

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】平成26年1月30日(2014.1.30)

【公開番号】特開2013-126996(P2013-126996A)
 【公開日】平成25年6月27日(2013.6.27)
 【年通号数】公開・登録公報2013-034
 【出願番号】特願2013-27633(P2013-27633)
 【国際特許分類】

A 6 1 K 35/76 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 C 1 2 N 5/071 (2010.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 35/76 Z N A
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 K 48/00
 C 1 2 N 5/00 2 0 2 A
 C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】
 【提出日】平成25年12月9日(2013.12.9)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0098
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0098】

C2C12筋芽細胞に、miRNAの機能を阻害すると報告されている¹⁸⁻¹⁹、miR-1又はmiR-133に対しアンチセンスな2'-O-メチル阻害オリゴ(又は対照GFP及びmiR-208)をトランスフェクトするという逆の実験も行った。miR-1阻害剤をトランスフェクトした細胞は、筋発生マーカーの減少及びホスホヒストンH3の増加で示されるように、筋形成の阻害及び筋芽細胞増殖促進を示した(図2f~図2i及び表2)。筋芽細胞増殖及び分化の阻害におけるmiR-133の役割と一致して、miR-133の阻害により、筋形成は促進し、細胞増殖は阻害されるという、逆の効果を引き起こした(図2f~図2j及び表2)。これに反して、対照2'-O-メチル阻害剤は効果が無かった(図2f~図2j)。上記の結果からの結論は、miR-1及びmiR-133は、骨格筋増殖と分化において別個の働きを有するということである:miR-1は筋芽細胞分化を促進するのに対し、miR-133は筋芽細胞増殖を促進する。

【手続補正2】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0109
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0109】

細胞培養、インビトロ筋形成分化及びルシフェラーゼレポーター検定

記載^{1 2}のように、C2C12筋芽細胞を培養し、また筋形成を誘導した。一時的トランスフェクション＝ルシフェラーゼレポーター検定は記載^{1 2, 2 6}のように行った。miRNA二重鎖及びmiR-1、miR-133、miR-208及びGFPに対してアンチセンスな2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチドは、Dharmacon（配列については表3参照）より購入した。これらは、哺乳動物細胞中にLIPOFECTAMINETM（Invitrogen）トランスフェクション（200 nM）又はAmaxa Biosystems（Gaithersburg, Maryland, U.S.A.）NUCLEOFECTOR(R) システム（5 µg）を用いて電気穿孔により導入した。

3'-UTRルシフェラーゼレポーター構築のために、pGL3-対照ベクター（Promega、Madison, Wisconsin, U.S.A.）の多重クローニング部位を取り除き、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に置いた。マウスHDACV4及びSRFの3'UTRは、PCR増幅し、改変したpGL3対照ベクターにクローン化し、構築物SRF-3'UTR及びHDAC4-3'UTRを得た（PCRプライマー配列については表3を参照）。ルシフェラーゼレポーター検定は、記載^{2 6}のように行った。

【**手続補正3**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】0110

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【0110】

ウェスタンブロットと免疫染色

ウェスタンブロットは既に記載^{2 7}のように行った。以下の抗体を用いた：抗ミオゲニン；SRF；MEF2；HDAC4；及びα-チューブリン（Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、California、U.S.A.）；及びホスホヒストン H3（Upstate Biotechnology、Lake Placid、New York、U.S.A.）。筋縞のある筋肉特異的MHCを認識する、MF20抗体は、DSHB（University of Iowa、Iowa City、Iowa、U.S.A）より得た。

免疫染色のために、12ウェルプレート中の処理したC2C12細胞を4%ホルムアルデヒドで、5分間、37℃で、固定し、その後0.1% NP40/PBS溶液に15分間、RTで移した。一次抗体は、3%BSAを含む0.1% NP40-PBS中で2時間次の濃度でインキュベートした：抗ミオゲニン（1：20稀釈）、抗ホスホヒストンH3（1:100稀釈）、MF20（1:10稀釈）。二次抗体フルオレッセイン抗マウス/ラビット（1：100稀釈；Vector Laboratories、Burlingame、California、U.S.A.）は、3%BSAを含む0.1%NP40-PBSに、1時間、37℃で加えた。DAPIを室温で、5分間加えた。PBSで数回洗浄後、細胞を蛍光顕微鏡観察に付した。全ウェルをカバーする10視野を拾い、緑色蛍光ポジティブ細胞及びDAPI染色の全細胞を各ウェル毎にそれぞれ計数した。