら、2002;Esquela-Kerscher及びSlack、2006;Calin及びCroce、2006a)。しかし、miRNAはまさにヒト癌に関係する特定のncRNAグループを表す。アンチセンスのイントロンのncRNAレベルは前立腺癌における腫瘍分化の度合と相関し(Reisら、2005)、MALAT-1

ncRNA発現は初期段階の非小細胞性肺癌において転移及び生存を予測することが示されており(Jiら、2003)、ncRNAと腫瘍生物学との深いつながりを示唆する。

【0071】

この問題に明確に取り組むために、発明者らは全く新しいncRNAの種類、すなわち転写される非コード超保存領域(T-UCR)をゲノムレベルで詳しく調べた。発明者らはバイオインフォマティクスの手法を使い、推測されるヒト腫瘍形成への関与を示す悪性経過の間に、UCRが、標的とされるゲノム領域に位置することを実際に示した。

## 【 0 0 7 2 】

現在、本明細書に示しているように、発明者らはRACE増幅法によりuc.246(E)及びuc.269A(N)に対応するcDNAをクローン化することができ、UCRが正真正銘、発現されかつ標準的な方法でクローン化できる遺伝子(本明細書ではnc-UCGと名付けた)であることを証明した。

## 【 0 0 7 3 】

ノーザンブロット、qRT-PCR及びゲノム全域マイクロアレイプロファイリングを含む様々な発現技術により、UCRが頻繁に転写され、ヒト白血病及び癌腫において区別できるサインが存在することを証明した。発明者らは、西欧諸国で最も頻度の高い成人白血病である慢性リンパ球性白血病(Chiorazziら、2005)、先進国で最も一般的な癌の一つである結腸直腸癌(de la Chapelle、2004)、及びアメリカで最も急速に増加するタイプの癌である肝細胞性癌腫に焦点を当てた(Wilson、2005)。

## 【 0 0 7 4 】

発明者らは、調べたすべての腫瘍タイプについて、対応する正常細胞と比較したときに、悪性細胞が、発現したUCRの固有のスペクトルを有することを発見し、このことはT-UCR発現における有意な変化が悪性経過に関与していることを示唆する。

## 【 0 0 7 5 】

ヒト癌におけるT-UCR変異の機能的意味を特徴付けることは、普通の作業ではない。T-UCRの無数の推測される機能は、仮説として、タンパク質コード遺伝子又は他の非コードRNAに対するアンチセンスの阻害的役割、或いは、非常に長い前駆体(例えば、通常のmiRNAの二倍の前駆体長を有するuc.339(P))などの特性を備えたmiRNAを意味する「非特異的(aspecific)」miRNAとしての役割が挙げられる。いくつかのUCRは遺伝子のように働かず、エンハンサーとしての制御機能を有することが分かっており(Nobregaら、2003;Pennacchioら、2006)、一方他のUCRは既知/未知の癌との関連をもつエクソンのタンパク質コード遺伝子を表すという事実により、この謎はさらに複雑になっている。特に興味深い領域は、約700kbに七つのUCRを含むDA

CHI座位である(Bejeranoら、2004b)。この領域由来の三つのUCRは、解析した癌において差示的に発現し、二つはCLLサインのメンバーである。マウスモデルにおいてこの座位からスキャンした保存領域の大部分はエンハンサーであり、発明者らの研究で解析したどの組織でも発現しなかったuc.351(N)を含む。

## 【 0 0 7 6 】

興味深いことに、エンハンサー機能を欠損する唯二つの領域は、uc.348(N)及びuc.352(N)であり、両者は非コードとして分類され、かつヒト癌において差示的に発現する。さらに、これらの特定のT-UCRへの関心を高めるのは、このゲノム領域が家族性CLLへの感受性と関連しており、既知のタンパク質コード遺伝子の変異がない(Ngら、2007)という知見である。

## 【 0 0 7 7 】

最近、ヒトゲノムの非コード部分に由来する数十bpのいくつかの短いブロック(pyknonと名付けられた)が、ほとんどすべての既知タンパク質コード遺伝子内に存在することが発見された(Rigoutsosら、2006)。PyknonはUCRと区別されるが、最も多いpyknon(四つ)を含む超保存エレメントは、CLL及びCRCの両方で最も差示的に発現するT-UCRの一つとして発明者らが発見したuc.73(P)であった。これらの興味深い観察により、相補配列をもつコード遺伝子上のuc.73(P)に対する調節機能の可能性が示唆される。

## 【 0 0 7 8 】

さらに、ヒト癌へのこのT-UCRの関与を発展させ、uc.73(P)の過剰発現の減少によりアポトーシスが引き起こされ、このT-UCRが異常に発現する結腸癌細胞において特異的な抗増殖効果を有したため、発明者らは、結腸癌におけるuc.73(P)についての発癌性機能を証明することができた。

## 【 0 0 7 9 】

もう一つのncRNAの種類であるT-UCRが、解析した白血病及び癌腫の高い割合で常にゲノ

10

20

30

40

50

ムレベルで変異しているという発明者らの発見は、コード及び非コードの両遺伝子がヒト腫瘍形成に関与しかつ協同しているというモデル(Calin及びCroce、2006b)を支持する。

【0080】

さらに、CLL患者におけるUCRとmiRNAの発現の間の相関により、二つ以上のタイプのncRNAが相互作用して表現型に影響を与える、複雑な機能的調節経路があるという興味深い可能性が高まる。

【0081】

発明者らはまた、二つの異なるタイプのncRNAが相互作用する、miRNA::T-UCR相互作用の存在を実際に示した。

【0082】

nc-UCGが白血病及び癌腫の高い割合で常にゲノムレベルで変異しており、白血病においてmiRNAと相互作用している可能性があることを発明者らは発見した。この発見は、コード及び非コードの両遺伝子がヒト腫瘍形成に関与しかつ協同しているというモデルについての裏付けを与える。

実施例I

実験手順

A) RACE法によるクローン化、並びにマイクロアレイ、qRT-PCR及びノーザンブロットによる発現解析

1) RACE法によるクローン化

6個のUCR(uc.47(N)、uc.110(N)、uc.192(N)、uc.246(E)、uc.269A(N)及びuc.352(N))の発現を、脳、精巣、骨髄、小腸、結腸及び肝臓の組織中で、短い産物を増幅するために設計したPCRプライマーの種々の組合せを使用して解析した。これらの産物は、マイクロアレイ解析におけるプローブとして使用した40塩基長のUCR配列、及び完全な>200bpのUCR配列を含んだ。UCR産物のうちの2個、すなわち、1個のエクソンuc.246(E)及び1個の非エクソンuc.269A(N)を、RACE(Rapid Amplification of cDNA End)法によって、5'方向及び3'方向の両方にクローン化した。配列をクローン化した組織源は、製造元のプロトコール(Marathon-ready cDNAs、Clontech、Palo Alto、CA)に従って、骨髄、白血球、胎生期の脳及び結腸であった。

2) マイクロアレイによるUCR発現研究。

【0083】

全RNAを、Trizolを(Invitrogen、Carlsbad、CA)用いて、19個の正常なヒト組織(Liuら、2004)、及びCLLと診断された患者からの50個のCLL試料から抽出した。インフォームドコンセントを、米国内のCLL Research Consortium機関におけるすべての患者から得た。(Calinら、2005a)の報告に従って、対照として、六人の健常な個体からのCDS+ B細胞(4個の個別の試料、二人の異なる健常な個体からプールした2個の試料)、及び三人の個体からの単核細胞(MNC)を使用した。また、RNAも、University of Ferrara、University of Bologna及びUniversity Tor

Vergata、Rome(Italy)において収集した78個の原発性結腸直腸細胞腫、21個の正常な結腸粘膜、9個の肝細胞の原発性細胞腫及び4個の正常な肝臓から抽出した。すべての試料は、ヒト対象を保護するための機関のガイドラインに従って、書面によるインフォームドコンセントと共に得た。

【0084】

マイクロアレイチップを、(soe.ucsc.edu/~jill/ultra)に示すように、全部で481個のヒトUCR配列を用いて開発した。各UCRについて、2個の40塩基長のプローブを設計し、一方は、センスゲノム配列(「+」と名付けた)に対応し、他方は、相補配列(「A+」と名付けた)に対応した。設計の基準は、(Liuら、2004)の記載に従った。各オリゴを、デュプリケートで、二つの異なるスライドの場所にプリントし、したがって、四通りの数値が解析のために入手可能であった。数千個(3484個)のブランクスポットを、バックグラウンド除去のために使用した。UCRマイクロアレイのアセンブリー、標的の調製及びアレイのハイブリダイゼーションからなるRNA抽出及びマイクロアレイ実験を、他所の詳細な記載(Liuら

10

20

30

40

50

、2004; Calinら、2004a)に従って実施した。

【0085】

手短にいうと、各組織試料からの5 $\mu$ gのRNAを、ビオチンを用いて、ランダムヘキサマーを使用する逆転写により標識した。ハイブリダイゼーションを、発明者らのmiRNAチップの第二版(ArrayExpress受託番号:A-MEXP-258)上で実施した。このチップは、962個のUCRプローブ、238個の成熟miRNAについてのプローブ、及び143個の前駆体miRNAについてのプローブを含有した。各オリゴを、デュプリケートで、二つの異なるスライドの場所にプリントした。GenePix 4000Bスキャナー(Axon Instruments)を使用して、ハイブリダイゼーションのシグナルを、ビオチンとストレプトアビジン-Alexa647コンジュゲートとの結合によって検出した(一色のシグナル)。GenePix Pro 6.0(Axon Instruments)を使用して、画像を定量化した。

10

【0086】

生データを、GeneSpring GX 7.3(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)中で、正規化し、解析した。22個の組織試料の発現データを、Bioconductor(Limmaパッケージ)中でLowess関数を用いて正規化し、次いで、GeneSpringの正規化を使用して中央値を中心とした。UCRの発現レベルを決定するために使用する閾値を、ブランクスポットの平均+2SD(標準偏差)として計算した。GeneSpringソフトウェアのon-chip及びon-geneの中央値の正規化を使用して、腫瘍を正規化した。階層的クラスタ分析を、類似性の尺度としての平均連結法及びピアソン相関関数を使用して行った。腫瘍と正常組織との統計学的な比較を、倍率変化についてフィルターをかけ、次いで、GeneSpringソフトウェアの分散分析(ANOVA)の統計値、並びに偽陽性の低減のためのBenjamin及びHochbergの補正を使用することによって実施した。倍率変化についてのフィルターは、1.2に設定した。これは、この閾値が、同一のチップを用いたマイクロRNAの解析のためにすでに使用されており[例えば、(Cahnら、2005a; Cimminoら、2005; Iorioら、2005)を参照されたい]、実際の生物学的な差を反映することが実証されていたからである。70kDaのゼータ関連タンパク質(ZAP-70)の発現に従ってグループ化した、CLL患者の間で差示的に発現したT-UCRは、ANOVAの結果をSAM(マイクロアレイの有意差解析)(Significance Analysis of Microarray)及びPAM(マイクロアレイの予測解析)(Prediction Analysis of Microarrays)の解析と組み合わせることによって同定した。それらの発現を、マイクロRNAの発現(Calinら、2005a)と比較した。すべてのデータを、MIAMExpressを使用してArrayExpressデータベースに提出し、これらのデータは、受託番号E-TABM-184を使用して読み出すことができた。

20

30

3)UCRのための定量的RT-PCR。

【0087】

定量的RT-PCRが、マイクロアレイの結果を確認するために発明者らが使用した最初の方法であった。マイクロアレイのデータを、uc.73(P)/73A(P)、uc.135(E)、uc.160(N)、uc.233(E)/233A(E)、uc.269(N)/269A(N)、uc.289(N)、uc.291(P)及びuc.346A(P)を含む11個のUCRについて、50個のCLL試料からなるアレイのセットから無作為に選択された15~17個のCLL試料を含む試料を種々に組み合わせて、かつ種々の正常なCD19+/CD5+ B細胞並びにBリンパ球及びTリンパ球の対照について、qRT-PCRによって検証した。マイクロアレイ研究のためには使用しなかった、3個の正常なCD19+/CD5+陽性B細胞の追加のセットを、AllCells(Berkeley, CA)から購入し、独立した確認セットとして使用した。すべての場合において、qRT-PCRのデータによって、マイクロアレイのデータが確認された。RNAを、リボヌクレアーゼを含有しないデオキシリボヌクレアーゼIを用いて処理し、ランダムプライマー及びSuperScript II逆転写酵素を使用してcDNAに逆転写した。センス又はアンチセンスのUCR転写物が発現するかどうかを決定するために、全RNAを、Thermoscript RT及び遺伝子に特異的な(すなわち、センス又はアンチセンスの)プライマーを使用して逆転写した。RTの条件は、(Schmittgenら、2004)の記載に従った。マイクロアレイ上のオリゴプローブと同一の40bp領域を増幅するために設計したPCRプライマーを使用し、リアルタイムPCR及びサイバークリーンによる検出を使用して、cDNAを増幅した。各UCRの、18S rRNAに対する

40

50

相対的な量を、式 $2^{\text{dCT}}$ (式中、 $\text{dCT} = (\text{CT}_{\text{UCR}} - \text{CT}_{18\text{s rRNA}})$ )を使用して決定した。相対的な遺伝子発現のデータに106を乗じて、表示を簡素化した。

#### 4) T-UCRのノーザンブロット解析。

【0088】

5個のUCR、すなわち、uc.110(N)、uc.192(N)、uc.246(E)、uc.269A(N)及びuc.352(N)を、ノーザンブロットによって解析し、次いで、そのうちの2個を、RACE実験によってクローン化した。第6のuc.47(N)については、データを表示しない。全RNAに対して、15%PAA-尿素ゲル上で電気泳動を行った(Calinら、2002)。RNA源は、11個の正常な組織(乳房、肝臓、肺、腎臓及び膵臓)をデュプリケート又はトリプリケートで含み(Ambion及びClontechから購入した)、実験室で調製した4個の正常なMNC試料及び16個のCLL試料を含んだ。これが、UCRの発現の、ノーザンブロットによる調査を代表するものであることから、同一の組織からの複数の試料を使用して、データの再現性を確認した。マイクロアレイと同一の転写物を検出するために、プローブを、チップ上のオリゴヌクレオチドと同一になるように設計し、ハイブリダイゼーションを(Calinら、2002)の記載に従って行った。

#### B) データベース及び統計学的解析。

##### 1) ゲノムの場所についてのデータベース。

【0089】

本明細書に報告するすべての研究のために使用したUCRのデータベースは、に公開されている(Bejeranoら、2004b)。解析を、200塩基対(bp)を超える長さの481個のセグメントに限定した。脆弱部位(FRA)のデータベース及び癌関連ゲノム領域(CAGR)のデータベースが、以前に公開されている(Cainら、2004b)。

##### 2) ゲノムの場所についての統計学的解析。

【0090】

超保存領域(UCR)の発生には、脆弱部位、癌の場合において増幅されている領域及び癌の場合において欠失している領域と関係があるという仮説を試験するために、ランダム効果のポワソン回帰モデル及び負の二項回帰モデルを活用した。これらのモデルの下では、「事象」をUCRの数と定義し、曝露「時間」(すなわち、脆弱部位対非脆弱部位)を、目的の領域の非オーバーラップの長さとして定義した。領域の「長さ」は、分かっている場合には、その値であり、分かっていない場合には、1Mbと推定した。例えば、各染色体について、すべての非オーバーラップの脆弱部位の全長を計算し、脆弱部位についての曝露時間として使用した。次いで、各染色体について、脆弱部位内に生じているUCRの数を数えた。各染色体の残余の長さ(全部のMb-脆弱部位のMb)は非脆弱であると想定し、各染色体中の残余のUCRは、非脆弱領域で生じると想定した。次いで、各領域について、代替のランダム効果モデル、ゼロ強調ポワソンモデル及びゼロ強調の負の二項モデルを適合させ、それらの三つのうちで、最も良好なモデルを、(パラメータの対数尤度及び数に基づいて)赤池情報量規準(Akaike's Information Criteria)を使用して選択した。これと同一のアプローチを使用して、ジンクフィンガータンパク質の発現からのデータを解析した。UCR及びLOHを有する脆弱部位について、ジンクフィンガータンパク質を用いた場合、最も良好に適合したモデルは、ゼロ強調の負の二項モデルであった。すべてのその他の場合については、ポワソンモデルを報告する。ゼロ事象を有するカテゴリーの数がポワソン分布から予想されるものより多い場合には、ゼロ強調の負の二項モデルが好ましかった。ある領域について事象の全数が少な過ぎる場合には、モデルの尤度の収束が不可能であり、結果は報告されていない。染色体内のデータには相関があると想定した点から、ポワソン回帰モデル、ゼロ強調ポワソン回帰モデル及びゼロ強調の負の二項回帰モデルにおけるランダム効果は、個々の染色体であった。各モデルにおける固定効果は、比較している領域の型についての(一つ又は複数の)指標変数からなった。発明者らは、発生率の比(incidence rate ratio)(IRR)が1.0であるという仮説を試験するために、発生率の比、発生率の比の両側95%信頼区間及び両側p値を報告する。IRRが、有意に>1である場合には、ある領域内でのUCRの数が、偶然によると予想される場合を上回って増加することを示す。

【0091】



miRNA及びジンクフィンガータンパク質のクラスター化の割合を、二つの独立した割合の差の漸近試験を使用して比較し、発明者らは、差、差の95%信頼区間及びp値を報告する。ZNF転写因子のクラスの遺伝子が、マイクロRNAと比較すると、有意により低いクラスター化を示した点は、注目すべきである(クラスターは、50kb未満のゲノムの距離における同一のクラスからの少なくとも2個の遺伝子の場所と定義される)(32%、95/297クラスター化ZNF遺伝子対48%、90/186クラスター化miRNA、差=16.4%、95% CI=(7.5%、25.2%)、 $P < 0.01$ )。すべての計算は、STATA v7.0及びStatXact v7.0を使用して完了した。

3) マイクロアレイの発現におけるUCRとmiRNAとの間の負の相関についての統計学的解析。

#### 【0092】

詳細な説明及びデータは、実施例IIにおいて提供する。手短にいうと、入力データは、T-UCRのリスト及びmiRNA(「シード」)のリスト、並びに発現値の対応する行列によって構成された。遺伝子(miR、UC)の各対について、 $r$ すなわちスピアマンの順位相関係数を計算した。すなわち、相関試験のP値を評価し、所与の排除値(value of rejection)における相関値が有意である遺伝子を選択する。実施した相関試験の数が多いことを考慮して、(Benjamini and Hochberg, 1995)に従って、P値を、複数の試験について誤検出率(false detection rate)(FDR)を使用することによって補正した。このようにして、P値は、本当に無効な試験の数を上回る偽陽性の数を制御し、一方、FDRは、有意な試験の数を上回る偽陽性の数を制御する。

#### C) 機能性の研究

1) マイクロRNAを用いた直接的な相互作用によるUCRの下方制御。

#### 【0093】

uc.160、uc.346A及びuc.348のゲノム配列を、pGL3-コントロールベクター(Clontech)内に、ルシフェラーゼの終止コドンから直ぐ下流のXbaI部位を使用してクローン化した。ヒト巨核球のMEG-01細胞系及び子宮頸癌HeLa細胞系を、ATCCの推奨に従って増殖した。siPORT neoFX(Ambion)を製造元のプロトコールに従って使用して、12穴プレート中で、0.4  $\mu$ gのホタルルシフェラーゼレポーターベクター、及びウミシイタケルシフェラーゼ、pRL-TK(Promega)を含有する0.08  $\mu$ gのコントロールベクターを使用して、細胞に共トランスフェクトした。各穴について、10nMのmiRNA-センス前駆体及びスクランブルしたオリゴヌクレオチド(Ambion)を使用した。ホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの活性を、トランスフェクトして24時間後に、Dual-luciferaseアッセイ(Promega)を使用して連続して測定した。すべての実験を、トリプリケートで、日を変えて四～六回実施した( $n = 12 \sim 18$ )。

#### 【0094】

超保存RNA及び成熟miRNAの両方の発現を、リアルタイムPCRを使用して解析した。UCRのRNAの発現は、上記に従って、リアルタイムPCRによって決定した。成熟miRNAの発現は、(Chenら、2005)の記載に従って、miR-155に対するTaqManループ構造プライマーアッセイ(Applied Biosystems)を使用して実施した。成熟miRNAの発現を、 $2^{-\Delta CT}$ (式中、 $\Delta CT = CT_{miRNA} - CT_{1 ss rRNA}$ )で表し、データに106を乗じて、表示を簡素化した。

#### 【0095】

患者の相関については、13個の試料からなるセットを使用し(9個のCLL患者試料及び4個の正常なリンパ球試料を含む)、miR-155、uc.346A及びuc.160のレベルを、本明細書の記載に従って解析した。miR-155トランスフェクションのMEG01内における「in vivo」効果を同定するために、uc.346A及びuc.160のレベルを、トランスフェクトして0、24及び48時間後に、記載に従って、qRT-PCRによって、pre-miRNA 155(Ambion)を用いて、Lipofectamine試薬を使用して測定した。

2) uc.73A(P)阻害による癌細胞の増殖に対する効果。

#### 【0096】

uc.73A(P)に対するsiRNAを、Dharmaconアルゴリズム(Dharmacon siDESIGN(dharmacon.com/sidesign))を使用して、UCRの完全配列を入力して設計した。8個の最も順位の高い標的配列を試験した。性能を、トランスフェクトして48、72及び144時

間後に、半定量的RT-PCRによって決定した。最も有効な2個のsiRNA、及びこれら2個を含む4個の異なるsiRNAのプールを使用した。これらを、siRNA1、siRNA3及びsiRNApoolと名付けた。細胞増殖アッセイのために、ヒト結腸癌細胞系であるCOLO-320及びSW620を、10% FBSを補ったRPMI1640培地中で増殖し、トランスフェクション1日前に、 $1 \times 10^4$ 個の細胞を、96穴プレート中に蒔いた。細胞に、siRNA-uc.73A(P)を200nMの最終濃度で、Lipofectamine 2000(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)を使用して、製造元のプロトコールに従ってトランスフェクトした。siCONTROL Non-Targeting siRNA Pool(Dharmacon Research、LaFayette、CO、USA)を、陰性対照として使用した。トランスフェクションを、同一条件下で、2日毎、第48時及び第96時に繰り返した。細胞数を評価するために、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega

U.S.、Madison、WI、USA)を使用した。第0時、第48時、第96時及び第144時のそれぞれにおいて、ELISAプレートリーダー(Spectra MAX、Molecular Devices、Sunnyvale、CA、USA)を使用して、490nmにおける吸光度を測定して読取りを実施した。細胞増殖アッセイは、各処理について、トリプリケートで三回実施した。0時と比べた、種々の時点における細胞数間の統計学的な差を、t検定を使用して計算した。

10

#### 【0097】

細胞周期アッセイ及びアポトーシスアッセイの両方のために、細胞を、6穴プレート中に、1穴当たり $6 \times 10^5$ 個の細胞で蒔いた。翌日、及びその後は48時間毎に、細胞に、200nMのsiRNAをトランスフェクトした。細胞を収集し、冷却した70%エタノール中で、少なくとも30分間固定した。ヨウ化プロピジウム(PI)染色を、第48時、第96時及び第144時に、50  $\mu$ g/mL

20

PI(Sigma Aldrich、St. Louis、MO)及び5.  $\mu$ g/mLのリボヌクレアーゼもデオキシリボヌクレアーゼも含有しないPBS溶液(Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA)中で実施した。アポトーシス染色を、第0時及び第144時に、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(BD Pharmingen、San Jose、CA、USA)及びPE-コンジュゲートモノクローナル活性カスパーゼ-3抗体アポトーシスキット(BD Biosciences)を用い、FACS Calibur(BD Biosciences、San Jose、CA、USA)を使用して製造元の手順に従って実施して、データを得た。各実験を三回実施した。

#### 【0098】

この研究に記載したクローン化したT-UCRのGeneBank受託番号を以下に示す。DQ644536(UCG.246)、DQ644537(UCG.269A、短い形態)、及びDQ644538(UCG.269A、長い形態)。

30

#### 実施例II

#### 実験手順

マイクロアレイの発現におけるUCRとmiRNAとの間の負の相関についての統計学的解析。

#### 【0099】

入力データは、UCGのリスト及びmiRNA(「シード」)のリスト、並びに発現値の対応する行列によって構成された。遺伝子(miR、UCR)の各対について、 $r$ すなわちスピアマンの順位相関係数を計算した。これは、順位付けに基づいた、データの傾向の相関のノンパラメトリックな尺度である。すなわち、相関試験のP値を評価し、所与の排除値における相関値が有意である遺伝子を選択した。相関値が分散していると想定して、P値の評価を、スチューデントの累積分布を使用して、マイクロアレイ実験中の試料の数に対応するいくつかの自由度を用いて実施した。P値は、(複数の遺伝子の間における)単一の相関の「良好さ」を測定する。したがって、本当の相関が、偶然によるものであるか又は生物学的に重要な情報を示すものであるかを理解するために、並べ替えの方法を選び、各行(miR又はUCR)について、試料の順を変化させ、異なる、変化させた試料の順を用いて、遺伝子(miR、UCR)の対の間の相関を計算した。試料の並べ替えを繰り返し、相関を100回計算した。こうすると、あらゆる本当の相関が、それと比較すべき100個のランダムな相関を有することになる。すべての( $100 * n^{\circ} \text{MIR} * n^{\circ} \text{UC}$ )ランダムな相関及び本当の相関を使用して、ランダムな相関の順位付け及び本当の相関の位置に基づいてP値を再計算した。

40

#### 【0100】

50

実施した相関試験の数が多いことを考慮して、(Benjamini and Hochberg, 1995)の定義に従って、P値を、複数の試験について誤検出率(FDR)を使用することによって補正した。このようにして、P値は、本当に無効な試験の数を上回る偽陽性の数を制御し、一方、FDRは、有意な試験の数を上回る偽陽性の数を制御する。この数を推定するいくつかの方法が提案されており、Tom Nicholsが考案した解法を採用した(frois.sourceforge.net/documents/technical/matlab/FDRを参照されたい)。この解法は、単一の試験上で得たP値を、それに、実施した試験の全数に関連する指数の組合せを乗じてリスケールする。補正をシード毎に基づいて実施した。これは、シードのリスト中の遺伝子を、独立した試験とみなしたことを意味する。この統計学的に検証されている反芻性のフィルターをかける操作(tripe filtering)によって、候補遺伝子の短いリストを標的にして抽出することが可能となり、したがって、それに続く高価な、時間のかかる遺伝子解析のための資源を節約する。

10

#### 【0101】

miR-24-1の発現値とuc.160の発現値との間の散布図を作成するために、回帰直線を、MatLabの機能であるROBUSTFITを使用することによってプロットして、これら2個の遺伝子間の負の相関の仮説を説明した。わずか11.67%(7/60)の点(発現値の対)が、外れ値であるに過ぎないことに注目されたい。

#### 実施例III

##### 追加の実施例及び情報

本明細書で使用する場合、miRとUCRとは、互換的に使用し、「miR遺伝子産物」、「マイクロRNA」、「miR」又は「miRNA」を非限定的に含み、これらは、miR遺伝子からのプロセシングされていない(例えば、前駆体)RNA転写物又はプロセシングされた(例えば、成熟)RNA転写物を指す。

20

##### UCR(miRNA)を使用する診断

一態様では、対象が癌を有するか、それを発症するリスクがあるかどうか診断する方法であって、対象からの試験試料中の少なくとも一つのUCRのレベルを測定し、試験試料中のmiR遺伝子産物のレベルを対照試料中の対応するmiR遺伝子産物のレベルと比較することを含む方法が、本明細書で提供される。本明細書で用いるように、「対象」は、癌を有するか、又は有することが疑われる、任意の哺乳動物であってよい。好ましい実施形態では、対象は、癌を有するか、又は有することが疑われるヒトである。

30

#### 【0102】

少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルは、対象から得られる生体試料(例えば、細胞、組織)で測定することができる。例えば、従来の生検技術によって、組織試料(例えば、腫瘍由来の)を癌関連疾患を有することが疑われる対象から取り出すことができる。別の実施形態では、血液試料を対象から取り出すことができ、標準の技術によるDNA抽出のために、血液細胞(例えば、白血球)を単離することができる。血液又は組織試料は、放射線療法、化学療法又は他の治療処置の開始の前に対象から得るのが好ましい。対応する対照組織又は血液試料は、対象の末罹患組織、正常なヒト個体若しくは正常な個体の集団、又は対象試料中の大多数の細胞に対応する培養細胞から得ることができる。次に、対象試料由来の細胞中の所与のmiR遺伝子から生成されるmiR遺伝子産物のレベルを、対照試料の細胞からの対応するmiR遺伝子産物レベルと比較することができるように、対照組織又は血液試料を対象からの試料とともにプロセシングする。生体試料のための参照用miR発現標準を、対照として用いることもできる。

40

#### 【0103】

対照試料中の対応するmiR遺伝子産物のレベルと比較した、対象から得られる試料中のmiR遺伝子産物のレベルの変化(例えば、上昇又は低下)は、対象における癌関連疾患の存在を示す。

#### 【0104】

一実施形態では、試験試料中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルは、対照試料中の対応するmiR遺伝子産物のレベルよりも高い(すなわち、miR遺伝子産物の発現が「上

50

方制御」されている)。本明細書で用いるように、対象由来の細胞又は組織試料中のmiR遺伝子産物の量が、対照細胞又は組織試料中の同じ遺伝子産物の量よりも大きい場合、miR遺伝子産物の発現は「上方制御」されている。

【0105】

別の実施形態では、試験試料中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルは、対照試料中の対応するmiR遺伝子産物のレベルよりも低い(すなわち、miR遺伝子産物の発現が「下方制御」されている)。本明細書で用いるように、対象由来の細胞又は組織試料中のその遺伝子によって生成されるmiR遺伝子産物の量が、対照細胞又は組織試料中の同じ遺伝子から生成される量よりも少ない場合、miR遺伝子の発現は「下方制御」されている。

【0106】

対照及び正常試料中の相対的なmiR遺伝子発現は、一つ又は複数のRNA発現標準に対して決定することができる。標準は、例えば、ゼロmiR遺伝子発現レベル、標準細胞系のmiR遺伝子発現レベル、対象の未罹患組織のmiR遺伝子発現レベル、又は正常なヒト対照集団について以前に得られたmiR遺伝子の平均発現レベルを含むことができる。

【0107】

試料中のmiR遺伝子産物のレベルは、生体試料中のRNA発現レベルを検出するために適する、任意の技術を用いて測定することができる。生体試料(例えば、細胞、組織)中のRNA発現レベルを決定するのに適する技術(例えば、ノーザンブロット分析、RT-PCR、in situ ハイブリダイゼーション)は、当業者に公知である。特定の実施形態では、少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルは、ノーザンブロット分析を用いて検出される。例えば、総細胞RNAは、核酸抽出緩衝液の存在下でのホモジナイゼーションと、その後の遠心分離によって細胞から精製することができる。核酸を沈殿させ、DNアーゼ処理及び沈殿によってDNAを取り出す。次に、標準の技術によってアガロースゲルによるゲル電気泳動によってRNA分子を分離し、ニトロセルロース紙に移す。次に、加熱によってRNAをろ紙の上に固定化する。特定のRNAの検出及び定量化は、問題のRNAに相補的である、適切に標識されたDNA又はRNAのプロープを用いて達成される。例えば、その全開示は参照により組み込まれる、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrookら、eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapter 7を参照。

【0108】

所与のmiR遺伝子産物のノーザンブロットハイブリダイゼーションに適するプロープは、核酸配列から生成することができ、その例には、対象とするmiR遺伝子産物に少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%の、又は完全な相補性を有するプロープが含まれるが、これらに限定されない。標識DNA及びRNAプロープの調製方法、及び標的ヌクレオチド配列へのそのハイブリダイゼーションの条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrookら、eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapters 10 and 11に記載され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0109】

一つのそれには限定されない例では、核酸プロープは、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 又は $^{35}\text{S}$ などの放射性核種;重金属;標識リガンドのための特異的結合対メンバー(例えば、ビオチン、アビジン又は抗体)として機能することができるリガンド;蛍光分子;化学発光分子;酵素などで標識することができる。

【0110】

プロープは、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる、Rigbyら(1977), J. Mol. Biol. 113:237-251のニックトランスレーション法又はFienbergら(1983), Anal. Biochem. 132:6-13のランダムプライミング法によって、高い特異的活性に標識することができる。後者は、一本鎖DNA又はRNA鋳型から高い特異的活性の $^{32}\text{P}$ 標識プロープを合成する好ましい方法である。例えば、ニックトランスレーション法によって高い放射性のヌクレオチドで既存のヌクレオチドを置換することによって、 $10^8\text{cpm}$ /マイクログラムを十分上

10

20

30

40

50

回る特異的活性を有する<sup>32</sup>P標識核酸プローブを調製することが可能である。次に、ハイブリダイズされたる紙を写真フィルムに曝露させることによって、ハイブリダイゼーションのオートラジオグラフ検出を実施することができる。ハイブリダイズされたる紙に曝露させられた写真フィルムの比重走査は、miR遺伝子転写産物レベルの精確な測定を提供する。別の手法を用いて、Amersham

Biosciences、Piscataway、NJから入手可能なMolecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimagerなどのコンピュータ画像処理システムによって、miR遺伝子転写産物レベルを定量化することができる。

#### 【0111】

DNA又はRNAプローブの放射性核種標識化が实际的でない場合、類似体、例えば、dTTP類似体5-(N-(N-ビオチニル- -アミノカプロイル)-3-アミノアリル)デオキシウリジン三リン酸をプローブ分子に組み込むために、ランダムプライマー法を用いることができる。ビオチン化プローブオリゴヌクレオチドは、呈色反応を生成する蛍光染料又は酵素に結合している、アビジン、ストレプトアビジン及び抗体(例えば、抗ビオチン抗体)などのビオチン結合タンパク質との反応によって検出することができる。

#### 【0112】

ノーザン及び他のRNAハイブリダイゼーション技術に加えて、RNA転写産物のレベルの決定は、in situハイブリダイゼーションの技術を用いて達成することができる。この技術は、ノーザンブロット技術より少ない細胞を必要とし、顕微鏡カバーガラスの上へ完全体細胞を置くこと、及び、放射性又はさもなければ標識核酸(例えば、cDNA又はRNA)プローブを含む溶液で細胞の核酸内容物を探ることを含む。この技術は、対象からの組織生検試料を分析するのに特に適する。in situハイブリダイゼーション技術の実際は、米国特許第5,427,916号にさらに詳細に記載され、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0113】

非限定的一例では、所与のmiR遺伝子産物のin situハイブリダイゼーションに適するプローブは、核酸配列から生成することができ、その例には、上述のように対象とするmiR遺伝子産物に少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%の、又は完全な相補性を有するプローブが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0114】

細胞中のmiR遺伝子転写産物の相対数は、miR遺伝子転写産物の逆転写と、続くポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)による逆転写産物の増幅によって決定することもできる。miR遺伝子転写産物のレベルは、内標準、例えば、同じ試料に存在する「ハウスキーピング」遺伝子からのmRNAのレベルと比較して定量化することができる。内標準として用いるのに適する「ハウスキーピング」遺伝子には、例えば、ミオシン又はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G3PDH)が含まれる。定量的及び半定量的RT-PCRを実施する方法及びその変形形態は、当業者に公知である。

#### 【0115】

場合によっては、試料中の複数の異なるmiR遺伝子産物の発現レベルを同時に決定することが望ましいこともある。他の場合には、癌に関連するすべての既知のmiR遺伝子の転写産物の発現レベルを決定することが望ましいこともある。数百のmiR遺伝子又は遺伝子産物について癌特異的発現レベルを調べることは、時間がかかり、大量の総RNA(例えば、各ノーザンブロットにつき少なくとも20 µg)、及び、放射性同位体を必要とするオートラジオグラフ技術を必要とする。

#### 【0116】

これらの限界を克服するために、一組のmiR遺伝子に特異的である一組のオリゴヌクレオチド(例えば、オリゴデオキシヌクレオチド)プローブを含んでいる、マイクロチップフォーマット(すなわち、マイクロアレイ)のオリゴライブラリーを構築することができる。そのようなマイクロアレイを用い、RNAを逆転写して一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを生成し、それらをハイブリダイズしてマイクロアレイの上のオリゴヌクレオチドを

10

20

30

40

50

探り、ハイブリダイゼーション又は発現プロファイルを生成することによって、生体試料中の複数のマイクロRNAの発現レベルを決定することができる。次に、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料のそれと比較し、癌細胞でどのマイクロRNAが変化した発現レベルを有するかについて決定することができる。

#### 【0117】

本明細書で用いるように、「プローブオリゴヌクレオチド」又は「プローブオリゴデオキシヌクレオチド」は、標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを指す。「標的オリゴヌクレオチド」又は「標的オリゴデオキシヌクレオチド」は、(例えば、ハイブリダイゼーションを通して)検出する分子を指す。「miR特異的プローブオリゴヌクレオチド」又は「miRに特異的なプローブオリゴヌクレオチド」は、特異的miR遺伝子産物に、又は特異的miR遺伝子産物の逆転写物にハイブリダイズするように選択される配列を有する、プローブオリゴヌクレオチドを意味する。

10

#### 【0118】

特定の試料の「発現プロファイル」又は「ハイブリダイゼーションプロファイル」は、基本的に、試料の状態のフィンガープリントである。二つの状態は、同様に発現される任意の特定の遺伝子を有することができるが、いくつかの遺伝子の評価は、細胞の状態に特異である遺伝子発現プロファイルの生成を同時に可能にする。すなわち、正常な組織を癌性(例えば、腫瘍)の組織から区別することができ、癌性組織中では、異なる予後状態(例えば、良好又は劣る長期生存期間の見通し)を決定することができる。異なる状態の癌組織の発現プロファイルを比較することによって、これらの状態のそれぞれにおいてどの遺伝子(遺伝子の上方制御及び下方制御を含む)が重要であるかについての情報が得られる。癌組織で差示的に発現される配列、並びに異なる予後をもたらす差示的発現の同定は、いくつかの方法によるこの情報の使用を可能にする。

20

#### 【0119】

それには限定されない一例では、(例えば、特定の患者で化学療法薬が長期の予後を改善する働きをするかどうかを決定するために)、特定の治療体系を評価することができる。同様に、患者試料を既知の発現プロファイルと比較することによって、診断をすることができる。さらに、これらの遺伝子発現プロファイル(又は個々の遺伝子)は、癌発現プロファイルを抑制するか、又は劣る予後プロファイルをより良好な予後プロファイルに変換する薬剤候補のスクリーニングを可能にする。

30

#### 【0120】

したがって、対象が癌を有するか、それを発症するリスクがあるかどうか診断する方法であって、対象から得られる試験試料由来のRNAを逆転写して一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供すること、miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイに標的オリゴデオキシヌクレオチドをハイブリダイズして、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供すること、及び試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料又は参照標準から生成されるハイブリダイゼーションプロファイルと比較することを含み、少なくとも一つのmiRNAのシグナルの変化は、対象が癌を有するかそれを発症するリスクがあることを示す方法も本明細書で提供される。

#### 【0121】

一実施形態では、マイクロアレイは、すべての既知のヒトmiRNAの相当な部分について、miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、マイクロアレイは、miR29a、miR-29b、miR-29c及びそれらの組合せからなる群から選択される一つ又は複数のmiRNAについて、miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。

40

#### 【0122】

マイクロアレイは、既知のmiRNA配列から生成される遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブから調製することができる。アレイは、各miRNAについて二つの異なるオリゴヌクレオチドプローブを含むことができ、一つは活性のある成熟した配列を含み、他はmiRNAの前駆体に特異的である。アレイは、わずかに少しの塩基だけヒト相同分子種と異なる一つ又は複数のマウス配列などの対照を含むこともでき、それは、ハイブリダイゼーション

50

のストリンジェンシー条件の対照の役目を果たすことができる。両方の種類からのtRNA又は他のRNA(例えば、rRNA、mRNA)を、マイクロチップにプリントすることもでき、特異的ハイブリダイゼーションのための、内部の、比較的安定した陽性対照を提供する。非特異的ハイブリダイゼーションのための一つ又は複数の適当な対照が、マイクロチップに含まれてもよい。この目的のために、任意の既知のmiRNAとの任意の相同性の非存在に基づいて、配列が選択される。

#### 【0123】

マイクロアレイは、当技術分野で公知である技術を用いて作ることができる。例えば、適当な長さ、例えば40個のヌクレオチドのプロブオリゴヌクレオチドを、位置C6で5'-アミンで修飾し、市販のマイクロアレイ系、例えばGeneMachine  
OmniGrid(商標)100 Microarrayer及びAmersham  
CodeLink(商標)活性化スライドを用いてプリントする。標識プライマーで標的RNAを逆転写することによって、標的RNAに対応する標識cDNAオリゴマーを調製する。第一の鎖合成の後で、RNA/DNAハイブリッドを変性させてRNA鋳型を分解する。このように調製される標識標的cDNAは、次に、ハイブリダイゼーション条件下、例えば、25℃の6×SSPE/30%ホルムアミドで18時間、その後37℃の0.75×TNT(トリスHCl/NaCl/Tween 20)で40分間の洗浄によってマイクロアレイチップにハイブリダイズさせる。固定化プロブDNAが試料中の相補的標的cDNAを認識するアレイの上の位置で、ハイブリダイゼーションが起こる。標識標的cDNAは、アレイの上の結合が起こる正確な位置を示し、自動検出及び定量を可能にする。出力は、患者試料中の特異的cDNA配列の相対存在量、したがって、対応する相補的miR  
の相対存在量を示すハイブリダイゼーション事象のリストからなる。

10

20

#### 【0124】

一実施形態によると、標識cDNAオリゴマーは、ビオチン標識プライマーから調製されるビオチン標識cDNAである。次に、マイクロアレイを、例えば、Streptavidin-Alexa647複合体を用いるビオチン含有転写産物の直接検出によって処理し、従来の走査法を利用して調べる。アレイの上の各スポットの画像強度は、患者試料中の対応するmiRの存在度に比例する。

#### 【0125】

アレイの使用は、miRNA発現の検出のために、いくつかの利点を有する。第一に、数百の遺伝子の広範な発現を、一時点に同じ試料で同定することができる。第二に、オリゴヌクレオチドプロブの細心の設計を通して、成熟分子及び前駆体分子の両方の発現を同定することができる。第三に、ノーザンブロット分析と比較すると、チップは少量のRNAを必要とし、2.5 µgの総RNAを用いて再現性のある結果を提供する。比較的限られた数(一種につき数百)のmiRNAが、各々のための異なるオリゴヌクレオチドプロブで、数種に共通するマイクロアレイの構築を可能にする。そのような道具は、様々な条件の下での、既知の各miRの種横断的発現の分析を可能にする。

30

#### 【0126】

特異的miRの定量的発現レベルアッセイの利用に加えて、miR発現パターンの分析のために、miR遺伝子発現プロファイリングを実施するために、miRNomeの相当部分、好ましくはmiRNome全体に対応するmiRNA特異的プロブオリゴヌクレオチドを含むマイクロチップを使用することができる。異なるmiRサインを、確立された疾患マーカーと、又は疾患状態と直接関連付けることができる。

40

#### 【0127】

本明細書で記載される発現プロファイリング方法により、試料中のRNAに相補的な一組の標識標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供するのに、癌関連疾患を有することが疑われる対象からの試料由来の総RNAを、定量的に逆転写する。次に、試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供するために、標的オリゴデオキシヌクレオチドを、miRNA特異的プロブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズする。結果は、試料中のmiRNAの発現パターンを表す試料のハイブリダイゼーションプロファイルである。ハイブリダイゼーションプロファイルは、試料由来の標的オリゴデオキシヌクレオチド

50

の、マイクロアレイ中のmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドへの結合からのシグナルを含む。プロファイルは、結合の有無(シグナル対ゼロシグナル)として記録することができる。

【0128】

より好ましくは、記録されるプロファイルは、各ハイブリダイゼーションからのシグナルの強度を含む。プロファイルを、正常な、すなわち、非癌性の対照試料から生成されるハイブリダイゼーションプロファイルと比較する。シグナルの変化は、対象における癌の存在、又はそれを発症する素因を示す。

【0129】

miR遺伝子発現を測定する他の技術も当分野の技術の範囲内であり、その例には、RNA転写及び分解の速度を測定するための様々な技術が含まれる。

【0130】

癌を有する対象の予後を決定する方法であって、癌関連疾患の特定の予後(例えば、良好又は陽性の予後、劣っているか悪い予後)と関連する、対象からの試験試料中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含む方法も、本明細書で提供される。

【0131】

これらの方法により、対照試料中の対応するmiR遺伝子産物のレベルと比較して、試験試料中の特定の予後と関連するmiR遺伝子産物のレベルの変化は、対象が、特定の予後を有する癌を有することを示す。一実施形態では、miR遺伝子産物は、悪い(すなわち、劣る)予後と関連する。悪い予後の例には、低い生存率及び速やかな疾患進行が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態では、少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルは、対象から得られる試験試料由来のRNAを逆転写して一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供すること、標的オリゴデオキシヌクレオチドを、miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズして、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供すること、及び試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料から生成されるハイブリダイゼーションプロファイルと比較することによって測定される。

【0132】

任意の一つの理論に拘束されることを望むものではなく、細胞中の一つ又は複数のmiR遺伝子産物のレベルの変化は、これらのmiRの一つ又は複数の意図する標的の脱制御をもたらすことができると考えられ、それは癌の形成をもたらすことができる。したがって、(例えば、癌細胞で上方制御されているmiR遺伝子産物のレベルを低下させることによって、癌細胞で下方制御されているmiR遺伝子産物のレベルを上昇させることによって)miR遺伝子産物のレベルを変化させるにより、癌の治療を成功させることができる。

【0133】

したがって、癌を有するかそれを有することが疑われる対象で腫瘍形成を抑制する方法であって、少なくとも一つのmiR遺伝子産物が対象の癌細胞で脱制御されている(例えば、下方制御又は上方制御されている)方法が、本明細書でさらに提供される。少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物が癌細胞で下方制御されている場合(例えば、miR-29ファミリー)、本方法は、対象における癌細胞の増殖が抑制されるように、少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物、又はその単離された変異体又は生物学的活性断片の有効量を投与することを含む。

【0134】

例えば、miR遺伝子産物が対象の癌細胞で下方制御されている場合、単離したmiR遺伝子産物の有効量を対象に投与することは、癌細胞の増殖を抑制することができる。対象に投与される単離したmiR遺伝子産物は、癌細胞で下方制御される内因性の野生型miR遺伝子産物(例えば、miR遺伝子産物)と同一であってよく、又はそれは、その変異体又は生物学的活性断片であってもよい。

【0135】

10

20

30

40

50



本明細書で定義されるように、miR遺伝子産物の「変異体」は、対応する野生型miR遺伝子産物に100%未満の同一性を有し、対応する野生型miR遺伝子産物の一つ又は複数の生物活性を有するmiRNAを指す。そのような生物活性の例には、標的RNA分子の発現の抑制(例えば、標的RNA分子の翻訳を抑制すること、標的RNA分子の安定性を調節すること、標的RNA分子のプロセッシングを抑制すること)、及び癌に関連する細胞過程(例えば、細胞分化、細胞増殖、細胞死)の抑制が含まれるが、これらに限定されない。これらの変異体には、種変異体、及びmiR遺伝子内の一つ又は複数の突然変異(例えば、置換、欠失、挿入)の結果である変異体が含まれる。ある実施形態では、変異体は、対応する野生型miR遺伝子産物に少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%同一である。

【0136】

10

本明細書で定義されるように、miR遺伝子産物の「生物学的活性断片」は、対応する野生型miR遺伝子産物の一つ又は複数の生物活性を有する、miR遺伝子産物のRNA断片を指す。上に述べたように、そのような生物活性の例には、標的RNA分子の発現の抑制、及び癌に関連する細胞過程の抑制が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態では、生物学的活性断片は、長さが少なくとも約5、7、10、12、15又は17個のヌクレオチドである。

【0137】

特定の実施形態では、単離したmiR遺伝子産物を、一つ又は複数の追加の抗癌治療法と組み合わせて対象に投与することができる。適する抗癌治療法には、化学療法、放射線療法及びそれらの組合せ(例えば、化学放射線療法)が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0138】

少なくとも一つの単離したmiR遺伝子産物が癌細胞で上方制御される場合、本方法は、癌細胞の増殖が抑制されるように、本明細書でmiR遺伝子発現抑制化合物と呼ばれる、少なくとも一つのmiR遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の有効量を、対象に投与することを含む。特定の実施形態では、少なくとも一つのmiR発現抑制化合物は、miR-29a、miR-29b、miR-29c及びそれらの組合せを含む、miR29ファミリーからなる群から選択されるmiR遺伝子産物に特異的である。

【0139】

本明細書で用いるように、用語「治療する」、「治療すること」及び「治療」は、疾患又は状態、例えば、癌に関連する症状を改善すること、例えば、疾患症状の開始を予防すること若しくは遅らせること、及び/又は疾患又は状態の症状の重症度若しくは頻度を低くすることを指す。本明細書で、用語「対象」、「患者」及び「個体」は、それらに限定されないが、霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、又は他のウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、齧歯動物又はマウスの種を含む、哺乳動物などの動物を含むと定義される。好ましい一実施形態では、動物はヒトである。

30

【0140】

本明細書で用いるように、単離したmiR遺伝子産物の「有効量」は、癌に罹患している対象で、癌細胞の増殖を妨げるのに十分な量である。当業者は、対象のサイズ及び体重;疾患侵食の範囲;対象の年齢、健康及び性別;投与経路;並びに、投与が局所性であるか全身性であるか、などの因子を考慮することによって、所与の対象に投与するmiR遺伝子産物の有効量を容易に決定することができる。

40

【0141】

例えば、単離したmiR遺伝子産物の有効量は、治療する腫瘍の概算重量に基づいて決めることができる。腫瘍の概算重量は、腫瘍の概算容量を計算することによって決定することができる。そこで、1立方センチメートルの容量は、およそ、1グラムと同等である。腫瘍の重量に基づく単離したmiR遺伝子産物の有効量は、腫瘍1グラムにつき約10~500マイクログラムの範囲であってよい。ある実施形態では、腫瘍は、腫瘍1グラムにつき少なくとも約10マイクログラム、少なくとも約60マイクログラム、又は少なくとも約100マイクログラムであってよい。

50

## 【0142】

単離したmiR遺伝子産物の有効量は、治療する対象の概算又は推定体重に基づいて決めることもできる。本明細書で記載するように、好ましくは、そのような有効量は非経口的に、又は経腸的に投与される。例えば、対象に投与される単離したmiR遺伝子産物の有効量は、体重1kgにつき、約5～約3000マイクログラムの範囲内、約700～1000マイクログラムの範囲内、又は約1000マイクログラムを超えてもよい。

## 【0143】

当業者は、所与の対象への単離したmiR遺伝子産物の投与のための適当な投薬計画を、容易に決定することもできる。例えば、miR遺伝子産物を、対象に一回(例えば、単一の注射又はデポジションとして)投与してもよい。或いは、miR遺伝子産物を、約3～約28日間、より詳細には約7～約10日間、1日に一回又は二回対象に投与することができる。特定の投薬計画では、miR遺伝子産物は、1日に一回、7日間投与される。投薬計画が複数の投与を含む場合、対象に投与されるmiR遺伝子産物の有効量は、投薬計画全期間にわたって投与される遺伝子産物の総量を含むことができるものと理解される。

10

## 【0144】

本明細書で用いるように、「単離」したmiR遺伝子産物は、合成されたもの、又はヒト介入を通して天然の状態から変化させられたもの若しくは取り出されたものである。例えば、合成miR遺伝子産物、又はその天然の状態の共存物質から部分的若しくは完全に分離されたmiR遺伝子産物は、「単離」されているとみなされる。単離したmiR遺伝子産物は、実質的に精製された形で存在すること、又はmiR遺伝子産物が送達されている細胞に存在することができる。したがって、細胞に故意に送達されるかその中で発現されるmiR遺伝子産物は、「単離」されたmiR遺伝子産物とみなされる。miR前駆体分子から細胞中に生成されるmiR遺伝子産物も、「単離」された分子であるとみなされる。特定の一実施形態によると、本明細書に記載される単離したmiR遺伝子産物は、対象(例えば、ヒト)の肺癌を治療するための医薬の製造のために用いることができる。

20

## 【0145】

単離されたmiR遺伝子産物は、いくつかの標準の技術を用いて得ることができる。例えば、miR遺伝子産物は、当技術分野で公知である方法を用いて、化学的に合成するか、組換えで生成することができる。一実施形態では、miR遺伝子産物は、適当に保護されたりボヌクレオシドホスホラミダイト及び従来のDNA/RNAシンセサイザーを用いて、化学的に合成される。合成RNA分子又は合成試薬の商業的供給業者には、例えば、Proligo(Hamburg, Germany)、Dharmacon Research(Lafayette, CO, U.S.A.)、Pierce Chemical(part of Perbio Science, Rockford, IL, U.S.A.)、Glen Research(Sterling, VA, U.S.A.)、ChemGenes(Ashland, MA, U.S.A.)及びCruachem(Glasgow, UK)が含まれる。

30

## 【0146】

或いは、任意の適するプロモーターを用いて、miR遺伝子産物を、組換え体環状又は線状DNAプラスミドから発現させることができる。プラスミドからRNAを発現させるために適するプロモーターには、例えば、U6若しくはH1 RNA pol IIIプロモーター配列、又はサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。他の適するプロモーターの選択は、当分野の技術の範囲内である。本発明の組換え体プラスミドは、癌細胞でのmiR遺伝子産物の発現のための、誘導可能又は制御可能なプロモーターを含むこともできる。

40

## 【0147】

組換え体プラスミドから発現されるmiR遺伝子産物は、標準の技術によって培養細胞発現系から単離することができる。組換え体プラスミドから発現されるmiR遺伝子産物は、癌細胞に送達すること、及びそこで直接発現させることもできる。miR遺伝子産物を癌細胞に送達するための組換え体プラスミドの使用を、下でさらに詳細に述べる。

## 【0148】

miR遺伝子産物を別々の組換え体プラスミドから発現させることができ、又はそれらを

50

同じ組換え体プラスミドから発現させることができる。一実施形態では、miR遺伝子産物は単一のプラスミドからRNA前駆体分子として発現され、前駆体分子は、それに限定されないが癌細胞中に現存しているプロセッシング系を含む適するプロセッシング系によって、機能的miR遺伝子産物にプロセッシングされる。他の適するプロセッシング系には、例えば、in vitroのショウジョウバエ細胞溶解物系(例えば、その全開示が参照により本明細書に組み込まれるTuschlらの米国特許出願公開第2002/0086356号に記載されているような)、及び大腸菌RNアーゼIII系(例えば、その全開示が参照により本明細書に組み込まれるYangらの米国特許出願公開第2004/0014113号に記載されているような)が含まれる。

#### 【0149】

miR遺伝子産物を発現するのに適するプラスミド、遺伝子産物を発現させるために核酸配列をプラスミドに挿入する方法、及び、対象とする細胞に組換え体プラスミドを送達する方法の選択は、当分野の技術の範囲内である。例えば、その全開示が参照により本明細書に組み込まれる、Zengら(2002), Molecular Cell 9:1327-1333、Tuschl(2002), Nat. Biotechnol. 20:446-448、Brummelkampら(2002), Science 296:550-553、Miyagishiら(2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500、Paddisonら(2002), Genes Dev. 16:948-958、Leeら(2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505及びPaulら(2002), Nat. Biotechnol. 20:505-508を参照。

10

#### 【0150】

一実施形態では、miR遺伝子産物を発現するプラスミドは、CMV中間-初期プロモーターの制御下のmiR前駆体RNAをコードする配列を含む。本明細書で用いるように、プロモーターの「制御下」は、miR遺伝子産物をコードする核酸配列がプロモーターの3'に位置し、その結果、プロモーターがmiR遺伝子産物コード配列の転写を開始することができることを意味する。

20

#### 【0151】

miR遺伝子産物は、組換え体ウイルスベクターから発現させることもできる。miR遺伝子産物を二つの別々の組換え体ウイルスベクターから、又は同じウイルスベクターから発現させることができると考えられる。組換え体ウイルスベクターから発現されるRNAは、標準の技術によって培養細胞発現系から単離すること、又は癌細胞で直接発現させることができる。miR遺伝子産物を癌細胞に送達するための組換え体ウイルスベクターの使用を、下でさらに詳細に述べる。

30

#### 【0152】

本発明の組換え体ウイルスベクターは、miR遺伝子産物及び、RNA配列を発現するのに適する任意のプロモーターをコードする配列を含む。適するプロモーターには、それらに限定されないが、U6若しくはH1 RNA pol IIIプロモーター配列、又はサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。他の適するプロモーターの選択は、当分野の技術の範囲内である。本発明の組換え体ウイルスベクターは、癌細胞でのmiR遺伝子産物の発現のための、誘導可能又は制御可能なプロモーターを含むこともできる。

#### 【0153】

miR遺伝子産物のコード配列を受け入れることができる任意のウイルスベクター、例えば、アデノウイルス(AV);アデノ随伴ウイルス(AAV);レトロウイルス(例えば、レンチウイルス(LV)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス);ヘルペスウイルスなどに由来するベクターを用いることができる。ウイルスベクターの親和性は、他のウイルス由来のエンベロープタンパク質若しくは他の表面抗原でベクターをシュードタイピングすることによって、又は異なるウイルスキャプシドタンパク質を適宜置換することによって修飾することができる。

40

#### 【0154】

例えば、本発明のレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、狂犬病、エボラ、マコラなどに由来する表面タンパク質でシュードタイピングすることができる。本発明のAAVベクターは、異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するようにベクターを工作することによって、異なる細胞を標的にさせることができる。例えば、血清型2の

50

ゲノムの上で血清型2のカプシドを発現するAAVベクターは、AAV 2/2と呼ばれる。AAV 2/2ベクター内のこの血清型2のカプシド遺伝子を血清型5カプシド遺伝子によって置換して、AAV 2/5ベクターを生成することができる。異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するAAVベクターを構築する技術は、当分野の技術の範囲内である。例えば、その全開示が参照により本明細書に組み込まれる、Rabinowitz, J.E., ら(2002), J. Virol. 76:791-801を参照。

#### 【0155】

本発明で使用するのに適する組換え体ウイルスベクター、RNAを発現するための核酸配列をベクターに挿入するための方法、対象とする細胞にウイルスベクターを送達する方法の選択、及び発現されたRNA産物の回復は、当分野の技術の範囲内である。例えば、その全開示が参照により本明細書に組み込まれる、Dornburg(1995), Gene Therapy 2:301-310、Eglitis(1988), Biotechniques 6:608-614、Miller(1990), Hum. Gene Therapy 1:5-14及びAnderson(1998), Nature 392:25-30を参照。

#### 【0156】

特に適するウイルスベクターは、AV及びAAVに由来するそれらである。miR遺伝子産物を発現するのに適するAVベクター、組換え体AVベクターを構築する方法、及び標的細胞にベクターを送達する方法が、Xiaら(2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010に記載され、その全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。miR遺伝子産物を発現するのに適するAAVベクター、組換え体AAVベクターを構築する方法、及び標的細胞にベクターを送達する方法が、Samulskiら(1987), J. Virol. 61:3096-3101、Fisherら(1996), J. Virol., 70:520-532、Samulskiら(1989), J. Virol. 63:3822-3826、米国特許第5,252,479号、米国特許第5,139,941号、国際特許出願公開第94/13788号及び国際特許出願公開第93/24641号に記載され、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、miR遺伝子産物は、CMV中間初期プロモーターを含む単一の組換え体AAVベクターから発現される。

#### 【0157】

ある実施形態では、本発明の組換え体AAVウイルスベクターは、ヒトU6 RNAプロモーターの制御下のpolyT終止配列と機能的に連結しているmiR前駆体RNAをコードする核酸配列を含む。本明細書で用いるように、「polyT終止配列と機能的に連結している」は、センス鎖又はアンチセンス鎖をコードする核酸配列が、5'の方向のpolyT終止シグナルに直に隣接していることを意味する。ベクターからのmiR配列の転写の間、polyT終止シグナルは、転写を終了する作用をする。

#### 【0158】

本発明の治療方法の他の実施形態では、miR発現を抑制する少なくとも一つの化合物の有効量を、対象に投与することができる。本明細書で用いるように、「miR発現を抑制する」は、治療後のmiR遺伝子産物の前駆体及び/又は活性のある成熟した形態の生成が、治療前の生成量よりも少ないことを意味する。miR発現が癌細胞で抑制されているかどうかについて、当業者は、例えば、診断方法について上で述べたmiR転写産物のレベルを決定するための技術を用いて、容易に決定することができる。抑制は、遺伝子発現のレベルで(すなわち、miR遺伝子産物をコードするmiR遺伝子の転写を抑制することによって)、又はプロセシングのレベルで(例えば、成熟した活性miRへのmiR前駆体のプロセシングを抑制することによって)起こることができる。

#### 【0159】

本明細書で用いるように、miR発現を抑制する化合物の「有効量」は、癌(例えば、癌)に罹患している対象で、癌細胞の増殖を妨げるのに十分な量である。当業者は、対象のサイズ及び体重;疾患侵食の範囲;対象の年齢、健康及び性別;投与経路;並びに、投与が局所性であるか全身性であるか、などの因子を考慮することによって、所与の対象に投与するmiR発現抑制化合物の有効量を容易に決定することができる。

#### 【0160】

例えば、発現抑制化合物の有効量は、上述したように、治療する腫瘍の概算重量に基づ

いて決めることができる。上述したように、miR発現を抑制する化合物の有効量は、治療する対象の概算又は推定体重に基づいて決めることもできる。

【0161】

当業者は、所与の対象へのmiR発現抑制化合物の投与のための適当な投薬計画を、容易に決定することもできる。

【0162】

miR遺伝子発現を抑制するのに適する化合物には、二本鎖RNA(例えば、short-若しくはsmall-interfering

RNAすなわち「siRNA」)、アンチセンス核酸、及びリボザイムなどの酵素RNA分子が含まれる。これらの化合物の各々は、所与のmiR遺伝子産物を標的にさせることができ、標的miR遺伝子産物の発現を妨害すること(例えば、その翻訳を妨げること、その切断若しくは破壊を誘導すること)ができる。 10

【0163】

例えば、所与のmiR遺伝子の発現は、miR遺伝子産物の少なくとも一部と、少なくとも90%、例えば少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列相同性を有する単離二本鎖RNA(「dsRNA」)分子を有するmiR遺伝子のRNA干渉を誘導することによって、抑制することができる。特定の実施形態では、dsRNA分子は、「short若しくはsmall interfering RNA」すなわち「siRNA」である。

【0164】

本方法で有用なsiRNAは、長さが約17～約29個のヌクレオチド、好ましくは約19～約25個のヌクレオチドの短い二本鎖RNAを含む。siRNAは、標準のワトソンクリック塩基対合相互作用(以下「塩基対」)によって一緒にアニールさせた、センスRNA鎖及び相補的アンチセンスRNA鎖を含む。センス鎖は、標的miR遺伝子産物中に含まれる核酸配列と実質的に同一の核酸配列を含む。 20

【0165】

本明細書で用いるように、標的mRNAに含まれる標的配列に「実質的に同一である」siRNA中の核酸配列は、標的配列と同一であるか、又は1、2個のヌクレオチドが標的配列と異なる核酸配列である。siRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖は、二つの相補的な一本鎖RNA分子を含むこと、又は二つの相補的部分が塩基対を形成して一本鎖「ヘアピン」領域によって共有結合している単一分子を含むことができる。 30

【0166】

siRNAは、一つ又は複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び/又は変更によって天然のRNAと異なる、変化させたRNAであってもよい。そのような変化には、例えばsiRNAの一つ又は複数の末端への、又はsiRNAの一つ又は複数の内部ヌクレオチドへの非ヌクレオチド物質の付加、或いは、ヌクレアーゼ分解にsiRNAを耐性にする修飾、或いはデオキシリボヌクレオチドによるsiRNAの一つ又は複数のヌクレオチドの置換を含めることができる。

【0167】

siRNAの片方又は両方の鎖は、3'突出部を含むこともできる。本明細書で用いるように、「3'突出部」は、二重RNA鎖の3'末端から延長する、少なくとも一つの対未形成のヌクレオチドを指す。したがって、ある実施形態では、siRNAは、長さが1～約6個のヌクレオチド(リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含む)、長さが1～約5個のヌクレオチド、長さが1～約4個のヌクレオチド、又は長さが約2～約4個のヌクレオチドの、少なくとも一つの3'突出部を含む。特定の実施形態では、3'突出部はsiRNAの両方の鎖に存在し、長さは2個のヌクレオチドである。例えば、siRNAの各鎖は、ジチミジル酸(「TT」)又はジウリジル酸(「uu」)の3'突出部を含むことができる。 40

【0168】

単離miR遺伝子産物について上に述べたように、siRNAは、化学的若しくは生物学的に生成すること、又は組換え体プラスミド若しくはウイルスのベクターから発現させることができる。dsRNA又はsiRNA分子を生成及び試験するための例示的な方法は、Gewirtzの米国 50

特許出願公開第2002/0173478号及びReichらの米国特許出願公開第2004/0018176号に記載され、その両方の全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0169】

所与のmiR遺伝子の発現は、アンチセンス核酸によって抑制することもできる。本明細書で用いるように、「アンチセンス核酸」は、RNA-RNA、RNA-DNA又はRNA-ペプチド核酸相互作用によって標的RNAに結合する、標的RNAの活性を変化させる核酸分子を指す。本方法で使用するのに適するアンチセンス核酸は、miR遺伝子産物中の連続核酸配列に相補的である核酸配列を一般に含む、一本鎖核酸(例えば、RNA、DNA、RNA-DNAキメラ、ペプチド核酸(PNA))である。アンチセンス核酸は、miR遺伝子産物中の連続核酸配列に50~100%相補的、75~100%相補的又は95~100%相補的である核酸配列を含むことができる。

10

【0170】

任意の理論に拘束されることを望むものではないが、アンチセンス核酸は、miR遺伝子産物/アンチセンス核酸二重鎖を消化する、RNアーゼH又は別の細胞ヌクレアーゼを活性化すると考えられている。

【0171】

アンチセンス核酸は、標的特異性、ヌクレアーゼ耐性、分子の効力に関する送達又は他の特性を高めるために、核酸骨格又は糖及び塩基部分(又はそれらの同等物)に対する修飾を含むこともできる。そのような修飾には、コレステロール部分、二重インターカレータ、例えばアクリジン、又は一つ又は複数のヌクレアーゼ耐性基が含まれる。

【0172】

単離miR遺伝子産物について上に述べたように、アンチセンス核酸は、化学的若しくは生物学的に生成すること、又は組換え体プラスミド若しくはウイルスベクターから発現させることができる。生成及び試験のための例示的な方法は、当分野の技術の範囲内である。例えば、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる、Stein and Cheng(1993), Science 261:1004及びWoolfらの米国特許第5,849,902号を参照。

20

【0173】

所与のmiR遺伝子の発現は、酵素性核酸によって抑制することもできる。本明細書で用いるように、「酵素性核酸」は、miR遺伝子産物中の連続核酸配列に相補性を有し、miR遺伝子産物を特異的に切断することができる、基質結合領域を含む核酸を指す。酵素性核酸の基質結合領域は、miR遺伝子産物中の連続核酸配列に、例えば、50~100%相補的、75~100%相補的又は95~100%相補的であってよい。酵素性核酸は、塩基、糖及び/又はリン酸基の修飾を含むこともできる。

30

【0174】

本明細書の実施例に記載のように、本方法で用いるための例示的な酵素性核酸には、DNMT3A及びDNMT3Bを含む新規のメチルトランスフェラーゼが含まれる。

【0175】

単離miR遺伝子産物について上に述べたように、酵素性核酸は、化学的若しくは生物学的に生成すること、又は組換え体プラスミド若しくはウイルスのベクターから発現させることができる。dsRNA又はsiRNA分子の生成及び試験のための例示的な方法は、Werner and Uhlenbeck(1995), Nucl. Acids Res. 23:2092-96、Hammannら(1999), Antisense and Nucleic Acid

40

Drug Dev. 9:25-31、及びCechらの米国特許第4,987,071号に記載され、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0176】

少なくとも一つのmiR遺伝子産物、又はmiR発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の投与は、癌を有する対象での癌細胞の増殖を妨げる。

【0177】

本明細書で用いるように、「癌細胞の増殖を抑制する」ことは、細胞を殺傷すること、又は永久若しくは一時的に細胞の増殖を停止させるか、遅らせることを意味する。miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物の投与の後、対象でそのような細胞の数が一定で

50

あるか又は減少するならば、癌細胞の増殖の抑制を推測することができる。そのような細胞の無名数は増加するが、腫瘍増殖速度が低下する場合も、癌細胞増殖の抑制を推測することができる。

【0178】

対象の体内の癌細胞の数は、直接測定によって、又は原発性若しくは転移性の腫瘍のサイズからの推定によって決定することができる。例えば、対象における癌細胞の数は、免疫組織学的方法、フローサイトメトリー、又は癌細胞の特徴的な表面マーカーを検出するように設計された、他の技術によって測定することができる。

【0179】

腫瘍サイズは、直接目視観察によって、又は画像診断方法、例えばX線、磁気共鳴画像法、超音波及びシンチグラフィーによって確認することができる。当技術分野で公知であるように、腫瘍サイズを確認するために用いられる画像診断法は、造影剤と一緒に、又は造影剤なしで使用することができる。腫瘍サイズは、組織塊の触診、又はキャリパーなどの計器による組織塊の測定などの、物理的手段によって確認することもできる。

【0180】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、対象の癌細胞にこれらの化合物を送達するのに適する任意の手段によって対象に投与することができる。例えば、miR遺伝子産物又はmiR発現抑制化合物は、これらの化合物、又はこれらの化合物をコードする配列を含む核酸を対象の細胞にトランスフェクトするのに適する方法によって投与することができる。

【0181】

一実施形態では、少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含むプラスミド若しくはウイルスベクターを細胞にトランスフェクトする。

【0182】

真核生物の細胞のためのトランスフェクション方法は当技術分野で公知であり、その例には、例えば、細胞の核又は前核への核酸の直接注入；エレクトロポレーション；リボソーム転移又は親油性物質によって媒介される転移；受容体媒介核酸送達、生物弾道又は粒子加速；リン酸カルシウム沈殿及びウイルスベクターによって媒介されるトランスフェクションが含まれる。

【0183】

例えば、細胞は、リボソーム転移化合物、例えば、DOTAP(N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート、Boehringer-Mannheim)又はLIPOFECTINなどの同等物をトランスフェクトすることができる。用いる核酸の量は、本発明の実施に重要ではない。10<sup>5</sup>個の細胞につき0.1~100マイクログラムの核酸で、許容される結果を達成することができる。例えば、10<sup>5</sup>の細胞につき3マイクログラムのDOTAP中に、約0.5マイクログラムのプラスミドベクターの割合を用いることができる。

【0184】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、任意の適する腸内又は非経口投与経路によって、対象に投与することもできる。本方法に適する腸内投与経路には、例えば、経口、直腸又は鼻腔内送達が含まれる。適する非経口投与経路には、例えば、血管内投与(例えば、静脈内ボラス注射、静脈内注入、動脈内ボラス注射、動脈内注入及び血管系へのカテーテル滴下)；組織の周囲及び内部への注射(例えば、腫瘍周囲及び腫瘍内注射、網膜内注射又は網膜下注射)；皮下注入(例えば浸透ポンプによる)を含む皮下注射又はデポジション；例えばカテーテル又は他の配備装置(例えば、網膜ペレット又は坐薬、又は多孔性、非多孔性若しくはゼリー状の物質を含むインプラント)による対象とする組織への直接適用；並びに吸入が含まれる。特に適する投与経路は、腫瘍への注射、注入及び直接注入である。

【0185】

本方法では、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子産物発現抑制化合物は、裸のRNAとして、送達試薬と一緒に、又はmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子産物発現抑制化合物を発現する配列を

10

20

30

40

50

含む核酸(例えば、組換え体プラスミド又はウイルスベクター)として、対象に投与することができる。適する送達試薬には、例えば、Mirus

Transit TKO親油性試薬;リポフェクチン;リポフェクタミン;セルフェクチン;ポリカチオン(例えば、ポリリジン)及びリポソームが含まれる。

【0186】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物を発現する配列を含む組換え体プラスミド及びウイルスベクター、並びにそのようなプラスミド及びベクターを癌細胞に送達する技術は、本明細書で論じられ、及び/又は当技術分野で公知である。

【0187】

特定の実施形態では、対象にmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む核酸)を送達するために、リポソームが用いられる。リポソームは、遺伝子産物又は核酸の血中半減期を長くすることもできる。本発明に用いるのに適するリポソームは、標準の小胞形成脂質から形成することができ、それらには、中性又は負荷電のリン脂質及びコレステロールなどのステロールが一般に含まれる。脂質の選択は、所望のリポソームサイズ及び血流中のリポソームの半減期などの因子を考慮することによって、一般に導かれる。リポソームを調製するために様々な方法が公知であり、例えば、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる、Szokaら(1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng.

9:467、並びに、米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,837,028号及び第5,019,369号に記載されている。

【0188】

本方法に用いられるリポソームは、リポソームの標的を癌細胞にするリガンド分子を含むことができる。癌細胞に一般的な受容体に結合するリガンド、例えば腫瘍細胞抗原に結合するモノクローナル抗体が好ましい。

【0189】

本方法に用いられるリポソームは、単核マクロファージ系(「MMS」)及び細網内皮系(「RES」)によるクリアランスを回避するように修飾することもできる。そのような修飾されたリポソームは、表面に、又はリポソーム構造に組み込まれたオブソニン化抑制部分を有する。特に好ましい実施形態では、本発明のリポソームは、オブソニン化抑制部分及びリガンドの両方を含むことができる。

【0190】

本発明のリポソームを調製するのに用いるオブソニン化抑制部分は、一般的に、リポソーム膜に結合している大きな親水性重合体である。本明細書で用いるように、それが、例えば、膜自体への脂溶性アンカーのインターカレーションによって、又は膜脂質の活性基に直接結合することによって、化学的又は物理的に膜に結合している場合、オブソニン化抑制部分はリポソーム膜に「結合」している。これらのオブソニン化抑制親水性重合体は、例えば、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,920,016号に記載されているように、MMS及びRESによるリポソームの取込みをかなり減少させる、保護表面層を形成する。

【0191】

リポソームを修飾するのに適するオブソニン化抑制部分は、好ましくは、約500~約40,000ダルトン、より好ましくは約2,000~約20,000ダルトンの数平均分子量を有する水溶性重合体である。そのような重合体には、ポリエチレングリコール(PEG)又はポリプロピレングリコール(PPG)誘導体;例えば、メトキシPEG又はPPG及びステアリン酸PEG又はPPG;合成ポリマー、例えばポリアクリルアミド又はポリN-ビニルピロリドン;線状、分枝状、又はデンドリマーのポリアミドアミン;ポリアクリル酸;多価アルコール、例えば、カルボキシル基又はアミノ基が化学的に連結しているポリビニルアルコール及びポリキシリトール、並びに、ガングリオシドGM1などのガングリオシドが含まれる。PEG、メトキシPEG又はメトキシPPG、又はそれらの誘導体の共重合体も適する。さらに、オブソニン化抑制重合体は、PEGとポリアミノ酸、多糖、ポリアミドアミン、ポリエチレンアミン又はポリヌク



レオチドとのブロック共重合体であってもよい。オブソニン化抑制重合体は、アミノ酸又はカルボン酸を含有する天然の多糖類、例えば、ガラクトン酸、グルクロン酸、マンヌロン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、ノイラミン酸、アルギン酸、カラゲナン；アミノ化多糖類又はオリゴ糖(直鎖又は分岐状)；又はカルボキシ化多糖類又はオリゴ糖、例えば、炭酸の誘導体と反応した結果カルボキシル基が連結したものであってもよい。好ましくは、オブソニン化抑制部分は、PEG、PPG又はそれらの誘導体である。PEG又はPEG誘導体で修飾されたりボソームは、「ペグ化リボソーム」と呼ばれることもある。

#### 【0192】

オブソニン化抑制部分は、多数の公知技術のいずれか一つによって、リボソーム膜に結合させることができる。例えば、PEGのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルは、ホスファチジルエタノールアミン脂溶性アンカーに結合させ、次に膜に結合させることができる。同様に、デキストラン重合体は、60 において、 $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ 及び30:12の比率のテトラヒドロフランと水などの溶媒混合液を用いて、還元アミノ化を通してステアリルアミン脂溶性アンカーで誘導体化することができる。

10

#### 【0193】

オブソニン化抑制部分で修飾されたりボソームは、修飾されていないリボソームよりずっと長い時間循環中に残留する。この理由から、そのようなリボソームは、「ステルス」リボソームと呼ばれることがある。ステルスリボソームは、多孔性又は「漏出性」の微小血管系によって養われる組織に集積することが知られている。したがって、そのような微小血管系の欠陥を特徴とする組織、例えば腫瘍は、これらのリボソームを効率的に集積する。Gabizon, ら(1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18:6949-53を参照。さらに、RESによる取込みの減少は、肝臓及び脾臓へのリボソームのかんりの蓄積を抑制することによって、ステルスリボソームの毒性を低下させる。したがって、オブソニン化抑制部分で修飾されているリボソームは、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む核酸)を腫瘍細胞に送達するのに特に適している。

20

#### 【0194】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、それらを対象に投与する前に、当分野の公知技術によって、「医薬品」とも呼ばれる医薬組成物として製剤化してもよい。したがって、本発明は、癌を治療するための医薬組成物を包含する。

#### 【0195】

一実施形態では、医薬組成物は、少なくとも一つの単離miR遺伝子産物、又は単離されたその変異体若しくは生物学的活性断片、及び薬学的に許容される担体を含む。特定の実施形態では、少なくとも一つのmiR遺伝子産物は、適する対照細胞と比較して癌細胞で低下した発現レベルを有するmiR遺伝子産物に対応する。

30

#### 【0196】

他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、少なくとも一つのmiR発現抑制化合物を含む。特定の実施形態では、少なくとも一つのmiR遺伝子発現抑制化合物は、その発現が対照細胞よりも癌細胞で高いmiR遺伝子に特異的である。

#### 【0197】

本発明の医薬組成物は、少なくとも無菌で、発熱物質を含有しないことを特徴とする。本明細書で用いるように、「医薬組成物」には、ヒト及び獣医での使用のための製剤が含まれる。本発明の医薬組成物を調製する方法は当分野の技術の範囲内であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.(1985)に記載され、その全開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

#### 【0198】

本医薬組成物は、少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む少なくとも一つの核酸)(例えば、0.1~90重量%)、又はその生理的に許容される塩を、薬学的に許容される担体と混合されて含む。ある実施形態では、本発明の医薬組成物は、一つ又は複数の抗癌剤(例えば、化学療法剤)をさらに含む。

50

本発明の医薬製剤は、リボソームに封入されている少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む少なくとも一つの核酸)、及び薬学的に許容される担体を含むこともできる。一実施形態では、医薬組成物は、miR遺伝子、又はmiR29a、miR-29b及びmiR-29cの一つ又は複数である遺伝子産物を含む。

【0199】

特に適する薬学的に許容される担体は、水、緩衝水、通常の生理食塩水、0.4%食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などである。

【0200】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は、ヌクレアーゼによる分解に耐性である、少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む少なくとも一つの核酸)を含む。

10

【0201】

当業者は、例えば2'位置が修飾されている一つ又は複数のリボヌクレオチドをmiR遺伝子産物に組み込むことによって、ヌクレアーゼ耐性の核酸を容易に合成することができる。適する2'修飾リボヌクレオチドには、フルオロ、アミノ、アルキル、アルコキシ及びO-アシルで2'位置が修飾されたものが含まれる。

医薬組成物

本発明の医薬組成物は、従来の薬用の賦形剤及び/又は添加剤を含むこともできる。適する薬用賦形剤には、安定剤、抗酸化剤、モル浸透圧調節剤、緩衝剤及びpH調節剤が含まれる。適する添加剤には、例えば、生理的に生体適合性の緩衝剤(例えば、トロメタミン塩酸塩)、キレート(chelant)(例えばDTPA若しくはDTPA-ビスアミド)若しくはカルシウムキレート錯体(例えばカルシウムDTPA、CaNaDTPA-ビスアミド)の添加、又は任意選択で、カルシウム塩若しくはナトリウム塩(例えば、塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム若しくは乳酸カルシウム)の添加が含まれる。本発明の医薬組成物は、液体状態で使用するために包装すること、又は凍結乾燥することができる。

20

【0202】

本発明の固体の医薬組成物のために、従来の無毒固体の薬学的に許容される担体、例えば、薬用等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、滑石、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウムなどを用いることができる。

30

【0203】

例えば、経口投与のための固体医薬組成物は、上記の担体及び賦形剤のいずれか、並びに、10~95%、好ましくは25%~75%の少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む少なくとも一つの核酸)を含むことができる。エアゾール(吸入)投与のための医薬組成物は、0.01~20重量%、好ましくは1~10重量%の、上に述べたようにリボソームに封入されている少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む少なくとも一つの核酸)、及び噴射剤を含むことができる。所望により担体が、例えば、鼻腔内送達のためのレシチンが含まれてもよい。

【0204】

40

本発明の医薬組成物は、一つ又は複数の抗癌剤をさらに含むことができる。特定の実施形態では、組成物は、少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物(又はそれらをコードする配列を含む少なくとも一つの核酸)、及び少なくとも一つの化学療法剤を含む。本発明の方法に適する化学療法剤には、DNAアルキル化剤、抗腫瘍抗生物質剤、抗代謝剤、チューブリン安定化剤、チューブリン不安定化剤、ホルモンアンタゴニスト剤、トポイソメラーゼ阻害剤、プロテインキナーゼ阻害剤、HMG-CoA阻害剤、CDK阻害剤、サイクリン阻害剤、カスパーゼ阻害剤、メタロプロテインナーゼ阻害剤、アンチセンス核酸、三重螺旋DNA、核酸アプタマー、及び分子的に修飾されたウイルス、細菌及び細菌外毒素の剤が含まれるが、これらに限定されない。本発明の組成物に適する作用物質の例には、シチジンアラビノシド、メトトレキセート、ビンクリスチン、エトボシド(VP-16)、

50

ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、シスプラチン(CDDP)、デキサメタゾン、アルグラビン、シクロホスファミド、筋肉融解素、メチルニトロソ尿素、フルオロウラシル、5-フルオロウラシル(5FU)、ビンブラスチン、カンプトセシン、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、過酸化水素、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、カルムスチン、ストレプトゾシン、CPT-11、タキソール、タモキシフェン、ダカルバジン、リツキシマブ、ダウノルビシン、1-

-D-アラビノフラノシルシトシン、イマチニブ、フルダラビン、ドセタキセル、FOLFOLX4が含まれるが、これらに限定されない。

#### 腫瘍形成阻害剤

腫瘍形成阻害剤を特定する方法であって、試験剤を細胞に提供して、細胞中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含む方法も、本明細書で提供される。一実施形態では、本方法は、試験剤を細胞に提供して、癌細胞中で低下した発現レベルと関連する少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含む。適する対照細胞(例えば、作用物質が提供されていない)と比較して、試験剤の提供後の、細胞中のmiR遺伝子産物のレベルの増加は、試験剤が腫瘍形成の阻害剤であることを示す。

#### 【0205】

他の実施形態では、本方法は、試験剤を細胞に提供して、癌細胞中で増加した発現レベルと関連する少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含む。適する対照細胞(例えば、作用物質が提供されていない)と比較して、試験剤の提供後の、細胞中のmiR遺伝子産物のレベルの低下は、試験剤が腫瘍形成の阻害剤であることを示す。特定の

#### 【0206】

適する作用物質には、薬剤(例えば、小分子、ペプチド)及び生体高分子(例えば、タンパク質、核酸)が含まれるが、これらに限定されない。作用物質は、組換えで、合成的に生成することができ、又はそれは、天然の源から単離(すなわち、精製)することができる。そのような作用物質を細胞に提供するための様々な方法(例えば、トランスフェクション)が当技術分野で公知であり、そのような方法のいくつかは上に記載されている。少なくとも一つのmiR遺伝子産物の発現を検出するための方法(例えば、ノーザンブロッティング、in situハイブリダイゼーション、RT-PCR、発現プロファイリング)も、当技術分野で

#### 実施例IV

癌関連疾患の診断、段階付け、予後予知、モニタリング及び治療のための方法、試薬及びキット。

#### 【0207】

本明細書におけるすべての実施例は、それらの範囲を限定するものではないとみなされるべきであることを理解されたい。種々の態様を、以下のサブセクションにおいてさらに詳細に説明する。

#### 診断方法

一つの実施形態では、患者が癌関連疾患を有するか又は患者の癌関連疾患を発症するリスクが正常を上回っているかを評価する診断方法を提供し、この方法は、患者試料中のマーカーの発現レベルと対照、例えば、癌関連疾患を有しない患者からの試料中のマーカーの正常な発現レベルとを比較するステップを含む。

#### 【0208】

正常なレベルと比較して患者試料中のマーカーの有意により高い発現レベルは、患者が癌関連疾患に罹患しているか又は患者の癌関連疾患を発症するリスクが正常を上回っていることを示す。

#### 【0209】

マーカーは、方法の陽性の予想値が、少なくとも約10%となり、特定の非限定的な実施形態では、約25%、約50%又は約90%となるように選択される。また、正常な細胞と比較し

て、少なくとも約20%において、及び特定の非限定的な実施形態では約50%又は約75%において、少なくとも2倍だけ差示的に発現するマーカーも方法において使用するために好ましい。

#### 【0210】

患者が癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価する一つの診断方法(例えば、新たな検出(「スクリーニング」)、再発の検出、反射試験(reflex testing))においては、この方法は、a)患者試料中のマーカーの発現レベルと、b)対照の非癌関連疾患試料中のマーカーの正常な発現レベルとを比較するステップを含む。正常なレベルと比較して患者試料中のマーカーの有意により高い発現レベルは、患者が癌関連疾患に罹患していることを示す。

10

#### 【0211】

また、患者の癌関連疾患を阻害するための療法の効能を評価するための診断方法も提供する。そのような方法は、a)療法の少なくとも一部を患者に提供する前に患者から得た第1の試料中のマーカーの発現と、b)療法の一部を提供した後に患者から得た第2の試料中のマーカーの発現とを比較するステップを含む。第1の試料中のマーカーの発現レベルと比べて第2の試料中のマーカーの有意により低い発現レベルは、療法には、患者の癌関連疾患を阻害する効能があることを示す。

#### 【0212】

これらの方法における「療法」は、これらに限定されないが、医薬組成物、遺伝子治療、並びに抗体及びケモカインの投与等の生物学的療法を含めた、癌関連疾患を治療するための任意の療法であってよいことが理解されるであろう。したがって、本明細書に記載する方法を使用して、療法の前、間及び後に患者を評価すること、例えば、疾患の状況の低減を評価することができる。

20

#### 【0213】

特定の態様では、診断方法は、化学的薬剤又は生物学的薬剤を使用する療法を対象とする。これらの方法は、a)患者から得、化学的薬剤又は生物学的薬剤の存在下で維持した第1の試料中のマーカーの発現と、b)患者から得、薬剤の非存在下で維持した第2の試料中のマーカーの発現とを比較するステップを含む。第1の試料中のマーカーの発現レベルと比べて第2の試料中のマーカーの有意により低い発現レベルは、薬剤には、患者の癌関連疾患を阻害する効能があることを示す。一つの実施形態では、第1の試料及び第2の試料は、患者から得た単一の試料の一部であっても、又は患者から得、プールした試料の一部であってもよい。

30

予後を評価するための方法

また、患者の癌関連疾患の進行を評価するためのモニタリング方法も提供し、この方法は、a)第1の時点において、患者試料中のマーカーの発現を検出するステップと、b)その後の時点において、ステップa)を反復するステップと、c)ステップa)及びステップb)において検出した発現レベルを比較するステップと、これらから、患者の癌関連疾患の進行をモニターするステップとを含む。第1の時点における試料中のマーカーの発現レベルと比してその後の時点における試料中のマーカーの有意により高い発現レベルは、癌関連疾患が進行していることを示し、一方、有意により低い発現レベルは、癌関連疾患が退行していることを示す。

40

#### 【0214】

さらに、癌関連疾患が悪化しているか又は将来悪化する可能性があるかを決定するための診断方法も提供し、この方法は、a)患者試料中のマーカーの発現レベルと、b)対照試料中のマーカーの正常な発現レベルとを比較するステップを含む。正常なレベルと比較して患者試料中の有意により高い発現レベルは、癌関連疾患が悪化しているか又は将来悪化する可能性があることを示す。

阻害性組成物、治療用組成物及び/又は有害性組成物を評価するための方法

また、患者の癌関連疾患を阻害するための組成物を選択するための試験方法も提供する。この方法は、a)患者由来の細胞を含む試料を得るステップと、b)試料の一定分量を、複

50

数の試験組成物の存在下で別々に維持するステップと、c)一定分量のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較するステップと、d)試験組成物のうちの一つを選択するステップとを含み、選択された試験組成物は、その試験組成物を含有する一定分量中のマーカーの発現レベルを、その他の試験組成物の存在下におけるマーカーの発現レベルと比べて有意に低減させる。

#### 【0215】

その上、癌関連疾患を引き起こす点で化合物が有害である可能性を評価する試験方法も提供する。この方法は、a)細胞の一定分量を、化合物の存在下及び非存在下で別々に維持するステップと、b)一定分量のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較するステップとを含む。化合物の非存在下において維持した一定分量中のマーカーの発現レベルと比べて化合物の存在下において維持した一定分量中のマーカーの有意により高い発現レベルは、化合物がそのような点で有害である可能性があること示す。

10

#### 【0216】

その上、患者の癌関連疾患を阻害する方法もさらに提供する。この方法は、a)患者由来の細胞を含む試料を得るステップと、b)試料の一定分量を、複数の組成物の存在下で別々に維持するステップと、c)一定分量のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較するステップと、d)組成物のうちの少なくとも一つを患者に投与するステップとを含み、少なくとも一つの組成物は、その組成物を含有する一定分量中のマーカーの発現レベルを、その他の組成物の存在下におけるマーカーの発現レベルと比べて有意に低減させる。

20

#### 【0217】

試料中のマーカーの発現レベルは、例えば、対応するマーカータンパク質又はタンパク質断片の存在を(例えば、タンパク質又はタンパク質断片と特異的に結合する抗体、抗体の誘導体、抗体断片又は一本鎖抗体等の試薬を使用することによって)、対応するマーカーの核酸(例えば、ヌクレオチド転写物若しくはその相補体)又は核酸断片の存在を(例えば、試料から得た転写されたポリヌクレオチドを、核酸配列又はその相補体の全体又はセグメントを有する一つ又は複数の核酸が固定化された基板と接触させることによって)、対応するマーカータンパク質によって直接的(すなわち、触媒されて)又は間接的に産生する代謝産物の存在を、試料中に検出することによって評価することができる。

#### 【0218】

上記の方法はいずれも、少なくとも一つ又は複数の(例えば、2、3、5若しくは10個以上の)癌関連疾患マーカーを使用して実施することができる。そのような方法においては、それらのうちの少なくとも一つがマーカーである、複数のマーカーのそれぞれの、試料中の発現レベルを、癌関連疾患に罹患していない対照のヒトから得た同一の型の試料中の複数のマーカーのそれぞれの正常な発現レベルと比較する。そうしたマーカーの対応する正常な又は対照のレベルと比べて、試料中の一つ又は複数のマーカーの有意に変化した(すなわち、単一のマーカーを使用する上記の方法において特定したように増加若しくは減少した)発現レベル、又はそれらの何らかの組合せは、患者が癌関連疾患に罹患していることを示す。上記の方法のすべてについて、(一つ又は複数の)マーカーが、方法の陽性の予想値が、少なくとも約10%となるように選択される。

30

#### 候補薬剤の例

40

候補薬剤は、当技術分野で既知の薬理作用のある物質であってもよく、又は何らかの薬理学的活性を示すことがこれまでに知られていない物質であってもよい。これらの物質は、天然に存在する物質であっても、又は実験室で合成された物質であってもよい。それらは、微生物、動物又は植物から単離してもよく、又は組換えによって産生しても、若しくは任意の適切な化学的な方法によって合成してもよい。それらは、小型分子、核酸、タンパク質、ペプチド又はペプチド模倣薬であってもよい。特定の実施形態では、候補薬剤は、50ダルトン超かつ約2,500ダルトン未満の分子量を有する小型の有機化合物である。候補薬剤は、タンパク質との構造的な相互作用のために必要な官能基を含む。候補薬剤はまた、生体分子中にも見い出され、それらとして、これらに限定されないが、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、構造類似体又は組合せが

50

挙げられる。

【0219】

候補薬剤は、合成化合物又は天然化合物のライブラリーを含めた多種多様な源から得られる。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチド及びランダム化オリゴペプチドの発現を含めて、多種多様な有機化合物及び生体分子の偶発的合成及び指向型合成のために利用可能な多数の手段がある。或いは、細菌、真菌、植物及び動物の抽出物の形態をとる天然化合物のライブラリーが、利用可能であるか、又は容易に産生される。さらに、天然の又は合成によって生成されるライブラリー及び化合物は、従来の化学的、物理学的及び生化学的な手段によって容易に改変され、コンビナトリアルライブラリーを生成するために使用することができる。特定の実施形態では、候補薬剤は、コンビナトリアルライブラリー法の技術における多数のアプローチのいずれかを使用して得ることができ、非限定的な例として、生物学的ライブラリー、空間的にアドレス可能な固相又は溶液相の平行ライブラリー、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「1-ピース、1-化合物」ライブラリー法、及び親和性クロマトグラフィーによる選択を使用する合成ライブラリー法が挙げられる。

10

【0220】

特定のさらなる実施形態では、特定の薬理作用のある物質に、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等、指向型の又は偶発的な化学的修飾を施して、構造類似体を生成することができる。

20

【0221】

また、癌関連疾患を治療するための治療剤を同定するための方法と同一の方法を使用し、in

vitro研究から得られたリード化合物/薬剤を検証することもできる。

【0222】

候補薬剤は、一つ又は複数の癌関連疾患の応答経路を上方制御又は下方制御する物質であってよい。特定の実施形態では、候補薬剤は、そのような経路に影響を及ぼすアンタゴニストであってよい。

癌関連疾患を治療するための方法

本明細書においては、癌関連疾患応答を治療する、阻害する、緩和する又は逆転させるための方法を提供する。本明細書に記載する方法においては、シグナル伝達カスケードを妨げる薬剤を、これらに限定されないが、そのような合併症がまだ明らかでない癌関連疾患患者及び少なくとも一つの癌関連疾患応答をすでに示している癌関連疾患患者等、それを必要とする個体に投与する。

30

【0223】

前者の場合、そのような治療は、そのような癌関連疾患応答の発生を予防するため及び/又はそれらが発生する程度を低減するために有用である。後者の場合、そのような治療は、そのような癌関連疾患応答が発生する程度を低減するため、それらのさらなる発達を予防するため、又は癌関連疾患応答を逆転させるために有用である。

【0224】

特定の実施形態では、癌関連疾患応答カスケードを妨げる薬剤は、そのような応答に特異的な抗体であってよい。

40

マーカーの発現

マーカーの発現は、いくつかの方法で阻害することができ、非限定的な例として、(一つ又は複数の)マーカーの転写、翻訳又は両方を阻害するために癌関連疾患細胞に提供することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。或いは、タンパク質の機能又は活性を阻害する細胞内抗体を産生させるために、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体、抗体の誘導体又は抗体断片をコードし、適切なプロモーター領域/調節領域と動作可能に連結しているポリヌクレオチドを細胞に提供することができる。マーカーの発現及び/又は機能はまた、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体、抗体の誘導体又は抗体断片を用いて癌関連疾患細胞を処理することによっても阻害することができる。

50

本明細書に記載する方法を使用して、マーカーの発現を阻害する又はマーカータンパク質の機能を阻害する分子を同定するために、特に、細胞膜を越えることが可能な程度に十分に小型の分子を含めた、多様な分子をスクリーニングすることができる。患者の癌関連疾患細胞を阻害するために、そのようにして同定した化合物を患者に提供することができる。

#### 【0225】

任意のマーカー又はマーカーの組合せ、及びマーカーと組み合わせた任意の特定のマーカーを、本明細書に記載する組成物、キット及び方法において使用することができる。一般に、癌関連疾患細胞中のマーカーの発現レベルと正常な細胞中の同一のマーカーの発現レベルとの間の差ができるだけ大きいマーカーを使用することが望ましい。この差が、マーカーの発現を評価するための方法の検出限界と同程度に小さい場合があるが、この差は、少なくとも決定方法の標準誤差よりも大きいことが望ましく、特定の実施形態では、正常組織中の同一のマーカーの発現レベルの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、100、500又は1000倍以上であることが望ましい。

10

#### 【0226】

特定のマーカータンパク質が細胞の周囲の細胞外空間に分泌されることが認識されている。そのようなマーカータンパク質を、癌と関係がある体液試料中に検出することができるという事実に起因して、これらのマーカーが、組成物、キット及び方法の特定の実施形態では使用される。これらの体液試料は、組織生検試料よりも、ヒト患者から容易に収集することができる。さらに、マーカータンパク質を検出するための *in vivo* における技法は、タンパク質に対して作られた標識抗体を対象に導入することを含む。例えば、抗体を、放射性マーカーを用いて標識することができ、対象中のその存在及び場所は、標準的な画像法によって検出することができる。

20

#### 【0227】

任意の特定のマーカータンパク質が、分泌タンパク質であるかどうかを決定するために、マーカータンパク質を、例えば、ヒトの細胞系等の哺乳動物細胞中で発現させ、細胞外液を収集し、細胞外液中のタンパク質の有無を(例えば、タンパク質と特異的に結合する標識抗体を使用して)評価する。

#### 【0228】

組織及び/又は体液の細胞を含有する患者試料を、本明細書に記載する方法において使用することができることが理解されるであろう。これらの実施形態では、マーカーの発現レベルを、試料中のマーカーの量(例えば、絶対的な量又は濃度)を評価することによって評価することができる。もちろん、試料中のマーカーの量を評価する前に、細胞試料に、多様な収集後の調製並びに保管の技法(例えば、核酸及び/若しくはタンパク質の抽出、固定化、保管、凍結、限外ろ過、濃縮、蒸発、遠心分離等)を施すことができる。

30

#### 【0229】

また、マーカーは、細胞から、消化器系、血流及び/又は間質空間中へ流出する場合があることも理解されるであろう。流出したマーカーは、例えば、血清又は血漿を調べることによって試験することができる。

#### 【0230】

組成物、キット及び方法を使用して、マーカータンパク質を発現する細胞の表面上に少なくとも一部が提示されるマーカータンパク質の発現を検出することができる。例えば、免疫学的方法を使用して、全細胞上のそのようなタンパク質を検出してもよく、又はコンピュータに基づいた配列解析法を使用して、少なくとも一つの細胞外ドメイン(すなわち、分泌タンパク質及び少なくとも一つの細胞表面ドメインを有するタンパク質の両方を含む)の存在を予測してもよい。マーカータンパク質を発現する細胞の表面上に少なくとも一部が提示されるマーカータンパク質の発現は、必ずしも細胞を溶解することなく、(例えば、タンパク質の細胞表面ドメインと特異的に結合する標識抗体を使用して)検出することができる。

40

#### 【0231】

50

マーカーの発現は、転写された核酸又はタンパク質の発現を検出するための任意の多種多様な方法によって評価することができる。そのような方法の非限定的な例として、分泌タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞質タンパク質又は核タンパク質を検出するための免疫学的な方法、タンパク質精製法、タンパク質の機能又は活性のアッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法、及び核酸増幅法が挙げられる。

#### 【0232】

特定の実施形態では、マーカーの発現を、抗体(例えば、放射標識抗体、発色団標識抗体、フルオロフォア標識抗体若しくは酵素標識抗体)、抗体の誘導体(例えば、基板とコンジュゲートさせた抗体、又はタンパク質-リガンドの対のタンパク質若しくはリガンドとコンジュゲートさせた抗体)、或いは抗体断片(例えば、一本鎖抗体、単離抗体の超可変ドメイン等)を使用して決定し、これらは、その正常な翻訳後修飾の全部又は一部を経たマーカータンパク質を含めて、マーカータンパク質又はその断片と特異的に結合する。

10

#### 【0233】

別の特定の実施形態では、マーカーの発現を、患者試料中の細胞からmRNA/cDNA(すなわち、転写されたポリヌクレオチド)を調製し、mRNA/cDNAを、マーカー核酸の相補体又はその断片である参照ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることによって評価する。cDNAは場合により、参照ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの前に、任意の多様なポリメラーゼ連鎖反応法を使用して増幅してよいが、好ましくは増幅しない。同様に、一つ又は複数のマーカーの発現を、定量PCRを使用して検出して、(一つ又は複数の)マーカーの発現レベルを評価することもできる。或いは、マーカーの突然変異又は変異(例えば、一塩基多型、欠失等)を検出する多くの方法のうちのいずれかを使用して、患者内におけるマーカーの発現を検出することもできる。

20

#### 【0234】

関連の実施形態では、試料から得た転写されたポリヌクレオチドの混合物を、マーカー核酸の少なくとも一部(例えば、少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、100又は500個以上のヌクレオチド残基)に対して相補性又は相同性を示すポリヌクレオチドが固定化された基板と接触させる。相補性又は相同性を示すポリヌクレオチドが、基板上で差示的に検出可能である(例えば、異なる発色団若しくはフルオロフォアを使用して検出可能である、又は異なる選択された位置に固定化されて検出可能である)場合には、複数のマーカーの発現レベルを、単一の基板(例えば、選択された位置に固定化されたポリヌクレオチドの「遺伝子チップ」マイクロアレイ)を使用して同時に評価することができる。一つの核酸と別の核酸とのハイブリダイゼーションが関与する、マーカーの発現を評価する方法を使用する場合には、ハイブリダイゼーションを厳密なハイブリダイゼーション条件下で実施することが望まれる。

30

#### バイオマーカーのアッセイ

特定の実施形態では、バイオマーカーのアッセイを、質量分析又は表面プラズモン共鳴を使用して実施することができる。種々の実施形態では、癌関連疾患に対して活性を示す薬剤を同定する方法は、a)一つ又は複数のマーカー又はその誘導体を含有する細胞試料を提供するステップと、b)前記細胞から抽出物を調製するステップと、c)前記抽出物を、マーカー結合部位を含有する標識核酸プローブと混合するステップと、d)試験薬剤の存在下又は非存在下で、マーカーと核酸プローブとの間の複合体の形成を決定するステップとを含むことができる。決定ステップは、前記抽出物/核酸プローブの混合物に対して電気泳動移動度シフトアッセイを行うことを含むことができる。

40

#### 【0235】

特定の実施形態では、決定ステップは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光に基づいたアッセイ及び超高スループットアッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイ又は蛍光相関分光法(FCS)アッセイから選択されたアッセイを含む。そのような実施形態では、SPRセンサーが、生体分子の相互作用の直接的なリアルタイムでの観察のために有用である。これは、SPRが、金属の誘電性表面における微小な屈折率の変化に対して感受性が高いからである。SPRは、約200nmのSPRセンサー/試料の界面内における $10^5 \sim 10^6$

50



<sup>6</sup>の屈折率(RI)単位の変化に対して感受性を示す表面技法である。したがってSPR分光法は、センサー層上に堆積する薄い有機被膜の成長をモニターするために有用である。

【0236】

組成物、キット及び方法は、一つ又は複数のマーカーの発現レベルの差の検出を利用することから、正常な細胞及び癌の影響を受けている細胞のうちの少なくとも一つにおいて、マーカーの発現レベルが、発現を評価するために使用する方法の最小検出限界よりも有意に高いことが望まれる。

【0237】

追加の患者試料を、一つ又は複数のマーカーを使用して日常的にスクリーニングすることによって、特異的な癌関連疾患を含めて、マーカーのうちの特定のものが、種々の型の細胞中で過剰発現することが認識されるであろうことを理解されたい。

10

【0238】

さらに、より多くの数の患者試料が、マーカーの発現について決定され、試料を得た個々の患者の成果が関連付けられるにつれ、また、マーカーのうちの特定のものの变化した発現が、癌関連疾患と強く関連付けられ、その他のマーカーの变化した発現が、その他の疾患と強く関連付けられることも確認されるであろう。したがって、組成物、キット及び方法は、患者の癌関連疾患の段階、グレード、組織学的な型及び性質のうちの一つ又は複数の特徴付けるために有用である。

【0239】

組成物、キット及び方法が、患者の癌関連疾患の段階、グレード、組織学的な型及び性質のうちの一つ又は複数の特徴付けるために使用される場合、対応する段階、グレード、組織学的な型又は性質の少なくとも約20%において、並びに特定の実施形態では、少なくとも約40%、60%又は80%において、及び癌関連疾患に罹患している実質的にすべての患者において、陽性の結果が得られるように、マーカー又はマーカーのパネルが選択されることが望まれる。マーカー又はマーカーのパネルの発明は、(非限定的な例では、80%超のアッセイの特異性と相まって)約10%超の陽性の予想値が、一般集団について得られるように選ぶことができる。

20

【0240】

複数のマーカーを、組成物、キット及び方法において使用する場合、患者試料中の各マーカーの発現レベルを、同一の型の非癌の試料中の複数のマーカーのそれぞれの正常な発現レベルと、単一反応混合物中(すなわち、各マーカーについて、異なる蛍光プローブ等の試薬を使用する)、又は一つ若しくは複数のマーカーに対応する個々の反応混合物中のいずれかで比較することができる。一つの実施形態では、対応する正常なレベルと比べて、試料中の複数のマーカーのうちの二つ以上の有意に増加した発現レベルは、患者が癌関連疾患に罹患していることを示す。複数のマーカーを使用する場合、2、3、4、5、8、10、12、15、20、30又は50個以上の個々のマーカーを使用することができ、特定の実施形態では、より少ないマーカーの使用が望まれる場合がある。

30

【0241】

組成物、キット及び方法の感受性(すなわち、患者試料中の非組織及び/又は体液起源の細胞に起因する妨害による)を最大化するためには、そこで使用するマーカーは、制限された組織分布を有する、例えば、非組織細胞中では通常は発現しないマーカーであることが望ましい。

40

【0242】

組成物、キット及び方法は、癌関連疾患を発症するリスクが増強している患者及びそれらの患者の医療アドバイザーにとって特に実用的であることが認識されている。癌関連疾患を発症するリスクが増強していると認識される患者として、例えば、癌関連疾患の家族歴を有する患者が挙げられる。

【0243】

正常なヒトの細胞中のマーカーの発現レベルは、多様な方法で評価することができる。一つの実施形態では、こうした正常な発現レベルを、正常に見える細胞の一部中のマーカー

50

一の発現レベルを決定し、この正常な発現レベルを、異常であることが疑われる細胞の一部中の発現レベルと比較することによって評価する。或いは特に、本明細書に記載する方法の日常的な実行の結果として、さらなる情報が入手可能になるにつれて、マーカーの正常な発現についての集団平均値を使用することができる。その他の実施形態では、マーカーの「正常な」発現レベルは、非癌罹患患者から得た患者試料中、癌関連疾患の発症が疑われる患者における発症前に患者から得た患者試料から、アーカイブの患者試料から等のマーカーの発現を評価することによって決定することができる。

#### 【0244】

また、本明細書においては、試料(例えば、アーカイブの組織試料、又は患者から得た試料)中の癌関連疾患細胞の存在を評価するための組成物、キット及び方法も提供する。これらの組成物、キット及び方法は、必要な場合には、組成物、キット及び方法を患者試料以外の試料と共に使用するために適応させる以外は、上記のものと実質的に同一である。例えば、使用すべき試料が、パラフィン処理された、アーカイブのヒト組織試料である場合には、キット中の組成物中の化合物の比を、又は試料中のマーカーの発現レベルを評価するために使用すべき方法を加減する必要がある場合がある。

#### 抗体を産生する方法

また、本明細書においては、患者が癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価するために有用な抗体を産生する単離ハイブリドーマを作製する方法も提供する。この方法においては、マーカータンパク質の全体又はセグメントを含むタンパク質又はペプチドを、合成又は単離する(例えば、マーカータンパク質を発現する細胞からの精製によるか、又はin vivo若しくはin vitroにおいて、タンパク質若しくはペプチドをコードする核酸を転写し、翻訳することによる)。脊椎動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ又はヒツジ等の哺乳動物を、タンパク質又はペプチドを使用して免疫化する。脊椎動物は場合により(かつ好ましくは)、タンパク質又はペプチドを用いて、少なくともさらに一回免疫化してよく、その結果、脊椎動物は、タンパク質又はペプチドに対してロバストな免疫応答を示す。免疫化した脊椎動物から脾細胞を単離し、任意の多様な方法を使用して、不死化細胞系と融合させて、ハイブリドーマを形成する。次いで、このようにして形成したハイブリドーマを、標準的な方法を使用してスクリーニングして、マーカータンパク質又はその断片と特異的に結合する抗体を産生する一つ又は複数のハイブリドーマを同定する。また、本明細書においては、この方法によって作製したハイブリドーマ、及びそのようなハイブリドーマを使用して作製した抗体も提供する。

#### 効能を評価する方法

また、本明細書においては、癌関連疾患細胞を阻害するための試験化合物の効能を評価する方法も提供する。上記に記載したように、マーカーの発現レベルの差は、細胞の異常な状況と相関付けられる。マーカーのうちの特定のものの発現レベルの変化は、細胞の異常な状況の結果生じる可能性が高いことが認識されているが、同様に、マーカーのうちのその他のものの発現レベルの変化が、それらの細胞の異常な状況を誘発、維持及び促進することも認識されている。したがって、患者の癌関連疾患を阻害する化合物は、一つ又は複数のマーカーの発現レベルの、そうしたマーカーの正常な発現レベル(すなわち、正常な細胞中のマーカーの発現レベル)により近づいたレベルへの変化を引き起こすであろう。

#### 【0245】

したがって、この方法は、試験化合物の存在下で維持した第1の細胞試料中のマーカーの発現と、試験化合物の非存在下で維持した第2の細胞試料中のマーカーの発現とを比較するステップを含む。試験化合物の存在下において有意に低減したマーカーの発現は、試験化合物が癌関連疾患を阻害することを示す。細胞試料は、例えば、患者から得た正常な細胞の単一の試料の一定分量、患者から得た正常な細胞のプールした試料、正常な細胞系の細胞、患者から得た癌関連疾患細胞の単一の試料の一定分量、患者から得た癌関連疾患細胞のプールした試料、癌関連疾患細胞系の細胞等であってよい。

#### 【0246】

10

20

30

40

50

一つの実施形態では、試料は、患者から得た癌関連疾患細胞であり、患者の癌関連疾患を最も良好に阻害する可能性のある化合物を同定するために、種々の癌関連疾患を阻害するために有効であると考えられている複数の化合物を試験する。

#### 【0247】

同様に、この方法を使用して、患者の癌関連疾患を阻害するための療法の効能を評価することもできる。この方法においては、一対の試料(一方には療法を施し、他方には療法を施さない)中の一つ又は複数のマーカーの発現レベルを評価する。試験化合物の効能を評価する方法の場合と同様に、療法が、マーカーの有意により低い発現レベルを誘発する場合には、療法には、癌関連疾患を阻害する効能がある。上記に記載したように、選択された患者からの試料をこの方法において使用する場合には、患者の癌関連疾患を阻害する効能がある可能性が最も高い療法を選択するために、代替療法をin vitroにおいて評価することができる。

10

有害である可能性を決定するための方法

本明細書に記載するように、ヒト細胞の異常な状況は、マーカーの発現レベルの変化と相関付けられる。また、試験化合物が有害である可能性を決定するための方法も提供する。この方法は、ヒト細胞の一定分量を試験化合物の存在下及び比存在下で別々に維持するステップを含む。一定分量のそれぞれにおけるマーカーの発現を比較する。(試験化合物の非存在下において維持した一定分量と比べて)試験化合物の存在下において維持した一定分量中のマーカーの有意により高い発現レベルは、試験化合物が有害である可能性を示す。種々の試験化合物の相対的な有害である可能性を、関連のあるマーカーの発現レベルの増強若しくは阻害の程度を比較すること、発現レベルを増強若しくは阻害するマーカーの数を比較すること、又は両方を比較することによって評価することができる。

20

単離タンパク質及び抗体

一つの態様は、単離マーカータンパク質及びその生物学的活性部分、並びにマーカータンパク質又はその断片に対して作られた抗体をもたらすための免疫原として使用するために適したポリペプチド断片に関する。一つの実施形態では、自然のマーカータンパク質を、細胞又は組織の源から、標準的なタンパク質精製の技法を使用する適切な精製スキームによって単離することができる。別の実施形態では、マーカータンパク質の全体又はセグメントを含むタンパク質又はペプチドを、組換えDNAの技法によって産生する。組換え発現に代わって、そのようなタンパク質又はペプチドを、標準的なペプチド合成の技法を使用して化学的に合成することもできる。

30

#### 【0248】

「単離」若しくは「精製」したタンパク質又はその生物学的活性部分は、タンパク質が由来する細胞若しくは組織の源からの細胞材料及びその他の混入タンパク質を実質的に含有せず、又は化学的に合成する場合には、化学前駆体及びその他の化学物質を実質的に含有しない。「細胞材料を実質的に含有しない」という言い回しには、タンパク質の調製が含まれ、この調製では、タンパク質が、細胞の細胞構成成分から分離されて単離されるか、又は組換えによって産生される。したがって、細胞材料を実質的に含有しないタンパク質は、約30%、20%、10%又は5%(乾燥重量)未満の異種のタンパク質(本明細書では、「混入タンパク質」とも呼ぶ)を有するタンパク質の調製物を含む。

40

#### 【0249】

タンパク質又はその生物学的活性部分を組換えによって産生する場合には、また、好ましくは、培地も実質的に含有しない、すなわち、培地が、タンパク質調製物の約20%、10%又は5%未満の容積に相当する。タンパク質を化学合成によって生成する場合には、好ましくは、化学前駆体又はその他の化学物質を実質的に含有しない、すなわち、タンパク質の合成に関与する化学前駆体又はその他の化学物質からタンパク質は分離されている。したがって、タンパク質のそのような調製物は、目的のポリペプチド以外に、約30%、20%、10%又は5%(乾燥重量)未満の化学前駆体又は化合物を有する。

#### 【0250】

50

マーカートンパク質の生物学的活性部分は、マーカートンパク質のアミノ酸配列に対して十分な同一性を示すアミノ酸配列又はマーカートンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、これらのポリペプチドは、完全長のタンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、対応する完全長のタンパク質の少なくとも一つの活性を示す。典型的には、生物学的活性部分は、対応する完全長のタンパク質の少なくとも一つの活性を有するドメイン又はモチーフを含む。マーカートンパク質の生物学的活性部分は、例えば、10、25、50又は100個以上のアミノ酸長であるポリペプチドであってよい。さらに、マーカートンパク質のその他の領域が欠失しているその他の生物学的活性部分を、組換えの技法によって調製し、マーカートンパク質の自然の形態の機能的な活性のうちの一つ又は複数について評価することもできる。特定の実施形態では、有用なタンパク質は、これらの配列のうちの一つに対して実質的に(例えば、少なくとも約40%、及び特定の実施形態では50%、60%、70%、80%、90%、95%又は99%の)同一性を示し、対応する天然に存在するマーカートンパク質の機能的な活性を保持するが、天然の対立遺伝子変異又は変異誘発によってアミノ酸配列の点では異なる。

10

#### 【0251】

さらに、マーカートンパク質のセグメントライブラリーを使用して、ポリペプチドの変化に富んだ集団を生成して、変異マーカートンパク質又はそのセグメントをスクリーニングし、それに続いて、選択することもできる。

予測医学(predictive medicine)

また、本明細書においては、予測医学の分野における動物モデル及びマーカの使用も提供し、この分野では、診断アッセイ、予後予知アッセイ、薬理ゲノミクス及び臨床試験のモニタリングが、予後予知(予測)の目的で使用されて、それによって、個体を予防的に治療する。したがってまた、本明細書においては、個体に癌関連疾患を発症するリスクがあるかどうかを決定するための、一つ又は複数のマーカートンパク質又は核酸の発現レベルを決定するための診断アッセイも提供する。そのようなアッセイを、予後予知又は予測の目的で使用して、それによって、癌関連疾患が発症する前に個体を予防的に治療することができる。

20

#### 【0252】

別の態様では、方法は、個体が、その個体の発現パターンを変化させる化学物質又は毒物に曝露されたことがあるかどうかを知るために、同一の個体を少なくとも定期的にスクリーニングするために有用である。

30

#### 【0253】

さらに別の態様は、臨床試験において、薬剤(例えば、癌関連疾患を阻害する目的、又は任意のその他の障害を治療若しくは予防する目的(例えば、そのような治療が示す場合がある何らかのシステム効果を理解する目的)のいずれかで投与された薬物又はその他の化合物)の、マーカの発現又は活性に対する影響をモニターすることに関する。

薬理ゲノミクス

マーカはまた、薬理ゲノミクスのマーカとしても有用である。本明細書で使用する場合、「薬理ゲノミクスのマーカ」は、客観的な生化学的マーカであり、その発現レベルが、患者の特異的な臨床における薬物に対する応答又は感受性と相関付けられる。薬理ゲノミクスのマーカの発現の存在又は量は、患者の、より具体的には、患者の腫瘍の、特定の薬物又は薬物群を用いた療法に対する予測される応答と関係を示す。患者中の一つ又は複数の薬理ゲノミクスのマーカの発現の存在又は量を評価することによって、患者に最も適した薬物療法、又は成功をより大きな程度でもたらすことが予測される薬物療法を選択することができる。

40

臨床試験のモニタリング

薬剤(例えば、薬物化合物)の、マーカの発現レベルに対する影響のモニタリングを、基礎的な薬物スクリーニングにおいてのみならず、また臨床試験においても適用することができる。例えば、マーカの発現に影響を及ぼす薬剤の有効性を、癌関連疾患のための治療を受けている対象の臨床試験においてモニターすることができる。

50

## 【0254】

一つの非限定的な実施形態では、本発明は、薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣薬、タンパク質、ペプチド、核酸、小型分子又はその他の薬物候補)を用いて対象を治療する場合の有効性をモニターするための方法を提供し、この方法は、(i)薬剤の投与前の対象から投与前試料を得るステップと、(ii)投与前試料中の一つ又は複数の選択されたマーカーの発現レベルを検出するステップと、(iii)対象から一つ又は複数の投与後試料を得るステップと、(iv)投与後試料中の(一つ又は複数の)マーカーの発現レベルを検出するステップと、(v)投与前試料中の(一つ又は複数の)マーカーの発現レベルを、一つ又は複数の投与後試料中の(一つ又は複数の)マーカーの発現レベルとを比較するステップと、(vi)それに従って、薬剤の対象への投与を変化させるステップとを含む。

10

## 【0255】

例えば、治療コースの間の(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現の増加は、無効な用量、及び用量の増加が望まれることを示すことができる。逆に、(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現の減少は、治療には効能があり、用量を変化させる必要がないことを示すことができる。

電子装置の読取り可能媒体、システム、アレイ、及びそれらを使用する方法

本明細書で使用する場合、「電子装置の読取り可能媒体」は、電子装置による直接的な読取り及びアクセスが可能である、データ又は情報を記憶、保持又は含有するための任意の適切な媒体を指す。そのような媒体として、これらに限定されないが、フロッピーディスク、ハードディスク記憶媒体及び磁気テープ等の磁気記憶媒体、コンパクトディスク等の光学記憶媒体、RAM、ROM、EPROM、EEPROM等の電子記憶媒体等、並びに通常のハードディスク、さらにこれらのカテゴリーのハイブリッド、すなわち、磁気/光学記憶媒体等が挙げられる。媒体は、本明細書に記載するマーカーをその上に記録するようになされる又は構成される。

20

## 【0256】

本明細書で使用する場合、「電子装置」という用語は、任意の適切な計算若しくは処理のための装置、又はデータ若しくは情報を記憶するように構成された若しくはなされたその他の機器を含むことを意図する。本発明と共に使用するために適した電子装置の例として、独立型計算装置、ローカルエリアネットワーク(LAN)、広域ネットワーク(WAN)、インターネット、イントラネット及びエクストラネットを含めたネットワーク、携帯端末(PDA)、携帯電話、ポケットベル等の電子機器、並びにローカルな及び分散型の処理システムが挙げられる。

30

## 【0257】

本明細書で使用する場合、「記録された」とは、電子装置の読取り可能媒体上に情報を記憶又は暗号化するための過程を指す。当業者であれば、媒体上に情報を記録するための任意の方法を容易に採用して、本明細書に記載するマーカーを含む材料をもたらすことができる。

## 【0258】

多様なソフトウェアプログラム及びフォーマットを使用して、本発明のマーカーの情報を、電子装置の読取り可能な媒体上に記憶することができる。マーカーをその上に記録させる媒体を得る又は生み出すために、フォーマット(例えば、テキストファイル又はデータベース)を構築する任意の数のデータプロセッサを利用することができる。マーカーを読取り可能な形態で提供することによって、多様な目的で、マーカーの配列情報に日常的にアクセスすることができる。例えば、当業者であれば、読取り可能な形態のヌクレオチド又はアミノ酸の配列を使用して、標的配列又は標的構造モチーフを、データ記憶手段の内部に記憶されている配列情報と比較することができる。検索手段を使用して、特定の標的配列又は標的モチーフと一致する配列の断片又は領域を同定する。

40

## 【0259】

したがってまた、本明細書においては、対象が癌関連疾患又は癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するための方法を実施するための指示を保持するための媒体も提供し、

50

この方法は、マーカーの有無を決定するステップと、マーカーの有無に基づいて、対象が癌関連疾患若しくは癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定し、かつ/又は癌関連疾患若しくは前癌関連疾患状態のための特定の治療を推奨するステップとを含む。

【0260】

また、本明細書においては、対象がマーカーと関係がある癌関連疾患又は癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するための電子システム及び/又はネットワーク中の方法も提供し、この方法は、マーカーの有無を決定するステップと、マーカーの有無に基づいて対象が癌関連疾患若しくは癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定し、かつ/又は癌関連疾患若しくは前癌関連疾患状態のための特定の治療を推奨するステップとを含む。この方法は、対象と関係がある表現型の情報を受け取り、かつ/又はネットワークから、対象と関係がある表現型の情報を得るステップをさらに含むことができる。

10

【0261】

また、本明細書においては、対象がマーカーと関係がある癌関連疾患又は癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するためのネットワーク、すなわち、方法も提供し、この方法は、マーカーと関係がある情報を受け取るステップと、対象と関係がある表現型の情報を受け取るステップと、ネットワークから、マーカー及び/又は癌関連疾患に対応する情報を得るステップと、表現型の情報、マーカー及び得た情報のうちの一つ又は複数に基づいて、対象が癌関連疾患又は癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するステップとを含む。この方法は、癌関連疾患又は前癌関連疾患状態のための特定の治療を推奨するステップをさらに含むことができる。

20

【0262】

また、本明細書においては、対象が癌関連疾患又は癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するためのビジネス方法も提供し、この方法は、マーカーと関係がある情報を受け取るステップと、対象と関係がある表現型の情報を受け取るステップと、ネットワークから、マーカー及び/又は癌関連疾患に対応する情報を得るステップと、表現型の情報、マーカー及び得た情報のうちの一つ又は複数に基づいて、対象が癌関連疾患又は癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するステップとを含む。この方法は、癌関連疾患又は前癌関連疾患状態のための特定の治療を推奨するステップをさらに含むことができる。

アレイ

また、本明細書においては、アレイ中で一つ又は複数の遺伝子の発現をアッセイするために使用することができるアレイも提供する。一つの実施形態では、組織中の遺伝子の発現をアッセイするために、アレイを使用して、アレイ中で遺伝子の組織特異性を解明することができる。このようにして、最大約7000個以上の遺伝子を、発現について同時にアッセイすることができる。これによって、一つ又は複数の組織中で特異的に発現する一連の遺伝子を示すプロファイルの開発が可能となる。

30

【0263】

そのような定性的な決定に加えて、本明細書においては、遺伝子の発現の定量化も提供する。したがって、組織特異性のみならず、また組織中の一連の遺伝子の発現レベルも解明可能である。したがって、遺伝子を、それらの組織における発現自体及びその組織中における発現レベルに基づいて群化することができる。これは、例えば、組織間における遺伝子の発現の関係を解明する場合に有用である。したがって、一つの組織を動揺させることができ、第2の組織中における遺伝子の発現に対する効果を決定することができる。これに関連して、生物学的刺激に対する応答について、一つの細胞型の、別の細胞型に対する効果を決定することができる。

40

【0264】

そのような決定は、例えば、遺伝子の発現レベルにおける細胞対細胞の相互作用の効果を知らるために有用である。薬剤を、一つの細胞型を治療目的で処理するために投与するが、薬剤が別の細胞型に対しては望ましくない効果を示す場合、この方法は、望ましくない効果の分子的基盤を決定するためのアッセイを提供し、したがって、対抗して作用する薬剤を同時投与するか、又はそうでなければ、望まれない効果を治療する機会を提供する。

50

同様に、単一の細胞型内であっても、望ましくない生物学的な効果を、分子レベルにおいて決定することができる。したがって、薬剤の、標的遺伝子以外の遺伝子の発現に対する効果を解明し、それに対抗することができる。

【0265】

別の実施形態では、アレイを使用して、アレイ中で、一つ又は複数の遺伝子の発現の時間経過をモニターすることができる。こうした時間経過は、本明細書に開示するように、種々の生物学的な状況、例えば、癌関連疾患の発症、癌関連疾患の進行、及び癌関連疾患と関係がある細胞の形質転換等の過程において発生し得る。

【0266】

アレイはまた、同一細胞中又は異なる細胞中における、ある遺伝子の発現又はその他の遺伝子の発現の効果を解明するためにも有用である。これによって、例えば、究極的な又は下流の標的を調節できない場合、治療的介入のための代替の分子標的の選択肢を提供する。

10

【0267】

アレイはまた、正常細胞及び異常細胞中における、一つ又は複数の遺伝子の差示的な発現パターンを解明するためにも有用である。これによって、診断又は治療的介入のための分子標的として役立つことができるであろう一連の遺伝子が提供される。

代用マーカー

マーカーは、一つ若しくは複数の障害若しくは疾患の状況について、又は癌関連疾患状況に至る状態についての代用マーカーとして役立つことができる。本明細書で使用する場合、「代用マーカー」は、客観的な生化学的マーカーであり、これは、疾患若しくは障害の有無と、又は疾患若しくは障害の進行と相関付けられる。そのようなマーカーの存在及び量は、疾患には依存しない。したがって、これらのマーカーは、特定の治療コースが、疾患の状況又は障害を軽減する点で有効であるかどうかを示すために役立つことができる。代用マーカーは、疾患の状況若しくは障害の、存在若しくは程度を標準的な方法によって評価することが困難である場合、又は潜在的にリスクな臨床エンドポイントに達する前に、疾患の進行の決定が望まれる場合に、特に有用である。

20

【0268】

マーカーはまた、薬力学的なマーカーとしても有用である。本明細書で使用する場合、「薬力学的なマーカー」は、客観的な生化学的マーカーであり、これは、薬物の効果と特異的に相関付けられる。薬力学的なマーカーの存在及び量は、薬物が投与される疾患の状況及び障害とは関連がない。したがって、マーカーの存在又は量は、対象中の薬物の存在又は活性を示す。例えば、薬力学的なマーカーが、生物学的組織中で、薬物のレベルに関係して、発現状態若しくは転写状態にある、又は非発現状態若しくは非転写状態にあるのいずれかであるという点において、マーカーは、組織中の薬物の濃度を示すことができる。このようにして、薬物の分布又は取込みを、薬力学的なマーカーによってモニターすることができる。同様に、薬力学的なマーカーの存在又は量が、薬物の代謝産物の存在又は量と関係する場合もあり、したがって、マーカーの存在又は量は、*in vivo*における薬物の相対的な分解速度を示す。

30

【0269】

薬力学的なマーカーは、特に、薬物が低い用量で投与される場合には、薬物効果の検出感度を増加させる点で、特に有用である。少ない量の薬物でも、マーカーの転写又は発現を複数回活性化させるのに十分であり得ることから、マーカーが増幅されて多量に存在する場合があります。これらのマーカーは、薬物自体よりも容易に検出可能である。また、マーカー自体の性質に起因して、マーカーがより簡単に検出される場合もある。例えば、本明細書に記載する方法を使用して、抗体を、タンパク質マーカーを検出するための免疫に基づいたシステムにおいて利用してもよく、又はマーカーに特異的な放射標識プローブを使用して、mRNAマーカーを検出してもよい。さらに、薬力学的なマーカーの使用は、直接的な観察の可能な範囲を越えた薬物治療に起因するリスクの予測も機構に基づいて提供することができる。

40

50

## 試験のためのプロトコール

癌関連疾患について試験する方法は、例えば、対象からの生物学的試料中の各マーカー遺伝子の発現レベルを長期間にわたり測定するステップと、レベルを、対照の生物学的試料中のマーカー遺伝子のレベルと比較するステップとを含む。

### 【0270】

マーカー遺伝子が、本明細書に記載する遺伝子のうちの一つであり、発現レベルが差示的に発現する(例えば、対照中の発現レベルよりも高い又は低い)場合には、対象が癌関連疾患の影響を受けていると判断される。マーカー遺伝子の発現レベルが許容範囲内に収まる場合には、対象が癌関連疾患の影響を受けている可能性は低い。

### 【0271】

発現レベルを比較するために、対照中のマーカー遺伝子の発現レベルを測定することによって、対照の標準値をあらかじめ決定することができる。例えば、標準値は、対照中の上記のマーカー遺伝子の発現レベルに基づいて決定することができる。例えば、特定の実施形態では、許容範囲を、標準値に基づいて $\pm 2S.D.$ とする。標準値を決定したら、試験方法を、対象からの生物学的試料中の発現レベルのみを測定し、値を対照について決定した標準値と比較することによって実施することができる。

### 【0272】

マーカー遺伝子の発現レベルは、マーカー遺伝子のmRNAへの転写及びタンパク質への翻訳を含む。したがって、癌関連疾患について試験する一つの方法は、マーカー遺伝子に対応するmRNAの発現強度又はマーカー遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルの比較に基づいて実施される。

## プローブ

癌関連疾患について試験する場合のマーカー遺伝子の発現レベルの測定は、種々の遺伝子解析の方法に従って実施することができる。具体的には、例えば、これらの遺伝子とプローブとしてハイブリダイズする核酸を使用するハイブリダイゼーションの技法、又はマーカー遺伝子とプライマーとしてハイブリダイズするDNAを使用する遺伝子増幅の技法を使用することができる。

### 【0273】

試験のために使用するプローブ又はプライマーは、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。それぞれのマーカー遺伝子のヌクレオチド配列についての識別番号が、本明細書に記載されている。

### 【0274】

さらに、高等動物の遺伝子には一般に、遺伝子多型が高い頻度で伴うことを理解されたい。また、スプライシングの過程の間に、相互に異なるアミノ酸配列を含むアイソフォームを産生する多くの分子もある。マーカー遺伝子の活性に類似する活性を示す、癌関連疾患と関係がある遺伝子はいずれも、遺伝子多型によるヌクレオチド配列の差を有する場合であっても、又はアイソフォームであっても、マーカー遺伝子の中に含まれる。

### 【0275】

また、マーカー遺伝子は、ヒトに加えて、その他の種の相同体を含むことができることも理解されたい。したがって、別段の指定がない限り、「マーカー遺伝子」という表現は、マーカー遺伝子の種に独特の相同体、又は個体に導入されている他種からのマーカー遺伝子を指す。

### 【0276】

また、「マーカー遺伝子の相同体」は、ヒト以外の種に由来する遺伝子を指し、これは、ヒトのマーカー遺伝子とプローブとして厳密な条件下でハイブリダイズすることができることも理解されたい。そのような厳密な条件は、当業者に既知であり、当業者であれば、適切な条件を実験的又は経験的に選択して、十分な(equal)厳密度をもたらすことができる。

### 【0277】

マーカー遺伝子のヌクレオチド配列か又はマーカー遺伝子のヌクレオチド配列の相補鎖

10

20

30

40

50



に対して相補性を示すヌクレオチド配列を含み、少なくとも15個のヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを、プライマー又はプローブとして使用することができる。したがって、「相補鎖」は、二本鎖DNAのうちの、一方の鎖に対する他方の鎖を意味し、二本鎖DNAは、A:T(RNAの場合にはU)塩基対及びG:C塩基対でできている。

#### 【0278】

さらに、「相補性を示す」は、少なくとも15個の連続したヌクレオチドの領域に対して完全な相補性を示すもののみならず、特定の場合には少なくとも40%、特定の場合には50%、特定の場合には60%、特定の場合には70%、少なくとも80%、90%及び95%以上の相同性を示すヌクレオチド配列を有するものも意味する。ヌクレオチド配列間の相同性の程度は、BLAST等のアルゴリズムによって決定することができる。

10

#### 【0279】

そのようなポリヌクレオチドは、マーカー遺伝子を検出するためのプローブとして、又はマーカー遺伝子を増幅するためのプライマーとして有用である。プライマーとして使用する場合、ポリヌクレオチドは通常、15bp~100bpのヌクレオチドを、特定の実施形態では、15bp~35bpのヌクレオチドを含む。プローブとして使用する場合には、DNAは、マーカー遺伝子の全ヌクレオチド配列(若しくはその相補鎖)、又は少なくとも15bpのヌクレオチドを有するその部分的な配列を含む。プライマーとして使用する場合、3'領域は、マーカー遺伝子に対して相補性を示さなければならず、5'領域は、制限酵素認識配列又はタグに連結されていてよい。

#### 【0280】

20

「ポリヌクレオチド」は、DNA又はRNAのいずれかであってよい。これらのポリヌクレオチドは、合成である又は天然に存在するのいずれかであってよい。また、ハイブリダイゼーションのためのプローブとして使用するDNAは通常標識する。当業者であれば、そのような標識方法は容易に理解する。本明細書においては、「オリゴヌクレオチド」という用語は、重合の程度が比較的低いポリヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの中に含まれる。

癌関連疾患についての試験

ハイブリダイゼーションの技法を使用する癌関連疾患についての試験は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、又はDNAマイクロアレイの技法を使用して実施することができる。さらに、RT-PCR法等の遺伝子増幅の技法を使用することもできる。RT-PCRにおける遺伝子増幅のステップの間にPCR増幅をモニターする方法を使用することによって、マーカー遺伝子の発現のより定量的な解析を達成することができる。

30

#### 【0281】

PCR遺伝子増幅をモニターする方法の場合、検出標的(DNA、又はRNAの逆転写物)を、蛍光染料及び蛍光を吸収するクエンチャーを用いて標識したプローブとハイブリダイズさせる。PCRが進行し、Taqポリメラーゼがその5'-3'エキソヌクレアーゼ活性でプローブを分解すると、蛍光染料とクエンチャーとが相互に引き離され、蛍光が検出される。蛍光は、リアルタイムで検出される。その中の標的のコピー数が知られている標準試料を同時に測定することによって、PCR増幅が直線的であるサイクルの数から、対象試料中の標的のコピー数を決定することが可能となる。また、当業者であれば、PCR増幅をモニターする方法は、任意の適切な方法を使用して実施することができることを認識する。

40

#### 【0282】

癌関連疾患について試験する方法はまた、マーカー遺伝子がコードするタンパク質を検出することによっても実施することができる。以降、マーカー遺伝子がコードするタンパク質を、「マーカータンパク質」と記載する。そのような試験方法のためには、例えば、ウェスタンブロット法、免疫沈降法及びELISA法を、各マーカータンパク質に結合する抗体を使用して利用することができる。

#### 【0283】

検出において使用する、マーカータンパク質に結合する抗体は、任意の適切な技法によ

50

って產生することができる。また、マーカータンパク質を検出するために、そのような抗体を適切に標識することもできる。或いは、抗体を標識する代わりに、抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインA又はプロテインGを標識して、マーカータンパク質を間接的に検出することもできる。より具体的には、そのような検出方法は、ELISA法を含むことができる。

#### 【0284】

抗原として使用するタンパク質又はその部分的なペプチドを、例えば、マーカー遺伝子又はその一部を発現ベクター中に挿入し、構築物を適切な宿主細胞中に導入して形質転換体を生成し、形質転換を培養して組換えタンパク質を発現させ、培地又は培地の上清から発現した組換えタンパク質を精製することによって得ることができる。或いは、遺伝子がコードするアミノ酸配列又は完全長のcDNAがコードするアミノ酸配列の一部を含むオリゴペプチドを化学的に合成して、免疫原として使用することもできる。

10

#### 【0285】

さらに、癌関連疾患についての試験を、指標として、マーカー遺伝子の発現レベルのみならず、また生物学的試料中のマーカータンパク質の活性も使用して実施することもできる。マーカータンパク質の活性は、タンパク質に本来備わっている生物学的活性を意味する。種々の方法を使用して、各タンパク質の活性を測定することができる。

#### 【0286】

癌関連疾患を示唆する症状にもかかわらず、日常的な試験においては、患者がこれらの疾患の影響を受けているとは診断されない場合であっても、そのような患者が、癌関連疾患に罹患しているかどうかを、本明細書に記載する方法に従って試験を実施することによって簡単に決定することができる。

20

#### 【0287】

より具体的には、特定の実施形態では、マーカー遺伝子が、本明細書に記載する遺伝子のうちの一つである場合には、症状から癌関連疾患が少なくとも疑われる患者におけるマーカー遺伝子の発現レベルの増加又は減少によって、症状は主として癌関連疾患によって引き起こされていることが示される。

#### 【0288】

さらに、試験は、患者の癌関連疾患が改善しているかどうかを決定するためにも有用である。すなわち、本明細書に記載する方法を使用して、癌関連疾患のための治療の治療効果を判断することができる。さらに、マーカー遺伝子が、本明細書に記載する遺伝子のうちの一つである場合には、癌関連疾患の影響を受けていると診断されている患者におけるマーカー遺伝子の発現レベルの増加又は減少によって、疾患がより進行していることが暗示される。

30

#### 【0289】

また、重症度及び/又は癌関連疾患に対する易罹患性も、発現レベルの差に基づいて決定することができる。例えば、マーカー遺伝子が、本明細書に記載する遺伝子のうちの一つである場合には、マーカー遺伝子の発現レベルの増加の程度が、癌関連疾患の存在及び/又は重症度と相関を示す。

40

マーカーの発現の制御

さらに、マーカー遺伝子の発現自体を、(一つ又は複数の)突然変異を遺伝子の転写調節領域中に導入することによって制御することもできる。当業者であれば、そのようなアミノ酸の置換を理解する。また、活性が維持される限り、変異させるアミノ酸の数は特に制限されない。通常、その数は、50個以内のアミノ酸であり、特定の非限定的な実施形態では、30個以内のアミノ酸、10個以内のアミノ酸、又は3個以内のアミノ酸である。活性が維持される限り、突然変異の部位はいずれの部位であってもよい。

スクリーニングの方法

さらに別の態様では、本明細書において、癌関連疾患を治療するための治療剤としての候補化合物についてスクリーニングする方法を提供する。一つ又は複数のマーカー遺伝子が、本明細書に記載する遺伝子の群から選択される。癌関連疾患のための治療剤は、(一

50

つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルを増加又は減少させることが可能である化合物を選択することによって得ることができる。

【0290】

「遺伝子の発現レベルを増加させる化合物」という表現は、遺伝子の転写、遺伝子の翻訳又はタンパク質活性の発現のステップのうちのいずれか一つを促進する化合物を指すことを理解されたい。他方、「遺伝子の発現レベルを減少させる化合物」という表現は、本明細書で使用する場合、これらのステップのいずれか一つを阻害する化合物を指す。

【0291】

特定の態様では、癌関連疾患のための治療剤についてスクリーニングする方法は、*in vivo*又は*in vitro*のいずれかにおいて実施することができる。このスクリーニングの方法は、例えば、(1)候補化合物を動物の対象に投与し、(2)動物の対象からの生物学的試料中の(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルを測定し、又は(3)候補化合物と接触させていない対照中の(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルと比較して、(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルを増加又は減少させる化合物を選択することによって実施することができる。

10

【0292】

さらに別の態様では、本明細書において、医薬品のための候補化合物の、(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルに対する効果を、動物の対象を候補化合物と接触させ、動物の対象に由来する生物学的試料中において、化合物の、(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルに対する効果をモニターすることによって評価するための方法を提供する。動物の対象に由来する生物学的試料中における(一つ又は複数の)マーカー遺伝子の発現レベルの変動は、上記に記載した試験方法において使用した技法と同一の技法を使用してモニターすることができる。さらに、評価に基づいて、医薬品のための候補化合物を、スクリーニングすることによって選択することができる。

20

キット

別の態様では、種々の診断及び試験のためのキットを提供する。一つの実施形態では、キットは、患者が癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価するために有用である。このキットは、マーカーの発現を評価するための試薬を含む。別の実施形態では、キットは、患者において癌関連疾患を阻害するための化学的薬剤又は生物学的薬剤の適切性を評価するために有用である。そのようなキットは、マーカーの発現を評価するための試薬を含み、また、一つ又は複数のそのような薬剤も含むことができる。

30

【0293】

さらなる実施形態では、キットは、癌関連疾患細胞の存在を評価するため又は癌関連疾患を治療するために有用である。そのようなキットは、抗体、抗体の誘導体又は抗体断片を含み、それらは、マーカータンパク質又はタンパク質の断片と特異的に結合する。そのようなキットはまた、複数の抗体、抗体の誘導体又は抗体断片を含むこともでき、複数のそのような抗体物質は、マーカータンパク質又はタンパク質の断片と特異的に結合する。

【0294】

追加の実施形態では、キットは、癌関連疾患細胞の存在を評価するために有用であり、キットは、マーカー核酸又は核酸の断片と特異的に結合する核酸プローブを含む。キットはまた、複数のプローブを含むこともでき、各プローブが、マーカー核酸又は核酸の断片と特異的に結合する。

40

【0295】

本明細書に記載する組成物、キット及び方法には、とりわけ、以下の用途があり得る。  
1) 患者が癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価すること、2) ヒト患者の癌関連疾患の段階を評価すること、3) 患者の癌関連疾患のグレードを評価すること、4) 患者の癌関連疾患の性質を評価すること、5) 患者の癌関連疾患を発症する可能性を評価すること、6) 患者の癌関連疾患と関係がある細胞の組織学的な型を評価すること、7) 癌関連疾患を治療するため及び/又は患者が癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価するために有用である抗体、抗体断片若しくは抗体の誘導体を作製すること、8) 癌関連疾患細胞の存在を評価する

50

こと、9)患者の癌関連疾患を阻害するための一つ又は複数の試験化合物の効能を評価すること、10)患者の癌関連疾患を阻害するための療法の効能を評価すること、11)患者の癌関連疾患の進行をモニターすること、12)患者の癌関連疾患を阻害するための組成物又は療法を選択すること、13)癌関連疾患に罹患している患者を治療すること、14)患者の癌関連疾患を阻害すること、15)試験化合物が有害である可能性を評価すること、並びに16)癌関連疾患を発症するリスクがある患者において癌関連疾患の発症を予防すること。

【0296】

キットは、(例えば、患者試料等の試料中の)癌関連疾患細胞の存在を評価するために有用である。キットは、複数の試薬を含み、それらの各試薬が、マーカーの核酸又はタンパク質と特異的に結合することが可能である。マーカータンパク質と結合させるための適切な試薬には、抗体、抗体の誘導体、抗体断片等がある。マーカー核酸(例えば、ゲノムDNA、MRNA、スプライシングされたMRNA、cDNA等)と結合させるための適切な試薬には、相補性を示す核酸がある。例えば、核酸試薬は、基板に固定化された(標識した又は標識していない)オリゴヌクレオチド、基板とは結合していない標識したオリゴヌクレオチド、PCRプライマーの対、分子ビーコンのプロープ等を含むことができる。

10

【0297】

キットは、本明細書に記載する方法を実施するために有用な追加の成分を含むこともできる。例として、キットは、相補性を示す核酸とアニールするため又は抗体が特異的に結合するタンパク質と抗体を結合させるために適した液体(例えば、SSC緩衝液)、一つ又は複数の試料区分、方法の実施を説明する指示材料、正常な細胞試料、癌関連疾患細胞試料等を含むことができる。

20

動物モデル

非ヒト動物モデルは、少なくとも一つの癌関連疾患を評価するために生成することができる。この方法は、動物を、反復用量の、対象とする場合癌を引き起こすと考えられている少なくとも一つの化学物質に曝すステップを含む。特定の態様では、この方法は、動物から、一つ又は複数の選択された試料を収集するステップと、収集した試料を、潜在的な癌の開始又は発症の一つ又は複数の徴候と比較するステップとをさらに含む。

【0298】

動物モデルを生成する方法は、動物を、化学物質を含まない特異的な環境下に維持し、動物を、癌を引き起こすと考えられている少なくとも一つの化学物質を用いて感作するステップを含む。特定の実施形態では、動物の少なくとも一部分を複数の逐次の曝露によって感作する。

30

【0299】

少なくとも一つの癌関連疾患に対する有効性について、薬剤をスクリーニングする方法は一般に、少なくとも一つの薬剤を試験動物に投与するステップと、薬剤が、癌関連疾患の一つ又は複数の症状を低減させるか又は悪化させるかを決定するステップと、一つ若しくは複数の症状の低減を、癌関連疾患に対する薬剤の有効性と関連付ける、又は一つ若しくは複数の症状の低減がないことを、薬剤の無効性と関連付けるステップとを含む。動物モデルは、開始、進行、重症度、病態、攻撃性、グレード、活性、不安定性、死亡率、罹患率、疾患の細分類のうちの少なくとも一つに寄与する一つ若しくは複数の代謝経路、又は少なくとも一つの癌関連疾患のその他の根底にある発症の若しくは病理学的な特色を評価するために有用である。この解析は、階層的クラスター分析、サインネットワークの構築、質量分析によるプロテオミクス解析、表面プラズモン共鳴、線形統計モデリング、部分最小二乗法判別解析及び多重線形回帰分析のうちの一つ又は複数によって行うことができる。

40

【0300】

動物モデルは、少なくとも一つの癌関連疾患について、一つ又は複数のマーカー又はその機能的な等価物の発現レベルを調べることによって決定することができる。

【0301】

動物モデルは、癌関連疾患を治療又は予防するために有用な治療剤のスクリーニングの

50

ために使用することができる。したがって、この方法は、癌関連疾患を治療又は予防するための治療剤を同定するために有用である。この方法は、候補薬剤を、本明細書に記載する方法によって作製した動物モデルに投与するステップと、候補薬剤が投与されていない対照の動物モデルと比較して、動物モデルにおける少なくとも一つの癌関連疾患の応答を評価するステップとを含む。少なくとも一つの癌関連疾患の応答が、症状の低減又は発症の遅延である場合には、候補薬剤は、癌関連疾患を治療又は予防するための薬剤となる。

#### 【0302】

癌関連疾患のための動物モデルは、この動物モデルにおいて、一つ若しくは複数のマーカー遺伝子又はマーカー遺伝子と機能的に等価な遺伝子の発現レベルが上昇している動物を含むことができる。本明細書で使用する場合、「機能的に等価な遺伝子」は一般に、マーカー遺伝子がコードするタンパク質の既知の活性に類似する活性を示すタンパク質をコードする遺伝子である。機能的に等価な遺伝子の代表的な例として、対象の動物のマーカー遺伝子の対応物が挙げられ、これは、動物に本来備わっている。

10

#### 【0303】

癌関連疾患のための動物モデルは、肺癌関連疾患に起因する生理学的な変化を検出するために有用である。特定の実施形態では、動物モデルは、マーカー遺伝子の追加の機能を明らかにするため及びマーカー遺伝子を標的にする薬物を評価するために有用である。

#### 【0304】

一つの実施形態では、癌関連疾患のための動物モデルを、対応遺伝子の発現レベルを制御すること又は対応遺伝子を投与することによって生み出すことができる。この方法は、癌関連疾患のための動物モデルを、本明細書に記載する遺伝子の群から選択された遺伝子の発現レベルを制御することによって生み出すステップを含むことができる。別の実施形態では、この方法は、癌関連疾患のための動物モデルを、本明細書に記載する遺伝子がコードするタンパク質を投与すること又はタンパク質に対する抗体を投与することによって生み出すステップを含むことができる。また、特定のその他の実施形態では、マーカーを過剰発現させてよく、その結果、次いで、適切な方法を使用してマーカーを測定することができることも理解されたい。

20

#### 【0305】

別の実施形態では、癌関連疾患のための動物モデルを、遺伝子のそのような群から選択された遺伝子を導入すること又はそのような遺伝子がコードするタンパク質を投与することによって生み出すことができる。

30

#### 【0306】

別の実施形態では、癌関連疾患を、遺伝子のそのような群から選択された遺伝子の発現又はそのような遺伝子がコードするタンパク質の活性を抑制することによって誘発することができる。アンチセンス核酸、リボザイム又はRNAiを使用して、発現を抑制することができる。タンパク質の活性を、抗体等の、活性を阻害する物質を投与することによって有効に制御することができる。

#### 【0307】

動物モデルは、癌関連疾患の根底にある機構を解明するために、かつまた、スクリーニングによって得られた化合物の安全性を試験するためにも有用である。例えば、動物モデルが癌関連疾患の症状を発症する場合又は特定の癌関連疾患に關与する測定値が動物中で変化する場合には、スクリーニングの系を、疾患を和らげる活性を示す化合物を探索するために構築することができる。

40

#### 【0308】

本明細書で使用する場合、「発現レベルの増加」という表現は、以下のいずれか一つを指す。外来遺伝子として導入したマーカー遺伝子が人為的に発現する場合、対象の動物に本来備わっているマーカー遺伝子の転写及びそのタンパク質への翻訳が増強される場合、又は翻訳産物であるタンパク質の加水分解が抑制される場合。本明細書で使用する場合、「発現レベルの減少」という表現は、対象の動物のマーカー遺伝子の転写及びそのタンパク質への翻訳が阻害される状況又は翻訳産物であるタンパク質の加水分解が増強される状

50

況のいずれかを指す。遺伝子の発現レベルは、例えば、DNAチップ上のシグナル強度の差によって決定することができる。さらに、翻訳産物、すなわち、タンパク質の活性は、正常な状況におけるタンパク質の活性と比較することによって決定することもできる。

#### 【0309】

また、動物モデルは、例えば、マーカー遺伝子が導入され、人為的に発現している動物を含めた遺伝子導入動物、マーカー遺伝子ノックアウト動物、及び別の遺伝子がマーカー遺伝子を置換しているノックイン動物を含むことができることも企図する範囲に属する。マーカー遺伝子のアンチセンス核酸、リボザイム、RNAi効果を示すポリヌクレオチド、又はデコイ核酸として機能するDNA等が導入されている遺伝子導入動物を、遺伝子導入動物として使用することができる。そのような遺伝子導入動物はまた、例えば、マーカータンパク質の活性が、(一つ若しくは複数の)突然変異を遺伝子のコード領域中に導入することによって増強若しくは抑制されている動物又はアミノ酸配列が改変されて、加水分解に対して耐性若しくは感受性を示すようになっている動物も含む。アミノ酸配列の突然変異は、置換、欠失、挿入及び付加を含む。

#### 治療への適用

本発明は、例えば、遺伝子発現のスイッチを「オン」にしたり、「オフ」にしたりすることによって、多面的効果及び細胞傷害性を引き起こすことなく、迅速に、効率的にかつ制御されて、遺伝子発現のレベルを調節することができることが望ましい多様な状況に対して広く適用可能である。本発明は、遺伝的疾患又は後天性疾患のいずれかのための治療において、ヒトの遺伝子治療の目的で、特に有用であり得る。遺伝子治療の一般的なアプローチには、一つ又は複数の核酸分子を細胞内に導入することが関与し、その結果、導入した遺伝子材料がコードする一つ又は複数の遺伝子産物が、細胞内で産生されて、機能活性を修復又は増強する。遺伝子治療のアプローチについての総説は、Andersonら(1992; Millerら(1992); Friedmannら(1989); 及びCournoyerら(1990))を参照されたい。しかし、現在の遺伝子治療ベクターは典型的には、内因性の転写因子に応答性である構成的な調節エレメントを活用する。これらのベクター系には、対象の遺伝子発現のレベルを調整する能力が与えられていない。対照的に、本発明の調節系には、この能力が備わっている。

#### 【0310】

本発明の系を遺伝子治療の目的で使用するためには、少なくとも一つのDNA分子を、遺伝子治療を必要とする対象(例えば、遺伝的疾患又は後天性疾患に罹患しているヒト対象)の細胞内に導入して、細胞を改変する。細胞は改変されて、1)宿主細胞内での本発明の誘導性レギュレーターの発現に適した形態をとる、誘導性レギュレーターをコードする核酸、及び2)s-shp1プロモーター等の組織に特異的なプロモーターに動作可能に連結している(例えば、治療のための)siRNAを含むようになる。本発明の調節系の構成成分をコードする単一のDNA分子を使用してもよく、或いは、各構成成分をコードする別々のDNA分子を使用してもよい。対象の細胞をex vivoにおいて改変し、次いで、対象内に導入してもよく、又は細胞をin vivoにおいて、核酸を細胞内に導入するための従来技法によって直接改変してもよい。したがって、本発明の調節系は、構成的な調節系を上回る、治療状況の要件に依存して遺伝子の発現レベルを調整することを可能にする利点を提供する。

#### 【0311】

遺伝的疾患又は後天性疾患の治療のために、対象の細胞中でノックダウン又はノックアウトすべき、特に興味深い遺伝子には、異常なタンパク質等の有害な遺伝子産物をコードする遺伝子がある。特異的な疾患の非限定的な例として、貧血、血液に関連する癌、パーキンソン病及び糖尿病が挙げられる。

#### 【0312】

本発明を適用して、治療のために自家細胞系又は同種細胞系を開発することができる。本発明を用いて、例えば、細胞移植及び/又は臓器移植における特に興味深い遺伝子治療の適用例が活用される。例示的な実施形態では、移植抗原の下方制御(例えば、siRNAによるベータ2-ミクログロブリンの発現の下方制御等)によって、患者の免疫系による拒絶のリスクを最小限とすると同時に、同種細胞の移植が可能となる。本発明は、有害効果(例

えば、移植した細胞の制御できない複製)の場合には、RNAiのスイッチを切ることが可能であろう。

#### 【0313】

本発明の対象となり得る細胞型には、造血幹細胞、筋芽細胞、肝細胞、リンパ球、気道上皮、皮膚上皮、島(ilet)、ドーパミン作動性神経細胞、角化細胞等がある。遺伝子治療のための細胞型、遺伝子及び方法のさらなる説明については、例えば、Armentanoら(1990); Wolffら(1990); Chowdhuryら(1991); Ferryら(1991); Quantinら(1992); Daiら(1992); van Beusechemら(1992); Rosenfeldら(1992); Kayら(1992); Cristianoら(1993); Hwuら(1993);及びHerz and Gerard(1993)を参照されたい。

#### 【0314】

本発明の特定の実施形態には、s-shipプロモーターを用いる治療に応答する任意の疾患状態を治療する方法がある。特異的な実施形態では、この方法は、プロモーターに動作可能に連結している治療又は診断のための(マーカー)遺伝子をコードする領域を有するポリヌクレオチド構築物を調製するステップを含み、構築物がコードする遺伝子は、疾患状態の治療のためのものである。

#### A. 医薬製剤、送達及び治療計画

本発明のある実施形態では、治療方法を企図する。有効量の医薬組成物を、一般に、疾患若しくはその症状の寛解、低減、最小化又は疾患若しくはその症状の程度の制限を、検出可能にかつ反復して行うのに十分な量と定義する。疾患の排除、根絶又は治癒を含めて、より厳密な定義を適用することができる。

#### 【0315】

投与経路及び製剤は、当然のことながら、病変の場所及び性質によって変化させ、投与経路としては、例えば、皮内投与、経皮(transdermal)投与、非経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、鼻内投与、皮下投与、経皮(percutaneous)投与、気管内投与、腹腔内投与、腫瘍内投与、灌流による投与、洗浄による投与、直接注入による投与及び経口投与が挙げられる。

#### 【0316】

遊離の塩基又は薬理学的に許容される塩としての活性化合物の液剤を、水中で、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤と共に適切に混合することによって調製することができる。また、分散剤を、グリセロール、液体ポリエチレングリコール及びそれらの混合物中、並びに油中で調製することもできる。保管及び使用の通常の条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を予防するための保存剤を含有する。注射用として使用するために適した医薬品の形態には、無菌、水性の液剤又は分散剤、及び無菌の注射用の液剤又は分散剤を用時調製するための無菌の散剤(その全体が参照によって本明細書に具体的に組み込まれている米国特許第5,466,468号)がある。すべての場合において、こうした形態は、無菌でなければならず、容易なシリンジへの注入性(syringability)を示す程度にまで流動性でなければならない。こうした形態は、製造及び保管の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌等の微生物の汚染作用に対して保存性をもたせなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等)、それらの適切な混合物を含有する溶媒若しくは分散媒体であってもよく、かつ/又は植物油であってもよい。適切な流動性を、例えば、レシチン等の被覆を使用することによって、分散剤の場合には必要な粒子サイズを維持することによって、かつ界面活性剤を使用することによって維持することができる。微生物の作用の阻止は、種々の抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたすことができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含めることが望ましい。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中で使用することによってもたすことができる。

#### 【0317】

水性液剤中における非経口投与のためには、例えば、この液剤を、必要であれば適切に

10

20

30

40

50

緩衝しなければならず、液体の希釈剤は最初に、十分な食塩水又はグルコースを用いて等張化しなければならない。これらの特定の水性液剤は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腫瘍内投与及び腹腔内投与のために、特に適している。これに関して、利用することができる無菌の水性媒体は、本開示に照らせば当業者に分かるであろう。例えば、1投与量を1mlの等張NaCl溶液中に溶解させ、これを、1000mlの皮下点滴療法用の液体に添加するか、又は提案されている注入部位において注入するかのいずれかを行うことができる(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition、pages 1035-1038及び1570-1580を参照されたい)。治療している対象の状態に依存して、投与量の何らかの変更がやむを得ず生じることもある。いずれにしても、投与を担当する人が、個体の対象に適した用量を決定する。さらに、ヒトへの投与の場合には、調製物は、FDAのOffice of Biologicsの基準が要求する無菌性、発熱性、一般的な安全性及び純度の基準を満たさなければならない。

10

#### 【0318】

無菌の注射用液剤は、適切な溶媒中に、必要量の活性化合物を、上記に列挙した種々のその他の成分と共に組み込み、必要に応じて、その後、ろ過滅菌することによって調製する。一般に、分散剤は、種々の滅菌した活性成分を、基剤である分散媒体及び上記に列挙したものから必要とされるその他の成分を含有する無菌のビヒクル中に組み込むことによって調製する。無菌の注射用液剤を調製するための無菌の散剤の場合には、好ましい調製方法は、活性成分に任意の追加の所望の成分を加えて、あらかじめろ過して無菌としたそれらの溶液から、それらの粉末を得る真空乾燥及び凍結乾燥の技法である。

20

#### 【0319】

本明細書に開示する組成物は、天然の形態又は塩の形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、(タンパク質の遊離のアミノ基と形成させた)酸付加塩、及び例えば、塩酸若しくはリン酸等の無機酸又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸と形成させた酸付加塩がある。また、遊離のカルボキシル基と形成させた塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム等の無機塩基又は水酸化第二鉄、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から誘導することができる。製剤化したら、液剤を、投与製剤に適合した様式かつ治療に有効な量で投与する。製剤は、注射用液剤、薬物放出カプセル剤等の多様な投与剤型として容易に投与される。

30

#### 【0320】

本明細書で使用する場合、「担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、ビヒクル、被覆、希釈剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイド等を含む。薬学的活性物質のために、そのような媒体及び物質を使用することは、当技術分野では周知である。任意の従来の媒体又は物質が活性成分と適合しない場合を除いて、それらを治療用組成物中において使用することを企図する。また、補助的な活性成分も、組成物中に組み込むことができる。

#### 【0321】

「薬学的に許容される」又は「薬理学的に許容される」という句は、ヒトに投与した場合、アレルギー性又は類似の都合の悪い反応を起こさない分子実体及び組成物を指す。タンパク質を活性成分として含有する水性の組成物の調製は、当技術分野で十分に理解されている。典型的には、そのような組成物を、液体の液剤若しくは懸濁剤、又は注射の前に液体とする液剤中若しくは懸濁剤中で適した固体の形態のいずれかとして、注射用として調製する。

40

#### B. 治療の組合せ

本発明の化合物及び方法は、従来の療法の状況において使用することができる。本発明の組成物を用いる治療の有効性を向上させるためには、これらの組成物を、それらの疾患及び状態の治療に有効なその他の薬剤と組み合わせることが望ましい。例えば、癌の治療を、本発明の治療用化合物と、抗癌剤又は手術等のその他の抗癌療法とを用いて実行することができる。同様に、血管の疾患又は状態の治療に、本発明及び従来の両方の血管の薬

50



剤又は療法を関与させることもできる。

【0322】

種々の組合せを利用することができる。例えば、本発明の宿主細胞を「A」とし、二次的な抗癌剤/抗療法を「B」とする。表-US-00005

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B  
A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

本発明の治療用発現構築物の患者への投与は、治療に毒性があれば、それを考慮に入れ、その特定の二次的な療法の投与の一般的なプロトコールに従う。治療サイクルは、必要に応じて繰り返すことが予想される。また、種々の標準的な療法、及び外科的介入を、記載の療法と組み合わせて適用することができることも企図する。

10

【0323】

本明細書に引用するすべての特許、特許出願及び参照文献は、それらの全体が参照によって組み込まれている。当業者が本発明を作製及び使用するために十分詳細に本発明を説明及び例示してきたが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の代替形態、改変形態及び改良形態が明らかになるはずである。当業者であれば、目的を実施し、言及した目標及び利点並びに本発明に本来備わっている目標及び利点を得るために本発明がよく適合していることを容易に理解する。

【0324】

本明細書に記載する方法及び試薬は、好ましい実施形態を代表する、例示的なものであり、それらによって本発明の範囲を制限するものではない。本発明の範囲内での改変形態、及びその他の用途を当業者であれば思いつくであろう。これらの改変形態は、本発明の精神の内に包含され、特許請求の範囲によって定義されている。また、当業者には、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書に開示した本発明に対して様々な置換形態及び改変形態を作製することができることも容易に明らかとなるであろう。

20

【0325】

本発明を好ましい実施形態によって具体的に開示してきたが、当業者であれば本明細書に開示した概念の自由選択的な特色、改変形態及び変更形態を思い浮かべることができ、そのような改変形態及び変更形態は、添付の特許請求の範囲によって定義する本発明の範囲に属するとみなされることを理解されたい。

【0326】

本発明を、種々の及び好ましい実施形態を参照して説明してきたが、本発明の根本的な範囲から逸脱することなく、種々の変化形態を作製することができ、均等物によってそれらの要素を置換することができることを当業者には理解されたい。さらに、本発明の根本的な範囲から逸脱することなく、多くの改変形態を作製して、特定の状況又は材料を本発明の教示に適応させることもできる。

30

【0327】

したがって、本発明は、本発明を実施することを企図して本明細書に開示した特定の実施形態に制限されるものではなく、本発明は、特許請求の範囲に属するすべての実施形態を含むものとする。

【0328】

本明細書において開示及び請求しているすべての組成物及び/又は方法及び/又は装置は、本開示に照らして、過度の実験なしで、作製及び遂行することができる。本発明の組成物及び方法を、好ましい実施形態の観点から説明してきたが、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載する組成物及び/又は方法及び/又は装置に対して、及び本明細書に記載する方法のステップ又は方法のステップの順番において変形形態を適用することができることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的にも生理学的にも関連する特定の薬剤で、本明細書に記載する薬剤を置換することができ、それでも、同一又は類似の結果を達成するであろうことが明らかであろう。当業者に明らかかなそのような類似の置換形態及び改変形態はすべて、添付の特許請求の範囲によって定義する本発明の精神、範囲及び概念に属するものであるとみなされる。

40

50

## 【 0 3 2 9 】

本開示全体で、様々な刊行物、特許及び公開特許明細書が、特定引用文献によって参照される。これらの刊行物、特許及び公開特許明細書の開示物は、本発明が関係する最新技術をより完全に記載するために、ここに参照により本開示に組み込まれる。

## 【 0 3 3 0 】

特に定義されていない場合は、本明細書で用いるすべての技術用語及び学術用語は、当分野(例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術及び生化学)の技術者が通常理解するのと同じ意味を有する。当分野の技術の範囲内である、分子的、遺伝的及び生化学的方法のために、標準の技術が用いられる。そのような技術は、文献に詳細に説明されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)、DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985)、Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984)、Mullisら米国特許第4,683,195号、Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins eds., 1984)、Transcription And Translation (Hames & Higgins eds., 1984)、Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987)、Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986)、Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.)、Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)、Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wuらeds.)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)、Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986)、The Laboratory Rat, editor in chief: Mark A. Suckow; authors: Sharp and LaRegina. CRC Press, Boston, 1988、及び化学方法を参照。

## 参考文献

本発明を明らかにするため又は本発明の実行に関する追加の詳細を提供するために本明細書において使用した刊行物及びその他の材料は、参照によって本明細書に組み込まれており、便宜を図るために、以下の参照文献一覧において提供されている。

## 【 0 3 3 1 】

本明細書において言及した文献の引用はいずれも、前記引用文献のいずれもが適切な先行技術であることを認めるものではない。年月日に関するすべての陳述又はこれらの文献の内容に関する描写は、本出願人に入手可能な情報に基づいており、これらの文献の年月日及び内容の正確さを何ら認めるものではない。

1. Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. Cell 113, 673-676.
2. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-355.
3. Balmain, A., Gray, J. W., and Ponder, B. A. (2003). The genetics and genomics of cancer. Nat Genet 33 Suppl, 238-244.
4. Bejerano, G., Haussler, D., and Blanchette, M. (2004a). Into the heart of darkness: large-scale clustering of human non-coding DNA. Bioinformatics 20, 140-148.
5. Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W. J., Mattick, J. S., and Haussler, D. (2004b). Ultraconserved elements in the human genome. Science 304, 1321-1325. Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling

the False Discovery Rate: a Practical and Powerful

7. Approach to Multiple Testing. *Journal of*

the Royal Statistical Society. B, 57, 289-300. Berezikov, E. and Plasterk, R.

H. Camels and zebrafish, viruses and cancer: a microRNA update

8. (2005a). *Hum Mol Genet.* 14, R183-90.

9. Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt,

J., Wienholds, E., Plasterk, R. H., and Cuppen, E. (2005b). Phylogenetic shadowi  
ng and computational identification of human  
microRNA genes. *Cell* 120, 21-24.

10. Bejerano, G., Lowe, C. B., Ahituv, N.,

10

King, B., Siepel, A., Salama, S. R., Rubin, E. M., Kent, W. J., and Haussler,

D. (2006). A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel  
retroposon. *Nature* 441, 87-90.

11. Bishop, J. M. (1991). Molecular themes

in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.

12. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Al  
dler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K.,

et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes riR15  
and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sc U S A* 99,  
15524-15529.

20

13. Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani,

C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo,

S., Dono, M., et al. (2004a). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in  
B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101,  
11755-11760.

14. Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru,

C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich,

F., Negrini; M., and Croce, C. M. (2004b). Human microRNA genes are frequently

located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad  
Sci U S A* 101, 2999-3004.

30

15. Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A.,

Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S., Iorio, M. V., Visone, R., Sever, N. I.,

Fabbri, M., et al. (2005a). A Unique MicroRNA Signature

Associated with Prognostic Factors and Disease Progression in B cell Chronic  
Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 352, 1667-1676.

16. Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006a).

MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* 6, 857-866.

17. Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006b).

MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 66,  
7390-7394.

40

18. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A.

J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V.

R., Andersen, M. R., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by  
stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33, e179.

19. Chiorazzi, N., Rai, K. R., and Ferrarini,

M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*

352, 804-815.

20. Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M.,

Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R., Zupo, S.,

Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce

50

- apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
21. Croce, C. M., and Calin, G. A. (2005).  
miRNAs, Cancer, and Stem Cell Division. *Cell* 122, 6-7. de la Chapelle, A.  
(2004). Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 4,  
769-780.
22. Dermitzakis, E. T., Reymond, A., and  
Antonarakis, S. E. (2005). Conserved non-genic sequences - an unexpected  
feature of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* 6, 151-157.
23. Duret, L., Dorkeld, F., and Gautier, C.  
(1993). Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates  
evolution: potential involvement in post-transcriptional regulation of gene  
expression. *Nucleic Acids Res* 21, 2315-2322. 10
24. Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn,  
A., Li, Z., Gomez, M. F., Lund, E., and Dahlberg, J. E. (2005). Accumulation of  
miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102,  
3627-3632.
25. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J.  
(2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
26. Furuno, M., Pang, K. C., Ninomiya, N.,  
Fukuda, S., Frith, M. C., Bult, C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., 20  
Hayashizaki, Y., et al. (2006). Clusters of internally primed transcripts  
reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genet* 2, e37.
27. Hunter, T. (1991). Cooperation between  
oncogenes. *Cell* 64, 249-270.
28. Huntley, S., Baggott, D. M., Hamilton, A. T., Tran-Gyamfi, M., Yang, S. C.,  
Kim, J., Gordon, L., Branscomb, E., and  
Stubbs, S. (2006). A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger  
genes: Insights into the evolutionary history of a large family of  
transcriptional repressors. *Genome Res* 16:669-677.
29. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA 30  
. Characterization of MicroRNA Expression Levels and  
Their Biological Correlates in Human Cancer Cell Lines. *Cancer*  
*Res*. 2007 Mar 15;67(6):2456-68.
30. Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G.,  
Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M.,  
Campiglio, M., et al. (2005). microRNA gene expression  
deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65, 7065-7070.
31. Ji, P., Diederichs, S., Wang, W.,  
Boing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H.,  
Bulk, E., et al. (2003). MALAT-1, a novel noncoding 40  
RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage  
non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22, 8031-8041.
32. Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D.,  
Blokzijl, T., Harms, G., Jacobs, S., Kroesen, B. J., and van den Berg, A.  
(2005). BIC and miR-155 are highly expressed in  
Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207,  
243-249.
33. Liu, C.-G., Cahn, G. A., Meloon, B.,  
Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, D. C., Shimizu, M., Zupo,  
S., Dono, M., et al. (2004). An oligonucleotide microchip for genome-wide miRNA 50

profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9740-9744.

34. Lu, J., Getz, G., Miska, E. A.,

Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.

35. Meisler, M. H. (2001). Evolutionarily

conserved noncoding DNA in the human genome: how much and what for? *Genome Res* 11, 1617-1618.

36. Ng, D., Toure, O., Wei, M.H., Arthur, D.C., Abbasi, F., Fontaine, L., Marti, G.E., Fraumeni, J.F.J., Goldin, L.R.,

10

Caporaso, N.E., and Toro, J.R. (2007). Identification of a novel chromosome region, 13q21.33-q22.2, for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109, 916-925.

37. Nobrega, M. A., Ovcharenko, I., Afzal, V., and Rubin, E. M. (2003). Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science* 302, 413.

38. Nobrega, M. A., Zhu, Y., Plajzer-Frick,

I., Afzal, V., and Rubin, E. M. (2004). Megabase deletions of gene deserts result in viable mice. *Nature* 431, 988-993.

39. Pennacchio, L. A., Ahituv, N., Moses,

20

A. M., Prabhakar, S., Nobrega, M. A., Shoukry, M., Minovitsky, S., Dubchak, I., Holt, A., Lewis, K. D., et al. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved

non-coding sequences. *Nature* Nov 5; [Epub ahead of print].

40. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ,

Manohar V, Abbasi F, Lin YC, Fredrickson T, Landgraf P, Ramachandra S, Huppi K, Toro JR, Zenger VE, Metcalf RA, Marti GE. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. 2007 Mar 9; [Epub ahead of print]

41. Reis, E. M., Louro, R., Nakaya, H. I.,

30

and Verjovski-Almeida, S. (2005). As antisense RNA gets intronic. *OMICS* 9.

42. Rhodes, D. R., and Chinnaiyan, A. M.

(2005). Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nat Genet* 37, Suppl:S31-37.

43. Rigoutsos, I., Huynh, T., Miranda, K.,

Tsirigos, A., McHardy, A., and Platt, D. (2006). Short blocks from the noncoding parts of the human genome have instances within nearly all known genes and relate to biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6605-6610.

44. Schmittgen, T. D., Jiang, J., Liu, Q.,

40

and Yang, L. (2004). A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursor. *Nucleic Acid Research* 32, 43-53.

45. Thomas, J. W., Touchman, J. W.,

Blakesley, R. W., Bouffard, G. G., Beckstrom-Sternberg, S. M., Margulies, E. H., Blanchette, M., Siepel, A. C., Thomas, P. J., McDowell, J. C., et al.

(2003). Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* 424, 788-793.

46. Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G.,

Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M.

47. V., Roldo, C., Ferracin, M., et al.

50

(2006). A microRNA expression signature of human

48. solid tumors define cancer gene

targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261. Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146.

49. Wilson, J. F. (2005). Liver cancer on the rise. *Ann Intern Med* 142, 1029-1032.

50. Wooster, R., and Weber, B. L. (2003).

Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 2339-2347. Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Kumamoto, K., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T.,

51. Calin, G. A., Liu, C. G., Croce, C. M.,

10

and Harris, C. C. (2006). microRNA Signature in

52. Lung Cancer Diagnosis and Prognosis.

*Cancer Cell* 9, 189-198.

53. Zhang, L., and al, e. (2006). MicroRNAs

exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9136-9141.

実施例IIの参考文献

54. Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W. J., Mattick, J. S., and Haussler, D. (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304, 1321-1325.

20

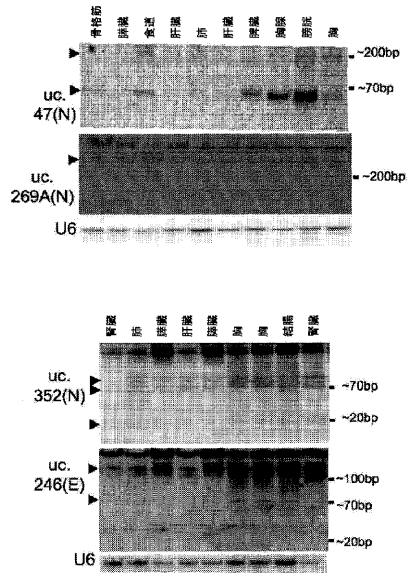
55. Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling

the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. B*, 57, 289-300.

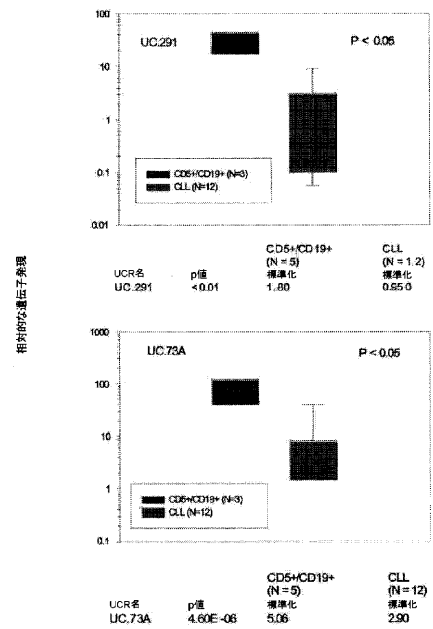
56. Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru,

C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.

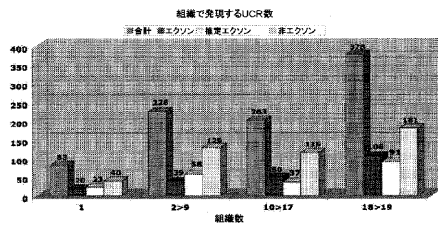
【図 1 A】



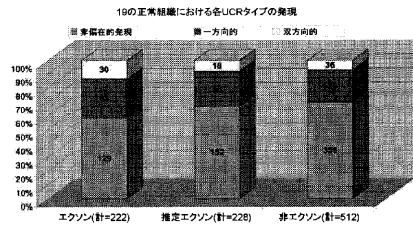
【図 1 B】



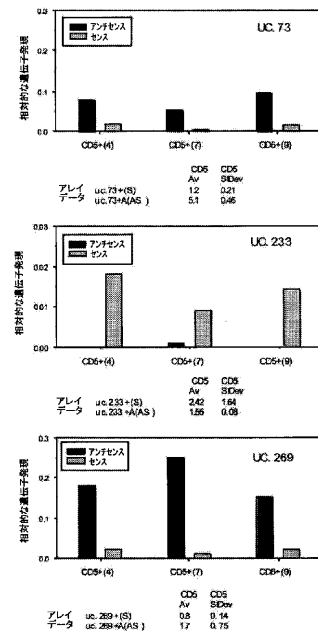
【図 1 C】



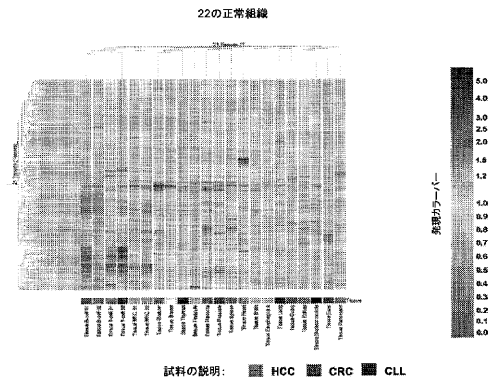
【図 1 D】



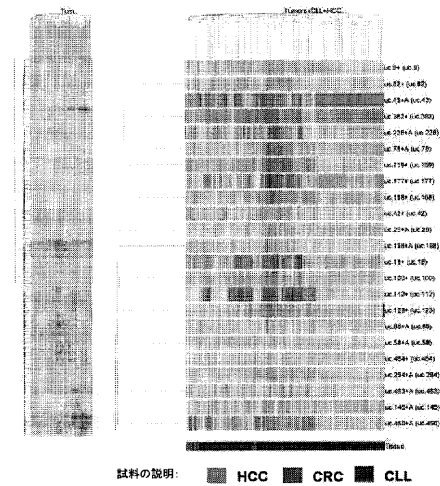
【図 1 E】



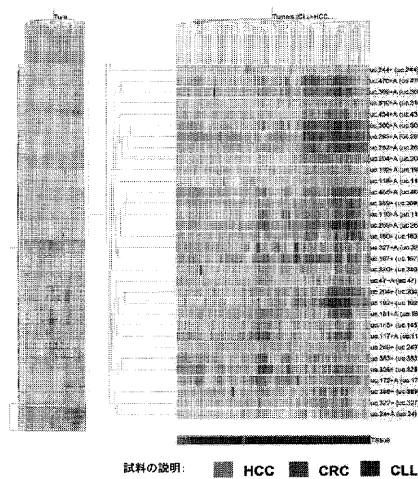
【図 2 A】



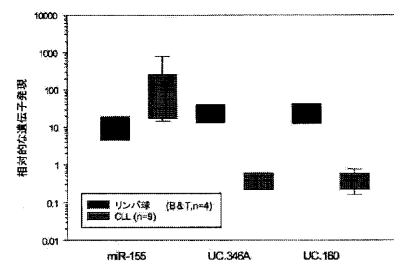
【図 2 B - 1】



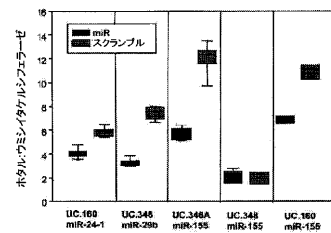
【図 2 B - 2】



【図 3 B】



【図 3 C】



【図 3 A】

5'- ACTTCCCGCTTCTATTA:TAGCATTAACAAG uc.346A  
(bp.158)  
3'-GGGATAG:TCCTATACGTAAT mir-155

5'- TCAATGACATTTGC:AAGACCATTTTCAT uc.160 (bp.184)  
3'-GGGGATAG:TCCTATACGTAAT mir-155

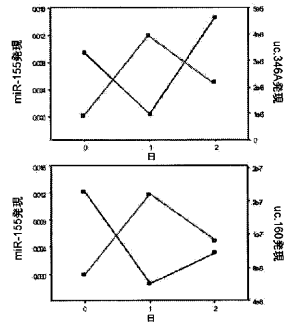
5'- CCGCCATTTACCTGC:CTACTAGCCCAAGG uc.160 (bp.136)  
3'-GACACAGACCACTTACCTGGT mir-24

5'- CTATGAGACTGATTTAC:CTGCCATAGA uc.348 (bp.170)  
3'-TTGTGACTAAGTTTACCAAGAT mir-29b

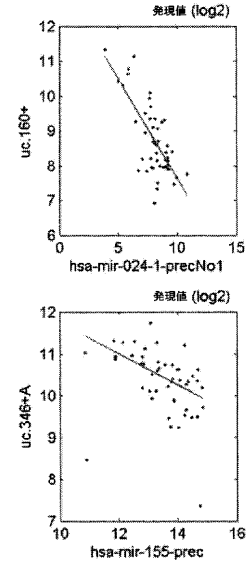
5'- TGGAGATAC:AACAAGA:TACATTAATGAGT uc.348 (bp.111)  
3'-GGGATAG:TCCTATACGTAAT mir-155



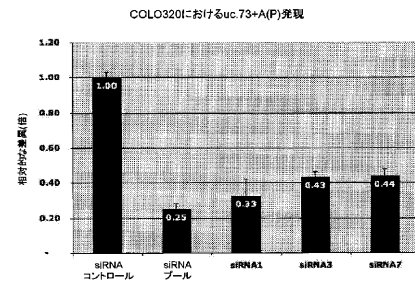
【図 3 D】



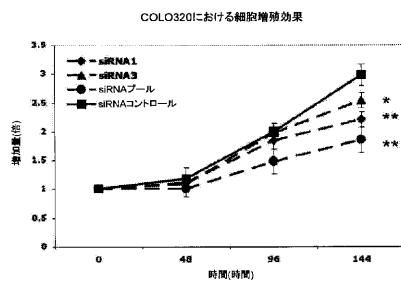
【図 3 E】



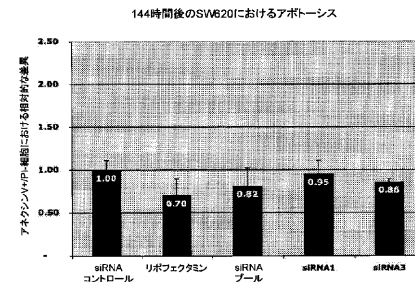
【図 4 A】



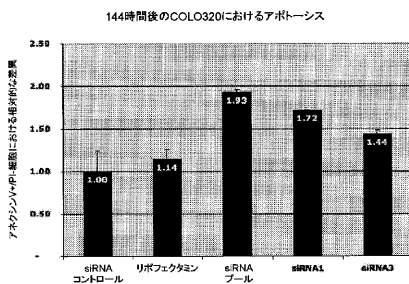
【図 4 B】



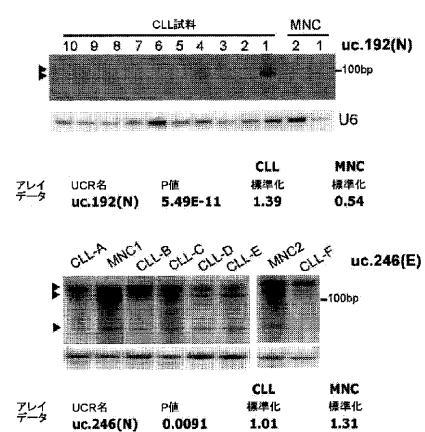
【図 4 D】



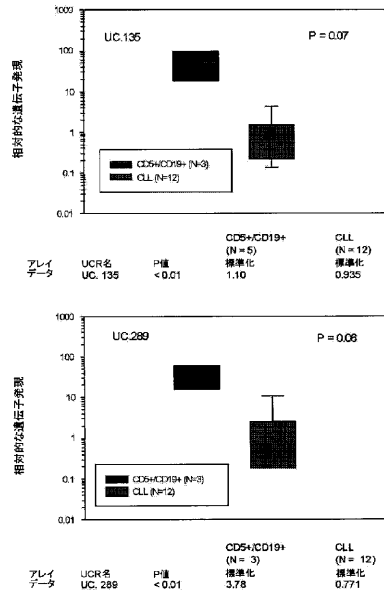
【図 4 C】



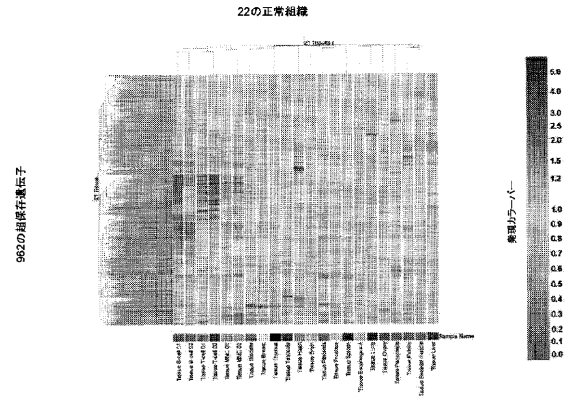
【図 5】



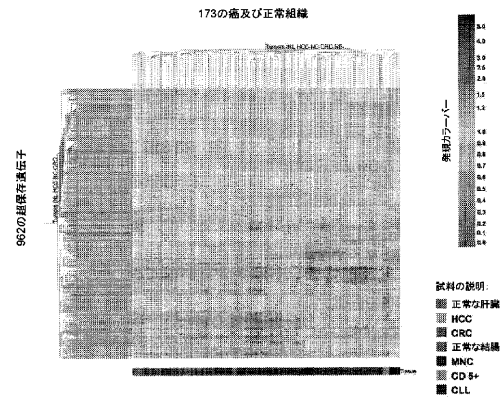
【図 6】



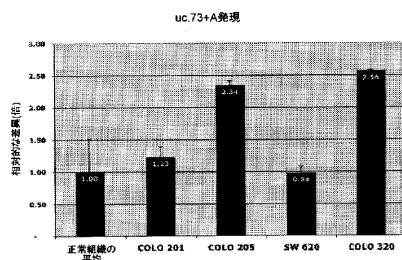
【図 7】



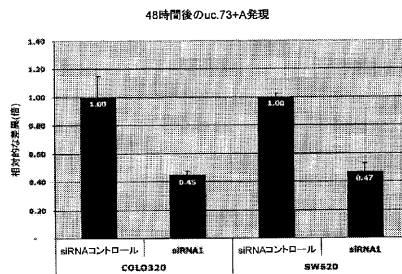
【図 8】



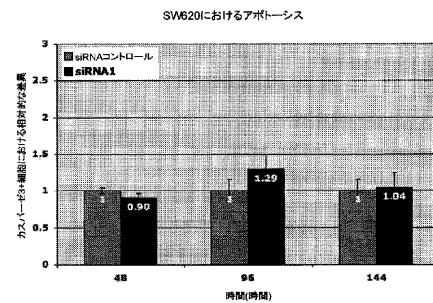
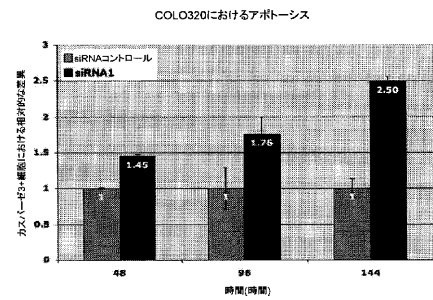
【図 9】



【図 10】



【図 11】



## 【図 12 - 1】

表1. 白血病及び癌腫において最も有意に差示的に発現するUCR\*

UCR名	プローブ (T-PCR)	タイプと位置	有意性	上流、ハスト及び 下流の遺伝子	CAGR位置と遺伝子発 現値
uc_29	uc_29+A	非エクソン	高 CRC vs 正常	LMG4, N AF18089	
uc_73	uc_73+A	推定エクソン	低 CLL vs CD5	AK136774, BC017741, BCX181B	
uc_111	uc_111+	推定エクソン	高 CRC vs 正常	AK128398, N AB051544	あり
uc_112	uc_112+	非エクソン	高 CRC vs 正常	TBC1D5, N SATB1	
uc_134	uc_134+A	推定エクソン	高 CRC vs 正常	AF27058, MGC12157, MLF1	
uc_135	uc_135+	エクソン	低 CLL vs CD5	GOLPH4, EV11 AKFM1	あり K&T(Xo26+22)により過剰発現する EVI1オゾンゲノムのアンセンス
uc_206	uc_206+	非エクソン	高 CRC vs 正常	SP8, N S04	
uc_230	uc_230+	推定エクソン	高 CRC vs 正常	AKD96400, N TEEC	
uc_233	uc_233+	エクソン	低 CLL vs CD5	C7orf21, CENIG3 ASB10	CENIG3ととのセンス
uc_291	uc_291+	推定エクソン	低 CLL vs CD5	AKD24497, C10orf1 KCNDMA1	

## 【図 12 - 2】

uc_292	uc_292+	エクソン	高 CRC vs 正常	AF338191, MLC2 C10orf2	MLC2ととのセンス
uc_339	uc_339+	推定エクソン	高 CRC vs 正常	ATP5G2, N XIAA1536	あり
uc_341	uc_341+	エクソン	高 CRC vs 正常	HOXC11, HOXC10 HOXC9	HOXC10ととのセンス
uc_388	uc_388+	非エクソン	高 CRC vs 正常	BX641000, ICF12 L1HJ4957	
uc_399	uc_399+A	非エクソン	高 CRC vs 正常	CYLD, N SALL1	
uc_420	uc_420+A	エクソン	高 CRC vs 正常	POLG2, DDN3 LOC80759	結核で下方制御されるDDX3ととのセンス

\*注釈 P<0.0001のUCRのみ選択した。UCRの完全なリストについては、補足の表3を参照されたい。CAGR-癌関連ゲノム領域(Calinsら, 2004b)により統合されている。N-イントロンの位置。遺伝子名はwww.ncbi.nlm.nih.gov。

12 続き

## 【図 15 - 1】

Calin G&amp;B

1

補足表1. 1pのヒト正常細胞(二つの細胞系は異なる遺伝子由来の二つのコピー)においてバックグラウンドにわたって発現するT-UCRのリスト。フィルタは変異スポット+2標準偏差の平均を用いて計算した。発現値はLowess及びチップ上の中央値により標準化した。

試料	UCRが フィルタ- される 細胞の数	B細胞 01	B細胞 02	脾臓	胸	食道	心臓	腎臓	肝臓	肺	MNC 01	
uc_186+A	19	3.399	2.332	1.620	1.111	0.905	1.722	0.961	0.942	1.601	1.298	1.803
uc_172+A	19	2.991	3.213	1.480	2.044	2.281	1.556	1.691	2.002	2.132	2.414	1.700
uc_274+A	19	2.715	1.623	0.996	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030	1.030
uc_428+A	19	2.020	1.708	1.600	1.031	1.337	1.136	1.627	0.948	1.241	1.262	0.998
uc_935+A	19	2.179	1.888	1.526	1.166	1.116	1.388	1.087	1.289	1.082	1.027	1.241
uc_571+A	19	1.333	1.559	1.254	1.166	1.073	1.223	1.522	1.154	1.099	1.205	1.010
uc_234+A	19	1.709	1.246	0.845	1.641	1.038	1.040	0.953	0.967	0.985	1.038	1.132
uc_432+A	19	1.841	1.322	1.146	1.175	1.056	1.024	0.988	1.084	1.244	1.248	1.222
uc_312+A	19	0.903	0.959	1.192	1.319	1.224	1.197	1.080	1.061	1.025	1.252	1.255
uc_206+A	19	1.899	1.300	1.026	1.033	0.956	1.086	0.514	0.936	1.045	1.099	1.063
uc_411+A	19	3.426	1.943	1.010	1.698	1.011	1.051	0.985	0.944	1.099	1.080	1.155
uc_465+A	19	2.455	2.603	1.415	1.751	1.211	1.021	1.273	1.519	1.299	1.495	1.585
uc_192+	19	0.967	0.935	1.178	1.106	1.238	1.252	1.021	0.944	0.994	1.209	1.038
uc_521+A	19	1.043	1.656	0.902	0.938	0.907	1.025	1.011	1.054	0.999	1.039	1.009
uc_186+A	19	2.453	1.227	0.953	1.024	0.941	0.950	0.938	0.946	0.927	0.999	1.238
uc_541+A	19	4.275	4.036	1.411	1.492	1.507	2.023	2.635	1.376	1.699	1.699	2.054
uc_423+A	19	3.093	3.142	2.218	2.363	1.874	1.895	2.199	2.315	2.787	2.552	2.792
uc_501+A	19	2.977	1.516	1.710	1.602	1.14	1.431	0.985	1.111	1.018	1.204	1.372
uc_731+	19	0.893	0.934	1.258	1.688	1.333	0.937	1.142	1.064	1.077	1.114	1.124
uc_321+A	19	1.077	0.964	1.051	1.006	0.94	0.996	0.969	0.969	0.972	0.971	0.932
uc_238+A	19	0.927	0.959	1.001	1.028	0.978	1.088	1.434	1.451	1.703	1.165	1.162
uc_310+	19	1.301	0.809	1.402	1.152	1.378	1.112	1.122	1.112	1.114	1.138	1.215
uc_131+A	19	2.452	2.271	1.874	1.048	1.130	1.029	0.445	0.249	1.51	1.32	1.223
uc_455+	19	2.904	2.964	1.984	1.056	1.068	1.066	0.974	0.939	0.942	1.031	1.087
uc_123+A	19	2.904	2.964	1.984	1.056	1.068	1.066	0.974	0.939	0.942	1.031	1.087
uc_244+A	19	2.007	0.981	1.035	1.028	1.071	1.013	0.982	0.982	0.967	1.038	1.025
uc_204+A	19	1.673	1.405	1.243	1.359	1.140	1.024	1.003	1.003	1.012	1.047	1.047
uc_347+	19	2.806	0.947	1.088	0.954	1.066	1.122	1.024	0.968	1.077	1.038	1.063
uc_440+	19	24.638	33.548	11.343	31.676	21.023	24.305	13.844	6.345	14.978	15.392	13.605
uc_206+	19	1.825	2.176	2.900	1.415	1.295	2.042	2.484	1.888	1.811	2.313	1.445
uc_388+A	19	2.335	1.979	1.106	1.322	1.161	1.337	1.015	0.949	1.069	1.038	1.079
uc_428+	19	2.354	1.453	1.441	1.06	1.430	1.422	1.455	1.057	1.211	1.461	1.411
uc_310+A	19	1.488	1.439	1.497	1.499	1.435	1.269	1.220	1.481	1.364	1.722	1.410
uc_423+A	19	6.953	4.053	4.049	1.572	1.493	1.592	2.401	2.401	2.401	2.401	2.401
uc_411+A	19	0.937	0.939	1.050	0.939	0.939	0.940	0.940	0.940	0.940	0.940	0.940
uc_192+	19	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761	2.761
uc_521+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_186+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_541+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_423+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_501+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_731+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_321+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_238+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_310+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_131+A	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_455+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_123+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_244+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_204+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_347+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777
uc_440+	19	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777	1.777

【 図 1 5 - 4 】

[illegible]

【 図 1 5 - 6 】

試料	UPDA による 相対濃度 の算出	MWC ID	原料	陽極	析出前	析出後	評価	T短時間	T長時間	結果	試験	
試-000A	0	1.153	1.766	1.697	1.215	1.196	1.180	1.913	1.841	2.328	1.514	1.520
試-0177A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0178A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0179A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0180A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0181A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0182A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0183A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0184A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0185A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0186A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0187A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0188A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0189A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0190A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0191A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0192A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0193A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0194A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0195A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0196A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0197A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0198A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0199A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0200A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0201A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0202A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0203A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0204A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0205A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0206A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0207A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0208A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0209A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0210A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0211A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0212A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0213A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0214A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0215A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0216A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0217A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0218A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0219A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0220A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0221A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0222A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0223A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0224A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0225A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0226A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0227A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0228A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0229A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0230A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0231A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0232A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0233A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0234A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0235A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0236A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0237A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0238A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0239A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0240A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0241A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0242A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0243A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0244A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0245A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0246A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0247A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0248A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0249A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0250A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0251A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0252A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0253A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0254A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0255A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0256A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0257A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0258A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0259A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0260A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0261A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0262A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0263A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0264A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0265A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0266A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0267A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-0268A	0	1.553	1.699	2.632	2.669	2.682	2.724	1.822	1.770	2.744	2.119	2.187
試-02												

【 図 1 5 - 8 】

8

試料	フルゲル組成の組成	MHC 0.2	厚膜	厚膜	胎皮	前記胎	骨格胎	胎膜	1層膜 0.1	T膜 0.2	胎膜	胎膜
0-32A	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32B	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32C	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32D	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32E	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32F	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32G	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32H	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32I	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32J	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32K	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32L	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32M	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32N	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32O	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32P	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Q	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32R	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32S	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32T	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32U	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32V	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32W	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32X	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Y	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Z	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32A	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32B	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32C	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32D	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32E	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32F	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32G	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32H	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32I	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32J	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32K	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32L	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32M	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32N	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32O	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32P	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Q	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32R	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32S	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32T	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32U	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32V	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32W	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32X	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Y	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Z	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32A	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32B	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32C	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32D	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32E	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32F	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32G	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32H	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32I	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32J	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32K	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32L	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32M	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32N	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32O	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32P	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Q	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32R	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32S	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32T	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32U	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32V	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32W	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32X	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Y	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Z	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32A	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32B	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32C	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32D	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32E	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32F	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32G	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32H	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32I	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32J	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32K	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32L	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32M	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32N	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32O	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32P	1.3	1.05	1.17	0.996	1.137	1.024	1.400	1.155	1.178	1.335	0.908	1.140
0-32Q	1.3	1.05	1.17	0.996								

## 【図 15 - 10】

10

[illegible]

【 図 1 6 - 2 】

1

Calin GA<sup>2</sup>

名称	グループ	種別	種別/沿革	所有者	UGR番号	UGRサブ
CRC対経路監視線	UG 150	0.00356	1.20	種直で入線	UG 150	
CRC対経路監視線	UG 329	0.00035	1.21	種直で入線	UG 329	P
CRC対経路監視線	UG 111	0.0044 05	1.21	種直で入線	UG 111	P
CRC対経路監視線	UG 182	0.0070 55	1.22	種直で入線	UG 182	P
CRC対経路監視線	UG 63	0.0050 11	1.22	種直で入線	UG 63	E
CRC対経路監視線	UG 468A	0.0001 98	1.23	種直で入線	UG 468	P
CRC対経路監視線	UG 425A	0.0048 05	1.23	種直で入線	UG 425	P
CRC対経路監視線	UG 209	0.0070 73	1.24	種直で入線	UG 209	N
CRC対経路監視線	UG 341	0.0070 45	1.24	種直で入線	UG 341	E
CRC対経路監視線	UG 420A	0.00 00 11	1.24	種直で入線	UG 420	P
CRC対経路監視線	UG 105	0.00137	1.28	種直で入線	UG 105	P
CRC対経路監視線	UG 246	0.0005 11	1.28	種直で入線	UG 246	E
CRC対経路監視線	UG 470A	0.0009 73	1.28	種直で入線	UG 470	P
CRC対経路監視線	UG 362	0.0070 63	1.29	種直で入線	UG 362	P
CRC対経路監視線	UG 303	0.0030 08	1.31	種直で入線	UG 303	N
CRC対経路監視線	UG 739A	0.0059 73	1.31	種直で入線	UG 739	P
CRC対経路監視線	UG 412	0.0010 05	1.31	種直で入線	UG 412	P
CRC対経路監視線	UG 266A	0.0008 1	1.36	種直で入線	UG 266	P
CRC対経路監視線	UG 537A	0.0030 89	1.36	種直で入線	UG 537	P
CRC対経路監視線	UG 388A	3.095E-06	1.37	種直で入線	UG 388	N
CRC対経路監視線	UG 200A	0.0002 08	1.37	種直で入線	UG 200	N
CRC対経路監視線	UG 330A	3.18E-06	1.37	種直で入線	UG 330	N
CRC対経路監視線	UG 18	0.0005 36	1.50	種直で入線	UG 18	N
CRC対経路監視線	UG 584A	2.57E-08	1.50	種直で入線	UG 584	P
CRC対経路監視線	UG 398A	0.0007 77	1.54	種直で入線	UG 398	P
CRC対経路監視線	UG 112	1.83E-14	1.79	種直で入線	UG 112	N
CRC対経路監視線	UG 145A	0.0002 23	1.79	種直で入線	UG 145	P
CRC対経路監視線	UG 339	2.59E-09	2.17	種直で入線	UG 339	P

HCC財正業務課	UC 198+	0.000477	0.89	階層で低下	UC 198	N
HCC財正業務課	UC 234+	0.002321	0.90	階層で低下	UC 233	N
HCC財正業務課	UC 27+	0.00175	0.93	階層で低下	UC 27	N
HCC財正業務課	UC 274+	0.00367	0.93	階層で低下	UC 274	P
HCC財正業務課	UC 396+	0.00105	0.95	階層で低下	UC 396	N
HCC財正業務課	UC 252+A	0.00152	1.17	階層で上昇	UC 252	N
HCC財正業務課	UC 20+A	0.00372	1.38	階層で上昇	UC 20	P
HCC財正業務課	UC 402+A	0.00141	1.38	階層で上昇	UC 402	P

\*統計的比較はBenjamini and Hochbergの補正なしに行った。

【 図 1 7 - 2 】

1

Calin GA5

超短波电台 无线电台		电台名称	频率	备注
日本 J-CH				
FMA - CHB				
FMA - CHB				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				
MPV 14.2 MHz				

## Colin GAGE

[illegible]Calin GA<sup>2</sup>

編號	項目	單位	金額	備註
347	總計		12,122,535.12	
348	總計		12,122,535.12	
349	總計		12,122,535.12	
350	總計		12,122,535.12	
351	總計		12,122,535.12	
352	總計		12,122,535.12	
353	總計		12,122,535.12	
354	總計		12,122,535.12	
355	總計		12,122,535.12	
356	總計		12,122,535.12	
357	總計		12,122,535.12	
358	總計		12,122,535.12	
359	總計		12,122,535.12	
360	總計		12,122,535.12	
361	總計		12,122,535.12	
362	總計		12,122,535.12	
363	總計		12,122,535.12	
364	總計		12,122,535.12	
365	總計		12,122,535.12	
366	總計		12,122,535.12	
367	總計		12,122,535.12	
368	總計		12,122,535.12	
369	總計		12,122,535.12	
370	總計		12,122,535.12	
371	總計		12,122,535.12	
372	總計		12,122,535.12	
373	總計		12,122,535.12	
374	總計		12,122,535.12	
375	總計		12,122,535.12	
376	總計		12,122,535.12	
377	總計		12,122,535.12	
378	總計		12,122,535.12	
379	總計		12,122,535.12	
380	總計		12,122,535.12	
381	總計		12,122,535.12	
382	總計		12,122,535.12	
383	總計		12,122,535.12	
384	總計		12,122,535.12	
385	總計		12,122,535.12	
386	總計		12,122,535.12	
387	總計		12,122,535.12	
388	總計		12,122,535.12	
389	總計		12,122,535.12	
390	總計		12,122,535.12	
391	總計		12,122,535.12	
392	總計		12,122,535.12	
393	總計		12,122,535.12	
394	總計		12,122,535.12	
395	總計		12,122,535.12	
396	總計		12,122,535.12	
397	總計		12,122,535.12	
398	總計		12,122,535.12	
399	總計		12,122,535.12	
400	總計		12,122,535.12	

【 図 1 7 - 8 】

Calin GA<sup>2</sup>[illegible]

【 図 1 8 - 2 】

Calin GA

[illegible]



【 図 1 8 - 4 】

Cain GA

[illegible]

【 図 1 8 - 6 】

Calin GA

[illegible]

【 図 1 8 - 8 】

Calin GA

ハミルトニアンプロパゲータ	プリビルドプロパゲータ	前編解(=前法)	前編解
ham-001-01a-2proc0	0.85	0.86	ham-001-14
ham-001-01a-2proc1	0.85	0.86	ham-001-15
ham-001-01a-2proc2	0.85	0.86	ham-001-16
ham-001-01a-2proc3	0.85	0.86	ham-001-17
ham-001-01a-2proc4	0.85	0.86	ham-001-18
ham-001-01a-2proc5	0.85	0.86	ham-001-19
ham-001-01a-2proc6	0.85	0.86	ham-001-20
ham-001-01a-2proc7	0.85	0.86	ham-001-21
ham-001-01a-2proc8	0.85	0.86	ham-001-22
ham-001-01a-2proc9	0.85	0.86	ham-001-23
ham-001-01a-2proc10	0.85	0.86	ham-001-24
ham-001-01a-2proc11	0.85	0.86	ham-001-25
ham-001-01a-2proc12	0.85	0.86	ham-001-26
ham-001-01a-2proc13	0.85	0.86	ham-001-27
ham-001-01a-2proc14	0.85	0.86	ham-001-28
ham-001-01a-2proc15	0.85	0.86	ham-001-29
ham-001-01a-2proc16	0.85	0.86	ham-001-30
ham-001-01a-2proc17	0.85	0.86	ham-001-31
ham-001-01a-2proc18	0.85	0.86	ham-001-32
ham-001-01a-2proc19	0.85	0.86	ham-001-33
ham-001-01a-2proc20	0.85	0.86	ham-001-34
ham-001-01a-2proc21	0.85	0.86	ham-001-35
ham-001-01a-2proc22	0.85	0.86	ham-001-36
ham-001-01a-2proc23	0.85	0.86	ham-001-37
ham-001-01a-2proc24	0.85	0.86	ham-001-38
ham-001-01a-2proc25	0.85	0.86	ham-001-39
ham-001-01a-2proc26	0.85	0.86	ham-001-40
ham-001-01a-2proc27	0.85	0.86	ham-001-41
ham-001-01a-2proc28	0.85	0.86	ham-001-42
ham-001-01a-2proc29	0.85	0.86	ham-001-43
ham-001-01a-2proc30	0.85	0.86	ham-001-44
ham-001-01a-2proc31	0.85	0.86	ham-001-45
ham-001-01a-2proc32	0.85	0.86	ham-001-46
ham-001-01a-2proc33	0.85	0.86	ham-001-47
ham-001-01a-2proc34	0.85	0.86	ham-001-48
ham-001-01a-2proc35	0.85	0.86	ham-001-49
ham-001-01a-2proc36	0.85	0.86	ham-001-50
ham-001-01a-2proc37	0.85	0.86	ham-001-51
ham-001-01a-2proc38	0.85	0.86	ham-001-52
ham-001-01a-2proc39	0.85	0.86	ham-001-53
ham-001-01a-2proc40	0.85	0.86	ham-001-54
ham-001-01a-2proc41	0.85	0.86	ham-001-55
ham-001-01a-2proc42	0.85	0.86	ham-001-56
ham-001-01a-2proc43	0.85	0.86	ham-001-57
ham-001-01a-2proc44	0.85	0.86	ham-001-58
ham-001-01a-2proc45	0.85	0.86	ham-001-59
ham-001-01a-2proc46	0.85	0.86	ham-001-60
ham-001-01a-2proc47	0.85	0.86	ham-001-61
ham-001-01a-2proc48	0.85	0.86	ham-001-62
ham-001-01a-2proc49	0.85	0.86	ham-001-63
ham-001-01a-2proc50	0.85	0.86	ham-001-64
ham-001-01a-2proc51	0.85	0.86	ham-001-65
ham-001-01a-2proc52	0.85	0.86	ham-001-66
ham-001-01a-2proc53	0.85	0.86	ham-001-67
ham-001-01a-2proc54	0.85	0.86	ham-001-68
ham-001-01a-2proc55	0.85	0.86	ham-001-69
ham-001-01a-2proc56	0.85	0.86	ham-001-70
ham-001-01a-2proc57	0.85	0.86	ham-001-71
ham-001-01a-2proc58	0.85	0.86	ham-001-72
ham-001-01a-2proc59	0.85	0.86	ham-001-73
ham-001-01a-2proc60	0.85	0.86	ham-001-74
ham-001-01a-2proc61	0.85	0.86	ham-001-75
ham-001-01a-2proc62	0.85	0.86	ham-001-76
ham-001-01a-2proc63	0.85	0.86	ham-001-77
ham-001-01a-2proc64	0.85	0.86	ham-001-78
ham-001-01a-2proc65	0.85	0.86	ham-001-79
ham-001-01a-2proc66	0.85	0.86	ham-001-80
ham-001-01a-2proc67	0.85	0.86	ham-001-81
ham-001-01a-2proc68	0.85	0.86	ham-001-82
ham-001-01a-2proc69	0.85	0.86	ham-001-83
ham-001-01a-2proc70	0.85	0.86	ham-001-84
ham-001-01a-2proc71	0.85	0.86	ham-001-85
ham-001-01a-2proc72	0.85	0.86	ham-001-86
ham-001-01a-2proc73			

## 【圖 18-10】

Cain G.

[illegible]

【 図 1 8 - 1 2 】

Calin GA

[illegible]

【 図 1 8 - 1 4 】

Calin GA

[illegible]

【 図 1 8 - 1 6 】

18

ハズレの番号	プレイの総回	当選確率(%)	期待値
haz-00-21w01	uc-014	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w02	uc-015	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w03	uc-016	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w04	uc-017	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w05	uc-018	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w06	uc-019	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w07	uc-020	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w08	uc-021	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w09	uc-022	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w10	uc-023	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w11	uc-024	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w12	uc-025	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w13	uc-026	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w14	uc-027	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w15	uc-028	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w16	uc-029	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w17	uc-030	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w18	uc-031	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w19	uc-032	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w20	uc-033	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w21	uc-034	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w22	uc-035	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w23	uc-036	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w24	uc-037	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w25	uc-038	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w26	uc-039	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w27	uc-040	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w28	uc-041	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w29	uc-042	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w30	uc-043	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w31	uc-044	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w32	uc-045	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w33	uc-046	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w34	uc-047	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w35	uc-048	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w36	uc-049	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w37	uc-050	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w38	uc-051	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w39	uc-052	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w40	uc-053	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w41	uc-054	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w42	uc-055	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w43	uc-056	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w44	uc-057	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w45	uc-058	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w46	uc-059	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w47	uc-060	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w48	uc-061	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w49	uc-062	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w50	uc-063	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w51	uc-064	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w52	uc-065	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w53	uc-066	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w54	uc-067	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w55	uc-068	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w56	uc-069	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w57	uc-070	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w58	uc-071	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w59	uc-072	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w60	uc-073	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w61	uc-074	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w62	uc-075	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w63	uc-076	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w64	uc-077	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w65	uc-078	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w66	uc-079	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w67	uc-080	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w68	uc-081	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w69	uc-082	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w70	uc-083	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w71	uc-084	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w72	uc-085	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w73	uc-086	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w74	uc-087	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w75	uc-088	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w76	uc-089	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w77	uc-090	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w78	uc-091	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w79	uc-092	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w80	uc-093	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w81	uc-094	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w82	uc-095	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w83	uc-096	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w84	uc-097	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w85	uc-098	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w86	uc-099	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w87	uc-100	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w88	uc-101	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w89	uc-102	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w90	uc-103	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w91	uc-104	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w92	uc-105	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w93	uc-106	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w94	uc-107	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w95	uc-108	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w96	uc-109	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w97	uc-110	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w98	uc-111	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w99	uc-112	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w00	uc-113	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w01	uc-114	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w02	uc-115	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w03	uc-116	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w04	uc-117	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w05	uc-118	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w06	uc-119	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w07	uc-120	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w08	uc-121	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w09	uc-122	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w10	uc-123	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w11	uc-124	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w12	uc-125	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w13	uc-126	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w14	uc-127	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w15	uc-128	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w16	uc-129	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w17	uc-130	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w18	uc-131	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w19	uc-132	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w20	uc-133	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w21	uc-134	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w22	uc-135	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w23	uc-136	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w24	uc-137	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w25	uc-138	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w26	uc-139	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w27	uc-140	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w28	uc-141	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w29	uc-142	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w30	uc-143	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w31	uc-144	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w32	uc-145	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w33	uc-146	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w34	uc-147	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w35	uc-148	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w36	uc-149	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w37	uc-150	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w38	uc-151	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w39	uc-152	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w40	uc-153	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w41	uc-154	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w42	uc-155	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w43	uc-156	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w44	uc-157	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w45	uc-158	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w46	uc-159	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w47	uc-160	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w48	uc-161	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w49	uc-162	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w50	uc-163	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w51	uc-164	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w52	uc-165	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w53	uc-166	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w54	uc-167	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w55	uc-168	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w56	uc-169	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w57	uc-170	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w58	uc-171	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w59	uc-172	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w60	uc-173	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w61	uc-174	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w62	uc-175	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w63	uc-176	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w64	uc-177	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w65	uc-178	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w66	uc-179	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w67	uc-180	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w68	uc-181	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w69	uc-182	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w70	uc-183	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w71	uc-184	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w72	uc-185	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w73	uc-186	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w74	uc-187	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w75	uc-188	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w76	uc-189	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w77	uc-190	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w78	uc-191	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w79	uc-192	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w80	uc-193	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w81	uc-194	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w82	uc-195	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w83	uc-196	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w84	uc-197	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w85	uc-198	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w86	uc-199	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w87	uc-200	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w88	uc-201	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w89	uc-202	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w90	uc-203	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w91	uc-204	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w92	uc-205	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w93	uc-206	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w94	uc-207	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w95	uc-208	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w96	uc-209	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w97	uc-210	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w98	uc-211	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w99	uc-212	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w00	uc-213	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w01	uc-214	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w02	uc-215	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w03	uc-216	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w04	uc-217	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w05	uc-218	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w06	uc-219	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w07	uc-220	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w08	uc-221	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w09	uc-222	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w10	uc-223	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w11	uc-224	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w12	uc-225	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w13	uc-226	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w14	uc-227	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w15	uc-228	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w16	uc-229	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w17	uc-230	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w18	uc-231	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w19	uc-232	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w20	uc-233	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w21	uc-234	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w22	uc-235	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w23	uc-236	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w24	uc-237	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w25	uc-238	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w26	uc-239	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w27	uc-240	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w28	uc-241	0.1806	haz-00-21
haz-00-21w29	uc-242		

【 図 1 8 - 1 8 】

Calin GA[illegible]

【 図 1 8 - 2 0 】

Cain GA

[illegible]

【 図 1 8 - 2 2 】

Calin GA

アルミのPRISMグループ	アルミのKCFRグループ	相対強度(Specific strength)	密度
ncm-018-200-1	ucf-003-1	0.5508	ncm-200
ncm-018-200-2	ucf-003-2	0.5506	ncm-200
ncm-018-200-3	ucf-003-3	0.5503	ncm-200
ncm-018-200-4	ucf-003-4	0.5503	ncm-200
ncm-018-200-5	ucf-003-5	0.5503	ncm-200
ncm-018-200-6	ucf-003-6	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-7	ucf-003-7	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-8	ucf-003-8	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-9	ucf-003-9	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-10	ucf-003-10	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-11	ucf-003-11	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-12	ucf-003-12	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-13	ucf-003-13	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-14	ucf-003-14	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-15	ucf-003-15	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-16	ucf-003-16	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-17	ucf-003-17	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-18	ucf-003-18	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-19	ucf-003-19	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-20	ucf-003-20	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-21	ucf-003-21	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-22	ucf-003-22	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-23	ucf-003-23	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-24	ucf-003-24	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-25	ucf-003-25	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-26	ucf-003-26	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-27	ucf-003-27	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-28	ucf-003-28	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-29	ucf-003-29	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-30	ucf-003-30	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-31	ucf-003-31	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-32	ucf-003-32	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-33	ucf-003-33	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-34	ucf-003-34	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-35	ucf-003-35	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-36	ucf-003-36	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-37	ucf-003-37	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-38	ucf-003-38	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-39	ucf-003-39	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-40	ucf-003-40	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-41	ucf-003-41	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-42	ucf-003-42	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-43	ucf-003-43	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-44	ucf-003-44	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-45	ucf-003-45	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-46	ucf-003-46	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-47	ucf-003-47	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-48	ucf-003-48	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-49	ucf-003-49	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-50	ucf-003-50	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-51	ucf-003-51	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-52	ucf-003-52	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-53	ucf-003-53	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-54	ucf-003-54	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-55	ucf-003-55	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-56	ucf-003-56	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-57	ucf-003-57	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-58	ucf-003-58	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-59	ucf-003-59	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-60	ucf-003-60	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-61	ucf-003-61	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-62	ucf-003-62	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-63	ucf-003-63	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-64	ucf-003-64	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-65	ucf-003-65	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-66	ucf-003-66	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-67	ucf-003-67	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-68	ucf-003-68	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-69	ucf-003-69	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-70	ucf-003-70	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-71	ucf-003-71	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-72	ucf-003-72	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-73	ucf-003-73	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-74	ucf-003-74	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-75	ucf-003-75	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-76	ucf-003-76	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-77	ucf-003-77	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-78	ucf-003-78	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-79	ucf-003-79	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-80	ucf-003-80	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-81	ucf-003-81	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-82	ucf-003-82	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-83	ucf-003-83	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-84	ucf-003-84	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-85	ucf-003-85	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-86	ucf-003-86	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-87	ucf-003-87	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-88	ucf-003-88	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-89	ucf-003-89	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-90	ucf-003-90	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-91	ucf-003-91	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-92	ucf-003-92	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-93	ucf-003-93	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-94	ucf-003-94	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-95	ucf-003-95	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-96	ucf-003-96	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-97	ucf-003-97	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-98	ucf-003-98	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-99	ucf-003-99	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-100	ucf-003-100	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-101	ucf-003-101	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-102	ucf-003-102	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-103	ucf-003-103	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-104	ucf-003-104	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-105	ucf-003-105	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-106	ucf-003-106	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-107	ucf-003-107	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-108	ucf-003-108	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-109	ucf-003-109	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-110	ucf-003-110	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-111	ucf-003-111	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-112	ucf-003-112	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-113	ucf-003-113	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-114	ucf-003-114	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-115	ucf-003-115	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-116	ucf-003-116	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-117	ucf-003-117	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-118	ucf-003-118	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-119	ucf-003-119	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-120	ucf-003-120	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-121	ucf-003-121	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-122	ucf-003-122	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-123	ucf-003-123	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-124	ucf-003-124	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-125	ucf-003-125	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-126	ucf-003-126	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-127	ucf-003-127	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-128	ucf-003-128	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-129	ucf-003-129	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-130	ucf-003-130	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-131	ucf-003-131	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-132	ucf-003-132	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-133	ucf-003-133	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-134	ucf-003-134	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-135	ucf-003-135	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-136	ucf-003-136	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-137	ucf-003-137	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-138	ucf-003-138	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-139	ucf-003-139	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-140	ucf-003-140	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-141	ucf-003-141	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-142	ucf-003-142	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-143	ucf-003-143	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-144	ucf-003-144	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-145	ucf-003-145	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-146	ucf-003-146	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-147	ucf-003-147	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-148	ucf-003-148	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-149	ucf-003-149	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-150	ucf-003-150	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-151	ucf-003-151	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-152	ucf-003-152	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-153	ucf-003-153	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-154	ucf-003-154	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-155	ucf-003-155	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-156	ucf-003-156	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-157	ucf-003-157	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-158	ucf-003-158	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-159	ucf-003-159	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-160	ucf-003-160	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-161	ucf-003-161	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-162	ucf-003-162	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-163	ucf-003-163	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-164	ucf-003-164	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-165	ucf-003-165	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-166	ucf-003-166	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-167	ucf-003-167	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-168	ucf-003-168	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-169	ucf-003-169	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-170	ucf-003-170	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-171	ucf-003-171	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-172	ucf-003-172	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-173	ucf-003-173	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-174	ucf-003-174	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-175	ucf-003-175	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-176	ucf-003-176	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-177	ucf-003-177	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-178	ucf-003-178	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-179	ucf-003-179	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-180	ucf-003-180	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-181	ucf-003-181	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-182	ucf-003-182	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-183	ucf-003-183	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-184	ucf-003-184	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-185	ucf-003-185	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-186	ucf-003-186	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-187	ucf-003-187	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-188	ucf-003-188	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-189	ucf-003-189	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-190	ucf-003-190	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-191	ucf-003-191	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-192	ucf-003-192	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-193	ucf-003-193	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-194	ucf-003-194	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-195	ucf-003-195	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-196	ucf-003-196	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-197	ucf-003-197	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-198	ucf-003-198	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-199	ucf-003-199	0.5497	ncm-200
ncm-018-200-200	ucf-003-200	0.5497	ncm-200

【 図 1 8 - 2 4 】

2[illegible]

【 図 1 8 - 2 6 】

2[illegible]

プレイ上の名前(グループ)	プレイ上の名前(グループ)	世間(年齢)	身長(m)
ham-001-gro-01a01	id 366	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a02	id 367	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a03	id 368	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a04	id 369	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a05	id 370	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a06	id 371	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a07	id 372	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a08	id 373	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a09	id 374	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a10	id 375	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a11	id 376	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a12	id 377	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a13	id 378	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a14	id 379	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a15	id 380	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a16	id 381	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a17	id 382	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a18	id 383	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a19	id 384	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a20	id 385	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a21	id 386	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a22	id 387	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a23	id 388	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a24	id 389	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a25	id 390	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a26	id 391	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a27	id 392	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a28	id 393	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a29	id 394	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a30	id 395	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a31	id 396	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a32	id 397	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a33	id 398	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a34	id 399	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a35	id 400	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a36	id 401	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a37	id 402	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a38	id 403	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a39	id 404	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a40	id 405	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a41	id 406	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a42	id 407	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a43	id 408	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a44	id 409	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a45	id 410	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a46	id 411	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a47	id 412	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a48	id 413	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a49	id 414	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a50	id 415	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a51	id 416	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a52	id 417	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a53	id 418	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a54	id 419	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a55	id 420	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a56	id 421	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a57	id 422	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a58	id 423	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a59	id 424	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a60	id 425	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a61	id 426	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a62	id 427	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a63	id 428	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a64	id 429	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a65	id 430	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a66	id 431	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a67	id 432	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a68	id 433	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a69	id 434	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a70	id 435	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a71	id 436	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a72	id 437	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a73	id 438	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a74	id 439	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a75	id 440	3.5436	ham-m01
ham-001-gro-01a76	id 441	3.5436	ham-m01
ham-001-g			

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 08/72081

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/68, A61P 35/00, A61K 48/00 (2008.04)

USPC - 435/6, 435/7.23, 702/20, 514/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - C12Q 1/68, A61P 35/00, A61K 48/00 (2008.04)

USPC - 435/6, 435/7.23, 702/20, 514/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST, PubMed, Google Patent, Google Scholar: UCR, T-UCR, miRNA, cancer, CAGR, CD, transcrib\$3, ultraconserved region\$2, transcribed ultraconserved region\$2, genomic adj10 location, CD5, CCL, and B-CCL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2006/0105360 A1 (CROCE et al.) 18 May 2006 (18.05.2006) [0011], [0016]-[0024], [0052], [0154]-[0155], [0166], [0221], [0247]	82  21-32, 35-44, 46-47, 58-62, 75, 77, 85-87
Y --- A	BEJERANO et al., Ultraconserved Elements in the Human Genome. Science, 28 May 2004, Vol 304, No 5675, pp. 1321-1325 (2004). Electronic Supplement [online]. [Retrieved on 2008.12.19]. abstract; p 1322, col 2, para 1; electronic supplement	21-32, 35-44, 46-47, 58-62, 75, 77, 85-87  10-13
Y	WANG et al., Ontogeny and oncogenesis balance the transcriptional profile of renal cell cancer. Cancer Research, 15 October 2004, Vol 64, No 20, pp 7279-7287. abstract	21-32, 35-44, 46-47, 58-62, 75, 77, 85-87
X,P	CALIN et al., Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. Cancer Cell, September 2007, Vol 12, No 3, pp 215-225. pg 223, col 1, para 3; pg 225, col 1, para 2.	10-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2008 (19.12.2008)

Date of mailing of the international search report

14 JAN 2009

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/72081

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 1-9, 14-20, 76, 78-80  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1-9, 14-19, 76 and 78 are directed to abstract and theoretical methods which do not qualify for search by this ISA per PCT Rule 39.1(i). These claims are directed to methods and uses of an agent, however they do not provide a practical application having a concrete, tangible and useful result.  
Claims 20, 79-80 are directed to mere presentations of information which do not qualify for search by this ISA per PCT Rule 39.1(v). These claims are directed to a model and a database, both comprising non-functional descriptive matter
2. ☒ Claims Nos.: 45, 83-84  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 83-84 lack an antecedent basis for the term "UCR gene product" within claim 82, the independent claim from which they depend.  
Claim 45 is unsearchable as it recites dependency on unsearchable claims and fails to remedy the deficiencies therein.
3. ☒ Claims Nos.: 33-34, 48-57, 63-74 and 81  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード ( 参考 )
A 0 1 K 67/027 (2006.01)		C 1 2 M 1/00	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 6 F 19/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
		G 0 6 F 19/00	6 1 8

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

( 特許庁注 : 以下のものは登録商標 )

1 . フロッピー

F ターム ( 参考 ) 4B024 AA01 AA11 AA12 AA19 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11  
CA12 GA18 HA08 HA09 HA12 HA14 HA19  
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 FA12  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ20 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36  
QR42 QR56 QR62 QR63 QR66 QR77 QR82 QS03 QS12 QS16  
QS25 QS34 QS36 QX02  
4C084 AA02 AA13 BA44 CA18 NA14 ZB262 ZB272