(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7545726号
(P7545726)

(45)発行日　令和6年9月5日(2024.9.5)

(24)登録日　令和6年8月28日(2024.8.28)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/11 (2006.01)	C12N	15/11	Z ZNA	
C12N 15/113 (2010.01)	C12N	15/113	Z	
C12N 15/115 (2010.01)	C12N	15/115	Z	
C12N 15/63 (2006.01)	C12N	15/63	Z	
C12N 15/86 (2006.01)	C12N	15/86	Z	

請求項の数　14　（全233頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-564923(P2020-564923)
(86)(22)出願日　令和1年5月21日(2019.5.21)
(65)公表番号　特表2021-524245(P2021-524245A)
(43)公表日　令和3年9月13日(2021.9.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/033232
(87)国際公開番号　WO2019/226603
(87)国際公開日　令和1年11月28日(2019.11.28)
審査請求日　令和4年5月13日(2022.5.13)
(31)優先権主張番号　62/674,939
(32)優先日　平成30年5月22日(2018.5.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　506115514
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
The Regents of the University of California
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 94607－5200，オークランド，フランクリン ストリート 1111，12番 フロア
(74)代理人　100083806
弁理士　三好 秀和
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤 正和
(74)代理人　100111235

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ組成物およびがん治療における使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

第1のプレマイクロＲＮＡ－３４ａ（プレｍｉＲ－３４ａ）と第２のプレｍｉＲ－３４ａに作動可能に連結されたｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドであって、前記ｔＲＮＡのアンチコドンステムループの全部または一部が、前記第1のプレｍｉＲ－３４ａと前記第２のプレｍｉＲ－３４ａで置き換えられており、

前記ポリヌクレオチドは、５’から３’への順序で、前記ｔＲＮＡの５’部分、前記第１のプレｍｉＲ－３４ａの５’部分、前記第２のプレｍｉＲ－３４ａの５’部分、前記第２のプレｍｉＲ－３４ａの３’部分、前記第１のプレｍｉＲ－３４ａの３’部分、および前記ｔＲＮＡの３’部分を含み、

前記第1のプレｍｉＲ－３４ａが、第１の挿入ＲＮＡ分子に作動可能に連結されており、前記第２のプレｍｉＲ－３４ａが第２の挿入ＲＮＡ分子に作動可能に連結されており、それによって前記第１と第２の挿入ＲＮＡ分子が細胞内で放出可能であり、前記第１の挿入ＲＮＡ分子および／または前記第２の挿入ＲＮＡ分子は、それぞれ前記第1のプレｍｉＲ－３４ａおよび／または前記第２のプレｍｉＲ－３４ａに対して異種であり、

前記第１の挿入ＲＮＡ分子が、

ａ）前記第1のプレｍｉＲ－３４ａの５’末端、

ｂ）前記第1のプレｍｉＲ－３４ａの３’末端、

ｃ）前記第1のプレｍｉＲ－３４ａのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の５’、または

ｄ）前記第1のプレｍｉＲ－３４ａのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の３’に挿入

される、または近接することによって前記第1のプレｍｉＲ－３４ａに作動可能に連結され、
　前記第２の挿入ＲＮＡ分子が、
　ａ）前記第２のプレｍｉＲ－３４ａの５’末端、
　ｂ）前記第２のプレｍｉＲ－３４ａの３’末端、
　ｃ）前記第２のプレｍｉＲ－３４ａのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の５’、または
　ｄ）前記第２のプレｍｉＲ－３４ａのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の３’
に挿入される、または近接することによって前記第２のプレｍｉＲ－３４ａに作動可能に連結される
ポリヌクレオチド。
【請求項２】
　前記ポリヌクレオチドが、２７５ヌクレオチドから４００ヌクレオチドまでの長さである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３】
　前記第１と前記第２の挿入ＲＮＡ分子が独立に、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、触媒ＲＮＡ、リボスイッチ、ＲＮＡアプタマーからなる群から選択される、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４】
　前記第１と前記第２の挿入ＲＮＡ分子が、成熟ｍｉＲＮＡである、請求項１～３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項５】
　前記第１と前記第２の挿入ＲＮＡ分子が、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から独立に選択される２つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項６】
　前記第１と前記第２の挿入ＲＮＡ分子が、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６からなる群から独立に選択される成熟ｍｉＲＮＡである、請求項１～５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項７】
　さらに、前記ｔＲＮＡおよび／または前記第1のプレｍｉＲ－３４ａおよび／または前記第２のプレｍｉＲ－３４ａが、１つ以上のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、または触媒ＲＮＡに連結されている、請求項１～６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。
【請求項８】
配列番号１８３～１９２からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。
【請求項９】

請求項１～８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドをコードするＤＮＡコード配列を含む発現カセット。
【請求項１０】
請求項１～８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項９に記載の発現カセットを含む、リポソーム、ナノ粒子、またはウイルスベクター。
【請求項１１】
請求項１～８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項９に記載の発現カセットまたは請求項１０に記載のリポソーム、ナノ粒子もしくはウイルスベクターでトランスフェクトまたは形質転換された、宿主細胞。
【請求項１２】
がんの成長、増殖、および／または進行を予防、緩和、低減、逆転および／または阻害する方法に使用するための医薬組成物であって、請求項１に記載のポリヌクレオチドを含み、任意で、
前記がんが、乳がん、リンパ腫、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、および肺がんからなる群から選択される、
医薬組成物。
【請求項１３】
前記ポリヌクレオチドが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
請求項１に記載のポリヌクレオチドであって、配列番号１８３－１９２からなる群から選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１８年５月２２日に出願された米国仮特許出願第６２／６７４，９３９号の利益を主張し、この出願はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
参照による配列表の組み込み
２０１９年５月１５日に作成され、１８７ＫＢのサイズを有するテキストファイル「ＵＣＤＶ－３５５ＷＯ　Ｓｅｑ　Ｌｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ」として、配列表が本明細書とともに提供される。テキストファイルの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
政府支援の声明
本発明は、米国国立衛生研究所により付与された助成金Ｒ０１ＧＭ１１３８８８およびＵ０１ＣＡ１７５３１５の下で政府支援を受けてなされたものである。政府は本発明に一定の権利を有する。
【背景技術】

【０００４】
ｍｉＲＮＡなどの非コードＲＮＡは、種々の細胞プロセスの根底にある標的遺伝子発現の調節に重要な役割を果たし、ｎｃＲＮＡの調節不全は、がんを含むヒトの疾患と高度に関連している（Ｃｅｃｈ ａｎｄ Ｓｔｅｉｔｚ，２０１４、Ｒｕｐａｉｍｏｏｌｅ ａｎｄ Ｓｌａｃｋ，２０１７、Ｔｈｙａｇａｒａｊａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１８）。ｎｃＲＮＡの作用は広く研究されてきたが、我々の知見はこれらの分子を真の生物学的レベルで完全に網羅していない可能性がある。現在、生物医学研究に使用されているｎｃＲＮＡは、主に化学合成によって産生され、種々の人工修飾で広範囲に装飾されている（Ｃｏｒｅｙ，２００７、Ｂｒａｍｓｅｎ ａｎｄ Ｋｊｅｍｓ，２０１２、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ，２０１７）。種々のメーカーおよび研究所のこのような化学的に設計／合成されたｎｃＲＮＡ剤は、人工修飾の種類、部位、程度が大きく異なるため、異なる高次構造、物理化学的特性、生物学的／薬理学的活性、および安全性プロファイルを備えている可能性がある。したがって、化学設計されたｎｃＲＮＡ分子は、生細胞内で産生された天然ｎｃＲＮＡの特性を表していない可能性がある（Ｈｏ ａｎｄ Ｙｕ，２０１６、Ｐｅｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。Ｔｏｌｌ様受容体などの特異的因子によって外来の侵入者として認識されている（Ｈｏｒｎｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００５、Ｒｏｂｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，２００９）、合成ｎｃＲＮＡは、非特異的作用を引き起こし、免疫原性を誘発することが十分に立証されており、これも種々の化学修飾で大きく異なる。有害な免疫反応の発生率が高いため、合成ｍｉＲ－３４ａ模倣体（ＭＲＸ３４）についての第Ｉ相臨床試験が最近終了したこと（Ｂｅｇ ｅｔ ａｌ．，２０１７）は、化学設計されたＲＮＡｉ剤を外来物質として認識する身体の能力を再び証明している。したがって、インビトロ転写（Ｂｅｃｋｅｒｔ ａｎｄ Ｍａｓｑｕｉｄａ，２０１１）、特に生細胞での生体工学（Ｐｏｎｃｈｏｎ ａｎｄ Ｄａｒｄｅｌ，２００７、Ｐｏｎｃｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００９、Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１３、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２０１４、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｐｅｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．，２０１６、Ｆａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１７、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２０１８）などの生物学的アプローチが、基礎研究および実験的治療のために、細胞ｎｃＲＮＡの特性をより良く表す天然ＲＮＡ分子を産生するために非常に求められている（Ｈｏ ａｎｄ Ｙｕ，２０１６、Ｐｅｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。

【０００５】
発酵を介して生体ｎｃＲＮＡを産生するための努力がなされてきたが、低い収率または成功率である。ｐ１９ ＲＮＡ結合タンパク質（Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１３）を使用すると、Ｅ．ｃｏｌｉで完全にプロセシングされたｓｉＲＮＡを産生する方法が提供されるが、収率が低い（例えば、細菌培養液１リットルあたり１０～８０μｇ）ため、この方法はＲＮＡｉ剤のミリグラム量の生産には実用的でない。ｔＲＮＡ足場の利用（Ｐｏｎｃｈｏｎ ａｎｄ Ｄａｒｄｅｌ，２００７、Ｐｏｎｃｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００９）は、ｎｃＲＮＡの大量（例えば、発酵１リットルあたり最大２０ｍｇ）産生を促進する可能性があるが、この方法の採用により、標的ｎｃＲＮＡの２０％未満が実際に単離可能なレベルで発現され得ることが明らかになった（例えば、全ＲＮＡの＞３％）（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。組換えプレｍｉＲＮＡ（ｍｉｒ）を産生するための最近の取り組みにより、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて、ハイブリッドｎｃＲＮＡ分子、つまりプレｍｉＲ－３４ａとｔＲＮＡＭｅｔ融合Ｓｅｐｈａｄｅｘアプタマー（ＭＳＡ）（ＭＳＡ／ｍｉｒ－３４ａ）の十分な発現（全ＲＮＡの１０～２０％）が実証された（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５）。ＭＳＡ／ｍｉｒ－３４ａは汎用足場として使用できるが、単離可能な標的ｎｃＲＮＡ産生の成功率は依然３０％未満であり、Ｓｅｐｈａｄｅｘアプタマーへの依存性は不明である。

【発明の概要】

【０００６】
ここでは、最初に、非常に高い発現レベル（全ＲＮＡの４０～８０％）および成功率（

約８０％、４２の標的ｎｃＲＮＡのうち３３）で、ミリグラム量の標的ｎｃＲＮＡ剤を迅速に産生するためのより安定で信頼できるｎｃＲＮＡ担体（ｎＣＡＲ）を開発したことを報告する。さらに、生物工学によるｎｃＲＮＡの少量および大量産生の両方に容易に適応できるパイプラインを確立し、即時使用可能な生物製剤ｎｃＲＮＡ分子のコレクションを作製するために適用した。２つのｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡを例として使用して、生物工学によるｍｉＲＮＡ剤は、ｍｉＲＮＡを標的指向化する特異的プロセシングのための固有のＲＮＡ特性を備えながら、ｍｉＲＮｏｍｅプロファイルを選択的に書き換え、ヒト細胞のトランスクリプトームを改変することができ、インビトロのヒト肺がん細胞に対する抗増殖特性およびインビボの異種移植マウスモデルにおける抗腫瘍活性をもたらしたことをさらに実証する。

【０００７】

一態様では、２つ以上のプレマイクロＲＮＡ（プレｍｉＲＮＡ）分子、例えば、第１のプレｍｉＲＮＡおよび第２のプレｍｉＲＮＡに作動可能に連結されたｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドが提供され、ここで、２つ以上のプレｍｉＲＮＡの各々は、挿入ＲＮＡ分子に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、挿入ＲＮＡ分子は、第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡに対して異種（heterologous）である。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡのアンチコドンステムループの全部または一部が、第１または第２のプレｍｉＲＮＡで置き換えられる。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡ分子は、ａ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡの５’末端、ｂ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡの３’末端、ｃ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡのダイサー切断部位またはＲＮａｓｅ切断部位の５’、またはｄ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡのダイサー切断部位またはＲＮａｓｅ切断部位の３’、に挿入されるか、近接するか、または作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、約２７５個のヌクレオチドから、例えば、約２８０ヌクレオチド以上、例えば、約２９０ヌクレオチド以上であり、最大約４００ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸をコードするものに由来するｔＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡをコードするＲＮＡは、表８に示されるように、配列番号３００～３５５、例えば、３００／３０１、３０２／３０３、３０４／３０５、３０６／３０７、３０８／３０９、３１０／３１１、３１２／３１３、３１４／３１５、３１６／３１７、３１８／３１９、３２０／３２１、３２２／３２３、３２４／３２５、３２６／３２、３２８／３２９、３３０／３３１、３３２／３３３、３３４／３３５、３３６／３３７、３３８／３３９、３４０／３４１、３４２／３４３、３４４／３４５、３４６／３４７、３４８／３４９、３５０／３５１、３５２／３５３、３５４／３５５に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する５’ｔＲＮＡ配列および３’ｔＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、哺乳動物のｔＲＮＡ、例えば、ヒトのｔＲＮＡである。いくつかの実施形態では、２つ以上のプレマイクロＲＮＡは、ヒトプレｍｉＲＮＡ分子に由来する。いくつかの実施形態において、２つ以上のプレｍｉＲＮＡは、プレｍｉＲ－３４ａ、プレｍｉＲ－１２４、プレｍｉＲ－１２９１、プレｍｉＲ－２００ｂ、プレｍｉＲ－２００ａ、プレｍｉＲ－１４１、プレｍｉＲ－４２９、プレｍｉＲ－１３３ａ、プレｌｅｔ－７ｃ、プレｍｉＲ－１２５ａ、プレｍｉＲ－３２８、プレｍｉＲ－１２６、プレｍｉＲ－２９８、プレｍｉＲ－１４８、プレｍｉＲ－１４４、プレｍｉＲ－１、プレｍｉＲ－１３３、プレｍｉＲ－８８８、プレｍｉＲ－６７７５、プレｍｉＲ－３７４、プレｍｉＲ－９２、プレｍｉＲ－１１８０、プレｍｉＲ－２１８、プレｍｉＲ－７、プレｍｉＲ－３７８、プレｍｉＲ－１７、プレｍｉＲ－１８ａ、プレｍｉＲ－２２、プレｍｉＲ－１２２、プレｍｉＲ－３０ｂ、プレｍｉＲ－４４９、プレｍｉＲ－５０６、プレｍｉＲ－９８、プレｍｉＲ－４４５８、プレｍｉＲ－２０

６、プレｍｉＲ－５１９、プレｍｉＲ－９３、プレｍｉＲ－１０６、プレｍｉＲ－３７３、およびプレｍｉＲ－５２０からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、２つ以上のプレｍｉＲＮＡは、同じプレｍｉＲＮＡ分子に由来する。いくつかの実施形態において、２つ以上のプレｍｉＲＮＡは、ヒトプレｍｉＲ－３４ａ分子に由来する。いくつかの実施形態では、２つ以上のプレｍｉＲＮＡは、異なるプレｍｉＲＮＡ分子に由来する。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、触媒ＲＮＡ、リボスイッチ、ＲＮＡアプタマーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、挿入ＲＮＡは、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約２００個のヌクレオチドを有し、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約５０個のヌクレオチドを有し、例えば、少なくとも約２０個のヌクレオチドかつ最大約２５個のヌクレオチドを有し、例えば、２０、２１、２２、２３、２４、２５個のヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、挿入ＲＮＡは、成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、２つ以上のプレｍｉＲＮＡにおける挿入ＲＮＡは、同じであるか、または異なる。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２２４からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡ、第１のプレｍｉＲＮＡおよび／または第２のプレｍｉＲＮＡは、１つ以上のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、または触媒ＲＮＡに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、アプタマー、ｓａＲＮＡまたは触媒ＲＮＡは、ａ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡの５’末端、ｂ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡの３’末端、ｃ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡのダイサーまたはＲＮａｓｅ切断部位の５’、またはｄ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡのダイサーまたはＲＮａｓｅ切断部位の３’、に挿入されるか、近接するか、または作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、アプタマーは、セフェデックス、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（ＦＬＴ１）、テオフィリン、マラカイトグリーン、ＨＣＣ－２２－５、ケラチン２３（ＫＲＴ２３）、アルファ２－ＨＳ糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、フェリチン軽鎖（ＦＴＬ）、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４、ＮＹ－ＥＳＯ－１、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３、サイクリンＢ１、ＫＩＦ２０Ａ、ＭＵＣ１、ＣＡ１９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、ＴＡＧ－７２、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ－カドヘリン、ＳｉＳｏ細胞で発現する受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）、およびＳＣ６からなる群から選択される標的抗原に結合する。

いくつかの実施形態において、アプタマーは、配列番号３５６～３５９のうちの１つと少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、プレｍｉＲＮＡは、天然に由来しまたは人工的に誘導される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号１８３～２１０、２６５～２８８および２９６～２９８のいずれか１つと少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、哺乳動物に対して実質的に非免疫原性である。

【０００８】

さらなる態様では、プレｍｉＲＮＡに作動可能に連結されたｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドが提供され、ポリヌクレオチドは、配列番号８５～１８２および２１１～２６４のいずれか１つと少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を含む。別の態様において、挿入ＲＮＡ分子を含むプレｍｉＲＮＡに作動可能に連結されたヒトｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドが提供され、例えば、プレｍｉＲＮＡと異種であり、ポリヌクレオチドは、配列番号２８９～２９５のいずれか１つと少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡのアンチコドンステムループの全部または一部は、プレｍｉＲＮＡで置き換えられる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、長さが約１５０個以上のヌクレオチド、例えば、約１６０個以上のヌクレオチド、例えば、約１７０個以上のヌクレオチド、例えば、約１８０個以上のヌクレオチドであり、最大約２３０個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸をコードするものに由来するｔＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡをコードするＲＮＡは、表８に示されるように、配列番号３００～３５５、例えば、３００／３０１、３０２／３０３、３０４／３０５、３０６／３０７、３０８／３０９、３１０／３１１、３１２／３１３、３１４／３１５、３１６／３１７、３１８／３１９、３２０／３２１、３２２／３２３、３２４／３２５、３２６／３２、３２８／３２９、３３０／３３１、３３２／３３３、３３４／３３５、３３６／３３７、３３８／３３９、３４０／３４１、３４２／３４３、３４４／３４５、３４６／３４７、３４８／３４９、３５０／３５１、３５２／３５３、３５４／３５５に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する５’ｔＲＮＡ配列および３’ｔＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、哺乳動物のｔＲＮＡ、例えば、ヒトのｔＲＮＡである。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、触媒ＲＮＡ、リボスイッチ、およびＲＮＡアプタマーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、挿入ＲＮＡは、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約２００個のヌクレオチドを有し、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約５０個のヌクレオチドを有し、例えば、少なくとも約２０個のヌクレオチドかつ最大約２５個のヌクレオチドを有し、例えば、２０、２１、２２、２３、２４、２５個のヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、挿入ＲＮＡは、成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２

２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡ、第１のプレｍｉＲＮＡおよび／または第２のプレｍｉＲＮＡは、１つ以上のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、または触媒ＲＮＡに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、アプタマー、ｓａＲＮＡまたは触媒ＲＮＡは、ａ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡの５’末端、ｂ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡの３’末端、ｃ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡのダイサーまたはＲＮａｓｅ切断部位の５’、またはｄ）第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡのダイサーまたはＲＮａｓｅ切断部位の３’、に挿入されるか、近接するか、または作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、アプタマーは、セフェデックス、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（ＦＬＴ１）、テオフィリン、マラカイトグリーン、ＨＣＣ－２２－５、ケラチン２３（ＫＲＴ２３）、アルファ２－ＨＳ糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、フェリチン軽鎖（ＦＴＬ）、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４、ＮＹ－ＥＳＯ－１、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３、サイクリンＢ１、ＫＩＦ２０Ａ、ＭＵＣ１、ＣＡ １９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、ＴＡＧ－７２、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ－カドヘリン、ＳｉＳｏ細胞で発現する受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）、およびＳＣ６からなる群から選択される標的抗原に結合する。いくつかの実施形態において、アプタマーは、配列番号３５６～３５９のうちの１つと少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号８５～２９８に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、プレｍｉＲＮＡは、天然に由来するかまたは人工的に誘導される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、哺乳動物に対して実質的に非免疫原性である。

【０００９】

さらなる態様において、提供されるのは、上記および本明細書に記載されるように、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチドを含む発現カセットである。さらなる態様において、提供されるのは、上記および本明細書に記載されるように、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチドを含むウイルスベクター、またはそのようなポリヌクレオチドを含む発現カセットである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレンチウイルスである。

【００１０】

さらなる態様において、提供されるのは、上記および本明細書に記載されるように、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチドを含むリポソームまたはナノ粒子、またはそのようなポリヌクレオチドを含む発現カセットである。いくつかの実施形態において、リポソームは、上記および本明細書に記載するように、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）と複合体を形成した、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチドを含む内部コア、および外部脂質二重層を含む。いくつかの実施形態では、内部コアは、例えば、約１０，０００ダルトンの分子量を有するリポソーム分岐ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリプレックス（ＬＰＰ）を含む。いくつかの実施形態において、リポソームの外側脂質二重層は、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＭＡ）、コレステロール、および１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥ

ＧＡＧＧＧ）の混合物を含む。

【００１１】

さらなる態様において、提供されるのは、上記および本明細書に記載されるように、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチド、またはそのようなポリヌクレオチドを含む発現カセット、ウイルスベクターまたはリポソーム／ナノ粒子でトランスフェクトまたは形質転換された宿主細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞から選択される。

【００１２】

別の態様において、提供されるのは、がんの成長、増殖、および／または進行を予防、緩和、低減、逆転および／または阻害を必要とする対象において、がんの成長、増殖、および／または進行を予防、緩和、低減、逆転および／または阻害する方法であり、上記および本明細書に記載されるように、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチド、またはそのようなポリヌクレオチドを含む発現カセット、ウイルスベクターまたはリポソーム／ナノ粒子を対象に投与することを含む方法である。いくつかの実施形態において、がんは、乳がん、リンパ腫、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、および肺がんからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、がんは、肺がんであり、ポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、がんは、膵臓がんであり、ポリヌクレオチドは、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、がんは、肝細胞がんであり、ポリヌクレオチドは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２２４からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、方法は、配列番号８５～２９８に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む１つ以上のｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、リポソームまたはナノ粒子は、静脈内、動脈内、腹腔内、腹腔内、肺内、肝内、皮下または腫瘍内から選択される経路を介して投与される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド、リポソームまたはナノ粒子の治療レジメンは、複数回、例えば、毎日、毎週、隔週、毎月、例えば、所定のまたは所望のエンドポイントに達するまで、投与される。いくつかの実施形態では、対象は、がんの症状を示しており、例えば、１つ以上の腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、対象は寛解状態にあり、腫瘍を再発症するリスクがある。いくつかの実施形態において、方法は、１つ以上の化学療法剤または抗がん剤、例えば、ゲムシチビンの同時投与を含む。いくつかの実施形態において、対象は、投与前に、１つ以上のｍｉＲＮＡの過剰発現または過少発現について試験される。

【００１３】

別の態様では、上記および本明細書に記載の通り、ポリヌクレオチド、発現カセット、リポソーム、ポリマー、ナノ粒子、ウイルスベクターおよび／または宿主細胞を含むキットが提供される。

【００１４】

定義

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。一般に、本明細書で使用される命名法、ならびに以下に記載される細胞培養、分子遺伝学、有機化学および核酸化学およびハイブリダイゼーションにおける実験手順は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。核酸およびペプチド合成には、標準的な技術が使用される。一般的に、酵素反応および精製ステップはメーカーの仕様書に従って実施される。技術および手順は、一般に、当技術分野における従来の方法および種々の一般的参考文献に従って実施され（一般に、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，４ｔｈ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（２０１２）およびＡｕｓｕｂｅｌ，ｅｄ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，（１９９０～２０１８）を参照）、これらはこの文書全体を通して提供される。本明細書で使用される命名法および分析化学の実験手順、ならびに以下に記載される有機合成は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。化学合成および化学分析には、標準的な技術またはその改変が使用される。

【００１５】

「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこれらの任意の組み合わせから構成されるポリマーを指す。

【００１６】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、糖（修飾、非修飾、またはその類似体）、ヌクレオチド塩基（修飾、非修飾、またはその類似体）、およびホスフェート基（修飾、非修飾、またはその類似体）を有する化学部分を指す。ヌクレオチドには、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および例えば、ロック核酸（「ＬＮＡ」）、ペプチド核酸（「ＰＮＡ」）、Ｌヌクレオチド、エチレン架橋核酸（「ＥＮＡ」）、アラビノシド、およびヌクレオチド類似体（脱塩基ヌクレオチドを含む）を含む修飾ヌクレオチド類似体が含まれる。同様に、「核酸」、「ヌクレオチド配列」、または「核酸配列」とは、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはそれらの任意の断片、ならびに天然に存在するまたは合成の分子を指す。これらの句はまた、一本鎖もしくは二本鎖であり、センス鎖もしくはアンチセンス鎖を表し得るゲノムもしくは合成起源のＤＮＡもしくはＲＮＡを指し、または任意のＤＮＡ様もしくはＲＮＡ様物質を指す。ＲＮＡは、本明細書に記載の方法で使用することができ、および／または逆転写によってｃＤＮＡに変換することができ、および／または本明細書に記載の方法で使用するＲＮＡであり得る。

【００１７】

本明細書で互換的に使用される場合、「マイクロＲＮＡ」、「ｍｉＲ」、または「ｍｉＲＮＡ」は、ｍｉＲＮＡ遺伝子からのプロセシングされていないまたはプロセシングされたＲＮＡ転写産物を指す。プロセシングされていないｍｉＲＮＡ遺伝子転写産物は、「ｍｉＲＮＡ前駆体」とも呼ばれ、通常、長さが約７０～１００個のヌクレオチドのＲＮＡ転写産物を含む。ｍｉＲＮＡ前駆体は、ＲＮＡｓｅ（ダイサー、アルゴノート、ＲＮＡｓｅＩＩＩなど）で消化し、１９～２５個のヌクレオチドの活性ＲＮＡ分子にすることによりプロセシングすることができる。この１９～２５個のヌクレオチドの活性ＲＮＡ分子は、「プロセシングされた」ｍｉＲＮＡ遺伝子転写産物または「成熟」ｍｉＲＮＡとも呼ばれる。

【００１８】

「プレマイクロＲＮＡ」または「プレｍｉＲ」または「プレｍｉＲＮＡ」という用語は、互換的に、そのポリヌクレオチド配列内に少なくとも１つの成熟マイクロＲＮＡ配列および少なくとも１つのダイサー切断可能部位を含むＲＮＡヘアピンを指す。

【００１９】

２つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一な」またはパーセント「同一性」という用語は、同一であるか、または特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドが同一である、２つ以上の配列または部分配列を指す（すなわち、比較ウィンドウ上で、または配列比較アルゴリズム（例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、ＦＡＳＴＡまたは他の任意の既知アラインメントアルゴリズム）を使用してまたは手動アラインメントおよび目視検査によって比較される指定領域上で、最大一致で比較および整列する場合、参照配列に対して特定の領域にわたって、例えば、本明細書に記載のｔＲＮＡ、プレマイクロＲＮＡおよびｔＲＮＡ／マイクロＲＮＡハイブリッドポリヌクレオチド分子、例えば、配列番号１～３６９に、少なくとも約８０％の同一性、例えば、少なくとも約８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の同一性を共有する。その場合、このような配列は「実質的に同一」であると言われる。この定義は、試験配列の賛辞も指す。好ましくは、長さが少なくとも約１０、１５、２０、２５、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０個のヌクレオチドの領域にわたって、または参照配列の全長にわたって同一である。

【００２０】

本明細書で使用される場合、「低分子干渉核酸」または「ｓｉＲＮＡ」という用語は、哺乳動物細胞（好ましくはヒト細胞）における遺伝子発現を下方制御する（すなわち、阻害する）ことができる任意の核酸分子を指す。ｓｉＲＮＡには、配列特異的ＲＮＡｉを媒介することができる核酸分子、例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、および短いヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）が含まれるが、これらに限定されない。同様に、「センス領域」という用語は、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス領域に（部分的または完全に）相補的なｓｉＲＮＡ分子のヌクレオチド配列を指す。任意選択で、ｓｉＲＮＡ分子のセンス鎖は、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス領域に相補的ではない追加のヌクレオチドも含み得る。逆に、本明細書で使用される場合、「アンチセンス領域」という用語は、標的核酸配列に（部分的または完全に）相補的なｓｉＲＮＡ分子のヌクレオチド配列を指す。任意選択で、ｓｉＲＮＡ分子のアンチセンス鎖は、ｓｉＲＮＡ分子のセンス領域に相補的ではない追加のヌクレオチドを含み得る。

【００２１】

「ｐｉＲＮＡ」と「Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ」という用語は互換的であり、遺伝子サイレンシングに関与する低分子ＲＮＡのクラスを指す。ＰｉＲＮＡ分子は通常、２６～３１個のヌクレオチドの長さである。

【００２２】

「ｓｎＲＮＡ」と「核内低分子ＲＮＡ」という用語は互換的であり、ＲＮＡスプライシングおよび転写因子の調節を含む種々のプロセスに関与する低分子ＲＮＡのクラスを指す。核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）のサブクラスも含まれる。この用語は、ｎｃＲＮＡに対するアンチセンス配列を含むｓｎＲＮＡのアンチセンス誘導体などの人工ｓｎＲＮＡを含むことも意図する。

【００２３】

「作動可能に連結された」とは、そのように記載された構成要素がそれらの通常の機能を果たすように構成される、要素の配置を指す。したがって、コード配列に作動可能に連結された所与のプロモーターは、適切な酵素が存在する場合、コード配列の発現をもたらすことができる。発現は、ＤＮＡまたはＲＮＡテンプレートからのマイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、アンチセンス核酸、またはｍＲＮＡの転写のいずれか１つ以上の転写を含むことを意味し、ｍＲＮＡテンプレートからのタンパク質の翻訳をさらに含むことができる。プロモーターは、コード配列の発現を指示するよ

うに機能する限り、コード配列と近接している必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在しても、プロモーター配列は依然コード配列に「作動可能に連結している」と見なされ得る。

【００２４】

「相同領域」という用語は、別の核酸領域と相同性を有する核酸の領域を指す。したがって、「相同領域」が核酸分子に存在するか否かは、同じまたは異なる分子の別の核酸領域を参照して決定される。さらに、核酸はしばしば二本鎖であるため、本明細書で使用される「相同領域」という用語は、核酸分子が互いにハイブリダイズする能力を指す。例えば、一本鎖核酸分子は、互いにハイブリダイズすることができる２つの相同な領域を有することができる。したがって、「相同領域」という用語は、相補的な配列を有する核酸セグメントを含む。相同領域は、長さが異なり得るが、典型的には４～４０個のヌクレオチド（例えば、約４～約４０、約５～約４０、約５～約３５、約５～約３０、約５～約２０、約６～約３０、約６～約２５、約６～約１５、約７～約１８、約８～約２０、約８～約１５など）であろう。

【００２５】

「相補的」および「相補性」という用語は互換的であり、ポリヌクレオチドが互いに塩基対を形成する能力を指す。塩基対は通常、逆平行ポリヌクレオチド鎖または領域のヌクレオチド単位間の水素結合によって形成される。相補的なポリヌクレオチド鎖または領域は、ワトソン－クリック様式で塩基対を形成することができる（例えば、ＡとＴ、ＡとＵ、ＣとＧ）。１００％相補的とは、１つのポリヌクレオチド鎖または領域の各ヌクレオチド単位が、第２のポリヌクレオチド鎖または領域の各ヌクレオチド単位と水素結合することができる状況を指す。完全ではない相補性とは、２本の鎖または２つの領域のすべてではないが一部のヌクレオチド単位が互いに水素結合し、パーセンテージで表すことができる状況を指す。

【００２６】

「標的部位」または「標的配列」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは阻害性ＲＮＡ分子によって認識される（すなわち、ハイブリダイゼーションに対して十分に相補的である）核酸配列である。

【００２７】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒトなどの哺乳動物を指すが、ヒト以外の霊長類、飼育動物（例えば、犬、猫など）、家畜（例えば、牛、羊、豚、馬など）または実験動物（例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモットなど）などの別の動物であってもよい。「患者」という用語は、疾患に罹患している、または罹患している疑いのある対象を指す。

【００２８】

本明細書で使用される場合、組成物の「有効量」または「医薬的に有効な量」または「治療上有効な量」という用語は、所望の治療効果および／または予防効果を達成するのに十分な量、例えば、治療中の疾患に関連する症状の予防または低減をもたらす量である。対象に投与される組成物の量は、疾患の種類および重症度、ならびに一般的な健康、年齢、性別、体重および薬物に対する耐性などの個体の特徴に依存するであろう。また、疾患の程度、重症度、および種類によっても異なる。当業者は、これらの因子および他の因子に応じて、適切な投与量を決定することができるであろう。本明細書に記載の組成物は、１つ以上の追加の治療用化合物と組み合わせて投与することもできる。

【００２９】

「がん関連抗原」または「腫瘍関連抗原」または「腫瘍特異的マーカー」または「腫瘍マーカー」という用語は、互換的に、正常細胞と比較して、がん細胞の表面に優先的に発現する分子（通常、タンパク質、炭水化物または脂質）を指し、がん細胞に対する薬剤の選択的標的指向化に有用である。多くの場合、がん関連抗原は、正常細胞と比較して、がん細胞で過剰発現する細胞表面分子であり、例えば、正常細胞と比較して、１倍の過剰発現、２倍の過剰発現、３倍以上の過剰発現である。多くの場合、がん関連抗原は、がん細

胞で不適切に合成される細胞表面分子であり、例えば、正常細胞で発現する分子と比較して、欠失、付加、または突然変異を含む分子である。多くの場合、がん関連抗原は、がん細胞の細胞表面でのみ発現し、正常細胞の表面では合成または発現しない。例示的なアプタマー標的には、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＦＬＴ１、テオフィリン、およびマラカイトグリーンが含まれるが、これらに限定されない。肝細胞がん細胞上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＨＣＣ－２２－５腫瘍関連抗原（Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃｈｉｍ Ａｃｔａ．２００６ Ａｐｒ；３６６（１－２）：２７４－８０）、およびＫＲＴ２３、ＡＨＳＧおよびＦＴＬ抗原（Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．２００９ Ａｕｇ ２８；２８１（２）：１４４－５０）が含まれるが、これらに限定されない。非小細胞肺がん細胞などの肺がん上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４およびＮＹ－ＥＳＯ－１（Ｇｒａｈ，ｅｔ ａｌ，Ｔｕｍｏｒｉ．（２０１４）１００（１）：６０－８）、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３およびサイクリンＢ１（Ｄａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ．（２０１６）９９：１７２－９）が含まれるが、これらに限定されない。膵臓がん細胞上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＫＩＦ２０Ａ（Ｉｍａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．（２０１１）１０４（２）：３００－７）、ＣＡ １９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、およびＴＡＧ－７２（Ｔｏｓｈｋｏｖ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｐａｎｃｒｅａｔｏｌ．（１９９４）１５（２）：９７－１０３）、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ－カドヘリン（Ｉｍａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（２００８）１４（２０）：６４８７－９５）、ＳｉＳｏ細胞で発現する受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）（Ａｋａｓｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｐａｎｃｒｅａｓ（２００３）２６（１）：４９－５５）、およびＳＣ６（Ｌｉｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｗｏｒｌｄ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．（２００５）１１（４８）：７６７１－５）が含まれるが、これらに限定されない。腫瘍関連抗原に特異的に結合するアプタマーは、本明細書に記載のハイブリッドｔＲＮＡ－プレｍｉＲＮＡ分子に含めることができる。

【００３０】

腫瘍またはがんの成長または進行に関する「阻害する」、「減少する」、「低減する」という用語は、当技術分野で知られている任意の方法を使用して、対象における腫瘍またはがんの成長、拡大、転移を測定可能な量で阻害することを指す。任意で化学療法剤または抗がん剤と組み合わせて、本明細書に記載されるように、例えば、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子を投与する前の腫瘍量と比較して、腫瘍量が少なくとも約１０％、２０％、３０％、５０％、８０％、または１００％減少した場合、腫瘍またはがんの成長、進行または拡大は、阻害、減少、または低減する。いくつかの実施形態において、任意で化学療法剤または抗がん剤と組み合わせて、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子の投与前の腫瘍量と比較して、腫瘍またはがんの成長、進行または拡大が、少なくとも約１倍、２倍、３倍、４倍、またはそれ超に阻害、減少、または低減する。

【図面の簡単な説明】

【００３１】

【図１】組換えＲＮＡのより高レベルな発現に向けた新しいｎｃＲＮＡ担体（ｎＣＡＲ）の同定を示す。図１Ａ．単独型ｔＲＮＡは、ＨＳＴ０８ Ｅ．ｃｏｌｉで発現を示さなかったのに対し、Ｓｅｐｈａｄｅｘアプタマーの融合（オレンジ色で強調表示）は、結果として生じるＭＳＡの過剰発現をもたらした（図１Ｂ）。図１Ｃ．ハイブリッドＭＳＡ／ｍｉｒ－３４ａは、Ｅ．ｃｏｌｉで過剰発現し、プレｍｉＲ－３４ａ自体は比較的低レベルの発現を示した。図１Ｄ．プレｍｉＲ－３４ａは、より安定した構造（赤矢印で示される塩基の変化）に向けて改良され、Ｓｅｐｈａｄｅｘアプタマーが除去された。これらの構築物の中で、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ－Ｇ１３８Ｕ／１３９ΔＧは、最高レベルの異種発現（全ＲＮＡの約５０％）を示したため、ｎｃＲＮＡ生物工学用の担体として選択された。図１Ｅは、図１Ｄに示すプレｍｉＲ－３４ａの高解像度の画像を提供する。

【００３２】

【図２】Ｅ．ｃｏｌｉにおけるｎｃＲＮＡの異種発現についてのＳｅｐｈａｄｅｘアプタマー非依存性を示す。単独型ｔＲＮＡに融合した改良プレｍｉＲ－３４ａＧ１３８Ｕ／１３９ΔＧは、ＨＳＴ０８およびＴｏｐ１０の両細胞でＭＳＡ／ｍｉｒ－３４ａ－１２９ヌクレオチドよりも高いレベルで発現する。全ＲＮＡを尿素－ＰＡＧＥにより分析した。

【００３３】

【図３】ｎＣＡＲを使用して、ｎｃＲＮＡ剤を生物工学により作製する３ステップの戦略を示す。図３Ａ．ステップ１では、目的のｎｃＲＮＡが標的ベクターにクローニングされ（図４を参照）、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖（赤／緑）が目的の標的低分子ＲＮＡ（ｓＲＮＡ、例えば、ｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡまたはアンチセンスＲＮＡ、ＲＮＡアプタマーなど）と呼ばれる挿入ＲＮＡに置き換えられる。図３Ｂ．ステップ２では、検証済みのプラスミドをＥ．ｃｏｌｉに形質転換し、発酵後、標的の生物工学（bioengineered）ｎｃＲＮＡ剤または生物製剤ｎｃＲＮＡ剤（ＢＥＲＡ）の発現について尿素－ＰＡＧＥ分析するために、全ＲＮＡを単離する。４２の標的ｎｃＲＮＡのうち、３３は顕著に高レベルな発現を示した（全ＲＮＡの４０～８０％）。形質転換されていない野生型細菌（ＷＴ）からの全ＲＮＡを比較に使用する。図３Ｃ．最後に、ステップ３で、ｎｃＲＮＡが、スピンカラムを使用して少量単離され、あるいは高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）法を使用して大量単離され、マイクログラムまたはミリグラムのＢＥＲＡをそれぞれ提供する。Ｂ：ブランクの非形質転換Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｔ：全ＲＮＡ、ＦＴ：通過画分、Ｗ１－２：洗浄、Ｅ：溶出液。画分１～１１が、ＦＰＬＣ単離中の種々の時点で収集された。ＲＮＡの純度は、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分析によって検証され（図５）、両方法は、９８％超の純度の即時使用可能なＢＥＲＡを提供することができた。

【００３４】

【図４】ＢＥＲＡを産生するためのｎＣＡＲ系プラスミドの遺伝子地図を示す。ｎＣＡＲをｐＢＳＴＮＡＶベクターに配置し、ｌｐｐプロモーター下で駆動し、アンピシリン耐性（ＡｍｐＲ）により選別した。ｎＣＡＲ内の成熟ｍｉＲＮＡおよび相補配列（それぞれ、最初の「ＮＮ…ＮＮ」および第２の「ＮＮ…ＮＮ」配列）は、目的のｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡで置換することができる。したがって、クローニングプライマー（点線）は、制限部位（ＥａｇＩおよびＳａｃＩＩ）から１５ヌクレオチドのところにわたって設計されており、両端において標的ｎｃＲＮＡに向かってプレｍｉＲ－３４ａと部分的に重複している。

【００３５】

【図５】単離されたＢＥＲＡの純度のＨＰＬＣ測定を示す。示されているのは、陰イオン交換ＦＰＬＣによって大量に精製されたｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐのＨＰＬＣトレースであり、いずれも純度が９８％超である。

【００３６】

【図６】ヒト細胞におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡからの標的ｍｉＲＮＡの選択的放出が、ダイサー依存性（ｍｉＲ－３４ａ）および非依存性（ｍｉＲ－１２４）様式で、ｍｉＲＮｏｍｅプロファイルを変化させることを示す。図６Ａ．低分子ＲＮＡ配列決定分析は、（ｉ）ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐが選択的にプロセシングされ、ヒト細胞においてｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐのアイソフォーム（長さ、開始部位／位置）をそれぞれ標的とすること（変化倍率（ＦＣ）、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ対対照ｔＲＮＡ（ｃｏｎ）処理）、（ｉｉ）ＢＥＲＡから産生されたｍｉＲ－３４ａ－５ｐのレベル（リードまたはｒｄｓ）は、ダイサーの状態に大きく影響されたが、ｍｉＲ－１２４－３ｐの産生はダイサー非依存性であったこと、を示した。個々のリード数は、ＦＣ＞１．２または＜０．８の富化ｍｉＲＮＡを表し、ＥｄｇｅＲ分析による有意差がある。図６Ｂ．ｍｉＲ－３４ａ－５ｐは、ｎＣＡＲ－ｍｉＲ－３４ａ－５ｐでトランスフェクションした後、野生型およびダイサー－ＫＯの両細胞で最も豊富なｍｉＲＮＡになり、これは、対照細胞のほんのわずかな割合とは際立って対照的であった。同様に、ｍｉＲ－１２４－３ｐは、ｎＣＡＲ－ｍｉＲ－１２４－３ｐでトランスフェクションした後、野生型細胞およびダイサー－ＫＯ細胞でそれぞれ７番目に多いおよび最も多いｍｉＲＮＡになった。

【００３７】
【図７】ＲＮＡ配列決定研究により同定された標的ｍｉＲＮＡおよびいくつかのｍＲＮＡにおける変化の程度についてのｑＰＣＲ検証を示す。図７Ａ．ステムループＲＴ　ｑＰＣＲの定量化により、ＢＥＲＡで処理した後の野生型細胞およびダイサー－ＫＯ細胞におけるｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐレベルの変化の程度が確認された。値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。＊＊＊Ｐ＜０．００１、独立ｔ検定図７Ｂ．ＲＮＡ配列決定研究によって同定された２９３Ｔ細胞におけるいくつかの下方制御された転写産物のＲＴ－ｑＰＣＲ検証。ＡＭＥＲ１、ＮＥＣＴＩＮ１、およびＧＡＳ１は、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐについて以前報告された標的であり、ＳＮＡＩ２、ＩＱＧＡＰ１、ＶＡＭＰ３、ＴＭＥＭ１０９、およびＮＲＡＳは、ｍｉＲ－１２４－３ｐの既知の標的である。値は平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝９）。＊＊＊Ｐ＜０．００１、ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置分散分析。図７Ｃ．１８Ｓハウスキーピング遺伝子のＣｔ値は、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡ処理によって変化しなかった。
【００３８】
【図８】ｍｉＲＮＡ標的遺伝子発現の調節におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡの特異性を示す。図８Ａ．対照と比較した、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐまたはｍｉＲ－１２４－３ｐでトランスフェクトされた２９３Ｔ細胞における有意に変化したｍＲＮＡ（Ｐ＜０．０１）のボルケーノプロット。多くの転写産物が、２９３Ｔ細胞でｎＣＡＲ／ｍｉＲによって下方制御された。ダイサー－ＫＯ細胞では、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐはトランスクリプトームへの影響を最小限に抑えたが（６つの遺伝子のみが有意に下方制御された）、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐの影響は維持された。ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（青）およびｍｉＲ－１２４－３ｐ（赤）のいくつかの報告された標的は矢印で示される。図８Ｂ．対照ｔＲＮＡ処理と比較した、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡで処理された野生型細胞およびダイサー－ＫＯ２９３Ｔ細胞で最も下方制御された上位３０個の遺伝子のヒートマップ。図８Ｃ．ｍｉＲＮＡ標的遺伝子の調節におけるＢＥＲＡの特異性は、ｍｉＲＮＡエンリッチメント解析によって裏付けられている。ｍｉＲＮＡエンリッチメント解析では、２９３Ｔ細胞においてｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ下方制御ｍＲＮＡの基礎となるｍｉＲ－３４／４４９が容易に同定されたが、ダイサー－ＫＯ細胞では同定されなかった。対照的に、ｍｉＲ－１２４／５０６は、野生型およびダイサー－ＫＯ２９３Ｔの両細胞でｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ下方制御ｍＲＮＡのために富化され、標的遺伝子発現の調節におけるＢＥＲＡ／ｍｉＲ－１２４－３ｐの特異性だけでなく、ダイサーへの非依存性も裏付けている。図８Ｄ．Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ　Ｐａｔｈｗａｙ　Ａｎａｌｙｓｉｓ（ＩＰＡ）によって同定された、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐによってそれぞれ影響を受ける主要な生物学的経路の遺伝子調節ネットワーク。
【００３９】
【図９】生物工学的ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４による標的遺伝子のタンパク質レベルの制御に及ぼす、ダイサーの状態の影響を示す。図９Ａ．ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐから産生された高レベルのｍｉＲ－３４ａ－５ｐは、２９３Ｔ細胞におけるｍｉＲ－３４ａ標的（ＣＤＫ６およびＳＩＲＴ１など）のタンパク質レベルの一貫した低下をもたらしたが、ダイサー－ＫＯ細胞ではｍｉＲ－３４ａ－５ｐのレベルがはるかに低いため、その効果は消失（ＣＤＫ６）または維持（ＳＩＲＴ１）し得る。図９Ｂ．野生型細胞およびダイサー－ＫＯ細胞で、異なる長さと位置でｍｉＲ－１２４－３ｐを産生すると、いくつかの既知のｍｉＲ－１２４標的（例えば、ＳＴＡＴ３およびＭＲＰ４）のタンパク質発現に異なる影響を及ぼす可能性がある。選択した抗体を用いてウエスタンブロットを行い、ローディング対照としてβ－アクチンを使用した。
【００４０】
【図１０】生物工学によるｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４が、（原）がん遺伝子発現の抑制を介してヒト肺がん細胞の増殖を阻害することを示す。図１０Ａ．ヒト肺がんＡ５４９、Ｈ２３、Ｈ１２９９、Ｈ１６５０、およびＨ１９７５細胞増殖の阻害におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ－ｍｉＲ－１２４－３ｐの用量反応曲線。

各ｎＣＡＲ／ｍｉＲは、Ｈ１９７５細胞に対するｍｉＲ－３４ａ－５ｐを除いて、対照ＲＮＡよりも有意に効果が高い（Ｐ＜０．００１、ボンフェローニ事後検定による二元配置分散分析）。値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。図１０Ｂ．ＥＣ５０およびヒルスロープの推定値。データは、可変勾配の正規化された用量反応関係に適合した。値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。対応する対照（一元配置分散分析）と比較した、＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、および＊＊＊Ｐ＜０．００１。図１０Ｃ．抗増殖効果は、ウエスタンブロットによって示されるように、ｍｉＲＮＡ標的遺伝子発現の下方制御（ｍｉＲ－３４ａの場合はｃＭＥＴおよびＣＤＫ６、ｍｉＲ－１２４の場合はＳＴＡＴ３、ｐＳＴＡＴ３およびＡＢＣＣ４／ＭＲＰ４）と関連していた。＊Ｐ＜０．０５、スチューデントｔ検定。

【００４１】

【図１１】図１１Ａ．マウスの体重は処置中に着実に増加し、処置群間で差異はなく（Ｐ＞０．０５、二元配置分散分析）、ＢＥＲＡ処置薬がマウスで良好な耐容性であったことを示唆している。図１１Ｂ．異種移植肺の重量は、対照と比較して、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ処置で有意に低く（＊Ｐ＜０．０５、ダネット多重比較検定による一元配置分散分析）、転移性肺異種移植腫瘍の進行制御を示唆している。値は平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝９）。

【００４２】

【図１２】インビボで肺異種移植腫瘍の進行を制御するための生物工学によるｍｉＲＮＡの適用を示す。図１２Ａ．転移性異種移植腫瘍マウスモデル（１群あたりＮ＝９）の肺腫瘍進行の進行に及ぼすｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ、および対照ＲＮＡ処置の影響。該マウスは、Ｄ－ルシフェリンの投与後に生存動物の生物発光画像化によってモニタリングされた。生物発光画像は、Ａ５４９細胞の接種後１０、２０、２５、３２、３９日目に撮影され、同じ曝露時間に正規化された。図１２Ｂ．局所肺異種移植腫瘍は、研究の最後にエクスビボ肺組織のＧＦＰ画像化により評価された。図１２Ｃ．肺腫瘍の代表的なＨ＆Ｅ染色スライド（１００倍）。このようにして、腫瘍面積が、対応する肺面積のパーセンテージとして定量化され、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ処置では対照よりも有意に（Ｐ＜０．０５）低かった。

【００４３】

【図１３】血清ＩＬ－６（図１３Ａ）およびＴＮＦα（図１３Ｂ）レベルの最小限の変化によって示されるように、生物工学によるＲＮＡが免疫適格性ＢＡＬＢ／ｃマウスのサイトカイン放出にわずかな影響を及ぼすことを示す。未処理のマウスおよびリポ多糖（ＬＰＳ）で処理されたマウスを対照として使用し、サイトカインレベルをＥＬＩＳＡによって決定した。ＬＰＳ処置マウスのＩＬ－６およびＴＮＦαレベルは、他のすべての群よりも有意に高い（Ｐ＜０．０１、一元配置分散分析）一方、ＲＮＡ処置群はいずれも未処置マウスと統計的に差異はない。値は平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝４マウス）。

【００４４】

【図１４】生物工学によるｌｅｔ－７ｃが、ｎｃＲＮＡの小さなコレクションの中で、ＨＣＣ細胞増殖に対する最も強力な阻害剤として同定されることを示す。図１４Ａ．ルシフェラーゼ／ＧＦＰを発現するＳｋ－Ｈｅｐ－１およびＨｕｈ７細胞に対する、生物工学によるｎｃＲＮＡ剤（５ｎＭ）のコレクションの抗増殖活性を、発光ＡＴＰアッセイによって調べた。値は、トランスフェクション試薬／ビヒクル対照（０％阻害）に対して正規化された。図１４Ｂ．最上位のｎｃＲＮＡ剤の用量反応曲線をさらに決定し、それらの薬力学的パラメーターを推定した。これは、このｎｃＲＮＡ剤のコレクションにおいてｌｅｔ－７ｃが、ＨＣＣ細胞生存率の最も強力な阻害剤であることを示す。図１４Ｃ．値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。＊Ｐ＜０．０５、ＭＳＡ対照と比較した。

【００４５】

【図１５】単離されたｌｅｔ－７ｃおよび対照ＭＳＡ剤が、９７％超純粋であり、エンドトキシンレベルが３ＥＵ／μｇ　ＲＮＡ未満であり、ＨＰＬＣおよびＰｙｒｏｇｅｎｔ－５０００動態ＬＡＬアッセイによってそれぞれ決定されたことを示す。

【００４６】
【図１６】ＨＣＣ細胞株において、生物工学により作製されたｌｅｔ－７ｃによる標的遺伝子のタンパク質レベルの抑制を示す。（Ａ）ｌｅｔ－７ｃが標的としたＡＲＩＤ３Ｂ、ｃ－ＭＹＣ、ＬＩＮ２８Ｂ、およびＢｃｌ－ｘｌのタンパク質レベルの免疫ブロット分析および（Ｂ）１５ｎＭ　ｌｅｔ－７ｃまたは対照ＭＳＡで処理したＨｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞におけるＨＭＧＡ２の免疫蛍光分析。免疫ブロット強度は、群間の比較のために全タンパク質およびビヒクル対照に正規化された。ビヒクル（ａ）またはＭＳＡ（ｂ）と比較して、Ｐ＜０．０５（ボンフェローニ事後検定よる一元配置分散分析）。ＨＭＧＡ２染色の免疫蛍光強度は、全ＤＡＰＩ陽性細胞に正規化された。＊ＭＳＡ（スチューデントｔ検定）と比較して、Ｐ＜０．０５。
【００４７】
【図１７】アポトーシス細胞死が、生物工学によるｌｅｔ－７ｃによって有意に誘導されることを示す。Ｓｋ－Ｈｅｐ－１およびＨｕｈ７細胞に５ｎＭのＭＳＡまたはｌｅｔ－７ｃを４８時間トランスフェクションし、ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ－ＦＩＴＣで染色し、全１０，０００事象の細胞ゲートを用いてフローサイトメーターにより計数した。初期および後期のアポトーシス細胞への、全集団の有意なシフトが観察されたが、総壊死集団は差異を示さなかった。値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定による一元配置分散分析）。
【００４８】
【図１８】生物工学によるｌｅｔ－７ｃが腫瘍球の増殖を急激に減少させることを示す。付着条件でＭＳＡまたはｌｅｔ－７ｃをトランスフェクションした後、同数のＨｕｈ７細胞を無血清／超低付着条件で７日間増殖させ、原発腫瘍球を産生した。次に、原発腫瘍球を単細胞に消化し、再度トランスフェクションし、無血清／超低付着条件でさらに７日間増殖させて、２次性腫瘍球を産生した。ｌｅｔ－７ｃ処置は、より小さな原発性および２次性腫瘍球をもたらした。値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定による一元配置分散分析）。
【００４９】
【図１９】Ｌｅｔ－７ｃがＬＰＰナノ複合体によってＨＣＣ細胞に効率的に送達され、細胞増殖を制御することを示す。（Ａ）ｌｅｔ－７ｃを充填したリポポリプレックス（ＬＰＰ）の概略図。（Ｂ）ｌｅｔ－７ｃを充填したＬＰＰ（赤矢印で示される）ナノ複合体のＴＥＭ画像、および動的光散乱によって測定されたサイズおよびゼータ電位。バーは５００ｎｍを示す。（ＣおよびＥ）ｌｅｔ－７ｃ（１５ｎＭ）の効率的な送達により、Ｈｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞の増殖が急激に抑制された（ＤおよびＦ）。比較のためにリポフェクタミン３０００（ＬＦ３０００）処理を使用した。値は、３回の処置の平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。＊＊Ｐ＜０．０１および＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニの事後検定を使用した１元配置または２元配置の分散分析）。
【００５０】
【図２０】ＬＰＰ／ＭＳＡナノ複合体の透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）検査を示す。粒径およびゼータ電位は、動的光散乱によって測定された。
【００５１】
【図２１】ＩＰＥＩ／ｌｅｔ－７ｃ製剤と比較した、ＬＰＰ－ｌｅｔ－７ｃナノ複合体の血清安定性を示す。３７℃未満で０、２、６、および２４時間、異なるｌｅｔ－７ｃ製剤を血清中でインキュベーションした後に単離されたｌｅｔ－７ｃの尿素－ＰＡＧＥ分析が示される。
【００５２】
【図２２】生物工学によるＧＦＰ－ｓｉＲＮＡ（５ｎＭ）の送達、およびＧＦＰ／ルシフェラーゼを発現するＳＫ－Ｈｅｐ１細胞における標的ＧＦＰ　ｍＲＮＡレベルの効果的な低下によって実証されるように、ＬＰＰが、標的遺伝子調節のための生物工学によるｎｃ

ＲＮＡの送達に効果的であることが示される。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（ＬＰ３０００）およびインビボ－ｊｅｔＰＥＩ（ＩＰＥＩ）製剤を比較に使用した。ＧＦＰ　ｍＲＮＡレベルは、選択的ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイによって決定された。値は、３回の処置の平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝３）。

【００５３】

【図２３】ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬は、同所性ＨＣＣＨｕｈ７異種移植マウスモデルにおいて腫瘍増殖を大幅に減少させることを示す。（Ａ）ＨＣＣ異種移植マウスモデルの確立および薬物治療のタイムライン。（Ｂ）ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃによる同所性ＨＣＣ進行の抑制は、生存動物のルシフェラーゼ生物発光シグナルの画像化によって実証された。インビボ－ｊｅｔＰＥＩ（ＩＰＥＩ）で製剤化されたｌｅｔ－７ｃおよびＭＳＡを比較に使用した。（Ｃ）ＨＣＣを含む肝臓のエクスビボＧＦＰ蛍光画像は、ｌｅｔ－７ｃの有効性をさらに示し、高レベルの腫瘍性ｌｅｔ－７ｃに関連していた（Ｄ）。（Ｅ）血清ＡＦＰレベルは、ｌｅｔ－７ｃで処理したマウスで有意に減少した。（Ｆ）担がん肝臓組織の代表的なＨ＆Ｅ染色および対応する肝臓切片における腫瘍領域のパーセンテージの定量的測定。青線で囲まれた領域は壊死領域であり、赤線は腫瘍と健康な肝臓（Ｌ）組織を区別するために適用される。値は平均±ＳＤである（各群でＮ＝４～６）。＊Ｐ＜０．０５および＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定を用いる１元配置または２元配置の分散分析）。

【００５４】

【図２４】処置中の動物の体重に差がないこと（Ａ）、ならびに血中尿素窒素（ＢＵＮ、Ｂ）、クレアチニン（Ｃ）、アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ、Ｄ）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（ＡＳＴ、Ｅ）を含む血液化学プロファイルが示すように、同所性ＨＣＣ異種移植マウスにおいて、処置は耐容性が良好であることを示す。興味深いことに、総ビリルビン（Ｆ）レベルは、未処理およびＭＳＡ処理マウスで高かったのに対し、ｌｅｔ－７ｃ処理マウスでは正常範囲内にある。値は平均±ＳＤである（各群でＮ＝４～６）。個々の血液化学バイオマーカーの範囲（ＢＡＬＢ／ｃマウスに由来、カリフォルニア大学デービス校の比較病理学研究所）を参照としてマークした。

【００５５】

【図２５】ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬が、同所性ＨＣＣ異種移植担がんマウスの全生存を有意に改善することを示す。（Ａ）ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃおよび対照ＬＰＰ／ＭＳＡによる処置前のＨＣＣ担がん動物の生物発光画像、および生物発光強度の定量的測定。（Ｂ）生存分析は、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃで処置したマウスが対照よりもはるかに長生きしたことを示した（＊＊Ｐ＜０．０１、Ｎ＝１０／群、ログランク（マンテル－コックス）検定）。生存期間の中央値は、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃで処置したマウスで２６．０日、ＬＰＰ／ＭＳＡで処置された動物で１９．５日であった。（Ｃ）処置中のマウスの体重。▼は、マウスが処置を受けた日を示す。

【００５６】

【図２６】ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃは、ヒトＰＢＭＣ（Ａ）および２系統の免疫適格マウス（ＢおよびＣ）におけるサイトカイン放出への影響が無いかまたは限定的に過ぎないことを示す。ＬＰＳを陽性対照として使用してサイトカイン放出ストームを誘発し、未処理およびＬＰＰビヒクル処理マウスまたは細胞を陰性対照と見なした。値は平均±ＳＤである。Ｂａｌｂ／ｃおよびＣＤ－１マウスの場合、各群に３匹の雌と３匹の雄が含まれていた（Ｎ＝６）。処置の１時間後に血液を採取し、サイトカイン測定のために血清サンプルを調製した。ヒトＰＢＭＣの場合、各処理は３回行い（Ｎ＝３）、処理の２４時間後に細胞培養液を回収した。ｎｄ、不検出。＊＊Ｐ＜０．０１および＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定を用いた２元配置分散分析）。

【００５７】

【図２７】ＭｉＲ－１２９１がＡＲＩＤ３Ｂを標的とし、ヒト膵臓がん細胞での発現を上方制御することを示す。Ａ、コンピュータ分析により、ＡＲＩＤ３ＢｍＲＮＡの３’ＵＴＲ内にｍｉＲ－１２９１の４つの推定ＭＲＥ部位が同定された。下線はｍｉＲ－１２９１の

シード配列である。Ｂ、Ｄｕａｌ　ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅレポーターアッセイは、ＡＲＩＤ３Ｂ　３’ＵＴＲルシフェラーゼ活性が、対照と比較して、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１で処理されたＡｓＰＣ－１細胞で約５０％増加したことを示した。Ｃ、ｑＰＣＲ分析により、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１は、ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞で、成熟ｍｉＲ－１２９１へと選択的にプロセシングされ、その後ＡＲＩＤ３Ｂ　ｍＲＮＡレベルが上方制御されることが明らかになった（Ｄ）。Ｅ、免疫ブロット分析は、ＡＲＩＤ３Ｂタンパク質レベルが、生物工学によるｍｉＲ－１２９１でのトランスフェクション後、ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞で上昇したことを示した。全長ＡＲＩＤ３Ｂ（ＡＲＩＤ３Ｂ－Ｆ１、約６１ｋＤ）および短形態のＡＲＩＤ３Ｂ（ＡＲＩＤ３Ｂ－ｓｈ、約２８ｋＤ）の両方が、ビヒクルおよびＭＳＡ対照と比較して、ＰＡＮＣ－１（トランスフェクションの７２時間後）およびＡｓＰＣ－１（４８時間および７２時間）細胞で上方制御された。ローディング対照としてβ－アクチンを使用した。値は平均±ＳＤ（Ｎ＝３）である。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１、対応する対照（１元配置または２元配置の分散分析）と比較。

【００５８】

【図２８】ルシフェラーゼレポートアッセイは、ＡＲＩＤ３Ｂ３’ＵＴＲに及ぼすｍｉＲ－１２９１の作用を裏付けていることを示す。ＡＲＩＤ３Ｂ　３’ＵＴＲ－ルシフェラーゼ活性は、ｍｉＲ－１２９１発現プラスミド（Ａ）で処理された細胞で有意に増加したが、ｍｉＲ－１２９１アンタゴミル（antagomir）（Ｂ）では減少した。ＰＡＮＣ－１細胞は、ＡＲＩＤ３Ｂ－３’ＵＴＲルシフェラーゼレポータープラスミド（ｐｓｉＣＨＥＣ２－ＡＲＩＤ３Ｂ－３’ＵＴＲ）およびｍｉＲ－１２９１発現プラスミド（ｐＣＭＶ－ｍｉＲ－１２９１）、ｍｉＲ－１２９１アンタゴミルまたはそれらの対応する対照で同時トランスフェクションされた。ルシフェラーゼ活性はトランスフェクションの４８時間後に測定された。値は平均±ＳＤ（Ｎ＝３）である。＊Ｐ＜０．０５、対照と比較（独立スチューデントｔ検定）。

【００５９】

【図２９】ヒト膵臓がん細胞におけるｍｉＲ－１２９１およびゲムシタビンとｎａｂ－パクリタキセル（Ｇｅｍ－ｎＰ）の独立および組合せの作用を示す。Ａ、ゲムシタビン、ｍｉＲ－１２９１、およびパクリタキセルは、特定の標的に作用し、したがって特定の細胞プロセスに干渉する可能性がある。免疫ブロット（ＢおよびＣ）および免疫蛍光（Ｄ、ＥおよびＦ、スケールバー２０μｍ）の研究では、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグとＧｅｍ－ｎＰの併用（コンボ）治療が、ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞で、最大程度のＤＮＡ損傷、有糸分裂、およびアポトーシスを示すことが示され、これは、γＨ２Ａ．Ｘ、Ｈ３ＰＳ１０、および切断カスパーゼ－３／７（Ｃ－カスパーゼ－３／７）によってそれぞれ示された。ローディング対照としてβ－アクチンを使用した。ＰＡＮＣ－１細胞のＣ－カスパーゼ－７画像を図３０に示し、ＡｓＰＣ－１細胞の個々のバイオマーカーを図３１に示す。

【００６０】

【図３０】ＰＡＮＣ－１細胞における別のアポトーシスマーカーである切断カスパーゼ－７の免疫蛍光を示す。対照と比較して、ｍｉＲ－１２９１またはＧｅｍ－ｎＰの単剤処置では、切断カスパーゼ－７レベルが増加し、併用治療（コンボ）はアポトーシスを最大に誘発した。スケールバーは２０μｍを示す。

【００６１】

【図３１】ＡｓＰＣ－１細胞におけるＤＮＡ損傷（γＨ２Ａ．Ｘ、Ａ）、有糸分裂阻害（Ｈ３ＰＳ１０、Ｂ）、およびアポトーシスマーカー（切断型カスパーゼ３／７、Ｃ）に及ぼす個々の薬剤および併用薬剤の効果に関する免疫蛍光研究を示す。ｍｉＲ－１２９１プロドラッグとＧｅｍ－ｎＰの併用処置（コンボ）は、単剤処置またはブランク対照よりも高レベルの切断カスパーゼ３／７およびγＨ２Ａ．Ｘを誘導した。スケールバーは２０μｍを示す

【００６２】

【図３２】生物工学によるｍｉＲ－１２９１プロドラッグがヒト膵臓がん細胞をＧｅｍ－ｎＰに感作することを示す。ＭＳＡ対照と比較して、低用量のＭＳＡ／ｍｉＲ－１２９１は、ＡｓＰＣ－１（Ａ）およびＰＡＮＣ－１（Ｃ）細胞の増殖に最小限の影響しか及ぼさなかったが、Ｇｅｍ－ｎＰに対するＡｓＰＣ－１（Ｂ）およびＰＡＮＣ－１（Ｄ）細胞の感受性を有意に（＊Ｐ＜０．００１、ボンフェローニ事後検定による２元配置分散分析）改善し、これは、推定薬力学パラメーター（Ｅ）によっても示された。ＡｓＰＣ－１およびＰＡＮＣ－１細胞は、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１またはＭＳＡ対照の単独（Ａ、Ｃ）、または種々の濃度のＧｅｍ－ｎＰ（Ｂ、Ｄ、８：１の固定比でＧｅｍ－ｎＰの全濃度が示されている）との組合せで４８時間処理され、細胞生存率をＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏアッセイで測定した。値は平均±ＳＤ（Ｎ＝３）である。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、対応するＭＳＡ対照処理（一元配置分散分析）と比較。

【００６３】

【図３３】ｍｉＲ－１２９１プロドラッグとＧｅｍ－ｎＰとの併用療法がマウスのＰＡＮＣ－１異種移植腫瘍増殖の抑制に最も効果的であり、すべての処置が良好な耐容性であったことを示す。Ａ、ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルの確立および薬物治療のタイムライン。Ｂ、ＰＡＮＣ－１異種移植腫瘍の増殖は、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグとＧｅｍ－ｎＰとの併用療法によって最大程度で減少した。＊Ｐ＜０．０５、＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定を使用した２元配置分散分析）。Ｃ、異なる処置を受けたマウスの解剖腫瘍の視覚的比較。Ｄ、解剖された異種移植腫瘍の重量。＊Ｐ＜０．０５（一元配置分散分析）。Ｅ、体重は薬物処置によって変化しなかった。Ｆ、アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（ＡＳＴ）、クレアチニン、血中尿素窒素（ＢＵＮ）、および総ビリルビンを含む血液生化学プロファイルは、異なる処置によって有意差を示さなかった。値は平均±ＳＤである（血液化学プロファイルのＮ＝３を除いて、１群あたりＮ＝６）。個々のマーカーの範囲（ＢＡＬＢ／ｃマウスに由来、カリフォルニア大学デービス校の比較病理学研究所）を参照としてマークした。

【００６４】

【図３４】臨床ＰＤＡＣ組織由来のＰＤＸマウスモデル（ＰＡ－０３８７）における生物工学によるｍｉＲ－１２９１プロドラッグ単剤療法およびＧｅｍ－ｎＰとの併用療法を示す。Ａ、ＰＤＸ腫瘍の増殖は、ＭＳＡまたは緩衝液対照と比較して、ｍｉＲ－１２９１単剤療法または併用療法によって有意に抑制された。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、および＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定を用いた２元配置分散分析）。Ｂ、異なる処置を受けたマウスの解剖腫瘍の比較。Ｃ、解剖された異種移植腫瘍の重量。＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１（一元配置分散分析）。Ｄ、Ｋｉ－６７または切断カスパーゼ－３抗体で染色されたＰＤＸ腫瘍の代表的なＩＨＣ（１００倍）。併用療法は最高度のアポトーシスを誘導したが（赤矢印：カスパーゼ－３染色）、細胞増殖は異なる処置群間であまり差異はなかった。Ｅ、体重は各処置で差異はなかった。Ｆ、血液生化学プロファイルは、いかなる薬物処置によっても変化しなかった。値は平均±ＳＤである（血液化学プロファイルのＮ＝３を除いて、１群あたりＮ＝５）。各マーカーの範囲は参照としてマークされた。

【００６５】

【図３５】インビボ－ｊｅｔＰＥＩで製剤化されたｍｉＲ－１２９１プロドラッグがマウスモデルのＰＡＮＣ－１異種移植片およびＰＤＸ腫瘍に分布可能であることを示す。担がんマウスは、インビボ－ｊｅｔＰＥＩで製剤化されたｍｉＲ－１２９１プロドラッグ（２５μｇ／マウス）の静脈内単回投与で処置された。２４時間後、腫瘍および肝臓組織を採取し、全ＲＮＡを単離した。ｍｉＲ－１２９１のレベルは、ＴａｑＭａｎステムループＲＴ－ｑＰＣＲアッセイで決定され、これは、ＭＳＡ対照と比較して、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１で処理されたＰＡＮＣ－１異種移植片（Ａ）およびＰＤＸ（Ｂ）マウスから単離された肝臓および腫瘍ではるかに高かった（ＰＡＮＣ－１異種移植モデルでは１群あたりＮ＝２マウス、ＰＤＸモデルでは１群あたりＮ＝３マウス）。

【００６６】

【図３６】ＰＤＸ－ＰＡ－０３８７腫瘍の代表的なＨ＆Ｅ画像を示す。異なる処置群（１００倍）間で生存腫瘍の形態に顕著な差異はない。
【００６７】
【図３７】ｍｉＲ－１２９１プロドラッグとＧｅｍ－ｎＰとの併用療法は、患者のＰＤＡＣ組織で確立された他の２つのＰＤＸマウスモデルで腫瘍増殖の制御に最も効果的であることが証明されている（ＰＡ－０３７５：Ａ、Ｂ、およびＣ、ＰＡ－０３２７：Ｄ、Ｅ、およびＦ）。ＡおよびＤ、ＰＤＸ腫瘍の増殖は、ＭＳＡまたは緩衝液対照と比較して、ｍｉＲ－１２９１単剤療法または併用療法によって有意に抑制された。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、および＊＊＊Ｐ＜０．００１（ボンフェローニ事後検定を用いた２元配置分散分析）。ＢおよびＥ、異なる処置を受けたマウスの解剖腫瘍の比較。ＣおよびＦ、解剖された異種移植腫瘍の重量。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１（一元配置分散分析）。値は、平均±ＳＤである（１群あたりＮ＝５）。ＰＡ－０３２７はより侵襲性であったため、このＰＤＸモデルでは、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグの用量を単剤療法と併用療法の両方で２０μｇ／マウスに増やした。これにより、驚くべきことに、最適な結果が得られた。
【００６８】
【図３８】ＰＤＸマウスモデルでは、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグの単剤療法と併用療法が耐容性であることを示す。マウスの体重は、異なる処置間で差異を示さなかった。
【００６９】
【図３９】新規コンビナトリアル生物工学によるＲＮＡ剤（ＣＯ－ＢＥＲＡ）はＥ．ｃｏｌｉで高発現する。ａ）各インサート（挿入物）の前に２つの最適化されたプレｍｉＲ－３４ａ配列を含むよう設計されたＣＯ－ＢＥＲＡ（長さ約２９７ヌクレオチド）の図。１つのプレｍｉＲ－３４ａのみを含むＢＥＲＡ（長さ約１８０ヌクレオチド）とは異なる。各インサートには、標的配列および相補配列が含まれていた。ｂ）個々のＣＯ－ＢＥＲＡをコードするプラスミドで形質転換されたＥ．ｃｏｌｉ　ＨＳＴ０８細胞から抽出された全ＲＮＡの変性尿素ＰＡＧＥ分析。参照用のラダーおよび野生型（ＷＴ）ＨＳＴ０８細胞。各標的ＣＯ－ＢＥＲＡの過剰発現の成功は、ＷＴ細胞と比較して、形質転換されたＨＳＴ０８細胞で新しい強いバンドが出現することによって示される。
【００７０】
【図４０】ＣＯ－ＢＥＲＡのＦＰＬＣ精製。ａ）ＣＯ－ＢＥＲＡは、陰イオン交換ＥｎｒｉｃｈＱカラムで全細菌ＲＮＡから分離された。再精製が必要ないくつかのＣＯ－ＢＥＲＡは、ｂ）再度、Ｅｎｒｉｃｈ　Ｑ、ｃ）ＤＥＡＥ、またはｄ）ＣＨＴＩＩ型のいずれかを使用することにより、さらにＦＰＬＣ分離に進んだ。代表的なＦＰＬＣトレースが示される。
【００７１】
【図４１】ＦＰＬＣで単離されたＣＯ－ＢＥＲＡの純度の検証。ａ）ＰＡＧＥ分析では、単離されたＣＯ－ＢＥＲＡの大部分が非常に純粋であり、不純物がない、または最小限であることが示された。Ｂ）ＨＰＬＣ分析により、個々のＣＯ－ＢＥＲＡの純度が定量的に決定され、その中で、ほとんどのＣＯ－ＢＥＲＡは約９９％の純度であり、１つのＣＯ－ＢＥＲＡのみが９５％未満の純度である（詳細は表ｘｘｘを参照）。
【００７２】
【図４２】種々のヒトＮＳＣＬＣ細胞株に対するＣＯ－ＢＥＲＡの抗増殖活性。５つの異なるＮＳＣＬＣ細胞株（ａ～ｅ）の細胞生存率は、リポフェクタミン３０００のみ（ビヒクル）、ロイシン（ＬＳＡ）、またはセリン（ＳＳＡ）ｔＲＮＡ対照と比較して、１５ｎＭの精製ＣＯ－ＢＥＲＡによって種々の程度に低下した。データはビヒクル対照に正規化された。値は平均±ＳＤ（Ｎ＝３）である。＊Ｐ＜０．０５、ビヒクル、ＬＳＡ、およびＳＳＡ対照と比較（ボンフェローニ事後検定を用いる一元配置分散分析）。
【００７３】
【図４３】リポポリプレックス（ＬＰＰ）またはｎｃＲＮＡをロードしたリポフェクタミン３０００でトランスフェクションされたＡ５４９細胞のＡＴＰ発光アッセイによって測

定された細胞増殖を示す。
【００７４】
【図４４】肺腫瘍負荷のあるマウスの治療を示す。ルシフェラーゼを発現するＡ４５９細胞を尾静脈からマウスに接種し、週に１回Ｄ－ルシフェリンで画像化し、シグナルが見える場合に治療を開始した。マウスは、尾静脈において、３０ｎｇのｎｃＲＮＡを充填したＬＰＰを用いて、週に３回、３週間治療された。第３週後、治療は中止された。
【発明を実施するための形態】
【００７５】
１．序文
生細胞で産生された非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）は、研究および治療のために細胞内ｎｃＲＮＡをより良く反映し得る。生体ｎｃＲＮＡを産生する試みがなされたが、低い収率または成功率であった。ここでは、最初に、合理的な設計および実験的検証によって同定されたプレｍｉＲ－３４ａ誘導体を含むより安定なｎｃＲＮＡ担体（ｎＣＡＲ）を使用する新規なｎｃＲＮＡ生物工学技術を報告する。このアプローチは、細菌において組換えｎｃＲＮＡの並外れて高レベルの発現（全ＲＮＡの４０～８０％）を示し、８０％の成功率（４２のｎｃＲＮＡのうち３３）をもたらした。新規のＦＰＬＣおよびスピンカラムに基づく方法も、それぞれ０．５リットルおよび数ミリリットルの細菌培養物からミリグラムおよびマイクログラムの組換えｎｃＲＮＡを大量および少量に精製するために開発された。次に、２つの生物工学によるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡを使用して、ヒト細胞への標的ｍｉＲＮＡの選択的放出（ダイサー依存性（ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ）または非依存性（ｍｉＲ－１２４ａ－３ｐ）であることが明らかになった）、ならびにその後のｍｉＲＮｏｍｅおよびトランスクリプトームのプロファイルの変化を実証した。改変されたトランスクリプトームのｍｉＲＮＡエンリッチメント解析により、標的遺伝子調節におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡの特異性が確認された。さらに、ｎＣＡＲで組み立てられたｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐは、標的遺伝子発現の調節を通じてヒト肺がん細胞の増殖を抑制するのに活性であった（例えば、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐの場合はｃＭＥＴおよびＣＤＫ６、ｍｉＲ－１２４－３ｐの場合はＳＴＡＴ３およびＡＢＣＣ４）。さらに、生物工学によるｍｉＲＮＡ分子は、生きた動物および生体外肺組織の生物発光イメージング、および組織病理学的検査によって実証されるように、転移性肺異種移植の進行を制御するのに効果的であった。この新規なｎｃＲＮＡ生体工学プラットフォームは、種々のｎｃＲＮＡ分子を産生するために容易に適応させることができ、生物製剤ｎｃＲＮＡは新規のがん治療薬として有望である。
【００７６】
２．ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子
一般に、当該ポリヌクレオチドは、１つ以上のプレマイクロＲＮＡ、例えば、第１のプレｍｉＲＮＡおよび第２のプレｍｉＲＮＡに作動可能に連結されたｔＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ｔＲＮＡのアンチコドンが、プレマイクロＲＮＡ分子で置き換えられる。例えば、いくつかの実施形態では、第１および／または第２のプレマイクロＲＮＡの３’末端および５’末端が、アンチコドンが除去された場合に作成されるｔＲＮＡの３’末端および５’末端に連結または融合される。ｔＲＮＡ分子ならびに第１および／または第２のプレマイクロＲＮＡ分子は、作動可能に連結されるために、互いに直接連結または融合され得るが、そうである必要はない。いくつかの実施形態において、第１および／または第２のプレマイクロＲＮＡは、１つ以上のダイサー切断可能部位を含み、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡポリヌクレオチドから発現することが望まれる挿入ＲＮＡ分子の高レベルの発現および効率的な切断を可能にする。
【００７７】
構造的に、いくつかの実施形態では、ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレマイクロＲＮＡ分子は、５’から３’方向に、（ｉ）ｔＲＮＡの５’部分、（ｉｉ）第１の挿入ＲＮＡ（例えば、成熟ｍｉＲＮＡ）を含む第１のプレｍｉＲＮＡの５’部分、（ｉｉｉ）第２の挿入ＲＮＡ（例えば、成熟ｍｉＲＮＡ）を含む第２のプレｍｉＲＮＡの５’部分、（ｉｖ）ヘア

ピン（例えば、第２のプレｍｉＲＮＡの一部であり得る）、（ｖ）第２の挿入ＲＮＡ（例えば、ガイドｍｉＲＮＡ）に対して実質的に相補的な配列を含む第２のプレｍｉＲＮＡの３’部分、（ｖｉ）第２の挿入ＲＮＡ（例えば、成熟ｍｉＲＮＡ）に対して実質的に相補的な配列を含む第１のプレｍｉＲＮＡの３’部分、および（ｖｉｉ）ｔＲＮＡの３’部分を含む。

【００７８】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９６に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－ＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［$N^1$１８－２００］ＵＧＵＧＡＧＣＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［$N^3$１８－２００］ＵＧＵＧＡＧＣＡＡＵＡＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［$N^4$１８－２００］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧＣＣＣＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［$N^2$１８－２００］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧＣＣＣ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９６）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、ここで、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものであり（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）、Ｎ３およびＮ４は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００７９】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９７に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［$N^1$１８－２００］ＵＧＵＧＡＧＣＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［$N^3$１８－２００］ＵＧＵＧＡＧＣＡＡＵＡＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［$N^4$１８－２００］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧＣＣＣＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［$N^2$１８－２００］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧＣＣＣ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９７）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、ここで、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものであり（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）、Ｎ３およびＮ４は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８０】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９８に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－ＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［$N^1$１８－２００］ＵＧＵＧＡＧＣ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［$N^3$１８－２００］ＵＧＵＧＡＧＣＡＡＵＡＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［$N^4$１８－２００］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧ

ＣＣＣ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［Ｎ^{2}$_{18-200}$］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧＣＣＣ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９８）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、ここで、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものであり（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）、Ｎ３およびＮ４は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８１】

ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレマイクロＲＮＡ分子に関して、いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、天然に存在する任意のアミノ酸残基のためのアンチコドンをコードするヒトｔＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡをコードするＲＮＡは、表８に示されるように、配列番号３００～３５５、例えば、３００／３０１、３０２／３０３、３０４／３０５、３０６／３０７、３０８／３０９、３１０／３１１、３１２／３１３、３１４／３１５、３１６／３１７、３１８／３１９、３２０／３２１、３２２／３２３、３２４／３２５、３２６／３２、３２８／３２９、３３０／３３１、３３２／３３３、３３４／３３５、３３６／３３７、３３８／３３９、３４０／３４１、３４２／３４３、３４４／３４５、３４６／３４７、３４８／３４９、３５０／３５１、３５２／３５３、３５４／３５５に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する５’ｔＲＮＡ配列および３’ｔＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、第１および第２のプレｍｉＲＮＡは、同じプレｍｉＲＮＡ（例えば、プレｍｉＲＮＡ　３４ａ）に由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２のプレｍｉＲＮＡは、異なるプレｍｉＲＮＡに由来する。いくつかの実施形態では、第１および第２の挿入ＲＮＡは同じである（例えば、同じ成熟ｍｉＲＮＡ）。いくつかの実施形態では、第１および第２の挿入ＲＮＡは異なる（例えば、異なる成熟ｍｉＲＮＡ）。ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレマイクロＲＮＡ分子は、任意で１つ以上のアプタマー配列を含み、それは例えば、要素（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、（ｉｖ）、（ｖ）、（ｖｉ）および／または（ｖｉｉ）の１つ以上の５’末端およびまたは３’末端に挿入される。いくつかの実施形態において、１つ以上の任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡは、ａ）プレｍｉＲＮＡの５’末端、（ｂ）プレｍｉＲＮＡの３’末端、（ｃ）プレｍｉＲＮＡのダイサー切断部位もしくはＲＮａｓｅ切断部位の５’、または（ｄ）プレｍｉＲＮＡのダイサー切断部位もしくはＲＮａｓｅ切断部位の３’、に挿入されるか、近接するか、または作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡ／デュアルプレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチドは、長さが約２７５個のヌクレオチド以上、例えば、約２８０個のヌクレオチド以上、例えば、約２９０個のヌクレオチド以上であり、最大約４００個のヌクレオチドである。

【００８２】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２８９に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＧＧＣＣＡＧＣＵＧＵＧＡＧＵＧＵＵＵＣＵＵ［Ｎ^{1}$_{18-200}$］ＵＧＵＧＡＧＣＡＡＵＡＧＵＡＡＧＧＡＡＧ［Ｎ^{2}$_{18-200}$］ＡＧＡＡＧＵＧＣＵＧＣＡＣＧＵＵＧＵＵＧＧＣＣＣ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２８９）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２

％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８３】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９０に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＧＧＵＡＧＡＡＵＵＣＣＡＧ［Ｎ^{1}１８－２００］ＵＧＵＡＣＵＧＵＧ［Ｎ^{2}１８－２００］ＡＡＡＧＧＡＣＵＧＵＣＵＵＣＣＵＧ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９０）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８４】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９１に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＣＣＡＧＣＵＣＧＧＧＣＡＧＣＣＧＵＧＧＣ［Ｎ^{1}１８－２００］ＵＧＧＡＧＵＣＡＧＧＵＣＵＣ［Ｎ^{2}１８－２００］ＵＧＡＣＧＧＣＧＧＡＧＣＣＣＵＧＣＡＣＧ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９１）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８５】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９２に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＡＣＡＡＵＧＣＵＵＵＧＣＵＡＧ［Ｎ^{1}１８－２００］ＣＧＣＣＵＣＵＵＣＡＡＵＧＧＡ［Ｎ^{2}１８－２００］ＵＡＧＣＵＡＵＧＣＡＵＵＧＡ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９２）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８６】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９３に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＵＧＣＣＡＧＵＣＵＣＵＡＧＧ［Ｎ^{1}１８－２００］ＧＧＡＣＡＵＣＣＡＧＧＧＵＣ［Ｎ^{2}１８－２００］ＵＧＧＣＧＵＣＵＧＧＣＣ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ

）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９３）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８７】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９４に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＧＣＡＵＣＣＧＧＧＵ［Ｎ^{1}１８－２００］ＵＡＧＡＧＵＵＡＣＡＣＣＣＵＧＧＧＡＧＵＵＡＡ［Ｎ^{2}１８－２００］ＵＵＧＧＡＧＣ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９４）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８８】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、配列番号２９５に対して、例えば、５’から３’方向において、５’－第１あるいは５’ｔＲＮＡ部分－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－ＡＧＧＣＣＵＣＵＣＵＣＵＣ［Ｎ^{1}１８－２００］ＵＵＡＡＡＵＧＵＣＣＡＵＡＣＡＡＵ［Ｎ^{2}１８－２００］ＡＡＧＡＡＵＧＧＧＧＣＵＧ－任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡ－第２あるいは３’ｔＲＮＡ部分－３’（配列番号２９５）に対して、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含み、Ｎ１およびＮ２は、実質的に相補的であり（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％相補的）、実質的に等しい長さのものである（例えば、等しい長さ、または長さが異なる場合は３個のヌクレオチド塩基以内）。

【００８９】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、任意で１つ以上のアプタマー配列を含み、それは例えば、要素（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、（ｉｖ）、（ｖ）、（ｖｉ）および／または（ｖｉｉ）の１つ以上の５’末端およびまたは３’末端に挿入される。いくつかの実施形態において、１つ以上の任意のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡは、ａ）プレｍｉＲＮＡの５’末端、（ｂ）プレｍｉＲＮＡの３’末端、（ｃ）プレｍｉＲＮＡのダイサーまたはＲＮａｓｅ切断部位の５’、または（ｄ）プレｍｉＲＮＡのダイサーまたはＲＮａｓｅ切断部位の３’、に挿入されるか、近接するか、または作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子をコードするポリヌクレオチドは、長さが約１５０個のヌクレオチド以上、例えば、約１７５個のヌクレオチド以上、例えば、約１８０個のヌクレオチド以上であり、最大約２００個のヌクレオチドである。

【００９０】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、標準的な組換え法により産生することができ、または合成的に調製することができる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、例えば、ヌクレオチド間結合、ヌクレオシド間結合、ジデオキシリボヌクレオチド、２’－糖修飾、２’－アミノ基、２’－フルオロ基、２’－メトキシ基、２’－ア

ルコキシ基、２’－アルキル基、２’－デオキシリボヌクレオチド、２’－０－メチルリボヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－フルオロリボヌクレオチド、ユニバーサルベースヌクレオチド、非環式ヌクレオチド、５－Ｃ－メチルヌクレオチド、ビオチン基、末端グリセリル取り込み、逆デオキシ脱塩基残基取り込み、立体障害分子、３’－デオキシアデノシン（コルジセピン）、３’－アジド－３’－デオキシチミジン（ＡＺＴ）、２’、３’－ジデオキシイノシン（ｄｄｌ）、２’、３’－ジデオキシ－３’－チアシチジン（３ＴＣ）、２’、３’－ジデヒドロ－２’、３’－ジデオキシチミジン（ｄ４Ｔ）、３’－アジド－３’－デオキシチミジン（ＡＺＴ）のモノホスフェートヌクレオチド修飾（ＭＮＭ）、ＭＮＭ－２’、３’－ジデオキシ－３’－チアシチジン（３ＴＣ）、ＭＮＭ－２’、３’－ジデヒドロ－２’、３’－ジデオキシチミジン（ｄ４Ｔ）、キャッピング部分、Ｌ－ヌクレオチドロック核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチド、２’－メトキシエトキシ（ＭＯＥ）ヌクレオチド、２’－メチル－チオ－エチル、２’－デオキシ－２’－フルオロヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－クロロヌクレオチド、２’－アジドヌクレオチド、２’－０－メチル、コレステロール基、２’－０－メチル基、ホスホロチオエート基、２’－フルオロ基、２’－Ｏ－メチオキシエチル基、ボラノホスフェート基、４’－チオリボース基、胆汁酸、脂質、および２’－酸素と４’－炭素を結合する架橋を含むが、これらに限定されない１つ以上の化学修飾を有し得る。

【００９１】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、類似体リボヌクレオチド塩基を含む。本明細書で使用される場合、「類似体」という用語は、そのリボヌクレオチドが産生されるところの細胞のｔＲＮＡ転写後修飾酵素の活性に由来する、リボヌクレオチドの可能な誘導体を定義する。ｔＲＮＡに見出され得るリボヌクレオチドＡ、Ｃ、ＧおよびＵの類似体は、そのｔＲＮＡが産生される細胞、およびｔＲＮＡにおける問題のリボヌクレオチドの位置に依存する。多数の類似体が、Ｓｐｒｉｎｚｌ ｅｔ ａｌ．（１９９８）“Ｃｏｍｐｉｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｔＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ａｎｄ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｔＲＮＡ ｇｅｎｅｓ”Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２６，１４８－１５３に記載されており、「ＲＮＡ修飾データベース」データ（ｍｅｄｓｔａｔ．ｍｅｄ．ｕｔａｈ．ｅｄｕ／ＲＮＡｍｏｄｓ／）に基づく。Ａの類似体は、より具体的には、１－メチル－Ａ、イノシンおよび２’－Ｏ－メチル－Ａによって構成される群から選択され得る。Ｃの類似体は、より具体的には、５－メチル－Ｃおよび２’－Ｏ－メチル－Ｃによって構成される群から選択され得る。Ｇの類似体は、より具体的には、７－メチル－Ｇおよび２’－Ｏ－メチル－Ｇによって構成される群から選択され得る。Ｕの類似体は、より具体的には、シュードウリシン、リボチミジン、２’－Ｏ－メチル－リボチミジン、ジヒドロウリシン、４－チオウリシンおよび３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）－ウリシンによって構成される群から選択され得る。

【００９２】

ａ．ｔＲＮＡ

ｔＲＮＡの一般的な特徴は、当業者に周知である。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、特徴的な、いわゆるクローバー葉二次構造を採るために折り畳むことができる単一のリボヌクレオチド鎖から形成される。この特徴的な二次構造は、以下のものを含む。

（ｉ）リボヌクレオチド鎖の５’末端の最初の７個のリボヌクレオチドと、リボヌクレオチド鎖の３’末端の最後の４個のリボヌクレオチドに先行する７個のリボヌクレオチドとから構成される、アクセプターステムであって、そのようにして６または７対のリボヌクレオチドを含む二本鎖構造を形成し、リボヌクレオチド鎖の５’末端の最初のリボヌクレオチドと、リボヌクレオチド鎖の３’末端の最後の４個のリボヌクレオチドに先行するリボヌクレオチドとによって構成されるリボヌクレオチドが対合しない可能性がある、アクセプターステム、

（ｉｉ）リボヌクレオチド鎖の５’末端の最初の７個のリボヌクレオチドに続くリボヌクレオチド鎖の一部の折り畳みによって形成される、４対のリボヌクレオチドで構成されるＤアームおよび８～１０個のリボヌクレオチドで構成されるＤループ、

（ｉｉｉ）リボヌクレオチド鎖のＤアームおよびＤループに続く一部の折り畳みによっ

て形成される、５対のリボヌクレオチドで構成されるアンチコドンのステムおよび７個のリボヌクレオチドで構成されるアンチコドンのループ（アンチコドンのステムループ）、
（ｉｖ）４～２１個のリボヌクレオチドで構成され、リボヌクレオチド鎖のアンチコドンのステムとアンチコドンのループとに続く一部によって形成される、可変ループ、
（ｖ）リボヌクレオチド鎖の可変ループに続き、かつ、アクセプターステムの構成に関与する３’末端のリボヌクレオチドに先行する部分の折り畳みによって形成される、５対のリボヌクレオチドで構成されるＴアームおよび８個のリボヌクレオチドで構成されるＴループ。

【００９３】

いくつかの実施形態において、上記で定義されたキメラｔＲＮＡは、それが由来するｔＲＮＡのアンチコドンの実質的にインタクトなステムを含まない。例えば、キメラｔＲＮＡでは、改変前のｔＲＮＡのアンチコドンのステムループに先行するリボヌクレオチドと、改変前のｔＲＮＡのアンチコドンのステムループに続くリボヌクレオチドとの間で、改変前のｔＲＮＡのアンチコドンステムはもはや存在しない。

【００９４】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡポリヌクレオチドは、例えば任意のアミノ酸をコードすることについて当技術分野で知られている任意のｔＲＮＡを含むことができる。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸をコードするかまたはそれに由来するｔＲＮＡである。適切なｔＲＮＡ分子の選択は、挿入ＲＮＡの発現に使用される宿主細胞によって部分的に促進され得る。例えば、所望の挿入ＲＮＡ分子の高発現レベルを産生しようとする場合、選択されるｔＲＮＡは、宿主細胞の種におけるレアコドンからではなく、宿主細胞の種によって優先されるコドンをコードするｔＲＮＡからのものであり得る。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、発現に使用される宿主細胞に由来する。いくつかの実施形態では、ｔＲＮＡは細菌ｔＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、哺乳動物ｔＲＮＡである。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡは、ヒトｔＲＮＡである。

【００９５】

一般に、本明細書に記載のハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡハイブリッド分子では、ｔＲＮＡは５’部分と３’部分に分割される。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡをコードするＲＮＡは、表８に示されるように、配列番号３００～３５５、例えば、３００／３０１、３０２／３０３、３０４／３０５、３０６／３０７、３０８／３０９、３１０／３１１、３１２／３１３、３１４／３１５、３１６／３１７、３１８／３１９、３２０／３２１、３２２／３２３、３２４／３２５、３２６／３２、３２８／３２９、３３０／３３１、３３２／３３３、３３４／３３５、３３６／３３７、３３８／３３９、３４０／３４１、３４２／３４３、３４４／３４５、３４６／３４７、３４８／３４９、３５０／３５１、３５２／３５３、３５４／３５５に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する５’ｔＲＮＡ配列および３’ｔＲＮＡ配列を含む。

【００９６】

ｂ．プレｍｉＲＮＡ

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡポリヌクレオチドは、当技術分野で知られている任意のプレマイクロＲＮＡ分子（複数可）を含むことができ、天然に存在するまたは人工的に誘導される供給源から得ることができる。いくつかの実施形態において、１つ以上のプレマイクロＲＮＡ分子は、哺乳動物のプレマイクロＲＮＡ分子に由来する。いくつかの実施形態において、１つ以上のプレマイクロＲＮＡ分子は、ヒトプレマイクロＲＮＡ分子に由来する。２つ以上のプレｍｉＲＮＡ分子を有する分子では、プレｍｉＲＮＡは同じでも異なっていてもよい。いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プ

レマイクロＲＮＡポリヌクレオチドのプレマイクロＲＮＡ要素は、長さが約８０個のヌクレオチド～約１２０個のヌクレオチド、例えば、長さが約８０個のヌクレオチド～約１００個のヌクレオチド、例えば、約８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５または１２０個のヌクレオチドの長さである。

【００９７】

いくつかの実施形態において、２つ以上のプレｍｉＲＮＡ、例えば、第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡは、プレｍｉＲ－３４ａ、プレｍｉＲ－１２４、プレｍｉＲ－１２９１、プレｍｉＲ－２００ｂ、プレｍｉＲ－２００ａ、プレｍｉＲ－１４１、プレｍｉＲ－４２９、プレｍｉＲ－１３３ａ、プレｌｅｔ－７ｃ、プレｍｉＲ－１２５ａ、プレｍｉＲ－３２８、プレｍｉＲ－１２６、プレｍｉＲ－２９８、プレｍｉＲ－１４８、プレｍｉＲ－１４４、プレｍｉＲ－１、プレｍｉＲ－１３３、プレｍｉＲ－８８８、プレｍｉＲ－６７７５、プレｍｉＲ－３７４、プレｍｉＲ－９２、プレｍｉＲ－１１８０、プレｍｉＲ－２１８、プレｍｉＲ－７、プレｍｉＲ－３７８、プレｍｉＲ－１７、プレｍｉＲ－１８ａ、プレｍｉＲ－２２、プレｍｉＲ－１２２、プレｍｉＲ－３０ｂ、プレｍｉＲ－４４９、プレｍｉＲ－５０６、プレｍｉＲ－９８、プレｍｉＲ－４４５８、プレｍｉＲ－２０６、プレｍｉＲ－５１９、プレｍｉＲ－９３、プレｍｉＲ－１０６、プレｍｉＲ－３７３、およびプレｍｉＲ－５２０からなる群から選択される。

【００９８】

いくつかの実施形態では、２つ以上のプレｍｉＲＮＡ、例えば、第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡは、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｃ（ＭＩ０００００６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１－１（ＭＩ０００００６５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１－２（ＭＩ０００００４３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７－１（ＭＩ０００００２６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７－２（ＭＩ０００００２６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７－３（ＭＩ０００００２６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１７（ＭＩ０００００７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８ａ（ＭＩ０００００７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８ｂ（ＭＩ０００１５１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２（ＭＩ０００００７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ｂ（ＭＩ０００００４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４ａ（ＭＩ０００００２６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２ａ－１（ＭＩ０００００９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２ａ－２（ＭＩ０００００９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２ｂ（ＭＩ０００３５６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３（ＭＩ０００００９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９８（ＭＩ０００００１００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０６ａ（ＭＩ０００００１１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０６ｂ（ＭＩ０００００７３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２（ＭＩ０００００４４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－１（ＭＩ０００００４４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－２（ＭＩ０００００４４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－３（ＭＩ０００００４４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５ａ（ＭＩ０００００４６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６（ＭＩ０００００４７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ａ－１（ＭＩ０００００４５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ａ－２（ＭＩ０００００４５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４１（ＭＩ０００００４５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４４（ＭＩ０００００４６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４８ａ（ＭＩ０００００２５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４８ｂ（ＭＩ０００００８１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ａ（ＭＩ０００００７３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ｂ（ＭＩ０００００３４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ｃ（ＭＩ０００００６５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０６（ＭＩ０００００４９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１８－１（ＭＩ０００００２９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１８－２（ＭＩ０００００２９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９８（ＭＩ０００５５２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２８（ＭＩ０００００８０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７３（ＭＩ０００００７８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７４ａ（ＭＩ０００００７８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７４ｂ（ＭＩ０００５５６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７４ｃ（ＭＩ００１６６８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ａ（ＭＩ０００００７８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｂ（ＭＩ００１４１５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｃ（ＭＩ００１５８２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｄ－１（ＭＩ００１６７４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｄ－２（ＭＩ０００３８４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｅ（ＭＩ００１６７５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｆ（ＭＩ００１６７５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｇ（ＭＩ００１６７６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｈ（ＭＩ００１

６８０８　８０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｉ（ＭＩ００１６９０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｊ（ＭＩ００２１２７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９ａ（ＭＩ０００１６４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９ｂ（ＭＩ０００３６７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９ｃ（ＭＩ０００３８２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０６（ＭＩ０００３１９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ａ－１（ＭＩ０００３１７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ａ－２（ＭＩ０００３１８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｂ（ＭＩ０００３１５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｃ（ＭＩ０００３１４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｄ（ＭＩ０００３１６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｅ（ＭＩ０００３１４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ａ（ＭＩ０００３１４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｂ（ＭＩ０００３１５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｃ（ＭＩ０００３１５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｄ（ＭＩ０００３１６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｅ（ＭＩ０００３１４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｆ（ＭＩ０００３１４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｇ（ＭＩ０００３１６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｈ（ＭＩ０００３１７５）、ｈｓａ－ｍｉ　ｒ－８８８（ＭＩ０００５５３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８０（ＭＩ０００６２７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９１（ＭＩ０００６３５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４５８（ＭＩ００１６８０４）、およびｈｓａ－ｍｉｒ－６７７５（ＭＩ００２２６２０）からなる群から選択される。

【００９９】

いくつかの実施形態では、２つ以上のプレｍｉＲＮＡ、例えば、第１および／または第２のプレｍｉＲＮＡは、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｃ（ＭＩ０００００６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４ａ（ＭＩ０００００２６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－１（ＭＩ０００００４４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－２（ＭＩ０００００４４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－３（ＭＩ０００００４４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５ａ（ＭＩ０００００４６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ａ－１（ＭＩ０００００４５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ａ－２（ＭＩ０００００４５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ａ（ＭＩ０００００７３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ｂ（ＭＩ０００００３４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ｃ（ＭＩ０００００６５０）、およびｈｓａ－ｍｉｒ－１２９１（ＭＩ０００６３５３）からなる群から選択される。

【０１００】

いくつかの実施形態において、プレマイクロＲＮＡは、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－１（ｍｉＲＢａｓｅ．ｏｒｇアクセッション番号：ＭＩ０００００６０）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－２（ＭＩ０００００６１）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ－３（ＭＩ０００００６２）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｂ（ＭＩ０００００６３）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｃ（ＭＩ０００００６４）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｄ（ＭＩ０００００６５）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｅ（ＭＩ０００００６６）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－１（ＭＩ０００００６７）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ－２（ＭＩ０００００６８）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｇ（ＭＩ０００００４３３）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｉ（ＭＩ０００００４３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１－１（ＭＩ０００００６５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１－２（ＭＩ０００００４３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７－１（ＭＩ０００００２６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７－２（ＭＩ０００００２６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７－３（ＭＩ０００００２６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９－１（ＭＩ０００００４６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９－２（ＭＩ０００００４６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９－３（ＭＩ０００００４６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０ａ（ＭＩ０００００２６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０ｂ（ＭＩ０００００２６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５ａ（ＭＩ０００００６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５ｂ（ＭＩ０００００４３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１６－１（ＭＩ０００００７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１６－２（ＭＩ０００００１１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１７（ＭＩ０００００７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８ａ（ＭＩ０００００７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８ｂ（ＭＩ０００１５１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９ａ（ＭＩ０００００７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９ｂ－１（ＭＩ０００００７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９ｂ－２（ＭＩ０００００７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０ａ（ＭＩ０００００７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０ｂ（ＭＩ０００１５１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１（ＭＩ０００００７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２（ＭＩ０００００７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２３ａ（ＭＩ０００００７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２３ｂ（ＭＩ０００００４３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２３ｃ（ＭＩ００１６０１

0）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２４－１（ＭＩ００００８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２４－２（ＭＩ００００８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２５（ＭＩ００００８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２６ａ－１（ＭＩ００００８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２６ａ－２（ＭＩ０００７５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２６ｂ（ＭＩ００００８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２７ａ（ＭＩ００００８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２７ｂ（ＭＩ０００４４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２８（ＭＩ００００８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９ａ（ＭＩ００００８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９ｂ－１（ＭＩ０００１０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９ｂ－２（ＭＩ０００１０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９ｃ（ＭＩ０００７３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ａ（ＭＩ００００８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ｂ（ＭＩ０００４４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ｃ－１（ＭＩ０００７３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ｃ－２（ＭＩ０００２５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ｄ（ＭＩ０００２５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０ｅ（ＭＩ０００７４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１（ＭＩ００００８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２（ＭＩ００００９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３ａ（ＭＩ００００９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３ｂ（ＭＩ０００３６４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４ａ（ＭＩ０００２６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４ｂ（ＭＩ０００７４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４ｃ（ＭＩ０００７４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２ａ－１（ＭＩ００００９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２ａ－２（ＭＩ００００９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２ｂ（ＭＩ０００３５６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３（ＭＩ００００９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９５（ＭＩ０００００９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９６（ＭＩ００００９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９８（ＭＩ０００１００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９９ａ（ＭＩ０００１０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９９ｂ（ＭＩ０００７４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１００（ＭＩ０００１０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０１－１（ＭＩ０００１０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０１－２（ＭＩ０００７３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０３ａ－１（ＭＩ０００１０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０３ａ－２（ＭＩ０００１０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０３ｂ－１（ＭＩ０００７２６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０３ｂ－２（ＭＩ０００７２６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０５－１（ＭＩ０００１１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０５－２（ＭＩ０００１１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０６ａ（ＭＩ０００１１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０６ｂ（ＭＩ０００７３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１０７（ＭＩ０００１１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２（ＭＩ０００４４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－１（ＭＩ０００４４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－２（ＭＩ０００４４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－３（ＭＩ０００４４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５ａ（ＭＩ０００４６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５ｂ－１（ＭＩ０００４４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５ｂ－２（ＭＩ０００４７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６（ＭＩ０００４７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７（ＭＩ０００４７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８－１（ＭＩ０００４４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８－２（ＭＩ０００７２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９－１（ＭＩ０００２５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９－２（ＭＩ０００４７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０ａ（ＭＩ０００４４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０ｂ（ＭＩ０００７４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３２（ＭＩ０００４４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ａ－１（ＭＩ０００４５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ａ－２（ＭＩ０００４５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３３ｂ（ＭＩ０００８２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３４（ＭＩ０００４７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３５ａ－１（ＭＩ０００４５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３５ａ－２（ＭＩ０００４５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３５ｂ（ＭＩ０００８１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３６（ＭＩ０００４７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３７（ＭＩ０００４５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３８－１（ＭＩ０００４７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３８－２（ＭＩ０００４５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３９（ＭＩ０００２６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４０（ＭＩ０００４５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４１（ＭＩ０００４５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４２（ＭＩ０００４５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４３（ＭＩ０００４５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４４（ＭＩ０００４６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４５（ＭＩ０００４６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４６ａ（ＭＩ０００４７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４６ｂ（ＭＩ０００３１２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４７ａ（

ＭＩ０００００２６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４７ｂ（ＭＩ０００５５４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４８ａ（ＭＩ０００００２５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４８ｂ（ＭＩ０００００８１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４９（ＭＩ０００００４７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５０（ＭＩ０００００４７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５１ａ（ＭＩ０００００８０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５１ｂ（ＭＩ０００３７７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５２（ＭＩ０００００４６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５３－１（ＭＩ０００００４６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５３－２（ＭＩ０００００４６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５４（ＭＩ０００００４８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５５（ＭＩ０００００６８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８１ａ－１（ＭＩ０００００２８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８１ａ－２（ＭＩ０００００２６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８１ｂ－１（ＭＩ０００００２７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８１ｂ－２（ＭＩ０００００６８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８１ｃ（ＭＩ０００００２７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８１ｄ（ＭＩ０００３１３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８２（ＭＩ０００００２７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８３（ＭＩ０００００２７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８４（ＭＩ０００００４８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８５（ＭＩ０００００４８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８６（ＭＩ０００００４８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８７（ＭＩ０００００２７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８８（ＭＩ０００００４８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９０ａ（ＭＩ０００００４８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９０ｂ（ＭＩ０００５５４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１（ＭＩ０００００４６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９２（ＭＩ０００００２３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９３ａ（ＭＩ０００００４８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９３ｂ（ＭＩ０００３１３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９４－１（ＭＩ０００００４８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９４－２（ＭＩ０００００７３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９５（ＭＩ０００００４８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９６ａ－１（ＭＩ０００００２３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９６ａ－２（ＭＩ０００００２７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９６ｂ（ＭＩ０００１１５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９７（ＭＩ０００００２３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９８（ＭＩ０００００２４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９９ａ－１（ＭＩ０００００２４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９９ａ－２（ＭＩ０００００２８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９９ｂ（ＭＩ０００００２８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ａ（ＭＩ０００００７３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ｂ（ＭＩ０００００３４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２００ｃ（ＭＩ０００００６５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０２（ＭＩ０００３１３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０３ａ（ＭＩ０００００２８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０３ｂ（ＭＩ００１７３４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０４（ＭＩ０００００２８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０５（ＭＩ０００００２８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０６（ＭＩ０００００４９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０８ａ（ＭＩ０００００２５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０８ｂ（ＭＩ０００５５７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１０（ＭＩ０００００２８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１（ＭＩ０００００２８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１２（ＭＩ０００００２８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１４（ＭＩ０００００２９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１５（ＭＩ０００００２９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１６ａ（ＭＩ０００００２９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１６ｂ（ＭＩ０００５５６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１７（ＭＩ０００００２９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１８－１（ＭＩ０００００２９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１８－２（ＭＩ０００００２９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１９ａ－１（ＭＩ０００００２９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１９ａ－２（ＭＩ０００００７４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１９ｂ（ＭＩ００１７２９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２１（ＭＩ０００００２９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２２（ＭＩ０００００２９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２３（ＭＩ０００００３００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２４（ＭＩ０００００３０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９６（ＭＩ０００００７４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９７（ＭＩ０００５７７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９８（ＭＩ０００５５２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９９（ＭＩ０００００７４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３００（ＭＩ０００５５２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０１ａ（ＭＩ０００００７４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０１ｂ（ＭＩ０００５５６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０２ａ（ＭＩ０００００７３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０２ｂ（ＭＩ０００００７７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０２ｃ（ＭＩ０００００７７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０２ｄ（ＭＩ０００００７７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０２ｅ（ＭＩ０００６４１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０２ｆ（ＭＩ０００６４１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ

－３２０ａ（ＭＩ０００００５４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｂ－１（ＭＩ０００３７７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｂ－２（ＭＩ０００３８３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｃ－１（ＭＩ０００３７７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｃ－２（ＭＩ０００８１９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｄ－１（ＭＩ０００８１９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｄ－２（ＭＩ０００８１９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０ｅ（ＭＩ００１４２３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２３ａ（ＭＩ０００００８０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２３ｂ（ＭＩ００１４２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２４（ＭＩ０００００８１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２５（ＭＩ０００００８２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２６（ＭＩ０００００８０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２８（ＭＩ０００００８０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２９－１（ＭＩ０００１７２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２９－２（ＭＩ０００１７２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３０（ＭＩ０００００８０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３１（ＭＩ０００００８１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３５（ＭＩ０００００８１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３７（ＭＩ０００００８０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３８（ＭＩ０００００８１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３３９（ＭＩ０００００８１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４０（ＭＩ０００００８０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４２（ＭＩ０００００８０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４５（ＭＩ０００００８２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３４６（ＭＩ０００００８２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１（ＭＩ０００００７６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６２（ＭＩ０００００７６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６３（ＭＩ０００００７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５ａ（ＭＩ０００００７６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５ｂ（ＭＩ０００００７６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７（ＭＩ０００００７７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６９（ＭＩ０００００７７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７０（ＭＩ０００００７７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７１ａ（ＭＩ０００００７７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７１ｂ（ＭＩ００１７３９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７２（ＭＩ０００００７８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７３（ＭＩ０００００７８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７４ａ（ＭＩ０００００７８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７４ｂ（ＭＩ０００５５６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７４ｃ（ＭＩ００１６６８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７５（ＭＩ０００００７８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７６ａ－１（ＭＩ０００００７８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７６ａ－２（ＭＩ０００３５２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７６ｂ（ＭＩ０００２４６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７６ｃ（ＭＩ０００００７７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７７（ＭＩ０００００７８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ａ（ＭＩ０００００７８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｂ（ＭＩ００１４１５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｃ（ＭＩ００１５８２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｄ－１（ＭＩ００１６７４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｄ－２（ＭＩ０００３８４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｅ（ＭＩ００１６７５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｆ（ＭＩ００１６７５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｇ（ＭＩ００１６７６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｈ（ＭＩ００１６８０８　８０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｉ（ＭＩ００１６９０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７８ｊ（ＭＩ００２１２７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７９（ＭＩ０００００７８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３８０（ＭＩ０００００７８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３８１（ＭＩ０００００７８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３８２（ＭＩ０００００７９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３８３（ＭＩ０００００７９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３８４（ＭＩ０００１１４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４０９（ＭＩ０００１７３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４１０（ＭＩ０００２４６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４１１（ＭＩ０００３６７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４１２（ＭＩ０００２４６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２１（ＭＩ０００３６８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２２ａ（ＭＩ０００１４４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２３（ＭＩ０００１４４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２４（ＭＩ０００１４４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５（ＭＩ０００１４４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９（ＭＩ０００１６４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１（ＭＩ０００１７２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３２（ＭＩ０００３１３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３３（ＭＩ０００１７２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８（ＭＩ０００１６３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９ａ（ＭＩ０００１６４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９ｂ（ＭＩ０００３６７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９ｃ（ＭＩ０００３８２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０ａ－１（ＭＩ０００１６５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０ａ－２（ＭＩ０００３１８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０ｂ（ＭＩ０００５５３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ

－４５１ａ（ＭＩ０００１７２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１ｂ（ＭＩ００１７３６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２（ＭＩ０００１７３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５４（ＭＩ０００３８２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５５（ＭＩ０００３５１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６（ＭＩ００１４１５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８３（ＭＩ０００２４６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８４（ＭＩ０００２４６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８５（ＭＩ０００２４６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８６（ＭＩ０００２４７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８６－２（ＭＩ００２３６２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８７ａ（ＭＩ０００２４７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８７ｂ（ＭＩ０００３５３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８８（ＭＩ０００３１２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８９（ＭＩ０００３１２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９０（ＭＩ００３１２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９１（ＭＩ０００３１２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９２（ＭＩ０００３１３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９３（ＭＩ０００３１３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９４（ＭＩ０００３１３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９５（ＭＩ０００３１３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９６（ＭＩ０００３１３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９７（ＭＩ０００３１３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９８（ＭＩ０００３１４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９９ａ（ＭＩ０００３１８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９９ｂ（ＭＩ００１７３９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００ａ（ＭＩ０００３１８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００ｂ（ＭＩ００１５９０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０１（ＭＩ０００３１８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０２（ＭＩ０００３１８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０３（ＭＩ０００３１８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０４（ＭＩ０００３１８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０５（ＭＩ０００３１９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０６（ＭＩ０００３１９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０７（ＭＩ０００３１９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０８（ＭＩ０００３１９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９－１（ＭＩ０００３１９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９－２（ＭＩ０００５５３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９－３（ＭＩ０００５７１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１０（ＭＩ０００３１９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１１（ＭＩ０００３１２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１２－１（ＭＩ０００３１４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１２－２（ＭＩ０００３１４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１３ａ－１（ＭＩ０００３１９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１３ａ－２（ＭＩ０００３１９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１３ｂ（ＭＩ０００６６４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１３ｃ（ＭＩ０００６６４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１４ａ－１（ＭＩ０００３１９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１４ａ－２（ＭＩ０００３１９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１４ａ－３（ＭＩ０００３２００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１４ｂ（ＭＩ００１４２５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１５－１（ＭＩ０００３１４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１５－２（ＭＩ０００３１４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１６ａ－１（ＭＩ０００３１８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１６ａ－２（ＭＩ０００３１８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１６ｂ－１（ＭＩ０００３１７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１６ｂ－２（ＭＩ０００３１６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１７ａ（ＭＩ０００３１６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１７ｂ（ＭＩ０００３１６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１７ｃ（ＭＩ０００３１７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ａ－１（ＭＩ０００３１７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ａ－２（ＭＩ０００３１７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ｂ（ＭＩ０００３１５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ｃ（ＭＩ０００３１５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ｄ（ＭＩ０００３１７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ｅ（ＭＩ０００３１６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８ｆ（ＭＩ０００３１５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ａ－１（ＭＩ０００３１７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ａ－２（ＭＩ０００３１８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｂ（ＭＩ０００３１５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｃ（ＭＩ０００３１４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｄ（ＭＩ０００３１６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９ｅ（ＭＩ０００３１４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ａ（ＭＩ０００３１４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｂ（ＭＩ０００３１５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｃ（ＭＩ０００３１５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｄ（ＭＩ０００３１６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｅ（ＭＩ０００３１４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｆ（ＭＩ０００３１４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｇ（ＭＩ０００３１６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２０ｈ（ＭＩ０００３１７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２１－１（ＭＩ００３１７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２１－２（ＭＩ０００３１６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－

５２２（ＭＩ０００３１７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２３（ＭＩ０００３１５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２４（ＭＩ０００３１６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２５（ＭＩ０００３１５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２６ａ－１（ＭＩ０００３１５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２６ａ－２（ＭＩ０００３１６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２６ｂ（ＭＩ０００３１５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５２７（ＭＩ０００３１７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５３２（ＭＩ０００３２０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５３９（ＭＩ０００３５１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４１（ＭＩ０００５５３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４２（ＭＩ０００３６８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４３（ＭＩ０００５５６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４４ａ（ＭＩ０００３５１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４４ｂ（ＭＩ００１４１５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４５（ＭＩ０００３５１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａ－１（ＭＩ０００３５９３、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａ－２（ＭＩ０００３５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａ－３（ＭＩ０００３６１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａａ－１（ＭＩ００１６６８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａａ－２（ＭＩ００１６６９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｂ（ＭＩ００１６７５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｃ（ＭＩ００１６７６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｄ（ＭＩ００１６７７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｅ－１（ＭＩ００１６７７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｅ－２（ＭＩ００１６７８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｇ－１（ＭＩ００１６７９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｇ－２（ＭＩ００１６７９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｈ（ＭＩ００１６７９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｉ（ＭＩ００１６８１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｊ－１（ＭＩ００１６８１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｊ－２（ＭＩ００１６８１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｋ（ＭＩ００１６８４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｌ（ＭＩ００１６８５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｍ（ＭＩ００１６９０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｎ（ＭＩ００１６９０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｏ（ＭＩ００１７８７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｐ（ＭＩ００１７８７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｑ（ＭＩ００１９１３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｒ（ＭＩ００１９１３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｓ（ＭＩ００１９１３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｔ（ＭＩ００１９１３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｕ（ＭＩ００１９１４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｖ（ＭＩ００１９１５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｗ（ＭＩ００１９２８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｘ（ＭＩ００１９２８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｙ（ＭＩ００２２２１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ａｚ（ＭＩ００２２２１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｂ（ＭＩ０００３５９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｂａ（ＭＩ００２５７４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｃ（ＭＩ０００３６３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｄ－１（ＭＩ０００３６６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｄ－２（ＭＩ０００３６７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｅ（ＭＩ０００６３４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｆ－１（ＭＩ０００６３７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｆ－２（ＭＩ０００６３７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｆ－３（ＭＩ０００６３７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｆ－４（ＭＩ０００６３７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｆ－５（ＭＩ０００６３７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｇ（ＭＩ０００６３９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｈ－１（ＭＩ０００６４１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｈ－２（ＭＩ０００６４１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｈ－３（ＭＩ０００６４１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｈ－４（ＭＩ０００６４１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｈ－５（ＭＩ００１６７５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｉ－１（ＭＩ０００６４２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｉ－２（ＭＩ０００６４２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｉ－３（ＭＩ０００６４２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｉ－４（ＭＩ０００６４２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｊ（ＭＩ０００６３４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｋ（ＭＩ０００６３５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｌ（ＭＩ０００６３６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｍ（ＭＩ０００６４００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｎ（ＭＩ０００６３９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｏ（ＭＩ０００６４０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｏ－２（ＭＩ００１６７４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｐ（ＭＩ０００６４２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｑ（ＭＩ００１０６３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｓ（ＭＩ００１４１４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｔ（ＭＩ００１４１６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｕ

（ＭＩ００１４１６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｖ（ＭＩ００１４１７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｗ（ＭＩ００１４２２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｘ（ＭＩ００１４２４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｘ－２（ＭＩ００１６８３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｙ（ＭＩ００１６５９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４８ｚ（ＭＩ００１６６８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５４９ａ（ＭＩ０００３６７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５０ａ－１（ＭＩ０００３６００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５０ａ－２（ＭＩ０００３６０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５０ａ－３（ＭＩ０００３７６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５０ｂ－１（ＭＩ００１６６８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５０ｂ－２（ＭＩ００１６６８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５１ａ（ＭＩ０００３５５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５１ｂ（ＭＩ０００３５７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５２（ＭＩ０００３５５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５３（ＭＩ０００３５５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５４（ＭＩ０００３５５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５５（ＭＩ０００３５６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５６（ＭＩ０００３５６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５７（ＭＩ０００３５６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８（ＭＩ０００３５６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５９（ＭＩ０００３５６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６１（ＭＩ０００３５６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６２（ＭＩ０００３５６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６３（ＭＩ０００３５６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６４（ＭＩ０００３５７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６６（ＭＩ０００３５７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６７（ＭＩ０００３５７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８（ＭＩ０００３５７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９（ＭＩ０００３５７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０（ＭＩ０００３５７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７１（ＭＩ０００３５７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７２（ＭＩ０００３５７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７３（ＭＩ０００３５８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７４（ＭＩ０００３５８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７５（ＭＩ０００３５８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７６（ＭＩ０００３５８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７７（ＭＩ０００３５８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７８（ＭＩ０００３５８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７９（ＭＩ０００３５８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８０（ＭＩ０００３５８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８１（ＭＩ０００３５８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８２（ＭＩ０００３５８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８３（ＭＩ０００３５９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８４（ＭＩ０００３５９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８５（ＭＩ０００３５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８６（ＭＩ０００３５９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８７（ＭＩ０００３５９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８８（ＭＩ０００３５９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５８９（ＭＩ０００３５９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９０（ＭＩ０００３６０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９１（ＭＩ０００３６０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９２（ＭＩ０００３６０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９３（ＭＩ０００３６０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９５（ＭＩ０００３６０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９６（ＭＩ０００３６０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９７（ＭＩ０００３６０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９８（ＭＩ０００３６１０　１６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５９９（ＭＩ０００３６１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６００（ＭＩ０００３６１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０１（ＭＩ０００３６１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０２（ＭＩ０００３６１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０３（ＭＩ０００３６１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０４（ＭＩ０００３６１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０５（ＭＩ０００３６１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０６（ＭＩ０００３６１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７（ＭＩ０００３６２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８（ＭＩ０００３６２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０９（ＭＩ０００３６２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１０（ＭＩ０００３６２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１１（ＭＩ０００３６２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２（ＭＩ０００３６２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１３（ＭＩ０００３６２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１４（ＭＩ０００３６２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１５（ＭＩ０００３６２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１６（ＭＩ０００３６２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１７（ＭＩ０００３６３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１８（ＭＩ０００３６３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１９（ＭＩ０００３６３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２０（ＭＩ０００３６３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２１（ＭＩ０００３６３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２２（ＭＩ０００３６３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２３（ＭＩ０００３６３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２４（ＭＩ０００３６３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２５（ＭＩ０００３６３９）、ｈｓａ－

ｍｉｒ－６２６（ＭＩ０００３６４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２７（ＭＩ０００３６４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２８（ＭＩ０００３６４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６２９（ＭＩ０００３６４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３０（ＭＩ０００３６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３１（ＭＩ０００３６４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３２（ＭＩ０００３６４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３３（ＭＩ０００３６４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３４（ＭＩ０００３６４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３５（ＭＩ０００３６５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３６（ＭＩ０００３６５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３７（ＭＩ０００３６５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３８（ＭＩ０００３６５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６３９（ＭＩ０００３６５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４０（ＭＩ０００３６５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４１（ＭＩ０００３６５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４２ａ（ＭＩ０００３６５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４２ｂ（ＭＩ００１６６８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４３（ＭＩ０００３６５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４４ａ（ＭＩ０００３６５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４５（ＭＩ０００３６６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４６（ＭＩ０００３６６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４７（ＭＩ００３６６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４８（ＭＩ０００３６６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４９（ＭＩ０００３６６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０（ＭＩ０００３６６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１（ＭＩ０００３６６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５２（ＭＩ０００３６６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５３（ＭＩ０００３６７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５４（ＭＩ００３６７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５５（ＭＩ０００３６７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５６（ＭＩ０００３６７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５７（ＭＩ０００３６８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５８（ＭＩ０００３６８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５９（ＭＩ０００３６８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６０（ＭＩ０００３６８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６１（ＭＩ０００３６６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６２（ＭＩ０００３６７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６３ａ（ＭＩ０００３６７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６３ｂ（ＭＩ０００６３３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６４ａ（ＭＩ０００６４４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６４ｂ（ＭＩ００１９１３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６５（ＭＩ０００５５６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６６８（ＭＩ０００３７６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７０（ＭＩ０００３９３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１（ＭＩ０００３７６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５（ＭＩ０００５４１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６（ＭＩ００１６４３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７０８（ＭＩ０００５５４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１（ＭＩ００１２４８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１８（ＭＩ００１２４８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７４４（ＭＩ０００５５５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７５８（ＭＩ０００３７５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７５９（ＭＩ０００４０６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６０（ＭＩ０００５５６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６１（ＭＩ０００３９４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６２（ＭＩ０００３８９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６４（ＭＩ０００３９４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６５（ＭＩ０００５１１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６６（ＭＩ０００３８３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６７（ＭＩ０００３７６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６９（ＭＩ０００３８３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７７０（ＭＩ０００５１１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０２（ＭＩ０００３９０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８７３（ＭＩ０００５５６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８７４（ＭＩ０００５５３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８７５（ＭＩ０００５５４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８７６（ＭＩ０００５５４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８７７（ＭＩ０００５５６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８８５（ＭＩ０００５５６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８８７（ＭＩ０００５５６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８８８（ＭＩ０００５５３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８８９（ＭＩ０００５５４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８９０（ＭＩ０００５５３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８９１ａ（ＭＩ００５５２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８９１ｂ（ＭＩ０００５５３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８９２ａ（ＭＩ０００５５２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８９２ｂ（ＭＩ０００５５３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８９２ｃ（ＭＩ００２２５６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２０（ＭＩ００５５７１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２１（ＭＩ０００５７１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２２（ＭＩ０００５７１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９２４（ＭＩ０００５７１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３３（ＭＩ０００５７５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３４（ＭＩ０００５７５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３５（ＭＩ０００５７５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３６（ＭＩ０

００５７５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３７（ＭＩ０００５７５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３８（ＭＩ０００５７６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９３９（ＭＩ０００５７６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４０（ＭＩ０００５７６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４１－１（ＭＩ０００５７６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４１－２（ＭＩ０００５７６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４１－３（ＭＩ０００５７６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４１－４（ＭＩ０００５７６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４２（ＭＩ０００５７６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４３（ＭＩ０００５７６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－９４４（ＭＩ０００５７６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１７８（ＭＩ０００６２７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１７９（ＭＩ０００６２７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８０（ＭＩ０００６２７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８１（ＭＩ０００６２７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８２（ＭＩ０００６２７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８３（ＭＩ０００６２７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８４－１（ＭＩ０００６２７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８４－２（ＭＩ００１５９７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８４－３（ＭＩ００１５９７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８５－１（ＭＩ０００３８４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１８５－２（ＭＩ０００３８２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１９３（ＭＩ００１４２０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１９７（ＭＩ０００６６５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１１９９（ＭＩ００２０３４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２００（ＭＩ０００６３３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０２（ＭＩ０００６３３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０３（ＭＩ０００６３３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０４（ＭＩ０００６３３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０５（ＭＩ０００６３３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０６（ＭＩ０００６３３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０７（ＭＩ０００６３４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２０８（ＭＩ０００６３４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２４（ＭＩ０００３７６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２５（ＭＩ０００６３１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２６（ＭＩ０００６３１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２７（ＭＩ０００６３１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２８（ＭＩ０００６３１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２２９（ＭＩ０００６３１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３１（ＭＩ０００６３２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３３－１（ＭＩ０００６３２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３３－２（ＭＩ００１５９７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３４（ＭＩ０００６３２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３６（ＭＩ０００６３２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３７（ＭＩ０００６３２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２３８（ＭＩ０００６３２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４３（ＭＩ０００６３７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４４－１（ＭＩ０００６３７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４４－２（ＭＩ００１５９７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４４－３（ＭＩ００１５９７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４５ａ（ＭＩ０００６３８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４５ｂ（ＭＩ００１７４３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４６（ＭＩ０００６３８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４７（ＭＩ０００６３８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４８（ＭＩ０００６３８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４９（ＭＩ０００６３８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５０（ＭＩ０００６３８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５１（ＭＩ０００６３８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５２（ＭＩ０００６４３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５３（ＭＩ０００６３８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５４－１（ＭＩ０００６３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５４－２（ＭＩ００１６７４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５５ａ（ＭＩ０００６３８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５５ｂ－１（ＭＩ０００６４３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５５ｂ－２（ＭＩ０００６４３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５６（ＭＩ０００６３９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５７（ＭＩ０００６３９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２５８（ＭＩ０００６３９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６０ａ（ＭＩ０００６３９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６０ｂ（ＭＩ００１４１９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６１（ＭＩ０００６３９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６２（ＭＩ０００６３９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６３（ＭＩ０００６３９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６４（ＭＩ０００３７５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６５（ＭＩ０００６４０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６６（ＭＩ０００６４０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６７（ＭＩ０００６４０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６８ａ（ＭＩ０００６４０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６８ｂ（ＭＩ００１６７４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６９ａ（ＭＩ０００６４０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２６９ｂ（ＭＩ００１６８８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７０－１

（ＭＩ０００６４０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７０－２（ＭＩ００１５９７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７１（ＭＩ０００３８１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７２（ＭＩ０００６４０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ａ（ＭＩ０００６４０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ｃ（ＭＩ００１４１７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ｄ（ＭＩ００１４２５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ｅ（ＭＩ００１６０５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ｆ（ＭＩ００１８００２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ｇ（ＭＩ００１８００３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７３ｈ（ＭＩ００２５５１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７５（ＭＩ０００６４１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７６（ＭＩ０００６４１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７７（ＭＩ０００６４１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７８（ＭＩ０００６４２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２７９（ＭＩ０００６４２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８１（ＭＩ０００６４２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８２（ＭＩ０００６４２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８３－１（ＭＩ０００３８３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８３－２（ＭＩ０００６４３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８４（ＭＩ０００６４３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８５－１（ＭＩ０００６３４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８５－２（ＭＩ０００６３４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８６（ＭＩ０００６３４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８７（ＭＩ０００６３４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８８（ＭＩ０００６４３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８９－１（ＭＩ０００６３５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２８９－２（ＭＩ０００６３５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９０（ＭＩ０００６３５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９１（ＭＩ０００６３５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９２（ＭＩ０００６４３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９３（ＭＩ０００６３５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９４（ＭＩ０００６３５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９５ａ（ＭＩ０００６３５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９５ｂ（ＭＩ００１９１４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９６（ＭＩ０００３７８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９７（ＭＩ０００６３５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９８（ＭＩ０００３９３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２９９（ＭＩ０００６３５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０１（ＭＩ０００３８１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－１（ＭＩ０００６３６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－１０（ＭＩ００１５９７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－１１（ＭＩ００１５９８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－２（ＭＩ０００６３６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－３（ＭＩ０００６３６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－４（ＭＩ０００６３６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－５（ＭＩ０００６３６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－６（ＭＩ０００６３６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－７（ＭＩ０００６３６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－８（ＭＩ０００６３６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０２－９（ＭＩ００１５９７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０３（ＭＩ０００６３７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０４（ＭＩ０００６３７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０５（ＭＩ０００６３７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０６（ＭＩ０００６４４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３０７（ＭＩ０００６４４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３２１（ＭＩ０００６６５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３２２（ＭＩ０００６６５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３２３（ＭＩ０００３７８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３２４（ＭＩ０００６６５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１３４３（ＭＩ００１７３２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４６８（ＭＩ０００３７８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４６９（ＭＩ０００７０７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４７０（ＭＩ０００７０７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１４７１（ＭＩ０００７０７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５３７（ＭＩ０００７２５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５３８（ＭＩ０００７２５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５３９（ＭＩ０００７２６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１５８７（ＭＩ００１６９０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８２５（ＭＩ０００８１９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１８２７（ＭＩ０００８１９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９０８（ＭＩ０００８３２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９０９（ＭＩ０００８３３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１０（ＭＩ０００８３３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１１（ＭＩ０００８３３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１２（ＭＩ０００８３３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１３（ＭＩ０００８３３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１４（ＭＩ０００８３３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９１５（ＭＩ０００８３３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９７２－１（ＭＩ０００９９８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９７２－２（ＭＩ００１５９７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９７３（ＭＩ００

０９９８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－１９７６（ＭＩ０００９９８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０５２（ＭＩ００１０４８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０５３（ＭＩ００１０４８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２０５４（ＭＩ００１０４８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１０（ＭＩ００１０６２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１３（ＭＩ０００３９３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１４（ＭＩ００１０６３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１５（ＭＩ００１０６３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１６（ＭＩ００１０６３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２１１７（ＭＩ００１０６３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２７６（ＭＩ００１１２８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２７７（ＭＩ００１１２８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２２７８（ＭＩ００１１２８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２３５５（ＭＩ００１５８７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２３９２（ＭＩ００１６８７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２４６７（ＭＩ００１７４３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２６８１（ＭＩ００１２０６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２６８２（ＭＩ００１２０６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２８６１（ＭＩ００１３００６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－２９０９（ＭＩ００１３０８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０６４（ＭＩ００１７３７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０６５（ＭＩ００１４２２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３０７４（ＭＩ００１４１８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１５（ＭＩ００１４１２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１６－１（ＭＩ００１４１２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１６－２（ＭＩ００１４１２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１７（ＭＩ００１４１３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１８－１（ＭＩ００１４１３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１８－２（ＭＩ００１４１３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１８－３（ＭＩ００１４１３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１８－４（ＭＩ００１４２０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１８－５（ＭＩ００１４２４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１８－６（ＭＩ００１５９８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１９－１（ＭＩ００１４１３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１１９－２（ＭＩ００１４１３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２０（ＭＩ００１４１３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２１（ＭＩ００１４１３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２２（ＭＩ００１４１３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２３（ＭＩ００１４１３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２４（ＭＩ００１４１４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２５（ＭＩ００１４１４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２６（ＭＩ００１４１４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２７（ＭＩ００１４１４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２８（ＭＩ００１４１４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１２９（ＭＩ００１４１４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３０－１（ＭＩ００１４１４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３０－２（ＭＩ００１４１４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３１（ＭＩ００１４１５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３２（ＭＩ００１４１５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３３（ＭＩ００１４１５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３４（ＭＩ００１４１５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３５ａ（ＭＩ００１４１５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３５ｂ（ＭＩ００１６８０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３６（ＭＩ００１４１５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３７（ＭＩ００１４１６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３８（ＭＩ００１４１６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１３９（ＭＩ００１４１６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４０（ＭＩ００１４１６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４１（ＭＩ００１４１６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４２（ＭＩ００１４１６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４３（ＭＩ００１４１６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４４（ＭＩ００１４１６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４５（ＭＩ００１４１７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４６（ＭＩ００１４１７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４７（ＭＩ００１４１７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４８（ＭＩ００１４１７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１４９（ＭＩ００１４１７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５０ａ（ＭＩ００１４１７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５０ｂ（ＭＩ００１６４２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５１（ＭＩ００１４１７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５２（ＭＩ００１４１７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５３（ＭＩ００１４１８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５４（ＭＩ００１４１８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５５ａ（ＭＩ００１４１８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５５ｂ（ＭＩ００１６８３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５６－１（ＭＩ００１４１８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５６－２（ＭＩ００１４２３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５６－３（ＭＩ００１４２４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５７（ＭＩ００１４１８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５８－１（ＭＩ００１４１８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１５８－２（ＭＩ００１４１８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１

５９（ＭＩ００１４１８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６０－１（ＭＩ００１４１８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６０－２（ＭＩ００１４１９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６１（ＭＩ００１４１９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６２（ＭＩ００１４１９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６３（ＭＩ００１４１９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６４（ＭＩ００１４１９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６５（ＭＩ００１４１９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６６（ＭＩ００１４１９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６７（ＭＩ００１４１９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６８（ＭＩ００１４１９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１６９（ＭＩ００１４２００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７０（ＭＩ００１４２０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７１（ＭＩ００１４２０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７３（ＭＩ００１４２０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７４（ＭＩ００１４２０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７５（ＭＩ００１４２０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７６（ＭＩ００１４２１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７７（ＭＩ００１４２１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７８（ＭＩ００１４２１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７９－１（ＭＩ００１４２１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７９－２（ＭＩ００１４２１６；ｈｓａ－ｍｉｒ－３１７９－３（ＭＩ００１４２２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８０－１（ＭＩ００１４２１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８０－２（ＭＩ００１４２１５；ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８０－３（ＭＩ００１４２１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８０－４（ＭＩ００１６４０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８０－５（ＭＩ００１６４０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８１（ＭＩ００１４２２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８２（ＭＩ００１４２２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８３（ＭＩ００１４２２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８４（ＭＩ００１４２２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８５（ＭＩ００１４２２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８６（ＭＩ００１４２２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８７（ＭＩ００１４２３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８８（ＭＩ００１４２３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１８９（ＭＩ００１４２３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９０（ＭＩ００１４２３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９１（ＭＩ００１４２３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９２（ＭＩ００１４２３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９３（ＭＩ００１４２３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９４（ＭＩ００１４２３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９５（ＭＩ００１４２４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９６（ＭＩ００１４２４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９７（ＭＩ００１４２４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９８－１（ＭＩ００１４２４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９８－２（ＭＩ００１７３３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９９－１（ＭＩ００１４２４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３１９９－２（ＭＩ００１４２４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２００（ＭＩ００１４２４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０１（ＭＩ００１４２５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０２－１（ＭＩ００１４２５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３２０２－２（ＭＩ００１４２５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３５２９（ＭＩ００１７３５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３５９１（ＭＩ００１７３８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６０５（ＭＩ００１５９９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６０６（ＭＩ００１５９９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６０７（ＭＩ００１５９９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６０９（ＭＩ００１５９９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１０（ＭＩ００１６０００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１１（ＭＩ００１６００１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１２（ＭＩ００１６００２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１３（ＭＩ００１６００３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１４（ＭＩ００１６００４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１５（ＭＩ００１６００５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１６（ＭＩ００１６００６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１７（ＭＩ００１６００７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１８（ＭＩ００１６００８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６１９（ＭＩ００１６００９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６２０（ＭＩ００１６０１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６２１（ＭＩ００１６０１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６２２ａ（ＭＩ００１６０１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６２２ｂ（ＭＩ００１６０１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６４６（ＭＩ００１６０４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６４８（ＭＩ００１６０４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６４９（ＭＩ００１６０４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５０（ＭＩ００１６０５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５１（ＭＩ００１６０５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５２（ＭＩ００１６０５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５３（ＭＩ００１６０５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５４（ＭＩ００１６０５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５５（ＭＩ００１６０５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６

５６（ＭＩ００１６０５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５７（ＭＩ００１６０５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５８（ＭＩ００１６０５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６５９（ＭＩ００１６０６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６０（ＭＩ００１６０６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６１（ＭＩ００１６０６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６２（ＭＩ００１６０６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６３（ＭＩ００１６０６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６４（ＭＩ００１６０６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６５（ＭＩ００１６０６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６６（ＭＩ００１６０６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６７（ＭＩ００１６０６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６８（ＭＩ００１６０６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６６９（ＭＩ００１６０７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７０－１（ＭＩ００１６０７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７０－２（ＭＩ００１９１１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７１（ＭＩ００１６０７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７２（ＭＩ００１６０７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７３（ＭＩ００１６０７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７４（ＭＩ００１６０７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７５（ＭＩ００１６０７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７７（ＭＩ００１６０７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７８（ＭＩ００１６０７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６７９（ＭＩ００１６０８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８０－１（ＭＩ００１６０８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８０－２（ＭＩ００１９１１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８１（ＭＩ００１６０８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８２（ＭＩ００１６０８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８３（ＭＩ００１６０８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８４（ＭＩ００１６０８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８５（ＭＩ００１６０８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８６（ＭＩ００１６０８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８７（ＭＩ００１６０８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８８－１（ＭＩ００１６０８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８８－２（ＭＩ００１７４４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ａ（ＭＩ００１６０９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ｂ（ＭＩ００１６４１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ｃ（ＭＩ００１６８３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ｄ－１（ＭＩ００１６８３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ｄ－２（ＭＩ００１６８３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ｅ（ＭＩ００１６８３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６８９ｆ（ＭＩ００１６８３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６９０－１（ＭＩ００１６０９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６９０－２（ＭＩ００２３５６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６９１（ＭＩ００１６０９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３６９２（ＭＩ００１６０９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７１３（ＭＩ００１６１３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３７１４（ＭＩ００１６１３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９０７（ＭＩ００１６４１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９０８（ＭＩ００１６４１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９０９（ＭＩ００１６４１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１０－１（ＭＩ００１６４１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１０－２（ＭＩ００１６４３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１１（ＭＩ００１６４１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１２（ＭＩ００１６４１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１３－１（ＭＩ００１６４１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１３－２（ＭＩ００１６４１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１４－１（ＭＩ００１６４１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１４－２（ＭＩ００１６４２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１５（ＭＩ００１６４２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１６（ＭＩ００１６４２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１７（ＭＩ００１６４２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１８（ＭＩ００１６４２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９１９（ＭＩ００１６４２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２０（ＭＩ００１６４２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２１（ＭＩ００１６４２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２２（ＭＩ００１６４２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２３（ＭＩ００１６４３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２４（ＭＩ００１６４３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２５（ＭＩ００１６４３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２６－１（ＭＩ００１６４３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２６－２（ＭＩ００１６４３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２７（ＭＩ００１６４３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２８（ＭＩ００１６４３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９２９（ＭＩ００１６４３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９３４（ＭＩ００１６５９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９３５（ＭＩ００１６５９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９３６（ＭＩ００１６５９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９３７（ＭＩ００１６５９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９３８（ＭＩ００１６５９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９３９（ＭＩ００１６５９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９４０（ＭＩ００１６５９７）

、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９４１（ＭＩ００１６５９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９４２（ＭＩ００１６５９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９４３（ＭＩ００１６６００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９４４（ＭＩ００１６６０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９４５（ＭＩ００１６６０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９６０（ＭＩ００１６９６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７２（ＭＩ００１６９９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７３（ＭＩ００１６９９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７４（ＭＩ００１６９９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７５（ＭＩ００１６９９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７６（ＭＩ００１６９９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７７（ＭＩ００１６９９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－３９７８（ＭＩ００１６９９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５１（ＭＩ００１５８６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５２（ＭＩ００１５８６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５３（ＭＩ００１５８６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５４（ＭＩ００１５８６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５５（ＭＩ００１５８６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５６（ＭＩ００１５８５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５７（ＭＩ００１５８５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２５９（ＭＩ００１５８５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６０（ＭＩ００１５８５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６１（ＭＩ００１５８６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６２（ＭＩ００１５８７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６３（ＭＩ００１５８７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６４（ＭＩ００１５８７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６５（ＭＩ００１５８６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６６（ＭＩ００１５８７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６７（ＭＩ００１５８７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６８（ＭＩ００１５８７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２６９（ＭＩ００１５８７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７０（ＭＩ００１５８７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７１（ＭＩ００１５８７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７２（ＭＩ００１５８８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７３（ＭＩ００１５８８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７４（ＭＩ００１５８８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７５（ＭＩ００１５８８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７６（ＭＩ００１５８８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７７（ＭＩ００１５８８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７８（ＭＩ００１５８８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２７９（ＭＩ００１５８８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８０（ＭＩ００１５８８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８１（ＭＩ００１５８８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８２（ＭＩ００１５８９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８３－１（ＭＩ００１５８９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８３－２（ＭＩ００１５９８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８４（ＭＩ００１５８９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８５（ＭＩ００１５８９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８６（ＭＩ００１５８９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８７（ＭＩ００１５８９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８８（ＭＩ００１５８９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２８９（ＭＩ００１５８９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９０（ＭＩ００１５８９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９１（ＭＩ００１５９００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９２（ＭＩ００１５８９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９３（ＭＩ００１５８２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９４（ＭＩ００１５８２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９５（ＭＩ００１５８２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９６（ＭＩ００１５８２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９７（ＭＩ００１５８２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９８（ＭＩ００１５８３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４２９９（ＭＩ００１５８２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３００（ＭＩ００１５８３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０１（ＭＩ００１５８２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０２（ＭＩ００１５８３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０３（ＭＩ００１５８３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０４（ＭＩ００１５８３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０５（ＭＩ００１５８３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０６（ＭＩ００１５８３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０７（ＭＩ００１５８３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０８（ＭＩ００１５８３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３０９（ＭＩ００１５８３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１０（ＭＩ００１５８４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１１（ＭＩ００１５８４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１２（ＭＩ００１５８４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１３（ＭＩ００１５８４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１４（ＭＩ００１５８４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１５－１（ＭＩ００１５８４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１５－２（ＭＩ００１５９８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１６（ＭＩ００１５８４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１７（ＭＩ００１５８５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１８（ＭＩ００１５８４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４３１９（ＭＩ００１５８４８）、

hsa-mir-4320（MI0015849）、hsa-mir-4321（MI0015852）、hsa-mir-4322（MI0015851）、hsa-mir-4323（MI0015853）、hsa-mir-4324（MI0015854）、hsa-mir-4325（MI0015865）、hsa-mir-4326（MI0015866）、hsa-mir-4327（MI0015867）、hsa-mir-4328（MI0015904）、hsa-mir-4329（MI0015901）、hsa-mir-4330（MI0015902）、hsa-mir-4417（MI0016753）、hsa-mir-4418（MI0016754）、hsa-mir-4419a（MI0016755）、hsa-mir-4419b（MI0016861）、hsa-mir-4420（MI0016757）、hsa-mir-4421（MI0016758）、hsa-mir-4422（MI0016759）、hsa-mir-4423（MI0016760）、hsa-mir-4424（MI0016763）、hsa-mir-4425（MI0016764）、hsa-mir-4426（MI0016765）、hsa-mir-4427（MI0016766）、hsa-mir-4428（MI0016767）、hsa-mir-4429（MI0016768）、hsa-mir-4430（MI0016769）、hsa-mir-4431（MI0016771）、hsa-mir-4432（MI0016772）、hsa-mir-4433（MI0016773）、hsa-mir-4433b（MI0025511）、hsa-mir-4434（MI0016774）、hsa-mir-4435-1（MI0016775）、hsa-mir-4435-2（MI0016777）、hsa-mir-4436a（MI0016776）、hsa-mir-4436b-1（MI0017425）、hsa-mir-4436b-2（MI0019110）、hsa-mir-4437（MI0016778）、hsa-mir-4438（MI0016781）、hsa-mir-4439（MI0016782）、hsa-mir-4440（MI0016783）、hsa-mir-4441（MI0016784）、hsa-mir-4442（MI0016785）、hsa-mir-4443（MI0016786）、hsa-mir-4444-1（MI0016787）、hsa-mir-4444-2（MI0019111）、hsa-mir-4445（MI0016788）、hsa-mir-4446（MI0016789）、hsa-mir-4447（MI0016790）、hsa-mir-4448（MI0016791）、hsa-mir-4449（MI0016792）、hsa-mir-4450（MI0016795）、hsa-mir-4451（MI0016797）、hsa-mir-4452（MI0016798）、hsa-mir-4453（MI0016799）、hsa-mir-4454（MI0016800）、hsa-mir-4455（MI0016801）、hsa-mir-4456（MI0016802）、hsa-mir-4457（MI0016803）、hsa-mir-4458（MI0016804）、hsa-mir-4459（MI0016805）、hsa-mir-4460（MI0016806）、hsa-mir-4461（MI0016807）、hsa-mir-4462（MI0016810）、hsa-mir-4463（MI0016811）、hsa-mir-4464（MI0016812）、hsa-mir-4465（MI0016816）、hsa-mir-4466（MI0016817）、hsa-mir-4467（MI0016818）、hsa-mir-4468（MI0016819）、hsa-mir-4469（MI0016820）、hsa-mir-4470（MI0016821）、hsa-mir-4471（MI0016822）、hsa-mir-4472-1（MI0016823）、hsa-mir-4472-2（MI0016824）、hsa-mir-4473（MI0016825）、hsa-mir-4474（MI0016826）、hsa-mir-4475（MI0016827）、hsa-mir-4476（MI0016828）、hsa-mir-4477a（MI0016829）、hsa-mir-4477b（MI0016830）、hsa-mir-4478（MI0016831）、hsa-mir-4479（MI0016838）、hsa-mir-

４４８０（ＭＩ００１６８４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８１（ＭＩ００１６８４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８２（ＭＩ００１６８４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８３（ＭＩ００１６８４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８４（ＭＩ００１６８４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８５（ＭＩ００１６８４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８６（ＭＩ００１６８４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８７（ＭＩ００１６８４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８８（ＭＩ００１６８４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４８９（ＭＩ００１６８５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９０（ＭＩ００１６８５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９１（ＭＩ００１６８５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９２（ＭＩ００１６８５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９３（ＭＩ００１６８５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９４（ＭＩ００１６８５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９５（ＭＩ００１６８５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９６（ＭＩ００１６８５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９７（ＭＩ００１６８５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９８（ＭＩ００１６８６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４４９９（ＭＩ００１６８６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５００（ＭＩ００１６８６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０１（ＭＩ００１６８６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０２（ＭＩ００１６８６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０３（ＭＩ００１６８６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０４（ＭＩ００１６８６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０５（ＭＩ００１６８６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０６（ＭＩ００１６８６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０７（ＭＩ００１６８７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０８（ＭＩ００１６８７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０９－１（ＭＩ００１６８７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０９－２（ＭＩ００１６８７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５０９－３（ＭＩ００１６８７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１０（ＭＩ００１６８７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１１（ＭＩ００１６８７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１２（ＭＩ００１６８７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１３（ＭＩ００１６８７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１４（ＭＩ００１６８８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１５（ＭＩ００１６８８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１６（ＭＩ００１６８８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１７（ＭＩ００１６８８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１８（ＭＩ００１６８８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５１９（ＭＩ００１６８８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２０ａ（ＭＩ００１６８８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２０ｂ（ＭＩ００１７３５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２１（ＭＩ００１６８８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２２（ＭＩ００１６８８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２３（ＭＩ００１６８９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２４ａ（ＭＩ００１６８９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２４ｂ（ＭＩ００１９１１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２５（ＭＩ００１６８９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２６（ＭＩ００１６８９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２７（ＭＩ００１６８９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２８（ＭＩ００１６８９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５２９（ＭＩ００１６８９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３０（ＭＩ００１６８９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３１（ＭＩ００１６８９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３２（ＭＩ００１６８９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３３（ＭＩ００１６９００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３４（ＭＩ００１６９０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３５（ＭＩ００１６９０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３６－１（ＭＩ００１６９０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３６－２（ＭＩ００１９１４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３７（ＭＩ００１６９０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３８（ＭＩ００１６９０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５３９（ＭＩ００１６９１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４５４０（ＭＩ００１６９１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３２（ＭＩ００１７２５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３３（ＭＩ００１７２６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３４（ＭＩ００１７２６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３５（ＭＩ００１７２６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３６（ＭＩ００１７２６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３７（ＭＩ００１７２６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３８（ＭＩ００１７２６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６３９（ＭＩ００１７２６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４０（ＭＩ００１７２６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４１（ＭＩ００１７２６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４２（ＭＩ００１７２６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４３（ＭＩ００１７２７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４４（ＭＩ００１７２７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４５（ＭＩ００１７２７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４６（ＭＩ００１７２７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４７（ＭＩ００１７２７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６４８（ＭＩ００１７２７５）、ｈｓａ

－ｍｉｒ－４６４９（ＭＩ００１７２７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５０－１（ＭＩ００１７２７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５０－２（ＭＩ００１７２７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５１（ＭＩ００１７２７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５２（ＭＩ００１７２８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５３（ＭＩ００１７２８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５４（ＭＩ００１７２８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５５（ＭＩ００１７２８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５６（ＭＩ００１７２８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５７（ＭＩ００１７２８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５８（ＭＩ００１７２８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５９ａ（ＭＩ００１７２８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６５９ｂ（ＭＩ００１７２９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６０（ＭＩ００１７２８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６１（ＭＩ００１７２８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６２ａ（ＭＩ００１７２９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６２ｂ（ＭＩ００１７２９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６３（ＭＩ００１７２９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６４（ＭＩ００１７２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６５（ＭＩ００１７２９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６６ａ（ＭＩ００１７２９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６６ｂ（ＭＩ００１９２９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６７（ＭＩ００１７２９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６８（ＭＩ００１７２９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６６９（ＭＩ００１７３００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７０（ＭＩ００１７３０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７１（ＭＩ００１７３０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７２（ＭＩ００１７３０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７３（ＭＩ００１７３０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７４（ＭＩ００１７３０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７５（ＭＩ００１７３０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７６（ＭＩ００１７３０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７７（ＭＩ００１７３０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７８（ＭＩ００１７３０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７９－１（ＭＩ００１７３１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６７９－２（ＭＩ００１７３１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８０（ＭＩ００１７３１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８１（ＭＩ００１７３１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８２（ＭＩ００１７３１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８３（ＭＩ００１７３１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８４（ＭＩ００１７３１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８５（ＭＩ００１７３１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８６（ＭＩ００１７３１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８７（ＭＩ００１７３１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８８（ＭＩ００１７３２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６８９（ＭＩ００１７３２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９０（ＭＩ００１７３２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９１（ＭＩ００１７３２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９２（ＭＩ００１７３２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９３（ＭＩ００１７３２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９４（ＭＩ００１７３２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９５（ＭＩ００１７３２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９６（ＭＩ００１７３２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９７（ＭＩ００１７３３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９８（ＭＩ００１７３３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４６９９（ＭＩ００１７３３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７００（ＭＩ００１７３３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０１（ＭＩ００１７３３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０３（ＭＩ００１７３３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０４（ＭＩ００１７３３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０５（ＭＩ００１７３３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０６（ＭＩ００１７３３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０７（ＭＩ００１７３４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０８（ＭＩ００１７３４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７０９（ＭＩ００１７３４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１０（ＭＩ００１７３４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１１（ＭＩ００１７３４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１２（ＭＩ００１７３４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１３（ＭＩ００１７３４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１４（ＭＩ００１７３４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１５（ＭＩ００１７３４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１６（ＭＩ００１７３５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１７（ＭＩ００１７３５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１８（ＭＩ００１７３５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７１９（ＭＩ００１７３５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２０（ＭＩ００１７３５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２１（ＭＩ００１７３５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２２（ＭＩ００１７３５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２３（ＭＩ００１７３５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２４（ＭＩ００１７３６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２５（ＭＩ００１７３６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２６（ＭＩ００１７３６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２７（ＭＩ００１７３６４

）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２８（ＭＩ００１７３６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７２９（Ｍ
Ｉ００１７３６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３０（ＭＩ００１７３６７）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７３１（ＭＩ００１７３６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３２（ＭＩ００１７３６９
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３３（ＭＩ００１７３７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３４（Ｍ
Ｉ００１７３７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３５（ＭＩ００１７３７２）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７３６（ＭＩ００１７３７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３７（ＭＩ００１７３７４
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３８（ＭＩ００１７３７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７３９（Ｍ
Ｉ００１７３７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４０（ＭＩ００１７３７８）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７４１（ＭＩ００１７３７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４２（ＭＩ００１７３８０
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４３（ＭＩ００１７３８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４４（Ｍ
Ｉ００１７３８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４５（ＭＩ００１７３８４）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７４６（ＭＩ００１７３８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４７（ＭＩ００１７３８６
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４８（ＭＩ００１７３８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７４９（Ｍ
Ｉ００１７３８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５０（ＭＩ００１７３８９）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７５１（ＭＩ００１７３９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５２（ＭＩ００１７３９１
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５３（ＭＩ００１７３９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５４（Ｍ
Ｉ００１７３９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５５（ＭＩ００１７３９５）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７５６（ＭＩ００１７３９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５７（ＭＩ００１７３９８
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５８（ＭＩ００１７３９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７５９（Ｍ
Ｉ００１７４００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６０（ＭＩ００１７４０１）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７６１（ＭＩ００１７４０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６２（ＭＩ００１７４０３
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６３（ＭＩ００１７４０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６４（Ｍ
Ｉ００１７４０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６５（ＭＩ００１７４０６）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７６６（ＭＩ００１７４０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６７（ＭＩ００１７４０８
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６８（ＭＩ００１７４０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７６９（Ｍ
Ｉ００１７４１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７０（ＭＩ００１７４１１）、ｈｓａ－ｍｉ
ｒ－４７７１－１（ＭＩ００１７４１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７１－２（ＭＩ００１
７４１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７２（ＭＩ００１７４１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７
７３－１（ＭＩ００１７４１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７３－２（ＭＩ００１７４１６
）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７４（ＭＩ００１７４１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７５（Ｍ
Ｉ００１７４１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７６－１（ＭＩ００１７４１９）、ｈｓａ－
ｍｉｒ－４７７６－２（ＭＩ００１７４２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７７（ＭＩ００１
７４２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７７８（ＭＩ００１７４２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７
７９（ＭＩ００１７４２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７８０（ＭＩ００１７４２４）、ｈｓ
ａ－ｍｉｒ－４７８１（ＭＩ００１７４２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７８２（ＭＩ００１
７４２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７８３（ＭＩ００１７４２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７
８４（ＭＩ００１７４２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７８５（ＭＩ００１７４３０）、ｈｓ
ａ－ｍｉｒ－４７８６（ＭＩ００１７４３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７８７（ＭＩ００１
７４３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７８８（ＭＩ００１７４３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７
８９（ＭＩ００１７４３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７９０（ＭＩ００１７４３７）、ｈｓ
ａ－ｍｉｒ－４７９１（ＭＩ００１７４３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７９２（ＭＩ００１
７４３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７９３（ＭＩ００１７４４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７
９４（ＭＩ００１７４４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７９５（ＭＩ００１７４４２）、ｈｓ
ａ－ｍｉｒ－４７９６（ＭＩ００１７４４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７９７（ＭＩ００１
７４４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７９８（ＭＩ００１７４４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４７
９９（ＭＩ００１７４４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８００（ＭＩ００１７４４８）、ｈｓ
ａ－ｍｉｒ－４８０１（ＭＩ００１７４４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８０２（ＭＩ００１
７４５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８０３（ＭＩ００１７４５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４８
０４（ＭＩ００１７４５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－４９９９（ＭＩ００１７８６５）、ｈｓ
ａ－ｍｉｒ－５０００（ＭＩ００１７８６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００１（ＭＩ００１

７８６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００２（ＭＩ００１７８６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００３（ＭＩ００１７８６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００４（ＭＩ００１７８７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００６（ＭＩ００１７８７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００７（ＭＩ００１７８７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００８（ＭＩ００１７８７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５００９（ＭＩ００１７８７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０１０（ＭＩ００１７８７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０１１（ＭＩ００１７８７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０４７（ＭＩ００１７９３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０８７（ＭＩ００１７９７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０８８（ＭＩ００１７９７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０８９（ＭＩ００１７９７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９０（ＭＩ００１７９７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９１（ＭＩ００１７９８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９２（ＭＩ００１７９８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９３（ＭＩ００１７９８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９４（ＭＩ００１７９８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９５（ＭＩ００１８００１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５０９６（ＭＩ００１８００４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１００（ＭＩ００１９１１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８６（ＭＩ００１８１６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８７（ＭＩ００１８１６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８８（ＭＩ００１８１６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１８９（ＭＩ００１８１６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９０（ＭＩ００１８１６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９１（ＭＩ００１８１７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９２（ＭＩ００１８１７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９３（ＭＩ００１８１７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９４（ＭＩ００１８１７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９５（ＭＩ００１８１７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９６（ＭＩ００１８１７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５１９７（ＭＩ００１８１７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５７１（ＭＩ００１９１１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５７２（ＭＩ００１９１１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５７９（ＭＩ００１９１３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８０（ＭＩ００１９１３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８１（ＭＩ００１９１３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８２（ＭＩ００１９１３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８３－１（ＭＩ００１９１３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８３－２（ＭＩ００１９１４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８４（ＭＩ００１９１４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８５（ＭＩ００１９１４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８６（ＭＩ００１９１４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８７（ＭＩ００１９１４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８８（ＭＩ００１９１４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５８９（ＭＩ００１９１４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５９０（ＭＩ００１９１５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５５９１（ＭＩ００１９１５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８０（ＭＩ００１９２８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８１ａ（ＭＩ００１９２８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８１ｂ（ＭＩ００１９２９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８２（ＭＩ００１９２８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８３（ＭＩ００１９２８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８４（ＭＩ００１９２８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８５（ＭＩ００１９２８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８７（ＭＩ００１９２９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８８（ＭＩ００１９２９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６８９（ＭＩ００１９２９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９０（ＭＩ００１９２９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９１（ＭＩ００１９２９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９２ａ－１（ＭＩ００１９２９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９２ａ－２（ＭＩ００１９２９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９２ｂ（ＭＩ００１９３１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９２ｃ－１（ＭＩ００１９２８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９２ｃ－２（ＭＩ００１９２８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９３（ＭＩ００１９３００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９４（ＭＩ００１９３０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９５（ＭＩ００１９３０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９６（ＭＩ００１９３０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９７（ＭＩ００１９３０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９８（ＭＩ００１９３０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５６９９（ＭＩ００１９３０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７００（ＭＩ００１９３０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０１－１（ＭＩ００１９３０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０１－２（ＭＩ００１９５９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０２（ＭＩ００１９３０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０３（ＭＩ００１９３１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０４（ＭＩ００１９３１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０５（ＭＩ００１９３１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０６（ＭＩ００１９３１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７０７（ＭＩ００１９３１５）、ｈｓａ－

ｍｉｒ－５７０８（ＭＩ００１９３１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７３９（ＭＩ００１９４１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－５７８７（ＭＩ００１９７９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０６８（ＭＩ００２０３４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０６９（ＭＩ００２０３４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７０（ＭＩ００２０３４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７１（ＭＩ００２０３４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７２（ＭＩ００２０３４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７３（ＭＩ００２０３５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７４（ＭＩ００２０３５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７５（ＭＩ００２０３５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７６（ＭＩ００２０３５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７７－１（ＭＩ００２０３５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７７－２（ＭＩ００２３５６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７８（ＭＩ００２０３５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０７９（ＭＩ００２０３５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８０（ＭＩ００２０３５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８１（ＭＩ００２０３５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８２（ＭＩ００２０３５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８３（ＭＩ００２０３６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８４（ＭＩ００２０３６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８５（ＭＩ００２０３６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８６（ＭＩ００２０３６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８７（ＭＩ００２０３６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８８（ＭＩ００２０３６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８９－１（ＭＩ００２０３６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０８９－２（ＭＩ００２３５６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６０９０（ＭＩ００２０３６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２４（ＭＩ００２１２５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２５（ＭＩ００２１２５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２６（ＭＩ００２１２６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２７（ＭＩ００２１２７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２８（ＭＩ００２１２７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１２９（ＭＩ００２１２７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１３０（ＭＩ００２１２７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１３１（ＭＩ００２１２７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１３２（ＭＩ００２１２７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１３３（ＭＩ００２１２７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１３４（ＭＩ００２１２７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６１６５（ＭＩ００２１４７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６４９９（ＭＩ００２２２０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５００（ＭＩ００２２２１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０１（ＭＩ００２２２１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０２（ＭＩ００２２２１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０３（ＭＩ００２２２１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０４（ＭＩ００２２２１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０５（ＭＩ００２２２１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０６（ＭＩ００２２２１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０７（ＭＩ００２２２１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０８（ＭＩ００２２２２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５０９（ＭＩ００２２２２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１０（ＭＩ００２２２２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１１ａ－１（ＭＩ００２２２２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１１ａ－２（ＭＩ００２３５６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１１ａ－３（ＭＩ００２３５６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１１ａ－４（ＭＩ００２３５６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１１ｂ－１（ＭＩ００２２５５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１１ｂ－２（ＭＩ００２３４３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１２（ＭＩ００２２２２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１３（ＭＩ００２２２２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１４（ＭＩ００２２２２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１５（ＭＩ００２２２２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６５１６（ＭＩ００２５５１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１５ａ（ＭＩ００２２５４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１５ｂ（ＭＩ００２２５４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１６（ＭＩ００２２５５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１７（ＭＩ００２２５５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１８（ＭＩ００２２５５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７１９（ＭＩ００２２５５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２０（ＭＩ００２２５５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２１（ＭＩ００２２５５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２２（ＭＩ００２２５５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２３（ＭＩ００２２５５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２４（ＭＩ００２２５５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２６（ＭＩ００２２５７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２７（ＭＩ００２２５７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２８（ＭＩ００２２５７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７２９（ＭＩ００２２５７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３０（ＭＩ００２２５７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３１（ＭＩ００２２５７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３２（ＭＩ００２２５７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３３（ＭＩ００２２５７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－

６７３４（ＭＩ００２２５７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３５（ＭＩ００２２５８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３６（ＭＩ００２２５８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３７（ＭＩ００２２５８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３８（ＭＩ００２２５８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７３９（ＭＩ００２２５８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４０（ＭＩ００２２５８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４１（ＭＩ００２２５８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４２（ＭＩ００２２５８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４３（ＭＩ００２２５８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４４（ＭＩ００２２５８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４５（ＭＩ００２２５９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４６（ＭＩ００２２５９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４７（ＭＩ００２２５９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４８（ＭＩ００２２５９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７４９（ＭＩ００２２５９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５０（ＭＩ００２２５９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５１（ＭＩ００２２５９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５２（ＭＩ００２２５９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５３（ＭＩ００２２５９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５４（ＭＩ００２２５９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５５（ＭＩ００２２６００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５６（ＭＩ００２２６０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５７（ＭＩ００２２６０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５８（ＭＩ００２２６０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７５９（ＭＩ００２２６０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６０（ＭＩ００２２６０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６１（ＭＩ００２２６０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６２（ＭＩ００２２６０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６３（ＭＩ００２２６０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６４（ＭＩ００２２６０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６５（ＭＩ００２２６１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６６（ＭＩ００２２６１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６７（ＭＩ００２２６１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６８（ＭＩ００２２６１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６９ａ（ＭＩ００２２６１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７６９ｂ（ＭＩ００２２７０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７０－１（ＭＩ００２２６１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７０－２（ＭＩ００２６４１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７０－３（ＭＩ００２６４１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７１（ＭＩ００２２６１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７２（ＭＩ００２２６１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７３（ＭＩ００２２６１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７４（ＭＩ００２２６１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７５（ＭＩ００２２６２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７６（ＭＩ００２２６２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７７（ＭＩ００２２６２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７８（ＭＩ００２２６２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７７９（ＭＩ００２２６２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８０ａ（ＭＩ００２２６２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８０ｂ（ＭＩ００２２６８１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８１（ＭＩ００２２６２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８２（ＭＩ００２２６２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８３（ＭＩ００２２６２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８４（ＭＩ００２２６２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８５（ＭＩ００２２６３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８６（ＭＩ００２２６３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８７（ＭＩ００２２６３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８８（ＭＩ００２２６３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７８９（ＭＩ００２２６３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９０（ＭＩ００２２６３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９１（ＭＩ００２２６３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９２（ＭＩ００２２６３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９３（ＭＩ００２２６３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９４（ＭＩ００２２６３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９５（ＭＩ００２２６４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９６（ＭＩ００２２６４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９７（ＭＩ００２２６４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９８（ＭＩ００２２６４３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６７９９（ＭＩ００２２６４４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８００（ＭＩ００２２６４５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０１（ＭＩ００２２６４６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０２（ＭＩ００２２６４７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０３（ＭＩ００２２６４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０４（ＭＩ００２２６４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０５（ＭＩ００２２６５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０６（ＭＩ００２２６５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０７（ＭＩ００２２６５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０８（ＭＩ００２２６５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８０９（ＭＩ００２２６５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１０（ＭＩ００２２６５５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１１（ＭＩ００２２６５６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１２（ＭＩ００２２６５７）、ｈｓａ－ｍ

ｉｒ－６８１３（ＭＩ００２２６５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１４（ＭＩ００２２６５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１５（ＭＩ００２２６６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１６（ＭＩ００２２６６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１７（ＭＩ００２２６６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１８（ＭＩ００２２６６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８１９（ＭＩ００２２６６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２０（ＭＩ００２２６６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２１（ＭＩ００２２６６６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２２（ＭＩ００２２６６７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２３（ＭＩ００２２６６８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２４（ＭＩ００２２６６９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２５（ＭＩ００２２６７０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２６（ＭＩ００２２６７１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２７（ＭＩ００２２６７２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２８（ＭＩ００２２６７３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８２９（ＭＩ００２２６７４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３０（ＭＩ００２２６７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３１（ＭＩ００２２６７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３２（ＭＩ００２２６７７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３３（ＭＩ００２２６７８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３４（ＭＩ００２２６７９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３５（ＭＩ００２２６８０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３６（ＭＩ００２２６８２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３７（ＭＩ００２２６８３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３８（ＭＩ００２２６８４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８３９（ＭＩ００２２６８５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４０（ＭＩ００２２６８６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４１（ＭＩ００２２６８７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４２（ＭＩ００２２６８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４３（ＭＩ００２２６８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４４（ＭＩ００２２６９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４５（ＭＩ００２２６９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４６（ＭＩ００２２６９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４７（ＭＩ００２２６９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４８（ＭＩ００２２６９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８４９（ＭＩ００２２６９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５０（ＭＩ００２２６９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５１（ＭＩ００２２６９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５２（ＭＩ００２２６９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５３（ＭＩ００２２６９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５４（ＭＩ００２２７００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５５（ＭＩ００２２７０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５６（ＭＩ００２２７０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５７（ＭＩ００２２７０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５８（ＭＩ００２２７０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５９－１（ＭＩ００２２７０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５９－２（ＭＩ００２６４２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８５９－３（ＭＩ００２６４２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６０（ＭＩ００２２７０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６１（ＭＩ００２２７０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６２－１（ＭＩ００２２７０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６２－２（ＭＩ００２６４１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６３（ＭＩ００２２７１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６４（ＭＩ００２２７１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６５（ＭＩ００２２７１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６６（ＭＩ００２２７１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６７（ＭＩ００２２７１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６８（ＭＩ００２２７１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８６９（ＭＩ００２２７１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７０（ＭＩ００２２７１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７１（ＭＩ００２２７１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７２（ＭＩ００２２７１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７３（ＭＩ００２２７２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７４（ＭＩ００２２７２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７５（ＭＩ００２２７２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７６（ＭＩ００２２７２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７７（ＭＩ００２２７２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７８（ＭＩ００２２７２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８７９（ＭＩ００２２７２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８０（ＭＩ００２２７２７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８１（ＭＩ００２２７２８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８２（ＭＩ００２２７２９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８３（ＭＩ００２２７３０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８４（ＭＩ００２２７３１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８５（ＭＩ００２２７３２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８６（ＭＩ００２２７３３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８７（ＭＩ００２２７３４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８８（ＭＩ００２２７３５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８８９（ＭＩ００２２７３６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８９０（ＭＩ００２２７３７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８９１（ＭＩ００２２７３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８９２（ＭＩ００２２７３９）、ｈｓａ－

ｍｉｒ－６８９３（ＭＩ００２２７４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８９４（ＭＩ００２２７４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－６８９５（ＭＩ００２２７４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１０６（ＭＩ００２２９５７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１０７（ＭＩ００２２９５８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１０８（ＭＩ００２２９５９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１０９（ＭＩ００２２９６０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１０（ＭＩ００２２９６１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１１（ＭＩ００２２９６２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１２－１（ＭＩ００２２９６３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１２－２（ＭＩ００２６４１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１３（ＭＩ００２２９６４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１１４（ＭＩ００２２９６５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５０（ＭＩ００２３６１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５１（ＭＩ００２３６１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５２（ＭＩ００２３６１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５３（ＭＩ００２３６１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５４（ＭＩ００２３６１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５５（ＭＩ００２３６１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５６（ＭＩ００２３６１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５７（ＭＩ００２３６１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５８（ＭＩ００２３６１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１５９（ＭＩ００２３６２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１６０（ＭＩ００２３６２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１６１（ＭＩ００２３６１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７１６２（ＭＩ００２３６２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７５１５（ＭＩ００２４３５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６４１－１（ＭＩ００２４９７５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７６４１－２（ＭＩ００２４９７６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７７０２（ＭＩ００２５２３８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７７０３（ＭＩ００２５２３９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７７０４（ＭＩ００２５２４０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７７０５（ＭＩ００２５２４１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７７０６（ＭＩ００２５２４２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４３（ＭＩ００２５５１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４４（ＭＩ００２５５１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４５（ＭＩ００２５５１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４６（ＭＩ００２５５１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４７（ＭＩ００２５５１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４８（ＭＩ００２５５１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８４９（ＭＩ００２５５１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５０（ＭＩ００２５５２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５１（ＭＩ００２５５２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５２（ＭＩ００２５５２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５３（ＭＩ００２５５２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５４（ＭＩ００２５５２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５５（ＭＩ００２５５２５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７８５６（ＭＩ００２５５２６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７３－１（ＭＩ００２５７４８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７３－２（ＭＩ００２５７４９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７４（ＭＩ００２５７５０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７５（ＭＩ００２５７５１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７６（ＭＩ００２５７５２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７７（ＭＩ００２５７５３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－７９７８（ＭＩ００２５７５４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５２（ＭＩ００２５８８８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５３（ＭＩ００２５８８９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５４（ＭＩ００２５８９０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５５（ＭＩ００２５８９１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５６（ＭＩ００２５８９２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５７（ＭＩ００２５８９３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５８（ＭＩ００２５８９４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０５９（ＭＩ００２５８９５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６０（ＭＩ００２５８９６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６１（ＭＩ００２５８９７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６２（ＭＩ００２５８９８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６３（ＭＩ００２５８９９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６４（ＭＩ００２５９００）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６５（ＭＩ００２５９０１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６６（ＭＩ００２５９０２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６７（ＭＩ００２５９０３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６８（ＭＩ００２５９０４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０６９（ＭＩ００２５９０５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７０（ＭＩ００２５９０６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７１－１（ＭＩ００２５９０７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７１－２（ＭＩ００２６４１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７２（ＭＩ００２５９０８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７３（ＭＩ００２５９０９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７４（ＭＩ００２５９１０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７５（ＭＩ００２５９１１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７６（ＭＩ００２５９１２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７７（ＭＩ００２５９１３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７８（ＭＩ００２５９

１４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０７９（ＭＩ００２５９１５）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８０（ＭＩ００２５９１６）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８１（ＭＩ００２５９１７）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８２（ＭＩ００２５９１８）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８３（ＭＩ００２５９１９）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８４（ＭＩ００２５９２０）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８５（ＭＩ００２５９２１）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８６（ＭＩ００２５９２２）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８７（ＭＩ００２５９２３）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８８（ＭＩ００２５９２４）、ｈｓａ－ｍｉｒ－８０８９（ＭＩ００２５９２５）からなる群から選択されるヒトプレマイクロＲＮＡである。例えば、ｍｉＲＢａｓｅ．ｏｒｇに列挙されるプレマイクロＲＮＡを参照のこと。

【０１０１】

いくつかの実施形態において、ハイブリッド分子は、全長の天然プレマイクロＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ハイブリッド分子は、天然のプレマイクロＲＮＡ分子の断片または部分配列を含む。使用が見出される天然プレマイクロＲＮＡ分子の断片または部分配列は、挿入ＲＮＡ分子（例えば、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、アプタマー、触媒ＲＮＡ）がハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子から切断または放出され得るように、エンドリボヌクレアーゼ（例えば、ダイサー）によって認識されアクセスされ得る１つ以上の切断部位を有する。

【０１０２】

ｃ．挿入ＲＮＡ

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、挿入ＲＮＡ配列を含んで、例えば挿入ＲＮＡ配列のインビボ送達またはインビトロでの高レベル産生のための足場として機能し、これは、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子から、例えば、エンドリボヌクレアーゼにより（例えばダイサーにより）切断され得る。いくつかの実施形態では、挿入ＲＮＡ分子（本明細書ではN^1、N^2、N^3、N^4とも呼ばれる）は、約１８個のヌクレオチドから最大約２００個までのヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約１５０個のヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約１２５個のヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約１００個のヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約７５個のヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約５０個のヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約４０個のヌクレオチド、例えば、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約３０個のヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡ分子は、約１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０個のヌクレオチドの長さであり得る。

【０１０３】

適切な場合または所望する場合、挿入ＲＮＡは、標的核酸またはタンパク質の転写または翻訳を防止、低減、または阻害する阻害性核酸であり得る。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、非コードＲＮＡである。いくつかの実施形態において、阻害性核酸は、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）または触媒ＲＮＡである。いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、例えば、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場のプレマイクロＲＮＡ分子に由来する（例えば、相同である）か、または異種である、成熟ｍｉＲＮＡである。いくつかの実施形態において、非コードＲＮＡは、ホメオボックス（ＨＯＸ）アンチセンス遺伝子間ＲＮＡ（ＨＯＴＡＩＲ）である。

【０１０４】
いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子は、例えば、上記および本明細書で同定されたプレｍｉＲＮＡに由来する１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子は、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４からなる群から選択される１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子は、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６からなる群から選択される１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。ハイブリッドｔＲＮＡ／デュアルプレｍｉＲＮＡ分子では、挿入ＲＮＡは同じでも異なってもよい。

【０１０５】
いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、がんの進行または原因に関連するバイオマーカーである。

【０１０６】
肝細胞がんの場合、挿入ＲＮＡは、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２２４から選択される１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。

【０１０７】
膵臓がんの場合、挿入ＲＮＡは、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６から選択される１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。

【０１０８】
肺がんの場合、挿入ＲＮＡは、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４から選択された１つ、２つ、またはそれ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む。

【０１０９】
乳がんの場合、標的ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１０ｂ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２９ｂ、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－１２５ｂ、ｍｉＲ－１４５、ｍｉＲ－１４６、およびｍｉＲ－１５５を含むがこれらに限定されないヒトｍｉＲＮＡから選択され得る。悪性リンパ腫の検出のために、標的ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－２０ａ、ｍｉＲ－１９ｂ、およびｍｉＲ－９２を含むがこれらに限定されないヒトｍｉＲＮＡから選択され得る。さらに、乳房腫瘍は、例えば、ｌｅｔ－７ファミリー、ｍｉｒ－１０ｂ、ｍｉｒ－１８ａ、ｍｉｒ－１０６ａ、ｍｉｒ１２５－ａ、ｍｉｒ１２５－ｂ、ｍｉｒ－１２６、ｍｉｒ－１３０ａ、ｍｉｒ－１４５、ｍｉｒ－１５５、ｍｉｒ－１４１、ｍｉｒ－２１４、ｍｉｒ－２０５、ｍｉｒ－２０６、ｍｉｒ－２１０、ｍｉｒ－１２６、ｍｉｒ－３３５、ｍｉｒ－２１３、ｍｉｒ－２０３、１７－５ｐ、ｍｉＲ－３０、ｍｉｒ－３４、およびｍｉｒ－３４２の非均一なｍｉＲＮＡプロファイルおよびｍｉＲＮＡシグネチャーを含み、乳がんの転帰に影響を及ぼすことが提唱さ

れている。例えば、Ｗｉｅｍｅｒ，Ｅｕｒ．Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ４３：１５２９－１５４４（２００７）を参照のこと。

【０１１０】

結腸直腸がんにおいて、標的ｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ファミリー、ｍｉＲ－１０ａ、ｍｉＲ－２０ａ、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２９ｂ、ｍｉＲ－３１、ｍｉＲ－９６、ｍｉＲ－１３３ｂ、ｍｉＲ－１３５ｂ、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－１４５、ｍｉＲ－１８３、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－１９ｂ、ｍｉＲ－９２を含むが、これらに限定されないヒトｍｉＲＮＡから選択され得る。

【０１１１】

前立腺がんの場合、標的ｍｉＲＮＡは、ｌｅｔ－７ｄ、ｍｉＲ－１２８ａ、ｍｉＲ－１９５、およびｍｉＲ－２０３を含むがこれらに限定されないヒトｍｉＲＮＡから選択することができる。

【０１１２】

さらに、いくつかの追加のｍｉＲＮＡがメラノーマ細胞で差次的に発現し、過剰発現したｍｉＲＮＡのいくつかはメラノーマ細胞の浸潤性を調節しているようである（Ｍａ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｍｕｅｌｌｅｒ ａｎｄ Ｂｏｓｓｅｒｈｏｆｆ，２００９；Ｍｕｅｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｐｈｉｌｉｐｐｉｄｏｕ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｓｅｇｕｒａ ｅｔ ａｌ．，２０１０；Ｓｔａｒｋ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。ｍｉＲＮＡのｍｉＲ－２２１／２２２は、ｐ２７Ｋｉｐｌ／ＣＤＫＮｌＢとｃ－ＫＩＴ受容体のｍＲＮＡレベルを下方制御し、それによって新生物の進行を制御し、そのようながん細胞の増殖を促進し、分化を低減させる（Ｆｅｌｉｃｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．，２００８）。さらに、ｍｉＲ－１３７は、メラノーマの細胞増殖、成熟、および色素沈着の主要制御因子であるＭＩＴＦの発現を下方制御する（Ｂｅｍｉｓ ｅｔ ａｌ．，２００８）。最近、いくつかのｍｉＲＮＡ遺伝子がメラノーマ細胞で差次的に調節され、したがって、がんを引き起こすことが示されている。そのようなｍｉＲＮＡのうちの１つであるｍｉＲ－２１１は、メラノーマで一貫して減少し（Ｍａｚａｒ ｅｔ ａｌ，２０１０を参照）、感受性細胞の浸潤性の増加と高い増殖率に関連している。さらに、エピジェネティック調節されたｍｉＲＮＡ遺伝子のグループ、例えばｍｉＲ－３４ｂ、－４８９、－３７５、－１３２、－１４２－３ｐ、－２００ａ、－１４５、－４５２、－２１、－３４ｃ、－４９６、－ｌｅｔ７ｅ、－６５４、および－５１９ｂが、メラノーマに関連付けられている。

【０１１３】

いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、標的分子または標的ポリペプチドに結合するアプタマーである。例示的なアプタマー標的には、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＦＬＴ１、テオフィリン、およびマラカイトグリーンが含まれるが、これらに限定されない。肝細胞がん細胞上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＨＣＣ－２２－５腫瘍関連抗原（Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃｈｉｍ Ａｃｔａ．２００６ Ａｐｒ；３６６（１－２）：２７４－８０）、およびＫＲＴ２３、ＡＨＳＧおよびＦＴＬ抗原（Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．２００９ Ａｕｇ ２８；２８１（２）：１４４－５０）が含まれるが、これらに限定されない。非小細胞肺がん細胞などの肺がん上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４およびＮＹ－ＥＳＯ－１（Ｇｒａｈ，ｅｔ ａｌ，Ｔｕｍｏｒｉ．（２０１４）１００（１）：６０－８）、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３およびサイクリンＢ１（Ｄａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ．（２０１６）９９：１７２－９）が含まれるが、これらに限定されない。膵臓がん細胞上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＫＩＦ２０Ａ（Ｉｍａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．（２０１１）１０４（２）：３００－７）、ＣＡ １９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、およびＴＡＧ－７２（Ｔｏｓｈｋｏｖ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｐａｎｃｒｅａｔｏｌ．（１９９４）１５（２）：９７－１０３）、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ－カドヘリン（Ｉｍａｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．（２００８）１４（２０）：６４８７－９５）、ＳｉＳｏ細胞で発現する

受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）（Ａｋａｓｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐａｎｃｒｅａｓ（２００３）２６（１）：４９－５５）、およびＳＣ６（Ｌｉｕ，ｅｔ　ａｌ．，ＷｏｒｌｄＪ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．（２００５）１１（４８）：７６７１－５）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１４】

いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、蛍光タンパク質、サイトカイン、成長因子、ホルモン、キナーゼ、核内受容体、Ｇタンパク質共役受容体、エピジェネティック制御因子、転写因子からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、紫色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）、シアン蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、オレンジ色蛍光タンパク質（ＯＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、サファイア型タンパク質から選択される蛍光タンパク質である。いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、インターロイキン（ＩＬ）－１α、ＩＬ－１β、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）α、インターフェロン（ＩＦＮ）α、ＩＦＮβ、ＩＦＮγ、ＴＧＦβ１、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３および遊走阻止因子（ＭＩＦ）から選択されるサイトカインである。いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ（ＰＰＡＲ－γまたはＰＰＡＲＧ）、レチノイン酸受容体（ＲＡＲ）、ビタミンＤ受容体、エストロゲン受容体（ＥＲ）、アンドロゲン受容体（ＡＲ）、グルココルチコイド受容体（ＧＲ）、甲状腺ホルモン受容体（ＴＨＲ）、ファルネソイドＸ受容体（ＦＸＲ）またはＮＲ１Ｈ４（核内受容体サブファミリー１、グループＨ、メンバー４）、肝臓Ｘ受容体（ＬＸＲ）、構成的アンドロスタン受容体（ＣＡＲ）、およびプレグナンＸ受容体（ＰＸＲ）から選択される核内受容体である。いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、アドレノメデュリン（ＡＭ）、アンギオポイエチン（Ａｎｇ）、オートクリン運動因子、骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、上皮成長因子（ＥＧＦ）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）、グリア細胞株由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、成長分化因子－９（ＧＤＦ９）、治癒因子、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）、肝細胞腫由来成長因子（ＨＤＧＦ）、インスリン様成長因子（ＩＧＦ）、遊走刺激因子、ミオスタチン（ＧＤＦ－８）、神経成長因子（ＮＧＦ）および他のニューロトロフィン、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、形質転換成長因子アルファ（ＴＧＦ－α）、形質転換成長因子ベータ（ＴＧＦ－β）、腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）、無翅型ＭＭＴＶ組込み部位（ＷＮＴ）ファミリーのメンバー、胎盤成長因子（ＰＧＦ）、ソマトトロフィン（成長ホルモンまたはＧＨ）、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、およびＩＬ－７から選択される成長因子である。

【０１１５】

いくつかの実施形態において、標的核酸またはポリペプチドは、ｍｉＲ－１２９１、ＡＫＴ２、サイクリンＢｌ、ＭｅＣＰ２、ＦＯＸＡ２、ＡＭＰＫａｌ、前部勾配ホモログ２（ＡＧＲ２）、アルギニノスクシネートシンターゼ（ＡｒＳＳ）、鎖Ｃ、Ｈ３－Ｈ４シャペロンＡＳＦ１の構造、オルニチンアミノトランスフェラーゼ（ＯＡＴ）、ケラチン、ＩＩ型細胞骨格８（ＫＲＴ８）、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ２（ＰＥＰＣＫ２）、エノイル補酵素Ａ（ＣｏＡ）ヒドラターゼ（ＥＣＨＳ１）、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼアイソフォーム１（ＰＳＡＴ１）、ジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼ（ＤＬＡＴ）、ペルオキシレドキシン３、アイソフォームＣＲＡ　ａ（ＰＲＤＸ３）、システインに富むタンパク質２（ＣＲＩＰ２）、鎖Ｃ、ヒトＰＣＮＡ、ファシンホモログ１、アクチン束化タンパク質、アイソフォームＣＲＡ　ａ（ＦＳＣＮ１）、セルピンＨＩ前駆体、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ前駆体、鎖Ａ、ジスルフィドイソメラーゼ関連シャペロンＥＲＰ２９、トリオースホスフェートイソメラーゼアイソ

フォーム２（ＴＰＩＩ）、ペルオキシレドキシン－４（ＰＲＤＸ４）、およびイソシトレートデヒドロゲナーゼ［ＮＡＤ］サブ単位ベータ（ＩＤＨ３Ｂ）、ａ－フェトタンパク質（ＡＦＰ）、ＡＦＰ－Ｌ３％、デス－ガンマ－カルボキシプロトロンビン（ＤＣＰ）、ＣＤＨ１（Ｅ－カドヘリン）、Ｈ３ヒストンのトリメチル化リジン２７（Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３）、ヒストンデアセチラーゼ－１、ヒストンデアセチラーゼ－２、ＳＩＲＴ１、ＣＤ４４、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、ＫＲＡＳ２、またはＲＲＥＢ１、ＡＢＣトランスポーター（例えば、ＡＢＣＣ１、ＡＢＣＧ２、ＡＢＣＢ１、ＡＢＣＣ２、ＡＢＣＣ３、およびＡＢＣＣ４）またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【０１１６】

３．製剤および投与

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場は、目的の挿入ＲＮＡ（例えば、阻害性核酸、アプタマー）を標的細胞の内部へ送達するため、それを必要とする対象（例えば、がん、例えば、肝細胞がん、膵臓がん、肺がんと診断された対象）に投与することができる。一般に、対象は哺乳動物であり、したがって、エンドリボヌクレアーゼ（例えば、ダイサー）を発現する真核細胞を含む。対象の標的真核細胞が一旦ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場でトランスフェクトまたは形質転換されると、標的細胞内のエンドリボヌクレアーゼ（例えば、ダイサー）は、目的の挿入ＲＮＡを切断または放出する。

【０１１７】

いくつかの実施形態において、挿入ＲＮＡは、阻害性核酸（例えば、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、アプタマー）または触媒ＲＮＡである。いくつかの実施形態において、真核細胞においてハイブリッド足場から一度放出された阻害性ＲＮＡは、標的核酸またはポリペプチドの量および／または活性を少なくとも約１０％～約１００％、２０％～約１００％、３０％～約１００％、４０％～約１００％、５０％～約１００％、６０％～約１００％、７０％～約１００％、１０％～約９０％、２０％～約８５％、４０％～約８４％、６０％～約９０％減少させ、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、および９９％などのこれらの範囲内の任意のパーセントの減少を含むがこれらに限定されない。

【０１１８】

特定の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場は、インビボでベクターから発現する。「ベクター」は、目的の核酸を細胞の内部に送達するために使用することができる物質の組成物である。直鎖ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に付随するポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスを含むがこれらに限定されない多数のベクターが当技術分野で知られている。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。発現構築物は、生細胞で複製することができ、または合成的に作製することができる。本出願の目的のため、「発現構築物」、「発現ベクター」、および「ベクター」という用語は、一般的な例示の意味で適用を実証するために互換的に使用され、本発明を限定することを意図しない。

【０１１９】

一実施形態では、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場を発現するための発現ベクターは、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）をコードするポリヌクレオチドに「作動可能に連結された」プロモーターを含む。本明細書で使用される「作動可能に連結された」または「転写制御下」という句は、プロモーターが、ＲＮＡポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するためにポリヌクレオチドに関して正しい位置および方向にあることを意味する。

【０１２０】

特定の実施形態において、目的のポリヌクレオチドをコードする核酸は、プロモーターの転写制御下にある。「プロモーター」は、遺伝子の特異的転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるＤＮＡ配列を指す。ここでは、プロモーターという用語は、ＲＮＡポリメラーゼＩ、ＩＩ、またはＩＩＩの開始部位の周りに集積されている転写制御モジュールのグループを指すために使用される。哺乳動物細胞発現の例示的なプロモーターには、とりわけ、ＳＶ４０初期プロモーター、ＣＭＶ最初期プロモーターなどのＣＭＶプロモーター（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，１６８，０６２号および同第５，３８５，８３９号を参照）、マウス乳腺腫瘍ウイルスＬＴＲプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ）、および単純ヘルペスウイルスプロモーターが含まれる。マウスメタロチオネイン遺伝子に由来するプロモーターなどの他の非ウイルスプロモーターも、哺乳動物の発現に使用されるであろう。これらおよび他のプロモーターは、当技術分野で周知の技術を使用して、市販のプラスミドから得ることができる。例えば、上記のＳａｍｂｒｏｏｋらを参照されたい。エンハンサー要素をプロモーターと組み合わせて使用して、構築物の発現レベルを増加させることができる。例には、Ｄｉｊｋｅｍａ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．（１９８５）４：７６１に記載されているＳＶ４０初期遺伝子エンハンサー、Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９８２ｂ）７９：６７７７に記載されているラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列（ＬＴＲ）に由来するエンハンサー／プロモーターおよびＢｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９８５）４１：５２１に記載されているヒトＣＭＶに由来する要素、例えば、ＣＭＶイントロンＡ配列に含まれる要素など、が含まれる。

【０１２１】

通常、転写ターミネーター／ポリアデニル化シグナルも発現構築物に存在する。そのような配列の例には、上記のＳａｍｂｒｏｏｋらに記載されているようなＳＶ４０に由来する配列、ならびにウシ成長ホルモンターミネーター配列（例えば、米国特許第５，１２２，４５８号を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、５’－ＵＴＲ配列は、その発現を増強するためにコード配列に近接して配置することができる。このような配列には、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）ＵＴＲなどのピコルナウイルスのリーダー配列に存在する配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含むＵＴＲが含まれる（Ｊａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．（１９８９）６３：１６５１－１６６０）。同じく使用される他のピコルナウイルスＵＴＲ配列には、ポリオリーダー配列およびＡ型肝炎ウイルスリーダーおよびＣ型肝炎ＩＲＥＳが含まれる。

【０１２２】

発現ベクターを細胞に導入する方法はいくつかある。特定の実施形態において、発現構築物は、ウイルスまたはウイルスゲノムに由来する操作された構築物を含む。特定のウイルスが受容体を介したエンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的かつ効率的に発現する能力により、それらは外来遺伝子を哺乳動物細胞に導入するための魅力的な候補となっている（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８、Ｎｉｃｏｌａｓ ａｎｄ Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎ，１９８８、Ｂａｉｃｈｗａｌ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６、Ｔｅｍｉｎ，１９８６）。

【０１２３】

インビボ送達のために利用可能な方法のうちの１つは、アデノウイルス発現ベクターの使用を含む。「アデノウイルス発現ベクター」は、（ａ）構築物のパッケージングをサポートすること、および（ｂ）その中にクローン化されたポリヌクレオチドを発現することのために十分なアデノウイルス配列を含む構築物を含むことを意味する。発現ベクターは、遺伝子操作された形態のアデノウイルスを含む。３６ｋＢの直鎖二本鎖ＤＮＡウイルスであるアデノウイルスの遺伝的構成に関する知見により、アデノウイルスＤＮＡの大きな断片を最大７ｋＢの外来配列で置換することができる（Ｇｒｕｎｈａｕｓ ａｎｄ Ｈｏｒｗｉｔｚ，１９９２）。レトロウイルスとは対照的に、アデノウイルスＤＮＡは潜在的な遺伝毒性なしにエピソーム様式で複製できるため、宿主細胞のアデノウイルス感染は染色

体組込みを引き起こさない。また、アデノウイルスは構造的に安定しており、大量な増幅後のゲノム再編成は検出されていない。アデノウイルスは、細胞周期の段階に関係なく、事実上すべての上皮細胞に感染することができる。

【０１２４】

アデノウイルスは、その中サイズのゲノム、操作の容易さ、高力価、広い標的細胞範囲、および高い感染力のために、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に好適である。ウイルスゲノムの両端には、ウイルスＤＮＡの複製およびパッケージングに必要なシスエレメントである１００～２００塩基対の逆方向反復配列（ＩＴＲ）が含まれる。

【０１２５】

複製欠損型であること、または少なくとも条件付きで欠損型になることという要件を除いて、アデノウイルスベクターの性質が実施の成功のために特に重要になるとは考えられていない。アデノウイルスは、４２の異なる既知の血清型またはサブグループＡ～Ｆのいずれかであり得る。サブグループＣのアデノウイルス５型は、使用する条件付き複製欠損アデノウイルスベクターを得るための好ましい出発物質である。これは、アデノウイルス５型が、膨大な生化学的および遺伝的情報が知られているヒトアデノウイルスであり、歴史的にアデノウイルスをベクターとして使用するほとんどの構築物に使用されてきたためである。

【０１２６】

典型的なベクターは複製欠損型であり、アデノウイルスＥ１領域がない。したがって、Ｅ１コード配列が除去された位置に目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入することが最も便利であろう。ただし、アデノウイルス配列内の構築物の挿入位置は重要ではない。目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、Ｋａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６）によって記載されているようにＥ３置換ベクターにおける欠失したＥ３領域の代わりに、またはＥ４領域に（その場合、ヘルパー細胞株またはヘルパーウイルスがＥ４欠損を補完する）挿入することもできる。

【０１２７】

アデノウイルスベクターは、真核生物の遺伝子発現（Ｌｅｖｒｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，１９９１、Ｇｏｍｅｚ－Ｆｏｉｘ ｅｔ ａｌ．，１９９２）およびワクチン開発（Ｇｒｕｎｈａｕｓ ａｎｄ Ｈｏｒｗｉｔｚ，１９９２、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｃ，１９９１）で使用されてきた。最近、動物実験により、組換えアデノウイルスが遺伝子治療に使用できることが示唆された（Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ ａｎｄ Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ，１９９１、Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ ｅｔ ａｌ．，１９９０、Ｒｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９３）。組換えアデノウイルスを異なる組織に投与する研究には、気管注入（Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９１、Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９２）、筋肉内注射（Ｒａｇｏｔ ｅｔ ａｌ．，１９９３）、末梢静脈内注射（Ｈｅｒｚ ａｎｄ Ｇｅｒａｒｄ，１９９３）および脳への定位接種（Ｌｅ Ｇａｌ Ｌａ Ｓａｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，１９９３）が含まれる。

【０１２８】

レトロウイルスベクターは、細胞でハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）を発現させるのにも好適である。レトロウイルスは、逆転写のプロセスによって感染細胞内でＲＮＡを二本鎖ＤＮＡに変換する能力を特徴とする一本鎖ＲＮＡウイルスのグループである（Ｃｏｆｆｉｎ，１９９０）。得られるＤＮＡは、プロウイルスとして細胞染色体に安定して組み込まれ、ウイルスタンパク質の合成を指示する。組込みにより、レシピエント細胞とその子孫にウイルス遺伝子配列が保持される。レトロウイルスゲノムには、キャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ要素をそれぞれコードするｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖの３個の遺伝子が含まれている。ｇａｇ遺伝子の上流にある配列には、ゲノムをビリオンにパッケージングするためのシグナルが含まれている。２個の長い末端反復（ＬＴＲ）配列は、ウイルスゲノムの５’および３’末端に存在する。これらは強力なプロモーターおよびエンハンサー配列を含み、宿主細胞ゲノムへの組込みにも必要である（Ｃｏｆｆｉｎ，１９９０）。

【０１２９】
レトロウイルスベクターを構築するために、目的の遺伝子をコードする核酸を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損のウイルスを産生する。ビリオンを産生するために、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ遺伝子を含むが、ＬＴＲおよびパッケージング要素を含まないパッケージング細胞株が構築される（Ｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３）。レトロウイルスＬＴＲおよびパッケージング配列とともにｃＤＮＡを含む組換えプラスミドがこの細胞株に導入されると（例えば、リン酸カルシウム沈殿により）、パッケージング配列により、組換えプラスミドのＲＮＡ転写産物をウイルス粒子にパッケージングすることができ、それはその後、培地に分泌される（Ｎｉｃｏｌａｓ ａｎｄ Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎ，１９８８、Ｔｅｍｉｎ，１９８６、Ｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９８３）。次に、組換えレトロウイルスを含む培地を収集し、任意で濃縮し、遺伝子導入に使用する。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞型に感染することができる。しかし、組込みおよび安定した発現には宿主細胞の分裂が必要である（Ｐａｓｋｉｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９７５）。

【０１３０】
他のウイルスベクターを発現構築物として使用することができる。ワクシニアウイルス（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８、Ｂａｉｃｈｗａｌ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６、Ｃｏｕｐａｒ ｅｔ ａｌ．，１９８８）、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８、Ｂａｉｃｈｗａｌ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ａｎｄ Ｍｕｚｙｃｓｋａ，１９８４）およびヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターが使用される場合がある。それらは、種々の哺乳類細胞のためにいくつかの魅力的な特性を提供する（Ｆｒｉｅｄｍａｎｎ，１９８９、Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８、Ｂａｉｃｈｗａｌ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６、Ｃｏｕｐａｒ ｅｔ ａｌ．，１９８８、Ｈｏｒｗｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，１９９０）。

【０１３１】
挿入ＲＮＡの切断および発現を行うには、発現構築物を細胞に送達する必要がある。この送達は、細胞株を形質転換するための実験手順のようにインビトロで、または特定の病状の治療のようにインビボまたはエクスビボで達成され得る。送達の１つのメカニズムは、発現構築物が感染性ウイルス粒子にキャプシド形成されるウイルス感染を介するものである。

【０１３２】
発現構築物を培養哺乳動物細胞に導入するためのいくつかの非ウイルス法も企図される。これらには、リン酸カルシウム沈殿（Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ Ｖａｎ Ｄｅｒ Ｅｂ，１９７３、Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｍａ，１９８７、Ｒｉｐｐｅ ｅｔ ａｌ．，１９９０）、ＤＥＡＥ－デキストラン（Ｇｏｐａｌ，１９８５）、エレクトロポレーション（Ｔｕｒ－Ｋａｓｐａ ｅｔ ａｌ．，１９８６、Ｐｏｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８４）、直接マイクロインジェクション（Ｈａｒｌａｎｄ ａｎｄ Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，１９８５）、ＤＮＡをロードしたリポソーム（Ｎｉｃｏｌａｕ ａｎｄ Ｓｅｎｅ，１９８２、Ｆｒａｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，１９７９）およびリポフェクタミン－ＤＮＡ複合体、細胞超音波処理（Ｆｅｃｈｈｅｉｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８７）、高速マイクロインジェクションを使用した遺伝子銃（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９０）、および受容体を介したトランスフェクション（Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８７、Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９８８）が含まれる。これらの技術のいくつかは、インビボまたはエクスビボでの使用にうまく適合させることができる。

【０１３３】
発現構築物が一旦細胞に送達されると、例えば目的の挿入ＲＮＡを含む、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場をコードする核酸は、異なる部位に配置され、発現され得る。特定の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定して組み込まれ得る。この組込みは、相同組換え（遺伝子置換）を介して同種の位置および方向にある場合もあれば、ランダムな非特異的位

置に組み込まれる（遺伝子添加）場合もある。さらに別の実施形態では、核酸は、ＤＮＡの別個のエピソームセグメントとして細胞内に安定して維持され得る。このような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期とは独立して、またはそれと同期して、維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物が細胞にどのように送達されるか、および細胞内のどこに核酸が残るかは、使用される発現構築物の種類に依存する。

【０１３４】

さらに別の実施形態では、発現構築物は、単純に裸の組換えＤＮＡまたはプラスミドから構成され得る。構築物の導入は、細胞膜を物理的または化学的に透過性にする上記の方法のいずれかによって実施することができる。これは特にインビトロでの導入に適用できるが、同様にインビボでの使用にも適用できる。Ｄｕｂｅｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）は、リン酸カルシウム沈殿物の形態でポリオーマウイルスＤＮＡを成体マウスおよび新生マウスの肝臓および脾臓に注入することに成功し、ウイルス複製の活性および急性感染を実証した。Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｙ　ａｎｄ　Ｎｅｓｈｉｆ（１９８６）も、リン酸カルシウムで沈殿したプラスミドを直接腹腔内注射すると、トランスフェクトされた遺伝子が発現することを実証した。目的の遺伝子をコードするＤＮＡも同様の様式でインビボで導入され、遺伝子産物を発現し得ることが想定される。

【０１３５】

裸のＤＮＡ発現構築物を細胞に導入するためのさらに別の実施形態は、微粒子銃が関わり得る。この方法は、ＤＮＡでコーティングされたマイクロプロジェクタイルを高速に加速させて、細胞膜を貫通し細胞を殺さずに細胞に侵入することを可能にする能力に依存している（Ｋｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７）。小粒子を加速させるためのいくつかの装置が開発されてきた。そのような装置の１つは、高電圧放電に依存して電流を生成し、それが駆動力を提供する（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０）。使用されるマイクロプロジェクタイルは、タングステンまたは金ビーズなどの生物学的に不活性な物質で構成される。

【０１３６】

いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ構築物は、リポソーム内にパッケージされ、送達される。リポソームは、リン脂質二重膜および内部の水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水溶液に懸濁されると自然に形成される。脂質成分は、閉じた構造を形成する前に自己再配列し、脂質二重層の間に水および溶解した溶質を封入する（Ｏｈｏｓｈ　ａｎｄ　Ｂａｃｈｈａｗａｔ，１９９１）。リポフェクタミン－ＤＮＡ複合体も企図される。一実施形態では、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ構築物は、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、例えば、リポソーム分岐ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリプレックス（ＬＰＰ）またはインビボジェットＰＥＩ（ＩＰＥＩ）と複合体を形成する。いくつかの実施形態において、ｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ構築物は、約１０，０００Ｄａの平均分子量を有する分岐ポリエチレンイミンと複合体を形成する。次に、複合体は、脂質二重層にカプセル化することができ、脂質二重層は例えば、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＭＡ）、コレステロールおよび１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）の混合物含む。

【０１３７】

特定の実施形態において、リポソームは、血球凝集ウイルス（ＨＶＪ）と複合体を形成し得る。これは、細胞膜との融合を促し、リポソームにカプセル化されたＤＮＡの細胞侵入を促進することが示されている（Ｋａｎｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９）。他の実施形態において、リポソームは、核の非ヒストン染色体タンパク質（ＨＭＧ－１）と複合体を形成するか、またはそれと組み合わせて使用され得る（Ｋａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１）。さらに別の実施形態では、リポソームは、ＨＶＪおよびＨＭＧ－１の両方と複合体を形成するか、またはそれらと組み合わせて使用され得る。このような発現構築物が、インビトロおよびインビボでの核酸の導入および発現に首尾よく使用されているという点で、

それらは適用可能である。細菌プロモーターがＤＮＡ構築物に使用される場合、リポソーム内に適切な細菌ポリメラーゼを含めることも望ましいであろう。

【０１３８】

特定のｌｎｃＲＮＡまたは阻害剤をコードする核酸を細胞に送達するために使用することができる他の発現構築物は、受容体媒介送達担体である。これらは、ほとんどすべての真核細胞における受容体を介したエンドサイトーシスによるマクロ分子の選択的取り込みを利用する。種々の受容体の細胞型特異的分布のために、送達は非常に特異的となり得る（Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ，１９９３）。

【０１３９】

受容体を介した遺伝子標的指向化担体は、一般に、細胞受容体に特異的なリガンドおよびＤＮＡ結合剤の２つの成分で構成される。受容体を介した遺伝子導入には、いくつかのリガンドが使用されている。最も広く特徴付けられているリガンドは、アシアロオロソムコイド（ＡＳＯＲ）（Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ，１９８７）およびトランスフェリン（Ｗａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０）である。最近、ＡＳＯＲと同じ受容体を認識する合成ネオ糖タンパク質が遺伝子送達担体として使用され（Ｆｅｒｋｏｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９３、Ｐｅｒａｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４）、上皮成長因子（ＥＧＦ）も扁平上皮がん細胞への遺伝子送達に使用されている（Ｍｙｅｒｓ，ＥＰＯ　０２７３０８５）。

【０１４０】

他の実施形態において、送達担体は、例えば、腫瘍関連抗原に特異的に結合する、カプセル化粒子および外部標的指向化リガンドを含み得る。例えば、Ｎｉｃｏｌａｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）は、ガラクトース末端アシアルガングリオシドであるラクトシルセラミドをリポソームに取り込んで用い、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加を観察した。したがって、特定の遺伝子をコードする核酸はまた、リポソームを伴うまたは伴わない任意の数の受容体－リガンド系によって細胞型に特異的に送達され得ることも実行可能である。ハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ構築物をＨＣＣ細胞に送達するための例示的な腫瘍関連抗原または表面抗原には、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＦＬＴ１、テオフィリン、およびマラカイトグリーンが含まれるが、これらに限定されない。肝細胞がん細胞上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＨＣＣ－２２－５腫瘍関連抗原（Ｚｈｏｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃｈｉｍ　Ａｃｔａ．２００６　Ａｐｒ；３６６（１－２）：２７４－８０）、およびＫＲＴ２３、ＡＨＳＧおよびＦＴＬ抗原（Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔ．２００９　Ａｕｇ　２８；２８１（２）：１４４－５０）が含まれるが、これらに限定されない。非小細胞肺がん細胞などの肺がん上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４およびＮＹ－ＥＳＯ－１（Ｇｒａｈ，ｅｔ　ａｌ，Ｔｕｍｏｒｉ．（２０１４）１００（１）：６０－８）、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３およびサイクリンＢ１（Ｄａｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌｕｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ．（２０１６）９９：１７２－９）が含まれるが、これらに限定されない。膵臓がん細胞上の例示的な腫瘍関連抗原は、アプタマー標的となり、例えば、ＫＩＦ２０Ａ（Ｉｍａｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ．（２０１１）１０４（２）：３００－７）、ＣＡ１９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、およびＴＡＧ－７２（Ｔｏｓｈｋｏｖ，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ　Ｊ　Ｐａｎｃｒｅａｔｏｌ．（１９９４）１５（２）：９７－１０３）、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ－カドヘリン（Ｉｍａｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．（２００８）１４（２０）：６４８７－９５）、ＳｉＳｏ細胞で発現する受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）（Ａｋａｓｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐａｎｃｒｅａｓ（２００３）２６（１）：４９－５５）、およびＳＣ６（Ｌｉｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｗｏｒｌｄ　Ｊ　Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．（２００５）１１（４８）：７６７１－５）が含まれるが、これらに限定されない。他のＴＡＡが知られており、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場の製剤および標的送達に使用されている。

【０１４１】

特定の例において、オリゴヌクレオチドは、カチオン性脂質と組み合わせて投与され得

る。カチオン性脂質の例には、リポフェクチン、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、およびＤＯＴＡＰが含まれるが、これらに限定されない。参照により具体的に組み込まれるＷＯ００／７１０９６の刊行物は、遺伝子治療に効果的に使用することができるＤＯＴＡＰ、コレステロールまたはコレステロール誘導体製剤などの異なる製剤を記載している。他の開示もまた、ナノ粒子および投与方法を含む異なる脂質またはリポソーム製剤について考察しており、これらには、米国特許公開第２００３／０２０３８６５号、同第２００２／０１５０６２６号、同第２００３／００３２６１５号、および同第２００４／００４８７８７号が含まれるが、これらに限定されない。これらは、核酸の投与および送達の製剤およびその他の関連する態様を開示する範囲で参照により具体的に組み込まれる。粒子を形成するために使用される方法は、米国特許第５，８４４，１０７号、同第５，８７７，３０２号、同第６，００８，３３６号、同第６，０７７，８３５号、同第５，９７２，９０１号、同第６，２００，８０１号、および同第５，９７２，９００号にも開示されており、これらはこれらの態様について参照により組み込まれる。

【０１４２】

特定の実施形態において、遺伝子導入は、エクスビボ条件下でより容易に実施され得る。エクスビボ遺伝子治療とは、動物からの細胞の単離、インビトロでの細胞への核酸の送達、そして続いて、改変された細胞を動物に戻すことを指す。これには、動物からの組織／器官の外科的除去、または細胞および組織の初代培養が含まれる場合がある。

【０１４３】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物も含まれる。臨床応用が企図される場合、医薬組成物は、意図された用途に適切な形態で調製されるであろう。一般に、これは、パイロジェン、および人間または動物に有害であり得る他の不純物を本質的に含まない組成物の調製を必要とするであろう。

【０１４４】

マクロ分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散システム、および水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む脂質系システムは、本明細書に記載のハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場の送達担体として使用することができる。心筋組織および平滑筋組織などの組織に核酸を送達するのに好適な市販の脂肪エマルジョンには、Ｉｎｔｒａｌｉｐｉｄ、Ｌｉｐｏｓｙｎ、ＬｉｐｏｓｙｎＩＩ、ＬｉｐｏｓｙｎＩＩＩ、Ｎｕｔｒｉｌｉｐｉｄ、および他の同様の脂質エマルジョンが含まれる。インビボでの送達担体として使用する１つのコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。そのようなシステムの調製および使用は、当技術分野でよく知られている。例示的な製剤は、米国特許第５，９８１，５０５号、米国特許第６，２１７，９００号、米国特許第６，３８３，５１２号、米国特許第５，７８３，５６５号、米国特許第７，２０２，２２７号、米国特許第６，３７９，９６５号、米国特許第６，１２７，１７０号、米国特許第５，８３７，５３３号、米国特許第６，７４７，０１４号、およびＷＯ０３／０９３４４９にも開示されており、これらは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１４５】

一般に、適切な塩および緩衝液を使用して、送達担体を安定させ、標的細胞による取り込みを可能にすることが望まれるであろう。組換え細胞が患者に導入される場合、緩衝液も使用される。水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散された有効量の送達担体を含むことができる。「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」という句は、動物またはヒトに投与された場合に有害、アレルギー、または他の有害な反応を生じない分子実体および組成物を指す。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」には、ヒトへの投与に好適な医薬などの医薬の製剤に使用するために許容される、溶媒、緩衝液、溶液、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的に活性な物質用のこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野でよく知られている。従来の媒体または薬剤がハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ足場と適合しない場合を除いて、治療用組成物での使用が

企図されている。補足的な活性成分もまた、それらが組成物の核酸を不活性化しないという条件で、組成物に組み込むことができる。

【０１４６】

注射用途またはカテーテル送達に好適な剤形には、例えば、無菌の水溶液または分散液、および無菌の注射液または分散液の即時調製用の無菌粉末が含まれる。一般に、これらの調製物は、無菌でかつ容易に注射可能な程度まで流動性である。調製物は、製造および保管の条件下で安定である必要があり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護される必要がある。適切な溶媒または分散媒体は、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、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含み得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散の場合に必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、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、チメロサールなどによってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物での使用によってもたらすことができる。

【０１４７】

無菌の注射液は、必要に応じて任意の他の成分（例えば、上に列挙したもの）とともに適切な量の活性化合物を溶媒に組み入れた後、濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、例えば上記に列挙したように、基本的な分散媒体および所望の他の成分を含む滅菌担体に種々の滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。無菌注射液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法には、予め滅菌濾過された溶液から活性成分の粉末に加えて任意の所望する追加成分を得る真空乾燥および凍結乾燥の技術が含まれる。

【０１４８】

組成物は、中性または塩の形態で製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、例えば、無機酸（例えば、塩酸またはリン酸、または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）に由来する酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成される）が含まれる。タンパク質の遊離カルボキシル基で形成される塩は、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または鉄の水酸化物）または有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど）からも誘導することができる。

【０１４９】

製剤時に、溶液は、好ましくは、投与製剤と適合する方法で、治療的に有効であるような量で投与される。製剤は、注射液、薬物放出カプセルなどのような種々の剤形で容易に投与することができる。例えば、水溶液での非経口投与の場合、溶液は一般に好適に緩衝化され、液体希釈剤は最初に、例えば十分な生理食塩水またはグルコースで等張にされる。このような水溶液は、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、肝内、腫瘍内および腹腔内の投与に使用することができる。好ましくは、特に本開示に照らして、当業者に知られているように、無菌の水性媒体が使用される。実例として、単回投与は、１ｍｌの等張ＮａＣｌ溶液に溶解し、１０００ｍｌの皮下注入液に添加されるか、または注入の候補部位に注射され得る（例えば、“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ” １５th Ｅｄｉｔｉｏｎ，ｐａｇｅｓ１０３５－１０３８ ａｎｄ １５７０－１５８０を参照）。治療される対象の状態に応じて、投与量にいくらかの変動が必然的に生じる。いずれにせよ、投与の責任者は、個々の対象に適切な用量を決定する。さらに、ヒトの投与では、調製物は、ＦＤＡ生物製剤局の基準で要求されるように、無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性および純度の基準を満たす必要がある。

【０１５０】

当業者は、過度の実験なしに、阻害性核酸または発現ベクターをインビトロまたはイン

ビボで標的細胞に送達するための適切なシステムを選択し使用することができるであろう。
【０１５１】
ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、白金配位複合体を含む化学療法に対する応答性を増強または増加させるために、がんを患う対象に投与され得る。代替の実施形態において、がんは、化学療法レジメンによる治療に耐性のものである。「化学療法に耐性」とは、がんが化学療法による治療に実質的に反応しないことを意味する。このような耐性のあるがんおよびがんの同定
【０１５２】
いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、標準的な化学療法または骨髄移植または他の新興治療または新規の標的療法の後に失敗した（再発した）対象を治療するために使用され得る。「治療する」、「治療」または「治療すること」とは、疾患症状の発症を予防もしくは遅延させること、および／または疾患症状の重症度もしくは頻度を軽減すること、および／または寛解を延長すること、および／または再発の頻度もしくは重症度を減らすことを含む、がんに関連する症状を改善することを意味する。いくつかの実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、白金配位錯体を含む化学療法と組み合わせて（例えば、白金配位錯体を含む化学療法の前にまたはそれと同時に）対象に投与することができる。
【０１５３】
ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、単独で、または他の化合物（例えば、化学療法剤）と組み合わせて、リポソーム、アジュバント、または任意の薬学的に許容される担体の存在下で、哺乳動物、例えば、ヒト、ウシ、ヒツジなどへの投与に好適な形態で提供され得る。必要に応じて、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）による治療を、従来および既存の、または新興のがん治療と、例えば、国際公開第２０１１／０３８１４２号に記載されているがん特異的ペプチドを使用する標的化学療法と、組み合わせることができる。
【０１５４】
ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、慢性的または断続的に投与され得る。「慢性」投与とは、初期の治療効果（活性）を長期間維持するために、急性モードではなく連続モードでの薬剤の投与を指す。「断続的な」投与は、中断することなく連続して行われるのではなく、本質的に周期的な治療である。代替の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、そのような阻害剤を必要とする対象、例えば、がんと診断された対象またはがんと疑われる対象に投与される。
【０１５５】
代替の実施形態では、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、当技術分野で知られている種々の方法によって、がん細胞に効果的に送達され得る。このような方法には、リポソームのカプセル化／送達、ベクター系遺伝子導入、細胞標的指向化のためのペプチドまたは免疫グロブリン配列（例えば、国際公開第２０１１／０３８１４２号に記載されているペプチド）への融合その他の技術が含まれるが、これらに限定されない。好適なウイルスベクターには、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターが含まれる。代替の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）もまた、当業者に周知の医薬組成物に製剤され得る。これらには、リポソーム製剤、および阻害性核酸の送達を増強し得るシクロデキストリンなどの他の薬剤または担体／賦形剤との組み合わせが含まれる。代替の実施形態において、好適な担体には、安定化された核酸－脂質粒子（例えば、ＳＮＡＬＰまたはＳＰＬＰ）、カチオン性脂質またはリポソーム核酸複合体（すなわち、リポプレックス）、リポソーム、ミセル、ビロソームまたはこれらの混合物などの脂質系担体が含まれる。他の実施形

態では、担体システムは、カチオン性ポリマー－核酸複合体（すなわち、ポリプレックス）などのポリマー系担体システムである。代替の実施形態では、担体システムは、シクロデキストリンポリマー－核酸複合体などのシクロデキストリン系担体システムである。さらなる実施形態において、担体システムは、カチオン性ペプチド－核酸複合体などのタンパク質系担体システムである。

【０１５６】

好適な担体が当技術分野で知られており、２００７年７月２６日に公開された米国特許出願第２００７／０１７３４７６号、２００５年１月１３日に公開された第２００５／０００８６１７号、２００５年１月２０日に公開された第２００５／００１４９６２号、２００５年３月２４日に公開された第２００５／００６４５９５号、２００６年１月１２日に公開された第２００６／０００８９１０号、２００６年３月９日に公開された第２００６／００５１４０５号、２００６年４月２０日に公開された第２００６／００８３７８０号、２００５年１月１３日公開された第２００５／０００８６８９号、２００７年７月２６日に公開された第２００７／０１７２９５０号、２００６年９月５日にＬｅｗｉｓらに交付された米国特許第７，１０１，９９５号、２００７年５月２２日にＭｏｎａｈａｎらに交付された第７，２２０，４００号、１９９８年１月６日にＢａｌｌｙらに交付された第５，７０５，３８５号、１９９９年１０月１２日にＷａｓａｎらに交付された第５，９６５，５４２号、２００１年９月１１日にＳｅｍｐｌｅらに交付された第６，２８７，５９１号に記載されているが、これらに限定されない。これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１５７】

一実施形態では、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）を含む核酸脂質粒子が提供される。上記の参照文献に加えて、好適な核酸－脂質粒子およびそれらの使用は、米国特許第６，８１５，４３２号、同第６，５８６，４１０号、および第同６，５３４，４８４号に記載されている。

【０１５８】

従来の薬務を用いて、がんに罹患している、がんのリスクがある、またはがんの発症前の対象に、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）を投与するための好適な製剤または組成物を提供することができる。好適な医薬組成物は、当技術分野で知られている手段によって製剤化され、それらの投与様式および用量は、熟練医によって決定される。任意の適切な投与経路、例えば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、脳室内、尿道内、腹腔内、肝内、腫瘍内、鼻腔内、エアロゾル、経口投与、または選択された治療に好適な任意の様式を使用することができる。治療用製剤は、液体溶液または懸濁液の形態であり得る。経腸投与の場合、化合物は、錠剤、カプセルで投与するか、または液体の形態で溶解することができる。テーブルまたはカプセルは、腸溶コーティングされているか、または徐放製剤であり得る。鼻腔内製剤の場合、粉末、点鼻薬、またはエアロゾルの形態。非経口投与の場合、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、滅菌水または生理食塩水、またはビタミンＫに使用されるものなどの非水溶性ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の投与に使用される薬学的に許容される担体に溶解し得る。好適な製剤には、がん細胞への標的送達、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の改善された血清半減期／安定性、改善された細胞内浸透および細胞質送達、インビボ活性の改善された持続性、有効性に必要な用量の減少、必要な投薬頻度の減少などの望ましい医薬特性を有するものが含まれる。代替の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）のリポソームナノ粒子系の投薬製剤は、当業者に周知の方法であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび／またはＲＮＡｉ（ｓｉＲＮＡ）系の薬剤を含む他のオリゴヌクレオチド系の試薬／治療薬の医薬製剤の調製のために現在実施されている方法を用いて調製することができる。代替の実施形態では、例えばレンチウイルス系ベクターを使用して、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含

むもの）を標的細胞（例えば、がん細胞）に形質導入するための遺伝子治療アプローチを使用することができる。

【０１５９】

例えば、製剤を作るための当技術分野で周知の方法は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｌｏｙｄ，ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，２２ｎｄ ｅｄ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ，（２０１２）に見出される。非経口投与用の製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水、または生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物起源の油、または水素添加ナフタレンを含み得る。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマーを使用して、化合物の放出を制御することができる。他の潜在的に有用な非経口送達システムには、エチレン－酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入システム、およびリポソームが含まれる。吸入用製剤には、例えばラクトースなどの賦形剤を含み得るか、または例えばポリオキシエチレン－９－ラウリルエーテル、グリココレートおよびデオキシコレートを含む水溶液であり得るか、または点鼻の形態で、またはゲルとしての投与用油性溶液であり得る。治療用組成物または予防用組成物の場合、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、がんを停止または遅延させるか、分化を促進するか、または自己複製を阻害もしくは減少させるか、またはがん細胞の生着または転移を阻害もしくは減少させるのに十分な量で個体に投与される。

【０１６０】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の「有効量」は、治療有効量または予防有効量を含む。「治療有効量」とは、がんの治療または分化の促進、あるいは自己複製の阻害もしくは減少またはがん細胞の生着もしくは転移の阻害もしくは減少などの所望の治療結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。増加または減少は、対照または参照対象、サンプルまたは化合物と比較した場合、１０％～９０％であり、例えば、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％であり、または１００％超であり、例えば、２００％、３００％、５００％またはそれ超であり得る。

【０１６１】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の治療有効量は、各対象の疾患状態、年齢、性別、および体重などの要素、および個体において望ましい反応を誘発するためのハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の能力によって変化し得る。投与計画は、最適な治療反応を提供するように調整することができる。治療上有効量はまた、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の毒性作用または有害作用より、治療的に有益な効果が上回る量である。「予防的有効量」とは、がんの予防もしくは防御または分化の促進、自己複製の阻害もしくは減少またはがん細胞の生着もしくは転移の阻害または減少などの所望の予防的結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。典型的には、予防的用量は、疾患の前または初期段階の対象において使用されるため、予防的有効量は、治療的有効量よりも少なくなり得る。代替の実施形態において、投薬量は、対象ががんから寛解しているか否かに応じて調整され得る。治療的有効量または予防的有効量のハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の好ましい範囲は、０．１ｎＭ～０．１Ｍ、０．１ｎＭ～０．０５Ｍ、０．０５ｎＭ～１５μＭまたは０．０１ｎＭ～１０μＭの任意の整数であり得る。代替の実施形態において、対象に投与される治療有効量または予防有効量は、対象の体重ｋｇあたり約５～約３０００マイクログラムの範囲、またはそれらの間の任意の数であり得る。

【０１６２】

代替の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、がん細胞に存在する標的核酸またはポリペプチドの量よりも１０％～９９％多い量、またはより一般には、がん細胞に存在する量よりも少なくとも１

０％、２０％、３０％、４０％、５０、５５％、もしくは６０％、または少なくとも６５％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％、または９６％、９７％、９８％、または９９％多い量で提供される。代替の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、がん細胞に存在する量よりも０．５～５０倍多い量、またはより一般的には、がん細胞に存在する量よりも少なくとも０．５、１、１．５、２、５、１０、２０、２５、３０、３５、４０、４５倍多い量で提供される。代替の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、非がん性膀胱細胞に存在する量または正常な膀胱細胞に存在する量と同等の量で提供される。

【０１６３】

投与量の値は、緩和されるべき状態の重症度によって変化する可能性があることに留意されたい。任意の特定の対象について、特定の投与計画は、個々の必要性、および組成物の投与を投与または監督する人の専門的判断に従って、経時的に調整することができる。本明細書に記載の投与量範囲は単なる例示であり、医師によって選択され得る投与量範囲を制限するものではない。組成物中の活性化合物の量は、病状、年齢、性別、および個体の体重などの要因によって異なり得る。投与計画は、最適な治療反応を提供するように調整することができる。例えば、単一のボーラスを投与することができ、いくつかの分割された用量を経時的に投与することができ、または治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例して減少または増加させることができる。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、単位剤形で非経口組成物を製剤することが有利であり得る。

【０１６４】

４．併用治療

種々の実施形態において、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、１つ以上の化学療法剤または抗がん剤と同時投与される。

【０１６５】

ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子と同時投与することができる化学療法剤または抗がん剤の例は、当技術分野で知られており、アルキル化剤（例えば、窒素マスタード、窒素尿素、エチレンイミン、メチルメラミン、アルキルスルホネート、カルムスチン、トリアゼン）、白金配位錯体（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、およびオキサリプラチン）、抗代謝物（例えば、葉酸類似体（例えば、メトトレキサート）、ピリミジン類似体（例えば、カペシタビン、５－フルオロウラシル、５－フルオロデオキシウリシン、５－フルオロデオキシウリシン一リン酸、シトシンアラビノシド、５－アザシチジン、ゲムシタビン）、プリン類似体（例えば、メルカプトプリン、チオグアニン、アザチオプリン、ペントスタチン、エリスロヒドロキシノニルアデニン、フルダラビン、クラドリビン）、植物アルカロイドおよび／またはテルペノイド、ビンカアルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、およびビンデシン）、ポドフィロトキシン（例えば、エトポシドおよびテニポシド）、カンプトテシン（例えば、イリノテカンおよびトポテカン）、アントラサイクリン、アロマターゼ阻害剤、タキサン（例えば、パクリタキセル（アルブミン結合パクリタキセル（ｎａｂ－パクリタキセル）を含む）、タキソールおよびドセタキセル）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、（タイプＩ阻害剤：イリノテカンおよびトポテカンを含むカンプトテシン、タイプＩＩ阻害剤：アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、およびテニポシド）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン）、ホルモン、分化剤、キナーゼ阻害剤（例えば、ベバシズマブ、ＢＩＢＷ２９９２、セツキシマブ、イマチニブ、トラスツズマブ、ゲフィチニブ、ラニビズマブ、ペガプタニブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、スニチニブ、エルロチニブ、ニロチニブ、ラパチニブ、パニツムマブ、バンデタニブ、Ｅ７０８０、パゾパニブ、ムブリチニブおよびホスタマチニブ）、および抗悪性腫瘍剤（例えば、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、フルダラビンおよびブレオマイシン）を含むが、これらに限定されない。目的のがんを治療するために使用されている化学療法剤または抗がん剤は、ハ

イブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子との併用療法レジメンで同時投与することができる。使用される化学療法剤または抗がん剤は当技術分野で知られており、参照文献、例えば、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ’ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，７１ｓｔ Ｅｄ．，２０１７，PDR Ｎｅｔｗｏｒｋ ｏｒ Ｂｒｕｎｔｏｎ ａｎｄ Ｋｎｏｌｌｍａｎｎ，Ｇｏｏｄｍａｎ ＆ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，１３ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２０１７，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌに記載されている。

【０１６６】

一実施形態では、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、ゲムシタビンおよびパクリタキセル、例えば、ナノ粒子アルブミン結合パクリタキセル（「ｎａｂ－パクリタキセル」）と同時投与される。

【０１６７】

５．モニタリングの方法

例えば、化学療法剤または抗がん剤と組み合わせて、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）による治療的および予防的治療の有効性を決定する際に、種々の方法を用いることができる。一般的に、有効性とは、有意な毒性なしに効果を生み出す能力である。有効性は、治療が所与の介入に治療的効果または予防的効果を提供することを示す（介入の例には、医薬製剤の投与、医療デバイスの使用、または外科的処置の使用を含むことができるが、これらに限定されない）。有効性は、治療を受けた個体と治療を受けていない個体の比較、または治療前後の同じ個体の比較によって測定できる。治療の有効性は、薬理学的研究、診断研究、予測研究、および予後研究を含む種々の方法を使用して決定することができる。有効性の指標の例には、腫瘍細胞増殖の阻害および腫瘍細胞死の促進が含まれるが、これらに限定されない。

【０１６８】

抗がん治療の有効性は、当技術分野で知られている種々の方法によって評価することができる。ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）は、例えば、化学療法剤または抗がん剤と組み合わせて、未治療またはプラセボの対照と比較して、動物モデルにおける予防効果または治療効果についてスクリーニングすることができる。次に、例えば、そのようなスクリーニングによって同定された化学療法剤または抗がん剤と組み合わせたハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）を、腫瘍細胞死または免疫系活性化の増強を誘導する能力について分析することができる。例えば、血清の複数の希釈物を培養中の腫瘍細胞株で試験することができ、細胞死または細胞増殖の阻害を調べるための標準的な方法を使用することができる（例えば、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．Ｅｄｉｔｏｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＵＳＡ，１９８４－２０１８、およびＡｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．Ｅｄｉｔｏｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＵＳＡ，１９８４－２０１８、Ｂｏｎｉｆａｃｉｎｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｄｉｔｏｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＵＳＡ，ｔｈｒｏｕｇｈ ２０１８を参照のこと。これらはすべて参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。

【０１６９】

これらの方法は、種々のがんに罹患している患者、または罹患しやすい患者の阻害疾患を検出するために提供される。症状のある患者の治療的治療と無症状の患者の予防的治療の両方を監視するために、種々の方法が使用され得る。

【０１７０】

モニタリング方法は、例えば化学療法剤または抗がん剤と組み合わせて、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の投与量を投与す

る前に患者の腫瘍量のベースライン値を決定し、これを治療後の腫瘍量の値と比較することをそれぞれ伴う。

【０１７１】

例えば化学療法剤または抗がん剤と組み合わせてハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）を使用する治療に関して、腫瘍量の値の有意な（すなわち、そのような測定値の平均からの１標準偏差として表される、同一サンプルの反復測定における通常の実験誤差範囲よりも大きい）減少は、ポジティブな治療結果（すなわち、例えば化学療法剤または抗がん剤との組み合わせによるハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の投与が、腫瘍の成長および／または転移の進行を遮断もしくは阻害し、または低下させた）を示す。

【０１７２】

他の方法では、腫瘍量の対照値（例えば、平均および標準偏差）は、例えば、化学療法剤または抗がん剤との併用でハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）による治療を受けた個体の対照集団から決定される。患者の腫瘍量の測定値を対照値と比較する。患者の測定レベルが対照値と有意に差異がない場合（例えば、複数の標準偏差）、治療を中止することができる。患者の腫瘍量レベルが対照値を有意に上回る場合は、薬剤の継続投与が必要である。

【０１７３】

他の方法では、現在治療を受けていないが過去に治療過程を受けた患者を腫瘍量についてモニタリングし、治療の再開が必要か否かを決定する。患者の腫瘍量の測定値は、過去の治療過程後に患者が過去に得た腫瘍量の値と比較することができる。過去の測定と比較して腫瘍量が有意に減少している（つまり、同一サンプルの反復測定における通常の誤差範囲よりも大きい）ことは、治療を再開することができることを示す。あるいは、患者の測定値を一連の治療を受けた後に患者の母集団で決定された対照値（平均と標準偏差）と比較することができる。あるいは、患者の測定値を、疾患の症状が依然ない予防的治療を受けた患者の集団、または疾患特徴の改善を示す治療的治療を受けた患者の集団の対照値と比較することができる。これらすべての場合において、対照レベルと比較して腫瘍量が有意に増加している（すなわち、標準偏差を上回る）ことは、患者の治療を再開する必要があることを示す。

【０１７４】

分析用の組織サンプルは、通常、患者の血液、血漿、血清、粘膜、組織生検、腫瘍、腹水、または脳脊髄液である。サンプルは、新生物の兆候について分析することができる。新生物または腫瘍量は、当技術分野で知られている任意の方法、例えば、資格のある病理医による生検の視覚的観察、または他の視覚化技術、例えば、ラジオグラフィー、超音波、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）を使用して検出することができる。

【０１７５】

さらに、例えば、化学療法剤または抗がん剤と組み合わせて、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の投与量を投与する前の患者の腫瘍量に関連する免疫系活性のレベルは、治療後の腫瘍量に関連する免疫系活性の値とそれぞれ比較することができる。

【０１７６】

免疫系活性の強化を伴う治療に関して、免疫応答シグナル値の有意な（すなわち、そのような測定値の平均からの１標準偏差として表される、同一サンプルの反復測定における通常の実験誤差範囲よりも大きい）増加は、ポジティブな治療結果（すなわち、例えば化学療法剤または抗がん剤と組み合わせた、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、挿入ＲＮＡを含むもの）の投与が、免疫応答を達成または増強した）を示す。免疫応答シグナルには、例えば、ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）のリンパ腫特異的細胞毒性効果の増強を評価することが含まれるが、これに限定されない。免疫応答シグナルの値が有意に変化しない、または減少する場合は、陰性の治療結果が示される。一般に、免疫原性薬剤による最初の治療過程を受けている患者は、連続的な投与で免疫応答活性の

増加を示すと予想され、最終的にはプラトーに達する。免疫反応が増加している間、薬剤投与は継続されることが多い。一旦プラトーが得られると、それは、治療が免疫のみを目的としている場合の指標であり、治療の投与を中止するか、投与量または頻度を減らすことができる。

【０１７７】

６．キット

本明細書に記載の１つ以上のハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、がん細胞の増殖を低減または阻害するための１つ以上の挿入ＲＮＡを含むもの）を含む１つ以上の容器を含むキットがさらに提供される。複数の容器を含むキットは、投与に好適な製剤、例えば、ｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場をカプセル化するリポソームを含む水溶液中に１つ以上のハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子の単回用量を提供するアリコートを有することができる。

【０１７８】

種々の実施形態において、好適な製剤は、がんを治療するためのハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子（例、ＨＣＣ、膵臓がん、肺がん）を使用するための説明書とともに、１つ以上のハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ（例えば、がん細胞の増殖を低減または阻害するための１つ以上の挿入ＲＮＡを含む）を含むキットで提供され得る。キットは、医薬担体、例えばリポソーム担体などの追加の薬剤、または化学療法剤または抗がん剤などの追加の活性成分を含み得る。追加の薬剤は、ハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、１つ以上の挿入ＲＮＡを含む）を含むものと同じ容器で提供されか、またはハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ足場（例えば、１つ以上の挿入ＲＮＡを含む）を含む容器とは別の容器で提供され得る。

【０１７９】

いくつかの実施形態において、１つ以上のハイブリッドｔＲＮＡ／プレマイクロＲＮＡ分子は、凍結乾燥される。

配列

１－８４：アプタマーを含むヒトｔＲＮＡ

８５－１１２：ヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合したヒトｔＲＮＡ

１１３－１２２：ヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体と融合したヒトロイシンｔＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ

１２３－１４２：ヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合したヒトセリンｔＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ

１４３－１７０：ヒトプレｍｉＲ－１２９１に融合したヒトｔＲＮＡ

１７１－１７６：種々のプレｍｉＲＮＡ（プレｍｉＲ－２００ｂ、プレｍｉＲ－１３３ａ、プレｍｉＲ－１２５ａ、プレｌｅｔ－７ｃ、プレｍｉＲ－１２４）に融合したヒトｔＲＮＡ

１７７－１８２：ヒトｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）

１８３－１９２：２つのヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合したヒトｔＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ

１９３－２１０：２つのヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合したヒトｔＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ、アプタマーの付加

配列番号１～２１０の注釈：下線はｔＲＮＡ配列であり、斜体はプレｍｉＲＮＡ配列である。二重下線は成熟ｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ配列であり、太字の下線はガイドｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ配列である。囲み文字は、アプタマー（Ｓｅｐｈａｄｅｘなど）配列である。

配列番号１－ｈｔＲＮＡ－Ｓｅｒ－ＴＧＡ－Ｓｅｐｈ（１１８ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGG AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２－ｈｔＲＮＡ－Ｓｅｒ－ＴＧＡ－ＥｐＣＡ（１０１ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCCAAUGGGGUCUCC CCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号３－ｈｔＲＮＡ－Ｓｅｒ－ＴＧＡ－Ｔｈｅｏ（１１５ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAU CCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号４－ｈｔＲＮＡ－Ｓｅｒ－ＧＣＴ－Ｓｅｐｈ（１１８ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＧＣＴ ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GACGAGGUGGCCGAGUGGUUAAGGCGAUGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGA AUCCAUUGUGCUCUGCACGCGUGGGUUCGAAUCCCACCCUCGUCGCCA -3′

配列番号５－ｈｔＲＮＡ－Ｓｅｒ－ＧＣＴ－ＥｐＣＡ（１０１ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＧＣＴ ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GACGAGGUGGCCGAGUGGUUAAGGCGAUGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCCAUUGUGCUCUGCA CGCGUGGGUUCGAAUCCCACCCUCGUCGCCA -3′

配列番号６－ｈｔＲＮＡ－Ｓｅｒ－ＧＣＴ－Ｔｈｅｏ（１１５ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＧＣＴ ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GACGAGGUGGCCGAGUGGUUAAGGCGAUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUC CAUUGUGCUCUGCACGCGUGGGUUCGAAUCCCACCCUCGUCGCCA -3′

配列番号７－ｈｔＲＮＡ－Ｌｅｕ－ＴＡＡ－Ｓｅｐｈアプタマー（１１９ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGG GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号８－ｈｔＲＮＡ－Ｌｅｕ－ＴＡＡ－ＥｐＣＡ（１０２ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGAUCCAAUGGACAUAUG UCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号９－ｈｔＲＮＡ－Ｌｅｕ－ＴＡＡ－Ｔｈｅｏ（１１６ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１０－ｈｔＲＮＡ－Ｌｅｕ－ＣＡＡ－Ｓｅｐｈ（１２０ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＣＡＡ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGUUCUGGUCUCCGUAUGGAGGCGUGGGUUCGAAUCCCACUUCUGACACCA -3′

配列番号１１－ｈｔＲＮＡ－Ｌｅｕ－ＣＡＡ－ＥｐＣＡ（１０３ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＣＡＡ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGUUCUGGUCUCCGUAUGGAGGCGUGGGUUCGAAUCCCACUUCUGACACCA -3′

配列番号１２－ｈｔＲＮＡ－Ｌｅｕ－ＣＡＡ－Ｔｈｅｏ（１１７ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＣＡＡ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGUUCUGGUCUCCGUAUGGAGGCGUGGGUUCGAAUCCCACUUCUGACACCA -3′

配列番号１３－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｙ－ＧＣＣ－Ｓｅｐｈ（１０７ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＧＣＣ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCAUGGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGACGCGGGAGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCCAUGCACCA -3′

配列番号１４－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｙ－ＧＣＣ－ＥｐＣＡ（９０ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＧＣＣ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCAUGGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUGCGACUGGUUACCCGGUCGACGCGGGAGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCCAUGCACCA -3′

配列番号１５－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｙ－ＧＣＣ－Ｔｈｅｏ（１０４ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＧＣＣ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCAUGGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCACGCGGGAGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCCAUGCACCA -3′

配列番号１６－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｙ－ＴＣＣ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＴＣＣ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCGUUGGUGGUAUAGUGGUUAGCAUAGCUGCCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAGCAGUUGACCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCACCA -3′

配列番号１７－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｙ－ＴＣＣ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＴＣＣ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCGUUGGUGGUAUAGUGGUUAGCAUAGCUGCCUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAGCAGUUGACCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCACCA -3′

配列番号１８－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｙ－ＴＣＣ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＴＣＣ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCGUUGGUGGUAUAGUGGUUAGCAUAGCUGCCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAGCAGUUGACCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCACCA -3′

配列番号１９－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｕ－ＣＴＣ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトグルタミン酸－ＣＴＣ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-UCCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCGGCGCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGACCGCCGCGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGUCAGGGAACCA-3′

配列番号２０－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｕ－ＣＴＣ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトグルタミン酸－ＣＴＣとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-UCCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCGGCGCUGCGACUGGUUACCCGGUCGACCGCCGCGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGUCAGGGAACCA-3′

配列番号２１－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｕ－ＣＴＣ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトグルタミン酸－ＣＴＣとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-UCCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCGGCGCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCACCGCCGCGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGUCAGGGAACCA-3′

配列番号２２－ｈｔＲＮＡ－Ａｓｐ－ＧＴＣ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン酸－ＧＴＣ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCCGCCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGACGCGGGAGACCGGGGUUCGAUUCCCCGACGGGGAGCCA-3′

配列番号２３－ｈｔＲＮＡ－Ａｓｐ－ＧＴＣ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン酸－ＧＴＣ　ｔＲＮＡおよびＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCCGCCUGCGACUGGUUACCCGGUCGACGCGGGAGACCGGGGUUCGAUUCCCCGACGGGGAGCCA-3′

配列番号２４－ｈｔＲＮＡ－Ａｓｐ－ＧＴＣ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン酸－ＧＴＣ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCCGCCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCACGCGGGAGACCGGGGUUCGAUUCCCCGACGGGGAGCCA-3′

配列番号２５－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｎ－ＴＴＧ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＴＴＧ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２６－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｎ－ＴＴＧ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＴＴＧ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２７－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｎ－ＴＴＧ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＴＴＧ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２８－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｎ－ＣＴＧ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＣＴＧ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGUUCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGAACCUCCA-3′

配列番号２９－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｎ－ＣＴＧ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＣＴＧ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGUUCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGAACCUCCA-3′

配列番号３０－ｈｔＲＮＡ－Ｇｌｎ－ＣＴＧ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＣＴＧ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGUUCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGAACCUCCA-3′

配列番号３１－ｈｔＲＮＡ－Ａｒｇ－ＡＣＧ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＡＣＧｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUCUGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGAUCAGAAGAUUCCAGGUUCGACUCCUGGCUGGCUCGCCA-3′

配列番号３２－ｈｔＲＮＡ－Ａｒｇ－ＡＣＧ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＡＣＧ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUCUGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGAUCAGAAGAUUCCAGGUUCGACUCCUGGCUGGCUCGCCA-3′

配列番号３３－ｈｔＲＮＡ－Ａｒｇ－ＡＣＧ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＡＣＧ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUCUGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCAGAAGAUUCCAGGUUCGACUCCUGGCUGGCUCGCCA-3′

配列番号３４－ｈｔＲＮＡ－Ａｒｇ－ＴＣＴ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＴＣＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAGCGCAUUGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUUCAAAGGUUGUGGGUUCGAAUCCCACCAGAGUCGCCA-3′

配列番号３５－ｈｔＲＮＡ－Ａｒｇ－ＴＣＴ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＴＣＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAGCGCAUUGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUUCAAAGGUUGUGGGUUCGAAUCCCACCAGAGUCGCCA-3′

配列番号３６－ｈｔＲＮＡ－Ａｒｇ－ＴＣＴ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＴＣＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAGCGCAUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUUCAAAGGUUGUGGGUUCGAAUCCCACCAGAGUCGCCA-3′

配列番号３７－ｈｔＲＮＡ－Ｃｙｓ－ＧＣＡ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトシステイン－ＧＣＡ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号３８－ｈｔＲＮＡ－Ｃｙｓ－ＧＣＡ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトシステイン－ＧＣＡ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号３９－ｈｔＲＮＡ－Ｃｙｓ－ＧＣＡ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトシステイン－ＧＣＡ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号４０－ｈｔＲＮＡ－Ｌｙｓ－ＣＴＴ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＣＴＴｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCCGGCUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUGGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUCCCAGGGUCGUGGGUUCGAGCCCCACGUUGGGCGCCA-3′

配列番号４１－ｈｔＲＮＡ－Ｌｙｓ－ＣＴＴ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＣＴＴｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCCGGCUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUGGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCCCAGGGUCGUGGGUUCGAGCCCCACGUUGGGCGCCA-3′

配列番号４２－ｈｔＲＮＡ－Ｌｙｓ－ＣＴＴ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＣＴＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCCGGCUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUGGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUCCCAGGGUCGUGGGUUCGAGCCCCACGUUGGGCGCCA-3′

配列番号４３－ｈｔＲＮＡ－Ｌｙｓ－ＴＴＴ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＴＴＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCACCA-3′

配列番号４４－ｈｔＲＮＡ－Ｌｙｓ－ＴＴＴ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＴＴＴｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCACCA-3′

配列番号４５－ｈｔＲＮＡ－Ｌｙｓ－ＴＴＴ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＴＴＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCACCA-3′

配列番号４６－ｈｔＲＮＡ－Ｍｅｔ－ＣＡＴ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトメチオニン－ＣＡＴｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCUCGUUAGCGCAGUAGGUAGCGCGUCAGUCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUCUGAAGGUCGUGAGUUCGAUCCUCACACGGGGCACCA-3′

配列番号４７－ｈｔＲＮＡ－Ｍｅｔ－ＣＡＴ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトメチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCUCGUUAGCGCAGUAGGUAGCGCGUCAGUCUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUCUGAAGGUCGUGAGUUCGAUCCUCACACGGGGCACCA-3′

配列番号４８－ｈｔＲＮＡ－Ｍｅｔ－ＣＡＴ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトメチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCUCGUUAGCGCAGUAGGUAGCGCGUCAGUCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUCUGAAGGUCGUGAGUUCGAUCCUCACACGGGGCACCA-3′

配列番号４９－ｈｔＲＮＡ－Ａｓｎ－ＧＴＴ－Ｓｅｐｈ（１１０ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン－ＧＴＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GUCUCUGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGUUCGGCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAACCGAAAGGUUGGUGGUUCGAUCCCACCCAGGGACGCCA-3′

配列番号５０－ｈｔＲＮＡ－Ａｓｎ－ＧＴＴ－ＥｐＣＡ（９３ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン－ＧＴＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GUCUCUGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGUUCGGCUGCGACUGGUUACCCGGUCGAACCGAAAGGUUGGUGGUUCGAUCCCACCCAGGGACGCCA-3′

配列番号５１－ｈｔＲＮＡ－Ａｓｎ－ＧＴＴ－Ｔｈｅｏ（１０７ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン－ＧＴＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GUCUCUGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGUUCGGCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAACCGAAAGGUUGGUGGUUCGAUCCCACCCAGGGACGCCA-3′

配列番号５２－ｈｔＲＮＡ－Ａｌａ－ＡＧＣ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトアラニン－ＡＧＣ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGGGUGUAGCUCAGUGGUAGAGCGCGUGCUUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAUGCACGAGGCCCCGGGUUCAAUCCCCGGCACCUCCACCA-3′

配列番号５３－ｈｔＲＮＡ－Ａｌａ－ＡＧＣ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトアラニン－ＡＧＣ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGGGUGUAGCUCAGUGGUAGAGCGCGUGCUUGCGACUGGUUACCCGGUCGAUGCACGAGGCCCCGGGUUCAAUCCCCGGCACCUCCACCA-3′

配列番号５４－ｈｔＲＮＡ－Ａｌａ－ＡＧＣ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトアラニン－ＡＧＣ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGGGGUGUAGCUCAGUGGUAGAGCGCGUGCUUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAUGCACGAGGCCCCGGGUUCAAUCCCCGGCACCUCCACCA-3′

配列番号５５－ｈｔＲＮＡ－Ｈｉｓ－ＧＴＧ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトヒスチジン－ＧＴＧ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCGUGAUCGUAUAGUGGUUAGUACUCUGCGUUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGCCGCAGCAACCUCGGUUCGAAUCCGAGUCACGGCACCA-3′

配列番号５６－ｈｔＲＮＡ－Ｈｉｓ－ＧＴＧ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトヒスチジン－ＧＴＧ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCGUGAUCGUAUAGUGGUUAGUACUCUGCGUUGCGACUGGUUACCCGGUCGGCCGCAGCAACCUCGGUUCGAAUCCGAGUCACGGCACCA-3′

配列番号５７－ｈｔＲＮＡ－Ｈｉｓ－ＧＴＧ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトヒスチジン－ＧＴＧ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′-GCCGUGAUCGUAUAGUGGUUAGUACUCUGCGUUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGCCGCAGCAACCUCGGUUCGAAUCCGAGUCACGGCACCA-3′

配列番号５８－ｈｔＲＮＡ－Ｉｌｅ－ＡＡＴ－Ｓｅｐｈ（１１０ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＡＡＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′-GGCCGGUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCGUGGUGCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAACGCCAAGGUCGCGGGUUCGAUCCCCGUACUGGCCACCA-3′

配列番号５９－ｈｔＲＮＡ－Ｉｌｅ－ＡＡＴ－ＥｐＣＡ（９３ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＡＡＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCCGGUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCGUGGUGCUGCGACUGGUUACCCGGUCGAACGCCAAGGUCGCGGGUUCGAUCCCCGUACUGGCCACCA -3′

配列番号６０－ｈｔＲＮＡ－Ｉｌｅ－ＡＡＴ－Ｔｈｅｏ（１０７ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＡＡＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCCGGUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCGUGGUGCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAACGCCAAGGUCGCGGGUUCGAUCCCCGUACUGGCCACCA -3′

配列番号６１－ｈｔＲＮＡ－Ｉｌｅ－ＴＡＴ－Ｓｅｐｈ（１１０ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＴＡＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCUCCAGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGCGGUACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAUGCCGAGGUUGUGAGUUCGAUCCUCACCUGGAGCACCA -3′

配列番号６２－ｈｔＲＮＡ－Ｉｌｅ－ＴＡＴ－ＥｐＣＡ（９３ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＴＡＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCUCCAGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGCGGUACUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAUGCCGAGGUUGUGAGUUCGAUCCUCACCUGGAGCACCA -3′

配列番号６３－ｈｔＲＮＡ－Ｉｌｅ－ＴＡＴ－Ｔｈｅｏ（１０７ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＴＡＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCUCCAGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGCGGUACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAUGCCGAGGUUGUGAGUUCGAUCCUCACCUGGAGCACCA -3′

配列番号６４－ｈｔＲＮＡ－Ｐｈｅ－ＧＡＡ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトフェニルアラニン－ＧＡＡ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCCGAAAUAGCUCAGUUGGGAGAGCGUUAGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGAUCUAAAGGUCCCUGGUUCGAUCCCGGGUUUCGGCACCA -3′

配列番号６５－ｈｔＲＮＡ－Ｐｈｅ－ＧＡＡ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトフェニルアラニン－ＧＡＡ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCCGAAAUAGCUCAGUUGGGAGAGCGUUAGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGAUCUAAAGGUCCCUGGUUCGAUCCCGGGUUUCGGCACCA -3′

配列番号６６－ｈｔＲＮＡ－Ｐｈｅ－ＧＡＡ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトフェニルアラニン－ＧＡＡ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GCCGAAAUAGCUCAGUUGGGAGAGCGUUAGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCUAAAGGUCCCUGGUUCGAUCCCGGGUUUCGGCACCA -3′

配列番号６７－ｈｔＲＮＡ－Ｐｒｏ－ＡＧＧ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトプロリン－ＡＧＧ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCUCGUUGGUCUAGGGGUAUGAUUCUCGCUUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAUGCGAGAGGUCCCGGGUUCAAAUCCCGGACGAGCCCCCA -3′

配列番号６８－ｈｔＲＮＡ－Ｐｒｏ－ＡＧＧ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトプロリン－ＡＧＧ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCUCGUUGGUCUAGGGGUAUGAUUCUCGCUUGCGACUGGUUACCCGGUCGAUGCGAGAGGUCCCGGGUUCAAAUCCCGGACGAGCCCCCA -3′

配列番号６９－ｈｔＲＮＡ－Ｐｒｏ－ＡＧＧ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトプロリン－ＡＧＧ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCUCGUUGGUCUAGGGGUAUGAUUCUCGCUUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAUGCGAGAGGUCCCGGGUUCAAAUCCCGGACGAGCCCCCA -3′

配列番号７０－ｈｔＲＮＡ－Ｔｒｐ－ＣＣＡ－Ｓｅｐｈ（１０８ヌクレオチド）：ヒトトリプトファン－ＣＣＡ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GACCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGAUCAGAAGGCUGCGUGUUCGAAUCACGUCGGGGUCACCA -3′

配列番号７１－ｈｔＲＮＡ－Ｔｒｐ－ＣＣＡ－ＥｐＣＡ（９１ヌクレオチド）：ヒトトリプトファン－ＣＣＡ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GACCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGAUCAGAAGGCUGCGUGUUCGAAUCACGUCGGGGUCACCA -3′

配列番号７２－ｈｔＲＮＡ－Ｔｒｐ－ＣＣＡ－Ｔｈｅｏ（１０５ヌクレオチド）：ヒトトリプトファン－ＣＣＡ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GACCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCAGAAGGCUGCGUGUUCGAAUCACGUCGGGGUCACCA -3′

配列番号７３－ｈｔＲＮＡ－Ｔｙｒ－ＧＴＡ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトチロシン－ＧＴＡ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- CCUUCGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCGGAGGACUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGGAUCCUUAGGUCGCUGGUUCGAAUCCGGCUCGAAGGACCA -3′

配列番号７４－ｈｔＲＮＡ－Ｔｙｒ－ＧＴＡ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトチロシン－ＧＴＡ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- CCUUCGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCGGAGGACUGCGACUGGUUACCCGGUCGGAUCCUUAGGUCGCUGGUUCGAAUCCGGCUCGAAGGACCA -3′

配列番号７５－ｈｔＲＮＡ－Ｔｙｒ－ＧＴＡ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトチロシン－ＧＴＡ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- CCUUCGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCGGAGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCUUAGGUCGCUGGUUCGAAUCCGGCUCGAAGGACCA -3′

配列番号７６－ｈｔＲＮＡ－Ｖａｌ－ＣＡＣ－Ｓｅｐｈ（１０９ヌクレオチド）：ヒトバリン－ＣＡＣｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGACGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAAACACCA -3′

配列番号７７－ｈｔＲＮＡ－Ｖａｌ－ＣＡＣ－ＥｐＣＡ（９２ヌクレオチド）：ヒトバリン－ＣＡＣｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUGCGACUGGUUACCCGGUCGACGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAAACACCA -3′

配列番号７８－ｈｔＲＮＡ－Ｖａｌ－ＣＡＣ－Ｔｈｅｏ（１０６ヌクレオチド）：ヒトバリン－ＣＡＣ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCACGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAAACACCA -3′

配列番号７９－ｈｔＲＮＡ－Ｔｈｒ－ＴＧＴ－Ｓｅｐｈ（１１０ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＴＧＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCUCUAUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGUAGAGCCUCCA -3′

配列番号８０－ｈｔＲＮＡ－Ｔｈｒ－ＴＧＴ－ＥｐＣＡ（９３ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＴＧＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCUCUAUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGUAGAGCCUCCA -3′

配列番号８１－ｈｔＲＮＡ－Ｔｈｒ－ＴＧＴ－Ｔｈｅｏ（１０７ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＴＧＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCUCUAUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGUAGAGCCUCCA -3′

配列番号８２－ｈｔＲＮＡ－Ｔｈｒ－ＡＧＴ－Ｓｅｐｈ（１１０ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＡＧＴ　ｔＲＮＡとＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCGCCGUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCUAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGGAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGCGGUGCCUCCA -3′

配列番号８３－ｈｔＲＮＡ－Ｔｈｒ－ＡＧＴ－ＥｐＣＡ（９３ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＡＧＴ　ｔＲＮＡとＥｐＣＡＭアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCGCCGUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCUGCGACUGGUUACCCGGUCGAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGCGGUGCCUCCA -3

配列番号８４－ｈｔＲＮＡ－Ｔｈｒ－ＴＧＴ－Ｔｈｅｏ（１０７ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＡＧＴ　ｔＲＮＡとテオフィリンアプタマーのハイブリッド分子

5′- GGCGCCGUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGCGGUGCCUCCA -3

配列番号８５－ｈｔＲＮＡ$^{Lys-TTT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＴＴＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA*AUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA -3′

配列番号８６－ｈｔＲＮＡ$^{Lys-CTT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＣＴＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCCCGGCUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUGGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA*AUCCCAGGGUCGUGGGUUCGAGCCCCACGUUGGGCGCCA -3′

配列番号８７－ｈｔＲＮＡ$^{Gln-TTG}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＴＴＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA*AUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA -3′

配列番号８８－ｈｔＲＮＡ$^{Gln-CTG}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＣＴＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGUUCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
*GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
AUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGAACCUCCA -3′

配列番号８９－ｈｔＲＮＡ$^{Cys-GCA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトシステイン－ＧＣＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
*GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCG
AUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA -3′

配列番号９０－ｈｔＲＮＡ$^{Tyr-GTA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトチロシン－ＧＴＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- CCUUCGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCGGAGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
GAUCCUUAGGUCGCUGGUUCGAAUCCGGCUCGAAGGACCA -3′

配列番号９１－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１９１ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA -3′

配列番号９２－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-GCT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１９１ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＧＣＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GACGAGGUGGCCGAGUGGUUAAGGCGAUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
*GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
AUCCAUUGUGCUCUGCACGCGUGGGUUCGAAUCCCACCCUCGUCGCCA -3′

配列番号９３－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１９２ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA -3′

配列番号９４－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-CAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１９３ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＣＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
GUUCUGGUCUCCGUAUGGAGGCGUGGGUUCGAAUCCCACUUCUGACACCA -3′

配列番号９５－ｈｔＲＮＡ$^{Gly-GCC}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８０ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＧＣＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCAUGGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUG*
*GUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAC
GCGGGAGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCCAUGCACCA -3′

配列番号９６－ｈｔＲＮＡ$^{Gly-TCC}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＴＣＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCGUUGGUGGUAUAGUGGUUAGCAUAGCUGCCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
AGCAGUUGACCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCACCA -3′

配列番号９７－ｈｔＲＮＡ$^{Glu-CTC}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトグルタミン酸－ＣＴＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- UCCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCGGCGCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
CCGCCGCGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGUCAGGGAACCA -3′

配列番号９８－ｈｔＲＮＡ$^{Asp-GTC}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン酸－ＧＴＣ　ｔＲＮＡおよびプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCCGCCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
CGCGGGAGACCGGGGUUCGAUUCCCCGACGGGGAGCCA -3′

配列番号９９－ｈｔＲＮＡ$^{Arg-ACG}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＡＣＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUCUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCG
AUCAGAAGAUUCCAGGUUCGACUCCUGGCUGGCUCGCCA -3′

配列番号１００－ｈｔＲＮＡ$^{Arg-TCT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＴＣＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAGCGCAUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
AUUCAAAGGUUGUGGGUUCGAAUCCCACCAGAGUCGCCA -3′

配列番号１０１－ｈｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトメチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCCUCGUUAGCGCAGUAGGUAGCGCGUCAGUCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCU*
GGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA
AUCUGAAGGUCGUGAGUUCGAUCCUCACACGGGGCACCA -3′

配列番号１０２－ｈｔＲＮＡ$^{Asn-GTT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８３ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン－ＧＴＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GUCUCUGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGUUCGGCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AACCGAAAGGUUGGUGGUUCGAUCCCACCCAGGGACGCCA -3′

配列番号１０３－ｈｔＲＮＡ$^{Ala-AGC}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトアラニン－ＡＧＣｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGGGGUGUAGCUCAGUGGUAGAGCGCGUGCUU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUG*
GUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAU
GCACGAGGCCCCGGGUUCAAUCCCCGGCACCUCCACCA -3′

配列番号１０４－ｈｔＲＮＡ$^{His-GTG}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトヒスチジン－ＧＴＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCCGUGAUCGUAUAGUGGUUAGUACUCUGCGUU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGCU*GGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCG CCGCAGCAACCUCGGUUCGAAUCCGAGUCACGGCACCA -3′

配列番号１０５－ｈｔＲＮＡ$^{Ile-AAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８３ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＡＡＴｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGCCGGUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCGUGGUGCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGC*UGGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC AACGCCAAGGUCGCGGGUUCGAUCCCCGUACUGGCCACCA -3′

配列番号１０６－ｈｔＲＮＡ$^{Ile-TAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８３ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＴＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCUCCAGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGCGGUACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGC*UGGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC AAUGCCGAGGUUGUGAGUUCGAUCCUCACCUGGAGCACCA -3′

配列番号１０７－ｈｔＲＮＡ$^{Phe-GAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトフェニルアラニン－ＧＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GCCGAAAUAGCUCAGUUGGGAGAGCGUUAGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGCU*GGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCG AUCUAAAGGUCCCUGGUUCGAUCCCGGGUUUCGGCACCA -3′

配列番号１０８－ｈｔＲＮＡ$^{Pro-AGG}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトプロリン－ＡＧＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGCUCGUUGGUCUAGGGGUAUGAUUCUCGCUU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGCUG*GUUGUU*GUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAU GCGAGAGGUCCCGGGUUCAAAUCCCGGACGAGCCCCCA -3′

配列番号１０９－ｈｔＲＮＡ$^{Trp-CCA}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ヒトトリプトファン－ＣＣＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GACCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGCUG*GUUGUU*GUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGA UCAGAAGGCUGCGUGUUCGAAUCACGUCGGGGUCACCA -3′

配列番号１１０－ｈｔＲＮＡ$^{Val-CAC}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）：ヒトバリン－ＣＡＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGCU*GGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCA CGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAAACACCA -3′

配列番号１１１－ｈｔＲＮＡ$^{Thr-TGT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８３ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＴＧＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGCUCUAUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGC*UGGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC AAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGUAGAGCCUCCA -3′

配列番号１１２－ｈｔＲＮＡ$^{Thr-AGT}$／プレｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８３ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＡＧＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′- GGCGCCGUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGCGGUGCCUCCA -3′

配列番号１１３－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／Ｔｗｉｓｔ－ｓｉＲＮＡ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がＴｗｉｓｔ－ｓｉＲＮＡ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGGUCUGAAUCUUGCU*
*CAGCUUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAC*AAGCUGAGAAGUAUUCAGACA*UAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*
GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１１４－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－３２８（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCUGGCCCUCUCUGCC*
*CUUCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAU*UAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１１５－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUGA*
*AUGCCGUUGUGAGC*AAUAGUAAGGAAG*CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１１６－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１９３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUG*
*UAUGGUUUGUGAGC*AAUAGUAAGGAAG*AACUGUACACCUUACUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCC
*C*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１１７－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／Ｎｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がＮｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAUUGUCAACUACU*
*GUCAGUUUGUGAGC*AAUAGUAAGGAA*AACUGACAGAGUAUGACAAUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１１８－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－２２－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－２２（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*AAGCUGCCAGUUGAA*GAACUGU*UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAGUUCUUAGCUUGGCAGCUCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１１９－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－２００ｂ－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－２００ｂ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UAAUACUGCCUGGUA*AUGAUGA*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAUCAUCAUUAUAGUGCAGUAUUCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２０－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１４８－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１４８（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UCAGUGCACUACAGA*ACUUUGU*UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAAGUUCGUAUGUGCACUGCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２１－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－６７７５－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－６７７５（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*AGGCCCUGUCCUCUG*CCCCAGU*UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCUGGGGCAAGGCGCAGGGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２２－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGAAUGUAAAGAAG*UAUGUAU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAAUACAUACUCUUCUACAUUCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２３－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１３３ａ－３ｐ（１９３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１３３ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UUUGGUCCCCUUCAA*CCAGCUG*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAGCUGGUUAAGUGGGACCAACUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCC *C*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２４－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２２－５ｐ（１９３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１２２（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGAGUGUGACAAUG*GUGUUUG*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA*AACGCCAUGUACACACUCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*C*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２５－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－１２２－５ｐ（１９３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１２２アンタゴミル（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*CAAACACCAUUGUCA*CACUCCA*UGUGAGCAAUAGUAAGGAA*UGGAGUGUGCAAUUGGUGUUUUU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２６－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－８８８－５ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－８８８（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UACUCAAAAAGCUGU*CAGUCA*UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*UGACUGACGCUCUUUUGAGUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１２７－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－３２８（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCUGGCCCUCUCUGCC CUUCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１２８－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUGA AUGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１２９－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGAGGUAGUAGGUUG*UAUGGUU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG*AACUGUACACCUUACUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCC*C*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３０－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／Ｎｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がＮｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UAAUUGUCAACUACU*GUCAGUU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAA*AACUGACAGAGUAUGACAAUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３１－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ＰｏｌＨ－ｓｉＲＮＡ－２０ヌクレオチド（１８７ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、ＰｏｌＨ－ｓｉＲＮＡ－２０ヌクレオチド（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCGAGCCAUUGAAAU*
*AAGCCUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGCUUAUUCAUAUGGCUCGCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAAUC
CAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３２－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ＰｏｌＨ－ｓｉＲＮＡ－２２ヌクレオチド（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、ＰｏｌＨ－ｓｉＲＮＡ－２２ヌクレオチド（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCGAGCCAUUGAAAU*
*AAGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGCUUAUUCAUAUGGCUCGCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３３－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－２２－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－２２（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAAGCUGCCAGUUGAA*
*GAACUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAGUUCUUAGCUUGGCAGCUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３４－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－２００ｂ－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－２００ｂ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAUACUGCCUGGUA*
*AUGAUGAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAUCAUCAUUAUAGUGCAGUAUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３５－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１４８－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１４８（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCAGUGCACUACAGA*
*ACUUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAAGUUCGUAUGUGCACUGCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３６－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－６７７５－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－６７７５（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAGGCCCUGUCCUCUG*
*CCCCAGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCUGGGGCAAGGCGCAGGGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３７－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－１３８－５ｐ（１９３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１３８アンタゴミル（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCGGCCUGAUUCACAA*
*CACCAGCUUGUGAGCAAUAGUAAGGAA**AGCUGGUGUUUGAUAUCAGGCCUU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGC
*CC*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３８－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１－３ｐ（１９１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGAAUGUAAAGAAG*
*UAUGUAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAAUACAUACUCUUCUACAUUCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１３９－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１３３ａ－３ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１３３ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUUUGGUCCCCUUCAA*
*CCAGCUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAGCUGGUUAAGUGGGACCAACU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCC
CAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１４０－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２２－５ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－１２２（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGAGUGUGACAAUG*
*GUGUUUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAACGCCAUGUACACACUCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCC
CAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１４１－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－１２２－５ｐ（１９３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、ｍｉＲ－１２２アンタゴミル（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCAAACACCAUUGUCA*
*CACUCCAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAUGGAGUGUGCAAUUGGUGUUUUU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１４２－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－８８８－５ｐ（１９２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－８８８（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUACUCAAAAAGCUGU*
*CAGUCAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUGACUGACGCUCUUUUGAGUCUA*GAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１４３－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６９ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGU*
*UGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGC
AGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA -3′

配列番号１４４－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-GCT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６９ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＧＣＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′- GACGAGGUGGCCGAGUGGUUAAGGCGAUGGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGU*
*UGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAUCCAUUGUGCUCUGCACGCGU
GGGUUCGAAUCCCACCCUCGUCGCCA -3′

配列番号１４５－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１７０ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGU*
*UGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCG
UGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA -3′

配列番号１４６－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-CAA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１７０ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＣＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGGUUCUGGUCUCCGUAUGGAGGCGUGGGUUCGAAUCCCACUUCUGACACCA-3′

配列番号１４７－ｈｔＲＮＡ$^{Gly-GCC}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５８ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＧＣＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCAUGGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGACGCGGGAGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGCCCAUGCACCA-3′

配列番号１４８－ｈｔＲＮＡ$^{Gly-TCC}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトグリシン－ＴＣＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCGUUGGUGGUAUAGUGGUUAGCAUAGCUGCCUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGAAGCAGUUGACCCGGGUUCGAUUCCCGGCCAACGCACCA-3′

配列番号１４９－ｈｔＲＮＡ$^{Glu-CTC}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトグルタミン酸－ＣＴＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-UCCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCGGCGCUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGACCGCCGCGGCCCGGGUUCGAUUCCCGGUCAGGGAACCA-3′

配列番号１５０－ｈｔＲＮＡ$^{Asp-GTC}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン酸－ＧＴＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCCGCCUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGACGCGGGAGACCGGGGUUCGAUUCCCCGACGGGGAGCCA-3′

配列番号１５１－ｈｔＲＮＡ$^{Gln-TTG}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＴＴＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号１５２－ｈｔＲＮＡ$^{Gln-CTG}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトグルタミン－ＣＴＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGUUCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGAACCUCCA-3′

配列番号１５３－ｈｔＲＮＡ$^{Arg-ACG}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＡＣＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUCUGACUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGGAUCAGAAGAUUCCAGGUUCGACUCCUGGCUGGCUCGCCA-3′

配列番号１５４－ｈｔＲＮＡ$^{Arg-TCT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトアルギニン－ＴＣＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAGCGCAUUGGACUGGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUUCCUGAAUUCAAAGGUUGUGGGUUCGAAUCCCACCAGAGUCGCCA-3′

配列番号１５５－ｈｔＲＮＡ$^{Cys-GCA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトシステイン－ＧＣＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGGAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA -3′

配列番号１５６－ｈｔＲＮＡ$^{Lys-CTT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＣＴＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCCCGGCUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUGGGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAUCCCAGGGUCGUGGGUUCGAGCCCCACGUUGGGCGCCA -3′

配列番号１５７－ｈｔＲＮＡ$^{Lys-TTT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトリジン－ＴＴＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCACCA -3′

配列番号１５８－ｈｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトメチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCCUCGUUAGCGCAGUAGGUAGCGCGUCAGUCU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAUCUGAAGGUCGUGAGUUCGAUCCUCACACGGGGCACCA -3′

配列番号１５９－ｈｔＲＮＡ$^{Asn-GTT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６１ヌクレオチド）：ヒトアスパラギン－ＧＴＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GUCUCUGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGUUCGGCU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAACCGAAAGGUUGGUGGUUCGAUCCCACCCAGGGACGCCA -3′

配列番号１６０－ｈｔＲＮＡ$^{Ala-AGC}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトアラニン－ＡＧＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGGGGUGUAGCUCAGUGGUAGAGCGCGUGCUU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAUGCACGAGGCCCCGGGUUCAAUCCCCGGCACCUCCACCA -3′

配列番号１６１－ｈｔＲＮＡ$^{His-GTG}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトヒスチジン－ＧＴＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCCGUGAUCGUAUAGUGGUUAGUACUCUGCGUU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGGCCGCAGCAACCUCGGUUCGAAUCCGAGUCACGGCACCA -3′

配列番号１６２－ｈｔＲＮＡ$^{Ile-AAT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６１ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＡＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGCCGGUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCGUGGUGCU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAACGCCAAGGUCGCGGGUUCGAUCCCCGUACUGGCCACCA -3′

配列番号１６３－ｈｔＲＮＡ$^{Ile-TAT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６１ヌクレオチド）：ヒトイソロイシン－ＴＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCUCCAGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGCGGUACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAUGCCGAGGUUGUGAGUUCGAUCCUCACCUGGAGCACCA-3′

配列番号１６４－ｈｔＲＮＡ$^{Phe-GAA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトフェニルアラニン－ＧＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GCCGAAAUAGCUCAGUUGGGAGAGCGUUAGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGGAUCUAAAGGUCCCUGGUUCGAUCCCGGGUUUCGGCACCA-3′

配列番号１６５－ｈｔＲＮＡ$^{Pro-AGG}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトプロリン－ＡＧＧ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGCUCGUUGGUCUAGGGGUAUGAUUCUCGCUU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAUGCGAGAGGUCCCGGGUUCAAAUCCCGGACGAGCCCCCA-3′

配列番号１６６－ｈｔＲＮＡ$^{Trp-CCA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１５９ヌクレオチド）：ヒトトリプトファン－ＣＣＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GACCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGGAUCAGAAGGCUGCGUGUUCGAAUCACGUCGGGGUCACCA-3′

配列番号１６７－ｈｔＲＮＡ$^{Tyr-GTA}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトチロシン－ＧＴＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-CCUUCGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCGGAGGACU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGGAUCCUUAGGUCGCUGGUUCGAAUCCGGCUCGAAGGACCA-3′

配列番号１６８－ｈｔＲＮＡ$^{Val-CAC}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６０ヌクレオチド）：ヒトバリン－ＣＡＣ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGACGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAAACACCA-3′

配列番号１６９－ｈｔＲＮＡ$^{Thr-TGT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６１ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＴＧＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGCUCUAUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGUAGAGCCUCCA-3′

配列番号１７０－ｈｔＲＮＡ$^{Thr-AGT}$／プレｍｉＲ－１２９１（１６１ヌクレオチド）：ヒトスレオニン－ＡＧＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子

5′-GGCGCCGUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCCUGUCU*GGUAGAAUUCCAGUGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCU*AAAGGACUGUCUUCCUGAAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGCGGUGCCUCCA-3′

配列番号１７１－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－２００ｂ／ｍｉＲ－２００ｂ－３ｐ（１７８ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉｒ－２００ｂのハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUCUUACUGGGCAGC*
*AUUGGAUGGAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAAUGAUGACGGCGGAGCCCUGCACG*GAUCCAAUGGACAU
AUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１７２－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－１３３ａ／ｍｉＲ－１３３ａ－５ｐ（１６８ヌクレオチド）：ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉｒ－１３３ａのハイブリッド分子

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*ACAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAA*
*UCGCCUCUUCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG*UAGCUAUGCAUUGAGAUCCAAUGGACAUAUGUCCG
CGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１７３－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉｒ－１２５ａ／ｍｉＲ－１２５ａ－３ｐ（１６８ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉｒ－１２５ａのハイブリッド分子

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*UGCCAGUCUCUAGG****UCCCUGAGACCCUUUAACCUGU******GA****GGACAUCCAGGGUC*ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC*UGGCGUCUGGCC*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGC
AGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１７４－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉｒ－１２５ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１６６ヌクレオチド）：ｍｉＲ－１２５ａ配列（成熟およびガイド）がｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉｒ－１２５ａのハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*UGCCAGUCUCUAGGUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU*
*GGACAUCCAGGGUCCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*UGGCGUCUGGCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAG
GUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１７５－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｌｅｔ－７ｃ（１６６ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｌｅｔ－７ｃのハイブリッド分子。

5′-GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GCAUCCGGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUAGAG*
*UUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUAGCUUUCC*UUGGAGCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGG
UUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１７６－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－１２４（１６７ヌクレオチド）：ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２４のハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUU*
*UAAAUGUCCAUACAAU*UAAGGCACGCGGUGAAUGCC*AAGAAUGGGGCUG*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCA
GGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号１７７－ｈｔＲＮＡ^{Glu}／５’ｔＲＦ＿ｍｉＲ－３４ａ－５Ｐ（９３ヌクレオチド）：５’ｔＲＮＡ断片（５’ｔＲＦ）配列が成熟型ｍｉＲ－３４ａガイド配列に置き換えられる、ヒトグルタミン酸ｔＲＮＡの修飾分子。

5′- UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUCUAAUCGCCGAGUAAUUUACGCCCGGGUGGUUGCGGCGCGGCCCGGG
UUCGAUUCCCGGCACUGACAACCA-3′

配列番号１７８－ｈｔＲＮＡ^{Gly}／５’ｔＲＦ＿ｍｉＲ－３４ａ－５Ｐ（９３ヌクレオチド）：５’ｔＲＮＡ断片（５’ｔＲＦ）配列が成熟型ｍｉＲ－３４ａガイド配列に置き換えられる、ヒトグリシンｔＲＮＡの修飾分子。

5′- UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUCCAGACGCCGAGUAAUUUACGCCCGGGUGGUUGCGGCGUGACCCGGGUUCGAUUCCCGGCACUGCCAACCA-3′

配列番号１７９－ｈｔＲＮＡ^{Leu}／５’ｔＲＦ＿ｍｉＲ－３４ａ－５Ｐ（１０３ヌクレオチド）：５’ｔＲＮＡ断片（５’ｔＲＦ）配列が成熟型ｍｉＲ－３４ａガイド配列に置き換えられる、ヒトロイシンｔＲＮＡの修飾分子。

5′- UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUAAUAACCGCCGAGUAAUUUACGCCCGGGUGGUUGCGGCGUCUCUUCGGGGGCGUGGGUUCAAAUCCCACCACUGCCAACCA-3′

配列番号１８０－ｈｔＲＮＡ^{Ser}／５’ｔＲＦ＿ｍｉＲ－３４ａ－５Ｐ（１０３ヌクレオチド）：５’ｔＲＮＡ断片（５’ｔＲＦ）配列が成熟型ｍｉＲ－３４ａガイド配列に置き換えられる、ヒトのセリンｔＲＮＡの修飾分子。

5′- UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUAUAACCGCCGAGUAAUUUACGCCCGGGUGGUUGCGGCGUGUGCUCUGCACGCGUGGGUUCGAAUCCCAUCACUGCCAACCA-3′

配列番号１８１－ｈｔＲＮＡ^{Leu}／プレｍｉＲ－３４ａ／ＭＩＲ－３４ａ－５ｐ＿５’ｔＲＦ＿アンチｍｉＲ－２１－５ｐ（１９１ヌクレオチド）：５’ｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）領域がアンチｍｉＲ－２１－５ｐ（成熟）配列（太字）に置き換えられてる、ヒトロイシンｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGAC**UCAACAUCAGUCUGAUAAGC***GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCG*AUUAUCAGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA -3′

配列番号１８２－ｈｔＲＮＡ^{Leu}／プレｍｉＲ－３４ａ／ＭＩＲ－３４ａ－５ｐ＿３’ｔＲＦ＿アンチｍｉＲ－２１－５ｐ（１９１ヌクレオチド）：３’ｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）領域がアンチｍｉＲ－２１－５ｐ（成熟）配列（太字）に置き換えられている、ヒトロイシンｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′- UCAGACUUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGAUGUCCG**UCAACAUCAGUCUGAUAAG** -3′

配列番号１８３－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－２１－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９４ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－２１）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でｍｉＲ－２１アンタゴミル（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG***CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*UAGCUUAUAAGAAUGAUGUUGC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１８４－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（２９７ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*<u>*UGGCAGUGUCUUAGC*</u>
<u>*UGGUUGU*</u><u>*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*</u>***UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***<u>*UGUGAGCAAUAGUAAG*</u>
<u>*GAAG*</u>***CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU***<u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*</u>***CAAUCAGCAAGUAU***
ACUGCCCU<u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*</u><u>GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUC</u>
<u>CUGGUACCA</u>-3′

配列番号１８５－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（２９８ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４１）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*<u>*UGAGGUAGUAGGUUG*</u>
<u>*UAUGGUU*</u><u>*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*</u>***UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***<u>*UGUGAGCAAUAGUAAG*</u>
<u>*GAAG*</u>***CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU***<u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*</u><u>*AACUGUACACCUUA*</u>
<u>*CUACCUUUC*</u><u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*</u><u>GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACU</u>
<u>CCUGGUACCA</u>-3′

配列番号１８６－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９７ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ｍｉＲ－１２４／ｍｉＲ－３４ａ）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*<u>*UAAGGCACGCGGUGA*</u>
<u>*AUGCCGUU*</u><u>*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*</u>***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***<u>*UGUGAGCAAUAGUAAG*</u>
<u>*GAAG*</u>***CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***<u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*</u><u>*CGGUGUUCCCGUCG*</u>
<u>*UGCCUUCU*</u><u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*</u><u>GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUC</u>
<u>CUGGUACCA</u>-3′

配列番号１８７－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／Ｎｒｆ２－ｓｉＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９６ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Ser}／ＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ／ｍｉＲ－３４ａ）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でＮｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*<u>*UAAUUGUCAACUACU*</u>
<u>*GUCAGUU*</u><u>*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*</u>***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***<u>*UGUGAGCAAUAGUAAG*</u>
<u>*GAAG*</u>***CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***<u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAA*</u><u>*AACUGACAGAGUAUG*</u>
<u>*ACAAUUCU*</u><u>*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*</u><u>AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCG</u>
<u>CUGCGCCA</u>-3′

配列番号１８８－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９８ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－３４ａ）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUU*UGAGGUAGUAGGUUG*UAUGGUU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGAACUGUACACCUUA*CUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACU CCUGGUACCA-3′

配列番号１８９－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９６ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Ser}／ｍｉＲ－１２４／ｍｉＲ－３４ａ）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUU*UAAGGCACGCGGUGAA*AUGCCGU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCG*UGCCUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCG CUGCGCCA-3′

配列番号１９０－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（２９７ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Ser}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUU*UGAGGUAGUAGGUUG*UAUGGUU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGAACUGUACACCUUA*CUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUC GCUGCGCCA-3′

配列番号１９１－ｈｔＲＮＡ$^{Ser-TGA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９７ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡＳｅｒ／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－３４ａ）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトセリン－ＴＧＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUU*UGAGGUAGUAGGUUG*UAUGGUU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGAACUGUACACCUUA*CUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUC GCUGCGCCA-3′

配列番号１９２－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉＲ－３４ａ／Ｎｒｆ２－ｓｉＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２９７ヌクレオチド）（ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ／ｍｉＲ－３４ａ）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でＮｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAUUGUCAACUACU*
*GUCAGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAG*
*GAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAA**AACUGACAGAGUAUG***
***ACAAUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUC
CUGGUACCA-3′

配列番号１９３－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられ［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGC*
*CAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**AACUGUACACCUUACUACCUUUC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAA*
UGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１９４－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／５’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGC*
*CAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCA***
***GUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAAU*
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１９５－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／５’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGC*
*CAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCG**UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAAU*
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１９６－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGAGGUAGUAGGUUG*UAUGGUU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU***UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU****AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*AACUGUACACCUUA*CUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAA
UGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１９７－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UAAGGCACGCGGUGAA*AUGCCGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU****UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU****UGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG****CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU****AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*CGGUGUUCCCGUCG*UGCCUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAAU
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１９８－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGC*UGGUUGUU*GUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU***UAAGGCACGCGGUGAAUGCCG****UUGUGAGCAAUAGUAAG*GAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU****AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAU*ACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAAU
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号１９９－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３６４ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGC*
*CAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**AACUGUACACCUUACUACCUUUC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUA
CCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUA
CCA-3′

配列番号２００－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３６４ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流にテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGC*
*CAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCA***
***GUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUAC
CAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUAC
CA-3′

配列番号２０１－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３６３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGC*
*CAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCG**UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUAC
CAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUAC
CA-3′

配列番号２０２－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／５’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUG*
*UAUGGUUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**AACUGUACACCUUACUACCUUUC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAA
UGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２０３－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／５’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUGA*
*AUGCCGUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCA***
***GUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAU
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２０４－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／５’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCG**UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAU
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２０５－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUG*
*UAUGGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAG*
*GAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCU
UGGCAGCGUC*GUAAGGAAG**AACUGUACACCUUACUACCUUUC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAA
UGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２０６－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGA*
*AUGCCGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAG*
*GAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCU
UGGCAGCGUC*GUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAU
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２０７－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３３０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCG**UUGUGAGCAAUAGUAAG*
*GAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCU
UGGCAGCGUC*GUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAU
GGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２０８－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３６４ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUG*
*UAUGGUUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGG***
***CACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*
*UUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG**AACUGUACACCUUACUACCUU***
***UC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUA
CCA-3′

配列番号２０９－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３６３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UAAGGCACGCGGUGA*AUGCCGUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU***UGGCA*** ***GUGUCUUAGCUGGUUGU****UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG****CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACG*UUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUC**UAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUAC CA-3′

配列番号２１０－ｈｔＲＮＡ$^{Leu-TAA}$／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉｒ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３６３ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、ヒトロイシン－ＴＡＡ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAGC*UGGUUGUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU***UAAGG*** ***CACGCGGUGAAUGCCG****UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACG*UUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCC**UAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUAC CA-3′

配列番号２１１～２５６の注釈：（下線付きのｔＲＮＡ配列、斜体のプレｍｉＲＮＡ配列、太字下線付きの成熟ｍｉＲＮＡ、斜体下線付きのパッセンジャー配列）

配列番号２１１　ｎＣＡＲ^{Met}／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８０ヌクレオチド）

5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAG*CGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUU*
*UCUU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAG*
*UGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG*GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２１２　ｈＣＡＲ^{Leu}／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１９２ヌクレオチド）

5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGAC*UGGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGU*
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２１３　ｈＣＡＲ^{Ser}／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１９１ヌクレオチド）

5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUU*
*UCUU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAG*
*UGCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２１４　ｈＣＡＲ^{Lys}／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）

5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGU*
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２１５　ｈＣＡＲ^{Gln}／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGU***UGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGU
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２１６　ｈＣＡＲ^{Cys}／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUC*
*UU***UGGCAGUGUCUUAGCUGGU***UGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUG
*CUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２１７　ｈｔＲＮＡ^{Leu}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１６７ヌクレオチド）
5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGAC*AGGCCUCUCUCUC***CGUGU**
UCACAGCGGACCUUGAU*UUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCC*AAGAAUGGGGCUGGAUCCA
AUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２１８　ｈｔＲＮＡ^{Ser}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１６７ヌクレオチド）
5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*AGGCCUCUCUCUC***CGUGU**
UCACAGCGGACCUUGAU*UUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCC*AAGAAUGGGGCUGAAUCCA
AUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２１９　ｈｔＲＮＡ^{Lys}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１５８ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACUA*GGCCUCUCUCUC***CGUGU**
UCACAGCGGACCUUGAU*UUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCC*AAGAAUGGGGCUGAAUCUG
AGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２２０　ｈｔＲＮＡ^{Gln}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１５７ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*AGGCCUCUCUCUC***CGUGU**
UCACAGCGGACCUUGAU*UUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCC*AAGAAUGGGGCUGAAUCCA
GCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２２１　ｈｔＲＮＡ^{Cys}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１５７ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*AGGCCUCUCUCUC***CGUGU**
UCACAGCGGACCUUGAU*UUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCC*AAGAAUGGGGCUGGAUCAA
GAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２２２　ｎＣＡＲ^{Met}／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAG*CGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUU*
*UCUU***UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAA*
*GUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG*GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２２３　ｈＣＡＲ^{Leu}／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１９３ヌクレオチド）
5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUU***GUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAG*
*UGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２２４　ｈＣＡＲ^{Ser}／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１９２ヌクレオチド）

5′-GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAG*
*UGCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２２５　ｈＣＡＲ^{Lys}／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１８３ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAU*CAGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAG*
*UGCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２２６　ｈＣＡＲ^{Gln}／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAG*
*UGCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２２７　ｈＣＡＲ^{Cys}／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１８２ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUC*
*UU***UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAGU*
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２２８　ｈｔＲＮＡ^{Ser}／プレｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１６６ヌクレオチド）
5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GCAUCCGGGU***UGAGGUA**
GUAGGUUGUAUGGUU*UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCUUGGAGCA*AAUCCA
AUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２２９　ｈｔＲＮＡ^{Leu}／プレｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１６８ヌクレオチド）
5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GCAUCCGGGU***UGAGGUA**
GUAGGUUGUAUGGUU*UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCUUGGAGCA*GAUCC
AAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２３０　ｈｔＲＮＡ^{Lys}／プレｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１５２ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAU*GCAUCCGGGU***UGAGGUA**
GUAGGUUGUAUGGUU*UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCUUGGAGCA*AAAUCU
GAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２３１　ｈｔＲＮＡ^{Cys}／プレｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１５７ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GCAUCCGGGU***UGAGGUA**
GUAGGUUGUAUGGUU*UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCUUGGAGCA*GAUCA
AGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２３２　ｈｔＲＮＡ^{Gln}／プレｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１５７ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GCAUCCGGGU***UGAGGUA**
GUAGGUUGUAUGGUU*UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCUUGGAGCA*AAUCC
AGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２３３　ｎＣＡＲ^{Met}／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１８０ヌクレオチド）
5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAG*CGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUU*
*UCUU***CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUU*AGAAG
*UGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG*GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２３４　ｈＣＡＲ^{Leu}／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１９２ヌクレオチド）
5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUU*AGAAGU
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２３５　ｈＣＡＲ^{Ser}／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１９１ヌクレオチド）
5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUU*AGAAGU
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２３６　ｈＣＡＲ^{Lys}／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１８２ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAU*CAGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUU*AGAAGU
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２３７　ｈＣＡＲ^{Gln}／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUU*AGAAGU
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２３８　ｈＣＡＲ^{Cys}／ｍｉＲ－３２８－３ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUC*
*UU***CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGGGGGGGAGAUGGGGGCCAUU*AGAAGUG
*CUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２３９　ｎＣＡＲ^{Met}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１８０ヌクレオチド）
5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAG*CGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUU*
*UCUU***UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU*AGAAG
*UGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG*GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２４０　ｈＣＡＲ^{Leu}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１９２ヌクレオチド）
5′- *ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU*AGAAGU
*GCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２４１　ｈＣＡＲ^{Ser}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１９１ヌクレオチド）
5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２４２　ｈＣＡＲ^{Lys}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１８２ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２４３　ｈＣＡＲ^{Gln}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２４４　ｈＣＡＲ^{Cys}／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUUC
UU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUG
CUGCACGUUGUUGGCCCGAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２４５　ｎＣＡＲ^{Met}／ｍｉＲ－１２６－３ｐ（１８０ヌクレオチド）
5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUU
UCUU**UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUGCAUUAUUCUCUAUGGUACGCAGAAG
UGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２４６　ｈＣＡＲ^{Leu}／ｍｉＲ－１２６－３ｐ（１９２ヌクレオチド）
5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGUGCAUUAUUCUCUAUGGUACGAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２４７　ｈＣＡＲ^{Ser}／ｍｉＲ－１２６－３ｐ（１９１ヌクレオチド）
5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGUGCAUUAUUCUCUAUGGUACGAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２４８　ｈＣＡＲ^{Lys}／ｍｉＲ－１２６－３ｐ（１８２ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUCAGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGUGCAUUAUUCUCUAUGGUACGAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′.

配列番号２４９　ｈＣＡＲ^{Gln}／ｍｉＲ－１２６－３ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGUGCAUUAUUCUCUAUGGUACGAGAAGU
GCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２５０　ｈＣＡＲ^{Cys}／ｍｉＲ－１２６－３ｐ（１８１ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUUC
UU**UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGUGCAUUAUUCUCUAUGGUACGAGAAGUG
CUGCACGUUGUUGGCCCGAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２５１　ｎＣＡＲ^{Met}／ｍｉＲ－２９８－５ｐ（１８０ヌクレオチド）
5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUU
UCUU**AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA**UGAGCAAUAGUAAGGAGGGGAGAACCCCCAUGCUUUUGACAGAAG
UGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２５２　ｈＣＡＲ^{Leu}／ｍｉＲ－２９８－５ｐ（１９４ヌクレオチド）
5′- ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGGAGAACCCCCAUGCUUUUGACAGAA
GUGCUGCACGUUGUUGGCCCGAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACCCCACUCCUGGUACCA-3′

配列番号２５３　ｈＣＡＲ^{Ser}／ｍｉＲ－２９８－５ｐ（１９３ヌクレオチド）
5′- GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUUGGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU
CUU**AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGGAGAACCCCCAUGCUUUUGACAGAA
GUGCUGCACGUUGUUGGCCCAAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCUGCUCGCUGCGCCA-3′

配列番号２５４　ｈＣＡＲ^{Ｌｙｓ}／ｍｉＲ－２９８－５ｐ（１８４ヌクレオチド）
5′- GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAU*CAGACUGGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGGAGAACCCCCAUGCUUUUGACAGAA*
*GUGCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGGCGCCA-3′

配列番号２５５　ｈＣＡＲ^{Ｇｌｎ}／ｍｉＲ－２９８－５ｐ（１８３ヌクレオチド）
5′- GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCUGGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUU*
*CUU***AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGGAGAACCCCCAUGCUUUUGACAGAA*
*GUGCUGCACGUUGUUGGCCC*AAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGACCUCCA-3′

配列番号２５６　ｈＣＡＲ^{Ｃｙｓ}／ｍｉＲ－２９８－５ｐ（１８３ヌクレオチド）
5′- GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUUGACU*GGCCAGCUGUGAGUGUUUC*
*UU***AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA***UGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGGAGAACCCCCAUGCUUUUGAC*AGAAG
*UGCUGCACGUUGUUGGCCC*GAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCCCUCCA-3′

配列番号２５７－ｂｔＲＮＡ$^{Ｍｅｔ－ＣＡＴ}$／プレｍｉＲ－３４ａ（１８０ヌクレオチド）：細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子

5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
CCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２５８－ｂｔＲＮＡ$^{Ｍｅｔ－ＣＡＴ}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４ａ－３ｐ（１８０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、ｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。
5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUGA*
*AUGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
CCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２５９－ｂｔＲＮＡ$^{Ｍｅｔ－ＣＡＴ}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ（１８１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、ｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる、細菌のメチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。
5′-GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUG*
*UAUGGUUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCC
CCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２６０－ｂｔＲＮＡ$^{Ｍｅｔ－ＣＡＴ}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ__５’ｔＲＦ__アンチｍｉＲ－２１－５ｐ（１８０ヌクレオチド）：５’ｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）領域がアンチｍｉＲ－２１－５ｐ（成熟）配列に置き換えられる（太字）、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。
5′-GGCUACGUAAGAC**UCAACAUCAGUCUGAUAAG**CG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
*UUAUGG*GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２６１－ｂｔＲＮＡ$^{Ｍｅｔ－ＣＡＴ}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ__３’ｔＲＦ__アンチｍｉＲ－２１－５ｐ（１８０ヌクレオチド）：３’ｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）領域がアンチｍｉＲ－２１－５ｐ（成熟）配列に置き換えられる（太字）、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。
5′-UCAGACUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGC*
*UGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC
CCGCUGUACACAGGUUCG**UCAACAUCAGUCUGAUCCA**-3′

配列番号２６２－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－２１－５ｐ__５’ｔＲＦ__ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がアンチｍｉＲ－２１（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、５’ｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）領域がｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（成熟）配列に置き換えられる、（太字）、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′-GGCUACGUAUAAG**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUU***GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UCAACAUCAGUCUGA**UAAGCUA**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**UAGCUUAUAAGAAUGAUGUUGC***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*CCAGGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3'

配列番号２６３－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－２１－５ｐ__３’ｔＲＦ__ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（１８０ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）がアンチｍｉＲ－２１（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、３’ｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）領域がｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（成熟）配列に置き換えられる（太字）、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡとプレｍｉＲ－３４ａのハイブリッド分子。

5′-GCUAAGAUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UCAACAUCAGUCUGA**UAAGCUA**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**UAGCUUAUAAGAAUGAUGUUGC***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*CCGCCUGACACAGGUUCG**UGGCAGUGUCUUAGCUCCA**-3'

配列番号２６４－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－１２９１（２２７ヌクレオチド）：３６ヌクレオチドの順方向および逆方向配列をもつ細菌メチオニンｔＲＮＡとプレｍｉＲ－１２９１のハイブリッド分子（ＳＮＯＲ３４、斜体太字）

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGAGUAAUUUACGUCGAC***GAGUUCUGUCCGUGAGCCUU****G*GGUAGAAUUCCAG*UGGCCCUGACUGAAGACCAGCAGUUGUACUGUGGCUGUUGGUUUCAAGCAGAGGCCUAA*AGGACUGUCUUCCUG**UGGUCUGUUGGCUGU***GACGUCGAUGGUUGCGGCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA -3′

配列番号２６５－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／アンチｍｉＲ－２１－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２８５ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－２１アンタゴミル（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UCAACAUCAGUCUG**AUAAGCUA**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAA*GGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**UAGCUUAUAAGAA**UGAUGUUGC***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２６６－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（２８５ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAG**CUGGUUGU**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU***UGUGAGCAAUAGUAA*GGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUA**UACUGCCCU***AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２６７－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（２８６ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２６８－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２８５ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２６９－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２８６ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７０－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／Ｎｒｆ２－ｓｉＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（２８５ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が、第１の前駆体でＮｒｆ２－ｓｉＲＮＡ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAUUGUCAACUACUGUCAGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCGUAAGGAAAACUGACAGAGUAUGACAAUUCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

10

20

30

40

50

配列番号２７１－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１９ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GG*
*CCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAG*
***GCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCAC*
*GUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**AACUGUACACCUUACUACCUUUC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG*
GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７２－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GG*
*CCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGC*
***AGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCAC*
*GUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGG*
UCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７３－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GG*
*CCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU**GUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAG*
***GCACGCGGUGAAUGCCG**UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCAC*
*GUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGG*
UCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７４－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１９ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGAGGUAGUAGGUU*
*GUAUGGUU**UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAA*
*GGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**AACUGUACACCUU*
***ACUACCUUUC**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCCCGCGG
GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７５－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC[GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC]CCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７６－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UGGCAGUGUCUUAG*CUGGUUGUU*GUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAGGCACGCGGUGAAUGCCG**UUGUGAGCAAUAGUAA*GGAAG***CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUA**UACUGCCCU**AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC[GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC]CCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７７－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３５２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG[GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC]*GG**CCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAG**GCACGCGGUGAAUGCCGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU**AGAAGUGCUGCAC*GUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*AACUGUACACCUUACUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*[GGCGAU]ACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC]CCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７８－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３５１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG[GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC]*GG**CCAGCUGUGAGUGUUUCUU*UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU***UGGC**AGUGUCUUAGCUGGUUGU**UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU**AGAAGUGCUGCAC*GUUGUUGGCCCGUAAGGAAG*CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*[GGCGAUA]CCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC]CCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２７９－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３５１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第１のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGG
CCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAG
GCACGCGGUGAAUGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCAC
GUUGUUGGCCCGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGGCGAUA
CCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２８０－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１９ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUU
GUAUGGUUUGUGAGCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAG
GCACGCGGUGAAUGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCAC
GUUGUUGGCCCGUAAGGAAGAACUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG
GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２８１－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUG
AAUGCCGUUGUGAGCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGC
AGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCAC
GUUGUUGGCCCGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGG
UCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２８２－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／５’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流にテオフィリンアプタマー（５’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAG
CUGGUUGUUGUGAGCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAG
GCACGCGGUGAAUGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCAC
GUUGUUGGCCCGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGG
UCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２８３－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１９ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5’- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUU*
*GUAUGGUUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU****UAAGGCACGCGGUGAAUGCCGU****UGUGAGCAAUAGUAA*
*GGAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU****AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCC*
*UUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG*AACUGUACACCUUACUACCUUUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGG
GUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3’

配列番号２８４－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5’- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU****UAAGGCACGCGGUG***
*AAUGCCGU*UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU****UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU***UGUGAGCAAUAGUAA
*GGAAG****CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU****AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCC*
*UUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG*CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGG
UCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3’

配列番号２８５－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３１８ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの下流にテオフィリンアプタマー（３’）の付加。

5’- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAG*
*CUGGUUGUUGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU****UAAGGCACGCGGUGAAUGCCG****UUGUGAGCAAUAGUAA*
*GGAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU****AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCC*
*UUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG*CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGG
UCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3’

配列番号２８６－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３５２ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｌｅｔ－７ｃ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5’- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAGGUU*
*GUAUGGUUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU****UAAG***
GCACGCGGUGAAUGCCGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU****AGAAGUGCUGCAC*
*GUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GUAAGGAAG*AACUGUACACCUUACUACCU
*UUC*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3’

配列番号２８７－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（３５１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のプレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCGGUG*
*AAUGCCGUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UGGC***
AGUGUCUUAGCUGGUUGU*UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG****CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU***AGAAGUGCUGCAC
*GUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GUAAGGAAGCGGUGUUCCCGUCGUGCCUU*
*CU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

配列番号２８８－ｂｔＲＮＡ$^{Met-CAT}$／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ／５’＋３’ＴＰＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ（３５１ヌクレオチド）：ｍｉＲ－３４ａ配列（成熟およびガイド）が第１の前駆体でｍｉＲ－３４ａ（成熟およびガイド）配列に置き換えられ、第２の前駆体でｍｉＲ－１２４（成熟およびガイド）配列に置き換えられる［太字］、細菌メチオニン－ＣＡＴ　ｔＲＮＡと２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子のハイブリッド分子、第２のレｍｉＲ－３４ａの上流および下流に２つのテオフィリンアプタマー（５’および３’）の付加。

5′- GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCG*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAG*
*CUGGUUGUUGUGAGC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU**UAAG***
GCACGCGGUGAAUGCCG*UUGUGAGCAAUAGUAAGGAAG****CGGUGUUCCCGUCGUGCCUUCU***AGAAGUGCUGCAC
*GUUGUUGGCCC*GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC*GUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCC*
*CU*AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA-3′

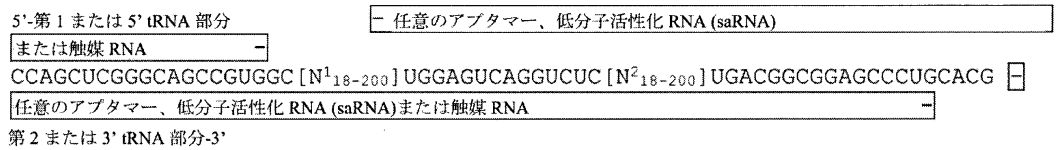
配列番号２８９－安定化されたプレｍｉＲ－３４ａＧ１３８Ｕ／１３９ΔＧ誘導体シェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。

5’-第１または5’ tRNA 部分　－ 任意のアプタマー、低分子活性化 RNA (saRNA)
または触媒 RNA －
GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^1_{18-200}] UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG [N^2_{18-200}] AGAAGUGCUGCACGUUG
UUGGCCC － 任意のアプタマー、低分子活性化 RNA (saRNA) または触媒 RNA
－ 第２または3’ tRNA 部分-3’

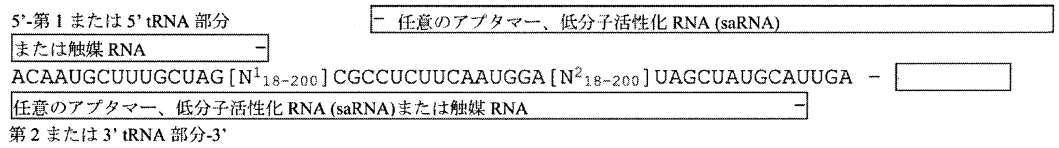
配列番号２９０－プレｍｉＲ－１２９１シェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。

5’-第１または5’ tRNA 部分　－ 任意のアプタマー、低分子活性化 RNA (saRNA)
または触媒 RNA － GGUAGAAUUCCAG [N^1_{18-200}] UGUACUGUG [N^2_{18-200}] AAAGGACUGUCUUCCUG
－ 任意のアプタマー、低分子活性化 RNA (saRNA) または触媒 RNA －
第２または3’ tRNA 部分-3’

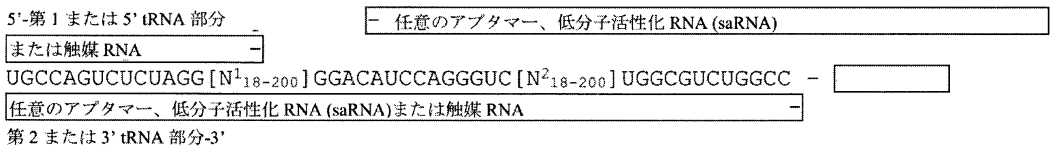
配列番号２９１－プレｍｉｒ－２００ｂシェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。



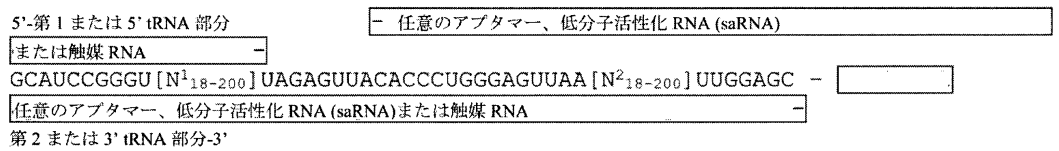
配列番号２９２－プレｍｉｒ－１３３ａシェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。



配列番号２９３－プレｍｉｒ－１２５ａシェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。



配列番号２９４－プレ－ｌｅｔ－７ｃシェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。



配列番号２９５－プレ－ｍｉＲ－１２４シェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。

5'-第１または5' tRNA部分 － 任意のアプタマー、低分子活性化RNA (saRNA)
または触媒RNA －
AGGCCUCUCUCUC [N^1_{18-200}] UUAAAUGUCCAUACAAU [N^2_{18-200}] AAGAAUGGGGCUG －
任意のアプタマー、低分子活性化RNA (saRNA)または触媒RNA －
第２または3' tRNA部分-3'

２つのプレｍｉＲ－３４ａ分子シェル／足場、表８に示すｔＲＮＡ配列、Ｎ１およびＮ２は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）であり、Ｎ３およびＮ４は実質的に相補的（例えば、少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％相補的）であり、実質的に等しい長さ（例えば、等しい長さ、または異なる長さの場合は３個のヌクレオチド塩基以内）である。

配列番号２９６－

5'-第１または5' tRNA部分 －
GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^1_{18-200}] UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^3_{18-200}] UGUGAGCAA
UAGUAAGGAAG [N^4_{18-200}] AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG [N^2_{18-200}] AGAAGUGCUGCACG
UUGUUGGCCC － 第２または3' tRNA部分-3'

配列番号２９７－

5'-第１または5' tRNA部分 － 任意のアプタマー、低分子活性化RNA
（ｓａＲＮＡ）または触媒RNA －
GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^1_{18-200}] UGUGAGCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^3_{18-200}] UGUGAGCAA
UAGUAAGGAAG [N^4_{18-200}] AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCCGUAAGGAAG [N^2_{18-200}] AGAAGUGCUGCACG
UUGUUGGCCC － 任意のアプタマー、低分子活性化RNA (saRNA)または触媒RNA
－第２または3' tRNA部分-3'

配列番号２９８－

5'-第１または5' tRNA部分 GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^1_{18-200}] UGUGAGC －
任意のアプタマー、低分子活性化RNA (saRNA)または触媒RNA －
GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUU [N^3_{18-200}] UGUGAGCAAUAGUAAGGAAG [N^4_{18-200}] AGAAGUGCUGCACGUUG
UUGGCCC － 任意のアプタマー、低分子活性化RNA (saRNA)または触媒RNA
－GUAAGGAAG [N^2_{18-200}] AGAAGUGCUGCACGUUGUUGGCCC第２または3' tRNA部分-3'

配列番号２９９－意図的に空白にしている

配列番号２５７～２８８の注釈　下線はｔＲＮＡ配列であり、斜体はプレｍｉＲＮＡ配列である。二重下線は成熟ｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ配列であり、太字の下線はガイドｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ配列である。囲み文字は、アプタマー（Ｓｅｐｈａｄｅｘなど）配列である。

２５７－２５９：ヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合した細菌ｔＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ

２６０－２６３：細菌のｔＲＮＡ断片（ｔＲＦ）

２６４：ヒトプレｍｉＲ－１２９１に融合した細菌ｔＲＮＡ

２６５－２７０：２つのヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合した細菌ｔＲＮＡ、ｍｉＲ

－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ
２７１－２８８：２つのヒトプレｍｉＲ－３４ａ誘導体に融合した細菌ｔＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖の代わりにｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ、アプタマーの付加

表８－ヒトtRNA (htRNA) 配列

アミノ酸	アンチコドン	配列番号	5' tRNA 部分	配列番号	3' tRNA 部分
セリン	TGA	300	GCAGCGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUU GGACU	301	AAUCCAAUGGGGUCUCCCCGCGCAGGUUCGAACCCU GCUCGCUGCGCCA
セリン	GCT	302	GACGAGGUGGCCGAGUGGUUAAGGCGAU GGACU	303	AAUCCAUUGUGCUCUGCACGCGUGGGUUCGAAUCC CACCCUCGUCGCCA
ロイシン	TAA	304	ACCAGGAUGGCCGAGUGGUUAAGGCGUU GGACU	305	GAUCCAAUGGACAUAUGUCCGCGUGGGUUCGAACC CCACUCCUGGUACCA
ロイシン	CAA	306	GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCC AGACU	307	GUUCUGGUCUCCCGUAUGGAGGCGUGGGUUCGAAUC CCACUUCUGACACCA
グリシン	GCC	308	GCAUGGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUC GCCU	309	ACGCGGGAGGCCCGGUUCGAUUCCCGGCCCAUGCA CCA
グリシン	TCC	310	GCGUUGGUGGUAUAGUGGUUAGCAUAGC UGCCU	311	AAGCAGUUGACCCGGUUCGAUUCCCGGCCAACGC ACCA
グルタミン酸	CTC	312	UCCCUGGUGGUCUAGUGGUUAGGAUUCG GCGCU	313	ACCGCCGCGGCCCGGUUCGAUUCCCGGUCAGGGAA CCA
アスパラギン酸	GTC	314	UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCC GCCU	315	ACGCGGGAGACCGGGUUCGAUUCCCCGACGGGGA GCCA
グルタミン	TTG	316	GGUCCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCU GGACU	317	AAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGGACC UCCA
グルタミン	CTG	318	GGUUCCAUGGUGUAAUGGUUAGCACUCU GGACU	319	AAUCCAGCGAUCCGAGUUCAAAUCUCGGUGGGAACC UCCA
アルギニン	ACG	320	GGGCCAGUGGCGCAAUGGAUAACGCGUCU GACU	321	GAUCAGAAGAUUCCAGGUUCGACUCCUGGCUGGCU CGCCA
アルギニン	TCT	322	GGCUCUGUGGCGCAAUGGAUAGCGCAUU GGACU	323	AAUUCAAAGGUUGUGGGGUUCGAAUCCCCACCAGAGU CGCCA
システイン	GCA	324	GGGGGCAUAGCUCAGUGGUAGAGCAUUU GACU	325	GAUCAAGAGGUCCCUGGUUCAAAUCCAGGUGCCCC CUCCA
リジン	CTT	326	GCCCGGCUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUGG GACU	327	AAUCCCAGGGUCGUGGGUUCGAGCCCCACGUUGGG CGCCA
リジン	TTT	328	GCCUGGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUC AGACU	329	AAUCUGAGGGUCCAGGGUUCAAGUCCCUGUUCAGG CACCA
メチオニン	CAT	330	GCCUCGUUAGCGCAGUAGGUAGCGCGUCA GUCU	331	AAUCUGAAGGUCGUGAGUUCGAUCCUCACACGGGG CACCA

表８－ヒトtRNA (htRNA) 配列

アミノ酸	アンチコドン	配列番号	5' tRNA 部分	配列番号	3' tRNA 部分
アスパラギン	GTT	332	GUCUCUGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGUU CGGCU	333	AACCGAAAGGUUGGUGGUUCGAUCCCACCCAGGGA CGCCA
アラニン	AGC	334	GGGGGUGUAGCUCAGUGGUAGAGCGCGU GCUU	335	AUGCACGAGGCCCCGGGUUCAAUCCCCGGCACCUCC ACCA
ヒスチジン	GTG	336	GCCGUGAUCGUAUAGUGGUUAGUACUCU GCGUU	337	GCCGCAGCAACCUCGGUUCGAAUCCGAGUCACGGCA CCA
イソロイシン	AAT	338	GGCCGGUUAGCUCAGUUGGUUAGAGCGU GGUGCU	339	AACGCCAAGGUCGCGGGUUCGAUCCCCGUACUGGCC ACCA
イソロイシン	TAT	340	GCUCCAGUGGCGCAAUCGGUUAGCGCGCG GUACU	341	AAUGCCGAGGUUGUGAGUUCGAUCCUCACCUGGAG CACCA
フェニルアラニン	GAA	342	GCCGAAAUAGCUCAGUUGGGAGAGCGUU AGACU	343	GAUCUAAAGGUCCCUGGUUCGAUCCCGGGUUUCGG CACCA
プロリン	AGG	344	GGCUCGUUGGUCUAGGGGUAUGAUUCUC GCUU	345	AUGCGAGAGGUCCCGGGUUCAAAUCCCGGACGAGC CCCCA
トリプトファン	CCA	346	GACCUCGUGGCGCAACGGUAGCGCGUCUG ACU	347	GAUCAGAAGGCUGCGUGUUCGAAUCACGUCGGGGU CACCA
チロシン	GTA	348	CCUUCGAUAGCUCAGUUGGUAGAGCGGA GGACU	349	GAUCCUUAGGUCGCUGGUUCGAAUCCGGCUCGAAG GACCA
バリン	CAC	350	GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUU CGCCU	351	ACGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAAA CACCA
スレオニン	標的	352	GGCUCUAUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGC CUGUCU	353	AAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGUAGAGC CUCCA
スレオニン	AGT	354	GGCGCCGUGGCUUAGUUGGUUAAAGCGCC UGUCU	355	AAACAGGAGAUCCUGGGUUCGAAUCCCAGCGGUGC CUCCA

表１０－アプタマー／標的配列

アプタマー標的	RNA 配列 (5'-3')	配列番号
Sephadex	AGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUUGCGG	356
テオフィリンアプタマー (TPA)	GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC	357
ペガプタニブ (抗 VEGF)	CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCCG	358
EpCAM アプタマー (EpCAMA)	GCGACUGGUUACCCGGUCG	359
アポリポタンパク質 B-siRNA (アポ B-siRNA)	GCCUCAGUCUGCUUCGCACC	360
ICAM1-siRNA	GCCCAAGCUGGCAUCCGUCA	361
Nrf2-siRNA	UAAUUGUCAACUUCUGUCA	362
ARV7-siRNA	GUAGUUGUAAGUAUCAUGA	363
GFP-siRNA	AGUUGUACUCCAGCUUGUGCCC	364
スクランブル-1 (scrm-1)	GUGUAACACGUCUAUACGCCCA	365
スクランブル-2 (scrm-2)	GUUCGUCUGUAGACGGUUGUUG	366
スクランブル-3 (scrm-3)	UUCUCCGAAGCUGUCACGUUU	367
スクランブル-4 (scrm-4)	AAGCGCGCUUUGUAGGAUUCGU	368
スクランブル-5 (scrm-5)	GGUGUCGUUUCUCUGGUGAGUA	369

【実施例】

【０１８０】

以下の実施例は、特許請求された発明を説明するために提供されるが、限定するものではない。

【０１８１】

実施例１

生体工学によるｎｃＲＮＡは、がん治療のために細胞のｍｉＲＮｏｍｅプロファイルを選択的に変化させる。

材料および方法

細菌培養ＤＨ５α（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、イリノイ州ロックフォード）およびＨＳＴ０８（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カリフォルニア州マウンテンビュー）は、プラスミドの調製および増幅のために、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを添加したＬＢで３７℃で増殖した。ＲＮＡを産生するために、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを添加した２ｘＹＴ培地を使用してＨＳＴ０８　Ｅ．ｃｏｌｉの増殖を促進した。

【０１８２】

ヒト細胞培養ヒト肺がん細胞株Ａ５４９　Ｈ２３、Ｈ１６５０、Ｈ１２９９、およびＨ１９７５は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（米国バージニア州マナッサス）から購入した。ＨＥＫ２９３Ｔおよびダイサー－ＫＯ（４－２５）細胞株は、ブライアン　Ｒ．カレン教授（デューク大学、ノースカロライナ州ダーラム）から快く提供された（Ｂｏｇｅｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。ルシフェラーゼおよびＧＦＰを発現するＡ５４９－Ｌｕｃ－ＧＦＰ細胞は、ｐＣＣＬｃ－Ｌｕｃ－ＥＧＦＰレンチウイルス構築物（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｃｏｒｅ、ＵＣ　Ｄａｖｉｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ、カリフォルニア州サクラメント）を用いる形質導入によって生成した。肺がん細胞株は、１０％ウシ胎児血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０で維持し、２９３Ｔ細胞は、１０％ウシ胎児血清とゲンタマイシン（１０μｇ／ｍＬ）を添加したＤＭＥＭで維持し、両方とも３７℃、加湿環境で５％ＣＯ２および９５％空気で増殖した。

【０１８３】

ｎｃＲＮＡ発現プラスミドの構築。個々のｍｉＲＮＡおよびプレｍｉＲ－３４ａの配列はｍｉＲＢａｓｅ（ｍｉｒｂａｓｅ．ｏｒｇ／）から入手し、ｓｉＲＮＡおよびＲＮＡアプタマー配列は以前に報告した研究から収集した（表１）。標的ｎｃＲＮＡ配列をコードするインサート（表２）は、プライマー（ＩＤＴ、カリフォルニア州サンディエゴ）を使用したＰＣＲ増幅によって生成した（表２）。増幅産物は、Ｓｅａｍｌｅｓｓ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を介してＳａｃＩＩおよびＥａｇＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、マサチューセッツ州イプスウィッチ）によって直鎖状化されたｐＢＳＴＮＡＶ（Ｐｏｎｃｈｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００９）にアニーリングした。プラスミドをＤＨ５α細胞で増殖させ、配列決定分析（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ、ニュージャージー州ピスカタウェイ）により確認した。

【表１】

表 1
標的 ncRNA 剤の生物工学のために文献から得られた siRNA および RNA アプタマー配列のリスト

名称	RNA 配列 (5'-3')	参照文献
アポリポタンパク質 B-siRNA (ApoB-siRNA)	GCCUCAGUCUGCUUCGCACC (配列番号 360)	(Raal et al., 2010)
ICAM1-siRNA	GCCCAAGCUGGCAUCCGUCA (配列番号 361)	(Miner et al., 2004)
Nrf2-siRNA	UAAUUGUCAACUUCUGUCA (配列番号 362)	(Feinstein, 2013)
ARV7-siRNA	GUAGUUGUAAGUAUCAUGA (配列番号 363)	(Liu et al., 2014)
GFP-siRNA	AGUUGUACUCCAGCUUGUGCCC (配列番号 364)	(Chen et al., 2015)
テオフィリンアプタマー (TPA)	GGCGAUACCAGCCGAAAGGCCCUUGGCAGCGUC (配列番号 357)	(Zimmermann et al., 2000)
ペガプタニブ	CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCCG (配列番号 358)	(Ng et al., 2006)
EpCAM アプタマー (EpCAMA)	GCGACUGGUUACCCGGUCG (配列番号 359)	(Shigdar et al., 2011)
scrm-1	GUGUAACACGUCUAUACGCCCA (配列番号 365)	(Schober et al., 2014)
scrm-2	GUUCGUCUGUAGACGGUUGUUG (配列番号 366)	genscript.com/siRNA_target_finder.html
scrm-3	UUCUCCGAAGCUGUCACGUUU (配列番号 367)	(Luan et al., 2010)
scrm-4	AAGCGCGCUUUGUAGGAUUCGU (配列番号 368)	(Nakatsu et al., 2013)
scrm-5	GGUGUCGUUUCUCUGGUGAGUA (配列番号 369)	invivogen.com/sirnawizard/

表２Ａ～Ｂ

標的ＢＥＲＡ、および対応するプラスミドの構築のために使用されたプライマーの配列。下線はｔＲＮＡ配列；標的ｍｉＲＮＡ／ｓｉＲＮＡ配列およびそれらの実質的相補鎖（例えばガイドＲＮＡ）には二重下線を付している；アプタマー配列は枠で囲っている。

【表２－１】

表２Ａ－プレ miR-34a 誘導体

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	対応するコード配列をクローニングするためのプライマー (5'-3')	
MSA/mir-34a-129 ヌクレオチド	233	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGAGUAAUUUAC GUCGACGUGGACCGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU UAGCUGGUUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUA UACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUGGGGCCCAAGAGGGAAGA UGACGUCGAUGGUUGCGGCCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUC GUAGCCACCA (配列番号 383)	75,604	順方向	AGTAATTTACGTCGACGTG GACCGGCCAGCTGTGAGT GTT (配列番号 388)
				逆方向	CGGCCGCAACCATCGACG TCATCTTCCCTCTTGGGCC CCACAACG (配列番号 389)
tRNA/mir-34a-110 ヌクレオチド 144ΔC	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUG AGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUGUGAGCAAUAG UAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGU UGUGGGGCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACC A (配列番号 384)	58,322	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGG CCAGCTGTGAGTGTTTCTT TG (配列番号 390)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGG GGCCCCACAACGTGCAG (配列番号 391)
tRNA/mir-34a-110 ヌクレオチド 野生型	181	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUG AGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUGUGAGCAAUAG UAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGU UGUGGGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCAC CA (配列番号 385)	58,627	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGG CCAGCTGTGAGTGTTTCTT TG (配列番号 390)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGG GGCCCCACAACGTGCAG (配列番号 393)
tRNA/mir-34a-110 ヌクレオチド G138U/139ΔG	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCUGUG AGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUGUGAGCAAUAG UAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGU UGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACC A (配列番号 257)	58,243	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGG CCAGCTGTGAGTGTTTCTT TG (配列番号 390)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGG GGGCCAACAACGTGCAGC (配列番号 395)
tRNA/mir-34a-110 ヌク	182	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCCGGGCCCCGCUGU GAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUGUGAGCAAUA GUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACG	58,908	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGG CCCCGCTGTGAGTGTTTC (配列番号 396)

【表２－２】

表２Aープレ miR-34a 誘導体					
名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	対応するコード配列をクローニングするためのプライマー (5'-3')	
				逆方向	
レオチド A39CC		UUGUGGGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCA CCA (配列番号 387)			TCGAACCTGTGACCCGCGG GGGCCCCACAACGTGCAG (配列番号 393)

【表２－３】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')	
miR-27a-3p	181	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUUUCACAGUGGC UAAGUUCCGCUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGC AGGGCUUAGCUGCUUGUGACUAGAAGUGCUGCA CGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUC CCGUCGUAGCCACCA (配列番号 398)	58,580	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTTCACAGTGGCTAAGTTCCGCTTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 442)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGTCACAAGCAGCTAAGCC CTGCCTTCCTTACTATTGC (配列番号 443)
miR-27b-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUUUCACAGUGGC UAAGUUCCUGCUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGC AGAGCUAGCUCAUUGUGACCAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 399)	58,242	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTTCACAGTGGCTAAGTTCTGCTTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 444)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTGGTCACAGTGAGCTAGCTCT GCCTTCCTTACTATTGC (配列番号 445)
miR-892b-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCCACUGGCUCCU UUCUGGGUAGAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAUCU ACUCAGAAGUGAGCCAGUUUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 400)	58,203	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCACTGGCTCCTTTCTGGGTAGATGTG AGCAATAGTAA (配列番号 446)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAAACTGGCTCACTTCTGAGT AGATTCCTTACTATTGC (配列番号 447)
miR-451a-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAAACCGUUACC AUUACUGAGUUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAC UUAGUAUGGUUAAUGGUUCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 401)	58,198	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTAAACCGTTACCATTACTGAGTTTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 448)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGAACCATTAACCATACTAA GTCTTCCTTACTATTGC (配列番号 449)

【表２－４】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')		
ApoB-siRNA	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCACGGCCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGCCUCAGUCU GCUUCGCACCUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGG UGCGAACAGUACUGAGGCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 402)	58,232	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTGCCTCAGTCTGCTTCGCACCTTGTGA GCAATAGTAA (配列番号 450)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGCCTCAGTACTGTTCGCA CCCTTCCTTACTATTGC (配列番号 451)
抗 miR-33a-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAACCACAGAAC AUGCAAUGCAAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAUUUG CAUUGCGUAUUCUGGUGGGUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 403)	58,273	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTACCACCAGAACATGCAATGTGAGTG AGCAAT (配列番号 452)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTACCCACCAGAATACGCAAT GCAATTCCTTA (配列番号 453)
抗 miR-126-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAGCAUGGCACU CAUUAUUACGCUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCCG UAAUAAGAGUUGCCAUGCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 404)	58,233	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTAGCATGGCACTCATTATTACGCTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 454)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGCATGGCAACTCTTATTA CGCTTCCTTACTATTGC (配列番号 455)
ICAM1-siRNA	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGCCCAAGCUG GCAUCCGUCAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGUG ACGGAUCCAUGCUUGGGCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 405)	58,232	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTGCCCAAGCTGGCATCCGTCATTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 456)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGCCCAAGCATGGATCCG TCACTTCCTTACTATTGC (配列番号 457)
miR-298-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAGCAAGCAG GGAGGUUCUCCCAUGAGCAAUAGUAAGGAGGCGG AGAACCCCCAUGCUUUUGACACAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 406)	58,364	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTAGCAGAAGCAGGAGGTTCTCCCATG AGCAATAGTAA (配列番号 458)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTGTCAAAAGCATGGGGGTTCT CCCCTCCTTACTATTGC (配列番号 459)
miR-519c-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUCUCUAGAGGGA AGCGCUUUCUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAACAG	58,252	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCTCTCTAGAGGGAAGCGCTTTCTGTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 460)

【表２－５】

表２Ｂ－nCAR/siRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量（ダルトン）	プライマー (5'-3')		
		AAAGUGCAUCUUUUUAGAUUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 407)		逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAATCTAAAAAGATGCACTTT CTGTTCCTTACTATTGC (配列番号 461)
miR-122-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGAGUGUGAC AAUGGUGUUUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAACAA ACGCCAUGUACACACUCCCUAGAAGUGCUGCACG UUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC GUCGUAGCCACCA (配列番号 408)	58,249	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTGGAGTGTGACAATGGTGTTTGTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 462)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGGAGTGTGTACATGGCG TTTGTTCCTTACTATT (配列番号 463)
Nrf2-siRNA	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAUUGUCAAC UACUGUCAGUUUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAAAC UGACAGAGUAUGACAAUUCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 409)	58,188	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTCAAGAGCAATAACGAAAAATGTTGT GAGCAA (配列番号 464)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGAATTGTCATACTCTGTCA GTTTTCCTTACTAT (配列番号 465)
miR-335-5p	181	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCAAGAGCAAU AACGAAAAAUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAACC GUUUUUCAUUAUGCUCUUGCUAGAAGUGCUGCA CGUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUC CCGUCGUAGCCACCA (配列番号 410)	58,470	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTCAAGAGCATAATGAAAA ACGGTTCCTTAC (配列番号 466)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGCAAGAGCATAATGAAAA ACGGTTCCTTAC (配列番号 467)
miR-126-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCGUACCGUGA GUAAUAAUGCGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUG CAUUAUUCUCUAUGGUACGCAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 411)	58,228	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCGTACCGTGAGTAATAATGCGTGTG AGCAA (配列番号 468)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTGCGTACCATAGAGAATAAT GCACTTCCTTACT (配列番号 469)
miR-144-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGGAUAUCAUCA UAUACUGUAAGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAUUU ACAGUAAUGUAUGAUAUCAUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 412)	58,214	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTGGATATCATCATATACTGTAAGTGTG AGCAATAGTA (配列番号 470)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTATGATATCATACATTACTGT AAATTCCTTACTATTG (配列番号 471)

【表２－６】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')	
ARV7-siRNA	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGUAGUUGUAAG UAUCAUGAUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA UCAUGAACUAUACAACUAAUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 413)	58,252	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTGTAGTTGTAAGTATCATGATGTTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 472)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCCGCGGGGGCCAACACAACG TGCAGCACTTCTATTAGTTGTATAGTTCATGA TGCTTCCTTACTATTGC (配列番号 473)
miR-200c-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCGUCUUACCCA GCAGUGUUUGGGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAUCA AACACUCUGUGGGUAAGACCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 414)	58,186	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCGTCTTACCCAGCAGTGTTTGGTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 474)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGTCTTACCACAGAGTGTT TGATTCCTTACTATTG (配列番号 475)
GFP-siRNA	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAGUUGUACUCC AGCUUGUGCCCUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGG CACAAGUGGUAGUACAACCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 415)	58,264	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 476)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGTTGTACTACCACTTGTG CCCTTCCTTACTATTGC (配列番号 477)
let-7c-5p	181	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGAGGUAGUAG GUUGUAUGGUUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAA CUGUACACCUUACUACCUUUCAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 259)	58,535	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTGTG AGCAA (配列番号 478)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTGAAAGGTAGTAAGGTGTAC AGTTCTTCCTTACT (配列番号 479)
miR-127-3p	185	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUAUCGGAUCCCGUC UGAGCUUGGCUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAAGC CUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUAGAAGUGC UGCACGUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCG AAUCCCGUCGUAGCCACCA (配列番号 417)	59,927	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTATCGGATCCGTCTGAGCTTGGCTTGTG AGCAAT (配列番号 480)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTATCAGAGCCCTCTGAGCTTC AGCAGGCTTTCCTTA (配列番号 481)
miR-34a-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU	58,243	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTG (配列番号 390)

【表２－７】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')	
		UAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA AUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 257)		逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGC (配列番号 483)
miR-124-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAAGGCACGCG GUGAAUGCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCG GUGUUCCCGUCGUGCCUUCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 258)	58,265	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTAAGGCACGCGGTGAATGCCGTTGTG AGCAA (配列番号 484)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGAAGGCACGACGGGAACA CCGCTTCCTTACTAT (配列番号 485)
miR-328-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCUGGCCCUCUC UGCCCUUCCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCG GGGGGGAGAUGGGGGCCAUUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 420)	58,335	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCCGTTCCTTTGGCAATGGTAATTGTG AGCAATAGTA (配列番号 486)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAATGGCCCCCATCTCCCCCC CGCTTCCTTACTATTGC (配列番号 487)
抗 miR-451b-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCCGUUCCUUUG GCAAUGGUAAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAAUU ACCAUUCCAUAAGGAACGUUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 421)	58,156	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCCGTTCCTTTGGCAATGGTAATTGTG AGCAATAGTA (配列番号 488)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAACGTTCCTTATGGAATGGT AATTTCCTTACTA (配列番号 489)
$tRNA_{Met}$	75	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GAUAUCCGCGGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCG UAGCCACCA (配列番号 422)	24,344	順方向	TTGTAACGCTGAATTCGGCTACGTAGCTCAGT TGGTTAGAGCAGCGGCCGATATCCGCGGGTC ACAGGT (配列番号 490)
				逆方向	CTTTCGCTAAGGATCTGCAGTGGTGGCTACGA CGGGATTCGAACCTGTGACCCGCGGATAT (配列番号 491)
MSA	107	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GAGUAAUUUACGUCGACGGUGACGUCGAUGGUU GCGGCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGU AGCCACCACUGCAGAUCCUUAGCGAAAGCUAAG GAUUUUUUUUAAGCUU (配列番号 423)	47,870		

【表２－８】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')	
miR-206-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGAAUGUAAG GAAGUGUGGUGUGAGCAAUAGUAAGGAACCA CAUGCUUCUUUAUAUCCCCAAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 424)	58,251	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTGGAATGTAAGGAAGTGTGGTGTG AGCAA(配列番号 492)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTTGGGATATAAAGAAGCAT GTGGTTCCTTACTA (配列番号 493)
抗 miR-21-5p-3	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGACUGGUGUUG CCAUGAGAUUUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAA UCUCAUGCAUACACCAGUAUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 425)	58,235	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTGACTGGTGTTGCCATGAGATTTTGTG AGCAATA (配列番号 494)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTATACTGGTGTATGCATGAGA TTCTTCCTTAC (配列番号 495)
miR-33a-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGUGCAUUGUAG UUGCAUUGCAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGGU GCAAUGAAACGACAAUGCAAAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 426)	58,361	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTGTGCATTGTAGTTGCATTGCATTGTG AGCAAT (配列番号 496)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTTTGCATTGTCGTTTCATTGC ACCTTCCTTACT (配列番号 497)
miR-130b-3p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUCAGUGCAAUGA UGAAAGGGCAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUG CUCUUUCCCCGUUGCACUAUAGAAGUGCUGCACG UUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCC GUCGUAGCCACCA (配列番号 427)	58,226	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTCAGTGCAATGATGAAAGGGCATTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 498)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTATAGTGCAACAGGGAAAGA GCACTTCCTTACTATTGC (配列番号 499)
抗 miR-21-5p-2	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGAUUCAACAGU CAACAUCAGUCUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAC UGAUGUGACUUGUUGAAUAUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 428)	58,243	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTGATTCAACAGTCAACATCAGTCTGTG AGCAATAGT (配列番号 500)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTATATTCAACAAGTCACATCA GTCTTCCTTAC (配列番号 501)
抗 miR-122-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUACCACAAAC ACAGAUUUGAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAAUC	58,125	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTTACCACAAACACAGATTTGATTGTG AGCAATAGTA (配列番号 502)

【表２－９】

表２Ｂ－ｎCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')		
		AAAUCUUGUCUUGUGGUACUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 429)		逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGTACCACAAGACAAGATT TGATTTCCTTACTA (配列番号 503)
scrm-5	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGGUGUCGUUUC UCUGGUGAGUAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUA CUCACCAUAGAAACGACACAAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 430)	58,273	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGGGCCAACAACG TTTCTTGGTGTCGTTTCTCTGGTGAGTATGTG AGCAAT (配列番号 504)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTTGTGTCGTTTCTATGGTGAG TACTTCCTTACTA (配列番号 505)
scrm-4	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUAAGCGCGCUUU GUAGGAUUCGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCG AAUCCUCAAUAGCGCGCUGUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 431)	58,281	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGGGCCAACAACG TTTCTTAAGCGCGCTTTGTAGGATTCGTTGTG AGCAA (配列番号 506)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTACAGCGCGCTATTGAGGATT CGCTTCCTTACTAT (配列番号 507)
scrm-2	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGUUCGUCUGUA GACGGUUGUUGUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA ACAACCUUCUCCAGACGAAAAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 432)	58,249	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGGGCCAACAACG TTTCTTGTTCGTCTGTAGACGGTTGTTGTGTG AGCAAT (配列番号 508)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTTTTCGTCTGGAGAAGGTTGT TGCTTCCTTACTA (配列番号 509)
scrm-3	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUUCUCCGAAGC UGUCACGUUUUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGAA UCGUGUAGCUUUUCGGAGACUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 433)	58,181	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGGGCCAACAACG TTTCTTTTCTCCGAAGCTGTCACGTTTTTGTGA GCAAT (配列番号 510)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGTCTCCGAAAGCTACACG ATTCTTCCTTACTAT (配列番号 511)
scrm-1	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGUGUAACACGU CUAUACGCCCAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUG GGCGUACAGAAGUGUUACAAAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 434)	58,335	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTGTGTAACACGTCTATACGCCCATGTG AGCAA (配列番号 512)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTTTGTAACACTTCTGTACGCC CACTTCCTTACTATTG (配列番号 513)

【表２－１０】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA 配列	分子量 (ダルトン)	プライマー (5'-3')	
miR-21-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUAGCUUAUCAG ACUGAUGUUGAUUGUGAGGCAAUAGUAAGGAAGUC AACAUCCGUCGAUGGGCUGUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 435)	58,267	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTAGCTTATCAGACTGATGTTGATGTG AGCAAT (配列番号 514)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTACAGCCCATCGACGGATGTT GACTTCCTTACTA (配列番号 515)
抗 miR-21-5p	180	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUCAACAUCAGU CUGAUAAGCUAUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUA GCUUAUAAGAAUGAUGUUGCAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCC CGUCGUAGCCACCA (配列番号 436)	58,267	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTCAACATCAGTCTGATAAGCTATGTG AGCAA (配列番号 516)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTGCAACATCATTCTTATAAGC TACTTCCTTACTA (配列番号 517)
miR-34a/ TPA3'	213	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU UAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA AUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCC UUGGCAGCGUCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUC CCGUCGUAGCCACCA (配列番号 437)	68,926	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCT (配列番号 390)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGACGCTGCCAAG GGCCTTTCGGCTGGTATCGCCGGGCCAACAA CGTGCAGC (配列番号 519)
miR-34a/ TPA3'+TPA5'	246	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU UAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA AUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCGGCGAUACCAGCCGAAAGGCCC UUGGCAGCGUCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUC CCGUCGUAGCCACCA (配列番号 438)	79,610	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG AAGGCCCTTGGCAGCGTCGGCCAGCTGTGAG TGTTT (配列番号 520)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGGACGCTGCCAAG GGCCTTTCGGCTGGTATCGCCGGGCCAACAA CGTGCAGC (配列番号 519)
miR-888/ ペガプタニブ 3'	207	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUACUCAAAAAG CUGUCAGUCAUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGUG ACUGACGCUUUUUUUGGGUCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCCGGAAUCAGUGAAUGCUUAUAAC AUCCGCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCCGUCG UAGCCACCA (配列番号 439)	66,868	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGGCCAGCTGTGAGTG TTTCTTTACTCAAAAAGCTGTCAGTCATTGTG AGCAATAGTAA (配列番号 522)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGGCGGATGTGTATAAG CATTCACTGATTCCGGGGCCAACAACGTGCA GCACTTCTAGACCCCAAAAAAGCGTCAGTCAC TTCCTTACTATTGC (配列番号 523)

【表２－１１】

表２Ｂ－nCAR/sRNA

名称	#ヌクレオチド	RNA配列	分子量（ダルトン）	プライマー（5'-3'）	
miR-34a/ペガプタニブ5'	207	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GCGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCCGGGCCA GCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAGCUG GUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGC AAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUU GGCCCCCGCGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGU AGCCACCA (配列番号 440)	66,922	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGCGGAATCAGTGAATG CTTATACATCCGGGCCAGCTGTGAGTGTTTCT TTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGCAA TAGTAA (配列番号 524)
				逆方向	GCATTCACTGATTCCGCGGGGGCCAACAACG TGCAGCACTTCTAGGGCAGTATACTTGCTGAT TGCTTCCTTACTATTGC (配列番号 525)
miR-34a/EpCAMA3'	199	GGCUACGUAGCUCAGUUGGUUAGAGCAGCGGCC GGGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU UAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCA AUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCAC GUUGUUGGCCCGCGACUGGUUACCCGGUCGCCG CGGGUCACAGGUUCGAAUCCCGUCGUAGCCACCA (配列番号 441)	64,373	順方向	GTTAGAGCAGCGGCCGGCCAGCTGTGAGTG TTTCT (配列番号 390)
				逆方向	TCGAACCTGTGACCCGCGCGGACCGGGTAAC CAGTCGCGGGCCAACAACGTGCAGCAC (配列番号 527)

【０１８４】

Ｅ．ｃｏｌｉでの組換えＲＮＡの発現。ＨＳＴ０８コンピテント細胞を標的プラスミドで形質転換した後、少量（５～５０ｍＬ）または大量（５００～６００ｍＬ）のいずれかで培養した。フェノール抽出によって全ＲＮＡを単離し、ＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、イリノイ州ロックフォード）で定量化し、変性尿素（８Ｍ）ポリアクリルアミド（８％）ゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）によって分析した。画像は、ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を用いて取得した。バンドの強度を用いて、全ＲＮＡと比較した標的ＲＮＡの発現を概算した。以下に示すように、全ＲＮＡ

における標的ＲＮＡの割合の正確な計算は、ＦＰＬＣ精製中に標的ＲＮＡのピークの面積をクロマトグラフの全ピークの総面積で割ることによって達成された。

【０１８５】

ｎＣＡＲ／ｓＲＮＡの少量および大量精製。標的の生物工学ＲＮＡ剤（bioengineered RNA agent「ＢＥＲＡ」）は、スピンカラムのＲＮＡ Ｃｌｅａｎ ＆ ＣｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒおよびＳｅｌｅｃｔ－ａ－Ｓｉｚｅ ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ ＆ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、カリフォルニア州アーバイン）を使用して少量精製した。ＲＮＡは、＞２００ヌクレオチド（ＲＮＡ Ｃｌｅａｎ＆ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ）について提案されるプロトコル、続いて５０塩基対カットオフプロトコル（Ｓｅｌｅｃｔ－ａ－Ｓｉｚｅ ＤＮＡ Ｃｌｅａｎ ＆ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ）に従って単離した。標的ＢＥＲＡの大量精製は、陰イオン交換Ｅｎｒｉｃｈ－Ｑ １０ｘ１００カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を備えるＮＧＣ ＱＵＥＳＴ １０ＰＬＵＳ高速タンパク質液体クロマトグラフィーシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して行った。全ＲＮＡからのｎＣＡＲ／ｓＲＮＡの分離は、最初に緩衝液Ａ（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）を用いて、２．５ｍｌ／分の一定流速で２分間平衡化した後、同じ流速で、５５％緩衝液Ｂ（緩衝液Ａ＋１Ｍ塩化ナトリウム、ｐＨ７．０）で４．８分間、５５～７５％緩衝液Ｂで２０．４分間、次に１００％緩衝液Ｂで９．６分間、勾配溶離したＥｎｒｉｃｈ－Ｑ１０ｘ１００カラムで行った。ＦＰＬＣトレースは、ＵＶ／Ｖｉｓ検出器を使用して２６０／２８０ｎｍでモニタリングされ、尿素－ＰＡＧＥ分析用に個々の画分を収集した。純度および予想サイズを確認した後、標的ＢＥＲＡを含む画分をプールし、エタノールで沈殿させ、脱塩し、Ａｍｉｃｏｎ ｕｌｔｒａ－２ｍＬ ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ ｆｉｌｔｅｒ（３０ｋＤａ；ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、マサチューセッツ州ビレリカ）を使用してヌクレアーゼを含まない水に濃縮／溶解した。

【０１８６】

ＲＮＡ純度の決定。ＲＮＡ純度は、前述のようにＨＰＬＣ分析によって定量化し（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５）、エンドトキシン活性は、インビトロおよびインビボの機能研究前に、製造元の指示に従って、Ｐｙｒｏｇｅｎｔ－５０００ ｋｉｎｅｔｉｃ ＬＡＬ ａｓｓａｙ（Ｌｏｎｚａ、メリーランド州ウォーカーズビル）を使用して決定した。ＦＰＬＣによって精製されたｎＣＡＲ／ｓＲＮＡの大部分は、純度が９８％超であり（表３）、エンドトキシンレベルは最小であった（＜１ＥＵ／μｇＲＮＡ）。

【表３】

表３
ｎＣＡＲプラットフォームを使用して大量産生され、ＦＰＬＣ法によって単離された各ＢＥＲＡの収率および純度

nCAR	収率 (mg RNA/L 発酵)	純度 (%; HPLC による)
miR-27a-3p	10.1	99.4
miR-27b-3p	10.2	99.4
miR-451a-5p	18.8	98.9
ApoB-siRNA	17.0	99.0
抗 miR-126-3p	20.0	99.2
ICAM1-siRNA	12.0	98.6
miR-298-5p	15.4	97.2
miR-519c-5p	16.0	99.3
miR-122-5p	9.80	87.0
Nrf2-siRNA	18.7	98.3
miR-126-3p	11.6	99.8
miR-144-5p	10.6	98.7
ARV7-siRNA	17.0	99.3
GFP-siRNA	12.0	99.3
let-7c-5p	8.70	92.4
miR-127-3p	3.83	95.5
miR-34a-5p	16.6	98.3
miR-124-3p	8.34	98.3
miR-328-3p	14.8	99.7
抗 miR-451b-5p	11.3	99.3
MSA	5.72	99.6
抗 miR-21-5p-3	7.48	98.2
miR-33a-5p	7.54	96.0
抗 miR-21-5p-2	9.41	96.9
抗 miR-122-5p	7.67	99.3
scrm-5	7.54	53.5
scrm-4	7.43	98.2
scrm-3	8.54	99.3
抗 miR-21-5p	11.7	99.4
miR-34a/TPA3'+TPA5'	18.2	99.5
miR-888/ペガプタニブ 3'	16.0	98.3
miR-34a/EpCAMA3'	12.7	99.0

【０１８７】
ＲＮＡ配列決定およびデータ分析。２９３ＴおよびダイサーＫＯ細胞に２０ｎＭのｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐまたは対照ｔＲＮＡをトランスフェクトした。細胞は３重実験で処理され、別々にプロセスおよび配列決定された。トランスフェクションの４８時間後にＴＲＩｚｏｌ－クロロホルムプロトコル（Ａｂｃａｍ）を使用して全ＲＮＡを単離し、ＲＮＡの完全性を１％標準アガロースゲル電気泳動で評価した。

【０１８８】
低分子ＲＮＡ：ライブラリー構築はＢＧＩによって調製し、３０ヌクレオチド未満の低分子ＲＮＡを、１μｇの全ＲＮＡから始めるゲル分離（１５％尿素－ＰＡＧＥ）によって収集した。低分子ＲＮＡ断片を、固有のバーコードにアニーリングしたアデニル化３’アダプターに連結した後、５’アダプターを連結し逆転写（ＲＴ）を行った。第１のｃＤＮＡ鎖を合成した後、１５サイクルのＰＣＲ増幅により産物を伸長した。非特異的産物からＰＣＲ増幅産物を精製するために第２のサイズ選別操作を行い、ゲル分離によって１０３～１１５ｂｐの断片を選別した。ゲル精製後、ＰＣＲ収量をＱｕｂｉｔ　３．０　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド）で定量化し、サンプルをプールして、環状一本鎖ＤＮＡ（環状ｓｓＤＮＡ）を作製し、最終の低分子ＲＮ

Ａライブラリーを得た。ＤＮＡナノボール（ＤＮＢ）は、環状ｓｓＤＮＡを用いてローリングサークル複製（ＲＣＲ）によって作製され、配列決定プロセスで蛍光シグナルを増大させた。ＤＮＢをパターン化ナノアレイにロードし、５０塩基対のシングルエンドリードをＢＧＩＳＥＱ－５００プラットフォーム（中国シンセン）で読み取った。ＦＡＳＴＱ形式の配列データをｍｉＲＤｅｅｐモジュールを使用して分析し（Ａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）、既知のｍｉＲＮＡのリード数を得た。トランスフェクトされたｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐまたはｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐから導き出したリード数を計算するために、ＰＥＲＬスクリプトが開発され、ＦＡＳＴＱ形式配列データからの配列リードを対応するコンストラクターにマッピングした後、各サンプルのアイソフォームリードをカウントした。このように既知のｍｉＲＮＡ、および各サンプル間のｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐまたはｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐに由来するｓＲＮＡのリード数を使用して、ＥｄｇｅＲを用いて表現型間で有意に差次的発現するｍｉＲＮＡ（Ｐ＜０．０５およびｌｏｇ２ＣＰＭ＞６）を分析した（Ｒｏｂｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。

【０１８９】

メッセンジャーＲＮＡ：ｍＲＮＡはｐｏｌｙ－Ｔオリゴ付着磁気ビーズを使用して精製した。精製後、高温下で二価カチオンを使用して、ｍＲＮＡを小片に断片化した。切断されたＲＮＡ断片は、ランダムプライマーを使用して逆転写により第１のｃＤＮＡ鎖にコピーされ、続いてＤＮＡポリメラーゼＩおよびＲＮａｓｅＨを使用して第２のｃＤＮＡ鎖を合成した。これらのｃＤＮＡ断片は、３’末端に付加の「Ａ」を含み、その後にアダプターを連結させることができた。次に、産物を精製し、ＰＣＲ増幅で濃縮し、Ｑｕｂｉｔで定量化し、ＲＣＲによってＤＮＢ系ナノアレイを生成するために使用した。コンビナトリアルプローブアンカー（ｃＰＡＬ）ライゲーションアプローチを用いて、段階的配列決定を行い、ＢＧＩＳＥＱ－５００システムで読み取った。ＦＡＳＴＱ形式の配列データは、ＢＷＡ－ＲＳＥＭ－ＥｄｇｅＲワークフローを使用して分析し（Ｌｉ　ａｎｄ　Ｄｕｒｂｉｎ，２００９、Ｒｏｂｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０、Ｌｉ　ａｎｄ　Ｄｅｗｅｙ，２０１１）、配列リードはＢＷＡソフトウェアを用いて参照ヒトゲノムアセンブリにマッピングした（２００９年２月、ＧＲＣｈ３７／ｈｇ１９）。個々の遺伝子の配列リード数はＲＳＥＭを使用して計算され、個々のサンプルから得られたリード数は、ＥｄｇｅＲパッケージを使用して表現型間で差次的に発現するｍＲＮＡ（ｌｏｇ２ＦＣ＞１．２またはｌｏｇ２ＦＣ＜０．８、Ｐ＜０．０５、およびｌｏｇ２ＣＰＭ＞５）の検出にかけられた。ネットワーク、機能、および経路分析は、主にヒトとげっ歯類の研究で実験的に実証された相互関係に基づいて、Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ　Ｐａｔｈｗａｙ　Ａｎａｌｙｓｉｓ（Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｑｉａｇｅｎ、カリフォルニア州レッドウッドシティー）を用いて行った。

【０１９０】

エンリッチメント解析。有意に下方制御された遺伝子（ｌｏｇ２ＦＣ＜０．８、Ｐ＜０．０５、およびｌｏｇ２ＣＰＭ＞５）のｍｉＲＮＡ標的エンリッチメント解析は、ＴａｒｇｅｔＳｃａｎ（Ｌｅｗｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）によって予測されたｍｉＲＮＡ標的を使用して行われ、エンリッチメントＰ値はフィッシャーの直接確率検定によって計算された。

【０１９１】

逆転写定量的リアルタイムＰＣＲ。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カリフォルニア州カールスバッド）を使用して細胞に２０ｎＭのｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４、または対照をトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に回収した。Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ分離キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して全ＲＮＡを抽出し、ランダムヘキサマーまたはそれぞれのステムループプライマーによるｃＤＮＡ合成に５００ｎｇの全ＲＮＡを使用した（表４）。ＲＴはＮｘＧｅｎＭ－ＭｕＬＶ逆転写酵素（Ｌｕｃｉｇｅｎ、ウィスコンシン州ミドルトン）を用いて実施し、ｑＰＣＲ分析は、定量ＲＴ－ＰＣＲマスターミックスおよび各プライマーを使用してＣＦＸ９６　Ｔｏｕｃｈ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ

ＰＣＲ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で実施した（表４）。対応するサンプルにおいて、ｍｉＲＮＡのレベルはＵ６　ｓｎＲＮＡに正規化され、ｍＲＮＡのレベルは１８Ｓ　ｒＲＮＡ（Ｎ＝９）に正規化され、式２－ΔΔＣＴを使用して決定した。反応は３独立実験で３重で行われ、同様の結果が得られた。

【表４】

表４

nCAR	方法	収率 (全 RNA の%)	収率 (μg/mL 細菌培養)	純度 (%; HPLC による)
miR-34a-5p	単カラム	42.5	18.9	88.5%
	ダブルカラム	33.0	14.8	97.8%
miR-124-3p	単	44.3	15.4	94.8%
	ダブル	40.4	14.0	98.3%

【０１９２】

細胞生存率アッセイ。細胞に種々の用量のｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ、または対照ｔＲＮＡをトランスフェクトした。細胞生存率は、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　２．０アッセイキット（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン）を使用して、トランスフェクション後７２に、製造元のプロトコルに従って決定した。発光は、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、カリフォルニア州サニーベール）を使用して２５０ミリ秒の積分時間で記録された。担体対照を０％に調整することにより阻害を計算し、ＲＮＡ濃度に対して阻害をプロットすることにより用量反応曲線を確立した。データは、ＥＣ５０およびヒルスロープ値の概算のため、可変勾配（Ｙ＝１００／（１＋１０＾（（ＬｏｇＥＣ５０－Ｘ）＊ヒルスロープ））、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ、カリフォルニア州サンディエゴ）を使用して正規化された阻害性用量反応モデルに適合させた（表５）。すべての実験は３重で行った。

【表５】

表５

標的		プライマー配列
U6	順方向	5’-CTCGCTTCGGCAGCACA-3’ (配列番号 528)
	逆方向	5’-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3’ (配列番号 529)
miR-34a	逆転写	5’-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACACAACC-3’ (配列番号 530)
	順方向	5’-CGCGCTGGCAGTGTCTTAGCT-3’ (配列番号 531)
	逆方向	5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’ (配列番号 532)
miR-124	逆転写	5’-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACGGCATT-3’ (配列番号 533)
	順方向	5’-GCGCTAAGGCACGCGGTG-3’ (配列番号 534)
	逆方向	5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’ (配列番号 532)
18S	順方向	5’-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3’ (配列番号 536)
	逆方向	5’-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3’ (配列番号 537)
AMER1	順方向	5’-GCGAATTCGGAGACCCAAAAGGATGAAGCTGCTCAG-3’ (配列番号 538)
	逆方向	5′-CCTTGCTCTTCCGGTGACGGCGGATACTGC-3 (配列番号 539)
BAG2	順方向	5′-AGCCACATTAGGCGCTCGGTCT-3′ (配列番号 540)
	逆方向	5′-AGTTAGAGGTTCGCGAGCCACACG-3′ (配列番号 541)
BCL6B	順方向	5’-GCTTTGTACAGGTGGCACATC-3’ (配列番号 542)
	逆方向	5’-GAACGTGGCTCTTGAGGGTC-3’ (配列番号 543)
CLUH	順方向	5’-GGTAGCGGGCACGGTACA-3’ (配列番号 544)
	逆方向	5’-GCATTGAGCACCCCAACAC-3’ (配列番号 545)
GAS1	順方向	5’-CTGGGGTTTGTTACCAGTTG-3’ (配列番号 546)
	逆方向	5’-GGGGGAAAGGTGTAATATGG-3’(配列番号 547)
IQGAP1	順方向	5’-GAAAGCCCAGGAAATCCAG-3’ (配列番号 548)
	逆方向	5’-TCCATACAAGCCAACATCAG-3’ (配列番号 549)
KCTD12	順方向	5’-GCTCGGGCTACATCACCATCGG-3’(配列番号 550)
	逆方向	5’-GGGTCCCGGCTTTCGTTCAG-3’(配列番号 551)
NECTIN1	順方向	5’-ACCAACCCCATCGGTACAC-3’ (配列番号 552)
	逆方向	5’-GGGGTGTAGGGGAATTCTGT-3’ (配列番号 553)
NID1	順方向	5’-CGGGGATGACTTCGTCTCTC-3′ (配列番号 554)
	逆方向	5’-GTGGTGACGTAGACTGCGT-3′ (配列番号 555)
NRAS	順方向	5’-CCTCTACAGGGAGCAGATTAAGCGA-3’ (配列番号 556)
	逆方向	5’-CCCTGTCTGGTCTTGGCTGAGGT-3’ (配列番号 557)
SNAI2	順方向	5’-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3’ (配列番号 558)
	逆方向	5’-GCAGATGAGCCCTCAGATTT-3’ (配列番号 559)
TMEM109	順方向	5’-ACACTGGATGCCTGGATTGGGC-3’ (配列番号 560)
	逆方向	5’-AAGCCGAGGAGCAGAGACAGCA-3’ (配列番号 561)
VAMP3	順方向	5’-GCAGCCAAGTTGAAGAGGAA-3’ (配列番号 562)
	逆方向	5’-CAGTTTTGAGTTCCGCTGGT-3’ (配列番号 563)
VIM	順方向	5’-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3’ (配列番号 564)
	逆方向	5’-TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT-3’ (配列番号 565)

【０１９３】

ウエスタンブロットアッセイ。Ａ５４９、２９３Ｔ、およびダイサー－ＫＯ ２９３Ｔ細胞を０．２５×１０^{6}細胞／ウェルで播種し、３０ｎＭ ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５Ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ、またはｔＲＮＡ対照で処理した。培養細胞を４８時間で収集し、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、ドイツ、マンハイム）を含むＲＩＰＡ溶解緩衝液（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、ミズーリ州セントルイス）で溶解した。全細胞溶菌液（３０μｇ）を１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで分離し、ＰＶＤＦ膜に転写し（２５０ｍＡで２時間）、標的抗体を用いて調べた。ＣＤＫ６（Ｃ－２１）、ｃＭＥＴ（Ｃ－２８）、ダイサー（Ｈ－２１２）、ＧＡＰＤＨ（Ｆ

Ｌ－３３５）、およびＳＩＲＴ１（Ｈ－３００）に対する抗体は、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（カリフォルニア州サンタクルーズ）から入手し、ｐ－ＳＴＡＴ３（Ｔｙｒ７０５）およびＳＴＡＴ３（１２４Ｈ６）はＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（マサチューセッツ州ビバリー）から、β－アクチン（ＡＣ－１５）はＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（ミズーリ州セントルイス）から、ＭＲＰ４（Ｍ４Ｉ－１０）はＡｂｃａｍ（マサチューセッツ州ケンブリッジ）から得た。その後、ペルオキシダーゼに結合した二次抗体は、抗ウサギ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｃ．、ペンシルベニア州ウェストグローブ）、抗マウスＩｇＧ、または抗ラットＩｇＧ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）であった。タンパク質のバンドは、発光画像分析装置（ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ）によって捕えた。

【０１９４】

転移性肺異種移植マウスモデルおよび治療研究すべての動物の手順は、カリフォルニア大学デービス校の施設内動物管理使用委員会によって承認され、すべての動物研究は、関連する国内および国際的なガイドラインに従って実施された。５週齢の雌の非肥満糖尿病／重症複合免疫不全（ＮＯＤ／ＳＣＩＤ）マウス（ＮＯＤ．ＣＢ１７－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ／Ｊ）をジャクソン研究所から購入し、実験の少なくとも１週間前に適応給餌した。

【０１９５】

Ａ５４９転移性異種移植マウスモデルは、３．５×10^6 Ａ５４９－ｌｕｃ／ＧＦＰ細胞を尾静脈から注入することによって確立された。麻酔の１０分後にＤ－ルシフェリンカリウム塩溶液（１５０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内注射することにより、生物発光イメージングを用いて腫瘍増殖をモニタリングした。画像はＣｈｅｍｉＤｏｃＭＰ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍで取得した。接種の１４日後、２７匹のマウスをランダムに３つの３つのグループに分けた（グループあたりＮ＝９）。マウスは、インビボ－ｊｅｔＰＥＩ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）で製剤化された３０μｇの対照ｔＲＮＡ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐまたはｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐで、週３回、３週間に渡り静脈内投与された。研究の終わりに、すべてのマウスをと殺し、肺を解剖し、重量測定し、ＧＦＰシグナルについてエクスビボで画像化した。肺組織をさらに１０％ホルマリンで固定し、ロズウェルパークがん研究所（米国ニューヨーク州バッファロー）の組織学施設で組織病理学的評価のためにヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）染色を行った。Ｈ＆Ｅ染色画像（１００倍）は、オリンパスカメラ（ＤＰ２５）およびＣｅｌｌＳｅｎｓソフトウェア（オリンパス、ペンシルベニア州センターバレー）を使用して捕えた。

【０１９６】

サイトカイン放出の誘導。５～６週齢の雌のＢＡＬＢ／ｃマウス（ジャクソン研究所）に、３０μｇのインビボ－ｊｅｔＰＥＩ製剤化された対照ｔＲＮＡ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐまたはｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐを尾静脈から静脈内投与した。未処置、または２０μｇのリポ多糖（ＬＰＳ）で静脈内処置した別々の動物群を対照として使用した。投与１時間後に血液を採取し、マウスＥＬＩＳＡアッセイキット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してサイトカインＩＬ－６およびＴＮＦαレベルを定量化するために血清を単離した。

【０１９７】

統計分析データは、平均±ＳＤとして表される。統計分析は、独立スチューデントｔ検定、一元配置分散分析、または二元配置分散分析（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ、カリフォルニア州サンディエゴ）を使用して実施した。Ｐ＜０．０５は統計的に有意であると見なされた。

【０１９８】

結果

ｎｃＲＮＡ担体のためのプレｍｉＲ－３４ａＧ１３８Ｕ／１３９ΔＧ誘導体の同定。細菌における組換えｎｃＲＮＡの異種発現を可能にするために、キメラｎｃＲＮＡ設計の根本的基礎を評価しようとした。最初に、ｔＲＮＡＭｅｔ単独型はＥ．ｃｏｌｉで明らかな発現を示さないことを見出した（図１Ａ）。際立って対照的に、ｔＲＮＡＭｅｔ融合Ｓｅ

ｐｈａｄｅｘアプタマー（ＭＳＡ）は過剰発現し、キメラの蓄積にとってＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーが重要であることを示した（図１Ｂ）。さらに、ヒトプレｍｉＲ－３４ａそれ自体が細菌で発現されると見られたが（全ＲＮＡの２％以下）、ハイブリッドＭＳＡ／ｍｉｒ－３４ａは蓄積の改善（全ＲＮＡの１０～２０％）を示し（図１Ｃ）、異種発現が成功するためのプレｍｉＲ－３４ａおよびキメラｎｃＲＮＡの安定性を証明した。

【０１９９】

したがって、プレｍｉＲ－３４ａを改良して、より安定で高レベルな発現を達成することを目指し、Ｓｅｐｈａｄｅｘアプタマーへの依存性を評価した。本発明者らのアプローチは、プレｍｉＲ－３４ａ（１１０ヌクレオチド）を使用し、小さなバルジおよびねじれを合理的に改変して、より安定なステムを得ることであり（図１Ｄ）、これは宿主において高いＲＮＡの安定性および蓄積をもたらし得る。実験的に評価された５つのプレｍｉＲ－３４ａ誘導体の中で、構築物Ｇ１３８Ｕ／１３９ΔＧが最高レベルの発現（全ＲＮＡの＞５０％）を示し、これはＳｅｐｈａｄｅｘアプタマーには非依存的であることも見出した（図１Ｄ）。この観察を裏付けるように、プレｍｉＲ－３４ａ　Ｇ１３８Ｕ／１３９ΔＧの位置エントロピーは、野生型の対応物（ｔＲＮＡ／ｍｉｒ－３４ａ－１１０ヌクレオチド）よりも４．６Ｋｃａｌ／ｍｏｌ低かった。さらに、ＭＳＡ／プレｍｉＲ－３４ａ（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）と比較した、ｔＲＮＡ融合プレｍｉＲ－３４ａ　Ｇ１３８Ｕ／１３９ΔＧ誘導体の発現増加は、ＨＳＴ０８およびＴｏｐ１０の一般的なＥ．ｃｏｌｉ株の両方で示された（図２）。結果として、生物工学によるＲＮＡｉ剤のためのｎｃＲＮＡ担体（ｎＣＡＲ）としてｔＲＮＡ（例：ｔＲＮＡＭｅｔ）に融合させるために、プレｍｉＲ－３４ａ　Ｇ１３８Ｕ／１３９ΔＧ誘導体を選択した。

【０２００】

ｎＣＡＲは、高い成功率で著しく高レベルの標的ｎｃＲＮＡの産生を可能にする。標的ＲＮＡｉ剤のアセンブリーのためにｎＣＡＲを適用し、そこではｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、アプタマーなどの低分子ＲＮＡ（ｓＲＮＡ）が、ｍｉＲ－３４ａ配列から置き換わるか、または指定位置に直接付加された（図３Ａ）。５’カウントルール（Ｐａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）を考慮して、合計４２のｎＣＡＲ／ｓＲＮＡ剤が設計された（表１および２）。このようにして、生物工学による個々の標的ｎｃＲＮＡ剤（ＢＥＲＡ）のコード配列が、標的ベクターにクローニングされた（図４）。形質転換および発酵に続いて、Ｅ．ｃｏｌｉから単離された全ＲＮＡの尿素－ＰＡＧＥ分析によって、標的ＢＥＲＡの発現を評価した。面白いことに、３３個のＢＥＲＡが非常に高いレベルで首尾よく発現し（全ＲＮＡの４０～８０％；図３Ｂ）、８０％の成功率（４２個の標的ｎｃＲＮＡのうち３３個）が得られたことが分かった。結果は、標的ＲＮＡｉ剤のより高レベルな異種発現の改善のためのｎＣＡＲのロバスト性を証明している。

【０２０１】

生物工学によるｎｃＲＮＡの注文対応の少量および大量精製。次に、全ＲＮＡから標的ＢＥＲＡを単離する方法を模索した。ｎＣＡＲプラットフォームの有用性は、ミリグラム単位のＢＥＲＡの大量産生を目的としているが、初期またはハイスループットのスクリーニングに使用できるマイクログラム量の精製の実用性も検討した。ｎＣＡＲシステムは一般に約１８０ヌクレオチド長のＢＥＲＡ（ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐなど）を提供するため、核酸の同様の物理化学的特性に基づいて、市販のＳｅｌｅｃｔ－ａ－Ｓｉｚｅ　ＤＮＡ　Ｃｌｅａｎ　＆　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（図３Ｃ）を使用して標的ＢＥＲＡを単離できるか否かを評価した。５０塩基対選択では、１５～２０μｇ／ｍｌ培養液の収率で８８％超の純粋なＢＥＲＡ（ＨＰＬＣ法で測定）を産生することができた（表４）。高分子ＲＮＡを除去するＲＮＡＣｌｅａｎ　＆　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒスピンカラムと組み合わせて使用した場合（図３Ｃ）、単離されたＢＥＲＡの純度は９７％を超えた（表４）。２カラム法は当然のことながら単カラムよりも低い収率であったが、著しく高レベルな発現により、全体的な収率（約１４μｇ／ｍｌ培養または全ＲＮＡの３０～４０％）は依然として非常に高かった。

【０２０２】

大量精製を実現するために、新規の陰イオン交換ＦＰＬＣ法を確立した。最大１５ｍｇの全ＲＮＡをＥｎｒｉｃｈ－Ｑ１０ｘ１００カラムにロードし、シングルランの塩勾配溶出により分離した（図３Ｃ）。ＦＰＬＣで単離したＢＥＲＡの大部分は、ＨＰＬＣ法で測定したところ、高度な均一性（＞９８％；表３）を示した（図６）。発現および精製収率のこのような向上を得て、シングルランで１０ｍｇに至る標的ＢＥＲＡ、および１Ｌの細菌発酵から４～２０ｍｇの純粋ＢＥＲＡを容易に取得した（表３）。さらに、エンドトキシンはこのプロセスを通じて洗い流され、最終的なＢＥＲＡのエンドトキシン活性は最小限であり（例えば、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ：０．８５ＥＵ／μｇＲＮＡ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ：０．１ＥＵ／μｇＲＮＡ）、これらは、細胞毒性を誘発することが報告されているレベル（２，０００ＥＵ／μｇＤＮＡ）（Ｂｕｔａｓｈ ｅｔ ａｌ．，２０００）およびマウス研究に推奨されるレベル（３０μｇＲＮＡ／時の率において≦５ＥＵ／ｍｇ体重；下記の動物研究を参照）（Ｍａｌｙａｌａ ａｎｄ Ｓｉｎｇｈ，２００８）よりもはるかに低く、（）、したがって機能研究のためにエンドトキシンフリーのＢＥＲＡを保証する。

【０２０３】

ヒト細胞において生物工学によるｎｃＲＮＡからの標的ｍｉＲＮＡの選択的放出は、エンドリボヌクレアーゼダイサーに依存して（ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ）または非依存で（ｍｉＲ－１２４－３ｐ）ｍｉＲＮｏｍｅを書き換える。標的ｍｉＲＮＡがヒト細胞のＢＥＲＡから特異的に産生できるか否か、およびこのプロセスがダイサーに依存性であるか否かを調べるために、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ、および対照ＲＮＡで処理されたヒト２９３Ｔ細胞およびダイサーノックアウト（ダイサー－ＫＯ）対応物（Ｂｏｇｅｒｄ ｅｔ ａｌ．，２０１４）において低分子ＲＮＡ配列決定の研究を実施した。結果は、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐが２９３Ｔ細胞でその優性アイソフォーム（２２ヌクレオチド；開始部位０）としてｍｉＲ－３４ａ－５ｐに選択的にプロセシングされ、他のアイソフォームのリードが低下することを示した（図６Ａ）。ただし、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐレベルは、野生型２９３Ｔ細胞よりもダイサー－ＫＯ ２９３Ｔ細胞で２７倍低く、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐからのｍｉＲ－３４ａ－５ｐの産生におけるダイサーの重要な役割を証明していた。意外にも、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐは、野生型２９３Ｔ細胞では主に０位で始まる２３ヌクレオチドのアイソフォームにプロセシングされたが、ダイサー－ＫＯ細胞では＋１位からの２２ヌクレオチド種にプロセシングされた。ｍｉＲ－１２４－３ｐは天然で２０ヌクレオチドとして存在するため、担体の３’末端におけるプレｍｉＲ－３４ａから引継がれた付加ヌクレオチドは、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐがユニークな切断をされてｍｉＲ－１２４－３ｐを提供することを示している。最も興味深いことに、野生型およびダイサー－ＫＯ２９３Ｔ細胞のｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐから同等レベルのｍｉＲ－１２４－３ｐが産生され（図６Ａ）、ｍｉＲ－１２４－３ｐの産生のためのダイサー非依存性を示している。

【０２０４】

ヒト細胞におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐからの標的ｍｉＲ－３４ａ－５ｐの選択的放出は、ｍｉＲＮｏｍｅプロファイルの特定の変化をもたらし、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐは、野生型２９３Ｔ細胞（全ｍｉＲＮＡの１６００万超のリード）およびダイサー－ＫＯ細胞（５０万未満のリード）の両方で最も豊富なｍｉＲＮＡになった（図６Ｂ）。同様に、ｍｉＲ－１２４－３ｐは、ｎＣＡＲ－ｍｉＲ－１２４－３ｐで処理後に、野生型細胞およびダイサー－ＫＯ２９３Ｔ細胞でそれぞれ７番目に豊富なｍｉＲＮＡになった。ｍｉＲＮｏｍｅ内での標的ｍｉＲＮＡレベルの増加は、ｑＰＣＲ分析によってさらに確認された（図７Ａ）。ｍｉＲ－３４ａ－５ｐレベル増加の倍数は、「驚くべきことに」野生型２９３Ｔ細胞よりもダイサー－ＫＯ細胞の方で高かったが、このシナリオは単にダイサー－ＫＯ細胞でのｍｉＲ－３４ａ－５ｐの低い基底発現レベルに起因している（図６Ａ）。まとめると、本発明者らの結果は、多数の標的ｍｉＲＮＡがダイサー依存性（例えば、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ）または非依存性（例えば、ｍｉＲ－１２４－３ｐ）の様式でヒト細胞におけるＢＥＲＡから選択的に産生されることができ、後に細胞のｍｉＲＮｏｍｅプロ

ファイルを書き換えることを証明している。

【０２０５】

生物工学によるｍｉＲＮＡは、ヒト細胞のトランスクリプトームプロファイルを特異的に調節する。ｍｉＲＮＡ標的遺伝子発現に及ぼすＢＥＲＡの効果を説明し、その特異性を評価するために、同じＲＮＡサンプル一式をｍＲＮＡ配列決定研究用に処理した。結果は、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａで処理した２９３Ｔ細胞では、１１２個の遺伝子が有意に下方制御され１９３個が上方制御され、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４で処理した２９３Ｔ細胞では、２６０個の遺伝子が下方制御され２９０個が上方制御されたことを示した（図８Ａ）。これらの下方制御された遺伝子には、特定のｍｉＲＮＡについてよく知られた多くの標的（例えば、ｍｉＲ－３４ａの場合はＡＭＥＲ１、ＧＡＳ１、およびＮＥＣＴＩＮ１、ｍｉＲ－１２４の場合はＶＡＭＰ３、ＳＮＡＩ２、ＩＱＧＡＰ１、ＴＭＥＭ１０９、およびＲＨＯＧ）（Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００７、Ｋａｒｇｉｎｏｖ ｅｔ ａｌ．，２００７、Ｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００９、Ｋａｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１１）、およびこれまでに報告されていないいくつかの遺伝子（例えば、ｍｉＲ－３４ａの場合はＢＡＧ２およびＢＣＬ６Ｂ、ｍｉＲ－１２４の場合はＮＩＤ１およびＶＩＭ）が含まれている。いくつかの転写産物の抑制は、遺伝子選択的プライマー（表５）を用いたｑＰＣＲ分析（図７Ｂ）によってさらに検証され、そこではハウスキーピング遺伝子のレベルは改変されていなかった（図７Ｃ）。

【０２０６】

他方、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐによってダイサー－ＫＯ ２９３Ｔ細胞で有意に下方制御された遺伝子は６つだけであり（図８Ｂ）、それらはｍｉＲ－３４ａに関連付けられていないものであり、このこともまたｍｉＲ－３４ａ－５ｐ産生のダイサー依存性、およびｍｉＲ－３４ａ標的遺伝子発現の調節におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐの選択性を裏付けている。際立って対照的に、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐはダイサー－ＫＯ細胞で６８遺伝子の発現を有意に減少させ、その多く（ＶＡＭＰ３、ＳＮＡＩ２、およびＲＨＯＧなど）は既知のｍｉＲ－１２４標的であり、野生型２９３Ｔ細胞で同定された標的との良好な重複を示している（図８Ｂ）。これは、細胞内でｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐからｍｉＲ－１２４－３ｐアイソフォームを同等の高レベルで産生することにおけるダイサー非依存性と符合しているが、主要なアイソフォームは長さおよび位置が異なっていた。

【０２０７】

ｍｉＲＮＡ標的遺伝子発現の調節におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡの選択性は、ｍｉＲＮＡエンリッチメント解析によってさらに実証された。ＭｉＲ－３４ａ－５ｐは、２９３Ｔ細胞のｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ下方制御遺伝子から高度に富化されたが、同じことはダイサーＫＯ細胞には当てはまらず（図８Ｃ）、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐからのｍｉＲ－３４ａ－５ｐのダイサー依存性切除による標的遺伝子発現に及ぼす特異的な効果が織り交ぜられている。予測されるように、同じｍｉＲ－３４／４４９ファミリー内のｍｉＲ－４４９／３４ｃも、２９３Ｔ細胞のｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ下方制御遺伝子から富化され、遺伝子調節におけるそれらの機能の類似性を裏付けている。ただし、ｍｉＲ－４４９／３４ｃは、ＢＥＲＡ処理後の発現において量の少なさ（ｌｏｇ２ＣＰＭ＜６）および／または変化の有意差の欠如（Ｐ＞０．０５）を示したため、トランスクリプトームの変化に寄与した可能性は低い。興味深いことに、ｍｉＲ－１２４－３ｐは、野生型細胞とダイサー－ＫＯ２９３Ｔ細胞の両方で、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐで下方制御された遺伝子について高度に富化されており（図８Ｃ）、これはｍｉＲ－１２４標的遺伝子発現の調節におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐの選択性をサポートするだけでなく、ｍｉＲ－１２４－３ｐ形成のダイサー非依存性も示している。同様に、ｍｉＲ－１２４／５０６ファミリー内のｍｉＲ－５０６は富化されていたが、ｍｉＲ－５０６はすべての遺伝子型および処理の細胞において不在であった（０リード）。さらに、ＢＥＲＡで下方制御された遺伝子によって影響を受ける生物学的経路を調査するため、ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ ｐａｔｈｗａｙ ａｎａｌｙｓｉｓを採用した。ｍｉＲ－３４ａによって調

節される遺伝子調節ネットワークは、細胞増殖、ＤＮＡ複製、細胞増殖および生存に関連しており、ｍｉＲ－１２４は細胞形態、維持、および遺伝子発現に関連していた（図８Ｄ）。まとめると、これらの結果は、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡがヒト細胞の遺伝子調節において高い選択性を示したことを証明している。

【０２０８】

生物製剤ｍｉＲＮＡは、ヒト細胞の標的遺伝子のタンパク質レベルを低下させる。さらに、生物工学によるｍｉＲＮＡがタンパク質発現レベルに及ぼす影響を調べるために、ｍｉＲ－３４ａの確立された標的（ＣＤＫ６およびＳＩＲＴ１など）（Ｓｕｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００８；Ｙａｍａｋｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）およびｍｉＲ－１２４の確立された標的（ＳＴＡＴ３およびＡＢＣＣ４／ＭＲＰ４など）（Ｈａｔｚｉａｐｏｓｔｏｌｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１；Ｍａｒｋｏｖａ　ａｎｄ　Ｋｒｏｅｔｚ，２０１４）をいくつか選択した。免疫ブロット分析は、高レベルの放出されたｍｉＲ－３４ａ－５ｐ（図６Ａ）の結果として、２９３Ｔ細胞におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐによるＣＤＫ６およびＳＩＲＴ１タンパク質レベルの一貫した抑制を明らかにした（図９Ａ）。しかし、ダイサー－ＫＯ細胞では、ＣＤＫ６タンパク質レベルは変化しなかったが、ＳＩＲＴ１レベルはｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐによって着実に減少し、これは、ダイサーの不在下で産生されたｍｉＲ－３４ａ－５ｐのレベルがはるかに低いためであり得る（図６Ａ）。この興味深い観察は、細胞のｍｉＲ－３４ａレベル変化の絶対量または変化の程度に対する、種々の標的の異なる感度を示している可能性もある（図６Ａ）。同様に、ｍｉＲ－１２４－３ｐに標的化されるＳＴＡＴ３およびＭＲＰ４／ＡＢＣＣ４のタンパク質レベルに及ぼすｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐの様々な影響の程度（図９Ｂ）が、野生型およびダイサー－ＫＯ２９３Ｔ細胞で同定され、これは、わずかに変更されたシード配列またはヌクレオチドを有するこれらの細胞で産生された最も豊富なｍｉＲ－１２４－３ｐアイソフォーム（図６Ａ）の差異に起因し得る。

【０２０９】

生物工学によるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐは、インビトロでヒト肺がん細胞の増殖を抑制するのに有効である。ＢＥＲＡの有用性をさらに評価するために、ｐ５３およびＥＧＦＲの状態が異なる種々のヒト肺がん細胞に対する、２モデルのＢＥＲＡ、すなわちｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐの用量依存的な抗増殖活性を調査した。肺がんは依然として米国で最も致命的ながんであり（Ｓｉｅｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４の発現または機能の回復は肺がん細胞の増殖を阻害するのに効果的である（Ｗｉｇｇｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０、Ｋａｓｉｎｓｋｉ　ａｎｄ　Ｓｌａｃｋ，２０１２、Ｃｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６、Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）からである。対照と比較して、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐの両方が細胞増殖を有意に大きく阻害し（図１０Ａ）、これは推定ＥＣ５０およびヒルスロープ値によっても示された。興味深いことに、Ｈ１２９９細胞（変異型ｐ５３）はＡ５４９（野生型ｐ５３）よりもｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐに対して感受性が高く、ｐ５３－ｍｉＲ－３４ａの正のフィードバックループは、ｐ５３がハプロ不全の場合に追加の腫瘍抑制効果をもたらす（Ｏｋａｄａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。同様に、構成的に活性なＥＧＦＲを保有するＨ１６５０およびＨ１９７５（変異型ＥＧＦＲ）細胞は、Ａ５４９（野生型ＥＧＦＲ）よりもｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐに対して感受性が高かった。さらに、Ａ５４９細胞増殖の抑制は、ｍｉＲ－３４ａ標的（ｃＭＥＴおよびＣＤＫ６）およびｍｉＲ－１２４標的（ＳＴＡＴ３、ｐＳＴＡＴ３およびＭＲＰ４／ＡＢＣＣ４）のタンパク質レベルの低下と関連しており（図１０Ｂ）、がん細胞増殖を減少させることにおいて、これらのｍｉＲＮＡについての複数の標的／経路の存在を裏付けている。

【０２１０】

生物工学によるｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐは、インビボでの転移性肺異種移植腫瘍の増殖を有意に低減する。最後に、本発明者らは、インビボでの肺腫瘍進行の抑制におけるＢＥＲＡ　ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐの有効性を決定した。

転移性肺異種移植マウスモデルは、ルシフェラーゼ／ＧＦＰ発現Ａ５４９細胞の尾静脈注射によって確立され、その後、インビボ－ｊｅｔＰＥＩで製剤化されたｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ、または対照ＲＮＡで静脈内投与された（３０μｇ、週３回、３週間）。正常な行動に加えて、すべてのマウスが処置間で差異のない体重の着実な増加を示したため、ＢＥＲＡはマウスで良好な耐容性であるように見えた（図１１Ａ）。腫瘍の成長は、生物発光イメージングによって６週間の経過にわたってモニタリングされ、対照マウスは、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐで処理されたマウスと比較してより強いシグナルを示した（図１２Ａ）。研究の終わりに、肺組織全体を切除し、重量測定し、エクスビボで画像化した（図１２Ｂ）。予想通り、腫瘍は、強い生物発光シグナルを示したマウスから収集された肺の目視検査によって明らかであり、これは、より明白なエクスビボＧＦＰシグナルによって示された。ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐで処置したマウスの肺組織も、対照群より有意に軽いことがわかった（図１１Ｂ）。さらに、切除したすべての肺組織の組織病理学的分析を行って、異種移植腫瘍を検証し、ＢＥＲＡ療法の有効性を定量的に決定した（図１２Ｃ）。生存動物とエクスビボの肺画像からの観察と一致して、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐで処置されたマウスは肺腫瘍結節の程度が有意に低いことがわかった。これらの結果は、転移性異種移植マウスモデルにおける肺がん進行の制御における生物製剤ｍｉＲ－３４ａ－５ｐの有効性を示している。

【０２１１】

生物工学は、インビボで免疫適格性マウスにおけるサイトカイン放出に最小限の影響しか与えない。最後に、ピーク時点（処置１時間後）付近で最も感受性の高いサイトカインＩＬ－６およびＴＮＦαを測定することにより、免疫適格性ＢＡＬＢ／ｃマウスモデルにおいて生物製剤ｎｃＲＮＡの免疫原性の可能性を評価した。本発明者らのデータは、ＬＰＳが、ＩＬ－６およびＴＮＦαの血中レベルの急激な増加によって明らかにされるように、マウスに即時サイトカイン放出症候群を誘発したことを示した（図１１Ｃ）。対照的に、未処置のマウスと比較して、インビボ－ｊｅｔＰＥＩで製剤化されたｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ、および対照ＲＮＡの投与は、ＬＰＳ処置よりも著しくかつ有意に低い、血清ＩＬ－６、ＴＮＦαレベルのごくわずかな増加をもたらした。結果は、生物製剤ｎｃＲＮＡがマウスで許容可能であり、サイトカイン放出への影響が最小限であることを示している。

【０２１２】

考察

万能的な担体としてｔＲＮＡ分子に融合した安定なプレｍｉＲ－３４ａＧ１３８Ｕ／１３９ΔＧ誘導体を同定したことに伴って、新規のｎｃＲＮＡ生物工学技術を確立した。このプラットフォームには、補完的な、少量および大量の新規精製方法の開発も含まれていた。このアプローチは、高い成功率（８０％；４２のうち３３のｎｃＲＮＡ）とともに、Ｅ．ｃｏｌｉにおける標的ｎｃＲＮＡの著しく高収率（全ＲＮＡの４０～８０％）および大量（１Ｌ細菌発酵から４～２０ｍｇ）の生産を提供した。例として、生物工学による２つのｎｃＲＮＡを使用して、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡからの標的ｍｉＲＮＡの選択的放出、ひいては標的遺伝子の特異的調節をさらに実証し、これはヒト細胞のｍｉＲＮｏｍｅおよびトランスクリプトームプロファイルの変化をもたらした。さらに、腫瘍抑制性のｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐ、ならびに対応するｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡプロドラッグの導入が、インビトロでのヒト肺がん細胞増殖およびインビボでの転移性異種移植腫瘍の進行の制御に有効であると証明されたことを示した。これらの結果は、この新規なｎｃＲＮＡ生物工学パイプラインのロバスト性と、基礎研究および実験的治療への生物製剤ｎｃＲＮＡ剤（ＢＥＲＡ）の幅広い適用を裏づけている。

【０２１３】

ペプチド合成によって作製されたものではなく生細胞内で産生および折りたたまれた組換えタンパク質を使用したタンパク質機能および治療法に関する研究とは際立って対照的に、ｎｃＲＮＡマクロ分子に関する現在の研究は、広範な人工修飾を含む化学合成された

ｎｃＲＮＡ模倣物に大きく依存している。化学修飾はｎｃＲＮＡの安定性を高め、より好ましい薬物動態特性（例えば、より長い半減期）とさらに高い効力を提供する可能性があるが、合成ｎｃＲＮＡ剤は根本的に異なる分子であり、疑いなく異なる高次構造と改変された化学的および生物学的特性を有する。したがって、細胞のｎｃＲＮＡに対する、化学操作されたｎｃＲＮＡの関連性は再検討される必要がある。さらに、異なるメーカーの合成ｎｃＲＮＡ剤は、人工修飾の種類、部位、程度が大きく異なり、いっそうの不確実性をもたらす。逆に、このレポートで提示された生物工学プラットフォームによって産生されたｎｃＲＮＡは、生細胞での天然ｎｃＲＮＡの生合成に似ているため、転写後修飾がない、または必要な転写後修飾を伴うだけの（Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５）、高度に構造化された安定したマクロ分子を提供する。組換えｎｃＲＮＡは生細胞で許容レベルまで産生されるため、生物製剤ｎｃＲＮＡが重度の免疫反応を引き起こす可能性は低い（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。最も重要なことに、本アプローチは、著しく高レベルな標的ｎｃＲＮＡ分子の発現（全ＲＮＡの４０～８０％）を高い成功率（８０％）で達成するため、既存の組換えＲＮＡ法（Ｐｏｎｃｈｏｎ ａｎｄ Ｄａｒｄｅｌ，２００７、Ｐｏｎｃｈｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００９、Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１３、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５）を上回る実質的な利点を示す。得られるｎｃＲＮＡ分子は、実際はＤＮＡ試薬であるウイルスまたは非ウイルスベクター／プラスミド系のｎｃＲＮＡ発現材料とも異なる（Ｈｏ ａｎｄ Ｙｕ，２０１６）。したがって、ｎＣＡＲ系の技術は、マイクログラム単位またはミリグラム単位のいずれかの量で目的のｎｃＲＮＡ剤を生産するために、一般的な生物医学研究室で簡単に適応できる、より実用的で費用効果の高い取り組みを表している。

【０２１４】

ヒト細胞における、生物工学によるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡ剤からの標的ｍｉＲＮＡの選択的放出の確認に加えて、本発明者らの低分子ＲＮＡ配列決定結果は、細胞内ｍｉＲＮＡが、他の研究と一致して、種々のアイソフォームとして存在することを示している（Ｅｂｈａｒｄｔ ｅｔ ａｌ．，２００９、Ｌｌｏｒｅｎｓ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。これは、ｍｉＲＮＡのＡｇｏタンパク質への結合親和性（Ｅｌｋａｙａｍ ｅｔ ａｌ．，２０１２）または細胞内の代謝回転（Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅ ａｎｄ Ｇｒｏｓｓｈａｎｓ，２００９）に影響を及ぼす可能性がある。特に、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐは主に２２－ヌクレオチド アイソフォームとして成熟ｍｉＲ－３４ａ－５ｐにプロセシングされたが、他の種（２１－および２３－ヌクレオチド、切断開始部位のシフト）ははるかに少ない量で産生された。しかしながら、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐは２９３Ｔ細胞で主に２３ヌクレオチド形態にプロセシングされたのに対し、ダイサー－ＫＯ細胞では１ヌクレオチド右にシフトした別の２２ヌクレオチド種にプロセシングされ、そのレベルはほぼ同等のレベルであった。他のｍｉＲＮＡの有意な増加がないことも、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡから標的ｍｉＲＮＡを産生する際の選択性うを裏付けているが、一部の高存在量ｍｉＲＮＡの比例的な減少は、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐの急激な増加の結果であり得る。さらに、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡをプロセシングするためのダイサーへの依存性（ｍｉＲ－３４ａ－５ｐ）および非依存性（ｍｉＲ－１２４－３ｐ）は、ｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡを使用して特定のｍｉＲＮＡをヒト細胞に導入し、細胞内ｍｉＲＮｏｍｅを選択的に変化させる多様性を示している。ダイサー－ＫＯ細胞の遺伝的背景が不変のままであるか否かは不明であるが、ＲＮＡ配列決定の結果は、ダイサー－ＫＯ細胞では改変されていたり、および／またはｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ処理によって誘導されたりする可能性のある、ｍｉＲＮＡ生合成のダイサー非依存性の因子および経路の存在を裏付けている。

【０２１５】

標的ｍｉＲＮＡをヒト細胞に導入する際に、生物工学によるｎｃＲＮＡは標的遺伝子の発現を調節するために効果的となり、トランスクリプトームプロファイルの特異的な変化をもたらした。特に、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐは、２９３Ｔ細胞で十分に立証された多くの標的（Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００７、Ｋａｒｇｉｎｏｖ ｅｔ ａｌ．，２００７、Ｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００９、Ｋ

ａｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）、およびこれまで報告されていないその他（ｍｉＲ－３４ａの場合はＢＡＧ２およびＢＣＬ６Ｂ、ｍｉＲ－１２４の場合はＮＩＤ１およびＶＩＭ）を下方制御したが、本研究では比較のための合成ｍｉＲＮＡ試薬は含まれなかった。これらの遺伝子は他の人々によって実験的に同定または検証されてはいないが、多くはｍｉＲａｎｄａ（ｍｉｃｒｏｒｎａ．ｏｒｇ）、ＴａｒｇｅｔＳｃａｎ（ｔａｒｇｅｔｓｃａｎ．ｏｒｇ／）およびｍｉＲＷａｌｋ（ｚｍｆ．ｕｍｍ．ｕｎｉ－ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ．ｄｅ／ａｐｐｓ／ｚｍｆ／ｍｉｒｗａｌｋ／ｍｉｃｒｏｒｎａｐｒｅｄｉｃｔｅｄｔａｒｇｅｔ．ｈｔｍｌ）などの種々のアルゴリズムによって予測される暫定的な標的である（例えば、ｍｉＲ－３４ａ－５ｐのＢＣＬ６Ｂ、ｍｉＲ－１２４－３ｐのＮＩＤ１およびＶＩＭ）。一部の遺伝子（ＢＡＧ２など）は予測標的ではなく、その変化は、一次標的遺伝子発現の変化の結果またはそれによって空間的に制御された効果であり得るが、オフターゲット効果の可能性を排除することはできない。それにもかかわらず、標的遺伝子発現の調節におけるｎＣＡＲ／ｍｉＲＮＡの特異性は、対応する下方制御された遺伝子の背後にある特異的ｍｉＲＮＡを同定した「バイアスなしの」エンリッチメント解析によってさらに実証されている。ｎｃＲＮＡを生物製剤マクロ分子として理解するための一歩は、天然型でのこれらの調節因子の知見を進歩させ、新しい発見の進歩を可能にし得る。

【０２１６】

改変されたトランスクリプトームは、細胞の成長、増殖、および生存の根底にある複数の介在経路について再定義されたところ、ｎＣＡＲに担われたｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐの抗増殖活性が複数のヒト肺がん細胞株で観察された。変異型ｐ５３または構成的に活性なＥＧＦＲバックグラウンドをもつ細胞は、ｍｉＲＮＡ処理に対してより感度が高いようである。裸の生物製剤ＲＮＡは血清ＲＮａｓｅによって分解可能であるため、治療用途には製剤化が必要である（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５、Ｊｉｌｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）。転移性肺異種移植マウスモデルにおけるインビボ－ｊｅｔＰＥＩ製剤化ＲＮＡを用いたさらなる研究は、インビボでの、生物工学によるｍｉＲＮＡ剤の有効性を裏付けるだけでなく、治療薬としての生物製剤ｎｃＲＮＡの開発の実現可能性も確立する。サンプルサイズは比較的小さく、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－１２４－３ｐ治療群はより変動的であったが、ｎＣＡＲ／ｍｉＲ－３４ａ－５ｐによる異種移植腫瘍増殖の抑制は対照治療よりも統計的に有意であることが確認された。さらに、サイトカイン放出への影響が最小限であることからわかるように、生物製剤ｎｃＲＮＡは免疫適格性マウスで十分に耐容性であることを示している。むしろ、がん治療のための生物製剤ｎｃＲＮＡの評価は、より大きなサンプルサイズおよび異なるモデルを用いたより包括的な研究によって検証されるはずである。

【０２１７】

可能な方向性の多さによって制限されたため、本研究においては、生物製剤的および薬理学的作用を例示するために、生物工学による多くのｎｃＲＮＡのうちの２つについて詳細な下流研究が実施されたが、生物工学によるｓｉＲＮＡおよびＲＮＡアプタマー剤の追加調査が正当化される。ロバストなｎｃＲＮＡ生物工学プラットフォームを確立すること、および肺がん治療のための生物製剤ｍｉＲ－３４ａ－５ｐおよびｍｉＲ－１２４－３ｐ分子によるｍｉＲＮＡ置換戦略（Ｂａｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０、Ｒｕｐａｉｍｏｏｌｅ　ａｎｄ　Ｓｌａｃｋ．，２０１７）を評価することに焦点を当てたが、ＢＥＲＡの有用性を過小評価することはできない。本研究で裏付けられているように、ｎｃＲＮＡ生物工学技術、および結果として生まれる生物製剤ｎｃＲＮＡ剤（ＢＥＲＡ）は、基礎的生物医学研究とｎｃＲＮＡ療法の開発に直接影響を及ぼすはずだが、より長いＲＮＡは細菌のＲＮａｓｅによる分解を受けやすいため（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）、現在のｎｃＲＮＡ担体は、種々の疾患に重要な役割を果たす長いｎｃＲＮＡ（Ｃｅｃｈ　ａｎｄ　Ｓｔｅｉｔｚ．，２０１４、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７）の産生用には拡大適用されないかもしれない。

【０２１８】

要約すると、目的のｓＲＮＡをもつｎｃＲＮＡ剤の産生に簡単に適応できる新規なｎｃ

ＲＮＡ生物工学技術を確立した。本発明者らの知見は、生物工学によるｎｃＲＮＡが独自の生物製剤材料を表し、ｎｃＲＮＡ治療法の開発を含め幅広い生物医学研究のための現行ツールへの貴重な追加になり得ることを示している。より優れたｎｃＲＮＡ担体が展開する可能性を排除することはできないが、基礎研究および応用的研究用の生物製剤ｎｃＲＮＡマクロ分子を産生する原理は残るであろう。

背景技術および実施例１のための参照文献

An, J., J. Lai, M. L. Lehman and C. C. Nelson (2013). miRDeep*: an integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. Nucleic Acids Res 41: 727-737.

Bader, A. G., D. Brown and M. Winkler (2010). The promise of microRNA replacement therapy. Cancer Res 70: 7027-7030.

Beckert, B. and B. Masquida (2011). Synthesis of RNA by in vitro transcription. Methods Mol Biol 703: 29-41.

Beg, M. S., A. J. Brenner, J. Sachdev, M. Borad, Y. K. Kang, J. Stoudemire, S. Smith, A. G. Bader, S. Kim and D. S. Hong (2017). Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs 35: 180-188.

Bogerd, H. P., A. W. Whisnant, E. M. Kennedy, O. Flores and B. R. Cullen (2014). Derivation and characterization of Dicer- and microRNA-deficient human cells. RNA 20: 923-937.

Bramsen, J. B. and J. Kjems (2012). Development of Therapeutic-Grade Small Interfering RNAs by Chemical Engineering. Front Genet 3: 154.

Butash, K. A., P. Natarajan, A. Young and D. K. Fox (2000). Reexamination of the effect of endotoxin on cell proliferation and transfection efficiency. Biotechniques 29: 610-614, 616, 618-619.

Cech, T. R. and J. A. Steitz (2014). The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. Cell 157: 77-94.

Chang, T. C., E. A. Wentzel, O. A. Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K. H. Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito, C. J. Lowenstein, D. E. Arking, M. A. Beer, A. Maitra and J. T. Mendell (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. Mol Cell 26: 745-752.

Chatterjee, S. and H. Grosshans (2009). Active turnover modulates mature マイクロRNA activity in Caenorhabditis elegans. Nature 461: 546-549.

Chen, Q. X., W. P. Wang, S. Zeng, S. Urayama and A

.M.Yu(2015).A general approach to high-yield biosynthesis of chimeric RNAs bearing various types of functional small RNAs for broad applications.Nucleic Acids Res 43:3857-3869.
Chi,S.W.,J.B.Zang,A.Mele and R.B.Darnell(2009).Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps.Nature 460:479-486.
Cho,C.Y.,J.S.Huang,S.G.Shiah,S.Y.Chung,J.D.Lay,Y.Y.Yang,G.M.Lai,A.L.Cheng,L.T.Chen and S.E.Chuang(2016).Negative feedback regulation of AXL by miR-34a modulates apoptosis in lung cancer cells.RNA 22:303-315.
Corey,D.R.(2007).Chemical modification:the key to clinical application of RNA interference?J Clin Invest 117:3615-3622.
Ebhardt,H.A.,H.H.Tsang,D.C.Dai,Y.Liu,B.Bostan and R.P.Fahlman(2009).Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications.Nucleic Acids Res 37:2461-2470.
Elkayam,E.,C.D.Kuhn,A.Tocilj,A.D.Haase,E.M.Greene,G.J.Hannon and L.Joshua-Tor(2012).The structure of human argonaute-2in complex with miR-20a.Cell 150:100-110.
Fang,P.Y.,L.M.Gomez Ramos,S.Y.Holguin,C.Hsiao,J.C.Bowman,H.W.Yang and L.D.Williams(2017).Functional RNAs:combined assembly and packaging in VLPs.Nucleic Acids Res 45:3519-3527.
Hatziapostolou,M.,C.Polytarchou,E.Aggelidou,A.Drakaki,G.A.Poultsides,S.A.Jaeger,H.Ogata,M.Karin,K.Struhl,M.Hadzopoulou-Cladaras and D.Iliopoulos(2011).An HNF4alpha-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis.Cell 147:1233-1247.
Ho,P.Y.and A.M.Yu(2016).Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics.Wiley Interdiscip Rev RNA 7:186-197.
Hornung,V.,M.Guenthner-Biller,C.Bourquin,A.Ablasser,M.Schlee,S.Uematsu,A.Noronha,M.Manoharan,S.Akira,A.de Fougerolles,S.Endres and G.Hartmann(2005).Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7.Nat Med 11:263-270.
Huang,L.,J.Jin,P.Deighan,E.Kiner,L.McRey

nolds and J. Lieberman (2013). Efficient and specific gene knockdown by small interfering RNAs produced in bacteria. Nat Biotechnol 31: 350-356.
Jilek, J. L., Y. Tian and A. M. Yu (2017). Effects of MicroRNA-34a on the Pharmacokinetics of Cytochrome P450 Probe Drugs in Mice. Drug Metab Dispos 45: 512-522.
Kaller, M., S. T. Liffers, S. Oeljeklaus, K. Kuhlmann, S. Roh, R. Hoffmann, B. Warscheid and H. Hermeking (2011). Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. Mol Cell Proteomics 10: M111 010462.
Karginov, F. V., C. Conaco, Z. Xuan, B. H. Schmidt, J. S. Parker, G. Mandel and G. J. Hannon (2007). A biochemical approach to identifying microRNA targets. Proc Natl Acad Sci USA 104: 19291-19296.
Kasinski, A. L. and F. J. Slack (2012). miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. Cancer Res 72: 5576-5587.
Khvorova, A. and J. K. Watts (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nat Biotechnol 35: 238-248.
Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell 120: 15-20.
Li, B. and C. N. Dewey (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics 12: 323.
Li, H. and R. Durbin (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25: 1754-1760.
Li, M. M., B. Addepalli, M. J. Tu, Q. X. Chen, W. P. Wang, P. A. Limbach, J. M. LaSalle, S. Zeng, M. Huang and A. M. Yu (2015). Chimeric MicroRNA-1291 Biosynthesized Efficiently in Escherichia coli Is Effective to Reduce Target Gene Expression in Human Carcinoma Cells and Improve Chemosensitivity. Drug Metab Dispos 43: 1129-1136.
Li, M. M., W. P. Wang, W. J. Wu, M. Huang and A. M. Y

u (2014). Rapid Production of Novel Pre-MicroRNA Agent hsa-mir-27b in Escherichia coli Using Recombinant RNA Technology for Functional Studies in Mammalian Cells. Drug Metab Dispos 42:1791-1795.
Li, P. C., M. J. Tu, P. Y. Ho, J. L. Jilek, Z. Duan, Q. Y. Zhang, A. X. Yu and A. M. Yu (2018). Bioengineered NRF2-siRNA Is Effective to Interfere with NRF2 Pathways and Improve Chemosensitivity of Human Cancer Cells. Drug Metab Dispos 46:2-10.
Liu, C., Z. Yang, J. Wu, L. Zhang, S. Lee, D. J. Shin, M. Tran and L. Wang (2017). lncRNA H19 interacts with polypyrimidine tract-binding protein 1 to reprogram hepatic lipid homeostasis. Hepatology.
Llorens, F., M. Hummel, L. Pantano, X. Pastor, A. Vivancos, E. Castillo, H. Mattlin, A. Ferrer, M. Ingham, M. Noguera, R. Kofler, J. C. Dohm, R. Pluvinet, M. Bayes, H. Himmelbauer, J. Antonio del Rio, E. Marti and L. Sumoy (2013). Microarray and deep sequencing cross-platform analysis of the mirRNome and isomiR variation in response to epidermal growth factor. BMC Genomics 14.
Malyala, P. and M. Singh (2008). Endotoxin limits in formulations for preclinical research. J Pharm Sci 97:2041-2044.
Markova, S. M. and D. L. Kroetz (2014). ABCC4 is regulated by microRNA-124a and microRNA-506. Biochem Pharmacol 87:515-522.
Okada, N., C. P. Lin, M. C. Ribeiro, A. Biton, G. Lai, X. He, P. Bu, H. Vogel, D. M. Jablons, A. C. Keller, J. E. Wilkinson, B. He, T. P. Speed and L. He (2014). A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. Genes Dev 28:438-450.
Park, J. E., I. Heo, Y. Tian, D. K. Simanshu, H. Chang, D. Jee, D. J. Patel and V. N. Kim (2011). ダイサー recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. Nature 475:201-205.
Pereira, P., A. Q. Pedro, J. A. Queiroz, A. R. Figueiras and F. Sousa (2017). New insights for therapeutic recombinant human miRNAs heterologous production:Rhodovolum sulfidophilum vs Escherichia coli. Bioengineered:1-8.
Pereira, P. A., J. F. Tomas, J. A. Queiroz, A. R. Figueiras and F. Sousa (2016). Recombinant pre-miR-29b for Alzheimer s disease therape

utics. Sci Rep 6：19946.
Ponchon, L., G. Beauvais, S. Nonin-Lecomte and F. Dardel (2009). A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli using a tRNA scaffold. Nat Protoc 4：947-959.
Ponchon, L. and F. Dardel (2007). Recombinant RNA technology：the tRNA scaffold. Nat Methods 4：571-576.
Robbins, M., A. Judge and I. MacLachlan (2009). siRNA and innate immunity. Oligonucleotides 19：89-102.
Robinson, M. D., D. J. McCarthy and G. K. Smyth (2010). edgeR：a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26：139-140.
Rupaimoole, R. and F. J. Slack (2017). MicroRNA therapeutics：towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov 16：203-222.
Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2017). Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin 67：7-30.
Sun, F., H. Fu, Q. Liu, Y. Tie, J. Zhu, R. Xing, Z. Sun and X. Zheng (2008). Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. FEBS Lett 582：1564-1568.
Thyagarajan, A., A. Shaban and R. P. Sahu (2018). MicroRNA-Directed Cancer Therapies：Implications in Melanoma Intervention. J Pharmacol Exp Ther 364：1-12.
Wang, W. P., P. Y. Ho, Q. X. Chen, B. Addepalli, P. A. Limbach, M. M. Li, W. J. Wu, J. L. Jilek, J. X. Qiu, H. J. Zhang, T. Li, T. Wun, R. D. White, K. S. Lam and A. M. Yu (2015). Bioengineering Novel Chimeric microRNA-34a for Prodrug Cancer Therapy：High-Yield Expression and Purification, and Structural and Functional Characterization. J Pharmacol Exp Ther 354：131-141.
Wiggins, J. F., L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, L. Patrawala, D. Brown and A. G. Bader (2010). Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor マイクロRNA-34. Cancer Res 70：5923-5930.
Yamakuchi, M., M. Ferlito and C. J. Lowenstein (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 105：13421-13426.
Yang, Q., L. Wan, C. Xiao, H. Hu, L. Wang, J. Zhao,

Ｚ．Ｌｅｉ ａｎｄ Ｈ．Ｔ．Ｚｈａｎｇ（２０１７）．Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ＬＨＸ２ ｂｙ ｍｉＲ－１２４ ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｎｖａｓｉｏｎ ｉｎ ｎｏｎ－ｓｍａｌｌ ｃｅｌｌ ｌｕｎｇ ｃａｎｃｅｒ．Ｏｎｃｏｌ Ｌｅｔｔ １４：３４２９－３４３６．
Ｚｈａｏ，Ｙ．，Ｍ．Ｊ．Ｔｕ，Ｗ．Ｐ．Ｗａｎｇ，Ｊ．Ｘ．Ｑｉｕ，Ａ．Ｘ．Ｙｕ ａｎｄ Ａ．Ｍ．Ｙｕ（２０１６）．Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｐｒｅ－ｍｉｃｒｏＲＮＡ－３４ａ ｐｒｏｄｒｕｇ ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ ｏｒｔｈｏｔｏｐｉｃ ｏｓｔｅｏｓａｒｃｏｍａ ｘｅｎｏｇｒａｆｔ ｔｕｍｏｒ ｇｒｏｗｔｈ ｖｉａ ｔｈｅ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ａｎｄ ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ａｒｒｅｓｔ．Ｓｃｉ Ｒｅｐ ６：２６６１１．

【０２１９】

実施例２

生物工学によるＬｅｔ－７ｃをロードしたリポポリプレックスは、肝細胞がん（ＨＣＣ）を阻害し、最小限の免疫原性で全生存期間を改善する

要約

肝細胞がん（ＨＣＣ）は依然としてがん関連死の主要な原因であり、より効果的な治療法が必要である。ＨＣＣにおいて欠損するマルチターゲティングマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）の再建は、新しい治療戦略を表している。この研究では、ＨＣＣ腫瘍量を軽減し、生存率を改善できる強力なｍｉＲＮＡ剤を同定しようとした。細菌発酵から精製され、生物工学によるユニークな非コードＲＮＡ分子のコレクションの中で、本発明者らはｌｅｔ－７ｃ剤を、インビトロでのＨｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞の両増殖に対する最も強力な阻害剤として同定した。標的遺伝子発現（Ｌｉｎ２８Ｂ、ＡＲＩＤ３Ｂ、Ｂｃｌ－ｘｌ、およびｃ－Ｍｙｃ）の選択的調節、アポトーシスの誘導、および腫瘍球増殖の阻害における、生物工学によるｌｅｔ－７ｃのメカニズム作用を実証するためのさらなる研究を提示する。リポソーム分岐ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリプレックス（ＬＰＰ）で製剤化された生物製剤ｌｅｔ－７ｃは、インビボ－ｊｅｔＰＥＩ（ＩＰＥＩ）よりもはるかに高い血清安定性を示した。さらに、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬は、同所性ＨＣＣ Ｈｕｈ７異種移植マウスモデルにおける腫瘍進行の制御において、ＩＰＥＩ／ｌｅｔ－７ｃよりも効果的であることが明らかになり、生存動物およびエクスビボの組織イメージング、ならびに組織病理学的検査および血液化学プロファイリング（例えば、α－フェトプロテインおよびビリルビンレベル）により決定される腫瘍量のより遍在的でより大幅な減少により顕在化する。さらに、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃは、同所性ＨＣＣマウスの全生存期間を有意に延長したが、免疫適格性マウスおよびヒト末梢血単核細胞におｋける免疫応答は誘発しなかったか、最小限であった。これらの結果は、生物工学によるｌｅｔ－７ｃが進行型ＨＣＣの治療に有望な分子であり、ＬＰＰがインビトロＲＮＡ送達の優れたモダリティであることを示している。

【０２２０】

材料および方法

材料。インビボ－ｊｅｔＰＥＩ（直鎖状２２ｋＤａ ＰＥＩ、ｌＰＥＩ）は、Ｐｏｌｙｐｌｕｓ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ（フランス、イルキルシュ）から購入した。分子量１０，０００Ｄａの分岐ポリエチレンイミン（ｂＰＥＩ１０ｋ）は、Ａｌｆａ Ａｅｓａｒ（マサチューセッツ州ワードヒル）から購入した。１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＭＡ）およびコレステロールは、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ（アラバマ州アラバスター）から購入した。１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）は、ＮＯＦ Ａｍｅｒｉｃａ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（ニューヨーク州ホワイト・プレーンズ）から購入した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００（ＬＦ３０００）、ＴＲＩｚｏｌ ＲＮＡ単離試薬、およびＢＣＡタンパク質アッセイキットは、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（マサチューセッツ州、ウォルサム）から購入した。Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ ＲＮＡ ＭｉｎｉＰｒｅｐ Ｋｉｔは、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅ

ａｒｃｈ（カリフォルニア州アービンＩｒｖｉｎｅ、ＣＡ）から入手した。Ｃｅｌｌｔｉｔｅｒ－Ｇｌｏアッセイは、Ｐｒｏｍｅｇａ（ウィスコンシン州マディソン）から購入した。Ｍａｔｒｉｇｅｌはコーニング（Ｃｏｒｎｉｎｇ、ニューヨーク）から購入した。ヒトα－フェトプロテインＥＬＩＳＡキットはＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（カリフォルニア州サンディエゴ）から購入した。分析グレードの他のすべての化学物質および有機溶媒は、Ｓｉｇｍａ ＡｌｄｒｉｃｈまたはＴｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。

【０２２１】

細胞培養。Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから入手し、イーグル最小必須培地（Ｃｅｌｌｇｒｏ、バージニア州マナッサス）で増殖させ、Ｈｕｈ７細胞はＪａｐａｎｅｓｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓから購入し、ダルベッコ改変イーグル培地（Ｇｉｂｃｏ、ニューヨーク州グランドアイランド）で増殖させた。両細胞株に、１０％ウシ胎児血清（Ｇｉｂｃｏ、ニューヨーク州グランドアイランド）および１％抗生物質／抗真菌剤（Ｃｅｌｌｇｒｏ、バージニア州マナッサス）を追加した。ＧＦＰ／ルシフェラーゼ発現細胞株は、親細胞にｐＣＣＬｃ－Ｌｕｃ－ＥＧＦＰレンチウイルス構築物（Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｒｅ、ＵＣ Ｄａｖｉｓ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ、カリフォルニア州サクラメント）を形質導入した後に樹立された。特に明記しない限り、すべての細胞は、インビトロＲＮＡ送達に関するメーカーの指示に従って、リポフェクタミン３０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド）でトランスフェクトされた。

【０２２２】

組換えｍｉＲＮＡ剤の産生。ｍｉＲＮＡ分子の生物工学は、ごく最近記載された通りに実施した（２１）。簡単に説明すると、標的ｍｉＲＮＡを含むｎｃＲＮＡをコードするインサートを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎクローニング技術を使用してｐＢＳＭｒｎａベクターにクローニングし、ＨＳＴ０８ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉに形質転換した。組換えｎｃＲＮＡは、陰イオン交換高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）によって９６％超の純度に精製され、純度は高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）アッセイによって決定した（２３）。純度９５％未満の生物工学によるｌｅｔ－７ｃを同じＦＰＬＣ法で再精製し、９６％超の均一性を達成した（図１５）。エンドトキシン活性は、Ｐｙｒｏｇｅｎｔ－５０００ ｋｉｎｅｔｉｃ ＬＡＬ ａｓｓａｙ（Ｌｏｎｚａ、メリーランド州ウォーカーズビル）を用いて調べた。

【０２２３】

細胞生存率アッセイ。ＧＦＰ／ルシフェラーゼを発現するＳｋ－Ｈｅｐ－１およびＨｕｈ７細胞（５，０００細胞／ウェル）を９６ウェルプレートに播種し、一晩増殖させた。ｌｅｔ－７ｃまたはＭＳＡを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００またはＬＰＰのいずれかを用いて３重実験で投与した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏキットを使用して細胞生存率を測定した。細胞生存率の阻害は、担体対照（０％阻害）と比較して決定され、薬力学パラメーターは、可変勾配を有する正規化された用量反応方程式にデータを適合させることによって概算した。

【０２２４】

【数１】

$$Y=100/(1+[[10]]^{((Log[[EC]]_{50}-X)*HillSlope)})$$

【０２２５】

有効性が低い場合、Ｈｕｈ７細胞のＭＳＡ（Ｅｍａｘ、Ｅｍｉｎ＝１００、２０．６４％）およびｍｉＲ－１４４（Ｅｍａｘ、Ｅｍｉｎ＝４４．４２、１７．２７％）は、全用量反応方程式の式に最もよく適合した。

【０２２６】

【数２】

$$Y=E_min+(E_max-E_min)/(1+[\![10]\!]^{((Log[\![EC]\!]_50-X)*Hill\ Slope)})$$

【０２２７】

免疫ブロットおよび免疫蛍光分析。Ｈｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞を６ウェルプレートに３００，０００細胞／ウェルで播種し、１５ｎＭのＲＮＡでトランスフェクトした。７２時間後、細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤（Ｐｉｅｒｃｅ、イリノイ州ロックフォード）を含むＲＩＰＡ緩衝液で溶解した。タンパク質レベルは、ＢＣＡアッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ、イリノイ州ロックフォード）によって決定した。１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）で分離した後、タンパク質をポリビニリデンジフルオリド膜に転写し、５％ミルク／１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むトリス緩衝生理食塩水でブロックした。固定化された全タンパク質は、製造元の指示に従って画像化した。膜は、一次抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｉｎｃ．のＢｃｌ－ｘｌウサギｍＡｂ［ＣＳＴ ２７６４］、ｃ－ＭｙｃウサギｍＡｂ［ＣＳＴ １３９８７］、およびＬＩＮ２８ＢウサギｍＡｂ［ＣＳＴ １１９６５］、ＡｂｃａｍのＡＲＩＤ３ＢウサギｐＡｂ［ＡＢ ９２３２８］）と４℃で一晩、１：１，０００希釈で５％ウシ血清アルブミンを含むＴＢＳ－Ｔでインキュベーションした後、Ｃｌａｒｉｔｙ ＥＣＬ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）による化学発光イメージングの前に、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ二次抗体（１：１０，０００希釈）と室温で２時間インキュベーションした。バンドの相対強度は、すべての固定化タンパク質に対して正規化された。

【０２２８】

ＨＭＧＡ２発現を検定するために、Ｈｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞をガラスチャンバースライド上で増殖させ、ＭＳＡまたはｌｅｔ－７ｃでトランスフェクトした。７２時間後、細胞を１０％ホルマリンで固定し、１％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で透過処理し、ＨＭＧＡ２ウサギｍＡｂ［ＣＳＴ ８１７９］（５％ウシ血清アルブミンで１：４００希釈）と４℃で一晩インキュベーションした。抗原はＡｌｅｘａ４８８結合抗ウサギＩｇＧ Ｆａｂ断片［ＣＳＴ４４１２］で検出され、核はＤＡＰＩ［ＣＳＴ４８０３］で対比染色した。

【０２２９】

フローサイトメトリー。Ｈｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞を６ウェルプレートに１５０，０００細胞／ウェルの密度でプレーティングし、５ｎＭＲＮＡでトランスフェクトした。４８時間後、製造元の指示（Ｔｒｅｖｉｇｅｎ、メリーランド州ゲイサーズバーグ）に従って、細胞をヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ－ＦＩＴＣで染色した。細胞数およびフルオロフォア強度は、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｆｏｒｔｅｓｓａ２０カラーサイトメーターを使用して測定した。全イベント数は１０，０００イベントでゲートされ、象限ゲートはビヒクル対照と比較して設定した。

【０２３０】

腫瘍球アッセイ。Ｈｕｈ７細胞を付着条件下で６ウェルプレートに３００，０００細胞／ウェルの密度で播種し、１５ｎＭのＲＮＡでトランスフェクトした。４８時間後、生細胞を２，５００細胞／ウェルの密度で２４ウェル超低接着表面プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、メイン州ケネバンク）に移し、ペニシリン／ストレプトマイシン、ＧｌｕｔａＭａｘ（Ｇｉｂｃｏ、ニューヨーク州グランドアイランド）、２０ｎｇ／ｍｌヒト上皮成長因子、および１０ｎｇ／ｍｌヒト塩基性線維芽細胞成長因子（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、ニュージャージー州ロッキーヒル）を含むＤＭＥＭ／Ｆ１２＋Ｂ２７で増殖させた。７日後、原発腫瘍球（＞１０μｍ直径）を数え、球直径をＩｍａｇｅＪで測定し、トリプシンで単細胞に解離させた。すべての細胞を超低接着／無血清の条件で新しいウェルに移した後、細胞に１５ｎＭのＲＮＡを再度トランスフェクトした。７日後、二次腫瘍球を再び数え、直径を

測定し、解離して個々の細胞を数えた。球体形成効率（％）は、前世代から播種された単細胞の総数と比較して計算した。

【０２３１】

ＬＰＰナノ複合体の製剤化および特性評価。５．０７ｍｇ ＤＯＴＭＡ、２．９２ｍｇコレステロール、および０．３８ｍｇ ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００（モル比＝５０：５０：１）を丸底フラスコ内のクロロホルムに溶解させた。有機溶媒を回転蒸発により除去し、フラスコの底に形成された脂質薄膜を、超音波槽を使用して１ｍＬのピロ炭酸ジエチル処理水で水和し、続いてＰｒｏｂｅ Ｓｏｎｉｃａｔｏｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で１００秒間さらに断続的に超音波処理した。得られたリポソームを０．２２μｍ滅菌フィルターに通して滅菌した。ポリプレックスは、２５０μＬの精製ＲＮＡ（１ｍｇ／ｍＬ）と２５０μＬのｂＰＥＩ１０ｋ（２５０μｇ／ｍＬ）をピペッティングにより混合した後、室温で５分間インキュベーションすることにより形成された。ＬＰＰは、５００μＬの新たに調製したポリプレックスを５００μＬのリポソームに激しくピペッティングすることで添加し、３０分間インキュベーションすることによって産生した。ＲＮＡをロードしたＬＰＰのゼータ電位および粒径は、動的光散乱法（Ｍａｌｖｅｒｎ Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ９０装置、Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｌｔｄ．、イギリス）によって測定した。ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃの形態は、銅グリッド上でリンタングステン酸で染色した後、Ｐｈｉｌｉｐｓ ＣＭ－１２０透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）で観察した。

【０２３２】

血清安定性。血清中の安定性を測定するために、５００μＬのＲＮＡをロードした製剤を５００μＬのＦＢＳまたはヒト血清と混合し、３７℃でインキュベーションした。種々の時点で、１００μＬのサンプルは、ＴＲＩｚｏｌを使用して全ＲＮＡ単離にかけ、変性尿素ポリアクリルアミド（８％）ゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）で分析し、ＲＮＡの完全性を評価した。

【０２３３】

ＳＫ－Ｈｅｐ－Ｌｕｃ－ＧＦＰ細胞におけるＧＦＰ－ｓｉＲＮＡによるＧＦＰ－ｍＲＮＡのインビトロノックダウン。ＳＫ－Ｈｅｐ１－Ｌｕｃ－ＧＦＰは、１２ウェルプレートに播種し、５×１０^{4}細胞／ウェルの密度で一晩増殖させた。最終濃度が５ｎＭになるように、ＢＥＲＡ／ＧＦＰ－ｓｉＲＮＡをロードしたＬＰＰナノ複合体を各ウェルに添加した。比較のため、ＬＰ３０００およびＩＶＪ－ＰＥＩの製剤が含まれていた。７２時間の処理後、細胞を回収し、ＴｒｉｚｏｌおよびＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ ＲＮＡ ＭｉｎｉＰｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して全ＲＮＡを抽出した。ＮｘＧｅｎＭ－ＭｕＬＶ逆転写酵素（Ｌｕｃｉｇｅｎ、Ｍｉｄｄｌｅｔｏｎ、ＷＩ、ＵＳＡ）をランダムヘキサマーとともに使用して、５００ｎｇの全ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。ＧＦＰ－ｍＲＮＡのレベルは、内部標準として１８Ｓを使用して決定した。この研究で使用したプライマーを表６に列挙する。すべてのリアルタイムｑＰＣＲ実験は、ＣＦＸ９６ Ｔｏｕｃｈ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、米国カリフォルニア州ハーキュリーズ）でｉＴａｑ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ Ｓｕｐｅｒｍｉｘを使用して実行した。細胞を３回に処理し、別々に検定した。式$2^{-\Delta\Delta Ct}$を用いた比較閾値サイクル（Ｃｔ）アプローチを利用して、相対的遺伝子発現を計算した。

【表６】

表６

	プライマーのリスト
Let-7c (逆転写)	5’-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCCAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCAT-3’ (配列番号 566)
Let-7c(PCR)	逆方向:5’-GCGCTAAGGCACGCGGTG-3’ (配列番号 534)
	順方向 5’-CGCGCTGAGGTAGTAGGTTGT-3’ (配列番号 568)
GFP	順方向 5’-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3’ (配列番号 569)
	逆方向 5’-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3’ (配列番号 570)
18S	順方向 5’-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3’ (配列番号 536)
	逆方向 5’-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3’ (配列番号 537)
U6	順方向 5’-CTCGCTTCGGCAGCACA-3’ (配列番号 528)
	逆方向 5’-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3’ (配列番号 529)

【０２３４】

ｌｅｔ－７ｃのインビトロ送達および細胞増殖の阻害。インビトロｌｅｔ－７ｃ送達を評価するために、ＧＦＰ／ルシフェラーゼを形質導入したＳｋ－Ｈｅｐ－１またはＨｕｈ７細胞（５０，０００細胞／ウェル）を１２ウェルプレートに播種し、一晩増殖させた。ＬＰＰナノ複合体またはＬＦ３０００で製剤化されたｌｅｔ－７ｃを各ウェルに１５ｎＭのＲＮＡの最終濃度になるよう添加した。７２時間後、細胞をＴｒｉｚｏｌで溶解し、Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ ＲＮＡ ＭｉｎｉＰｒｅｐ Ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ）を用いてＲＮＡを収集し、ｌｅｔ－７ｃおよびｌｅｔ－７ｃ前駆体レベルのＲＴ－ｑＰＣＲ評価を行った。この研究で使用したプライマーを表６に列挙する。すべてのリアルタイムｑＰＣＲ実験は、ＣＦＸ９６ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ｔｈｅｒｍｏ ｃｙｃｌｅｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、米国カリフォルニア州ハーキュリーズ）でｉＴａｑ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ Ｓｕｐｅｒｍｉｘを使用して実行した。増幅産物の存在量は、$2^{-\Delta\Delta Ct}$法により、Ｕ６核小体低分子ＲＮＡおよびビヒクル対照と比較して報告された。

【０２３５】

同所性ＨＣＣ異種移植マウスモデルにおける治療研究。すべての動物の手順は、カリフォルニア大学デービス校の施設内動物管理使用委員会によって承認された。

【０２３６】

同所性ＨＣＣ異種移植マウスモデルの確立。ルシフェラーゼ／ＧＦＰを発現するＨｕｈ７細胞を、1×10^{8}細胞／ｍｌの最終濃度になるようＭａｔｒｉｇｅｌと混合した。４週齢の雄の無胸腺ヌードマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、メイン州バーハーバー）に麻酔をかけ、腹筋層の正中線の白線に沿って切開（約１ｃｍ）を行った。２０μＬのＨｕｈ７細胞を含むＭａｔｒｉｇｅｌ懸濁液（2×10^{6}細胞）を肝臓の左葉に注入した。Ｈｕｈ７細胞の生着の成功は、Ｄ－ルシフェリン（１５０ｍｇ／ｋｇ）（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ，Ｉｎｃ．、カリフォルニア州ミルピタス）の腹腔内注射後、ＣｈｅｍｉＤｏｃ（商標）ＭＰ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（ＢｉｏＲａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を使用した生物発光イメージングによって確認した。

【０２３７】

腫瘍進行の研究。接種１週間後、インビボ生物発光イメージングによって決定された腫瘍サイズに従って、マウスを５つの群（未処理、ｌＰＥＩ／ＭＳＡ、ＬＰＰ／ＭＳＡ、ｌＰＥＩ／ｌｅｔ－７ｃおよびＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃ）に割り当て、週３回処置した（４０μｇＲＮＡ）。腫瘍の成長をモニタリングするために、マウスを週に１回画像化した。１５日目の最終投与の２時間後にマウスをと殺した。腫瘍が生着した肝臓を摘出し、ＣｈｅｍｉＤｏｃ（商標）ＭＰ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍを使用してＧＦＰ蛍光を画像化した。ＲＮＡが健康な肝臓とＨＣＣ腫瘍から抽出され、ｌｅｔ－７ｃのレベルは遺伝子選択

的プライマーを使用したステムループＲＴ－ｑＰＣＲを用いて定量化した（表６）。血液化学プロファイリング（比較病理学研究所、カリフォルニア大学デービス校）のために血液を採取し、血清α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）をＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ミネソタ州ミネアポリス）により調べた。ヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）の組織病理学的研究は、ロズウェルパークがん研究所（ニューヨーク州バッファロー）の臨床免疫組織化学研究所によって実施された。

【０２３８】

生存研究。接種の１週間後、生物発光イメージングによって決定された腫瘍サイズに応じて、担がんマウスの別のバッチを２つの群（ＬＰＰ／ＭＳＡおよびＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃ）に割り当て、（４０μｇＲＮＡ）で週３回３週間継続して処置した。動物の健康を評価するために、体重を週に２回記録した。生存率はカプランマイヤー法で分析し、ログランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定で比較した。

【０２３９】

サイトカイン放出の誘導。ヒトＰＭＣはＬｏｎｚａ（メリーランド州ウォーカービル）から購入し、１０％ヒトＡＢ血清（Ｓｉｇｍａ、ミズーリ州セントルイス）を追加したＲＰＭＩ１６４０で維持した。ＰＢＭＣを２×10^5細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレートに播種し、一晩増殖させた。細胞を１０ｎｇ／ｍＬまたは１００ｎｇ／ｍＬのＬＰＳ（正対照）、ＬＰＰ／ＭＳＡ（５ｎＭ）、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃ（５ｎＭ）、またはＬＰＰビヒクルで処理した。処理２４時間後、培地を回収し、遠心分離によって細胞片を除去した。ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－４およびＩＬ－１０レベルは、対応するヒトサイトカインＥＬＩＳＡアッセイキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド）を使用して定量化した。

【０２４０】

健康なＢａｌｂ／ｃおよびＣＤ－１マウス（５～６週齢）を異なる群（群あたり３匹の雌および３匹の雄）に無作為に割り当て、４０μｇのＭＳＡもしくはｌｅｔ－７ｃをロードしたＬＰＰナノ複合体、または２０μｇのＬＰＳ（正対照）もしくはＬＰＰビヒクル（負対照）を注射した。処置１時間後に血液を採取し、マウスＩＬ－６およびＩＬ－４　ＥＬＩＳＡアッセイキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド）を使用して血清ＩＬ－６およびＩＬ－４レベルを定量化した。

【０２４１】

統計分析。すべての値は、平均±標準偏差（ＳＤ）である。統計分析は、ボンフェローニの事後検定または必要に応じてスチューデントｔ検定（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ、カリフォルニア州サンディエゴ）を用いる１元配置または２元配置分散分析を使用して実行した。

【０２４２】

結果

生物工学によるｌｅｔ－７ｃは、ｎｃＲＮＡ剤のコレクションの中でＨＣＣ細胞増殖に対する最も強力な阻害剤である。対照ＲＮＡ（ＭＳＡ）は一貫して最小の細胞生存率阻害を生じため、生物工学によるｍｉＲＮＡ剤の小コレクションのスクリーニングはそれらの抗増殖活性を予測するものであった（図１４Ａ）。両細胞株で重複した、より大きな抗増殖活性を示す、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－１２４、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、およびｍｉＲ－１２６を含む多くのｍｉＲＮＡ剤が、用量反応研究のために追跡された（図．１４Ｂ）。Ｌｅｔ－７ｃは最も強力なｎｃＲＮＡとして明らかにされ、ＥＣ５０値はＳｋ－Ｈｅｐ－１細胞およびＨｕｈ７細胞でそれぞれ０．７８ｎＭおよび０．５１ｎＭであった（図１４Ｃ）。さらに、ｌｅｔ－７ｃは、同じ陰イオン交換ＦＰＬＣ法（２１）で精製された他の試験済みｎｃＲＮＡと同じくらい純粋（＞９７％、ＨＰＬＣによる）であり（図１４）、エンドトキシンレベルが低く（図１５）、不純物による干渉は最小限であることが示唆された。

【０２４３】

生物工学によるｌｅｔ－７ｃは、標的遺伝子のタンパク質レベルを低減する。組換えｌ

ｅｔ－７ｃの作用を検証するため、がんで重要ないくつかの既知のｌｅｔ－７ｃ標的のタンパク質レベルを調べた。ｌｅｔ－７ファミリーｍｉＲＮＡの標準標的であるＬＩＮ２８Ｂは、Ｈｕｈ７細胞ではｌｅｔ－７ｃによって６０％超減少した一方、Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞では免疫ブロットによって検出されなかった（図１６Ａ）。これは、生物製剤ｌｅｔ－７ｃ－で処理された細胞において、対照ＭＳＡよりもはるかに高いレベルのｌｅｔ－７ｃと関連していた。さらに、Ｂｃｌ－ｘｌおよびｃ－Ｍｙｃのタンパク質レベルは、Ｈｕｈ７およびＳｋ－Ｈｅｐ－１の両細胞でｌｅｔ－７ｃによって一貫して抑制されたが、ＡＲＩＤ３Ｂの下方制御はＨｕｈ７細胞でのみ観察された。さらに、免疫蛍光研究は、ＨＭＧＡ２発現がＨｕｈ７細胞で有意に減少したのに対し、Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞では有意ではなかったことを示した（図１６Ｂ）。

【０２４４】

生物工学ｌｅｔ－７ｃによるＨＣＣ細胞のアポトーシスの誘導。Ｌｅｔ－７ファミリーのｍｉＲＮＡは、他のメカニズムの中でも、Ｂｃｌ－ｘｌのターゲティングを介してアポトーシスを誘導することが示されている（３２）。同様に、我々のデータは、低用量（５ｎＭ）のｌｅｔ－７ｃが、ビヒクルおよびＭＳＡ治療と比較して、Ｈｕｈ７とＳｋ－Ｈｅｐ－１の両細胞で初期および後期アポトーシス細胞集団の、控えめではあるが強固な増加を誘発したことを示した（図１７）。さらに、ｌｅｔ－７ｃおよびＭＳＡのトランスフェクション後、壊死細胞集団は変化しなかった。

【０２４５】

生物製剤ｌｅｔ－７ｃはＨＣＣ細胞の幹細胞性を抑制する。ｌｅｔ－７とＬＩＮ２８の間の負のフィードバックは、治療帰結にとって重要ながん細胞の幹細胞性に影響を及ぼす（３３）。そのため、Ｈｕｈ７細胞での腫瘍球アッセイを使用してがん幹細胞（ＣＳＣ）の増殖を評価した。Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞は、同様の条件下で腫瘍球を形成しなかった。付着条件でのトランスフェクションとそれに続く超低接着／無血清条件での増殖後、ｌｅｔ－７ｃ処理細胞で原発腫瘍球サイズにおける直径半分の有意な減少が観察されたが、腫瘍球数の減少は観察されなかった（図１８）。その後の解離、トランスフェクション、および超低接着／無血清条件での増殖により二次腫瘍球を形成すると、ｌｅｔ－７ｃ処理細胞で同様な直径の５０％減少が観察された。原発腫瘍球からの球形成効率は有意に低下しなかったが、ｌｅｔ－７ｃ処理により二次腫瘍球では球数と個々の細胞数が有意に減少した（図１８）。

【０２４６】

ｌｅｔ－７ｃをロードしたＬＰＰナノ複合体の調製および特性評価。したがって、動物モデルでの治療研究に向けて、ＬＰＰを使用して、生物工学によるｌｅｔ－７ｃ分子（図１９Ａ）をロードした。ｌｅｔ－７ｃをロードしたＬＰＰのサイズは９８．３５±５．１１ｎｍで、ゼータ電位値は４３．９±２．２ｍＶであり、これはＴＥＭ検査によって補完された（図１９Ｂ）。対照ＲＮＡ　ＭＳＡは同じ方法で製剤化され、ＬＰＰ／ＭＳＡナノ複合体は同様のサイズ（１０２．４±５．９ｎｍ）およびゼータ電位（４５．１±１．２ｍＶ）を示した（図２０）。さらに、ＬＰＰは、ＦＢＳおよびヒト血清の両方において２４時間までにわたり、ポリプレックスよりも大きな程度において（図２１Ｃ）、ｌｅｔ－７ｃを分解（図２１Ａ～Ｂ）から効果的に保護することができた。

【０２４７】

ＬＰＰはｌｅｔ－７ｃをＨＣＣ細胞に効率的に送達し、細胞増殖の阻害を誘発する。さらに、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（ＬＦ３０００）と並行して、Ｈｕｈ７とＳｋ－Ｈｅｐ－１の両細胞でＬＰＰによる送達効率を評価した。本発明者らのデータは、ｌｅｔ－７ｃがＬＰＰナノ複合体によってＨｕｈ７細胞に効率的に送達されたことを示し、これは、ＬＦ３０００製剤と同等レベルのｌｅｔ－７ｃの増加によって明らかになり（図１９Ｃ）、細胞増殖の急激な抑制につながった（図１９Ｄ）。同様の結果が、Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞におけるＬＦ３０００およびＬＰＰで製剤化されたｌｅｔ－７ｃで観察された（図１９Ｅ～Ｆ）。これらのデータは、ＧＦＰ／ルシフェラーゼを発現するＨｕｈ７細胞における標的ＧＦＰレベルのノックダウンによって示されるように、生物工学による別

のｎｃＲＮＡ分子であるＧＦＰ－ｓｉＲＮＡ（２０、２１）のＬＰＰナノ粒子による効率的な送達によっても補完された（図２２）。

【０２４８】

生物工学によるｌｅｔ－７ｃは、同所性異種移植マウスモデルにおけるＨＣＣ腫瘍の進行を有意に減少させ、耐容性も良好である。したがって、本発明者らは、ｌｅｔ－７ｃ療法の有効性を調査するために、ルシフェラーゼ／ＧＦＰを発現するＨｕｈ７細胞を用いた同所性ＨＣＣ異種移植マウスモデルを確立した（図２３Ａ）。生存動物の生物発光イメージングによって明らかにされたように（図２３Ｂ）、ＨＣＣ腫瘍量は、未処理のマウスと比較して、ＬＰＰおよびＩＰＥＩで送達された両ｌｅｔ－７ｃによって約５０％阻害され、一方、対照ＭＳＡは影響を有さなかった。肝臓腫瘍ＧＦＰシグナルのエクスビボイメージング（図２３Ｃ）は、ＨＣＣの制御に対するｌｅｔ－７ｃの有効性をさらに実証し、これは、未処理のマウスと比較して、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃによって７０％超、ＩＰＥＩ／ｌｅｔ－７ｃによって約３３％減少した。ＨＣＣの抑制は、ｌｅｔ－７ｃで処置したマウスから単離した健康な肝臓および腫瘍の両方でｌｅｔ－７ｃのレベルが高いことと関連していた（図２３Ｄ）。さらに、同所性ＨＣＣの阻害におけるｌｅｔ－７ｃ療法の有効性は、ｌｅｔ－７ｃ処置マウスにおける有意に低い血清ＡＦＰレベル（図２３Ｅ）、ならびにＨＣＣ組織の組織病理学的検査（図２３Ｆ）によっても裏付けられた。腫瘍量のより遍在的で有意により大幅な減少により示されるように（図２３）、より高い血清安定性（図２１）と一致して、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃがＨＣＣの制御においてＩＰＥＩ／ｌｅｔ－７ｃよりも効果的であったことも注目に値する。

【０２４９】

全マウスの体重が経時的に着実な増加を示したため、すべての処置は耐容性が良好であった（図２４Ａ）。ｌｅｔ－７ｃの安全性をさらに調査するために、血液生化学プロファイルが決定された（図２２Ｂ～Ｆ）。アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、血中尿素窒素（ＢＵＮ）、およびクレアチニンを含む肝機能および腎機能のバイオマーカーはすべて正常範囲内であった。驚いたことに、未処置およびＭＳＡ処置マウスの血中総ビリルビンレベルは非常に変動し、正常範囲を超える傾向があったが、ｌｅｔ－７ｃ処置マウスでは正常範囲内に留まり、これはＨＣＣの制御におけるｌｅｔ－７ｃの有効性の別の指標であり得る。

【０２５０】

ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬は、同所性ＨＣＣ担がんマウスの全生存期間を有意に改善する。全生存に対するＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬の利益の大きさを定義するために、同所性ＨＣＣ　Ｈｕｈ７異種移植マウスの別のコホートをさらに作成した。生存マウスの定量的生物発光イメージングによってＨＣＣの発症が確認された後、同程度の腫瘍量を示す対象をＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃおよび対照ＬＰＰ／ＭＳＡ処置に無作為に割り付けた（図２５Ａ）。生存分析は、ＬＰＰ／ＭＳＡと比較して、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃ療法がＨＣＣ担がんマウスの全生存を有意に改善したことを示した（図２５Ｂ）。これは、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃで処置したマウスの生存期間中央値（２６．０日）がＬＰＰ／ＭＳＡ対照（１９．５日）よりも長いことによっても示された。他の治療研究におけるｌｅｔ－７ｃ処置の安全性プロファイル（図２４）と一致して、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃ処置では、ＬＰＰ／ＭＳＡと比較して、マウスの体重は変化しなかった（図２５Ｃ）。

【０２５１】

ヒトＰＢＭＣおよび免疫適格マウスにおいてＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃの免疫原性は全くないかまたは最小限である。最後に、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬がヒトＰＢＭＣと健康な免疫適格マウスの２つの異なる系統（Ｂａｌｂ／ｃおよびＣＤ－１）で免疫応答を誘発するか否かを評価した。予想通り、ＬＰＳ処置は、ＩＬ－６レベルの著しく急激な上昇ならびにＴＮＦαおよびＩＬ－１０レベルの増加によって示されるように、ヒトＰＢＭＣ（図２６Ａ）ならびにＢａｌｂ／ｃ（図２６Ｂ）およびＣＤ－１（図２６Ｃ）マウスの両方でサイトカイン放出症候群を引き起こした。対照的に、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃ処置は、ヒトＰＢＭＣのＩＬ－６、ＩＬ－４、またはＩＬ－１０のレベルを改変させなかった一方

、未処理の細胞と統計的な有意差なくＴＮＦαレベルをわずかに増加させた。ＬＰＰ／ビヒクル、ＬＰＰ／ＭＳＡおよびＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃはすべて、Ｂａｌｂ／ｃおよびＣＤ－１マウスの血清ＩＬ－６レベルに軽度の増加を引き起こしたが、ＩＬ－６レベルの上昇は依然として有意に、ＬＰＳによって誘発されるものよりも２～３桁低かった。これらの結果は、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃが免疫原性ではないことを示唆している。

【０２５２】

考察

ｍｉＲＮＡ補充療法は、がん細胞における腫瘍抑制ｍｉＲＮＡの発現／機能の喪失に関する発見を踏まえると、腫瘍の進行を制御するための新規の有望な戦略である。ただし、ｍｉＲＮＡの調節不全ならびに他の調節因子および経路が複雑であるため、機能的なｍｉＲＮＡの再導入は必ずしも最適な効果と一致しない場合がある。そのため、ｍｉＲ－１２２が最も豊富な肝ｍｉＲＮＡであり、多くのｍｉＲＮＡがＨＣＣの進行に関連しているが、生物工学によるｌｅｔ－７ｃが、ｍｉＲ－１２２を含むｎｃＲＮＡ剤の小コレクションの中でＨＣＣ細胞に対して最も高い抗増殖活性を示すことが見出された。他のｍｉＲＮＡのインビボでの有効性は、本明細書ではｌｅｔ－７ｃと比較されていないが、本スクリーニング方法は、ＨＣＣ腫瘍量を軽減し、本研究で明らかにされた全生存期間を改善することにおけるｌｅｔ－７ｃの潜在的な利益を予測するものである。

【０２５３】

現在のｍｉＲＮＡの研究および医薬品開発では、主に試験管で合成されたｍｉＲＮＡ模倣物を使用しており、これは、代謝的安定性を改善しより好ましい薬物動態特性を示すことが期待される広範な化学修飾で構成される。しかし、異なるメーカーのこのような合成ｍｉＲＮＡ剤またはオリゴヌクレオチドは、人工修飾の種類、位置、および程度の点で大きく異なる。「同じ配列」を保持すると考えられているこれらのｍｉＲＮＡ剤は、文字通り異なる分子であり、必然的に異なる二次および高次構造、ならびに物理化学的および生物学的活性を有する。さらに、合成ＲＮＡ剤はサイトカイン放出症候群を誘発するリスクが高い（３４～３６）。これはまた、合成ポリペプチド／タンパク質ではなく生細胞で産生され折りたたまれた組換えタンパク質を使用することによって成功が証明されている、タンパク質の研究および治療とはまったく対照的である。この研究で提示された生物工学によるｍｉＲＮＡ分子は、新規クラスの生物製剤ｍｉＲＮＡ剤を表し、生細胞で折りたたまれ耐容性があるため、細胞ＲＮＡ高分子の特性をよりよく捉えることができる（２２）。最小限の天然修飾で、ヒト細胞で好ましい安定性を示す（２３、３７）組換えｍｉＲＮＡ剤は、細胞のｍｉＲＮｏｍｅプロファイルを書き換えて調節機能を実行する成熟ｍｉＲＮＡを標的とするように選択的にプロセシングされる（２１）。

【０２５４】

がん細胞プロセスの背後にあるｍｉＲＮＡ制御遺伝子調節の多面的性質は、広範な検証を是認する。ＬＩＮ２８およびｌｅｔ－７ファミリーのｍｉＲＮＡの相互作用（３３、３８）は、ＨＣＣおよび他の肝疾患だけでなく多能性の調節においても重要な要素である（３９）。幹様細胞で上方制御されることが示されているＬＩＮ２８は、細胞を未分化状態に再プログラムすることができるため（４０）、ＬＩＮ２８はＣＳＣおよび腫瘍の開始を抑制するための創薬可能な標的であり得る。対照的に、多能性を阻害し、分化を促進することが示されているＬＩＮ２８調節ｌｅｔ－７ファミリーｍｉＲＮＡは、ＣＳＣの維持および複製を管理するために利用され得る（４１、４２）。本研究は、腫瘍球の成長の阻害における、生物工学ｌｅｔ－７ｃ剤の一貫した作用を示し、これは、Ｈｕｈ７細胞におけるＬＩＮ２８Ｂ発現の強力な抑制に起因すると考えられ、Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞を上回る、ｌｅｔ－７ｃ剤に対するＨｕｈ７細胞のより高い感受性についての説明を提供する。さらに、アポトーシスの誘導は抗腫瘍剤の一般的なメカニズムであり、アポトーシスに対する耐性はＣＳＣの一般的な特徴である。ｌｅｔ－７ファミリーｍｉＲＮＡは、Ｂｃｌ－ｘｌを含む抗アポトーシスタンパク質の減弱化を介して細胞をアポトーシスに誘導あるいは感作することも示されている（３２、４３）。本研究では、両ＨＣＣ細胞株でｌｅｔ－７ｃによるＢｃｌ－ｘｌ発現の抑制が見られ、これは、低用量のｌｅｔ－７ｃによる（壊死

細胞集団ではなく）アポトーシス細胞集団の誘導と符合する。

【０２５５】

現在臨床研究中の全身投与用のＲＮＡ薬は、その優れた生体適合性と好ましい脂質組成を考慮して、主に脂質ベースのシステム（リポソームなど）によって送達される（４４～４６）。一例として、進行ＨＣＣ用のＳＭＡＲＴＩＣＬＥＳ（登録商標）リポソームナノ粒子で製剤化された、転写因子Ｃ／ＥＢＰ－αを標的とする低分子活性化二本鎖ＲＮＡを評価するための第Ｉ相試験が進行中である（ｈｔｔｐｓ：／／ｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ／ｃｔ２／ｓｈｏｗ／ＮＣＴ０２７１６０１２）。脂質ベースの送達システムの中で、ＬＰＰはリポソームおよびポリプレックスの両方の好ましい特性を提供する（２８、２９、４７）。本発明者らの最近の研究により、ＩＰＥＩは、標的遺伝子ノックダウンを達成するため肝臓に（２０）、ならびに全身系で疾患を制御するため腫瘍組織（２１、２４、２６）に、生物製剤ＲＮＡを送達できることが示された。本研究では、ポリプレックスの外部ペグ化脂質コーティングにより、ＩＰＥＩと比較してＬＰＰナノ複合体で製剤化されたｌｅｔ－７ｃの血清安定性の改善を確認した。その結果、ＬＰＰはＨＣＣ細胞株で高いインビトロ送達効率を示した。最も重要なことは、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃは、インビボでの同所性ＨＣＣ腫瘍量の有意に大幅な抑制を提供し、これは生存動物のルシフェラーゼ生物発光シグナル、エクスビボＧＦＰ強度、血清ＡＦＰレベル、および組織学的腫瘍面積を含む、複数の独立した評価項目によって一貫して示されている。さらに、ＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬は、同所性ＨＣＣマウスの生存期間中央値を６．５日までに有意に改善したことが明らかになったが、これは少ないように思われる。しかし、マウスとヒトの寿命の相違およびそれらの可能な相関関係（４８）を考慮すると、これはＨＣＣ患者の生存利益の約９か月の延長に相当し、臨床調査を正当化する。

【０２５６】

本発明者らの以前の研究結果（２３）と一致して、本研究は、高度に精製された低エンドトキシン組換えＲＮＡがＨＣＣ担がん免疫不全マウスで耐容性良好であり、免疫適格マウスでサイトカイン放出が全くないまたは最小限であることを示した。興味深いことに、肝障害の指標である血清ビリルビンレベルは、ｌｅｔ－７ｃで処置したマウスのみ正常範囲内に収まった。これは、ＨＣＣ腫瘍増殖の制御におけるｌｅｔ－７ｃ療法の有効性（さらなる肝障害の抑制につながる）に起因する可能性が高く、このことはＨＣＣモデルの侵襲的性質を浮き彫りにしている（４９）。さらに、本研究は、生細胞で産生された組換えｍｉＲＮＡ分子の安全性プロファイルに加えて、生物工学によるＲＮＡがヒトＰＢＭＣで免疫原性ではないことを初めて示した。

【０２５７】

結論として、本発明者らは、侵襲性ＨＣＣ腫瘍マウスモデルにおけるＬＰＰ／ｌｅｔ－７ｃナノ治療薬の有効性を実証し、マウスおよびヒトＰＢＭＣにおいて免疫原性がないまたは最小限であることを示した。最初のこの種の生物製剤ｌｅｔ－７ｃ剤は、特定の標的および重要な細胞機能への干渉を介してＨＣＣ細胞の生存率を阻害することにおいてｍｉＲＮＡの小セットの中で最も強力であると特定された。本発明者らの知見は、ＬＰＰで製剤化された生物製剤ｌｅｔ－７ｃが、ＨＣＣの効果的かつ安全な治療として役立つことを示唆しており、これは臨床的検証に値する。

実施例２のための参照文献

１．Ｓｉｅｇｅｌ ＲＬ，Ｍｉｌｌｅｒ ＫＤ，Ｊｅｍａｌ Ａ．Ｃａｎｃｅｒ ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，２０１８．ＣＡ Ｃａｎｃｅｒ Ｊ Ｃｌｉｎ ２０１８；６８：７－３０．
２．Ｋｉｍ ＮＧ，Ｎｇｕｙｅｎ ＰＰ，Ｄａｎｇ Ｈ，Ｋｕｍａｒｉ Ｒ，Ｇａｒｃｉａ Ｇ，Ｅｓｑｕｉｖｅｌ ＣＯ，Ｎｇｕｙｅｎ ＭＨ．Ｔｅｍｐｏｒａｌ ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ ｄｉｓｅａｓｅ ｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｏｆ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ ｃａｒｃｉｎｏｍａ：Ａ ｒｅａｌ－ｗｏｒｌｄ ｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅ ｆｒｏｍ １９９８ ｔｏ ２０１５．Ｃａｎｃｅｒ ２０１８．
３．Ｓｕｎ Ｗ，Ｃａｂｒｅｒａ Ｒ．Ｓｙｓｔｅｍｉｃ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｐ

atients with Advanced, Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Emergence of Therapies. J Gastrointest Cancer 2018.
4. Gbolahan OB, Schacht MA, Beckley EW, LaRoche TP, O'Neil BH, Pyko M. Locoregional and systemic therapy for hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Oncol 2017;8:215-228.
5. Galle PR, Tovoli F, Foerster F, Worns MA, Cucchetti A, Bolondi L. The treatment of intermediate stage tumours beyond TACE: From surgery to systemic therapy. J Hepatol 2017;67:173-183.
6. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. NEngl J Med 2008;359:378-390.
7. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, Pracht M, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2017;389:56-66.
8. Inarrairaegui M, Melero I, Sangro B. Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma: Facts and Hopes. Clin Cancer Res 2018;24:1518-1524.
9. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2016;25:16-27.
10. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004;431:350-355.
11. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. Cancer Res 2010;70:7027-7030.
12. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov 2017;16:203-222.
13. Yu AM, Tian Y, Tu MJ, Ho PY, Jilek JL. MicroRNA Pharmacoepigenetics: Posttranscriptional Regulation Mechanisms behind Variable Drug Disposition and Strategy to Develop More Effective Therapy. Drug Metab Dispos 2016;44:308-319.
14. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer M

odel. Cell 2009;137:1005-1017.
15. Fu X, Rivera A, Tao L, De Geest B, Zhang X. Construction of an oncolytic herpes simplex virus that precisely targets hepatocellular carcinoma cells. Mol Ther 2012;20:339-346.
16. Sandbothe M, Buurman R, Reich N, Greiwe L, Vajen B, Gurlevik E, Schaffer V, et al. The microRNA-449 family inhibits TGF-beta-mediated liver cancer cell migration by targeting SOX4. J Hepatol 2017;66:1012-1021.
17. Wu H, Tao J, Li X, Zhang T, Zhao L, Wang Y, Zhang L, et al. MicroRNA-206 prevents the pathogenesis of hepatocellular carcinoma by modulating expression of met proto-oncogene and cyclin-dependent kinase 6 in mice. Hepatology 2017;66:1952-1967.
18. Zhang J, Yang Y, Yang T, Yuan S, Wang R, Pan Z, Yang Y, et al. Double-negative feedback loop between microRNA-422a and forkhead box (FOX) G1/Q1/E1 regulates hepatocellular carcinoma tumor growth and metastasis. Hepatology 2015;61:561-573.
19. Lu Y, Yue X, Cui Y, Zhang J, Wang K. MicroRNA-124 suppresses growth of human hepatocellular carcinoma by targeting STAT3. Biochem Biophys Res Commun 2013;441:873-879.
20. Chen QX, Wang WP, Zeng S, Urayama S, Yu AM. A general approach to high-yield biosynthesis of chimeric RNAs bearing various types of functional small RNAs for broad applications. Nucleic Acids Res 2015;43:3857-3869.
21. Ho PY, Duan Z, Batra N, Jilek JL, Tu MJ, Qiu JX, Hu Z, et al. Bioengineered ncRNAs selectively change cellular miRNome profiles for cancer therapy. J Pharmacol Exp Ther 2018.
22. Ho PY, Yu AM. Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics. Wiley Interdisciplinary Reviews:RNA 2016;7:186-197.
23. Wang WP, Ho PY, Chen QX, Addepalli B, Limbach PA, Li MM, Wu WJ, et al. Bioengineering Novel Chimeric microRNA-34a for Prodrug Cancer Therapy:High-Yield Expression and Purification, and Structural and Functional Characterization. Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics 2015;354:131-141.
24. Jian C, Tu MJ, Ho PY, Duan Z, Zhang Q, Qiu J

X, DeVere White RW, et al. Co-targeting of DNA, RNA, and protein molecules provides optimal outcomes for treating osteosarcoma and pulmonary metastasis in spontaneous and experimental metastasis mouse models. Oncotarget 2017;8:30742-30755.
25. Li PC, Tu MJ, Ho PY, Jilek JL, Duan Z, Zhang QY, Yu AX, et al. Bioengineered NRF2-siRNA Is Effective to Interfere with NRF2 Pathways and Improve Chemosensitivity of Human Cancer Cells. Drug Metab Dispos 2018;46:2-10.
26. Zhao Y, Tu MJ, Yu YF, Wang WP, Chen QX, Qiu JX, Yu AX, et al. Combination therapy with bioengineered miR-34a prodrug and doxorubicin synergistically suppresses osteosarcoma growth. Biochem Pharmacol 2015;98:602-613.
27. Lv HT, Zhang SB, Wang B, Cui SH, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. Journal Of Controlled Release 2006;114:100-109.
28. Rezaee M, Oskuee RK, Nassirli H, Malaekeh-Nikouei B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. Journal Of Controlled Release 2016;236:1-14.
29. Ewe A, Panchal O, Pinnapireddy SR, Bakowsky U, Przybylski S, Temme A, Aigner A. Liposome-polyethylenimine complexes (DPPC-PEI lipopolyplexes) for therapeutic siRNA delivery in vivo. Nanomedicine 2017;13:209-218.
30. Schafer J, Hobel S, Bakowsky U, Aigner A. Liposome-polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery. Biomaterials 2010;31:6892-6900.
31. Ewe A, Schaper A, Barnert S, Schubert R, Temme A, Bakowsky U, Aigner A. Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. Acta biomaterialia 2014;10:2663-2673.
32. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. Journal of hepatology 2010;52:698-704.
33. Nam Y, Chen C, Gregory RI, Chou JJ, Sliz P. Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28. Cell 2011;147:1080-1

091.
34. Robbins M, Judge A, MacLachlan I. siRNA and innate immunity. Oligonucleotides 2009;19:89-102.
35. Yu H, Wang Z, Sun G, Yu Y. Recognition of nucleic acid ligands by toll-like receptors 7/8: importance of chemical modification. Curr Med Chem 2012;19:1365-1377.
36. Bramsen JB, Kjems J. Development of Therapeutic-Grade Small Interfering RNAs by Chemical Engineering. Front Genet 2012;3:154.
37. Li M-M, Addepalli B, Tu M-J, Chen Q-X, Wang W-P, Limbach PA, LaSalle JM, et al. Chimeric microRNA-1291 biosynthesized efficiently in Escherichia coli is effective to reduce target gene expression in human carcinoma cells and improve chemosensitivity. Drug Metabolism and Disposition 2015;43:1129-1136.
38. Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, Kodama T, Aburatani H. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. Gene 2006;384:51-61.
39. McDaniel K, Hall C, Sato K, Lairmore T, Marzioni M, Glaser S, Meng F, et al. Lin28 and let-7: roles and regulation in liver diseases. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2016;310:G757-765.
40. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 2007;318:1917-1920.
41. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature 2000;403:901-906.
42. Viswanathan SR, Daley GQ. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. Cell 2010;140:445-449.
43. Tian N, Han Z, Li Z, Zhou M, Fan C. Lin28/let-7/Bcl-xL pathway: the underlying mechanism of drug resistance in Hep3B cells. Oncol Rep 2014;32:1050-1056.
44. Xue HY, Guo PB, Wen WC, Wong HL. Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery. Current Pharmaceutical Design 2015;21:3140-3147.

４５．Ｓｕｌｌｅｎｇｅｒ ＢＡ，Ｎａｉｒ Ｓ．Ｆｒｏｍ ｔｈｅ ＲＮＡ ｗｏｒｌｄ ｔｏ ｔｈｅ ｃｌｉｎｉｃ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１６；３５２：１４１７－１４２０．
４６．Ｋｉｍ ＨＪ，Ｋｉｍ Ａ，Ｍｉｙａｔａ Ｋ，Ｋａｔａｏｋａ Ｋ．Ｒｅｃｅｎｔ ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｖｅｈｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｔｈｅｒａｐｙ．Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ２０１６；１０４：６１－７７．
４７．Ｘｉａ Ｙ，Ｔｉａｎ Ｊ，Ｃｈｅｎ Ｘ．Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｓｕｒｆａｃｅ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｎ ｌｉｐｏｓｏｍａｌ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１６；７９：５６－６８．
４８．Ｄｕｔｔａ Ｓ，Ｓｅｎｇｕｐｔａ Ｐ．Ｍｅｎ ａｎｄ ｍｉｃｅ：Ｒｅｌａｔｉｎｇ ｔｈｅｉｒ ａｇｅｓ．Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ２０１６；１５２：２４４－２４８．
４９．Ｃａｒｒ ＢＩ，Ｇｕｅｒｒａ Ｖ，Ｇｉａｎｎｉｎｉ ＥＧ，Ｆａｒｉｎａｔｉ Ｆ，Ｃｉｃｃａｒｅｓｅ Ｆ，Ｒａｐａｃｃｉｎｉ ＧＬ，Ｄｉ Ｍａｒｃｏ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｏｆ ａｂｎｏｒｍａｌ ｐｌａｓｍａ ｂｉｌｉｒｕｂｉｎ ｗｉｔｈ ａｇｇｒｅｓｓｉｖｅ ｈｅｐａｔｏｃｅｌｌｕｌａｒ ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ．Ｉｎ：Ｓｅｍｉｎａｒｓ ｉｎ ｏｎｃｏｌｏｇｙ；２０１４：Ｅｌｓｅｖｉｅｒ；２０１４．ｐ．２５２－２５８．

【０２５８】

実施例３

膵臓がん細胞および患者由来異種移植片マウスモデルにおける、生物工学ｍｉＲＮＡ－１２９１プロドラッグ療法

要約

目的：本発明者らの最近の研究では、マイクロＲＮＡ－１２９１（ｍｉＲ－１２９１）が膵臓がん（ＰＣ）試料で下方制御され、ｍｉＲ－１２９１の回復がＰＣ細胞の腫瘍形成を阻害することが明らかになった。本発明者らはまた、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグを生物工学によって作製した。本研究は、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグの単剤療法および化学療法との併用療法の有効性を評価するためのものである。

【０２５９】

実験計画：薬物治療に対するＰＣ細胞の感受性はＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏアッセイによって決定した。薬物作用のメカニズムは、特定のマーカーまたは標的をモニタリングすることによって検証した。ＰＡＮＣ－１および患者由来の異種移植片（ＰＤＸ）マウスモデルが、ｍｉＲ－１２９１単剤療法、ならびにゲムシタビンおよびｎａｂ－パクリタキセル（Ｇｅｍ－ｎＰ）との併用療法の抗腫瘍効果を定義するために確立された。ＰＣ治療用のｍｉＲ－１２９１ベースの治療戦略を探求するため、Ｓｅｐｈａｄｅｘアプタマータグ付きメチオニル－ｔＲＮＡ（ＭＳＡ）足場を使用することにより、細菌で大量のプレｍｉＲ－１２９１（またはｍｉｒ－１２９１）を産生する新規アプローチを首尾よく確立した（２３）。さらなる研究により、キメラＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１あるいは「ｍｉＲ－１２９１プロドラッグ」がヒト細胞で成熟ｍｉＲ－１２９１に正確にプロセシングされ、その後、標的タンパク質の発現が調節され、ＰＣ細胞の増殖が抑制されることが示された（２３）。生細胞で産生された生物工学によるｍｉＲＮＡ剤が、化学合成または酵素反応によって試験管で作製された従来のｍｉＲＮＡ剤と区別されることは注目に値する（２４）。最も重要なことは、異なるメーカー／供給業者の合成ＲＮＡ剤またはオリゴヌクレオチドは、修飾の種類、位置、および程度が大きく異なり、「同じ配列」を有すると考えられてはいるものの、文字通り異なる分子であり、必然的に異なる２次構造およびより高次の構造ならびに生物活性を有する。したがって、本発明者らの生物製剤ｍｉＲＮＡ剤は、生細胞内で折りたたまれ耐容性があるという事実を考えると、細胞ＲＮＡ分子の天然の特性をよりよく捉えることができる（２４）。

【０２６０】

結果：ＡＲＩＤ３ＢがｍｉＲ－１２９１の新規な標的として検証され、生物工学によるｍｉＲ－１２９１プロドラッグは、ＰＣ細胞で成熟ｍｉＲ－１２９１へと選択的にプロセ

シングされ、意外にもＡＲＩＤ３ＢのｍＲＮＡおよびタンパク質のレベルを上方制御した。ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの同時投与は、ｍｉＲ－１２９１またはＧｅｍ－ｎＰ単独と比較して、ＰＣ細胞のアポトーシス（切断カスパーゼ－３／７）、ＤＮＡ損傷（γＨ２Ａ．Ｘ）および有糸分裂停止（Ｈ３ＰＳ１０）のレベルを大幅に増加させた。結果として、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグは、Ｇｅｍ－ｎＰに対するＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞の感受性を向上させた。さらに、インビボ－ｊｅｔＰＥＩで製剤化されたｍｉＲ－１２９１プロドラッグの全身投与は、ＰＡＮＣ－１異種移植片と３つのＰＤＸマウスモデルの両方でＧｅｍ－ｎＰ単独と同等の程度に腫瘍増殖を抑制したが、併用療法は腫瘍増殖を全モデルにおいて単剤療法よりも遍在的にかつ最大に（７０～９０％）抑制した。すべての治療は、インビボのマウスにおいて良好な耐容性であった。

【０２６１】

結論：生物製剤ｍｉＲ－１２９１プロドラッグは、ＰＣのための単剤療法としての、また化学療法に対する感作剤としての治療的可能性を有する。

【０２６２】

材料および方法

材料。ＲＰＭＩ１６４０培地、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、トリプシン、リポフェクタミン３０００、およびＴｒｉｚｏｌ試薬は、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（カリフォルニア州カールスバッド）から購入した。ゲムシタビン塩酸塩はＬＣラボラトリーズ（マサチューセッツ州ウォーバーン）から購入した。ＲＩＰＡ溶解緩衝液および完全なプロテアーゼ阻害剤カクテルは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（ミズーリ州セントルイス）から購入した。ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔは、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（イリノイ州ロックフォード）から購入した。γＨ２Ａ．Ｘ、切断カスパーゼ－３、および切断カスパーゼ－７に対する一次抗体は、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（マサチューセッツ州ダンバース）から購入し、ＡＲＩＤ３ＢおよびＨ３ＰＳ１０に対する抗体は、Ａｂｃａｍ（マサチューセッツ州ケンブリッジ）から購入し、β－アクチンに対する抗体は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（ミズーリ州セントルイス）から入手した。西洋ワサビペルオキシダーゼヤギ抗ウサギおよびマウス二次抗体は、それぞれＪａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ－Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ペンシルベニア州ウェストグローブ）およびＣｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（マサチューセッツ州ダンバース）から提供された。ＥＣＬ基質およびＰＶＤＦ膜は、Ｂｉｏ－Ｒａｄ（カリフォルニア州ハーキュリーズ）から入手した。他のすべての試薬は商業的供給元から購入し、分析グレードのものであった。

【０２６３】

生物製剤ｍｉＲ－１２９１プロドラッグ（ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１）および対照ＲＮＡＭＳＡの生産。組換えＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１および対照ｔＲＮＡ ＭＳＡの発現は、最近記載されたように実施され（２３、２５）、精製は改良された陰イオン交換高速タンパク質液体クロマトグラフ（ＦＰＬＣ）法をもちいて実施された（２６）。簡単に説明すると、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１およびＭＳＡを発現するプラスミドをそれぞれＨＳＴ０８ Ｅ．ｃｏｌｉコンピテント細胞に形質転換した。全細菌ＲＮＡからの標的ＲＮＡの分離は、ＮＧＣ ＱＵＥＳＴ １０ＰＬＵＳ ＦＰＬＣシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して、Ｅｎｒｉｃｈ－Ｑ１０ｘ１００カラムで行い、これは、最初に緩衝液Ａ（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）で２．５ｍｌ／分の一定流速で４．４分間平衡化し、その後、６４％緩衝液Ｂ（緩衝液Ａ＋１ Ｍ塩化ナトリウム、ｐＨ７．０）で１０分間、６４～７８％緩衝液Ｂで８分間、その後、１００％緩衝液Ｂで３分間、勾配溶出したＦＰＬＣトレースは、ＵＶ／Ｖｉｓ検出器を使用して２６０／２８０ｎｍでモニタリングした。尿素－ＰＡＧＥ分析による標的ＲＮＡの確認後、画分をプールし、エタノールで沈殿させ、脱塩し、Ａｍｉｃｏｎ ｕｌｔｒａ－2mL ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ ｆｉｌｔｅｒ（３０ｋＤａ、ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、マサチューセッツ州ビレリカ）を使用してヌクレアーゼフリー水に濃縮／溶解した。ＲＮＡの純度は、高速液体クロマトグラフィー（

ＨＰＬＣ）アッセイ（２５）によって検証され、９７％超の純度の組換えＲＮＡを本研究で使用した。

【０２６４】

プラスミド構築およびルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ。予測されるｈｓａ－ｍｉＲ－１２９１応答エレメント（ＭＲＥ、図２７Ａ）を含むヒトＡＲＩＤ３Ｂの３’ＵＴＲセグメント（終止コドンから０～９７２ｂｐ）は、下記プライマーを使用したＰＣＲによってヒトゲノムから増幅した。順方向：５’－ＣＣＧ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＧＴＣ　ＣＧＴ　ＣＴＧ　ＴＣＣ　ＡＧＧ　ＣＴＣ　ＣＡＴ　ＴＣＡ　ＧＧＴ　ＣＣＴ　ＧＣＴ　Ｇ－３’（配列番号５７５）、逆方向：５’－ＴＴＧ　ＣＧＧ　ＣＣＧ　ＣＧＧ　ＧＧＣ　ＣＧＧ　ＧＴＴ　ＡＣＣ　ＣＡＡ　ＴＣＡ　ＣＴＴ　ＧＣＴ　ＴＧＧ　ＣＴＴ　Ｔ－３’（配列番号５７６）。次に、ＸｈｏＩおよびＮｏｔＩ制限部位でｐｓｉＣＨＥＣＫ－ＩＩベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン）内のレニラルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入された。配列はＤＮＡ配列決定によって確認された。

【０２６５】

ルシフェラーゼレポーターアッセイは、以前に報告されたように実施した（２７）。簡単に説明すると、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００を使用して、ＨＥＫ－２９３細胞およびＡｓＰＣ－１細胞を、ＡＲＩＤ３Ｂ－３’ＵＴＲルシフェラーゼレポータープラスミド（ｐｓｉＣＨＥＣＫ－ＡＲＩＤ３Ｂ－３’ＵＴＲ）またはｐｓｉＣＨＥＣＫ空ベクター（０．１μｇ）と、ＭＳＡもしくはＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（０、５、２０ｎＭ）、またはｍｉＲ－１２９１発現プラスミドもしくは対照ベクター（２０）、またはｍｉＲ－１２９１アンタゴミルもしくは対照オリゴとで同時トランスフェクションした。トランスフェクションの４８時間後、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）Ｍ３ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ、カリフォルニア州サニーベール）を使用して、Ｄｕａｌ－Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｒｅｐｏｒｔｅｒ　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン）によりルシフェラーゼ活性を測定した。レニラルシフェラーゼの活性をホタルルシフェラーゼに正規化した後、対応する対照のパーセンテージとして計算した。

【０２６６】

細胞培養および処置。ＡｓＰＣ－１、ＰＡＮＣ－１、およびＨＥＫ２９３細胞は、ＡＴＣＣから入手し、１０％ウシ胎児血清（ＧＩＢＩＣＯ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、および１００ｍｇ／ｍｌストレプトマイシンを含むＲＰＭＩまたはＤＭＥＭ培地で、３７℃、加湿インキュベーター内の５％ＣＯ２で維持した。細胞生存率アッセイでは、細胞を９６ウェルプレートに５，０００細胞／ウェルの密度で播種し、一晩インキュベーションした後、種々の濃度のゲムシタビン（Ｇｅｍ、０～１０μＭ）とｎａｂ－パクリタキセル（固定比Ｇｅｍ／ｎＰ＝８／１）の存在下で、ＭＳＡまたはＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（ＡｓＰＣ－１細胞では１ｎＭ、ＰＡＮＣ－１細胞では５ｎＭ）でトランスフェクトした。４８時間後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）発光細胞生存率アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン）によって細胞の生存率を測定した。薬力学的パラメーターは、可変勾配、Ｙ＝底値＋（最上値－底値）／（１＋１０＾（（ＬｏｇＩＣ５０－Ｘ）＊ヒルスロープ））の阻害性用量反応モデルにデータを適合させることによって概算した。

【０２６７】

ＲＮＡ単離および逆転写定量的リアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）。２４ウェルプレートに播種したＰＡＮＣ－１またはＡｓＰＣ－１細胞に、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００を使用して、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１、対照ＭＳＡ、またはビヒクルをトランスフェクトした。Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ　ＲＮＡ　ＭｉｎｉＰｒｅｐ　ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、カリフォルニア州アーバイン）を使用してトランスフェクションの４８時間後および７２時間後に全ＲＮＡを抽出し、ＮｘＧｅｎ　Ｍ－ＭｕＬＶ逆転写酵素（Ｌｕｃｉｇｅｎ、ウィスコンシン州ミドルトン）で逆転写した。ＲＴ－ｑＰＣＲは、成熟ｍｉＲ－１２９１用のＴａｑＭａｎ　ｓｍａｌｌ　ＲＮＡ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｔｈｅｒ

ｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、またはＵ６用の遺伝子特異的プライマー（順方向５’－ＣＴＣ ＧＣＴ ＴＣＧ ＧＣＡ ＧＣＡ ＣＡ－３’（配列番号５２８）、逆方向５’－ＡＡＣ ＧＣＴ ＴＣＡ ＣＧＡ ＡＴＴ ＴＧＣ ＧＴ－３’（配列番号５２９）、ｍｉＲ－１２９１の内部標準）、ＡＲＩＤ３Ｂ（順方向５’－ＧＴＧ ＧＣＡ ＣＣＣ ＡＴＧ ＴＣＣ ＡＡＴ ＣＴＡ－３’（配列番号５７９）、逆方向ＡＧＧ ＡＴＣ ＡＣＣ ＧＴＣ ＣＡＧ ＴＴＣ ＡＴＡ－３’（配列番号５８０））、およびＧＡＰＤＨ（順方向：５’－ＡＴＣ ＡＣＣ ＡＴＣ ＴＴＣ ＣＡＧ ＧＡＧ ＣＧＡ－３’（配列番号５８１）、逆方向：５’－ＧＣＴ ＴＣＡ ＣＣＡ ＣＣＴ ＴＣＴ ＴＧＡ ＴＧＴ－３’（配列番号５８２）、ＡＲＩＤ３Ｂの内部標準）を使用して、ＣＦＸ９６ ＴｏｕｃｈリアルタイムＰＣＲシステム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）で実行した。標的遺伝子の相対的発現は、式２－ΔΔＣｔを用いる比較閾値サイクル（Ｃｔ）法を使用して産出した。

タンパク質の単離および免疫ブロット分析。ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞を、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（ＰＡＮＣ－１細胞では１０または２０ｎＭ、ＡｓＰＣ－１細胞では３または５ｎＭ）、Ｇｅｍ－ｎＰ（ＰＡＮＣ－１細胞では１６０ｎＭ～２０ｎＭ、ＡｓＰＣ－１細胞の場合は１００ｎＭ～１２．５ｎＭ）、またはＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの組み合わせで処理した。４８時間または７２時間後に細胞を回収し、ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｃｏｃｋｔａｉｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ミズーリ州セントルイス）を添加したＲＩＰＡ緩衝液で溶解し、そのタンパク質濃度をＢＣＡ ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、イリノイ州ロックフォード）で測定した。タンパク質（３０μｇ／レーン）を１０％または１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで分離し、フッ化ポリビニリデン（ＰＶＤＦ）膜に転写した後、５％ミルクでブロッキングした。膜は、選択的抗ＡＲＩＤ３Ｂ（１：１５００、Ａｂｃａｍ）、抗γＨ２Ａ．Ｘ（１：１０００、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、抗切断カスパーゼ－７（１：１０００、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、抗ヒストンＨ３（ホスホＳ１０、１：１０００、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）または抗β－アクチン（１：５０００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）一次抗体とインキュベーションした後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ（１：１００００、Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｃ．、米国ペンシルベニア州ウェストグローブ）または抗マウス（１：３０００、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）ＩｇＧとインキュベーションした（表７）。３回洗浄した後、膜をＥＣＬ基質とインキュベーションし、続いてＣｈｅｍｉＤｏｃ ＭＰ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）で可視化および画像化した。タンパク質バンド強度は、Ｉｍａｇｅ Ｌａｂソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって定量化され、対応するサンプルのβ－アクチンレベルに対して正規化された。

【表７】

表７
ウエスタンブロットおよび免疫蛍光分析に使用される抗体。

抗体	製造	カタログ番号
ARID3B	Abcam	ab92328
γH2A.X	細胞シグナル伝達	2577
切断カスパーゼ-7	細胞シグナル伝達	9491
切断カスパーゼ-3	細胞シグナル伝達	9579
ヒストン H3 (ホスホ S10)	Abcam	ab5176
ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG	Jackson ImmunoReseach	111-035-003
抗マウス IgG、HRP 結合抗体	細胞シグナル伝達	7076
AlexaFluor (登録商標) 488 結合ヤギ抗ウサギ IgG	細胞シグナル伝達	4412

【０２６８】

免疫蛍光。細胞を８ウェルチャンバースライドにプレーティングし、付着のために一晩

インキュベーションした。次に、細胞を通常の培地（ブランク）、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１、Ｇｅｍ－ｎＰ、またはＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの組み合わせで処理した。４８時間のインキュベーション後、培地を除去し、細胞を４％パラホルムアルデヒドで固定し、透過処理して、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を添加した５％ＢＳＡでブロッキングした。次に、ブロッキングされた細胞を一次抗体、抗切断カスパーゼ－３、抗切断カスパーゼ－７、抗γＨ２Ａ．Ｘ、または抗Ｈ３ＰＳ１０とともに４℃で一晩インキュベーションした後、蛍光二次抗体、抗ウサギＩｇＧＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８　Ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（１：５００、＃４４１２、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）とインキュベーションした。ＤＡＰＩ（＃８９６１、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を細胞とインキュベーションして、核染色した。画像は、Ｚｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７１０　Ｓｃａｎｎｉｎｇ　Ｄｅｖｉｃｅ（Ｚｅｉｓｓ、ドイツ、オーバーコッヘン）に接続されたＺｅｉｓｓ　Ａｘｉｏ　Ｏｂｓｅｒｖｅｒ．ｚ１　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅを使用して取得した。

【０２６９】

動物。すべての動物実験は、カリフォルニア大学デービス校の施設内動物管理使用委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。５～６週齢の雌無胸腺ヌードマウス（ＮＵ／Ｊ）およびＮＯＤ．ＣＢ１７－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ／Ｊマウス（Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、メイン州バーハーバー）を使用して、ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルおよび膵臓がん患者由来の異種移植片（ＰＤＸ）マウスモデルをそれぞれ確立した。マウスは一定の温度および湿度で無菌ケージで飼育され、餌および水を自由に摂取させた。細胞／組織移植の前に、ケタミン（８０ｍｇ／ｋｇ）とキシラジン（７ｍｇ／ｋｇ）の組み合わせを含むＰＢＳの腹腔内注射によってマウスを麻酔した。

【０２７０】

ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデル。ＰＡＮＣ－１細胞をトリプシン処理し、ＰＢＳに再懸濁し、Ｍａｔｒｉｇｅｌ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カリフォルニア州サンノゼ）と１：１の比率（ｖ／ｖ）で混合した。１００μＬのＰＢＳ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ溶液中の細胞（７．５×10^6）を、ＰＡＮＣ－１異種移植腫瘍マウスモデルの作製のためにヌードマウスの左背下部領域に皮下注射した。

【０２７１】

膵臓がんＰＤＸマウスモデル。匿名の新鮮な外科的膵臓がん標本は、カリフォルニア大学デービス校のＣｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ　Ｂｉｏｒｅｐｏｓｉｔｏｒｙから入手した。術前に化学療法または放射線療法を受けた患者はいなかった。ＰＤＸマウスモデルは、若干の改変を加えて前述のように確立した（２８、２９）。簡単に説明すると、患者の腫瘍標本を、抗生物質を含むＲＰＭＩで２～３mm^3片に切り刻み、ＳＣＩＤマウス（Ｆ１）に皮下移植した。サイズが直径１ｃｍに達したら、ＰＤＸを採取し、２～３mm^3に切断し、４匹の新しいＳＣＩＤマウス（Ｆ２）に拡張させた。異なる患者に由来する３つのＰＤＸモデルであるＰＡ－０３８７、ＰＡ－０３７５、およびＰＡ－０３２７は、正常に移植され、その後、Ｐ３（ＰＡ－０３８７、ＰＡ－０３７５）およびＰ４（ＰＡ－０３２７）に継代され、これらは治療研究に使用された。

【０２７２】

治療研究。担がんマウスは、腫瘍サイズが７０～１２０mm^3に達したとき、５つの治療群（５～６マウス／群）に無作為に割り付けた。マウスに、緩衝液（群１）、ＭＳＡ（１０μｇ／マウス、群２）、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（１０μｇ／マウス、群３）、Ｇｅｍ（３００μｇ／マウス）とｎＰ（４０μｇ／マウス）（群４）、またはＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（１０μｇ／マウス）およびＧｅｍ（３００μｇ／マウス）とｎＰ（４０μｇ／マウス）の組み合わせ（群５）を３日ごとに１０回静脈内投与した。個々の動物の体重および腫瘍サイズを週に１～２回モニタリングした。腫瘍サイズは次の式により算出した。Ｖ＝０．５×長さ×$幅^2$。最初の治療から２９日目に動物をと殺し、組織学的分析のために腫瘍を解剖し、１０％ホルマリンで固定した。血清サンプルも血液化学分析用に調製した。

【０２７３】
免疫組織化学。腫瘍組織の組織学的特性ならびにカスパーゼ－３およびＫｉ－６７の発現は、以前に報告されたように、それぞれＨ＆Ｅ染色および免疫組織化学アッセイによって決定された（１８、３０）。手短に言えば、固定した腫瘍組織をパラフィンで包埋した。パラフィンスライドを抗切断カスパーゼ－３、抗Ｋｉ－６７抗体、またはヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色した後、Ｏｌｙｍｐｕｓカメラ（ＤＰ２５）およびＣｅｌｌＳｅｎｓソフトウェア（オリンパス、ペンシルベニア州センターバレー）を使用して写真撮影した。
【０２７４】
血液化学プロファイル。血液化学プロファイルは、カリフォルニア大学デービス校の比較病理学研究所で決定された。
【０２７５】
統計分析。値は、平均±標準偏差（ＳＤ）である。群および変数の数に応じて、スチューデントｔ検定、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用した一元配置分散分析または二元配置分散分析によってデータを分析した。Ｐ値が０．０５未満（Ｐ＜０．０５）の場合、差異は有意であると見なされた。
【０２７６】
結果
ＡＲＩＤ３Ｂは、ｍｉＲ－１２９１の直接標的である。本発明者らの最近の研究は、ｍｉＲ－１２９１がＰＣ細胞の増殖および腫瘍形成を抑制することを示した（１８）。ｍｉＲ－１２９１がＰＣ細胞の成長を制御する分子メカニズムをさらに詳しく説明するために、コンピューター分析を行ってｍｉＲ－１２９１の標的候補を予測した。一連の推定標的の中で、ＤＮＡ結合タンパク質ＡＲＩＤ３Ｂは、その３’ＵＴＲ内のｍｉＲ－１２９１の４つのｍｉＲＮＡ応答エレメント（ＭＲＥ）からなる最有力候補であった（図２７Ａ）。したがって、ｍｉＲ－１２９１とＡＲＩＤ３Ｂ　３’ＵＴＲの間の相互作用を評価するために、ＡＲＩＤ３Ｂ　３’ＵＴＲルシフェラーゼレポータープラスミドを構築した。驚くべきことに、生物工学によるｍｉＲ－１２９１による処理は、対照と比較して、ＡｓＰＣ－１（図２７Ｂ）およびＨＥＫ２９３細胞におけるＡＲＩＤ３Ｂ－３’ＵＴＲ－ルシフェラーゼレポーター活性を有意に増加させた。ｍｉＲ－１２９１を発現するプラスミドを用いる細胞へのｍｉＲ－１２９１の導入は、同じ結果を示した一方（図２８Ａ）、ｍｉＲ－１２９１アンタゴミルで処理した細胞ではＡＲＩＤ３Ｂ－３’ＵＴＲ－ルシフェラーゼレポーター活性は減少した（図２８Ｂ）。ｍｉＲ－１２９１の発現／機能に干渉するために異なるツールを使用するこれらの実験は一貫しており、結果は、ｍｉＲ－１２９１がＡＲＩＤ３Ｂ　３’ＵＴＲを標的とし、ＡＲＩＤ３Ｂの発現を正に調節し得ることを示唆している。
【０２７７】
ＭｉＲ－１２９１は、ＰＣ細胞におけるＡＲＩＤ３ＢのｍＲＮＡおよびタンパク質のレベルを上方制御する。ＡＲＩＤ３Ｂの発現に及ぼすｍｉＲ－１２９１の効果を定義するために、まず、ＴａｑＭａｎステムループＲＴ－ｑＰＣＲアッセイキットを使用してＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞における生物工学によるＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１プロドラッグからの高レベルの成熟ｍｉＲ－１２９１の産生を検証した。（図２７Ｃ）。次に、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１と対照ＭＳＡで処理したＰＣ細胞のＡＲＩＤ３Ｂ　ｍＲＮＡレベルを比較した。ビヒクル対照治療と比較して、ＭＳＡはＡＲＩＤ３Ｂ　ｍＲＮＡレベルを変化させなかった。ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（２０ｎＭ）による処置は、処置後４８時間および７２時間で、ＭＳＡまたはビヒクル対照と比較して、ＰＡＮＣ－１細胞のＡＲＩＤ３Ｂ　ｍＲＮＡレベルをそれぞれ１．２倍および１．４倍増加させた。（図２７Ｄ）。同様に、ＭＳＡ／ｍｉｒ－１２９１（５ｎＭ）は、処理後４８時間および７２時間で、ＡｓＰＣ－１細胞のＡＲＩＤ３Ｂ　ｍＲＮＡレベルをそれぞれ４．７倍および３．２倍の上方制御した（図２７Ｄ）。
【０２７８】
さらに、ＰＣ細胞のＡＲＩＤ３Ｂタンパク質レベルに及ぼすｍｉＲ－１２９１の影響を

調べるためにウエスタンブロットを実施した。他の研究者によって他のタイプのヒトがん細胞株で見出されたように（３１）、ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１の両細胞で、全長ＡＲＩＤ３Ｂ（ＡＲＩＤ３Ｂ－Ｆ１、約６１ｋＤ）および短形ＡＲＩＤ３Ｂ（ＡＲＩＤ３Ｂ－ｓｈ、約２８ｋＤ）とそれぞれ表される２つの異なるＡＲＩＤ３Ｂバンドを観察した（図２７Ｅ）。本発明者らのデータは、２０ｎＭ ｍｉＲ－１２９１プロドラッグによるトランスフェクションの７２時間後に、ＡＲＩＤ３Ｂ－ＦＬタンパク質レベルがＰＡＮＣ－１細胞で約５０％増加したことを示した。５ｎＭ ｍｉＲ－１２９１による処理後４８時間（８０％）および７２時間（２００％）の両方で、ＡｓＰＣ－１細胞でＡＲＩＤ３Ｂ－ＦＬタンパク質レベルの高度な増加が見られた。興味深いことに、ＡＲＩＤ３Ｂ－Ｓｈタンパク質レベルに及ぼすｍｉＲ－１２９１の影響は、ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１の両細胞でＡＲＩＤ３Ｂ－Ｆ１と同じパターンに従うように見えた（図２７Ｅ）。これらの結果は、ｍｉＲ－１２９１がＰＣ細胞におけるＡＲＩＤ３Ｂの発現を上方制御することを示している。

【０２７９】

ＤＮＡ損傷、有糸分裂停止、およびアポトーシスに及ぼすｍｉＲ－１２９１プロドラッグおよびＧｅｍ－ｎＰの個別作用および複合作用。歴史的に、単剤はＰＣの治療に対して非常に限られた効果しか発揮しなかった。したがって、ｍｉＲ－１２９１単剤療法を評価し、それをＰＣの１次化学療法であるＧｅｍ－ｎＰと比較しながら、併用効果を調べることを目的とした（図２９Ａ）。対応する標的またはマーカータンパク質に及ぼすｍｉＲ－１２９１プロドラッグ（ＰＡＮＣ－１細胞で１０ｎＭ、ＡｓＰＣ－１細胞で３ｎＭ）およびＧｅｍ－ｎＰの個別作用および複合作用を、ウエスタンブロットによりＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞で最初に調査した（図２９Ｂ－Ｃ）。本発明者らのデータは、Ｇｅｍ－ｎＰの同時投与は、ＰＡＮＣ－１細胞におけるＡＲＩＤ３Ｂのｍｉ Ｒ－１２９１に制御された上方制御を変化させなかったが、ＡｓＰＣ－１細胞における効果を増強したことを示し、２つの細胞株の異なる感受性を再び示唆した。免疫ブロット（図２９Ｂ～Ｃ）および免疫蛍光検査をさらに実施して、ＤＮＡ損傷（γ－Ｈ２Ａ．Ｘ染色点）、アポトーシス（切断カスパーゼ－３／７）および有糸分裂停止（Ｈ３ＰＳ１０）に及ぼす単剤および併用薬物の効果を決定した（図２９Ｄ～Ｆ、図３０、図３１）。結果は、ＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１の両細胞株におけるアポトーシス（カスパーゼ－３／７）の誘導に加えて、驚くべきことに、ｍｉＲ－１２９１単独で明らかなＤＮＡ損傷（γ－Ｈ２Ａ．Ｘ染色点の形成）をＡｓＰＣ－１細胞で誘発したことを示した。一方、Ｇｅｍ－ｎＰは、γ－Ｈ２Ａ．ＸおよびＨ３ＰＳ１０の上方制御によってそれぞれ明らかにされるように、両ＰＣ細胞株でＤＮＡ損傷および有糸分裂停止を主に引き起こした。最も重要なことは、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグおよびＧｅｍ－ｎＰの併用療法が、ＰＡＮＣ－１細胞とＡｓＰＣ－１の両細胞で最大程度のＤＮＡ損傷、有糸分裂、アポトーシスを引き起こし、これは、γＨ２Ａ．Ｘ、Ｈ３ＰＳ１０、および切断カスパーゼ－３／７（Ｃ－カスパーゼ－３／７）によってそれぞれ示された。これらの結果は、ｍｉＲ－１２９１がアポトーシスおよびおそらくＤＮＡ損傷を誘発することを示しており、ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用療法が最適な結果をもたらし得ることを示唆している。

【０２８０】

生物工学によるｍｉＲ－１２９１プロドラッグは、化学療法薬に対するＰＣ細胞の感受性を高める。ｍｉＲ－１２９１プロドラッグがＧｅｍ－ｎＰに対する膵臓がん細胞の感受性を高めることができるか否かを評価するために、ｍｉｒ－１２９１プロドラッグまたは対照ＭＳＡの存在下でのＧｅｍ－ｎＰの抗増殖活性をＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞でＣｅｌｌｔｉｔｅｒ－Ｇｌｏアッセイにより評価した。結果は、ｍｉＲ－１２９１で処理されたＰＡＮＣ－１およびＡｓＰＣ－１細胞が、ＭＳＡで処理された細胞と比較してＧｅｍ－ｎＰに対してはるかに感受性が高いことを示した（図３２）。感度の向上は、ＭＳＡ処理細胞（５２．３±２０．３ｎＭ、＊Ｐ＜０．０５）よりもｍｉＲ－１２９１処理ＰＡＮＣ－１細胞（１５５±３３ｎＭ）のＥＣ５０値が低いことによっても明らかになった。さらに、ｍｉＲ－１２９１をトランスフェクトしたＡｓＰＣ－１細胞も、ＭＳＡ処理

細胞（１４．６±５．５ｎＭ、＊＊Ｐ＜０．０１）よりも有意に低いＥＣ５０値（４０．４±１．８ｎＭ）を示した（図３２Ｅ）。これらの結果は、ｍｉＲ－の同時投与がＰＣ細胞を化学療法に感作できることを示している。

【０２８１】

生物工学によるｍｉＲ－１２９１プロドラッグの単剤療法およびＧｅｍ－ｎＰとの併用療法は、ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルの腫瘍増殖を制御するのに効果的である一方、マウスでの耐容性は良好である。インビボでの生物工学ｍｉＲ－１２９１プロドラッグの単剤療法およびＧｅｍ－ｎＰとの併用療法の抗腫瘍効果を決定するために、本発明者らは最初にＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルを確立した（図３３Ａ）。薬物投与の２４時間後の高レベルの腫瘍ｍｉＲ－１２９１によって示されるように、インビボ－ｊｅｔＰＥＩ製剤化ｍｉＲ－１２９１プロドラッグの単回投与の全身投与は、ＰＡＮＣ－１異種移植腫瘍組織に分布可能であった（図３３Ａ）。緩衝液またはＭＳＡの処理と比較して、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグ単独では、Ｇｅｍ－ｎＰと同程度に、ＰＡＮＣ－１腫瘍増殖が著しく抑制されたが、ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用治療は腫瘍増殖を最大限に阻害した（図３３Ｂ）。解剖された腫瘍の目視検査および重量（図３３Ｃ～Ｄ）は、併用療法について顕著に最適な腫瘍抑制効果をさらに示した。興味深いことに、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグ処置群の最終腫瘍のサイズは比較的変動し、５０％は反応性が高く、５０％は反応性が低かった（図３３Ｃ）。対照的に、併用療法によってすべての腫瘍が遍在的に同様のサイズに縮小された。これらの結果は、ＰＡＮＣ－１異種移植腫瘍の進行の制御におけるｍｉＲ－１２９１プロドラッグ単剤療法の有効性、およびｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用療法の最適な結果を示している。

【０２８２】

動物の体重は異なる群間で有意差を示さなかったため、すべての処置はマウスで耐容性が良好であった（図３３Ｅ）。薬物治療の安全性をさらに調べるために、血液生化学プロファイルが決定された（図３３Ｆ）。アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、総ビリルビン、血中尿素窒素（ＢＵＮ）、およびクレアチニンを含む肝臓および腎臓の機能の全マーカーは、２匹のマウスのＡＬＴレベルを除いて、正常範囲内であった。ここで、ｍｉＲ－１２９１単剤療法の１匹およびＧｅｍ－ｎＰ治療群の１匹は、正常範囲をわずかに超えた。しかし、どの治療群間でも各血液バイオマーカーに有意差はなく、処置が肝臓または腎臓の毒性を引き起こさなかったことを示唆している。まとめると、結果は、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグまたはＧｅｍ－ｎＰの単独の治療用量、または組み合わせの全身投与が、ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルにおいて耐容性が良好であることを示している。

【０２８３】

３つの異なるＰＤＸマウスモデルにおける生物製剤ｍｉＲ－１２９１プロドラッグ治療単独およびＧｅｍ－ｎＰ化学療法との併用の有効性。がん細胞株に由来する異種移植片モデルと比較して、ＰＤＸ腫瘍モデルは、元の腫瘍の非均一性性および組織学的特徴をよりよく保ち、したがって、ヒトの疾患に対してより高い例示精度および忠実度を提供し得る（３２～３４）。したがって、臨床ＰＣサンプルから３つのＰＤＸモデルを確立し、それらを使用してｍｉＲ－１２９１プロドラッグ療法をさらに評価した。最初のＰＤＸモデル（ＰＡ－０３８７、図３４）は、ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルで使用されたものと同じ投与計画にかけられた。同様に、単一用量のｍｉＲ－１２９１プロドラッグを全身投与した２４時間後に、ＲＴ－ｑＰＣＲ分析により、ＰＤＸ組織で高レベルのｍｉＲ－１２９１が確認された（図３５Ｂ）。治療データは、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグまたはＧｅｍ－ｎＰ単独での処置が、緩衝液またはＭＳＡ対照と比較して、ＰＤＸＰＡ－０３８７腫瘍増殖を有意に減少させたことを示し、併用治療は最高度の阻害を示した（図３４Ａ）。同様に、解剖された腫瘍の目視検査（図３４Ｂ）および最終腫瘍重量の調査（図３４Ｃ）により、ＰＤＸＰＡ－０３８７の制御におけるｍｉＲ－１２９１プロドラッグ単独、Ｇｅｍ－ｎＰ単独、およびそれらの組み合わせの有効性が裏付けられた一方、単剤療法と併用療法の間に統計的差異はなかった。Ｈ＆Ｅ染色はさらに、ＰＤＸが実際に臨床膵臓腺が

んに近い組織学的表現型の特徴を示したことを証明した（図３６）。さらに、免疫組織化学研究は、異なる治療群間で細胞増殖（Ｋｉ－６７染色）に差異がないことを示したが、併用治療群の腫瘍は最高レベルのアポトーシス（切断カスパーゼ－３）を示し（図３４Ｄ）、それらの抗腫瘍活性の背後にある主要なメカニズムとしてのアポトーシスの誘導を裏付けている。さらに、どの動物もストレスの兆候を示さず、異なる治療間で体重（図３４Ｄ）および血液生化学プロファイル（図３４Ｆ）に有意差はなく、すべての薬物処置がＰＤＸ保有マウスに対して安全であったことを示唆している。

【０２８４】

別のＰＤＸモデルであるＰＡ－０３７５を利用して、ＰＮＡＣ－１（図３３Ａ）およびＰＡ－０３８７　ＰＤＸと同じ投与計画に従うことにより、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグ単剤療法およびＧｅｍ－ｎＰとの併用療法の有効性を批判的に評価した。本発明者らのデータにより、生物工学ｍｉＲ－１２９１プロドラッグまたはＧｅｍ－ｎＰによる処置は、単独または併用で、マウスのＰＡ－０３７５ＰＤＸ腫瘍増殖を有意に抑制することができることが示された（図３７Ａ～Ｃ）。単剤療法と併用療法の間で統計的に有意差はなかったが、併用療法は明らかに最大の阻害程度をもたらした。

【０２８５】

第３のＰＤＸモデルであるＰＡ－０３２７は、他の２つのＰＤＸモデルよりも侵襲性であったため、同じ用量のＧｅｍ－ｎＰを使用しながら、単剤療法および併用療法の両方で、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグの用量を２０μｇ／マウスに増やすことにより、投与計画を修正した。驚くべきことに、最適な結果が観察された（図３７Ｄ～Ｆ）。緩衝液およびＭＳＡの処理と比較して、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグによる単剤療法は、ＰＡ－０３２７　ＰＤＸの進行を、Ｇｅｍ－ｎＰ化学療法と同レベルの５０％まで有意に低減させ、これは、経時的な腫瘍増殖（図３７Ｄ）、ならびに解剖された腫瘍の目視検査（図３７Ｅ）および研究終了時の腫瘍重量の定量的測定（図３７Ｆ）によって示された。最も重要なことは、ｍｉＲ－１２９１プロドラッグとＧｅｍ－ｎＰ化学療法剤の同時投与は、ＰＤＸの進行を最大限に抑制することができ（＞８０％）、これはまた単剤療法と有意に異なっていた（図３７Ｄ）。併用療法の最も強力な抗腫瘍効果は、解剖された腫瘍の目視検査（図３７Ｅ）および計量（図３７Ｆ）によっても実証された。さらに、ＰＤＸを有する動物の体重は、異なる処置群間で有意差を示さず（図３８）、すべての処置がマウスで良好な耐容性であったことを示している。

【０２８６】

考察

ＰＣの生物学および治療についての数十年にわたる研究にもかかわらず、ＰＣの原因および病態形成ならびにより効果的な治療法についての深い理解は依然不足しており、ＰＣを最も致命的な悪性腫瘍のうちの１つにしている。機能的な非コードｍｉＲＮＡに関する最近の知見、ならびにｍｉＲＮＡの調節不全と膵臓腺がんの病因および進行との関連は、ｍｉＲＮＡベースの治療法を開発するための手がかりを提供する（１３～１５、３５）。ヒト膵臓腺がん組織におけるｍｉＲ－１２９１の有意な下方制御およびｍｉＲ－１２９１の腫瘍抑制作用を明らかにした後（１８）、発明者らは本研究において、ＰＡＮＣ－１異種移植片および３つの異なるＰＤＸ腫瘍マウスモデルにおけるＰＣ増殖の制御について、ｍｉＲ－１２９１単剤療法（１０～２０μｇ／マウスまたは０．５～１ｍｇ／ｋｇ、静注）は、Ｇｅｍ－ｎＰ（３００～４０μｇ／マウス；７．５／１比、静注）と同じくらい効果的であったが、併用療法は最大の抑制度を供したことを実証した。ｍｉＲ－１２９１およびＧｅｍ－ｎＰの併用療法の最適な結果は、アポトーシスレベルの上昇と関連していた。

【０２８７】

ｍｉＲＮＡベースの治療法は、がん治療の新規な戦略を表している。しかし、新規なｍｉＲＮＡ治療薬の研究開発は、化学合成によって試験管で作製されたｍｉＲＮＡ模倣物の使用、ならびに動物およびヒトの研究に必要な大量のｍｉＲＮＡ剤への入手によって制限される（２４）。これはまた、合成ポリペプチド／タンパク質の代わりに生細胞で産生された組換え／生物工学によるタンパク質を使用するタンパク質の研究および治療とはまっ

たく対照的である。他の人達が使用している従来の合成ｍｉＲＮＡ剤とは異なり、本研究では、生細胞で産生、折り畳み、許容され、ＦＰＬＣ法によって高度に均一に大量精製された（例えば、０．５～１リットルの発酵から数ミリグラム）、生物工学によるｍｉＲ－１２９１プロドラッグの有効性を調査した（２３、３６）。生物製剤ｍｉＲ－１２９１プロドラッグは、ヒトＰＣ細胞および異種移植腫瘍組織において、成熟ｍｉＲ－１２９１へと選択的にプロセシングされ、その結果、標的遺伝子の発現が調節され、Ｇｍｅ－ｎＰの有効性が向上した。

【０２８８】

ＰＡＮＣ－１細胞はＡｓＰＣ－１細胞よりもＧｅｍ－ｎＰまたはｍｉＲ－１２９１に対して比較的耐性があるため、ＰＡＮＣ－１細胞を利用して、ｍｉＲ－１２９１の単剤療法および併用療法を評価するための異種移植マウスモデルを確立した。ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの単剤療法はいずれも、ＰＡＮＣ－１異種移植腫瘍の増殖を制御する上で全般的な有効性を示したが、個体内の変動は明らかであった。１群あたり６匹のマウスという小さなサンプルサイズでも、３匹の対象はｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの単剤療法に感受性があったが、他の３匹は比較的反応が悪かった。対照的に、ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用療法は、マウスでの耐容性は良好であったが、Ｇｅｍ－ｎＰまたはｍｉＲ－１２９１のいずれか単独よりも大幅に腫瘍増殖を遍在的に抑制でき、単剤療法と比べた併用療法の利益を証明している。

【０２８９】

細胞株由来の異種移植モデルは、がんの研究および治療研究に有用であるが、人工環境下で多くの継代培養がされた市販の細胞株は、元の組織とは異なる多くの遺伝的変化や新しい特徴を示す可能性がある（３４、３７）。初代の患者の腫瘍の特性をよりよく再現し、患者における新規治療法の効率を反映させるために、がん生物学の研究および新薬の評価に使用されるＰＤＸモデルの数が増えている（１６、２８、３２、３８～４０）。現在の研究では、３個体の異なるＰＣ患者からのＰＤＸモデルが確立され、ｍｉＲ－１２９１単剤療法およびＧｅｍ－ｎＰとの併用療法を評価するために利用された。ＰＡＮＣ－１異種移植マウスモデルからの知見と一致して、生物製剤ｍｉＲ－１２９１プロドラッグは、ＰＤＸ腫瘍増殖を低減し、Ｇｅｍ－ｎＰの有効性を改善させるのに効果的であったが、組織病理学分析は、ＰＤＸ腫瘍が、臨床ＰＣの組織学的特徴をＰＡＮＣ－１細胞に由来する異種移植腫瘍よりも確かによく維持することを示した（データは示していない）。カスパーゼ－３レベルの増加によって明らかにされるように、併用療法によるＰＤＸ進行の減少は、アポトーシスの誘導に起因し、これもインビトロのデータと一致している。さらに、異なるＰＤＸ腫瘍モデルは、当然のことながら、ｍｉＲ－１２９１およびＧｅｍ－ｎＰ治療単独に対して種々の感受性を示した。ＰＡ－０３８７は、ｍｉＲ－１２９１よりもＧｅｍ－ｎＰに対して比較的感受性があったが、ＰＡ－０３７５はｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰに対して同等に反応した。第３のＰＤＸであるＰＡ－０３２７は、最も浸潤性があると見られたが、Ｇｅｍ－ｎＰとｍｉＲ－１２９１の両単剤療法に対してより低い感受性を示した。むしろ、ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用療法が、ＰＡ－０３２７の最終的な腫瘍サイズを８０％超縮小し、ＰＣと戦うための最適な戦略として用量調整を含む併用療法を支持している。

【０２９０】

ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用療法の結果の改善は、必然的にＰＣ細胞でのマルチターゲティングによるものである。以前の知見（１８）と一致して、本研究により、カスパーゼ－３／７レベルの増加で表されるようにｍｉＲ－１２９１単独がアポトーシスを増強することが示され、Ｇｅｍ－ｎＰを同時投与するとこれはさらに大きな程度に増加した。ゲムシタビンはヌクレオシド類似体であり、活性化された代謝物であるゲムシタビン三リン酸に変換され、その後、ＤＮＡに組み込まれることによりＤＮＡ合成を阻害し、Ｇ１／Ｓ細胞周期の停止およびアポトーシスを引き起こす（４１、４２）。パクリタキセルは、マイクロチューブの安定化を通じて細胞の有糸分裂を減少させる（４３）。γＨ２Ａ．ＸおよびＨ３ＰＳ１０レベルの増加によって示されるように、ＤＮＡ損傷および有糸

分裂停止に及ぼすＧｅｍ－ｎＰの作用は、ＰＣ細胞株で明白であった。同様に、ｍｉＲ－１２９１の同時投与は、ＤＮＡ損傷および有糸分裂停止のレベルを高め、ｍｉＲ－１２９１によってＰＣ細胞がＧｅｍ－ｎＰに対して感作されることについての良い説明を提供する。ＡｓＰＣ－１細胞がＰＡＮＣ－１細胞よりもｍｉＲ－１２９１および化学療法に対して感受性が高かったことも注目に値し、これは、ＡｓＰＣ－１細胞における初期の時点（治療後４８時間）でのマーカータンパク質発現のより顕著な増加に関する知見と一致している。

【０２９１】

本研究では、以前に報告されたもの（ＭＲＰ１、ＧＬＵＴ１、ＭＵＣ１、ＦＯＸＡ２、およびＭｅＣＰ２など）に加えて、ｍｉＲ－１２９１の新規標的であるＡＲＩＤ３Ｂも検証した（１８、２０～２３）。ｍｉＲＮＡは一般に標的遺伝子の発現を低下させるが、ＡＲＩＤ３ＢはＰＣ細胞でｍｉＲ－１２９１によってむしろ上方制御された。正確なメカニズムは不明であるが、ｍｉＲＮＡが直接的または間接的な作用を通じて標的遺伝子の発現を刺激することもできるという証拠が増えている（４４）。さらに、限られた数の報告しかないが、がんにおけるＡＲＩＤ３Ｂの役割については依然議論の余地がある。いくつかの研究は、ＡＲＩＤ３Ｂが、がん細胞の増殖、浸潤性、幹細胞性、または腫瘍形成を促進することを示したが（４５～４８）、他の研究は、ＡＲＩＤ３Ｂがアポトーシス促進性ｐ５３標的遺伝子の活性化およびアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしたことを示した（３１、４９）。これらの研究では、調査されたがん細胞の種類および使用された試薬、ならびに研究デザインが大きく異なる。ＰＣ細胞でＡＲＩＤ３Ｂを最初に調査したものである本発明者らの研究は、ヒトのがん細胞における、完全長および短長（スプライシング型）のＡＲＩＤ３Ｂタンパク質の存在に関する報告と一致している（３１）。ｍｉＲ－１２９１によるＡＲＩＤ３Ｂの上方制御は、他の人達が示したアポトーシスの誘導におけるＡＲＩＤ３Ｂの機能（３１、４９）だけでなく、ごく最近本発明者らにより報告されたＰＣ細胞のアポトーシスの増強におけるｍｉＲ－１２９１の役割とも一致する（１８）。したがって、抗アポトーシスＡＲＩＤ３Ｂの上方制御は、ｍｉＲ－１２９１の抗腫瘍機能の背後にある別の可能なメカニズムである可能性が高い。

【０２９２】

要約すると、本研究は、ＰＮＡＣ－１異種移植片および異なるＰＤＸ腫瘍マウスモデルにおけるＰＣ腫瘍増殖の制御において、この種の初めての生物製剤であるｍｉＲ－１２９１プロドラッグがＧｅｍ－ｎＰと同様に効果的である一方、ｍｉＲ－１２９１とＧｅｍ－ｎＰの併用療法は異種移植腫瘍の増殖を最大限に抑制したことを示した。さらに、すべての処置は、マウスで肝臓および腎臓の毒性の兆候がなく、良好な耐容性であった。併用療法の最適な有効性は、アポトーシス、ＤＮＡ損傷、および有糸分裂停止の誘導の増強に起因し得た。さらに、ｍｉＲ－１２９１によるアポトーシスの誘導は、ＡＲＩＤ３Ｂの上方制御と関連していた。これらの結果は、生物製剤ｍｉＲ－１２９１プロドラッグをＰＣ治療用の新規な抗腫瘍剤として開発できるという結論と一致しており、ｍｉＲ－１２９１の同時投与は現在の標準的な化学療法Ｇｅｍ－ｎＰの有効性を増強する。

実施例３のための参照文献

１．Ｓｉｅｇｅｌ ＲＬ，Ｍｉｌｌｅｒ ＫＤ，Ｊｅｍａｌ Ａ．Ｃａｎｃｅｒ ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，２０１８．ＣＡ：ａ ｃａｎｃｅｒ ｊｏｕｒｎａｌ ｆｏｒ ｃｌｉｎｉｃｉａｎｓ．２０１８；６８：７－３０．

２．Ｔｅｍｐｅｒｏ ＭＡ，Ｍａｌａｆａ ＭＰ，Ａｌ－Ｈａｗａｒｙ Ｍ，Ａｓｂｕｎ Ｈ，Ｂａｉｎ Ａ，Ｂｅｈｒｍａｎ ＳＷ，ｅｔ ａｌ．Ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ Ａｄｅｎｏｃａｒｃｉｎｏｍａ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ２．２０１７，ＮＣＣＮ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｉｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ．Ｊ Ｎａｔｌ Ｃｏｍｐｒ Ｃａｎｃ Ｎｅｔｗ．２０１７；１５：１０２８－６１．

３．Ｈｉｄａｌｇｏ Ｍ．Ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ ｃａｎｃｅｒ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．２０１０；３６２：１６０５－１７．

４．Ｂｕｒｒｉｓ ３ｒｄ Ｈ，Ｍｏｏｒｅ ＭＪ，Ａｎｄｅｒｓｅｎ Ｊ，Ｇｒｅｅｎ

MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. Journal of clinical oncology. 1997;15:2403-13.
5. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. New England Journal of Medicine. 2013;369:1691-703.
6. Mohammed A, Janakiram NB, Madka V, Li M, Asch AS, Rao CV. Current Challenges and Opportunities for Chemoprevention of Pancreatic Cancer. Curr Med Chem. 2017.
7. Tsai S, Evans DB. Therapeutic Advances in Localized Pancreatic Cancer. JAMA Surg. 2016;151:862-8.
8. Krantz BA, O'Reilly EM. Biomarker-Based Therapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Emerging Reality? Clin Cancer Res. 2017.
9. Manji GA, Olive KP, Saenger YM, Oberstein P. Current and Emerging Therapies in Metastatic Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res. 2017;23:1670-8.
10. Narayanan V, Weekes CD. Molecular therapeutics in pancreas cancer. World J Gastrointest Oncol. 2016;8:366-79.
11. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004;431:350-5.
12. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116:281-97.
13. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. Cancer research. 2010;70:7027-30.
14. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nature reviews Drug discovery. 2017;16:203-22.
15. Yu AM, Tian Y, Tu MJ, Ho PY, Jilek JL. MicroRNA Pharmacoepigenetics: Posttranscriptional Regulation Mechanisms behind Variable Drug Disposition and Strategy to Develop More Effective Therapy. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2016;44:308-19.
16. Gilles ME, Hao L, Huang L, Rupaimoole R, Lopez-Casas PP, Pulver E, et al. Personalized RNA Medicine for Pancreatic Cancer. Clin C

ancer Res. 2018;24:1734-47.
17. Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P. Targeting miR-21 for therapy of pancreatic cancer. Mol Ther. 2013;21:986-94.
18. Tu M-J, Pan Y-Z, Qiu J-X, Kim EJ, Yu A-M. MicroRNA-1291 targets the FOXA2-AGR2 pathway to suppress pancreatic cancer cell proliferation and tumorigenesis. Oncotarget. 2016;7:45547.
19. Bi H-C, Pan Y-Z, Qiu J-X, Krausz KW, Li F, Johnson CH, et al. N-methylnicotinamide and nicotinamide N-methyltransferase are associated with microRNA-1291-altered pancreatic carcinoma cell metabolome and suppressed tumorigenesis. Carcinogenesis. 2014;35:2264-72.
20. Pan Y-Z, Zhou A, Hu Z, Yu A-M. Small nucleolar RNA-derived microRNA hsa-miR-1291 modulates cellular drug disposition through direct targeting of ABC transporter ABCC1. Drug Metabolism and Disposition. 2013;41:1744-51.
21. Yamasaki T, Seki N, Yoshino H, Itesako T, Yamada Y, Tatarano S, et al. Tumor-suppressive microRNA-1291 directly regulates glucose transporter 1 in renal cell carcinoma. Cancer science. 2013;104:1411-9.
22. Luo H, Guo W, Wang F, You Y, Wang J, Chen X, et al. miR-1291 targets mucin 1 inhibiting cell proliferation and invasion to promote cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. Oncology reports. 2015;34:2665-73.
23. Li MM, Addepalli B, Tu MJ, Chen QX, Wang WP, Limbach PA, et al. Chimeric MicroRNA-1291 Biosynthesized Efficiently in Escherichia coli Is Effective to Reduce Target Gene Expression in Human Carcinoma Cells and Improve Chemosensitivity. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2015;43:1129-36.
24. Ho PY, Yu AM. Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2016;7:186-97.
25. Wang W-P, Ho PY, Chen Q-X, Addepalli B, Limbach PA, Li M-M, et al. Bioengineering novel chimeric microRNA-34a for prodrug cancer therapy: high-yield expression and purification, and structural and functional chara

cterization. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2015;354:131-41.
26. Ho P, Duan Z, Batra N, Jilek J, Tu M, Qiu J, et al. Bioengineered ncRNAs selectively change cellular miRNome profiles for cancer therapy. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2018.
27. Pan Y-Z, Morris ME, Yu A-M. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. Molecular pharmacology. 2009;75:1374-9.
28. Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, Zhang X, Iacobuzio-Donahue C, Karikari C, et al. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. Clinical cancer research. 2006;12:4652-61.
29. Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. Nature protocols. 2009;4:1670-80.
30. Zhao Y, Tu M-J, Yu Y-F, Wang W-P, Chen Q-X, Qiu J-X, et al. Combination therapy with bioengineered miR-34a prodrug and doxorubicin synergistically suppresses osteosarcoma growth. Biochemical pharmacology. 2015;98:602-13.
31. Joseph S, Deneke VE, Dahl KDC. ARID3B induces tumor necrosis factor alpha mediated apoptosis while a novel ARID3B splice form does not induce cell death. PloS one. 2012;7:e42159.
32. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. Nature reviews Clinical oncology. 2012;9:338-50.
33. Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. Cancer research. 2013;73:5315-9.
34. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. Clinical Cancer Research. 2003;9:4227-39.
35. Rachagani S, Macha MA, Heimann N, Seshacharyulu P, Haridas D, Chugh S, et al. Clinical implications of miRNAs in the pathogenesi

s, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. Advanced drug delivery reviews. 2015;81:16-33.
36. Chen QX, Wang WP, Zeng S, Urayama S, Yu AM. A general approach to high-yield biosynthesis of chimeric RNAs bearing various types of functional small RNAs for broad applications. Nucleic acids research. 2015;43:3857-69.
37. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. Cancer research. 2009;69:3364-73.
38. Rajeshkumar NV, Yabuuchi S, Pai SG, De Oliveira E, Kamphorst JJ, Rabinowitz JD, et al. Treatment of Pancreatic Cancer Patient-Derived Xenograft Panel with Metabolic Inhibitors Reveals Efficacy of Phenformin. Clin Cancer Res. 2017;23:5639-47.
39. Knudsen ES, Balaji U, Mannakee B, Vail P, Eslinger C, Moxom C, et al. Pancreatic cancer cell lines as patient-derived avatars: genetic characterisation and functional utility. Gut. 2018;67:508-20.
40. D'Costa Z, Jones K, Azad A, van Stiphout R, Lim SY, Gomes AL, et al. Gemcitabine-Induced TIMP1 Attenuates Therapy Response and Promotes Tumor Growth and Liver Metastasis in Pancreatic Cancer. Cancer Res. 2017;77:5952-62.
41. Yip-Schneider MT, Sweeney CJ, Jung S-H, Crowell PL, Marshall MS. Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2001;298:976-85.
42. Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine. Seminars in oncology; 1995. p. 19-25.
43. Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen H-J, Yang C. Taxol: mechanisms of action and resistance. Journal of the National Cancer Institute Monographs. 1993:55-61.
44. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012;3:311-30.
45. Kobayashi K, Era T, Takebe A, Jakt LM, Nis

hikawa S. ARID3B induces malignant transformation of mouse embryonic fibroblasts and is strongly associated with malignant neuroblastoma. Cancer Res. 2006;66:8331-6.
46. Cowden Dahl KD, Dahl R, Kruichak JN, Hudson LG. The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. Neoplasia. 2009;11:1208-15.
47. Bobbs A, Gellerman K, Hallas WM, Joseph S, Yang C, Kurkewich J, et al. ARID3B Directly Regulates Ovarian Cancer Promoting Genes. PLoS One. 2015;10:e0131961.
48. Liao TT, Hsu WH, Ho CH, Hwang WL, Lan HY, Lo T, et al. let-7 Modulates Chromatin Configuration and Target Gene Repression through Regulation of the ARID3B Complex. Cell Rep. 2016;14:520-33.
49. Pratama E, Tian X, Lestari W, Iseki S, Ichwan SJ, Ikeda M-A. Critical role of ARID3B in the expression of pro-apoptotic p53-target genes and apoptosis. Biochemical and biophysical research communications. 2015;468:248-54.

【0293】

実施例４

複数の低分子ＲＮＡを運ぶための単一ｎｃＲＮＡ分子の生物工学

本発明者らは最近、細菌発酵によって生物工学または生物製剤ｎｃＲＮＡ剤（ＢＥＲＡ）を産生する高収率で費用効果の高い方法を確立し、これは、標的の低分子ＲＮＡを収容する安定なｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ担体（約１８０ヌクレオチド）に基づくものである。それにもかかわらず、より長いｎｃＲＮＡ（例えば、＞２６０ヌクレオチド）を異種発現させることは依然として課題であり、単一のＢＥＲＡが複数の低分子ＲＮＡを運び得るか否かは不明である。この問題に対処するべく、発明者らは、複数の低分子ＲＮＡを収容させるために、追加のヒトプレｍｉＲ－３４ａをｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ足場に取り付けて新しいｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／プレｍｉＲ－３４ａ担体（約２９６ヌクレオチド）を提供できると仮定した。したがって、ｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、およびアンタゴミルの種々の組み合わせを含む１０種類のコンビナトリアルＢＥＲＡ（ＣＯ－ＢＥＲＡ）を設計した。本発明者らのデータは、すべての標的ＣＯ－ＢＥＲＡがＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉで高いレベルで首尾よく発現したことを示し、それは全細菌ＲＮＡの４０％超という高レベルであった。さらに、組換えＣＯ－ＢＥＲＡは、高速タンパク質液体クロマトグラフィー法によって高度に均一に精製された。さらに、ＣＯ－ＢＥＲＡは、種々のヒト非小細胞肺がん細胞株に対して強力な抗増殖活性を示した。これらの結果は、実験、診断、および治療ツールとして新しい生物製剤ＲＮＡを開発するための道を開く可能性のある、マルチターゲティング用の種々の弾頭低分子ＲＮＡを運ぶ長いｎｃＲＮＡ分子の産生を裏付けている。

肺がんは、米国の男女両方で２番目に多いがんである。肺がんの症例の大部分は、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）に分類される。現在のＮＳＣＬＣ治療には、切除手術、放射線療法、および薬物療法が含まれるが、これらはすべていくつかの利益があり、制限がある。その結果、肺がんによる死亡は、米国の全がんによる死亡の約２７％を占めている。したがって、ＮＳＣＬＣには新規な治療薬が強く求められている。マイクロＲＮＡ（ｍｉＲ

ＮＡまたはｍｉＲ）は、ｍＲＮＡの分解または翻訳阻害により標的遺伝子の発現を統制する、細胞内のゲノム由来の非コード低分子ＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）の一クラスである。ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、およびｌｅｔ－７ｃなどの一部のｍｉＲＮＡは、一般にＮＳＣＬＣ組織／細胞で下方制御され、ＣＤＫ６、ＳＴＡＴ３、Ｒａｓなどの種々のがん遺伝子を標的とする。このような調節不全の腫瘍抑制ｍｉＲＮＡの発現または機能を回復させることは、がん治療の新規戦略を表している。マルチターゲティングのためにＮＳＣＬＣ細胞に複数のｍｉＲＮＡを同時に導入することを目的として、ｎｃＲＮＡ生物工学技術を使用して、複数のｍｉＲＮＡを持つ単一のｎｃＲＮＡ分子を産生した。ＣＯ－ＢＥＲＡ構築物の設計、発現、および処理の結果を図３９～４４に示す。

【０２９４】

本発明者らのデータは、マルチターゲティングｎｃＲＮＡ剤がＥ．ｃｏｌｉで首尾よく発現したことを示した。ＦＰＬＣ法を使用して、組換えｎｃＲＮＡを高度に均一に精製することができた。ｎｃＲＮＡは、種々の細胞株においてヒトＮＳＣＬＣ細胞の生存を阻害するのに効果的であり、ｈｔＲＮＡＬｅｕ／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４およびｈｔＲＮＡＬｅｕ／ｍｉＲ－１２４／ｍｉＲ－３４ａがさらなる試験の最良候補として選択された。生物工学ｎｃＲＮＡによるヒトＮＳＣＬＣ細胞の処理は、細胞のｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、およびｌｅｔ－７ｃのレベルを上昇させ、ＣＤＫ６、ＳＴＡＴ３、およびＲａｓを含む標的遺伝子のタンパク質レベルを低下させることを示した。ｎｃＲＮＡをロードしたＬＰＰは、リポフェクタミン３０００よりも細胞増殖の阻害のために効果的であったため、動物モデルではＬＰＰを使用した。ｈｔＲＮＡＬｅｕ／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４およびｈｔＲＮＡＬｅｕ／ｍｉＲ－１２４／ｍｉＲ－３４ａは、処置中止後のシグナル増加から明らかなように、マウスにおける異種移植ＮＳＣＬＣの増殖を制御するのに有効であり得る。したがって、単一のｎｃＲＮＡ剤をマルチターゲティングに使用することは、ＮＳＣＬＣの効果的な治療を提供する。

【０２９５】

材料および方法

細菌培養

Ｅ．ｃｏｌｉ株のＤＨ５α（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、マサチューセッツ州ウォルサム）およびＨＳＴ０８（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カリフォルニア州マウンテンビュー）は、プラスミド調製用のルリアブロス（ＬＢ）およびＲＮＡ産生用の２ＸＹＴ培地でそれぞれ増殖させた。培地には１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを補充した。

【０２９６】

ヒト細胞培養

ヒト肺がん細胞株Ａ５４９（ＡＴＣＣ：ＣＲＭ－ＣＣＬ－１８５）、Ｈ１９７５（ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－５９０８）、Ｈ２３（ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－５８００）、Ｈ１６５０（ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－５８８３）、およびＨ１２９９（ＡＴＣＣ：５８０３）は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（バージニア州マナッサス）から購入した。細胞株は、１０％ウシ胎児血清、１００Ｕ／ｍｌペニシリンナトリウム、および１００μｇ／ｍｌ硫酸ストレプトマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を添加したＲＰＭＩ １６４０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で維持し、３７°Ｃで５％CO_2の加湿雰囲気で増殖した。

【０２９７】

ＣＯ－ＢＥＲＡ発現プラスミドの構築

すべてのｍｉＲＮＡの配列はｍｉＲＢａｓｅから取得され、最適化されたプレｍｉＲ－３４ａ、ならびにアンチｍｉＲ－２１、ＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ、ｌｅｔ－７ｃ、およびｍｉＲ－１２４の配列は最近の研究から採用された（Ｈｏ ｅｔ ａｌ ２０１８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１８）。ＣＯ－ＢＥＲＡ配列（配列番号１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、および１９２）は、図３９ａに示すように、ｍｉＲ－３４ａ二重鎖を標的ｍｉＲＮＡまたはｓｉＲＮＡ配列で置換することによって

生成し、対応するコード配列は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（ニュージャージー州ピスカタウェイ）によってｐＵＣ５７ベクター中に合成された。標的インサートは、ＥｃｏＲＩおよびＰｓｔＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、マサチューセッツ州イプスウィッチ）で消化後、プラスミドから放出された。ＵＳＢ　ＰｒｅｐＥａｓｅ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ，Ｉｎｃ．、オハイオ州クリーブランド）を使用してゲル精製後、各インサートを、Ｔ４　Ｒａｐｉｄ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、ＥｃｏＲＩおよびＰｓｔＩで消化したベクターｐＢＳＴＮＡＶ（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１８、Ｐｏｎｃｈｏｎ　ｅｔ　ａｌ．２００９）に連結した。次に、プラスミドをＤＨ５αコンピテント細胞に形質転換し、アンピシリンで選別した。コロニーを拡張させ、ＣＯ－ＢＥＲＡ発現プラスミドをＭｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、ドイツ、ヒルデン）で単離した。すべての標的ＣＯ－ＢＥＲＡ発現プラスミドは、配列決定分析（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、ニュージャージー州ピスカタウェイ）によって確認された。

【０２９８】

Ｅ．ｃｏｌｉにおける組換えＣＯ－ＢＥＲＡの発現

確認された配列をもつプラスミドは、以前に記載されたようにＨＳＴ０８に形質転換された（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１８、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１４、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．２０１５）。全ＲＮＡをＴｒｉｓ－ＨＣｌ飽和フェノール抽出法で抽出し、ＮａｎｏＤｒｏｐ　２０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で定量化し、変性尿素（８Ｍ）ＰＡＧＥ（８％）ゲルで１レーンあたり０．１μｇの全細菌ＲＮＡを分離することにより組換えＣＯ－ＢＥＲＡ発現を分析し、参照用にＲｉｂｏＲｕｌｅｒ低範囲ＲＮＡラダー（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した。ＰＡＧＥゲルをエチジウムブロマイドで染色し、ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＭＰ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＢｉｏＲａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を使用して画像化した。

【０２９９】

高速タンパク質液体クロマトグラフィーによるＣＯ－ＢＥＲＡの精製

ＣＯ－ＢＥＲＡは、ＮＧＣ　Ｑｕｅｓｔ　１０Ｐｌｕｓ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）システム（ＢｉｏＲａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を使用して全ＲＮＡから精製した。すべてのＣＯ－ＢＥＲＡは、最初にＥｎｒｉｃｈ－Ｑ　１０×１００（ＢｉｏＲａｄ、カリフォルニア州ハーキュリーズ）を使用して精製した。ＦＰＬＣ画分を尿素－ＰＡＧＥで分析し、ＲＮＡの分離および純度を確認した。標的ＣＯ－ＢＥＲＡを含む画分をプールし、エタノールで沈殿させ、Ａｍｉｃｏｎウルトラ２ｍｌ遠心フィルター（３０ｋＤａ、ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、マサチューセッツ州ビレリカ）を使用してヌクレアーゼフリー水で脱塩／濃縮した。場合によっては、濃縮ＣＯ－ＢＥＲＡには不純物がいくらか含まれており、どのカラムが最も純粋な産物を産生したかに応じて、Ｅｎｒｉｃｈ－Ｑ　１０×１００、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　Ｍｉｎｉ　Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＤＥＡＥ、またはＢｉｏ－Ｓｃａｌｅ　Ｍｉｎｉ　ＣＨＴ　Ｔｙｐｅ　ＩＩ（ＢｉｏＲａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）のいずれかを使用して、第２の精製にかけた。同様に、画分は尿素－ＰＡＧＥ分析によって評価され、したがって、標的画分を組み合わせ、脱塩し、濃縮した。

【０３００】

Ｅｎｒｉｃｈ－Ｑ１０×１００およびＢｉｏ－ＳｃａｌｅＭｉｎｉ　Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ　ＤＥＡＥでのＲＮＡ分離は、緩衝液Ａ（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）および緩衝液Ｂ（緩衝液Ａ＋１Ｍ塩化ナトリウム、ｐＨ７．０）を使用して行った一方、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　Ｍｉｎｉ　ＣＨＴ　Ｔｙｐｅ　ＩＩは、緩衝液Ｃ（５ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）および緩衝液Ｄ（１５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０）を使用して遂行した。ＦＰＬＣトレースは、ＵＶ－可視検出器を使用して２６０／２８０ｎｍでモニタリングし、それに応じて画分が収集された。具体的には、約５～１０ｍｇのＲＮＡをＥｎｒｉｃｈ－Ｑカラムに充填し、２ｍｌ／分の流速で勾配溶離、すなわち、１００

％の緩衝液Ａで４分間、続いて５５％の緩衝液Ｂで１０分、５５～７２％の緩衝液Ｂで２０分間、７２～７４％の緩衝液Ｂで８分間、１００％の緩衝液Ｂで１０分間、次に１００％の緩衝液Ａで１０分間の勾配を通して分離した。約５ｍｇのＲＮＡをＢｉｏ－Ｓｃａｌｅ Ｍｉｎｉ Ｍａｃｒｏ－Ｐｒｅｐ ＤＥＡＥに充填し、２ｍｌ／分で勾配溶離、すなわち、１００％緩衝液Ａで１２分間分離後、５０％緩衝液Ｂに５分間切り替え、５０～６０％の緩衝液Ｂで２５分間、６０～７５％の緩衝液Ｂで１０分間、１００％の緩衝液Ｂで５分間、最後に１００％の緩衝液Ａで５分間の勾配で分離した。最後に、約０．５ｍｇのＲＮＡをＢｉｏ－Ｓｃａｌｅ Ｍｉｎｉ ＣＨＴ Ｔｙｐｅ ＩＩに充填し、２．５ｍｌ／分で勾配溶離、すなわち、１００％緩衝液Ｃで２分間、続いて７３～９０％緩衝液Ｄで１８分間、１００％緩衝液Ｄで５分間、次に１００％緩衝液Ｃで５分間分離した。

【０３０１】

ＦＰＬＣで単離されたＣＯ－ＢＥＲＡの純度の定量的測定

ＦＰＬＣで単離されたＲＮＡの純度は、以前に説明したように（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１５）、Ｓｈｉｍａｄｚｕ ＬＣ－２０ＡＤ ＨＰＬＣシステムのＸＢｒｉｄｇｅ（登録商標）オリゴヌクレオチドＢＥＨ Ｃ$_{18}$カラム（２．１×５０ｍｍ、粒径２．５μｍ、Ｗａｔｅｒｓ、マサチューセッツ州ミルフォード）を用いて、最適な高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）法によって定量的に決定された。

【０３０２】

エンドトキシンの定量化

ＦＰＬＣで精製されたＣＯ－ＢＥＲＡのエンドトキシンレベルは、Ｌｉｍｕｌｕｓ Ａｍｅｂｏｃｙｔｅ Ｌｙｓａｔｅ Ｐｙｒｏｇｅｎｔ－５０００動態アッセイ（Ｌｏｎｚａ、メリーランド州ウォーカーズビル）を使用して、製造元の指示に従って定量化された。簡単に説明すると、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ３プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ、カリフォルニア州サニーベール）を使用して、３４０ｎｍの波長で吸光度を測定した。キットで提供されるエンドトキシン標準を使用して標準曲線を作成し、エンドトキシンレベルをエンドトキシン単位（ＥＵ）／μｇＲＮＡとして算出した。

【０３０３】

細胞生存率アッセイ

細胞を９６ウェルプレートに１ウェルあたり３，０００または５，０００細胞で播種し、一晩インキュベーションした後、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ３０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して細胞に１５ｎＭ ｎｃＲＮＡまたは対照ｔＲＮＡをトランスフェクションし、ビヒクル対照として空のＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００もトランスフェクションした。細胞生存率は、記載されたように（Ｈｏ ｅｔ ａｌ．２０１８、Ｊｉｌｅｋ ｅｔ ａｌ．２０１９、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１５）、トランスフェクションの７２時間後にＭＴＴアッセイを使用して測定した。すべての実験は３重で実施され、別々の培養物で少なくとも１回繰り返した。

【０３０４】

結果

ＣＯ－ＢＥＲＡの設計およびプラスミドの構築

新規なｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡベースのｎｃＲＮＡ生物工学技術を使用して、１リットルの細菌培養からミリグラム量の種々の標的ＢＥＲＡを産生することができた（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１５、Ｈｏ ｅｔ ａｌ．２０１８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１４、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１９、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１５）。しかし、この技術によって、複数の標的低分子ＲＮＡを運ぶ２６０ヌクレオチドより長いＲＮＡ分子を産生できるか否かは不明であった。この問題に対処するために、ＢＥＲＡ技術に基づいて、１０個の新規なＣＯ－ＢＥＲＡ分子（配列番号１８３～１９２）を設計した。ここでは、別のプレｍｉＲ－３４ａがｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ担体に連続して融合され、得られたｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ／プレｍｉＲ－３４ａ担体は、長さが約２９６ヌクレオチドで、固有のｍｉＲ－３４ａ二重鎖を置換することで２つの標的低分子ＲＮＡのローディングを可能にした（図３９ａ）。ＣＯ－ＢＥＲＡの多様性を高めるために、本発明者らの設計

には、ヒトセリンまたはロイシンｔＲＮＡのいずれかと、それに続くＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ、アンチｍｉＲ－２１－５ｐ、ｌｅｔ－７ｃ－５ｐ、ｍｉＲ－１２４－３ｐおよびｍｉＲ－３４ａ－３ｐ（配列番号１８３～１９２）の異なる組み合わせを伴う２つの最適化されたヒトプレｍｉＲ－３４ａ（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１８）が含まれていた。対応するコード配列を合成し、ｐＵＣ５７ベクターにクローニングし、最終的に標的ｐＢＳＴＮＡＶベクターにサブクローニングし（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１８；Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１４；Ｐｏｎｃｈｏｎ　ｅｔ　ａｌ．２００９；Ｐｏｎｃｈｏｎ　ａｎｄ　Ｄａｒｄｅｌ　２００７）、ＨＳＴ０８　Ｅ．ｃｏｌｉでの異種発現に進む前に配列決定によって確認した。

【０３０５】

すべての標的ＣＯ－ＢＥＲＡはＥ．ｃｏｌｉで高度に発現する。

長いｎｃＲＮＡ　ＣＯ－ＢＥＲＡを過剰に異種発現できるか否かを決定するために、個々のＣＯ－ＢＥＲＡ発現プラスミドで形質転換したＥ．ｃｏｌｉから全ＲＮＡを抽出し、尿素－ＰＡＧＥで分析した。結果（図３９ｂ）は、野生型細菌と比較した場合、対応する新しいＲＮＡバンドの出現によって明らかなように、１０個すべてのＣＯ－ＢＥＲＡが細菌で首尾よく発現したことを示した。興味深いことに、同様の長さのこれらのＣＯ－ＢＥＲＡ（配列番号１８３～１９２）には、ＢＥＲＡに関する本発明者らの知見（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１８、Ｊｉｌｅｋ　ｅｔ　ａｌ．２０１９）と類似して、ＰＡＧＥ移動度の可変レベルによって示されるように異なる２次構造およびそれより高次の種々の構造が確実に含まれている（図３９ｂ）。これらのＣＯ－ＢＥＲＡの発現レベルもわずかに異なるが、ＲＮＡバンドの強度（図３９ｂ）およびより定量的にはＦＰＬＣピーク面積（図３９ｂ）から推定されるように、各々が全細菌ＲＮＡの４０％超を占めていた（図４０ａ）。加えて、１リットルの細菌培養液から抽出した全ＲＮＡの量は、ｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｍｉＲ－１２４／ｍｉＲ－３４ａでの約５０ｍｇからｈｔＲＮＡ^{Ｓｅｒ}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４での１２．６ｍｇまでの範囲であり、ＣＯ－ＢＥＲＡ間で可変であった（表９）。

【表９】

表９．個々のFPLCで単離されたCO-BERAの収率、純度、およびエンドトキシンレベル
収率は、細菌培養液１リットルあたりの精製CO-BERAの量として定義され、単離されたCO-BERAの純度は、最適なHPLC法によって定量化された (Wang et al.2015)。個々のCO-BERAの分子量はOligoCalcを用いて算出した。エンドトキシンレベルは、Limulus Amebocyte Lysate Pyrogent-5000動態アッセイを使用して決定された。

	名称	長さ(ヌクレオチド)	分子量(g/mol)	1L培養液から抽出した全RNA(mg)	1L培養液から精製した標的CO-BERA(mg)	純度(%)	エンドトキシン活性(EU/μg RNA)
1	$htRNA^{Leu}$/miR-34a/miR-124[a]	297	96,008.1	48.4	21.3	99.0	0.15
2	$htRNA^{Leu}$/miR-124/miR-34a[a]	297	96,583.4	50.0	22.0	99.0	3.31
3	$htRNA^{Leu}$/let-7c/miR-124[b]	298	96,300.3	21.6	4.3	96.7	1.60
4	$htRNA^{Leu}$/let-7c/miR-34a[c]	298	96,278.3	21.3	10.7	95.6	1.34
5	$htRNA^{Ser}$/miR-124/miR-34a[a]	296	95,684.9	22.2	4.4	99.4	1.44
6	$htRNA^{Ser}$/let-7c/miR-124[d]	297	95,977.0	12.6	0.5	92.3	0.33
7	$htRNA^{Ser}$/let-7c/miR-34a[a]	297	95,955.1	22.0	13.2	99.6	0.71
8	$htRNA^{Leu}$/miR-34a/抗 miR-21[c]	294	96,010.2	17.6	0.2	95.1	1.11
9	$htRNA^{Leu}$/NRF2-siRNA/miR-34a[a]	297	95,931.1	20.0	6.4	99.6	0.19
10	$htRNA^{Ser}$/NRF2-siRNA/miR-34a[a]	296	95,607.9	13.3	1.3	99.0	6.32

[a]ENrich Q単独、[b]ENrich Q、次いでCHT II型、[c]ENrich Q、次いでDEAE、[d]Enrich Q、次いでEnrich Q。

【０３０６】

ＣＯ－ＢＥＲＡは、ＦＰＬＣ法により高度に均一に精製される。

細菌ＲＮＡから組換えＣＯ－ＢＥＲＡを単離するために、ＢＥＲＡの精製に利用される陰イオン交換ＦＰＬＣ法を最適化しようとした（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．２０１８）。精製塩勾配で長時間溶出することにより（図４０ａ）、１回の実行で細菌ＲＮＡから標的ＣＯ－ＢＥＲＡを高度に均一に精製することができ、ＨＰＬＣ法で定量的に測定し、尿素－ＰＡＧＥ分析で評価したところ（図４１）、１０個中６個のＣＯ－ＢＥＲＡは、９９．０％以上の純度であった（表９）。それにもかかわらず、他の４つのＣＯ－ＢＥＲＡは、強陰イオン交換カラムを使用したシングルランＦＰＬＣ分離後、純度が９０％未満であったため、さらに精製するために処理された。同じ強陰イオン交換カラムまたは弱陰イオン交換カラム（図４０ｂ～ｃ）のいずれかを使用した再精製により、９５～９７％の純度のＣＯ－ＢＥＲＡが良好に得られた（表９）。ＣＯ－ＢＥＲＡｓ　ｈｔＲＮＡ^{ＳＥＲ}／ｌｅｔ－７Ｃ／ｍｉＲ－１２４およびｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｌｅｔ－７Ｃ／ｍｉＲ－１２４は、精製が極めて難しいことが判明し、強陰イオン交換（図４０ｂ）またはセラミックヒドロキシアパタイトカラム（図４０ｄ）で再精製すると、９６．７％純粋なｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４および９２．３％純粋なｈｔＲＮＡ^{Ｓｅｒ}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４分子が得られた（表９）。一方、１リットルの細菌発酵からの全ＲＮＡの量が少ないことの関連に加えて、２カラム精製後の全体的な収量も低くなった（表９）。対照的に、シングルラン強陰イオン交換ＦＰＬＣ法で精製された標的ＣＯ－ＢＥＲＡの大部分は、１リ

ットルの細菌培養から１０ｍｇ超であり、再精製を行った際に通常、４～７ｍｇが得られた（表９）。さらに、ＦＰＬＣで精製されたＣＯ－ＢＥＲＡは、Ｌｉｍｕｌｕｓ Ａｍｅｂｏｃｙｔｅ Ｌｙｓａｔｅ Ｐｙｒｏｇｅｎｔ－５０００動態アッセイで測定した場合、低いエンドトキシン活性を示した（表９）。１つのＣＯ－ＢＥＲＡ ｈｔＲＮＡ^{Ｓｅｒ}／ＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ／ｍｉＲ－３４ａのエンドトキシンレベルは６．３２ＥＵ／μｇ ＲＮＡであったため、他のすべてのＣＯ－ＢＥＲＡは４ＥＵ／μｇＲＮＡ未満のエンドトキシン活性を示した。総合すると、これらの結果は、１リットルの細菌発酵から最小限のエンドトキシン活性で、数ミリグラムの９５％超純粋なＣＯ－ＢＥＲＡを一般的に提供する単カラムまたはマルチカラムのＦＰＬＣ法により、組換えＣＯ－ＢＥＲＡの大量精製の成功を証明した。

【０３０７】

生物製剤ＣＯ－ＢＥＲＡ分子はヒトＮＳＣＬＣ細胞の生存を阻害する

したがって、本発明者らは、これらの組換えＣＯ－ＢＥＲＡの、ヒトＮＳＣＬＣ細胞に対する抗増殖活性を評価および比較した。種々の遺伝的背景を表して、ＮＳＣＬＣの非均一性をシミュレーションするために、５つの異なるＮＳＣＬＣ細胞株、すなわちＡ５４９、Ｈ１９７５、Ｈ２３、Ｈ１６５０、およびＨ１２９９のパネルを選択した。細胞の可変性は、１５ｎＭの個々のＣＯ－ＢＥＲＡ、対照ｔＲＮＡ（つまり、ＬＳＡおよびＳＳＡ）、またはビヒクルによるトランスフェクションの７２時間後に決定した。本発明者らのデータ（図４２ａ～ｅ）は、すべてのＣＯ－ＢＥＲＡが、ビヒクルおよびｔＲＮＡ対照と比較して、これらのＮＳＣＬＣ細胞株で顕著な抗増殖活性を示したことを示した。同じＣＯ－ＢＥＲＡは、異なる細胞株の生存率に対して種々のレベルの抑制を示した一方、異なるＣＯ－ＢＥＲＡは、同じ細胞株に種々の程度の阻害を示した（図４２）。それらのうち、ｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４およびｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｌｅｔ－７ｃ／ｍｉＲ－１２４は、すべてのＮＳＣＬＣ細胞株に対して一貫して最大限の抗増殖活性を示し（例えば、Ａ５４９細胞の８０％超の阻害、および他のすべての５０％超の抑制）、これは将来の研究のために追求される可能性がある。

【０３０８】

考察

本研究において、新規な微生物発酵ベースの方法が確立され、２つの低分子ＲＮＡ弾頭を運ぶ長さ約３００ヌクレオチドの新規長鎖ｎｃＲＮＡ分子、すなわちＣＯ－ＢＥＲＡの、高レベルの異種発現を初めて達成した。ＣＯ－ＢＥＲＡは、本発明者らが最近同定した（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１５、Ｈｏ ｅｔ ａｌ．２０１８）独自の安定なｔＲＮＡ／プレｍｉＲ－３４ａ足場を利用して設計され、マルチターゲティングを目的として追加の低分子ＲＮＡを収容するために別のヒトプレｍｉＲＮＡを組み込む。ＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｌｅｔ－７ｃ、およびアンチｍｉＲ－２１の種々の組み合わせから構成される１０個のＣＯ－ＢＥＲＡはすべて、一般的なＥ．ｃｏｌｉ株ＨＳＴ０８で首尾よく発現し、各々が全細菌ＲＮＡの４０％超を占めた。これらの低分子ＲＮＡは、ＮＳＣＬＣでのそれらの腫瘍抑制特性のために選択されたものであり、我々の結果は、目的とする他の低分子ＲＮＡを収容するためにこのアプローチが使用され得ることを示唆している。組換えＣＯ－ＢＥＲＡの大部分は、シングルラン強陰イオン交換ＦＰＬＣ法によって、高度な均一性まで精製でき、ＨＰＬＣで定量化すると一般に９９％超純粋であり、Ｌｉｍｕｌｕｓ Ａｍｅｂｏｃｙｔｅ Ｌｙｓａｔｅ動態アッセイで測定すると３ＥＵ／μｇ ＲＮＡ未満のエンドトキシン活性であるが、他のいくつかは再精製を要したので、全体的な収率は変動した。生物製剤ＣＯ－ＢＥＲＡは、ヒトＮＳＣＬＣ細胞株のパネルに対して強力な抗増殖活性を示したが、動物モデルで腫瘍の進行を制御する際のマルチターゲティングメカニズムおよび有効性を定義するためのさらなる研究が強く求められる。

【０３０９】

本研究で記載される生物工学または組換えＲＮＡ分子およびＣＯ－ＢＥＲＡは、生細胞で作製され、折りたたまれ、これはＲＮＡ研究および薬品開発を支配してきた広範囲な種

々の改変を含む化学エンジニアリングＲＮＡ模倣物とは区別される（Ｂｒａｍｓｅｎ ａｎｄ Ｋｊｅｍｓ ２０１２、Ｈｏ ａｎｄ Ｙｕ ２０１６、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ ２０１７、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．２０１９）。興味深いことに、タンパク質の研究は、合成ポリペプチドまたはタンパク質ではなく生細胞で産生され折りたたまれた生物工学によるタンパク質または組換えタンパク質によって直接支配されており、これは、タンパク質の構造および機能を理解し、新規タンパク質の治療法を開発するのに非常に成功していることが証明されている（Ｌｅａｄｅｒ ｅｔ ａｌ．２００８）。遺伝子研究で人気が高まっている合成ＤＮＡまたは遺伝子（Ｓｃｈｉｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．２０１８）は、実際には化学修飾で構成されていないことも特筆される。したがって、細胞機構が認識して転写後修飾を実行し、必要な構造および折り畳みへとプロセシングできる、生物製剤ＲＮＡ分子（Ｈｏ ａｎｄ Ｙｕ ２０１６、Ｐｅｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．２０１７、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．２０１９）を産生するための新規技術、とりわけ微生物発酵に基づく方法を開発する必要がある。実際、組換えＲＮＡまたはＢＥＲＡには、転写後修飾が全くない、またはシュードウリシンなど最小限のものしかなく（Ｇａｕｄｉｎ ｅｔ ａｌ．２００３、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１５、Ｎｅｌｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１２、Ｐｏｎｃｈｏｎ ｅｔ ａｌ．２００９、Ｐｏｎｃｈｏｎ ａｎｄ Ｄａｒｄｅｌ ２００７、Ｒａｎａｅｉ－Ｓｉａｄａｔ ｅｔ ａｌ．２０１４、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１５）、それらは天然のＲＮＡに似せて固有の２次および高次の構造をとるためには必要である。さらに、微生物発酵で異種産生された生物工学によるＲＮＡ分子は、種々の研究によってインビトロおよびインビボで生物学的に機能的であることが実証されている（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１５、Ｈｏ ｅｔ ａｌ．２０１８、Ｊｉａｎ ｅｔ ａｌ．２０１７、Ｊｉｌｅｋ ｅｔ ａｌ．，２０１９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１４，２０１５，２０１８，２０１９、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．２０１０、Ｎｅｌｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．２０１２、Ｐａｉｇｅ ｅｔ ａｌ．２０１１，２０１２、Ｐｅｒｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．２０１６ａ，２０１６ｂ、Ｐｉｔｕｌｌｅ ｅｔ ａｌ．１９９５、Ｔｕ ｅｔ ａｌ．２０１９、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１５、Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００９、Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．２０１６）。さらに、同量の同等に純粋な（例えば、９８％超の）化学工学および生体工学によるＲＮＡ剤の産生コストを直接比較することはできないが、ＲＮＡ生体工学技術は、研究開発用の高純度な標的ＲＮＡｉ分子の安定した大量生産において費用効果が高いことが証明されている（Ｙｕ ｅｔ ａｌ．２０１９）。

【０３１０】

以前の研究では２６０ヌクレオチド未満のｎｃＲＮＡしか提供されていなかったところ、本研究では、細菌発酵によって長さ約３００ヌクレオチドの長いｎｃＲＮＡ分子の一貫した高レベルの発現を達成することができた。このアプローチにより、２つの標的低分子ＲＮＡを１つの長いＣＯ－ＢＥＲＡに組み立て、マルチターゲティングに使用することもできた。５種類の弾頭低分子ＲＮＡ、すなわちｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｌｅｔ－７ｃ、ＮＲＦ２－ｓｉＲＮＡ、およびアンチｍｉＲ－２１が、ＮＳＣＬＣでのそれらの抗腫瘍活性のために選択された。ＳＴＡＴ３、ＣＤＫ４／６、およびＲＡＳなどの多くのがん遺伝子を標的とする腫瘍抑制ｍｉＲＮＡである、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３４ａ、およびｌｅｔ－７ｃ（Ｈａｔｚｉａｐｏｓｔｏｌｏｕ ｅｔ ａｌ．２０１１、Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．２００５、Ｓｕｎ ｅｔ ａｌ．２００８）は、一般的に染色体異常またはメチル化のためにＮＳＣＬＣ組織または細胞で調節不全となっている（Ｈｅｒｍｅｋｉｎｇ ２０１０、Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．２０１０）。対照的に、ＰＴＥＮおよびＰＤＣＤ４などの腫瘍抑制遺伝子を標的とするｍｉＲ－２１（Ａｓａｎｇａｎｉ ｅｔ ａｌ．２００８、Ｍｅｎｇ ｅｔ ａｌ．２００７）は、通常、ＮＳＣＬＣで過剰発現する。核因子赤芽球－２関連因子－２（ＮＲＦ２）は、種々のメカニズムを通じてＮＳＣＬＣで構成的に活性化され、細胞増殖および化学感受性に重要な役割を果たす（Ｂａｒ－Ｐｅｌｅｄ ｅｔ ａｌ．２０１７、Ｙａｍａｄｏｒｉ ｅｔ ａｌ．２０１２）。ｍｉＲＮＡおよびアンタゴミル剤をそれぞれ介する腫瘍抑制ｍｉＲＮＡの回復および腫瘍促進ＲＮＡの阻害は、がんを治療するための新しい戦略を表している。実際、これらのＣＯ－ＢＥＲＡは、試験した

すべてのヒトＮＳＣＬＣ細胞株に対して強力な抗増殖活性を示したが、根底にあるマルチターゲティングの機序はさらなる検証が求められる。

【０３１１】

各ＣＯ－ＢＥＲＡは全細菌ＲＮＡの４０％超を占めたが、個々のＣＯ－ＢＥＲＡは、同体積の微生物発酵から種々の量の全ＲＮＡをもたらし、これは、ＣＯ－ＢＥＲＡの構造、安定性、および生物学的特性に関係する可能性がある。興味深い観察は、ドッキングされた低分子ＲＮＡに加えて、ｔＲＮＡは全ＲＮＡの収率にも影響を及ぼすように見えることである。６つのＣＯ－ＢＥＲＡはロイシンｔＲＮＡ足場で産生され、４つはセリンｔＲＮＡで産生された。ロイシンｔＲＮＡで組み立てられたＣＯ－ＢＥＲＡでは抽出された全ＲＮＡの平均量は２９．８ｍｇ／Ｌ細菌培養液であったが、セリンｔＲＮＡを含むＣＯ－ＢＥＲＡの平均量は１７．５ｍｇ／Ｌであった。これはおそらく、ＣＯ－ＢＥＲＡがＥ．ｃｏｌｉに蓄積される際の安定性の違いおよび／または宿主細菌に対する毒性の可能性によるものである。さらに、ｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｍｉＲ－３４ａ／ｍｉＲ－１２４とｈｔＲＮＡ^{Ｌｅｕ}／ｍｉＲ－１２４／ｍｉＲ－３４ａは１リットルの細菌培養あたり同様な量の全ＲＮＡを提供したため、ＣＯ－ＢＥＲＡにおける低分子ＲＮＡの順序は、全ＲＮＡの収率に影響を及ぼすとは見られない。種々の要因の影響およびその根底にあるメカニズムを理解することで、ＲＮＡ生物工学技術の改善およびＣＯ－ＢＥＲＡの産生が促進されるであろう。

【０３１２】

ＣＯ－ＢＥＲＡの精製は、単カラムまたはマルチカラムのＦＰＬＣ法を使用することにより達成された。ほとんどのＣＯ－ＢＥＲＡは、１回のＦＰＬＣ分離後に９９％純粋であり、１リットルの細菌培養から数ミリグラムの即時使用可能なＣＯ－ＢＥＲＡが得られた。他は追加カラムでさらなる精製を要したため、全体的な収率も低かった。純度の低い一部のＣＯ－ＢＥＲＡでは尿素－ＰＡＧＥゲルに余分なバンドが見られたが、これは形質転換されていないＥ．ｃｏｌｉでは見られなかった。このバンドは、短縮型、転写後修飾、もしくは別の折りたたまれ方がされた種などの、ＣＯ－ＢＥＲＡの改変形態、または単にＣＯ－ＢＥＲＡ発現プラスミドによる形質転換のために上方制御された細菌ＲＮＡを表し得る。このような「不純物」の性質を同定するには、ＲＮＡ配列決定などのさらなる調査が必要になり得る。より広範な構造的研究および機能的研究に必要なより純粋な産物を得るために、代替方法を検討するか、現在の方法を改良することができる。

【０３１３】

要約すると、本発明者らは、マルチターゲティングの展望を有する複数の弾頭低分子ＲＮＡを保持する、長さ約３００ヌクレオチドの新規単一ｎｃＲＮＡ分子を産生するための新しいアプローチを確立した。この方法は、数日間以内で１リットルの細菌培養物からミリグラム量の標的ＣＯ－ＢＥＲＡを産生するために容易に適合させることができる。最も重要なことは、ＣＯ－ＢＥＲＡは生細胞で産生され折りたたまれるため、細胞ＲＮＡの特性をより適切に捉えることができる。このように、生物製剤ＲＮＡのこのユニークな多重化は、細胞調節メカニズムの調査およびｎｃＲＮＡ治療法の開発を含むがこれらに限定されない、幅広い生物医学研究のために、現在のツールへの非常に貴重な追加となるであろう。

実施例４のための参照文献

Ａｌｅｇｒｅ Ｆ，Ｏｒｍｏｎｄｅ ＡＲ，Ｓｎｉｄｅｒ ＫＭ，Ｗｏｏｌａｒｄ Ｋ，Ｙｕ ＡＭ，Ｗｉｔｔｅｎｂｕｒｇ ＬＡ（２０１８）Ａ ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｍｉｃｒｏＲＮＡ－３４ａ ｐｒｏｄｒｕｇ ｄｅｍｏｎｓｔｒａｔｅｓ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｉｎ ａ ｃａｎｉｎｅ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｏｓｔｅｏｓａｒｃｏｍａ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ １３（１２）：ｅ０２０９９４１

Ａｍｂｒｏｓ Ｖ（２００４）Ｔｈｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ ｏｆ ａｎｉｍａｌ ｍｉｃｒｏＲＮＡｓ．Ｎａｔｕｒｅ ４３１（７００６）：３５０－５

Ａｓａｎｇａｎｉ ＩＡ，Ｒａｓｈｅｅｄ ＳＡ，Ｎｉｋｏｌｏｖａ ＤＡ，Ｌｅｕｐｏｌｄ ＪＨ，Ｃｏｌｂｕｒｎ ＮＨ，Ｐｏｓｔ Ｓ，Ａｌｌｇａｙｅｒ Ｈ（２００８）ＭｉｃｒｏＲＮＡ－２１（ｍｉＲ－２１）ｐｏｓｔ－ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌｌｙ

downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. Oncogene 27(15):2128-36
Bar-Peled L, Kemper EK, Suciu RM, Vinogradova EV, Backus KM, Horning BD, Paul TA, Ichu TA, Svensson RU, Olucha J, Chang MW, Kok BP, Zhu Z, Ihle NT, Dix MM, Jiang P, Hayward MM, Saez E, Shaw RJ, Cravatt BF (2017) Chemical proteomics identifies druggable vulnerabilities in a genetically defined cancer. Cell 171(3):696-709 e23
Bramsen JB, Kjems J (2012) Development of therapeutic-grade small interfering RNAs by chemical engineering. Front Genet 3:154
Chen QX, Wang WP, Zeng S, Urayama S, Yu AM (2015) A general approach to high-yield biosynthesis of chimeric RNAs bearing various types of functional small RNAs for broad applications. Nucleic Acids Res 43(7):3857-69
Esteller M (2011) Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet 12(12):861-74
Gaudin C, Nonin-Lecomte S, Tisne C, Corvaisier S, Bordeau V, Dardel F, Felden B (2003) The tRNA-like domains of E. coli and A. aeolicus transfer-messenger RNA: structural and functional studies. J Mol Biol 331(2):457-471
Hatziapostolou M, Polytarchou C, Aggelidou E, Drakaki A, Poultsides GA, Jaeger SA, Ogata H, Karin M, Struhl K, Hadzopoulou-Cladaras M, Iliopoulos D (2011) An HNF4a-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. Cell 147(6):1233-47
Hermeking H (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. Cell Death Differ 17(2):193-9
Ho PY, Duan Z, Batra N, Jilek JL, Tu MJ, Qiu JX, Hu Z, Wun T, Lara PN, DeVere White RW, Chen HW, Yu AM (2018) Bioengineered noncoding RNAs selectively change cellular miRNome profiles for cancer therapy. J Pharmacol Exp Ther 365(3):494-506
Ho PY, Yu AM (2016) Bioengineering of noncoding RNAs for research agents and therapeutics. Wiley Interdiscip Rev RNA 7(2):186-97
Hutchinson CR (1998) Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. Curr Opin Microbiol 1(3):319-29
Jian C, Tu MJ, Ho PY, Duan Z, Zhang Q, Qiu JX, DeVere White RW, Wun T, Lara PN, Lam KS, Yu AX,

Yu AM (2017) Co-targeting of DNA, RNA, and protein molecules provides optimal outcomes for treating osteosarcoma and pulmonary metastasis in spontaneous and experimental metastasis mouse models. Oncotarget 8 (19) : 30742-30755
Jilek JL, Zhang QY, Tu MJ, Ho PY, Duan Z, Qiu JX, Yu AM (2019) Bioengineered let-7c inhibits orthotopic hepatocellular carcinoma and improves overall survival with minimal immunogenicity. Mol Ther Nucleic Acids 14 : 498-508
Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 120 (5) : 635-47
Khvorova A, Watts JK (2017) The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nat Biotechnol 35 (3) : 238-248
Knight V, Sanglier JJ, DiTullio D, Braccili S, Bonner P, Waters J, Hughes D, Zhang L (2003) Diversifying microbial natural products for drug discovery. Appl Microbiol Biotechnol 62 (5-6) : 446-58
Leader B, Baca QJ, Golan DE (2008) Protein therapeutics : a summary and pharmacological classification. Nat Rev Drug Discov 7 (1) : 21-39
Levin AA (2019) Treating disease at the RNA level with oligonucleotides. N Engl J Med 380 (1) : 57-70
Li MM, Addepalli B, Tu MJ, Chen QX, Wang WP, Limbach PA, LaSalle JM, Zeng S, Huang M, Yu AM (2015) Chimeric microRNA-1291 biosynthesized efficiently in Escherichia coli is effective to reduce target gene expression in human carcinoma cells and improve chemosensitivity. Drug Metab Dispos 43 (7) : 1129-36
Li MM, Wang WP, Wu WJ, Huang M, Yu AM (2014) Rapid production of novelプレmicroRNA agent hsa-mir-27b in Escherichia coli using recombinant RNA technology for functional studies in mammalian cells. Drug Metab Dispos 42 (11) : 1791-5
Li PC, Tu MJ, Ho PY, Jilek JL, Duan Z, Zhang QY, Yu AX, Yu AM (2018) Bioengineered NRF2-siRNA is effective to interfere with NRF2 pathways and improve chemosensitivity of human

cancer cells. Drug Metab Dispos 46 (1) : 2-10
Li X, Tian Y, Tu MJ, Ho PY, Batra N, Yu AM (2019) Bioengineered miR-27b-3p and miR-328-3p modulate drug metabolism and disposition via the regulation of target ADME gene expression. Acta Pharm Sin B [ePub ahead of print]
Lin PY, Yu SL, Yang PC (2010) MicroRNA in lung cancer. Br J Cancer 103 (8) : 1144-8
Liu Y, Stepanov VG, Strych U, Willson RC, Jackson GW, Fox GE (2010) DNAzyme-mediated recovery of small recombinant RNAs from a 5S rRNA-derived chimera expressed in Escherichia coli. BMC biotechnology 10 : 85
Liu YP, Berkhout B (2011) miRNA cassettes in viral vectors : problems and solutions. Biochimica et biophysica acta 1809 (11-12) : 732-45
Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology 133 (2) : 647-58
Nelissen FHT, Leunissen EHP, van de Laar L, Tessari M, Heus HA, Wijmenga SS (2012) Fast production of homogeneous recombinant RNA-towards large-scale production of RNA. Nucleic Acids Res 40 (13)
Paige JS, Nguyen-Duc T, Song W, Jaffrey SR (2012) Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. Science 335 (6073) : 1194
Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. Science 333 (6042) : 642-6
Pereira P, Pedro AQ, Queiroz JA, Figueiras AR, Sousa F (2017) New insights for therapeutic recombinant human miRNAs heterologous production : Rhodovolum sulfidophilum vs Escherichia coli. Bioengineered 8 (5) : 670-677
Pereira P, Pedro AQ, Tomas J, Maia CJ, Queiroz JA, Figueiras A, Sousa F (2016a) Advances in time course extracellular production of humanプレmiR-29b from Rhodovulum sulfidophilum. Appl Microbiol Biotechnol 100 (8) : 3723-34
Pereira PA, Tomas JF, Queiroz JA, Figueiras AR, Sousa F (2016b) Recombinant pre-miR-29b for Alzheimer s disease therapeutics. Sci Rep 6 : 19946
Pitulle C, Hedenstierna KO, Fox GE (1995) An

ovel approach for monitoring genetically engineered microorganisms by using artificial, stable RNAs. Appl Environ Microbiol 61(10):3661-6
Ponchon L, Beauvais G, Nonin-Lecomte S, Dardel F (2009) A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in Escherichia coli using a tRNA scaffold. Nat Protoc 4(6):947-59
Ponchon L, Dardel F (2007) Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. Nat Methods 4(7):571-6
Ranaei-Siadat E, Merigoux C, Seijo B, Poncho n L, Saliou JM, Bernauer J, Sanglier-Cianferani S, Dardel F, Vachette P, Nonin-Lecomte S (2014) In vivo tmRNA protection by SmpB and pre-ribosome binding conformation in solution. RNA 20(10):1607-20
Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Front Microbiol 5:172
Schindler D, Dai J, Cai Y (2018) Synthetic genomics: a new venture to dissect genome fundamentals and engineer new functions. Curr Opin Chem Biol 46:56-62
Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X (2008) Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. FEBS letters 582(10):1564-8
Tu MJ, Ho PY, Zhang QY, Jian C, Qiu JX, Kim EJ, Bold RJ, Gonzalez FJ, Bi H, Yu AM (2019) Bioengineered miRNA-1291 prodrug therapy in pancreatic cancer cells and patient-derived xenograft mouse models. Cancer Lett 442:82-90
Wang WP, Ho PY, Chen QX, Addepalli B, Limbach PA, Li MM, Wu WJ, Jilek JL, Qiu JX, Zhang HJ, Li T, Wun T, White RD, Lam KS, Yu AM (2015) Bioengineering novel chimeric microRNA-34a for prodrug cancer therapy: High-yield expression and purification, and structural and functional characterization. J Pharmacol Exp Ther 354(2):131-41
Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Morishima Y, Kurishima K, Itoh K, Yamamoto M, Minami Y, Noguchi M, Hizawa N (2012) Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. Oncogene 31(45):4768-77
Yu AM, Jian C, Yu AH, Tu MJ (2019) RNA therapy

：Are we using the right molecules？Pharmacol Ther １９６：９１－１０４
Zhang K，Lu X，Li Y，Jiang X，Liu L，Wang H（２０１９）New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in Zymomonas mobilis．Appl Microbiol Biotechnol
Zhang X，Potty AS，Jackson GW，Stepanov V，Tang A，Liu Y，Kourentzi K，Strych U，Fox GE，Willson RC（２００９）Engineered 5S ribosomal RNAs displaying aptamers recognizing vascular endothelial growth factor and malachite green．J Mol Recognit ２２（２）：１５４－６１
Zhao Y，Tu MJ，Wang WP，Qiu JX，Yu AX，Yu AM（２０１６）Genetically engineered pre－microRNA－３４ａ prodrug suppresses orthotopic osteosarcoma xenograft tumor growth via the induction of apoptosis and cell cycle arrest．Sci Rep ６：２６６１１

【０３１４】

本開示は以下の実施形態を含む。

実施形態１

２つ以上のプレマイクロＲＮＡ（プレｍｉＲＮＡ）に作動可能に連結されたｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドであって、前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡの各々が、前記プレｍｉＲＮＡに対して異種である挿入ＲＮＡ分子に作動可能に連結されている、ポリヌクレオチド。

実施形態２

前記ｔＲＮＡのステムループアンチコドンの全部または一部が、前記プレｍｉＲＮＡで置き換えられている、実施形態１に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３

前記挿入ＲＮＡ分子が、
ａ）前記プレｍｉＲＮＡの５’末端、
ｂ）前記プレｍｉＲＮＡの３’末端、
ｃ）前記プレｍｉＲＮＡのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の５’、または
ｄ）前記プレｍｉＲＮＡのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の３’
に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、実施形態１または２に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４

前記ポリヌクレオチドが、約２７５ヌクレオチド以上、例えば、約２８０ヌクレオチド以上、例えば、約２９０ヌクレオチド以上、かつ約４００ヌクレオチドまでの長さである、実施形態１～３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態５

前記ｔＲＮＡが、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するか、またはそれをコードするｔＲＮＡである、実施形態１～４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態６

前記ｔＲＮＡをコードするＲＮＡが、表８に示される配列番号３００～３５５に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８

％、９９％または１００％の配列同一性を有する５’ｔＲＮＡ配列および３’ｔＲＮＡ配列を含む、実施形態１～５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態７

前記ｔＲＮＡが、哺乳動物ｔＲＮＡ、例えばヒトｔＲＮＡである、実施形態１～６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態８

前記２つ以上のプレマイクロＲＮＡが、ヒトプレｍｉＲＮＡ分子に由来する、実施形態１～７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態９

前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡが、プレｍｉＲ－３４ａ、プレｍｉＲ－１２４、プレｍｉＲ－１２９１、プレｍｉＲ－２００ｂ、プレｍｉＲ－２００ａ、プレｍｉＲ－１４１、プレｍｉＲ－４２９、プレｍｉＲ－１３３ａ、プレｌｅｔ－７ｃ、プレｍｉＲ－１２５ａ、プレｍｉＲ－３２８、プレｍｉＲ－１２６、プレｍｉＲ－２９８、プレｍｉＲ－１４８、プレｍｉＲ－１４４、プレｍｉＲ－１、プレｍｉＲ－１３３、プレｍｉＲ－８８８、プレｍｉＲ－６７７５、プレｍｉＲ－３７４、プレｍｉＲ－９２、プレｍｉＲ－１１８０、プレｍｉＲ－２１８、プレｍｉＲ－７、プレｍｉＲ－３７８、プレｍｉＲ－１７、プレｍｉＲ－１８ａ、プレｍｉＲ－２２、プレｍｉＲ－１２２、プレｍｉＲ－３０ｂ、プレｍｉＲ－４４９、プレｍｉＲ－５０６、プレｍｉＲ－９８、プレｍｉＲ－４４５８、プレｍｉＲ－２０６、プレｍｉＲ－５１９、プレｍｉＲ－９３、プレｍｉＲ－１０６、プレｍｉＲ－３７３、およびプレｍｉＲ－５２０からなる群から選択される、実施形態１～８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１０

前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡが、同じプレｍｉＲＮＡ分子に由来する、実施形態１～９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１１

前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡが、ヒトプレｍｉＲ－３４ａ分子に由来する、実施形態１０に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１２

前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡが、異なるプレｍｉＲＮＡ分子に由来する、実施形態１～９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１３

前記挿入ＲＮＡが、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、触媒ＲＮＡ、リボスイッチ、ＲＮＡアプタマーからなる群から選択される、実施形態１～１２のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１４

前記挿入ＲＮＡが、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約２００個までのヌクレオチドを有する、実施形態１～１３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１５

前記挿入ＲＮＡが、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約５０個までのヌクレオチドを有する、実施形態１４に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１６

前記挿入ＲＮＡが、少なくとも約２０個のヌクレオチドかつ最大約２５個までのヌクレオチドを有する、実施形態１４に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１７

前記挿入ＲＮＡが、成熟ｍｉＲＮＡである、実施形態１～１６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１８

前記挿入ＲＮＡが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される２つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、実施形態１～１７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態１９

前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡにおける前記挿入ＲＮＡが同じである、実施形態１～１８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２０

前記２つ以上のプレｍｉＲＮＡにおける前記挿入ＲＮＡが異なる、実施形態１～１８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２１

前記挿入ＲＮＡが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４からなる群から選択される、実施形態１～２０のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２２

前記挿入ＲＮＡが、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである、実施形態１～２０のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２３

前記挿入ＲＮＡが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２２４からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである、実施形態１～２０のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２４

さらに、前記ｔＲＮＡおよび／またはプレｍｉＲＮＡが、１つ以上のアプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、または触媒ＲＮＡに作動可能に連結されている、実施形態１～２３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２５

前記アプタマー、ｓａＲＮＡまたは触媒ＲＮＡが、

ａ）前記プレｍｉＲＮＡの５’末端、

ｂ）前記プレｍｉＲＮＡの３’末端、

ｃ）前記プレｍｉＲＮＡのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の５、または

ｄ）前記プレｍｉＲＮＡのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の３’

に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、実施形態２４に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２６

前記アプタマーが、セフェデックス、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（ＦＬＴ１）、テオフィリン、マラカイトグリーン、ＨＣＣ－２２－５、ケラチン２３（ＫＲＴ２３）、アルファ２－ＨＳ糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、フェリチン軽鎖（ＦＴＬ）、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４、ＮＹ－ＥＳＯ－１、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３、サイクリンＢ１、ＫＩＦ２０Ａ、ＭＵＣ１、ＣＡ１９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、ＴＡＧ－７２、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ

－カドヘリン、ＳｉＳｏ細胞で発現する受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）、およびＳＣ６からなる群から選択される標的抗原に結合するものである、実施形態２４～２５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２７

前記アプタマーが、配列番号３５６～３５９のうちの１つに対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む核酸配列を含む、実施形態２４～２６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２８

前記ポリヌクレオチドが、配列番号１８３～２１０、２６５～２８８および２９６～２９８のうちのいずれか１つに対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む、実施形態１～２７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態２９

プレｍｉＲＮＡに作動可能に連結されたｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが、配列番号８５～１８２および２１１～２６４のうちのいずれか１つに対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を含む、ポリヌクレオチド。

実施形態３０

挿入ＲＮＡ分子を含むプレｍｉＲＮＡに作動可能に連結されたヒトｔＲＮＡを含むポリヌクレオチドであって、例えば、前記挿入ＲＮＡ分子が、前記プレｍｉＲＮＡに対して異種であり、前記ポリヌクレオチドが、配列番号２８９～２９５のうちのいずれか１つに対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む、ポリヌクレオチド。

実施形態３１

前記ｔＲＮＡのステムループアンチコドンの全部または一部が、前記プレｍｉＲＮＡで置き換えられている、実施形態３０に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３２

前記ポリヌクレオチドが、約１５０ヌクレオチド以上、例えば、約１６０ヌクレオチド以上、例えば、約１７０ヌクレオチド以上、例えば、約１８０ヌクレオチド以上、かつ約２３０ヌクレオチドまでの長さである、実施形態３０～３１のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３３

前記ｔＲＮＡが、セリン、ロイシン、グリシン、グルタメート、アスパルテート、グルタミン、アルギニン、システイン、リジン、メチオニン、アスパラギン、アラニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、およびバリンからなる群から選択されるアミノ酸に由来するか、またはそれをコードするｔＲＮＡである、実施形態３０～３２のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３４

前記ｔＲＮＡをコードする前記ＲＮＡが、表８に提供される配列番号３００～３５５に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する５’ｔＲＮＡ配列および３’ｔＲＮＡ配列を含む、実施形態３０～３３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３５

前記ｔＲＮＡが、哺乳動物ｔＲＮＡ、例えばヒトｔＲＮＡである、実施形態３０～３４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３６

前記挿入ＲＮＡが、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、成熟マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、短いヘアピン型ＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、Ｐｉｗｉ結合ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓ

ｎｏＲＮＡ）、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、触媒ＲＮＡ、リボスイッチ、およびＲＮＡアプタマーからなる群から選択される、実施形態３０～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３７

前記挿入ＲＮＡが、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約２００個までのヌクレオチドを有する、実施形態３０～３６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３８

前記挿入ＲＮＡが、少なくとも約１８個のヌクレオチドかつ最大約５０個までのヌクレオチドを有する、実施形態３７に記載のポリヌクレオチド。

実施形態３９

前記挿入ＲＮＡが、少なくとも約２０個のヌクレオチドかつ最大約２５個までのヌクレオチドを有する、実施形態３７に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４０

前記挿入ＲＮＡが、成熟ｍｉＲＮＡである、実施形態３０～３９のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４１

前記挿入ＲＮＡが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡである、実施形態３０～４０のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４２

さらに、前記ｔＲＮＡおよび／またはプレｍｉＲＮＡが、アプタマー、低分子活性化ＲＮＡ（ｓａＲＮＡ）、または触媒ＲＮＡに作動可能に連結されている、実施形態３０～４１のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４３

前記アプタマー、ｓａＲＮＡまたは触媒ＲＮＡが、

ａ）前記プレｍｉＲＮＡの５’末端、

ｂ）前記プレｍｉＲＮＡの３’末端、

ｃ）前記プレｍｉＲＮＡのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の５’、または

ｄ）前記プレｍｉＲＮＡのダイサーもしくはＲＮａｓｅ切断部位の３’

に挿入される、近接する、または作動可能に連結される、実施形態４２に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４４

前記アプタマーが、セフェデックス、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（ＦＬＴ１）、テオフィリン、マラカイトグリーン、ＨＣＣ－２２－５、ケラチン２３（ＫＲＴ２３）、アルファ２－ＨＳ糖タンパク質（ＡＨＳＧ）、フェリチン軽鎖（ＦＴＬ）、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３／４、ＮＹ－ＥＳＯ－１、１４－３－３ζ、ｃ－Ｍｙｃ、ＭＤＭ２、ＮＰＭ１、ｐ１６、ｐ５３、サイクリンＢ１、ＫＩＦ２０Ａ、ＭＵＣ１、ＣＡ１９－９、ＤＵ－ＰＡＮ－２、ＴＡＧ－７２、カドヘリン３（ＣＤＨ３）／Ｐ－カドヘリン、ＳｉＳｏ細胞で発現する受容体結合がん抗原（ＲＣＡＳ１）、およびＳＣ６からなる群から選択される標的抗原に結合するものである、実施形態３０～４３のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４５

前記アプタマーが、配列番号３５６～３５９のうちの１つに対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む核酸配列を含む、実施形態３０～４４のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４６

配列番号８５～２９８に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む、実施形態１～４５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４７

前記プレｍｉＲＮＡが、天然由来または人工由来である、実施形態１～４６のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４８

前記ポリヌクレオチドが、哺乳動物に対して実質的に非免疫原性である、実施形態１～４７のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

実施形態４９

実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む発現カセット。

実施形態５０

実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態４９に記載の発現カセットを含む、リポソームまたはナノ粒子。

実施形態５１

実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態４９に記載の発現カセットを含む、ウイルスベクター。

実施形態５２

前記リポソームが、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）と複合体を形成した実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む内部コアと、外部脂質二重層とを含む、実施形態５０に記載のリポソームまたはナノ粒子。

実施形態５３

前記内部コアが、例えば約１０，０００ダルトンの分子量を有する、リポソーム分岐ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリプレックス（ＬＰＰ）を含む、実施形態５０～５２のいずれか一項に記載のリポソームまたはナノ粒子。

実施形態５４

前記外部脂質二重層が、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＯＴＭＡ）、コレステロールおよび１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥＧ２０００）の混合物を含む、実施形態５０～５３のいずれか一項に記載のリポソームまたはナノ粒子。

実施形態５５

実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態４９に記載の発現カセットまたは実施形態５０～５４のいずれか一項に記載のリポソームもしくはナノ粒子でトランスフェクトまたは形質転換された、宿主細胞。

実施形態５６

前記宿主細胞が、原核細胞または真核細胞である、実施形態５５に記載の宿主細胞。

実施形態５７

前記宿主細胞が、細菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞または植物細胞から選択される、実施形態５５または５６に記載の宿主細胞。

実施形態５８

必要とする対象において、がんの成長、増殖、および／または進行を予防、緩和、低減、逆転および／または阻害する方法であって、実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態４９に記載の発現カセットまたは実施形態５０～５４のいずれか一項に記載のリポソーム、ナノ粒子もしくはウイルスベクターを前記対象に投与することを含む、方法。

実施形態５９
前記がんが、乳がん、リンパ腫、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、および肺がんからなる群から選択される、実施形態５８に記載の方法。
実施形態６０
前記ポリヌクレオチドが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、ｍｉＲ－２２４、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－４２９、ｍｉＲ－１４８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－８８８、ｍｉＲ－６７７５、ｍｉＲ－３７４、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１１８０、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－７、ｍｉＲ－３７８、ｍｉＲ－１７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－２２、ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－３０ｂ、ｍｉＲ－４４９、ｍｉＲ－５０６、ｍｉＲ－９８、ｍｉＲ－４４５８、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－５１９、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－１０６、ｍｉＲ－３７３、およびｍｉＲ－５２０からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、実施形態５８または５９に記載の方法。
実施形態６１
前記がんが、肺がんであり、前記ポリヌクレオチドが、ｍｉＲ－３４ａおよびｍｉＲ－１２４からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、実施形態５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６２
前記がんが、膵臓がんであり、前記ポリヌクレオチドが、ｍｉＲ－１２９１、ｍｉＲ－３４、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２１６からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、実施形態５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６３
前記がんが、肝細胞がんであり、前記ポリヌクレオチドが、ｌｅｔ－７ｃ、ｍｉＲ－２９８、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－１２４、ｍｉＲ－３２８、ｍｉＲ－１４４、ｍｉＲ－１２６、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１８、ｍｉＲ－１２５ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－２００、およびｍｉＲ－２２４からなる群から選択される１つ以上の成熟ｍｉＲＮＡを含む、実施形態５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６４
前記ポリヌクレオチド、リポソームまたはナノ粒子が、静脈内、動脈内、腹腔内、腹腔内、肺内、肝内、皮下または腫瘍内から選択される経路を介して投与される、実施形態５８～６３のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６５
前記ポリヌクレオチド、リポソームまたはナノ粒子の治療レジメンが、複数回、例えば、毎日、毎週、隔週、毎月、例えば所定のまたは所望のエンドポイントに達するまで、投与される、実施形態５８～６４のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６６
前記対象が、がんの症状を示している、例えば、１つ以上の腫瘍を有している、実施形態５８～６５のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６７
前記対象が、寛解状態にあり、腫瘍を再発症するリスクがある、実施形態５８～６５のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６８
１つ以上の化学療法剤または抗がん剤の同時投与をさらに含む、実施形態５８～６７のいずれか一項に記載の方法。
実施形態６９
前記対象が、投与前に１つ以上のｍｉＲＮＡの過剰発現または過少発現について試験される、実施形態５８～６８のいずれか一項に記載の方法。
実施形態７０

配列番号８５～２９８に対して少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有する１つ以上のハイブリッドｔＲＮＡ／プレｍｉＲＮＡ分子を前記対象に投与することを含む、実施形態５８～６９のいずれか一項に記載の方法。

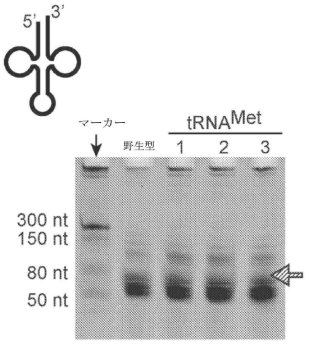
実施形態７１

実施形態１～４８のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは実施形態４９に記載の発現カセット、実施形態５０～５４のいずれか一項に記載のリポソーム、ナノ粒子もしくはウイルスベクター、および／または実施形態５５～５７のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、キット。

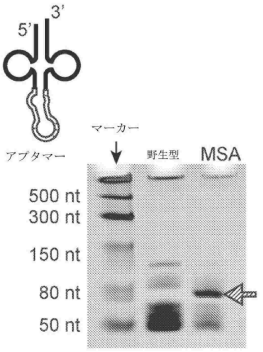
本明細書に記載の実施例および実施形態は、例示のみを目的としており、それに照らして種々の改変または変更が当業者に提案され、本出願の趣旨および範囲ならびに添付の特許請求の範囲に含まれるべきであることが理解されよう。本明細書で引用したすべての刊行物、特許、および特許出願は、あらゆる目的で、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

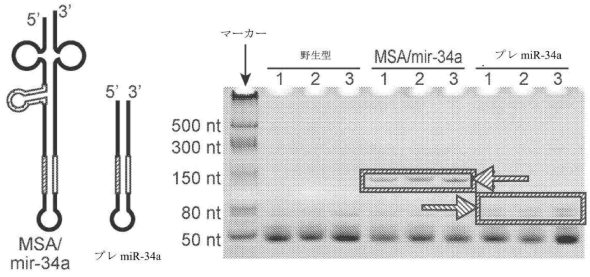
【図１Ａ】



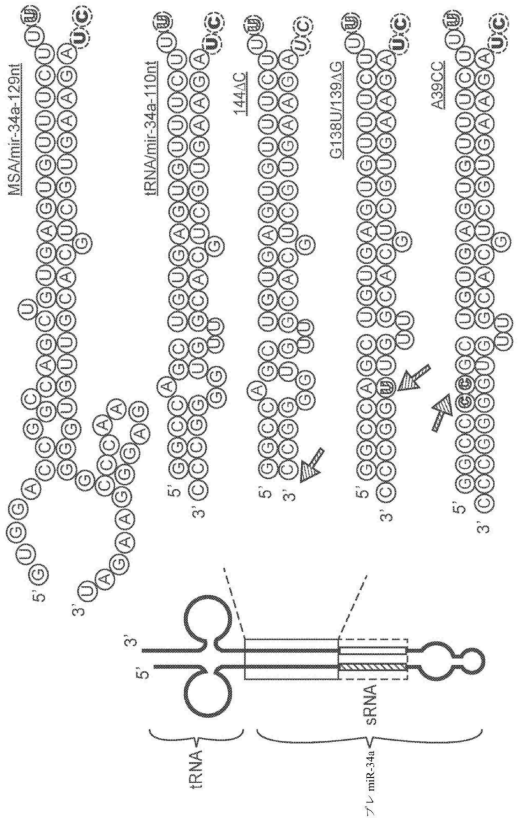
【図１Ｂ】



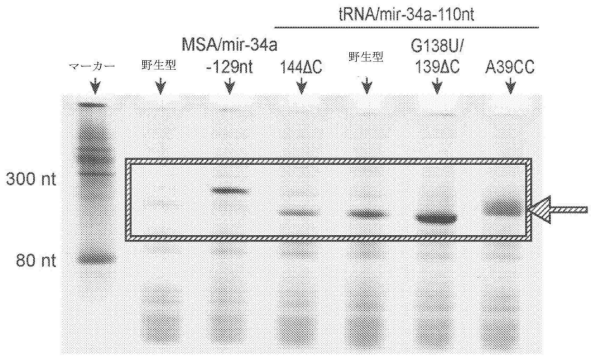
【図１Ｃ】



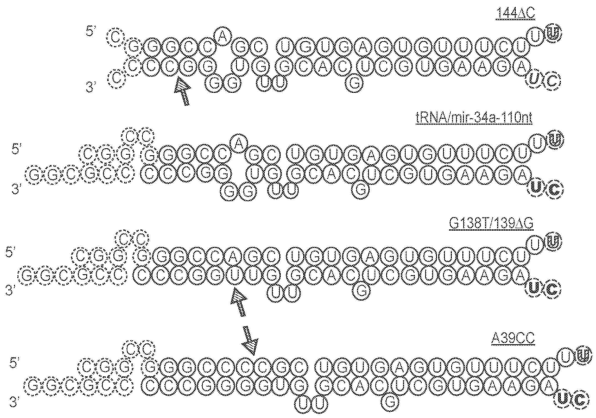
【図１Ｄ－１】



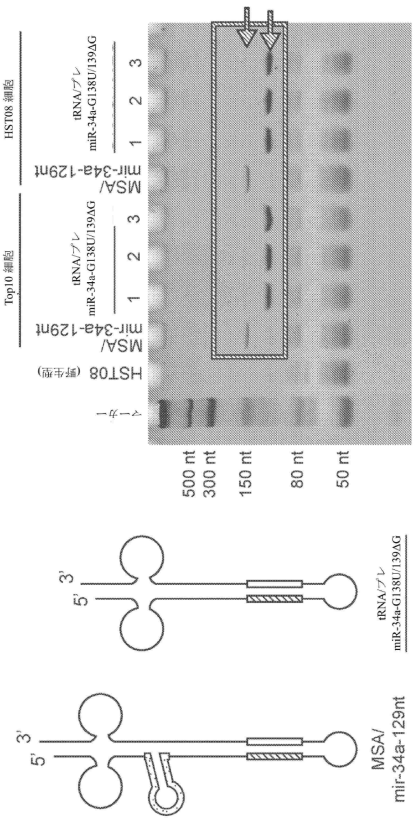
【図１Ｄ－２】



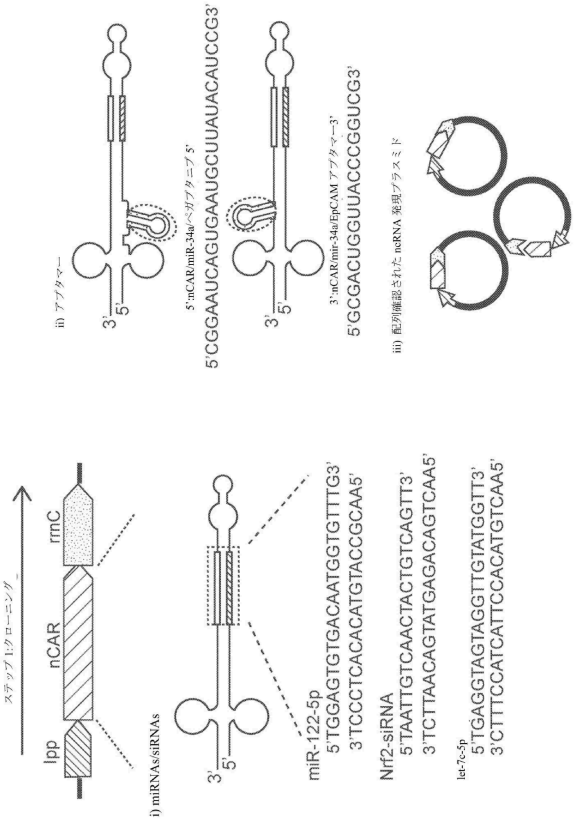
【図１Ｅ】



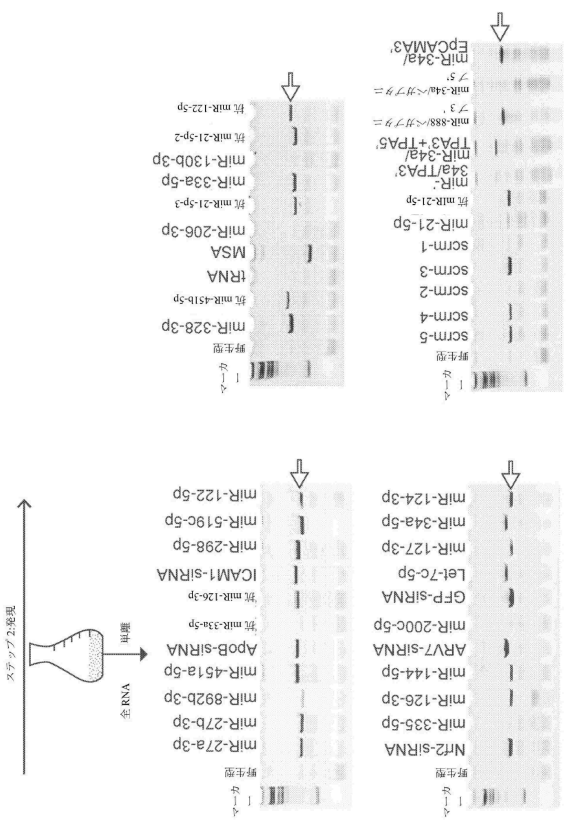
【図２】



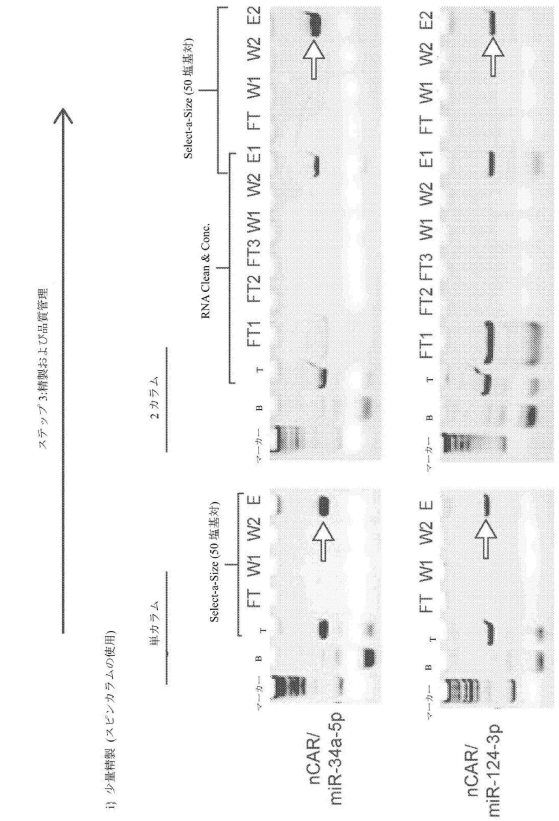
【図３Ａ】



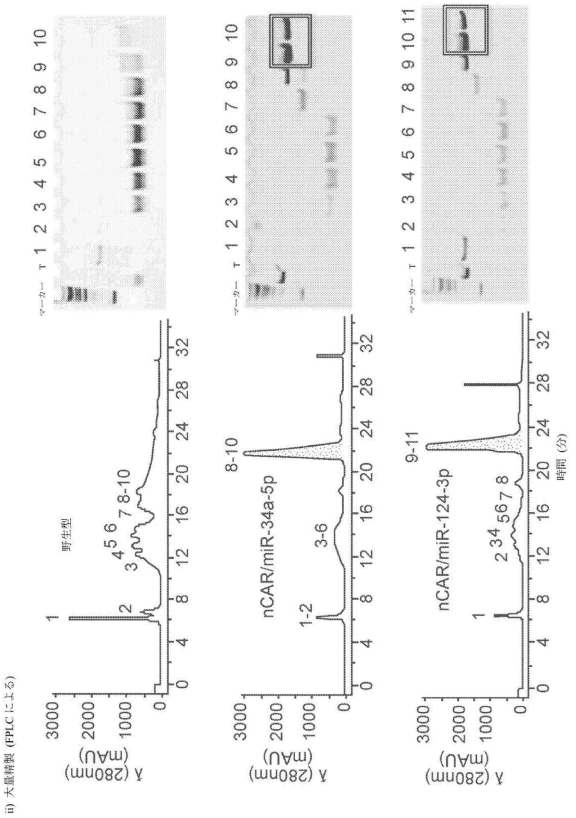
【図３Ｂ】



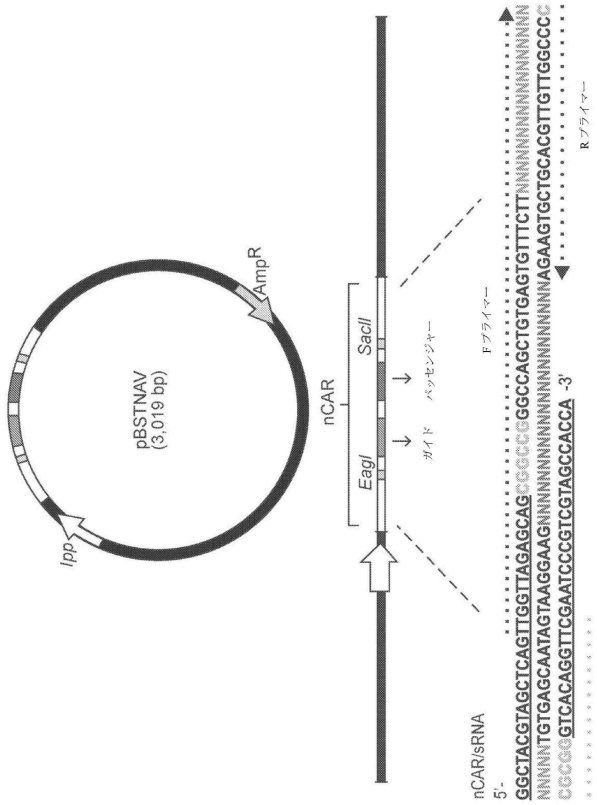
【図３Ｃ－１】



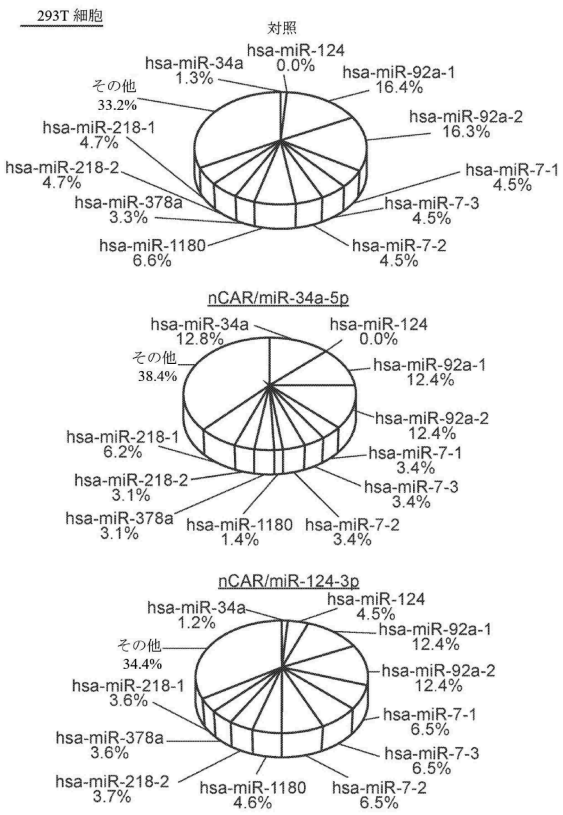
【図３Ｃ－２】



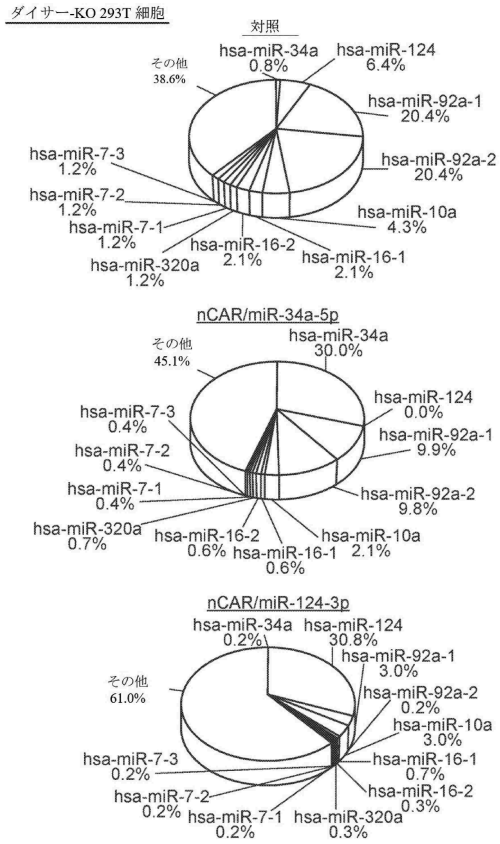
【図４】


pBSTNAV
(3,019 bp)
AmpR
lpp
nCAR
SacII
EagI
ガイド
パッセンジャー
Fプライマー
Rプライマー
nCAR/sRNA
5'-
GGCTACGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCAG
NNNNNTGTGAGCAATAGTAAGGAAGNNNN

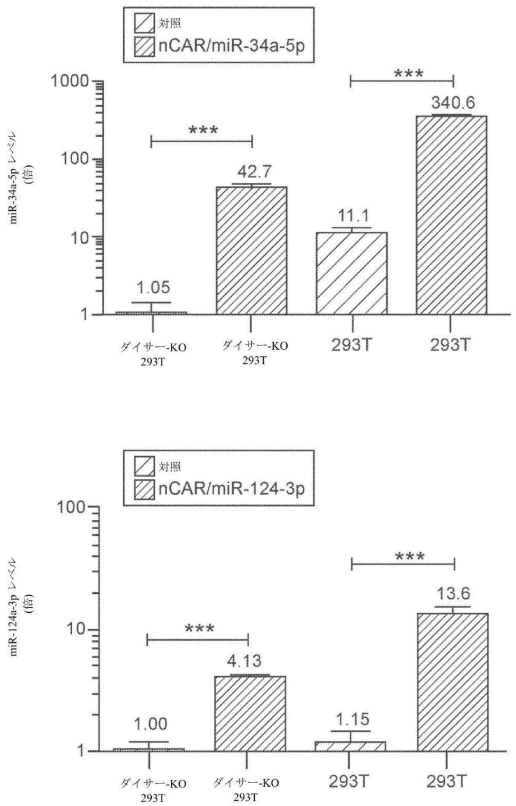
【図６Ｂ－１】



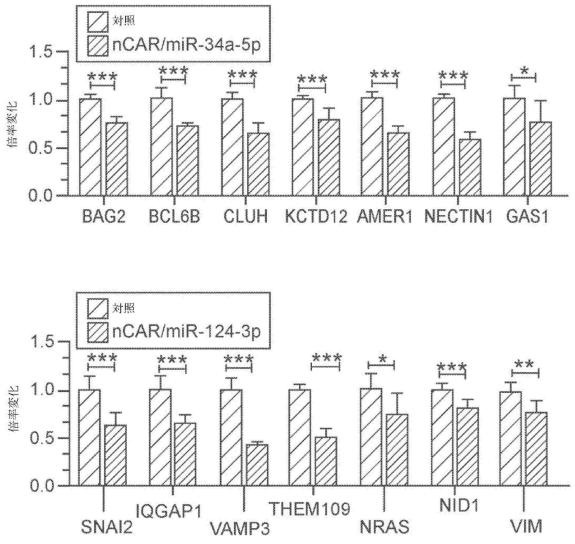
【図６Ｂ－２】



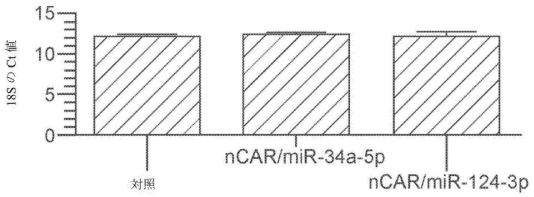
【図７Ａ】



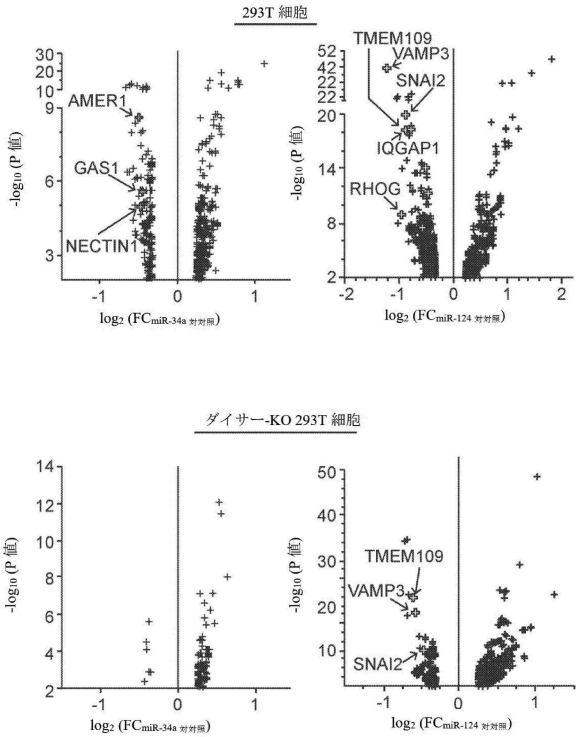
【図７Ｂ】



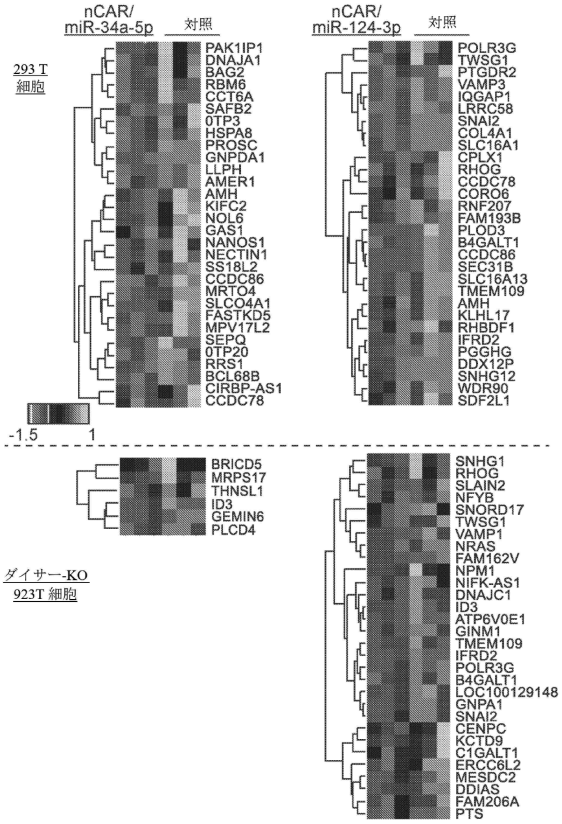
【図７Ｃ】



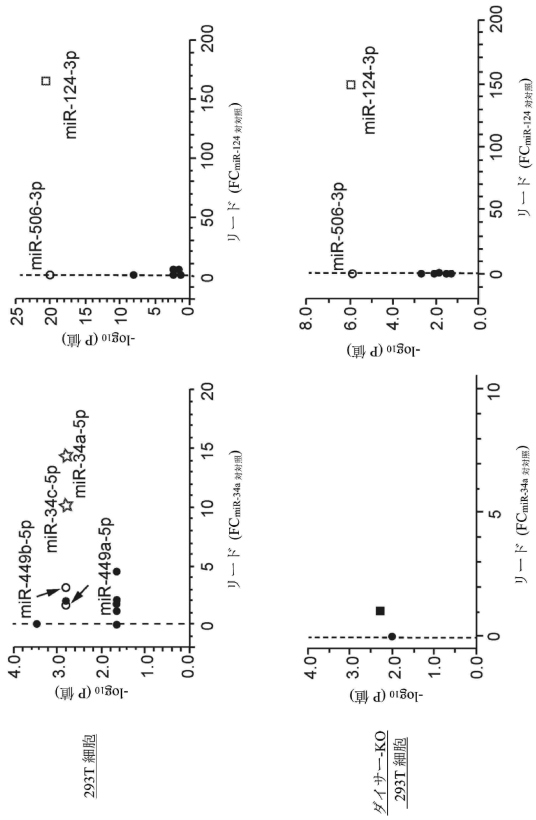
【図８Ａ】



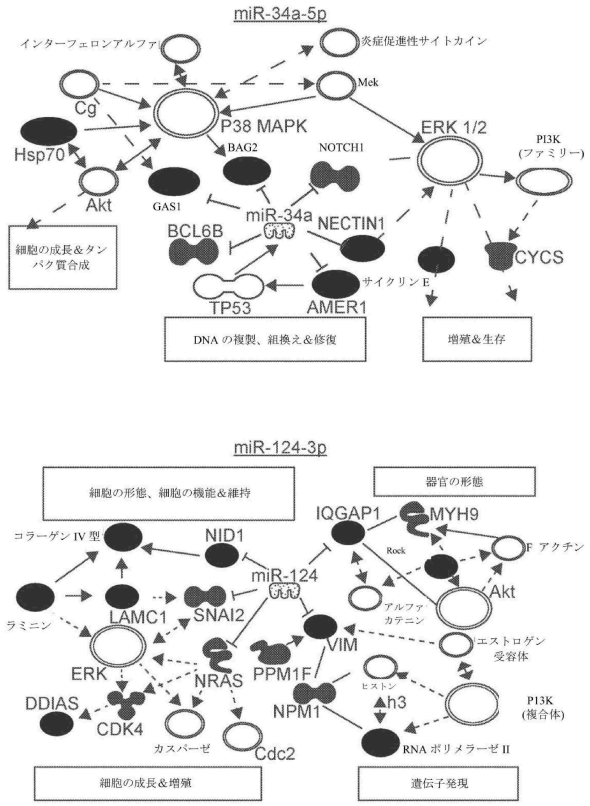
【図８Ｂ】



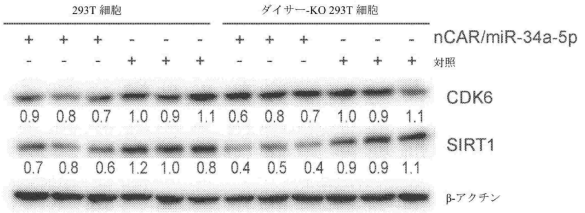
【図８Ｃ】



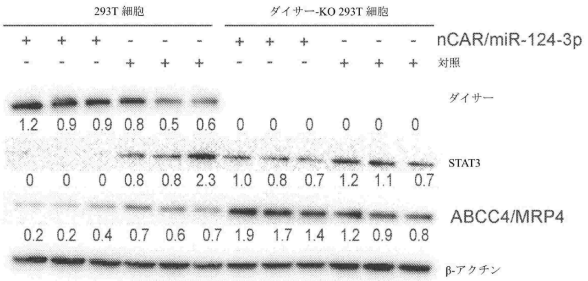
【図８Ｄ】



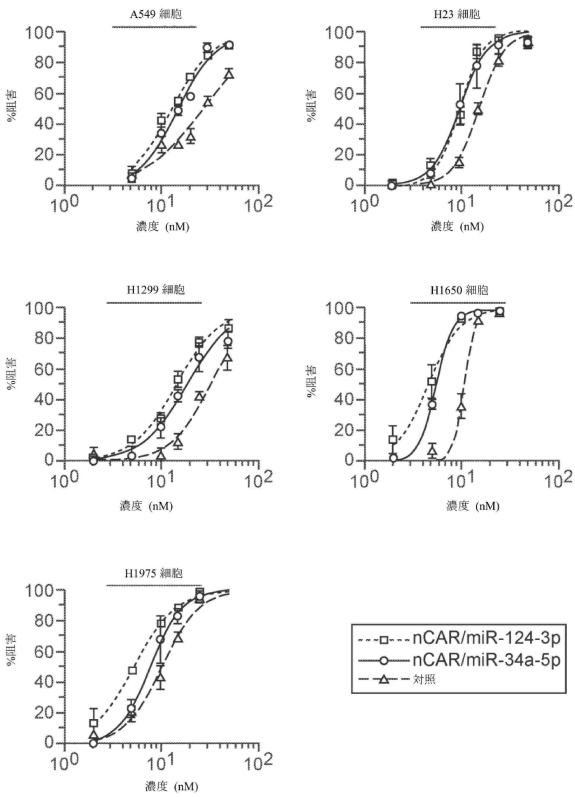
【図９Ａ】



【図９Ｂ】



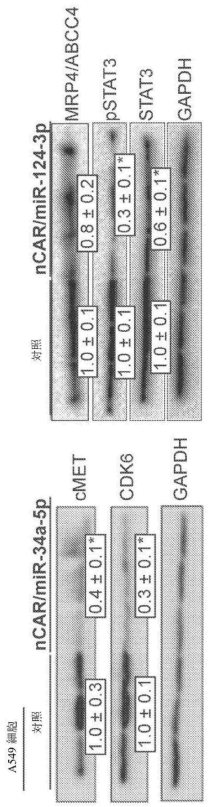
【図１０Ａ】



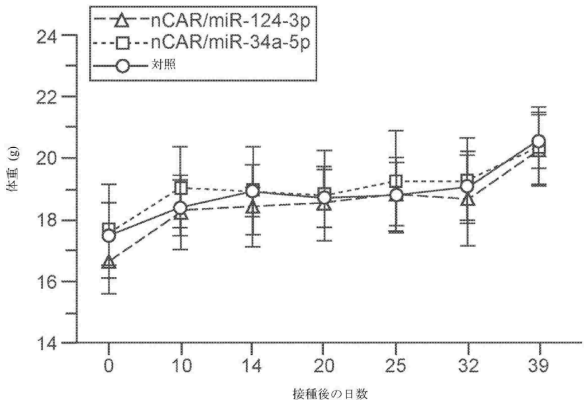
【図１０Ｂ】

細胞株	対照		nCAR/miR-34a-5p		nCAR/miR-124-3p	
	EC50 (nM)	ヒルスロープ	EC50 (nM)	ヒルスロープ	EC50 (nM)	ヒルスロープ
A549	26.5 ± 1.06	1.46 ± 0.14	14.8 ± 1.04***	2.24 ± 0.19**	12.6 ± 1.03***	2.09 ± 0.13*
H23	15.7 ± 1.03	3.27 ± 0.26	9.93 ± 1.05***	3.02 ± 0.43	9.96 ± 1.03***	3.55 ± 0.39
H1299	32.5 ± 1.05	2.12 ± 0.21	18.6 ± 1.06***	1.87± 0.19	14.4 ± 1.04***	1.93 ± 0.14
H1650	10.8 ± 1.02	7.42 ± 1.43	5.54 ± 1.01**	4.79 ± 0.30	4.54 ± 1.06***	2.63 ± 0.33**
H1975	10.2 ± 1.06	2.25 ± 0.29	7.80 ± 1.04	2.67± 0.23	5.22 ± 1.02**	2.00 ± 0.07

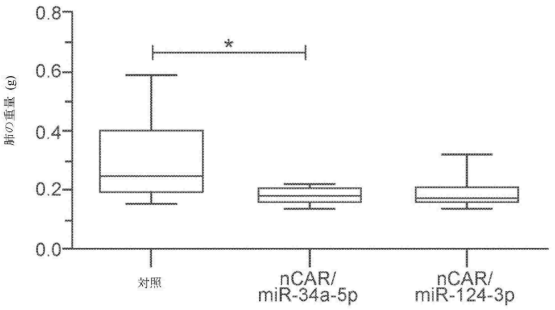
【図１０Ｃ】



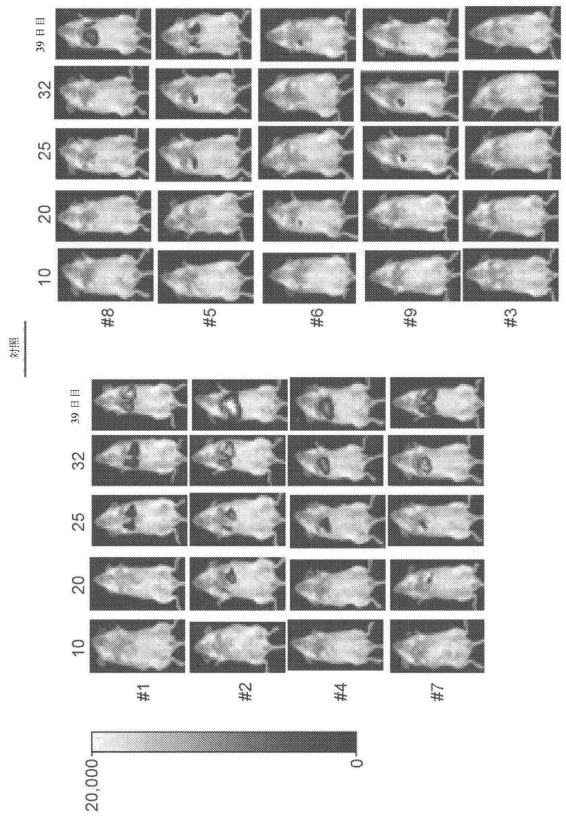
【図１１Ａ】



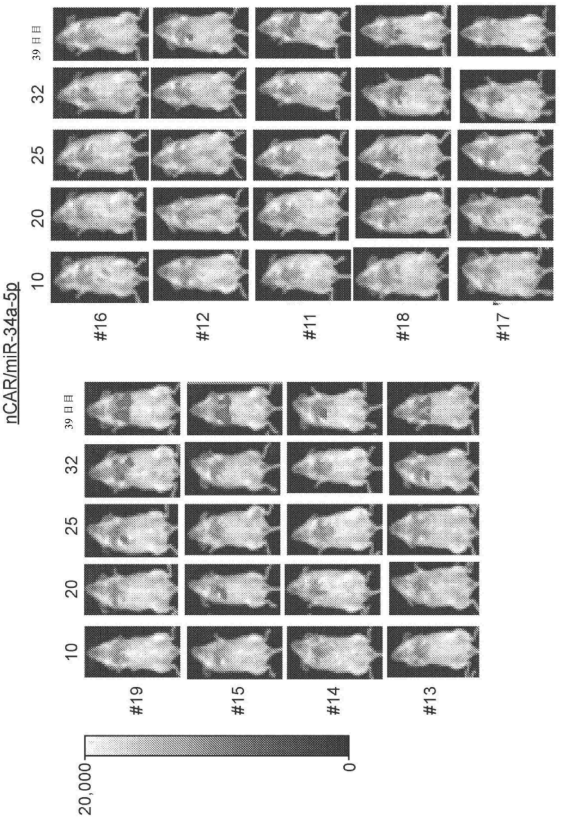
【図１１Ｂ】



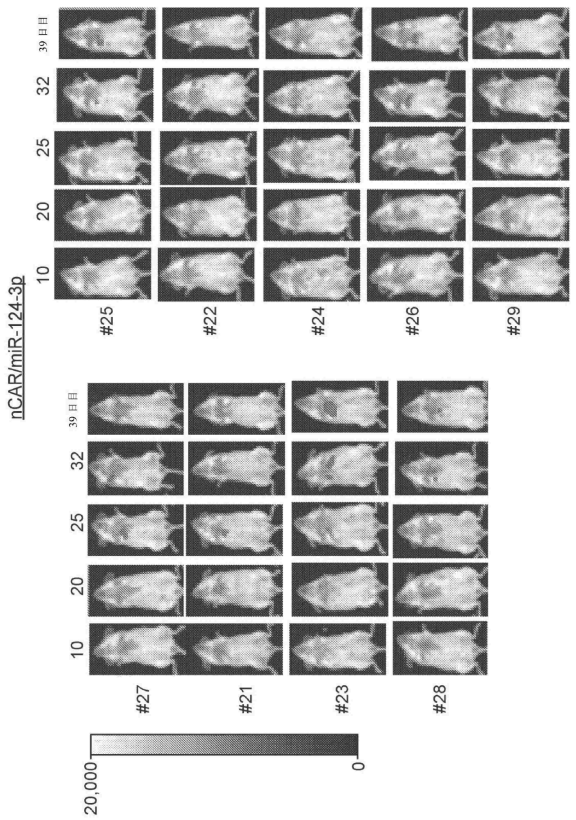
【図１２Ａ－１】



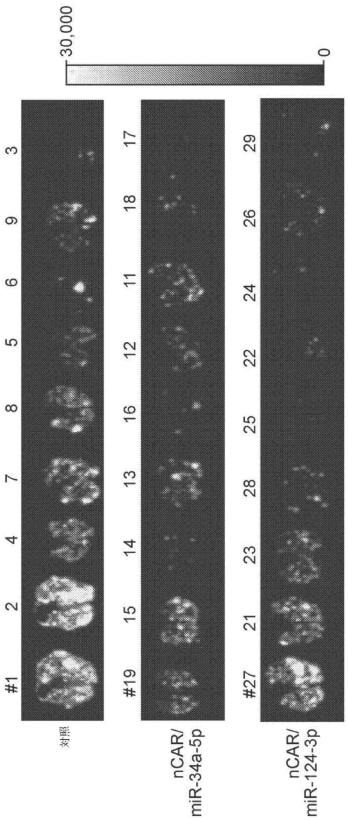
【図１２Ａ－２】



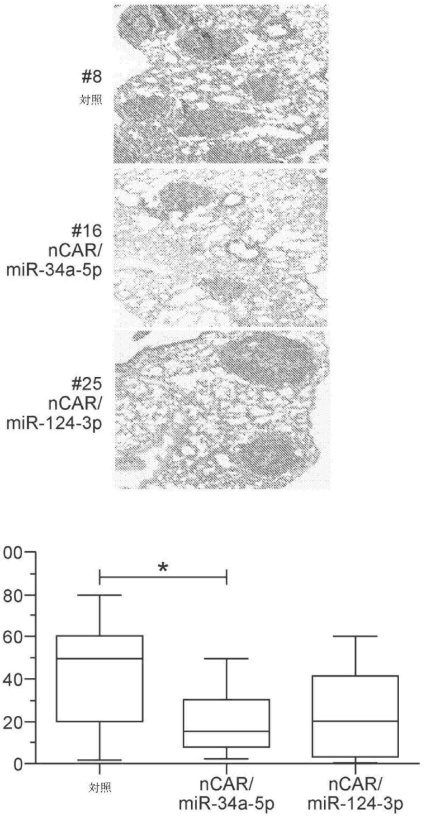
【図１２Ａ－３】



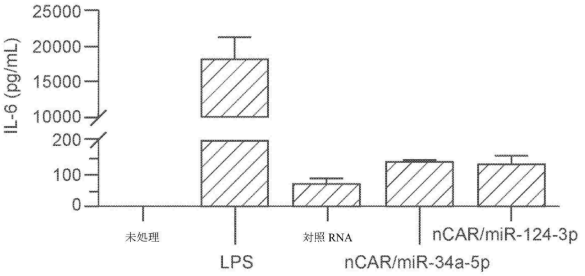
【図１２Ｂ】



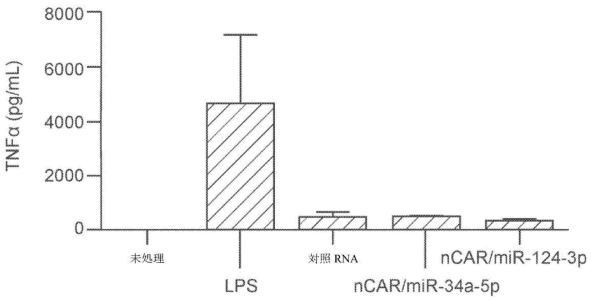
【図１２Ｃ】



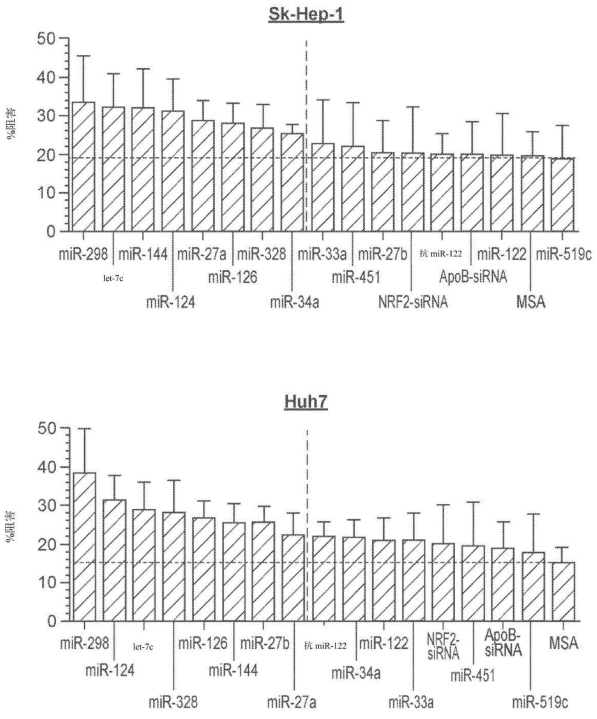
【図１３Ａ】



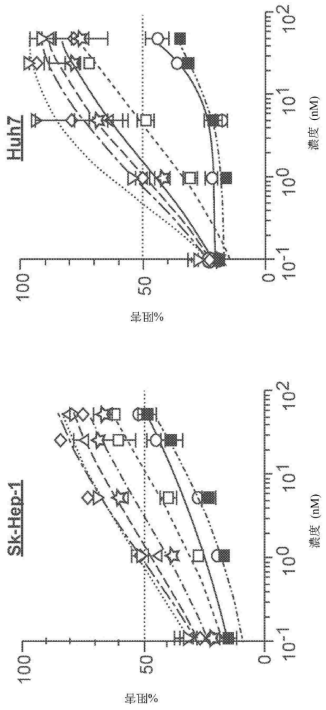
【図１３Ｂ】



【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【図１４Ｃ】

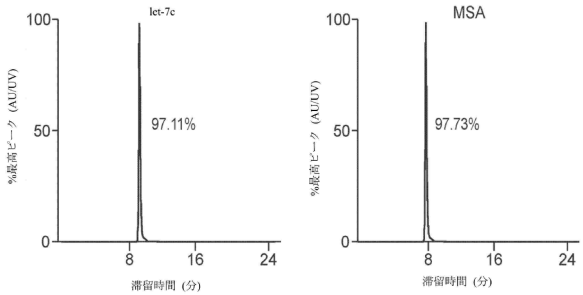
Huh7

RNA 剤	EC_{50} (nM)	ヒルスロープ	R^2
MSA	116.1±8.28	1.00	0.86
miR-298	4.34±1.12*	0.47±0.06	0.98
miR-124	1.13±1.16*	0.52±0.10	0.98
let-7c	0.51±1.25*	0.73±0.39	0.94
miR-328	0.81±1.14*	0.56±0.26	0.86
miR-126	1.67±1.25	0.46±0.13	0.94
miR-144	25.41±2.21	1.00	0.92

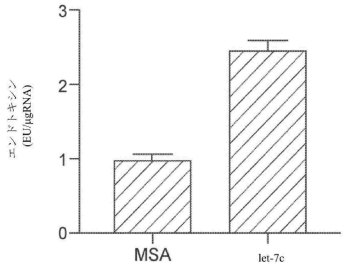
Sk-Hep-1

RNA 剤	EC_{50} (nM)	ヒルスロープ	R^2
MSA	63.01±1.69	0.27±0.05	0.80
miR-298	11.28±1.24*	0.34±0.04	0.93
miR-124	1.41±1.16*	0.37±0.03	0.97
let-7c	0.78±1.20*	0.39±0.03	0.96
miR-328	0.87±1.29	0.43±0.05	0.93
miR-126	3.18±1.23*	0.35±0.04	0.94
miR-144	89.17±1.43	0.34±0.05	0.90

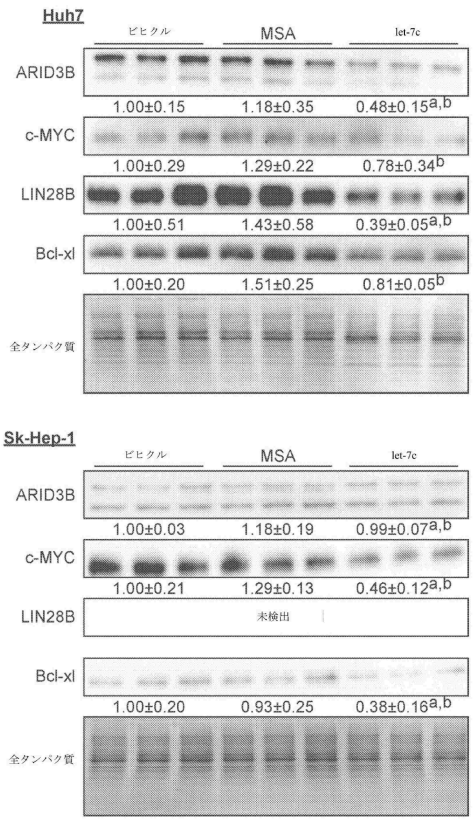
【図１５Ａ】



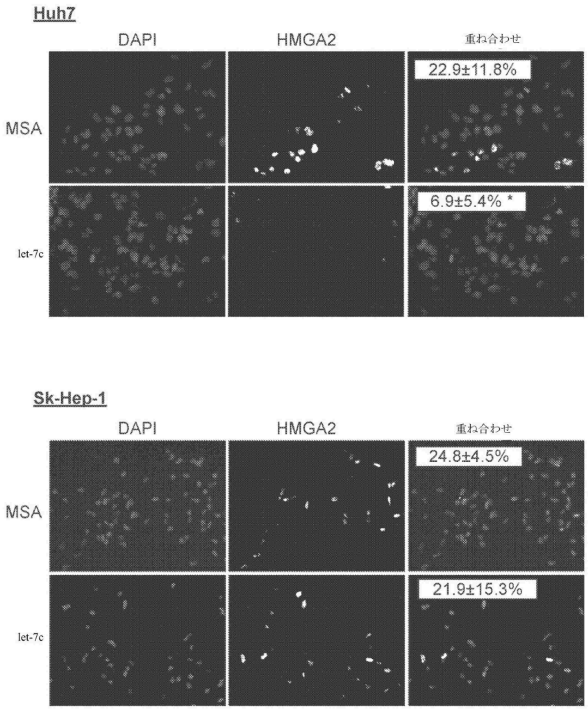
【図１５Ｂ】



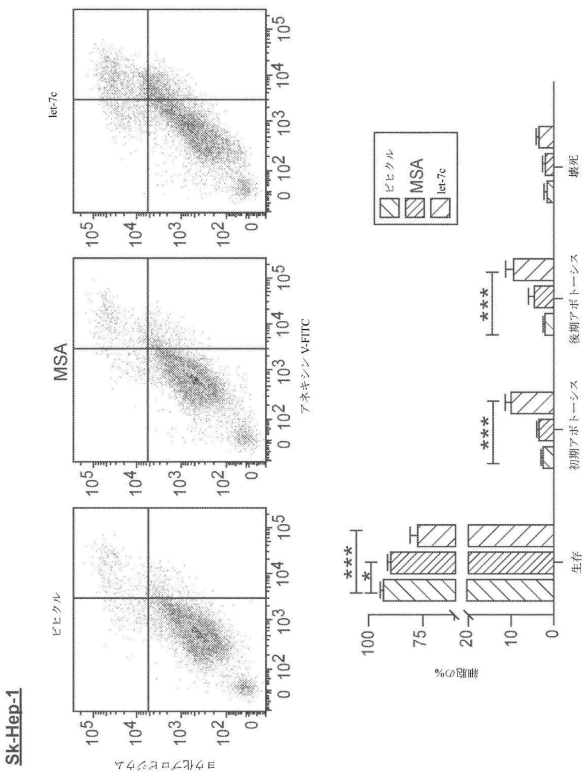
【図１６Ａ】



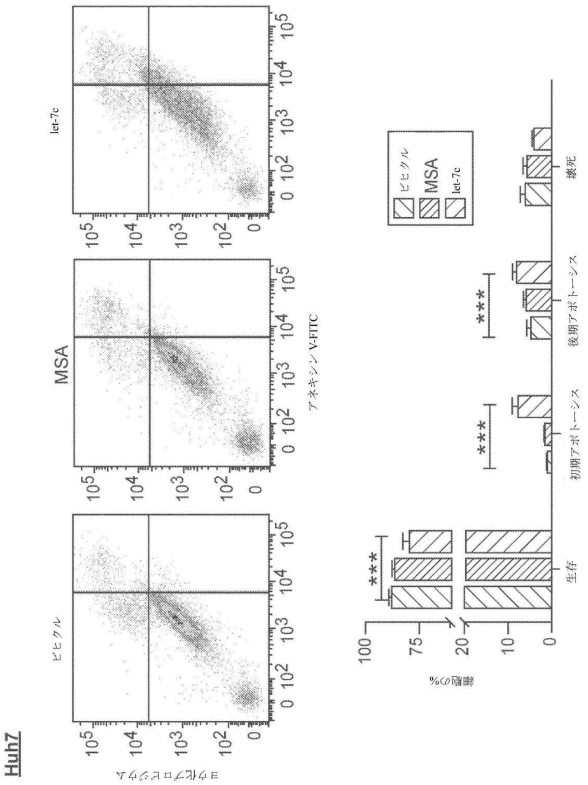
【図１６Ｂ】



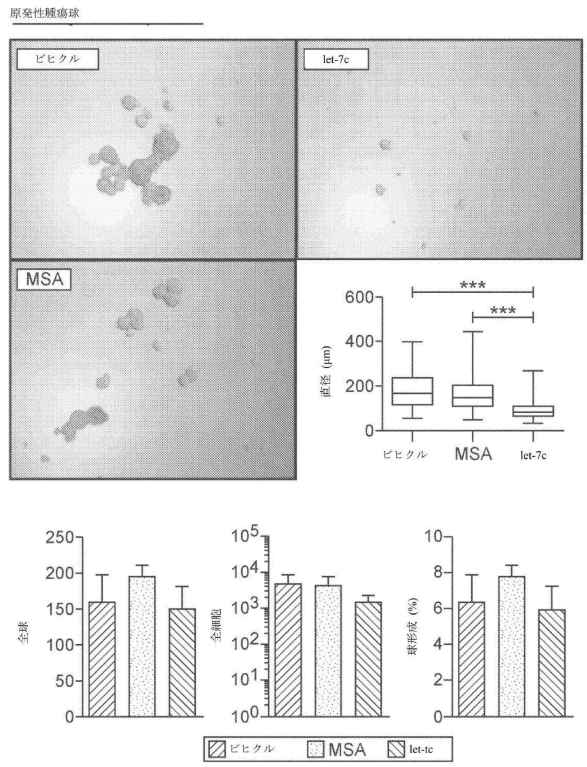
【図１７－１】



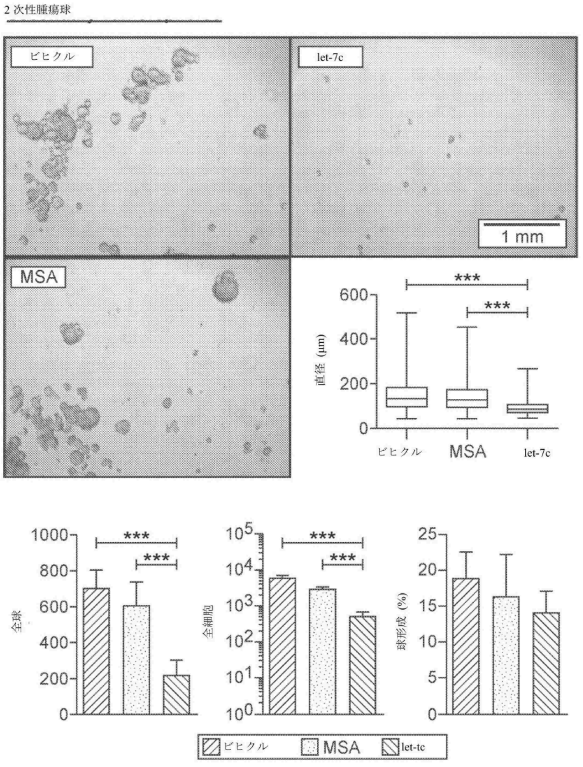
【図１７－２】



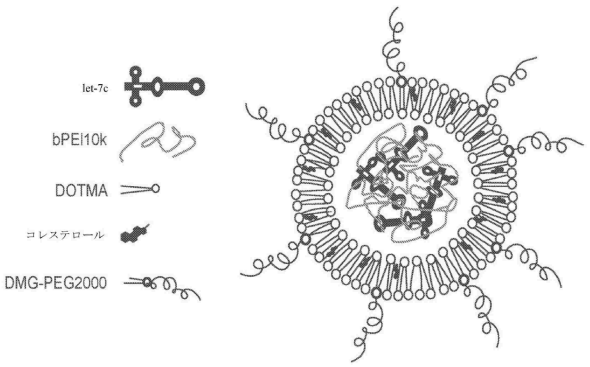
【図１８Ａ】



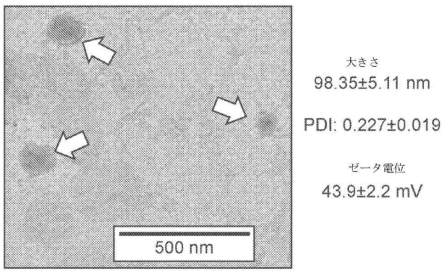
【図１８Ｂ】



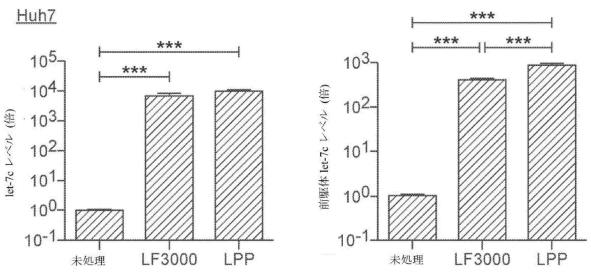
【図１９Ａ】



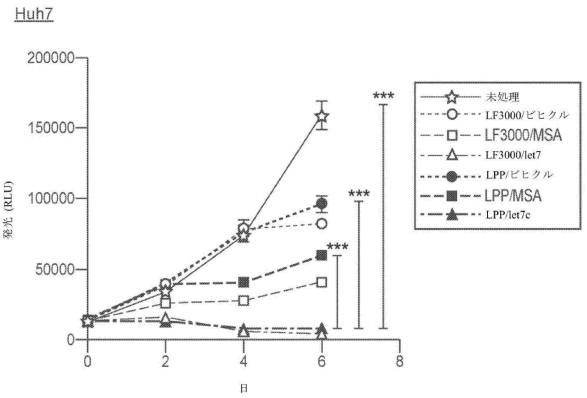
【図１９Ｂ】



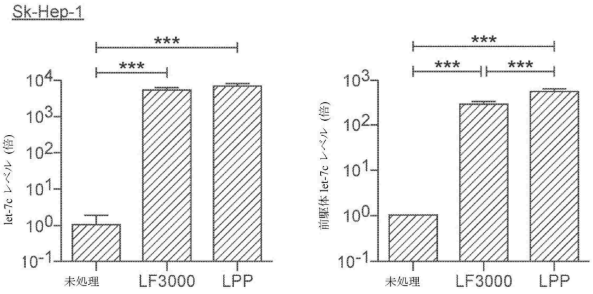
【図１９Ｃ】



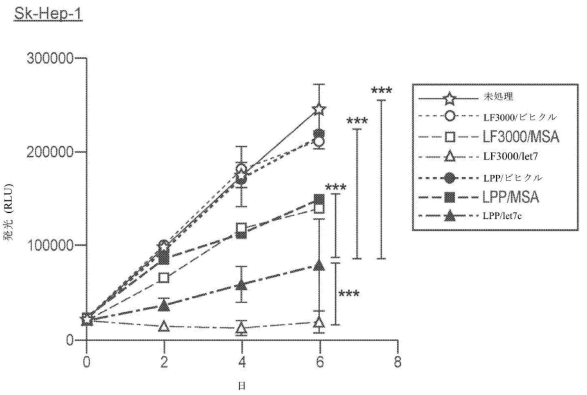
【図１９Ｄ】



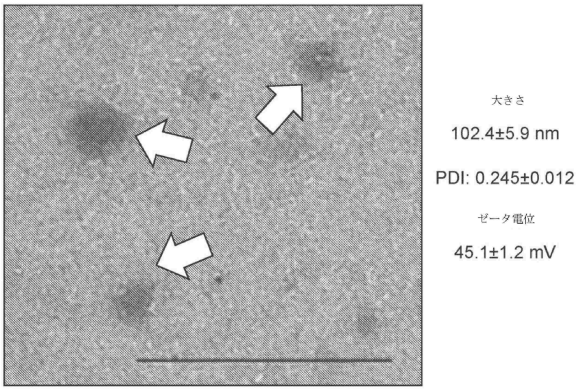
【図１９Ｅ】



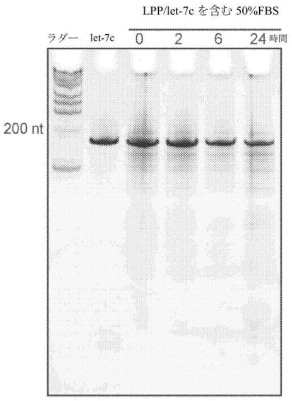
【図１９Ｆ】



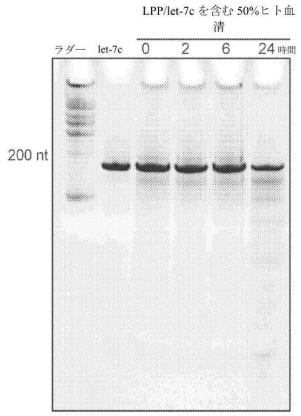
【図２０】



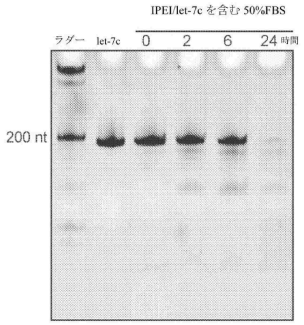
【図２１Ａ】



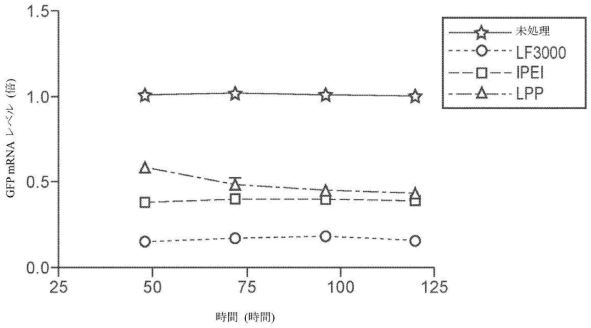
【図２１Ｂ】



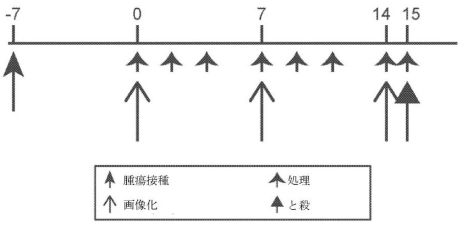
【図２１Ｃ】



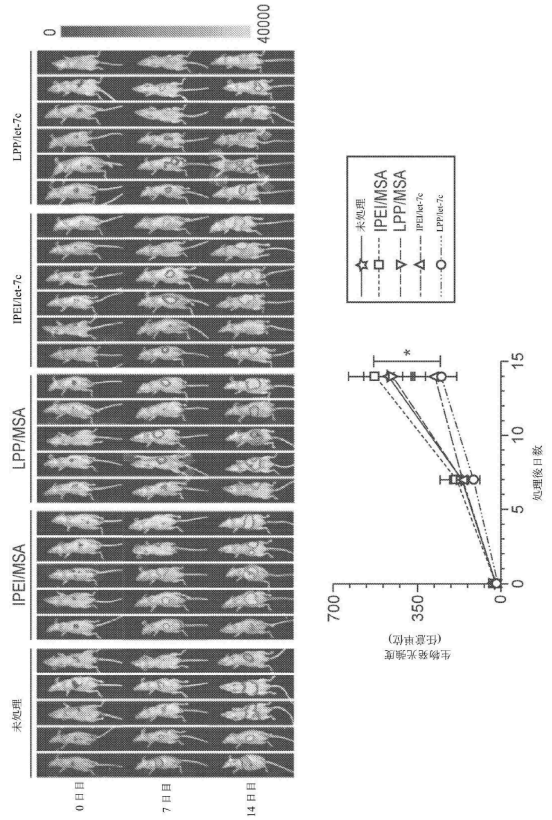
【図２２】



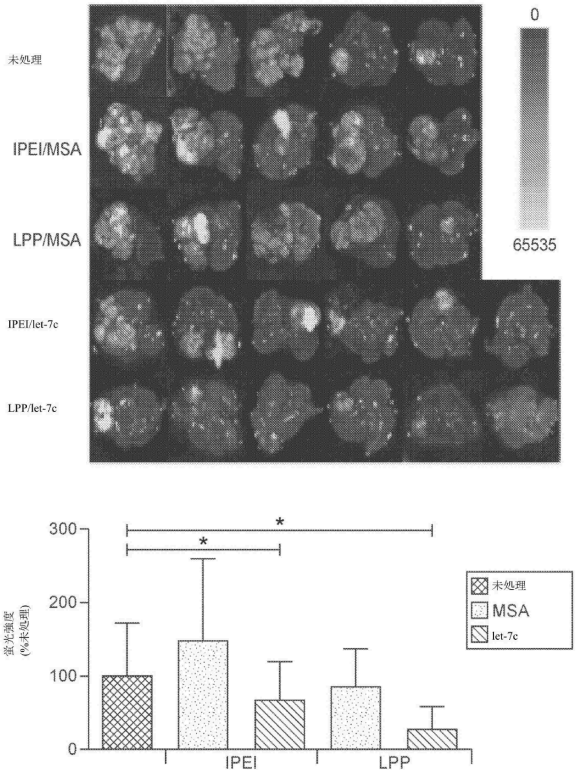
【図２３Ａ】



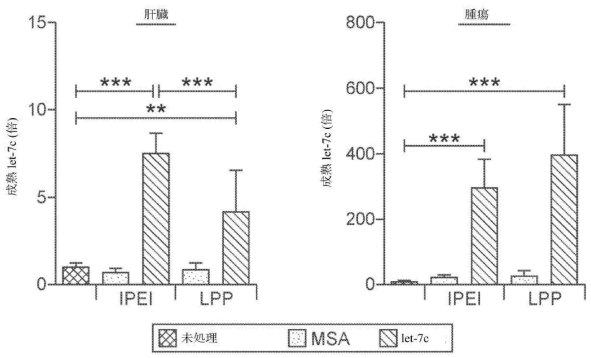
【図２３Ｂ】



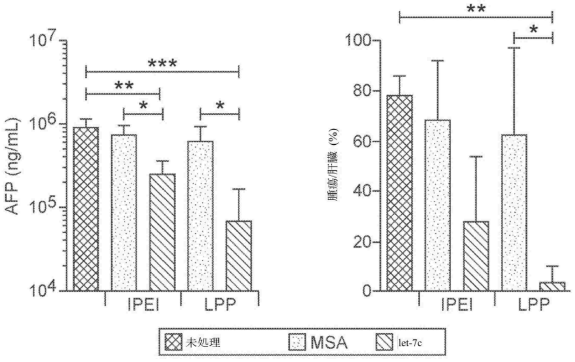
【図２３Ｃ】



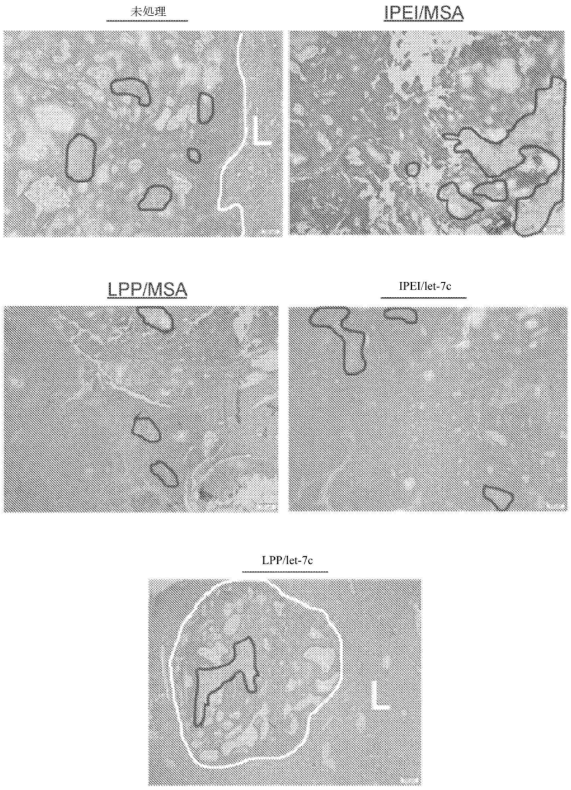
【図２３Ｄ】



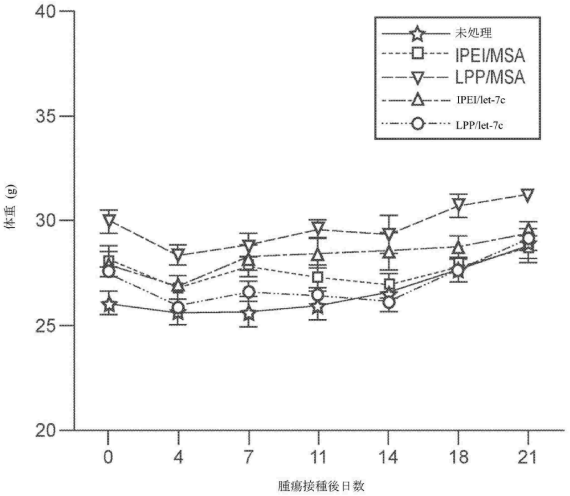
【図２３Ｅ】



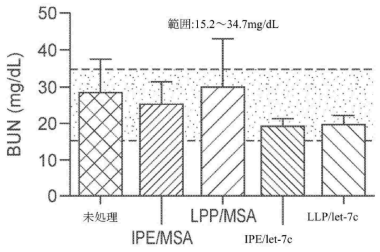
【図２３Ｆ】



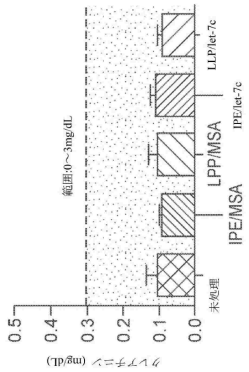
【図２４Ａ】



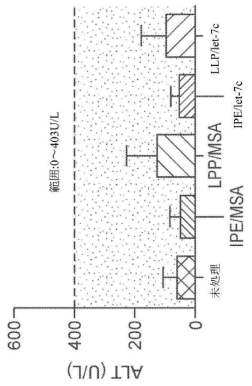
【図２４Ｂ】



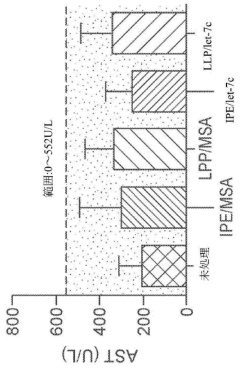
【図２４Ｃ】



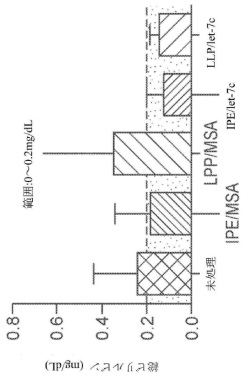
【図２４Ｄ】



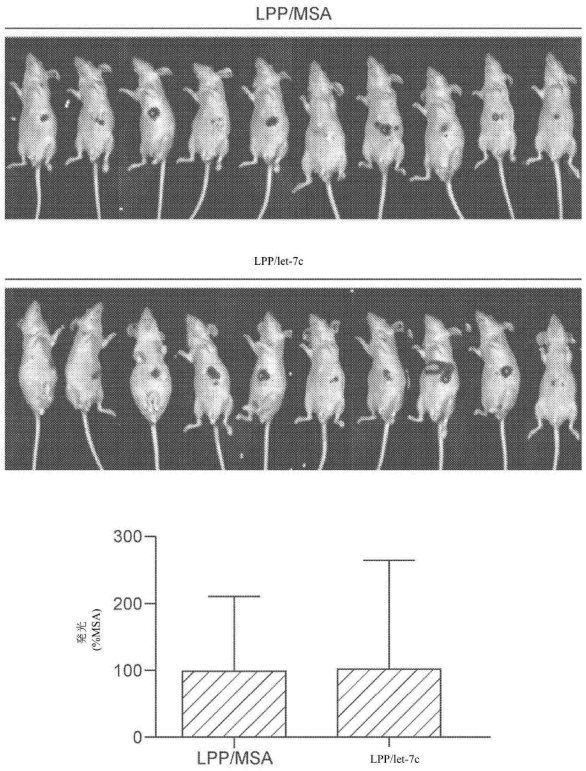
【図２４Ｅ】



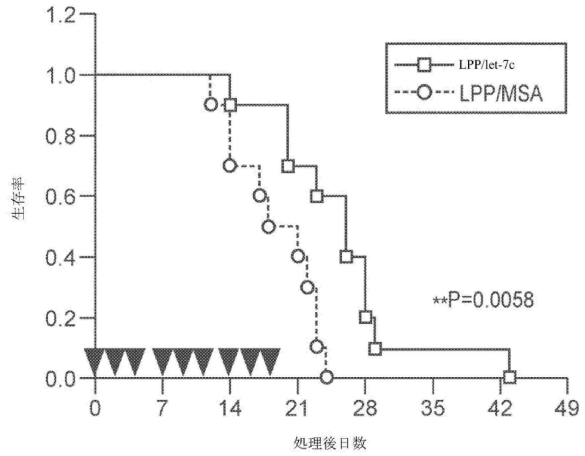
【図２４Ｆ】



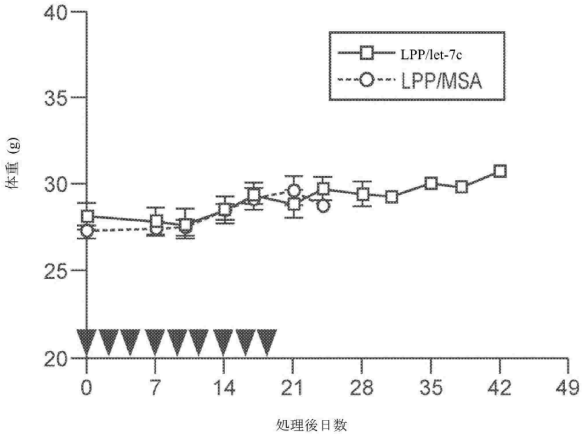
【図２５Ａ】



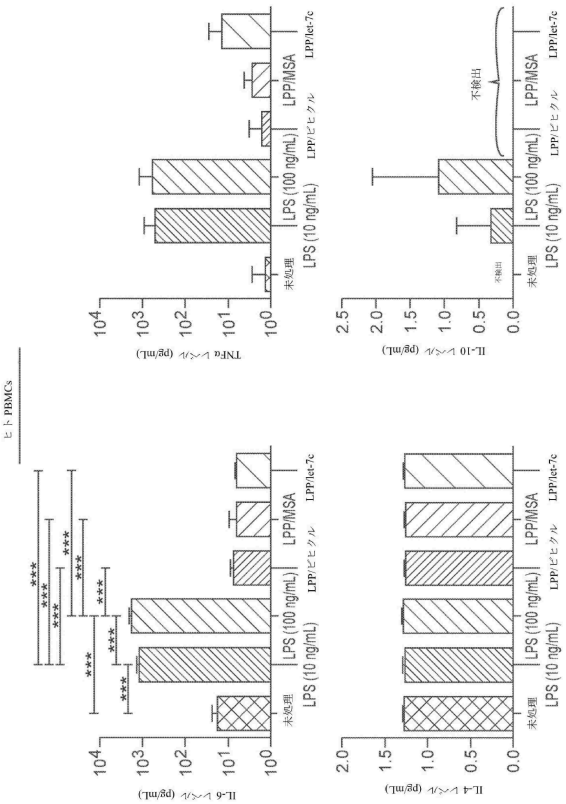
【図２５Ｂ】



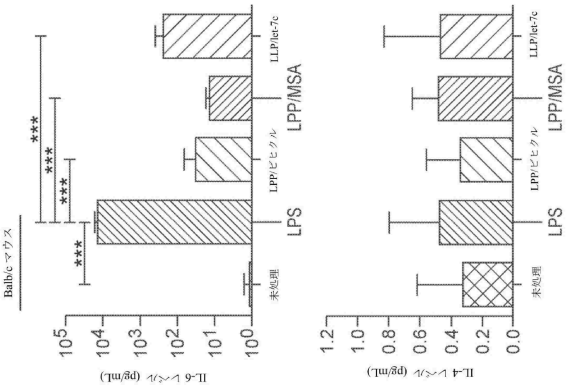
【図２５Ｃ】



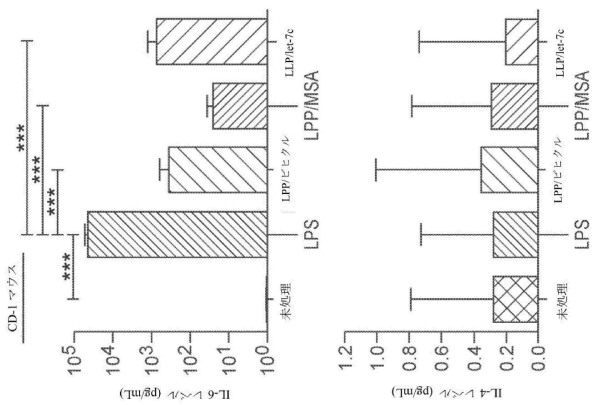
【図２６Ａ】



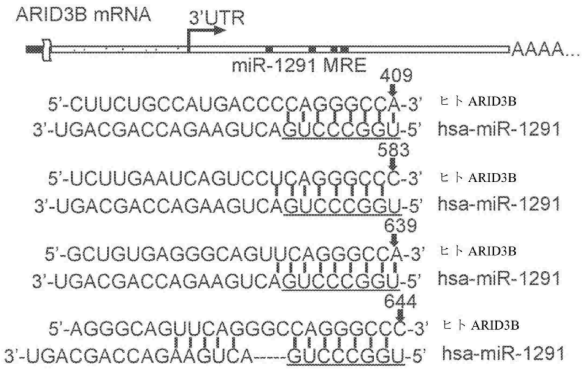
【図２６Ｂ】



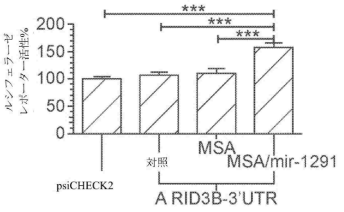
【図２６Ｃ】



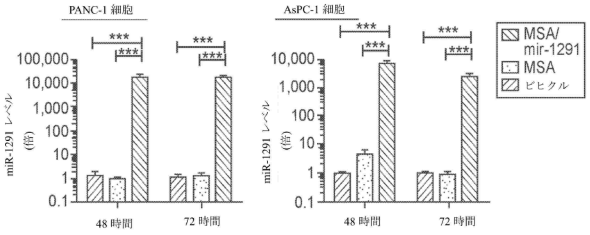
【図２７Ａ】



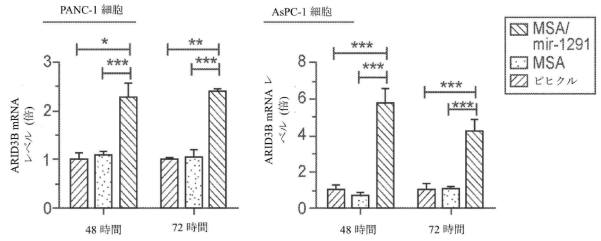
【図２７Ｂ】



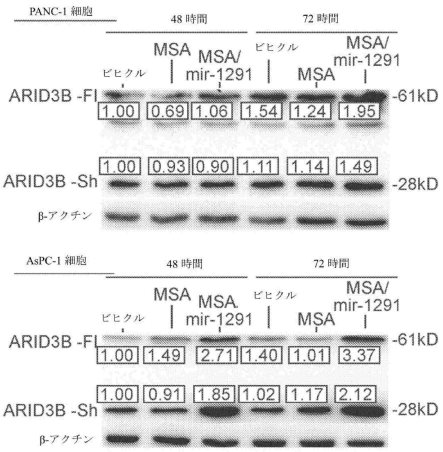
【図２７Ｃ】



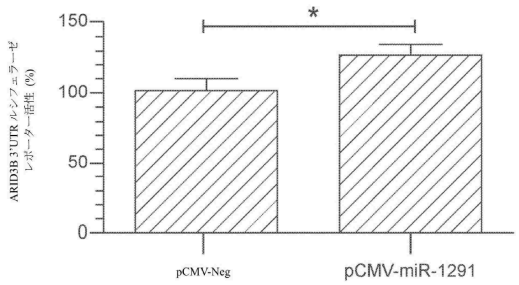
【図２７Ｄ】



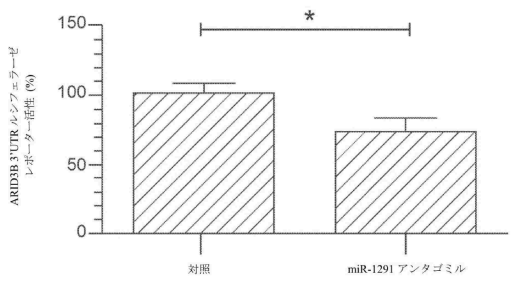
【図２７Ｅ】



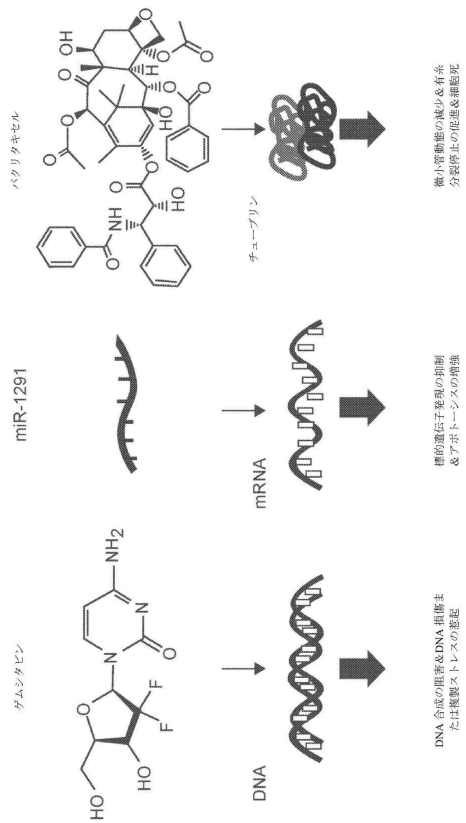
【図２８Ａ】



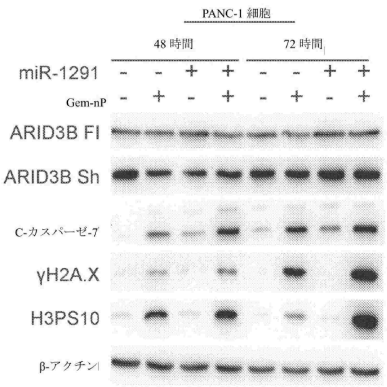
【図２８Ｂ】



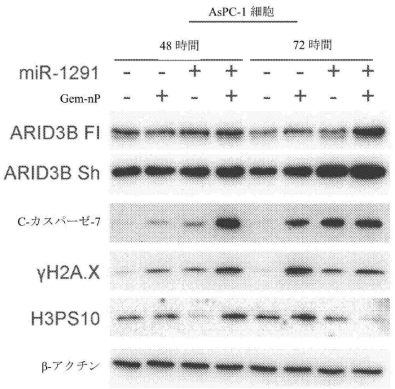
【図２９Ａ】



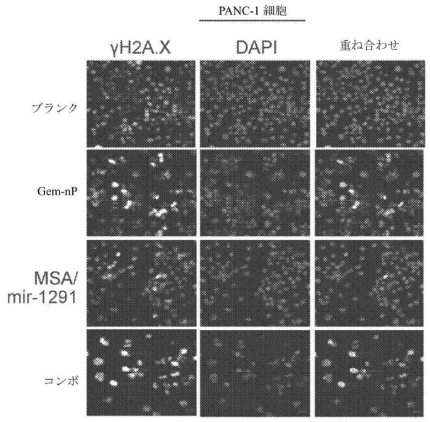
【図２９Ｂ】



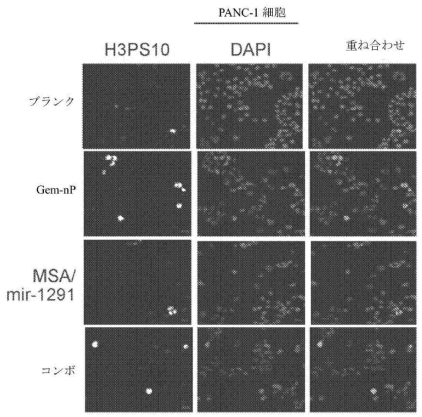
【図２９Ｃ】



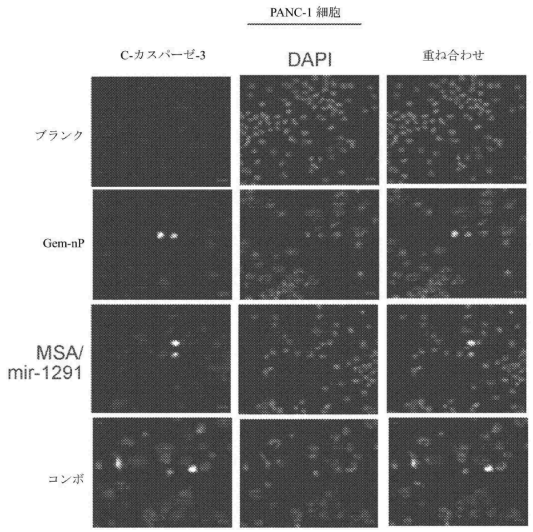
【図２９Ｄ】



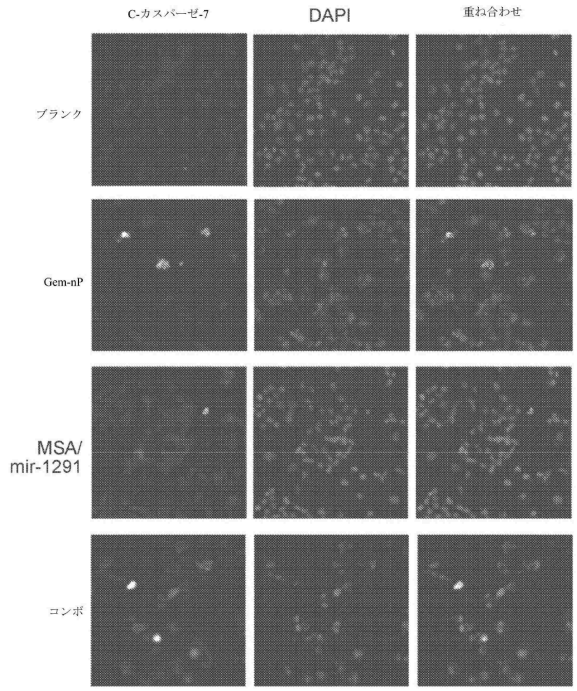
【図２９Ｅ】



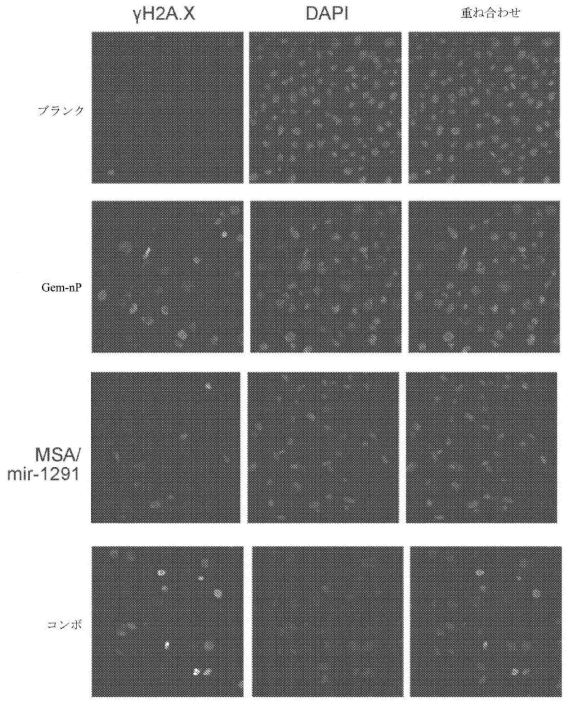
【図２９Ｆ】



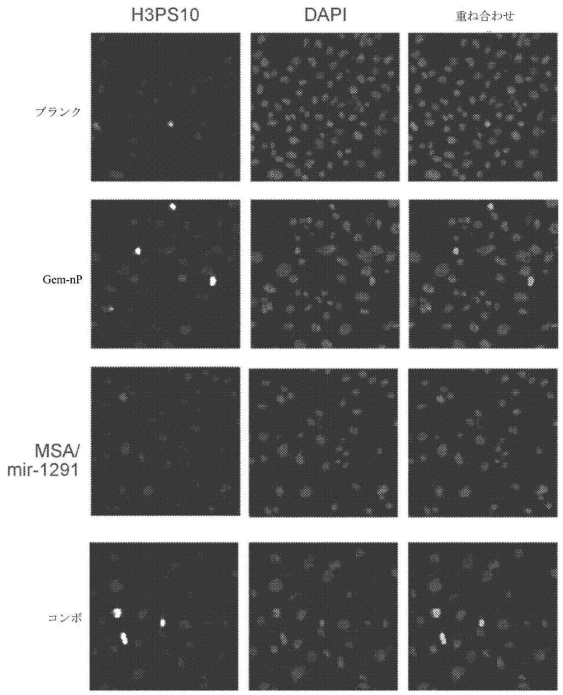
【図３０】



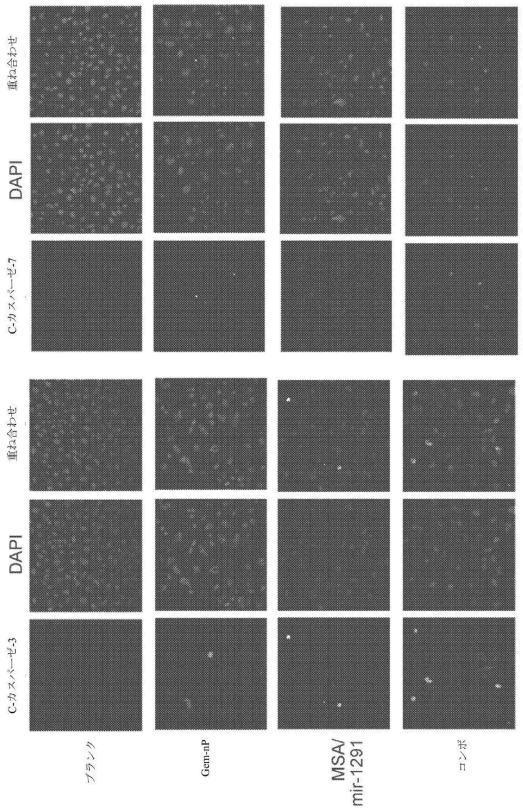
【図３１Ａ】



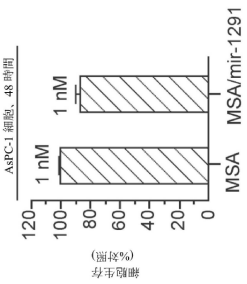
【図３１Ｂ】



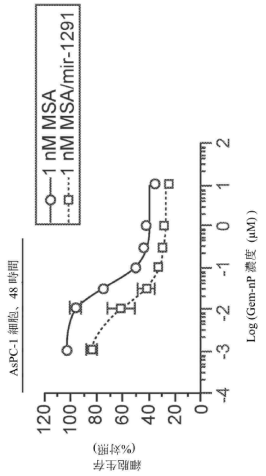
【図３１Ｃ】



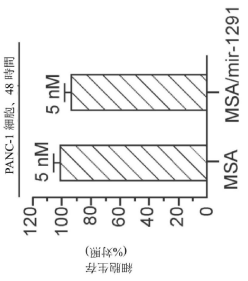
【図３２Ａ】



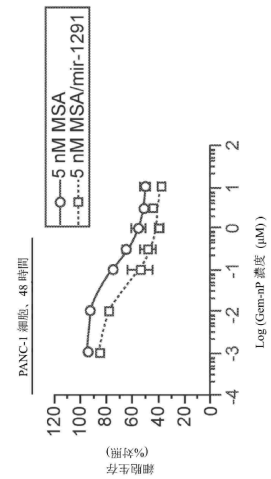
【図３２Ｂ】



【図３２Ｃ】



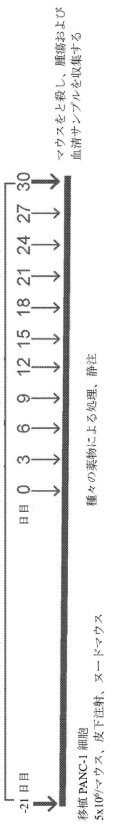
【図３２Ｄ】



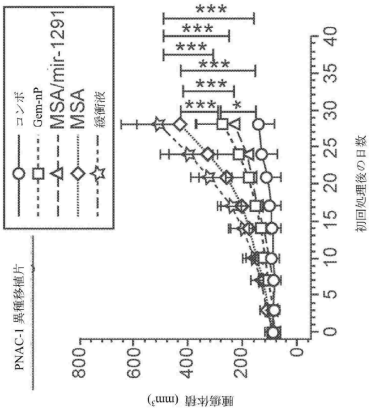
【図３２Ｅ】

細胞株	薬物	EC50 (nM)	頂部 (%)	底部 (%)	ヒルスロープ	適合度 (R^2)
AsPC-1	MSA	40.4±1.8	104±2.2	37.0±1.4	-1.51±0.06	0.99
	MSA/mir-1291	14.6±5.5**	86.7±2.3**	24.3±1.8**	-1.18±0.41	0.97
PANC-1	MSA	155±33	95.8±0.9	49.4±1.4	-0.94±0.17	0.98
	MSA/mir-1291	52.3±20.3*	86.7±2.0**	40.0±3.0*	-0.94±0.56	0.94

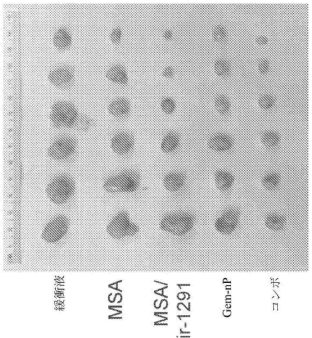
【図３３Ａ】



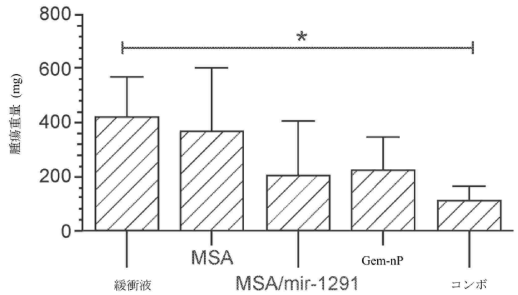
【図３３Ｂ】



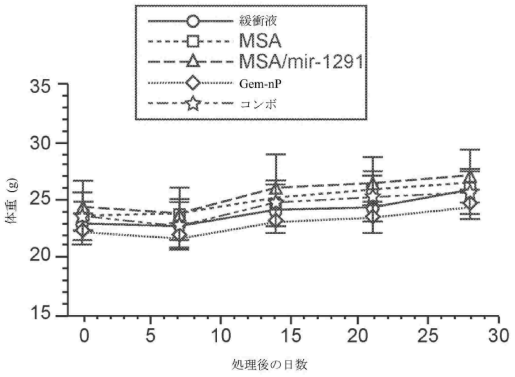
【図３３Ｃ】



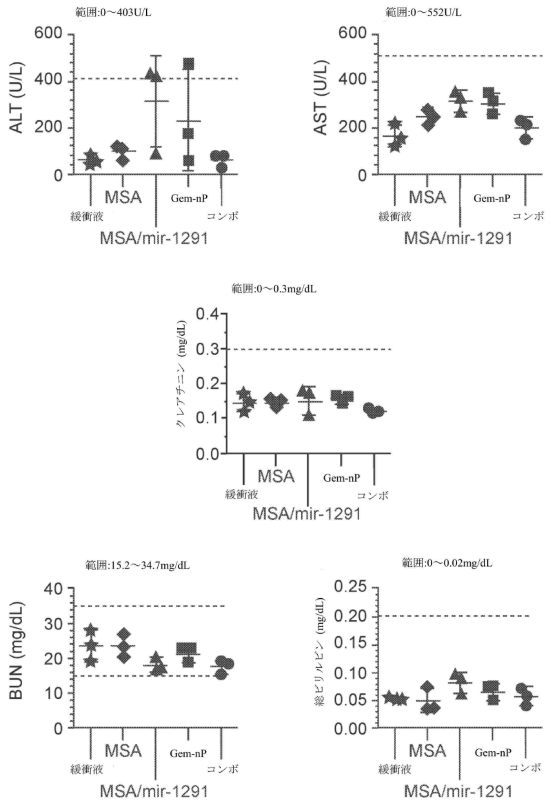
【図３３Ｄ】



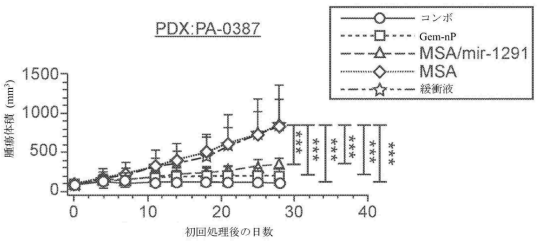
【図３３Ｅ】



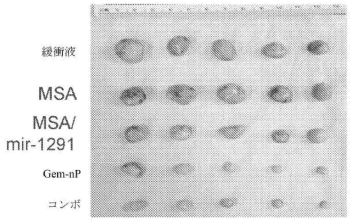
【図３３Ｆ】



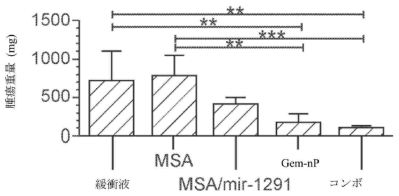
【図３４Ａ】



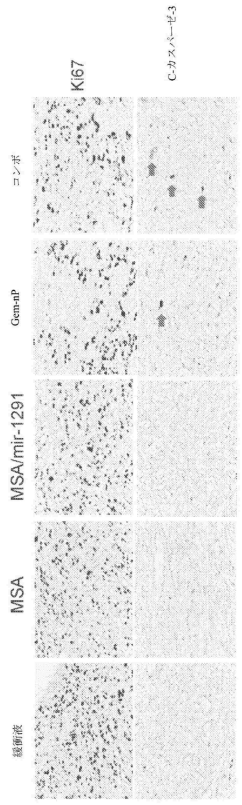
【図３４Ｂ】



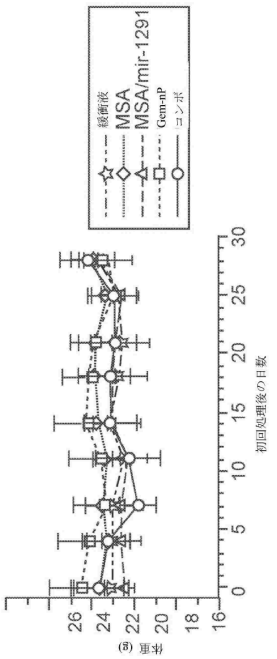
【図３４Ｃ】



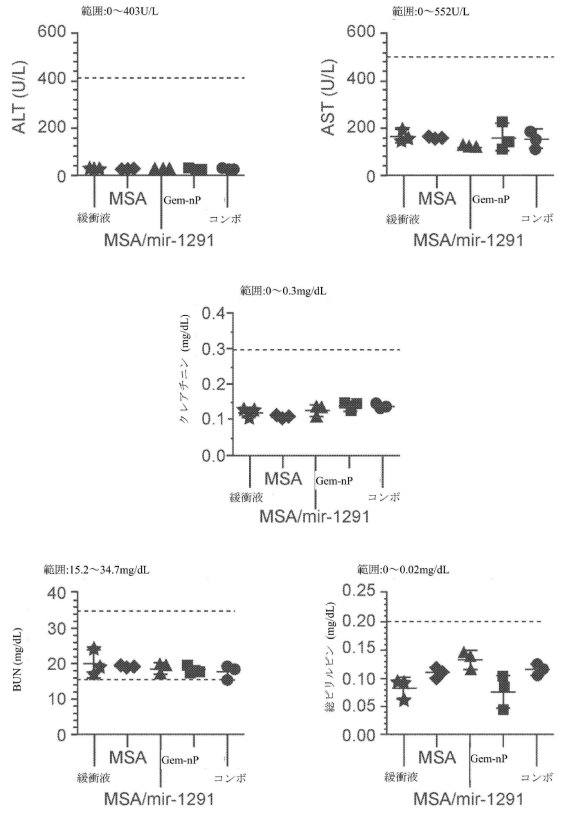
【図３４Ｄ】



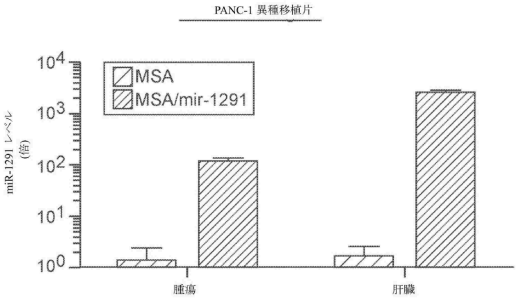
【図３４Ｅ】



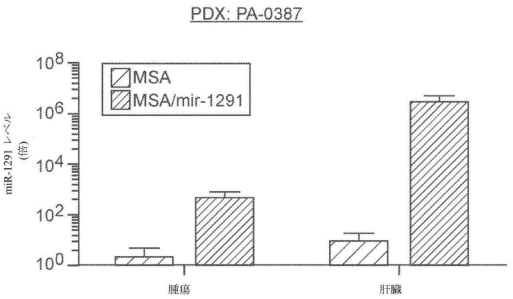
【図３４Ｆ】



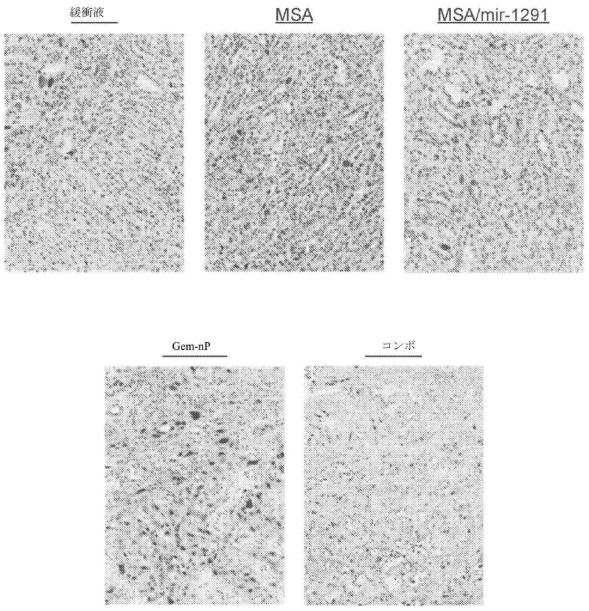
【図３５Ａ】



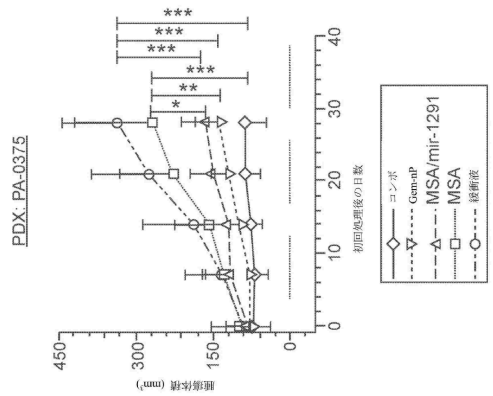
【図３５Ｂ】



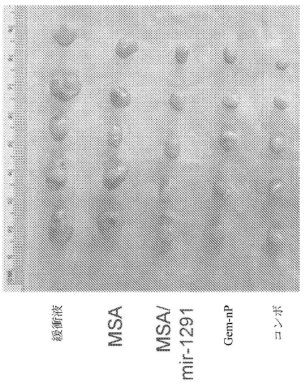
【図３６】



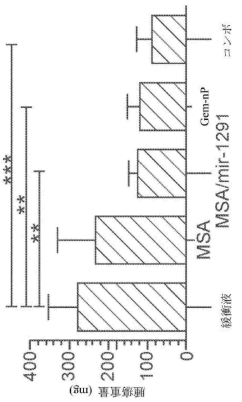
【図３７Ａ】



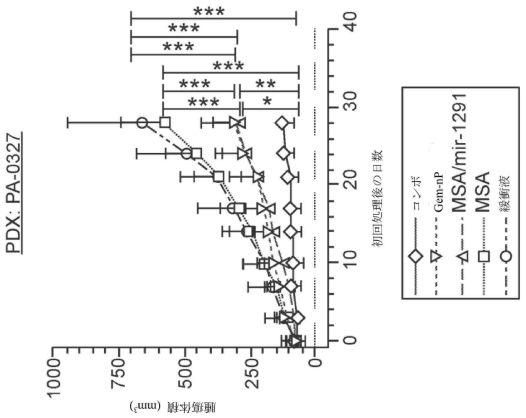
【図３７Ｂ】



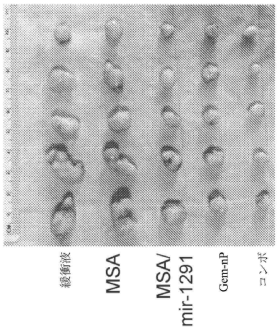
【図３７Ｃ】



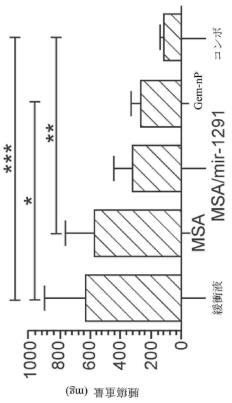
【図３７Ｄ】



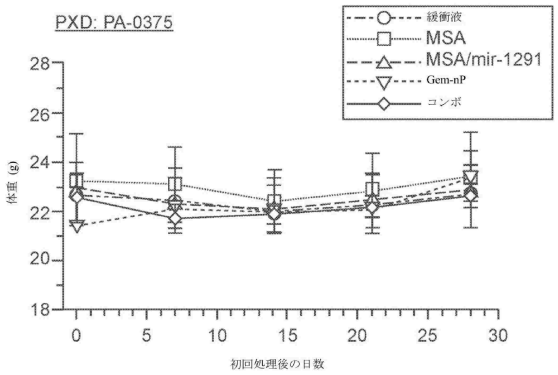
【図３７Ｅ】



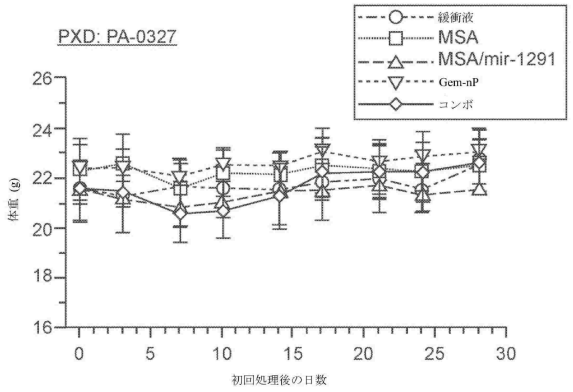
【図３７Ｆ】



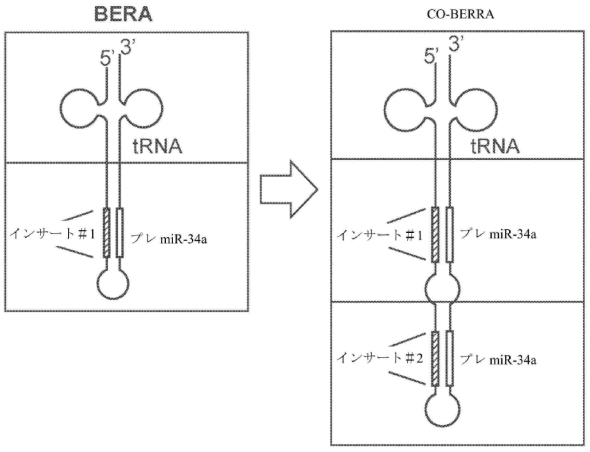
【図３８Ａ】



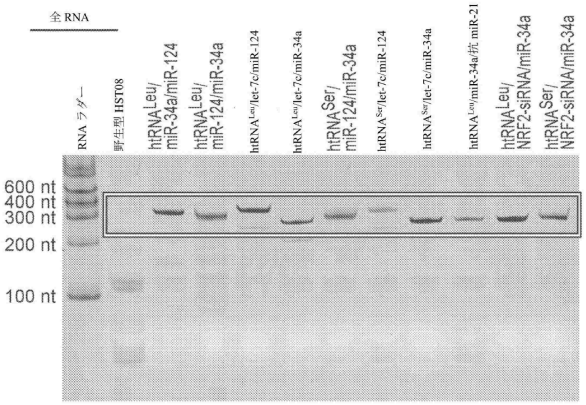
【図３８Ｂ】



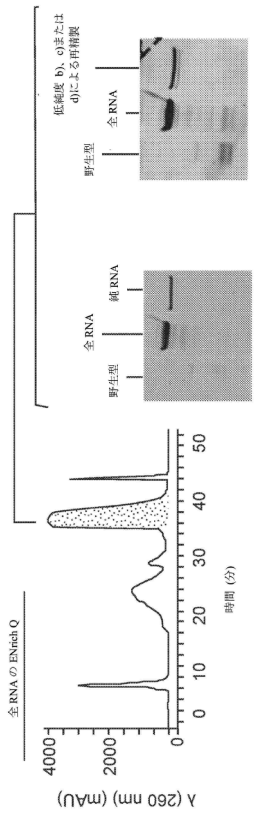
【図３９Ａ】



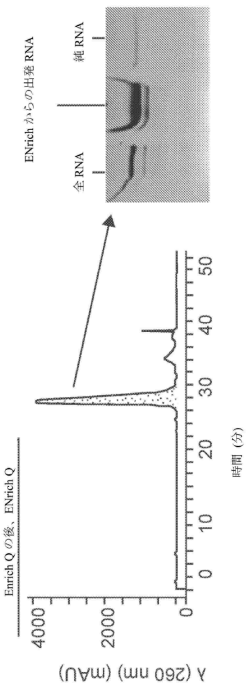
【図３９Ｂ】



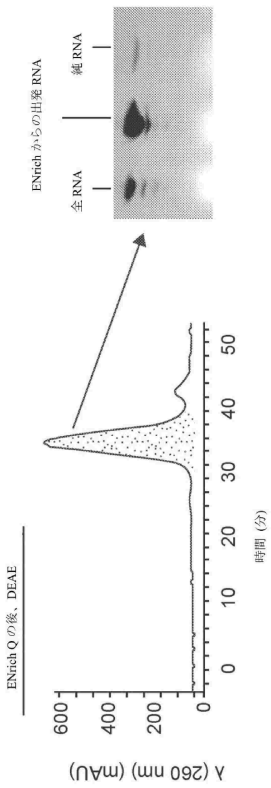
【図４０Ａ】



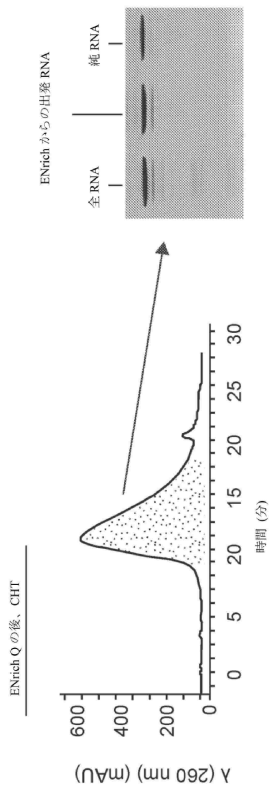
【図４０Ｂ】



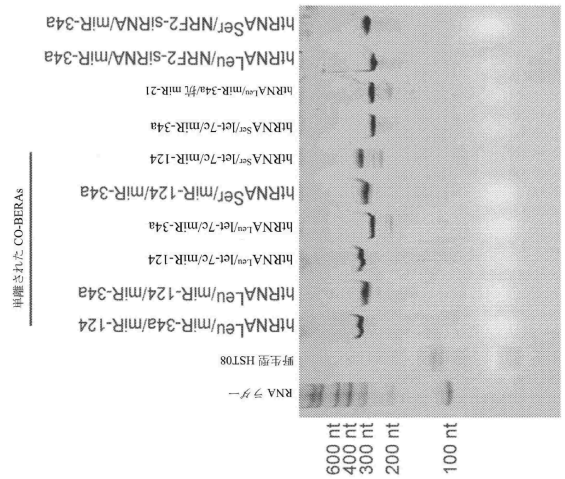
【図４０Ｃ】



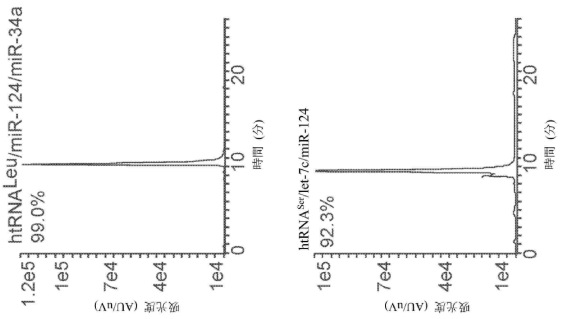
【図４０Ｄ】



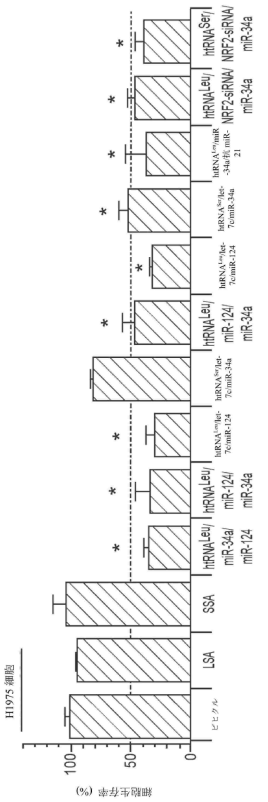
【図４１Ａ】



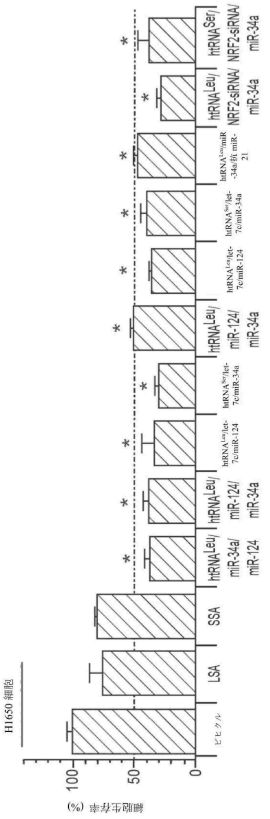
【図４１Ｂ】



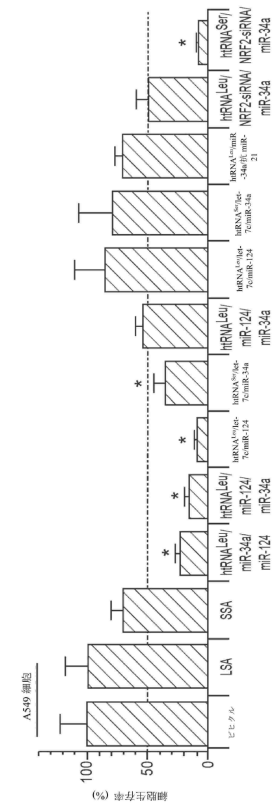
【図４２Ａ】



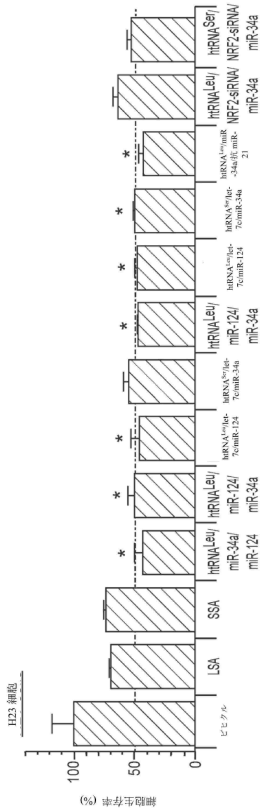
【図４２Ｂ】



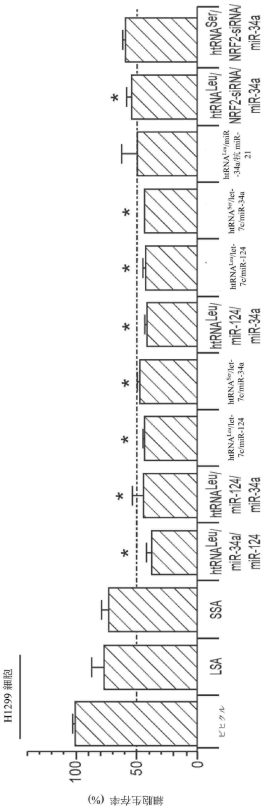
【図４２Ｃ】



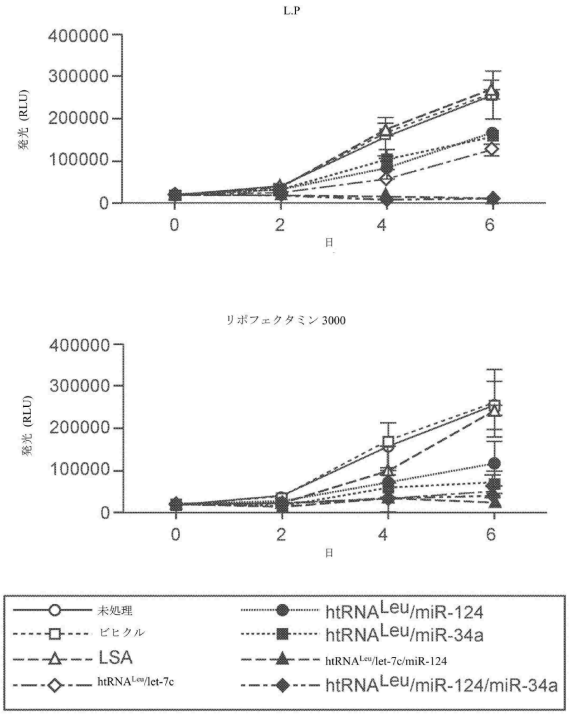
【図４２Ｄ】



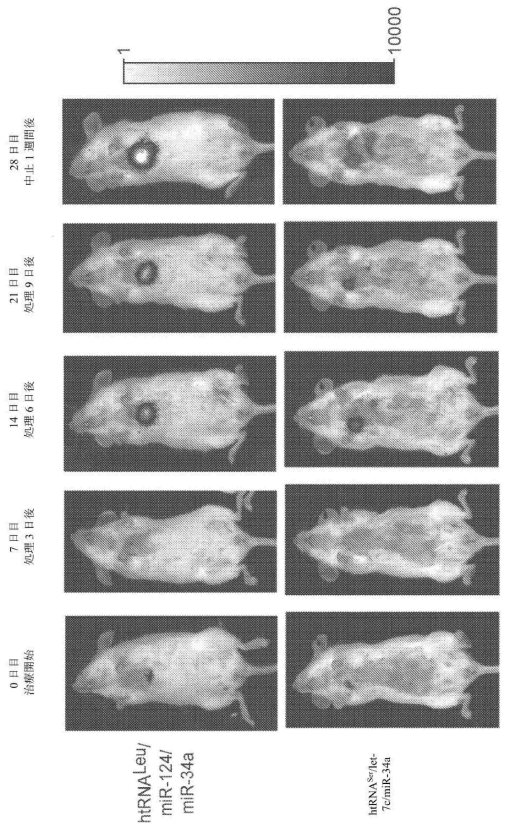
【図４２Ｅ】


H1299 細胞
ビヒクル
LSA
SSA
htRNALeu/ miR-34a/ miR-124
htRNALeu/ miR-124/ miR-34a
htRNASer/let-7c/miR-124
htRNASer/let-7c/miR-34a
htRNALeu/ miR-124/ miR-34a
htRNASer/let-7c/miR-124
htRNASer/let-7c/miR-34a
htRNALeu/ NRF2-siRNA/ miR-34a
htRNASer/ NRF2-siRNA/ miR-34a
0
50
100
細胞生存率 (%)

【図４３】


L.P
発光 (RLU)
400000
300000
200000
100000
0
0
2
4
6
日
リポフェクタミン 3000
未処理
ビヒクル
LSA
htRNALeu/let-7c
htRNALeu/miR-124
htRNALeu/miR-34a
htRNALeu/let-7c/miR-124
htRNALeu/miR-124/miR-34a

【図４４】


1
10000
28 日目 中止 1 週間後
21 日目 処理 9 日後
14 日目 処理 6 日後
7 日目 処理 3 日後
0 日目 治療開始
htRNALeu/ miR-124/ miR-34a
htRNASer/let-7c/miR-34a

【配列表】
0007545726000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/88 (2006.01)		C12N	15/88	Z
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 15/10 (2006.01)		C12N	15/10	Z
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00	
A61K 47/59 (2017.01)		A61K	47/59	
A61K 31/7105(2006.01)		A61K	31/7105	

弁理士　原 裕子
(74)代理人　100195257
弁理士　大渕 一志
(72)発明者　ユ、 エイミン
アメリカ合衆国 ９５６１８－６１５３ カリフォルニア州 デービス リサーチ パーク トライブ １８５０ スィート １００ ユニバーシティ オブ カリフォルニア デービス イノベーション アクセス
(72)発明者　ホ、 プイ ヤン
アメリカ合衆国 ９５６１８－６１５３ カリフォルニア州 デービス リサーチ パーク トライブ １８５０ スィート １００ ユニバーシティ オブ カリフォルニア デービス イノベーション アクセス
(72)発明者　ツ、 メイジャン
アメリカ合衆国 ９５６１８－６１５３ カリフォルニア州 デービス リサーチ パーク トライブ １８５０ スィート １００ ユニバーシティ オブ カリフォルニア デービス イノベーション アクセス
(72)発明者　ジレク、 ジョセフ エル.
アメリカ合衆国 ９５６１８－６１５３ カリフォルニア州 デービス リサーチ パーク トライブ １８５０ スィート １００ ユニバーシティ オブ カリフォルニア デービス イノベーション アクセス
(72)発明者　ツァン、 キャンユ
アメリカ合衆国 ９５６１８－６１５３ カリフォルニア州 デービス リサーチ パーク トライブ １８５０ スィート １００ ユニバーシティ オブ カリフォルニア デービス イノベーション アクセス
(72)発明者　ペトレク、 ハンナ イー.
アメリカ合衆国 ９５６１８－６１５３ カリフォルニア州 デービス リサーチ パーク トライブ １８５０ スィート １００ ユニバーシティ オブ カリフォルニア デービス イノベーション アクセス
審査官　白井 美香保

(56)参考文献
特表２０１７－５２４３４１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１５－５２３８５６（ＪＰ，Ａ）
特表２０１６－５３３７６０（ＪＰ，Ａ）
J. Pharmacol. Exp. Ther.，Vol.365，p.494-506，Epub 2018.03.30

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｑ １／６８－１／７０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ（ＳＴＮ）