

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5451077号
(P5451077)

(45) 発行日 平成26年3月26日 (2014. 3. 26)

(24) 登録日 平成26年1月10日 (2014. 1. 10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/15 (2006. 01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N 37/00 (2006. 01)	G O 1 N 37/00 1 O 2
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
請求項の数 22 (全 79 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2008-549549 (P2008-549549)	(73) 特許権者	593172050
(86) (22) 出願日	平成19年1月3日 (2007. 1. 3)		ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2009-531018 (P2009-531018A)		・リサーチ・ファウンデーション
(43) 公表日	平成21年9月3日 (2009. 9. 3)		THE OHIO STATE UNIV
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/000103		ERSITY RESEARCH FOU
(87) 国際公開番号	W02007/081720		NDATION
(87) 国際公開日	平成19年7月19日 (2007. 7. 19)		アメリカ合衆国オハイオ州43201, コ
審査請求日	平成21年11月12日 (2009. 11. 12)		ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
(31) 優先権主張番号	60/756, 400		524
(32) 優先日	平成18年1月5日 (2006. 1. 5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 肺癌の診断、予後診断及び治療のためのマイクロRNAを基盤とした方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者が肺癌を有するか又は肺癌を発症するリスクを有するかを検出するための方法であって、前記被験者からの試験試料中の mi R-155 及び let-7a-2 からなる mi R 遺伝子産物のレベルを測定することを含み、

前記試験試料中の前記 mi R-155 遺伝子産物のレベルの、コントロール試料中の対応する mi R-155 遺伝子産物のレベルに対する 増加、並びに

前記試験試料中の前記 let-7a-2 遺伝子産物のレベルの、コントロール試料中の対応する let-7a-2 遺伝子産物のレベルに対する 減少、

が、前記被験者が肺癌を有すること又は肺癌を発症するリスクを有することの指標となる、前記方法。

【請求項2】

前記方法が、mi R-21、mi R-191、mi R-126*、mi R-210、mi R-143、mi R-205、mi R-192-prec、mi R-224、mi R-126、mi R-24-2、mi R-30a-5p、mi R-212、mi R-140、mi R-9、mi R-214、mi R-17-3p、mi R-224a、mi R-218-2、mi R-95、mi R-145、mi R-198、mi R-216-prec、mi R-219-1、mi R-106a、mi R-197、mi R-192、mi R-125a-prec、mi R-26a-1-prec、mi R-146、mi R-203、mi R-199b-prec、let-7a-2-prec、mi R-27b、mi R-3

10

20

2、mi R-29b-2、mi R-220、mi R-33、mi R-181c-prec、mi R-150、mi R-101-1、mi R-124a-3、mi R-125a及びlet-7f-1からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物を測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記方法が、mi R-21、mi R-205及びmi R-216からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物を測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記方法が、mi R-21、mi R-191、mi R-210、mi R-126*及びmi R-224からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物を測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記肺癌が肺腺癌であり、そして、前記方法が、mi R-21、mi R-191、mi R-210、mi R-126*、mi R-126、mi R-24-2、mi R-219-1、mi R-95、mi R-192-prec、mi R-220、mi R-216-prec、mi R-204-prec、mi R-188、mi R-198、mi R-145及びmi R-224からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物を測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記肺癌が肺扁平上皮癌であり、そして、前記方法が、mi R-205、mi R-224、mi R-191、mi R-126*、mi R-140、mi R-210、mi R-17-3p、mi R-29b、mi R-143、mi R-203、mi R-21、mi R-214、mi R-212、mi R-30a-5p及びmi R-197からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物を測定することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記試験試料中の前記の少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物のレベルが前記コントロール試料中の対応するmi R遺伝子産物のレベルよりも少ない請求項2記載の方法。

【請求項8】

前記試験試料中の前記の少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物のレベルが前記コントロール試料中の対応するmi R遺伝子産物のレベルよりも多い請求項2記載の方法。

【請求項9】

肺癌を有する被験者の予後を判定する方法であって、前記被験者からの試験試料中のmi R-155及びlet-7a-2からなるmi R遺伝子産物のレベルを測定することを含み、ここで：

前記mi R遺伝子産物が肺癌の予後不良と関連しており；

前記肺試験試料内のmi R-155遺伝子産物の量の、コントロール試料内の対応するmi R-155遺伝子産物の量に対する増加、並びに

前記試験試料中の前記let-7a-2遺伝子産物のレベルの、コントロール試料中の対応するlet-7a-2遺伝子産物のレベルに対する減少、が予後不良の指標となる、前記方法。

【請求項10】

前記方法が、mi R-17-3p、mi R-106a、mi R-93、mi R-145、let-7b、mi R-20及びmi R-21からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmi R遺伝子産物を測定することを含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記肺癌が肺腺癌である、請求項9記載の方法。

【請求項12】

被験者が肺癌を有するか又は肺癌を発症するリスクを有するかを検出するための、請求

10

20

30

40

50

項1記載の方法であって：

(1) 前記被験者から得られた試験試料からのRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し；

(2) 前記標的オリゴデオキシヌクレオチドをmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて前記試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；及び

(3) 前記試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルをコントロール試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較する、
ことを含み、ここで少なくとも1種のmiRNAのシグナルの変化が前記被験者が肺癌を有すること又は肺癌を発症するリスクを有することの指標となる、前記方法。

10

【請求項13】

前記コントロール試料から生成したシグナルと比較して少なくとも1種のmiRNAのシグナルがダウンレギュレートされている、請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記コントロール試料から生成したシグナルと比較して少なくとも1種のmiRNAのシグナルがアップレギュレートされている、請求項12記載の方法。

【請求項15】

前記マイクロアレイが、miR-155及びlet-7a-2に対するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチド、並びに、所望により、miR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-224a、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a、let-7f-1及びその組み合わせからなる群より選択される1又は複数種の追加のmiRNAに対するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチド、を含む請求項12記載の方法。

20

30

【請求項16】

被験者が被験者中に予後不良の肺癌を有するか又は予後不良の肺癌を発症するリスクを有するかを検出するための、請求項9に記載の方法であって：

(1) 前記被験者から得られた試験試料からのRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し；

(2) 前記標的オリゴデオキシヌクレオチドをmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて前記試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；及び

(3) 前記試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルをコントロール試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較する；

40

ことを含み、ここでmiR-155の前記ハイブリダイゼーションプロファイルの増加、及び、let-7a-2の前記ハイブリダイゼーションプロファイルの減少、が前記被験者が予後不良の肺癌を有すること又は予後不良の肺癌を発症するリスクを有することの指標となる、前記方法。

【請求項17】

miR-17-3p、miR-106a、miR-93、miR-145、let-7b、miR-20及びmiR-21からなる群より選択される少なくとも1種の追加のmiRNA遺伝子産物のハイブリダイゼーションプロファイルの変化が、前記被験者が予後不良の肺癌を有すること又は予後不良の肺癌を発症するリスクを有することの指標となる、請

50

求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記肺癌が肺腺癌である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

前記マイクロアレイが、miR-155 及び let-7a-2 に対する miRNA 特異的プローブオリゴヌクレオチド、並びに、所望により、miR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-224a、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a、let-7f-1 及びその組み合わせからなる群より選択される miRNA に対する少なくとも 1 種の追加の miRNA 特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む、請求項 16 記載の方法。

10

【請求項 20】

抗肺癌剤を同定する in vitro の方法であって、試験薬剤を細胞に供給し、miR-155 及び let-7a-2 のレベルを測定することを含み、ここでコントロール細胞と比較した前記細胞内で観察される miR-155 のレベルの減少、及び let-7a-2 の量の増加が、前記試験薬剤が抗肺癌剤であることの指標となる、前記方法。

20

【請求項 21】

肺癌細胞中の減少した発現量と関連する少なくとも 1 種の追加の miR 遺伝子産物を測定する、ここにおいて、前記少なくとも 1 種の追加の miR 遺伝子産物が、miR-126*、miR-143、miR-192、miR-224、miR-126、miR-30a-5p、miR-140、miR-9、miR-224a、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216、miR-219-1、miR-125a、miR-26a-1、miR-199b、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c、miR-101-1、miR-124a-3、let-7f-1 及びその組み合わせからなる群より選択される、請求項 20 記載の方法。

30

【請求項 22】

少なくとも 1 種の追加の miR 遺伝子産物を測定する、ここにおいて、前記少なくとも 1 種の追加の miR 遺伝子産物が、miR-21、miR-191、miR-210、miR-205、miR-24-2、miR-212、miR-214、miR-17-3p、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-146、miR-203、miR-150 及びその組み合わせからなる群より選択される、請求項 21 記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明者

Carlo M. Croce, Nozomu Yanaiharu 及び Curtis C. Harris

【0002】

政府補助

本発明は全体又は部分において CCR/NCI/NIH からの助成金 CA76259 及び所内助成金により、並びに契約番号 NO1-CO-12400 のもと、NCI/NIH

50

からの政府助成金により補助された。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

肺癌は世界的に他のどのような形態の癌よりも多くの死をもたらす (Goodman, G. E., Thorax 57: 994-999 (2002))。米国においては、肺癌は男女両方において癌死亡の主要な原因である。2002年、肺癌による死亡率は134,900名の死亡という推定であった。肺癌はまた欧州の全ての国においても癌死亡の主要な原因であり、肺癌関連死の数は発展途上国においても同様に急速に増加している。

【0004】

全肺癌患者の5年生存率は診断の時点での病期に関わらず約13%しかない。これは該疾病がまだ限局性である間に発見された患者における46%の5年生存率と対照的である。しかし、16%の肺癌しか該疾病が転移する前に発見されない。早期発見は該疾病が進行期に達するまで臨床症状が見られないことが多いため難しい。現在では、診断は胸部X線の使用、痰に含まれる細胞の種類の分析及び気道 (bronchial passage) の光ファイバー検査 (fiberoptic examination) により補助される。治療計画は癌の種類及び病期によって決定され、手術、放射線治療及び／又は化学療法が含まれる。この癌や他の癌のための治療法に関するかなりの研究にも関わらず、肺癌は診断することも効果的に治療することも難しいままである。従って、このような癌の発見及び治療のための改良された方法に対する大きな需要が存在する。

【0005】

Carbone, J. Clin. Oncol. 23: 3219-3226 (2005); Granville及びDennis, Cell Mol. Biol. 32: 169-176 (2005))。例えば、p53及びRB/p16両者経路の異常が肺癌においては一般的である。他のいくつかの遺伝子、例えばK-ras、PTEN、FHIT及びMYO18Bは、より低頻度ではあるが肺癌において遺伝的に変化している (Minnaほか, Cancer Cell 1: 49-52 (2002); Sekidoほか, Annu. Rev. Med. 54: 73-87 (2003); Yokota及びKohn, Cancer Sci. 95: 197-204 (2004))。公知の遺伝子及びタンパク質に注目することによって有用な情報が得られてきたが、これまでに知られていなかった肺癌のマーカーも肺癌の生物学に対する見識を与え得る。

【0006】

マイクロRNA (miRNA) は、メッセンジャーRNA (mRNA) 標的にハイブリダイズすることにより；及び該RNA標的の翻訳抑制を誘発すること又は（より低頻度で）分解を誘発することのいずれかにより；遺伝子発現を調節する、短い非コードRNAのクラスである。miRNAの発見及び研究により、細胞分化、細胞増殖及び細胞死等の、生物の発生及び様々な細胞プロセスにおいて重要な役割を演じるmiRNA媒介型の遺伝子調節機構が明らかになった (Cheng, A. M., ほか, Nucleic Acids Res. 33: 1290-1297 (2005))。最近の研究においては、特定のmiRNAの異常な発現が神経障害 (Ishizuka, A. ほか, Genes Dev. 16: 2497-2508 (2002)) 及び癌等のヒトの疾病に関与している可能性があることが示唆されている。特に、miR-16-1及び／又はmiR-15aの異所性発現 (misexpression) がヒト慢性リンパ球性白血病において見い出されている (Calin, G. A. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99: 15524-15529 (2002))。

【0007】

全ての公知のヒトマイクロRNAを含んだマイクロアレイの開発及び使用により、試料中の全てのmiRNAの発現の一斉分析が可能になった (Liu, C. G. ほか, P

10

20

30

40

50

roc Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744 (2004))。これらのマイクロRNAマイクロアレイはmiR-16-1がヒトCLL細胞において脱制御されていることを確認するために用いらただけでなく、ヒトCLLの明確な臨床病理学的特徴と関連したmiRNA発現シグナチャーを生成するためにも用いられた(Calin, G. A. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:1175-11760 (2004))。

【0008】

肺癌細胞において異なる発現様式を示すマイクロRNAの同定は肺癌の診断、予後診断及び治療に役立つ。さらに、これらのmiRNAの推定標的の同定はその病原的役割を解明するのに役立つ。本発明は肺癌の診断、予後診断及び治療のための新奇な方法及び組成物を提供する。

10

【発明の開示】

【0009】

発明の概要

本発明は一部、肺癌細胞における変化した発現量と関連する特定のmiRNAの同定に基づく。

【0010】

従って、本発明は患者が肺癌を有するか又は肺癌を発症するリスクを有するか診断するための方法を含む。本発明の方法によると、前記患者からの試験試料中の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量が、コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量と比較される。コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量に対する試験試料中のmiR遺伝子産物の量の変化(例えば増加、減少)は、肺癌を有するか又は肺癌を発症するリスクを有する患者の指標である。ある態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a及びlet-7f-1からなる群より選択される。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-155、miR-210、miR-126*及びmiR-224からなる群より選択される。他の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-205及びmiR-216からなる群より選択される。さらに他の態様においては、前記肺癌は肺腺癌であり、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-155、miR-210、miR-126*、miR-126、miR-24-2、miR-219-1、miR-95、miR-192-prec、miR-220、miR-216-prec、miR-204-prec、miR-188、miR-198、miR-145及びmiR-224からなる群より選択される。

20

30

40

【0011】

前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量は当業者に周知の様々な手法を用いて測定され得る(例えば定量又は半定量RT-PCR、ノーザンブロット分析、溶液ハイブリダイゼーション検出)。特定の態様においては、少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量は、患者から得られた試験試料からのRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供し、この標的オリゴデオキシヌクレオチドを1又は複数種のmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチド(例えばmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチ

50

ドを含むマイクロアレイ) にハイブリダイズさせ、該試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、そして該試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルをコントロール試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較することにより測定される。該試験試料中の少なくとも1種のmiRNAのシグナルの、コントロール試料に対する変化は、肺癌を有するか又は肺癌を発症するリスクを有する患者の指標である。特定の態様においては、前記マイクロアレイは全ての公知のヒトmiRNAの実質的な部分に対するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。さらなる態様においては、該マイクロアレイは、miR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a及びlet-7f-1からなる群より選択される1又は複数種のmiRNAに対するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0012】

20

本発明は患者からの試験試料内の肺癌の予後不良と関連する少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量を測定することを含む、肺癌患者の予後の判定の方法も提供する。これらの方法によると、予後不良と関連するmiR遺伝子産物の試験試料中の量の、コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量と比較した際の変化は、予後不良の指標である。ある態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-155、miR-17-3p、miR-106a、miR-93、let-7a-2、miR-145、let-7b、miR-20及びmiR-21からなる群より選択される。特定の態様においては、前記肺癌は肺腺癌であり、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-155及びlet-7a-2からなる群より選択される。

【0013】

30

前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量はここで記されるように測定され得る(例えば定量又は半定量RT-PCR、ノーザンブロット分析、溶液ハイブリダイゼーション検出、マイクロアレイ分析)。試験試料における少なくとも1種のmiRNAのシグナルのコントロール試料に対する変化は、予後不良の肺癌を有するか又は発症するリスクを有する患者の指標である。特定の態様においては、miR-125a、miR-125b-1、miR-224及び/又はmiR-21のシグナルの変化は、予後不良の肺癌を有するか又は発症するリスクを有する患者の指標である。他の態様においては、肺腺癌の患者からの試料におけるmiR-155及び/又はlet-7a-2のシグナルの変化は予後不良の指標である。ある態様においては、前記マイクロアレイはmiR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a及びlet-7f-1からなる群より選択される1又は複数種のmiRNAに対するmiRNA特異的プロー

40

50

ブオリゴヌクレオチドを含む。

【0014】

本発明は患者の癌細胞中で少なくとも1種のmiR遺伝子産物が脱制御（例えばダウンレギュレート、アップレギュレート）されている患者の肺癌を治療する方法も含む。少なくとも1種の単離されたmiR遺伝子産物が前記肺癌細胞中でダウンレギュレートされている場合、前記方法は有効な量の単離されたmiR遺伝子産物、又はその単離された変異体若しくは生物活性のある断片を投与し、前記患者中の癌細胞の増殖を抑制することを含む。少なくとも1種の単離されたmiR遺伝子産物が該肺癌細胞中でアップレギュレートされている場合、前記方法はこの少なくとも1種のmiR遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも1種の化合物の有効な量を前記患者に投与し、肺癌細胞の増殖を抑制する

10

【0015】

関連する態様においては、患者の肺癌を治療する前記方法はさらに、まず該患者の肺癌細胞内の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量を測定し、このmiR遺伝子産物の量をコントロール細胞中の対応するmiR遺伝子産物の量と比較する工程を含む。該miR遺伝子産物の発現が肺癌細胞中で脱制御（例えばダウンレギュレート、アップレギュレート）されている場合、前記方法はさらに該肺癌細胞中で発現しているこの少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物の量を変えることを含む。ある態様においては、前記癌細胞中に発現している前記miRNA遺伝子産物の量はコントロール細胞中に発現しているmiR遺伝子産物の量よりも少なく、該miR遺伝子産物の有効な量、又はその単離された変異体若しくは生物活性のある断片が前記患者に投与される。他の態様においては、該癌細胞中に発現する該miR遺伝子産物の量はコントロール細胞中に発現する該miR遺伝子産物の量よりも多く、この少なくとも1種のmiR遺伝子の発現を抑制するための少なくとも1種の化合物の有効な量が該患者に投与される。

20

【0016】

本発明はさらに肺癌を治療するための医薬組成物を提供する。一態様においては、該医薬組成物は少なくとも1種の単離されたmiR遺伝子産物、又はその単離された変異体若しくは生物活性のある断片と、薬理的に許容される担体とを含む。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物は、適したコントロール細胞と比較して肺癌細胞内での減少した発現量を有するmiR遺伝子産物に相当する。ある態様においては、前記の単離されたmiR遺伝子産物はmiR-126*、miR-143、miR-192、miR-224、miR-126、miR-30a-5p、miR-140、miR-9、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216、miR-219-1、miR-125a、miR-26a-1、miR-199b、let-7a-2、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c、miR-101-1、miR-124a-3、let-7f-1及びその組み合わせからなる群より選択される。

30

【0017】

他の態様においては、本発明の医薬組成物は少なくとも1種のmiR発現抑制化合物を含む。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR発現抑制化合物はコントロール細胞よりも肺癌細胞中において発現が多いmiR遺伝子産物に対して特異的である。ある態様においては、前記miR発現抑制化合物はmiR-21、miR-191、miR-210、miR-155、miR-205、miR-24-2、miR-212、miR-214、miR-17-3p、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-146、miR-203、miR-150及びその組み合わせからなる群より選択される1又は複数種のmiRNA遺伝子産物に対して特異的である。

40

【0018】

本発明は、細胞に対し試験薬剤を供給し、該細胞内における少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物の量を測定することを含む、抗肺癌剤の同定法も含む。一態様においては、

50

前記方法は試験薬剤を細胞に供給し、肺癌細胞中の減少した発現量と関連する少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量を測定することを含む。適したコントロール細胞に対する前記細胞中のmiR遺伝子産物の量の増加は、前記試験薬剤が抗肺癌剤であることの指標である。特定の態様においては、肺癌細胞中の減少した発現量と関連する前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-126*、miR-143、miR-192、miR-224、miR-126、miR-30a-5p、miR-140、miR-9、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216、miR-219-1、miR-125a、miR-26a-1、miR-199b、let-7a-2、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c、miR-101-1、miR-124a-3、let-7f-1及びその組み合わせからなる群より選択される。

10

【0019】

他の態様においては、前記方法は細胞に対し試験薬剤を供給し、肺癌細胞中の増加した発現量と関連する少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量を測定することを含む。適したコントロール細胞に対する、肺癌における前記細胞中の増加した発現量と関連する前記miR遺伝子産物の量の減少は、前記試験薬剤が抗肺癌剤であることの指標である。特定の態様においては、肺癌細胞中の増加した発現量と関連する前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-210、miR-155、miR-205、miR-24-2、miR-212、miR-214、miR-17-3p、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-146、miR-203、miR-150及びその組み合わせからなる群より選択される。

20

【0020】

発明の詳細な説明

【0021】

本発明は一部、肺癌細胞において正常なコントロール細胞と比較して変化した発現量を有する特定のマイクロRNAの同定、並びにこれらのマイクロRNAの特定の診断上の、予後診断上の、及び治療上の特性との関連性に基づく。

【0022】

本明細書では互換的に、「miR遺伝子産物」、「マイクロRNA」、「miR」、又は「miRNA」という語をmiR遺伝子からのプロセシングされていない又はプロセシングされたRNA転写産物を表すものとして用いる。miR遺伝子産物はタンパク質に翻訳されないため、「miR遺伝子産物」という語はタンパク質を含まない。プロセシングされていないmiR遺伝子転写産物は「miR前駆体」とも呼ばれ、典型的には70-100ヌクレオチドの長さのRNA転写産物を含む。このmiR前駆体はRNase（例えば、Dicer、Argonaut、RNaseIII（E. coli RNaseIII等））による消化でプロセシングされ、活性のある19-25ヌクレオチドのRNA分子となり得る。この活性のある19-25ヌクレオチドのRNA分子は「プロセシングされた」miR遺伝子転写産物又は「成熟」miRNAとも呼ばれる。

30

【0023】

前記の活性のある19-25ヌクレオチドのRNA分子は天然のプロセシング経路を通じて（例えば無傷細胞又は細胞ライセートを用いて）又は合成プロセシング経路により（例えば単離されたDicer、Argonaut、若しくはRNaseIII等の単離されたプロセシング酵素を用いて）、miR前駆体から得ることが出来る。活性のある19-25ヌクレオチドのRNA分子は生物学的又は化学的合成により、miR前駆体からプロセシングされる必要なく、直接産生することも出来ると理解される。マイクロRNAがここで名称により表される際、特に断りの無い限りは、その名称は前駆体及び成熟型の両者に相当する。

40

【0024】

本発明は、患者からの試験試料における少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量の測定と、該試験試料中のmiR遺伝子産物の量の、コントロール試料中の対応するmiR遺伝

50

子産物の量に対する比較とを含んだ、患者が肺癌を有するか又は肺癌を発症するリスクを有するかを診断する方法を含む。ここで、「患者」は肺癌を有する又は有する疑いのあるどのような哺乳類であってもよい。好ましい態様においては、前記患者は肺癌を有する又は有する疑いのあるヒトである。

【0025】

前記肺癌はどのような形態の肺癌であっても、例えば組織学的に異なった肺癌（腺癌、扁平上皮癌等）であってもよい。さらに、前記肺癌は特定の予後（低生存率、急速な進行等）と関連するものであってもよい。

【0026】

表1a及び表1bに特定の前駆体及び成熟ヒトマイクロRNAのヌクレオチド配列を示す。

10

【0027】

表1a－ヒトマイクロRNA前駆体の配列

【表1】

表1a ヒトマイクロRNA前駆体配列

前駆体名	配列 (5' から3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>let-7a-1</i>	CACUGUGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU UUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGAUAAACUA UACAAUCUACUGUCUUUCCUAAACGUG	1

20

【表 2】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>let-7a-2</i>	AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUAGAA UUACAUCAAGGGAGAUAAACUGUACAGCCUCCU AGCUUUCU	2
<i>let-7a-3</i>	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGGGGCU CUGCCCUGCUAUGGGGAUAACUAUACAAUCUAC UGUCUUUCU	3
<i>let-7a-4</i>	GUGACUGCAUGCUCUCCAGGUUGAGGUAGUAGG UUUGUAUAGUUUAGAAUUACACAAGGGAGAUAA CUGUACAGCCUCCUAGCUUUCUUGGGUCUUG CACUAAACAAC	4
<i>let-7b</i>	GGCGGGGUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUUC GGGCAGUGAUGUUGCCCCUCGGAAGAUAAACUA UACAACCUACUGCCUUCUCCUG	5
<i>let-7c</i>	GCAUCCGGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU UAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAAC CUUCUAGCUUUCUUGGAGC	6
<i>let-7d</i>	CCUAGGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUUUUA GGCAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUAAACUA UACGACCUGCUGCCUUCUAGG	7
<i>let-7d-v1</i>	CUAGGAAGAGGUAGUAGUUUGCAUAGUUUAG GGCAAAGAUUUUGCCCACAAGUAGUUAGCUAU ACGACCUGCAGCCUUCUAG	8
<i>let-7d-v2</i>	CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCG GGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAACUG CGCAAGCUACUGCCUUGCUAG	9
<i>let-7e</i>	CCCGGGCUGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGAG GAGGACACCCAAGGAGAUACUAUACGGCCUC CUAGCUUUCUCCAGG	10
<i>let-7f-1</i>	UCAGAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGG GGUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAACU AUACAAUCUAUUGCCUUCUCCUGA	11
<i>let-7f-2-1</i>	CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGU GGGUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAA CUAUACAAUCUAUUGCCUUCUCCUGA	12
<i>let-7f-2-2</i>	CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUUU AGGGUCAUACCCCAUCUUGGAGAUAAACUAUAC AGUCUACUGUCUUCUCCACGG	13
<i>let-7g</i>	UUGCCUGAUUCCAGGCUGAGGUAGUAGUUUGU ACAGUUUGAGGGUCUAUGAUACCACCCGGUAC AGGAGAUAAACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA GGAACAGCGCGC	14
<i>let-7i</i>	CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCG GGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAACUG CGCAAGCUACUGCCUUGCUAG	15

10

20

30

40

【表 3】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-1b-1-1</i>	ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUAUGUACC CAUAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAAG AAGUAUGUAUUUUUGGUAGGC	16
<i>miR-1b-1-2</i>	CAGCUAACAACUAGUAAUACCUACUCAGAGU ACAUACUUCUUAUGUACCCAUUAUGAACAUAC AAUGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAUUUU UGGUAGGCAAUA	17
<i>miR-1b-2</i>	GCCUGCUUGGGAAACAUAUCUUCUUAUAUGCC CAUAUGGACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAAG AAGUAUGUAUCUCAGGCCGGG	18
<i>miR-1b</i>	UGGGAAACAUAUCUUCUUAUAUGCCCAUAUGG ACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUG UAUCUCA	19
<i>miR-1d</i>	ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUAUGUACC CAUAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAAG AAGUAUGUAUUUUUGGUAGGC	20
<i>miR-7-1a</i>	UGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUA GUGAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCGA CAACAAUUCACAGUCUGCCAUUAUGGCACAGGC CAUGCCUCUACA	21
<i>miR-7-1b</i>	UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACU AGUGAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCG ACAACAAUUCACAGUCUGCCAUUAUGGCACAGG CCAUGCCUCUACAG	22
<i>miR-7-2</i>	CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCAUCU GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUGUCUACUG CGCUCAACAACAAUCCAGUCUACCUAUUGG UGCCAGCCAUCGCA	23
<i>miR-7-3</i>	AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUG GAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUGAUGUACU ACGACAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGC AGACUCCCUUCGAC	24
<i>miR-9-1</i>	CGGGGUUGGUUGUUAUCUUGGUUAUCUAGCU GUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAGCUAG AUAACCGAAAGUAAAAUAACCCCA	25
<i>miR-9-2</i>	GGAAGCGAGUUGUUAUCUUGGUUAUCUAGCU GUAUGAGUGUAUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAU AACCGAAAGUAAAAACUCCUUA	26
<i>miR-9-3</i>	GGAGGCCCGUUCUCUCUUGGUUAUCUAGCU GUAUGAGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAGCUAG AUAACCGAAAGUAGAAAUGAUUCUCA	27
<i>miR-10a</i>	GAUCUGUCUGUCUUCUGUAUAUACCCUGUAGA UCCGAAUUUGUGUAAGGAAUUUGUGGUCACA AAUUCGUAUCUAGGGGAAUAUGUAGUUGACAU AAACACUCCGCUCU	28

10

20

30

40

【表 4】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-10b</i>	<u>CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCCU</u> <u>GUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUUAUAGU</u> CACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAUAUAUGGUCG AUGCAAAAACUUCA	29
<i>miR-15a-2</i>	GCGCGAAUGUGUGUUUAAAAAAAAAUAACC UGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG GAUUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUAUUGUGCUG CCUCAAAAUAAC	30
<i>miR-15a</i>	CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUU GUGGAUUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUAUUGUG CUGCCUCAAAAUAACAAGG	31
<i>miR-15b-1</i>	CUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCAC GUCAAGAUGCGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUAG	32
<i>miR-15b-2</i>	UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCA UGGUUUACAUGCACAGUCAAGAUGCGAAUCA UUAUUUGCUGCUCUAGAAUUAAGGAAUUC AU	33
<i>miR-16-1</i>	GUCAGCAGUGCCUAGCAGCACGUAAAUAUUG GCGUUAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUA ACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC	34
<i>miR-16-2</i>	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGU AGUGAAUAUAUAUUAACACCAUAUUAACUG UGCUGCUUAGUGUGAC	35
<i>miR-16-13</i>	GCAGUGCCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGU UAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAACUG UGCUGCUGAAGUAAGGU	36
<i>miR-17</i>	<u>GUAGAAUAUGUCAAGUGCUUACAGUGCAG</u> <u>GUAGUGAUUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGC</u> <u>ACUUGUAGCAUUAUGGUGAC</u>	37
<i>miR-18</i>	UGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAGUGAA GUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGCUCCU UCUGGCA	38
<i>miR-18-13</i>	UUUUUGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG UGAAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGC UCCUUCUGGCAUAAGAA	39
<i>miR-19a</i>	GCAGUCCUCUGUAGUUUUGCAUAGUUGCACU ACAAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAAUCUAUGCA AAACUGAUGGUGGCCUG	40
<i>miR-19a-13</i>	CAGUCCUCUGUAGUUUUGCAUAGUUGCACUA CAAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAAUCUAUGCAA AACUGAUGGUGGCCUG	41
<i>miR-19b-1</i>	CACUGUUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCA UCCAGCUGUGUGAUUAUUCUGCUGUGCAAAUCC AUGCAAAACUGACUGUGGUAGUG	42

10

20

30

40

【表 5】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-19b-2</i>	ACAUUGCUACUACAAUAGUUUUGCAGGUUU GCAUUUCAGCGUAUAUAUGUAUAUGUGGCUGU GCAAAUCCAUGCAAAACUGAUUGUGAUAAUGU	43
<i>miR-19b-13</i>	UUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAG CUGUGUGAUAUUCUGCUGUGCAAAUCCAUGCA AAACUGACUGUGGUAG	44
<i>miR-19b-X</i>	UUACAAUAGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCAGC GUAUAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAAUCCA GCAAAACUGAUUGUGAU	45
<i>miR-20</i> (<i>miR-20a</i>)	GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUG UUUAGUUAUCUACUGCAUUAUGAGCACUAAA GUACUGC	46
<i>miR-21</i>	UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUUGUAGCUG UUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCU GUCUGACA	47
<i>miR-21-17</i>	ACCUUGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUUGU ACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUG GGCUGUCUGACAUUUUG	48
<i>miR-22</i>	GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGC UUUAUGUCCUGACCCAGCUAAAGCUGCCAGUU GAAGAACUGUUGCCCUCUGCC	49
<i>miR-23a</i>	GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUGC UUCUGUCACAAAUACAUUGCCAGGGGAUUUC CAACCGACC	50
<i>miR-23b</i>	CUCAGGUGCUCUGGCUGCUUGGGUUCUGGCA UGCUGAUUUGUGACUUAAGAUUAAAAUCACAU UGCCAGGGAUUACCACGCAACCACGACCUUGG C	51
<i>miR-23-19</i>	CCACGGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAU UUGCUUCCUGUCACAAAUACAUUGCCAGGGA UUUCCAACCGACCCUGA	52
<i>miR-24-1</i>	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGUUCUC AUUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACA GGAG	53
<i>miR-24-2</i>	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACAC AGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCA GGAACAGGG	54
<i>miR-24-19</i>	CCCUGGGCUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUG AAACACAGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGU UCAGCAGGAACAGGGG	55
<i>miR-24-9</i>	CCCUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUAUCAGUUC UCAUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAA CAGCAUC	56

10

20

30

【表 6】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-25</i>	GGCCAGUGUUGAGAGGCGGAGACUUGGGCAAU UGCUGGACGCUGCCCUGGGCAUUGCACUUGUC UCGGUCUGACAGUGCCGGCC	57
<i>miR-26a</i>	AGGCCGUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUA GGCUGUGCAGGUUCCAAUGGCCUAUCUUGGUU ACUUGCACGGGGACGCGGGCCU	58
<i>miR-26a-1</i>	GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUG UGCAGGUCCAAUGGGGCCUAUUCUUGGUUACU UGCACGGGGACGC	59
<i>miR-26a-2</i>	GGCUGUGGCUGGAUUAAGUAAUCCAGGAUAG GCUGUUUCCAUCUGUGAGGCCUAUUCUUGAUU ACUUGUUUCUGGAGGCAGCU	60
<i>miR-26b</i>	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU UGUGUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCAUAUACUUG GCUCGGGGACCGG	61
<i>miR-27a</i>	CUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAG GGUCCACACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUAA GUUCCGCCCCCCAG	62
<i>miR-27b-1</i>	AGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGUG AUUGGUUUCGCUUUGUUCACAGUGGCUAAGU UCUGCACCU	63
<i>miR-27b-2</i>	ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAU UGGUGAACAGUGAUUGGUUUCGCUUUGUUCA CAGUGGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGU G	64
<i>miR-27-19</i>	CCUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA GGGUCCACACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUA AGUUCGGCCCCCAGG	65
<i>miR-28</i>	GGUCCUUGCCCUCAGGAGCUCACAGUCUAAU GAGUUACCUUUCUGACUUUCCACUAGAUGU GAGCUCCUGGAGGGCAGGCACU	66
<i>miR-29a-2</i>	CCUUCUGUGACCCCUUAGAGGAUGACUGAUUU CUUUUGGUGUUCAGAGUCAUAUAUUUUUCUA GCACCAUCUGAAAUCGGUUAUAAUGAUUGGGG AAGAGCACCAUG	67
<i>miR-29a</i>	AUGACUGAUUUUUUUGGUGUUCAGAGUCAAU AUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUAU	68
<i>miR-29b-1</i>	CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUUUGGUGGUUAG AUUUAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAA AUCAGUGUUCUUGGGGG	69
<i>miR-29b-2</i>	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG AUUUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGA AAUCAGUGUUUUAGGAG	70

10

20

30

【表 7】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-29c</i>	ACCACUGGCCCAUCUCUACACAGGCUGACCG AUUUCUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUC UAGCACCAUUUGAAAUCCGUUAUGAUGUAGGG GGAAAAGCAGCAGC	71
<i>miR-30a</i>	GCGACUGUAAACAUCUCCGACUGGAAGCUGUG AAGCCACAGAUGGGCUUUCAGUCGGAUGUUUG CAGCUGC	72
<i>miR-30b-1</i>	AUGUAAACAUCUACACUCAGCUGUAAUACA GGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUUUACGU	73
<i>miR-30b-2</i>	ACCAAGUUUCAGUUCAGUAAACAUCUACAC UCAGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUG GAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA	74
<i>miR-30c</i>	AGAUACUGUAAACAUCUACACUCUCAGCUGU GGAAAGUAAGAAAGCUGGGAGAAGGCUGUUUA CUCUUUCU	75
<i>miR-30d</i>	GUUGUUGUAAACAUCUCCCGACUGGAAGCUGUA AGACACAGCUAAGCUUUCAGUCAGAUGUUUGC UGCUC	76
<i>miR-30e</i>	CUGUAAACAUCUUGACUGGAAGCUGUAAAGGU GUUCAGAGGAGCUUUCAGUCGGAUGUUUACAG	77
<i>miR-31</i>	GGAGAGGAGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUUG AACUGGGAACCUGCUAUGCCAACAUAUUGCCA UCUUUC	78
<i>miR-32</i>	GGAGAUUUUGCACAUAUAAGUUGCAUGUUG UCACGGCCUCAUGCAAUUUAGUGUGUGAU AUUUUC	79
<i>miR-33b</i>	GGGGGCCGAGAGAGGCGGGCGCCCCGCGGUG CAUUGCUGUUGCAUUGCACGUGUGAGGCGG GUGCAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCG GCCCCUGGCACCAC	80
<i>miR-33b-2</i>	ACCAAGUUUCAGUUCAGUAAACAUCUACAC UCAGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUG GAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA	81
<i>miR-33</i>	CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCU GGUGGUACCCAUGCAAUGUUUCCACAGUGCAU CACAG	82
<i>miR-34-a</i>	GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCU UAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGC AAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGC ACGUUGUGGGGCCC	83
<i>miR-34-b</i>	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGA UUUGUACUGUGGUGGUUACAAUCACUAACUCCA CUGCCAUCAAAACAAGGCAC	84

10

20

30

【表 8】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-34-c</i>	<u>AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAGCUGAU</u> <u>UGC UAAUAGUACCAUACACUAACCACACGGCC</u> <u>AGGUAAAAAGAUU</u>	85
<i>miR-91-13</i>	<u>UCAGAAUAAUGUCAAGUGCUUACAGUGCAGG</u> <u>UAGUGAUUUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCA</u> <u>CUUGUAGCAUUAUGGUGA</u>	86
<i>miR-92-1</i>	<u>CUUUCUACACAGGUUGGGAUUCGGUUGCAAUGC</u> <u>UGUGUUUCUGUAUGGUUAUUGCACUUGUCCCGG</u> <u>CCUGUUGAGUUUGG</u>	87
<i>miR-92-2</i>	<u>UCAUCCCUUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUACUU</u> <u>GUGUUCUAUAUAAAAGUAUUGCACUUGUCCCGG</u> <u>CCUGUGGAAGA</u>	88
<i>miR-93-1</i> (<i>miR-93-2</i>)	<u>CUGGGGGCUCCAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUA</u> <u>GUGUGAUUACCCAACCUACUGCUGAGCUAGCA</u> <u>CUUCCCGAGCCCCCGG</u>	89
<i>miR-95-4</i>	<u>AACACAGUGGGCACUCAUAAUAAUGUCUGUUGA</u> <u>AUUGAAAUGCGUUAUUAUUAACGGGUUUUAU</u> <u>UGAGCACCCACUCUGUG</u>	90
<i>miR-96-7</i>	<u>UGGCCGAUUUUGGCACUAGCACAUUUUUGCUU</u> <u>GUGUCUCUCCGCUCUGAGCAAUCAUGUGCAGU</u> <u>GCCAAUAUGGGAAA</u>	91
<i>miR-97-6</i> (<i>miR-30*</i>)	<u>GUGAGCGACUGUAAACAUCUCGACUGGAAGC</u> <u>UGUGAAGCCACAGAUGGGCUUUCAGUCGGAUG</u> <u>UUUGCAGCUGCCUACU</u>	92
<i>miR-98</i>	<u>GUGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUUGUGGGGUA</u> <u>GGGAUAUUAAGGCCCAAUUAGAAGAUAAUUAU</u> <u>ACAACUUACUACUUCC</u>	93
<i>miR-99b</i>	<u>GGCACCCACCCGUAGAACCGACCUUGCGGGGCC</u> <u>UUCGCCGCACACAAGCUCGUGUCUGUGGGUCC</u> <u>GUGUC</u>	94
<i>miR-99a</i>	<u>CCCAUUGGCAUAAACCCGUAGAUCCGAUCUUG</u> <u>UGGUGAAGUGGACCGCACAAAGCUCGCUUCUAU</u> <u>GGGUCUGUGUCAGUGUG</u>	95
<i>miR-100-1/2</i>	<u>AAGAGAGAAGAUUUGAGGCCUGUUGCCACAA</u> <u>ACCCGUAGAUCCGAACUUGUGGUUAUUAUUGCCG</u> <u>CACAAGCUUGUAUCUAUAGGUUAUGUGUCUGUU</u> <u>AGGCAAUCUCAC</u>	96
<i>miR-100-11</i>	<u>CCUGUUGCCACAACCCGUAGAUCCGAACUUG</u> <u>UGGUAUUAUGUCCGCACAAGCUUGUAUCUAUAG</u> <u>GUAUGUGUCUGUUAAGG</u>	97
<i>miR-101-1/2</i>	<u>AGGCUGCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGA</u> <u>UGCUGUCUAUUCUAAAGGUACAGUACUGUGAU</u> <u>AACUGAAGGAUGGCAGCCAUCUUAACCUUCCA</u> <u>CAGAGGAGCCUCAC</u>	98

10

20

30

40

【表 9】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-101</i>	UCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCCAUUCU AAAGGUACAGUACUGUGAUAAACUGA	99
<i>miR-101-1</i>	UGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGC GUCUAUUCUAAAGGUACAGUACUGUGAUAAACU GAAGGAUGGCA	100
<i>miR-101-2</i>	ACUGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUG CUGUAUAUCUGAAAGGUACAGUACUGUGAUAA CUGAAGAAUGGUGU	101
<i>miR-101-9</i>	UGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGCU GUAUAUCUGAAAGGUACAGUACUGUGAUAAACU GAAGAAUGGUG	102
<i>miR-102-1</i>	CUUCUGGAAGCUGGUUUUCACAUGGUGGCUUAG AUUUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGA AAUCAGUGUUUUAGGAG	103
<i>miR-102-7.1</i> (<i>miR-102-7.2</i>)	CUUCAGGAAGCUGGUUUUCAUAUGGUGGUUUAG AUUUAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAA AUCAGUGUUCUUGGGGG	104
<i>miR-103-2</i>	UUGUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGCUGCCUU GUAGCAUUCAGGUCAAGCAACAUAUGUACAGGG CUAUGAAAGAACCA	105
<i>miR-103-1</i>	UACUGCCCUCGGCUUCUUUACAGUGCUGCCUU GUUGCAUAUGGAUCAAGCAGCAUAUGUACAGGG CUAUGAAGGCAUUG	106
<i>miR-104-17</i>	AAAUGUCAGACAGCCCAUCGACUGGUGUUGCC AUGAGAUUCAACAGUCAACAUCAGUCUGAUAA GCUACCCGACAAGG	107
<i>miR-105-1</i>	UGUGCAUCGUGGUCAAAUGCUCAGACUCCUGU GGUGGCUGCUCAUGCACCACGGAUGUUUGAGC AUGUGCUACGGUGUCUA	108
<i>miR-105-2</i>	UGUGCAUCGUGGUCAAAUGCUCAGACUCCUGU GGUGGCUGCUUUAUGCACCACGGAUGUUUGAGC AUGUGCUAUGGUGUCUA	109
<i>miR-106-a</i>	CCUUGGCCAUGUAAAAGUGCUUACAGUGCAGG UAGCUUUUUGAGAUCUACUGCAAUGUAAGCAC UUCUUACAUAACCAUGG	110
<i>miR-106-b</i>	CCUGCCGGGGCUAAAGUGCUGACAGUGCAGAU AGUGGUCCUCUCCGUGCUACCGCACUGUGGGU ACUUGCUGCUCCAGCAGG	111
<i>miR-107</i>	CUCUCUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGUUGCC UUGUGGCAUGGAGUUCAAGCAGCAUUGUACAG GGCUAUCAAAGCACAGA	112
<i>miR-108-1-small</i>	ACACUGCAAGAACAUAAGGAUUUUUAGGGGC AUUAUGACUGAGUCAGAAAACACAGCUGCCCC UGAAAGUCCCUCAUUUUUCUUGCUGU	113

10

20

30

40

【表 10】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-108-2-small</i>	ACUGCAAGAGCAAUAAGGAUUUUUAGGGGCAU UAUGAUAGUGGAAUGGAAACACAUCUGCCCC AAAAGUCCCUCAUUUU	114
<i>miR-122a-1</i>	CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUG UUUGUGUCUAAACUAUCAACGCCAUUAUCAC ACUAAAUAGCUACUGCUAGGC	115
<i>miR-122a-2</i>	AGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCC AAACUAUCAACGCCAUUAUCACACUAAAUAG CU	116
<i>miR-123</i>	ACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU UCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC	117
<i>miR-124a-1</i>	AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUU GAUUUAAUGUCCAUAACAUAAGGCACGCGG UGAAUGCCAAGAAUGGGGCUG	118
<i>miR-124a-2</i>	AUCAAGAUUAGAGGCUCUCUCCGUGUUCA CAGCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAUAUA GGCACGCGGUGAAUGCCAAGAGCGGAGCCUAC GGCUGCACUUGAAG	119
<i>miR-124a-3</i>	UGAGGGCCCCUCUGCGUGUUCACAGCGGACCU UGAUUUAAUGUCUAUACAUAUAAGGCACGCGG UGAAUGCCAAGAGAGGGCCCUCC	120
<i>miR-124a</i>	CUCUGCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAU GUCUAUACAUAUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA AGAG	121
<i>miR-124b</i>	CUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAU GUCAUACAUAUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA GAG	122
<i>miR-125a-1</i>	UGCCAGUCUCUAGGUCCUGAGACCCUUAAC CUGUGAGGACAUCAGGGUCACAGGUGAGGUU CUUGGGAGCCUGGCGUCUGGCC	123
<i>miR-125a-2</i>	GGUCCUGAGACCCUUAACCUGUGAGGACA CCAGGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCCUG G	124
<i>miR-125b-1</i>	UGCGCUCCUCUCAGUCCUGAGACCCUAACUU GUGAUGUUUACCGUUUAAAUCCACGGGUUAGG CUCUUGGGAGCUGCGAGUCGUGCU	125
<i>miR-125b-2</i>	ACCAGACUUUUCUAGUCCUGAGACCCUAAC UUGUGAGGUUUUUAGUAACAUCACAAGUCAG GCUCUUGGGACCUAGGCGGAGGGGA	126
<i>miR-126-1</i>	CGCUGGCGACGGGACAUAUAUACUUUUGGUAC GCGCUGUGACACUCAAACUCGUACCGUGAGU AAUAAUGCGCCGUCCACGGCA	127
<i>miR-126-2</i>	ACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU UCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC	128

10

20

30

40

【表 1 1】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-127-1</i>	UGUGAUCACUGUCUCCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUUUCAGAAAGAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCUGGUCGGAAGUCUCAUCAUC	129
<i>miR-127-2</i>	CCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUUUCAGAAAGAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCUGGUCGG	130
<i>miR-128a</i>	UGAGCUGUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUGAGAGGUUACAUAUUCUCACAGUGAACCUGGUCUCUUUUUCAGCUGCUUC	131
<i>miR-128b</i>	GCCCGGCAGCCACUGUGCAGUGGGGAAGGGGGCCGAUACACUGUACGAGAGUGAGUAGCAGGUCUCACAGUGAACCUGGUCUCUUUCCCUACUGUGUCACACUCCUAAUGG	132
<i>miR-128</i>	GUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUGAGAGGUUACAUAUUCUCACAGUGAACCUGGUCUCUUUUCAGC	133
<i>miR-129-1</i>	UGGAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCUGUUCUCUCAACAGUAGUCAGGAAGCCCUUACCCCAAAGUAUCUA	134
<i>miR-129-2</i>	UGCCCUUCGCGAAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCUGUACAUAACUCAAUAGCCGGAAGCCCUUACCCCAAAAGCAUUUGCGGAGGGCG	135
<i>miR-130a</i>	UGCUGCUGGCCAGAGCUCUUUUCACAUUGUGCUACUGUCUGCACCUGUCACUAGCAGUGCAAUGUUAAGGGCAUUGGCCGUGUAGUG	136
<i>miR-131-1</i>	GCCAGGAGGCGGGGUUGGUUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAUAACCCCAUACACUGCGCAG	137
<i>miR-131-3</i>	CACGGCGCGGCAGCGGCACUGGCCUAAGGGAGGCCCGUUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAGCUAGAUAAACGAAAGUAGAAAUG	138
<i>miR-131</i>	GUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGUAUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAAC	139
<i>miR-132-1</i>	CCGCCCCCGCUGUCUCCAGGGCAACCGUGGCUUUCGAUUGUACUGUGGGAACUGGAGGUAAACAGUCUACAGCCAUGGUCGCCCCGCAGCACGCCCACGCGC	140
<i>miR-132-2</i>	GGGCAACCGUGGCUUUCGAUUGUUAUCUGUGGGAACUGGAGGUAAACAGUCUACAGCCAUGGUCGCGCC	141

10

20

30

40

【表 1 2】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-133a-1</i>	ACAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAAC CAAAUCGCCUCUCAAUGGAUUUGGUCCCCU CAACCAGCUGUAGCUAUGCAUUGA	142
<i>miR-133a-2</i>	GGGAGCCAAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAA UGGAACCAAAUCGACUGUCCAUGGAUUUGGU CCCCUUAACCAGCUGUAGCUGUGCAUUGAUG GCGCCG	143
<i>miR-133</i>	GCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAAUCGCCU CUUCAUUGGAUUUGGUCCCCUUAACCAGCUG UAGC	144
<i>miR-133b</i>	CCUCAGAAGAAAGAUGCCCCCUGCUCUGGCUG GUCAAACGGAACCAAGUCCGUCUCCUGAGAG GUUUGGUCCCCUUAACCAGCUACAGCAGGGC UGGCAAUGCCCAGUCCUUGGAGA	145
<i>miR-133b-small</i>	GCCCCCUGCUCUGGCUGGUCAAACGGAACCAA GUCCGUCUCCUGAGAGGUUUGGUCCCCUUA ACCAGCUACAGCAGGG	146
<i>miR-134-1</i>	CAGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAU GCACUGUGUUAACCCUGUGGGCCACCUAGUCA CCAACCCUC	147
<i>miR-134-2</i>	AGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAUG CACUGUGUUAACCCUGUGGGCCACCUAGUCAC CAACCCU	148
<i>miR-135a-1</i>	AGGCCUCGCUGUUCUCUAUGGCUUUUAUUC UAUGUGAUUCUACUGCUCACUCAUAUAGGGAU UGGAGCCGUGGCGCACGGCGGGGACA	149
<i>miR-135a-2</i> (<i>miR-135-2</i>)	AGAUAAAUUCACUCUAGUGCUUUUUGGCUUUU UAUUCCUAUGUGAUAGUAAUAAAGUCUCAUGU AGGGAUGGAAGCCAUGAAAUACAUUGUGAAAA AUCA	150
<i>miR-135</i>	CUAUGGCUUUUAUUCCUAUGUGAUUCUACUG CUCACUCAUAUAGGGAUUGGAGCCGUGG	151
<i>miR-135b</i>	CACUCUGCUGUGGCCUAUGGCUUUUCAUUCU AUGUGAUUGCUGUCCCAAACUCAUGUAGGGCU AAAAGCCAUGGGCUACAGUGAGGGGCGAGCUC C	152
<i>miR-136-1</i>	UGAGCCUCGAGGACUCCAUUUGUUUUGAUG AUGGAUUCUUAUGCUCCAUCAUCGUCUCAAU GAGUCUUCAGAGGGUUCU	153
<i>miR-136-2</i>	GAGGACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGAUUCU AUGCUCUCCAUCGUCUCAAUGAGUCUUC	154
<i>miR-137</i>	CUUCGGUGACGGGUAAUUCUUGGGUGGAUAAUA CGGAUUACGUUGUUAUUGCUUAAGAAUACGCG UAGUCGAGG	155

10

20

30

40

【表 1 3】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-138-1</i>	<u>CCCUGGCAUGGUGUGGUGGGGCAGCUGGUGUU</u> <u>GUGAAUCAGGCCGUUGCCAAUCAGAGAACGGC</u> UACUUCACAACACCAGGGCCACACCACACUACA GG	156
<i>miR-138-2</i>	CGUUGCUGCAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG ACGAGCAGCGCAUCCUCUACCCGGCUAUUUC ACGACACCAGGGUUGCAUCA	157
<i>miR-138</i>	<u>CAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACGAGCAG</u> CGCAUCCUCUACCCGGCUAUUUCACGACACCA GGGUUG	158
<i>miR-139</i>	GUGUAUUCUACAGUGCACGUGUCUCCAGUGUG GCUCGGAGGCUGGAGACGCGGCCCUUGUGGAG UAAC	159
<i>miR-140</i>	UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGCCAGUGGUUUU <u>ACCCUAUGGUAGGUUACGUCAUGCUGUUCUAC</u> <u>CACAGGGUAGAACCACGGACAGGAUACCGGGG</u> CACC	160
<i>miR-140as</i>	<u>UCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUA</u> CGUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCAC GGACAGGA	161
<i>miR-140s</i>	<u>CCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUAC</u> GUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACG GACAGG	162
<i>miR-141-1</i>	CGGCCGGCCUGGGUCCAUCUCCAGUACAGU GUUGGAUGGUCUAAUUGUGAAGCUCCUAAACAC UGUCUGGUAAAAGAUGGCUCCCGGGUGGGUUC	163
<i>miR-141-2</i>	GGGUCCAUCUCCAGUACAGUGUUGGAUGGUC UAAUUGUGAAGCUCCUAAACACUGUCUGGUAAA GAUGGCCC	164
<i>miR-142</i>	<u>ACCCAUAAGUAGAAAGCACUACUAAACAGCAC</u> <u>UGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGAUG</u>	165
<i>miR-143-1</i>	GCGCAGCGCCUGUCUCCAGCCUGAGGUGCA GUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAG <u>AUGAAGCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAGUU</u> GUUCUGCAGC	166
<i>miR-143-2</i>	CCUGAGGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUU GGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG	167
<i>miR-144-1</i>	UGGGGCCCUGGCUGGGAUAUCAUAUAUACUG UAAGUUUGCGAUGAGACACUACAGUAUAGAUG <u>AUGUACUAGUCCGGGCACCCCC</u>	168
<i>miR-144-2</i>	GGCUGGGAUAUCAUAUAUACUGUAAGUUUGC GAUGAGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAG UC	169

10

20

30

40

【表 1 4】

前駆体名	配列 (5' から3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-145-1</i>	CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUU <u>UCCCAGGA</u> <u>AUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAU</u> UCCUGGA AAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU	170
<i>miR-145-2</i>	CUCACGGUCCAGUUU <u>UCCCAGGAAUCCCUUAG</u> <u>AUGCUAAGAUGGGGAU</u> UCCUGGAAAUACUGUU CUUGAG	171
<i>miR-146-1</i>	CCGAUGUGUAUCCUCAGCUU <u>UGAGAACUGAAU</u> <u>UCCAUGGGUUGUGUCAGUGUCAGACCUCUGAA</u> AUUCAGUUCUUCAGCUGGGGAUAUCUCUGUCAU CGU	172
<i>miR-146-2</i>	AGCUUUGAGAACUGAAU <u>UCCAUGGGUUGUGUC</u> <u>AGUGUCAGACCUGUGAAAUUCAGUUCUUCAGC</u> U	173
<i>miR-147</i>	AAUCUAAAGACAACA <u>UUUCUGCACACACACCA</u> <u>GACUAUGGAAGCCAGUGUGUGGAAAUGCUUCU</u> GCUAGAUU	174
<i>miR-148a</i> (<i>miR-148</i>)	GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAG <u>UAUGAUAGAAGUCAGUGCACUACAGAACUUUG</u> UCUC	175
<i>miR-148b</i>	CAAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUG <u>UUUAACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUC</u> <u>AGUGCAUCACAGAACUUUGUCUCGAAAGCUUU</u> CUA	176
<i>miR-148b-small</i>	AAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUGU <u>UAUACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUCA</u> GUGCAU	177
<i>miR-149-1</i>	GCCGGCGCCCGAGCUCUGGCUC <u>CCGUGUCUUCAC</u> <u>UCCCGUGCUUGUCCGAGGAGGGAGGGAGGGAC</u> GGGGGCUGUGCUGGGGCAGCUGGA	178
<i>miR-149-2</i>	GCUCUGGCUC <u>CCGUGUCUUCACUCCGUGCUUG</u> <u>UCCGAGGAGGGAGGGAGGGAC</u>	179
<i>miR-150-1</i>	CUCCCCAUGGCCCU <u>GUCUCCCAACCCUUGUACC</u> <u>AGUGCUGGGCUCAGACCCUGGUACAGGCCUGG</u> GGGACAGGGACCUGGGGAC	180
<i>miR-150-2</i>	CCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGUGCUGGGC <u>UCAGACCCUGGUACAGGCCUGGGGGACAGGG</u>	181
<i>miR-151</i>	UUUCCUGCCUCGAGGAGCUCACAGUCUAGUA <u>UGUCUCAUCCCCUACUAGACUGAAGCUCCUUG</u> AGGACAGG	182
<i>miR-151-2</i>	CCUGUCCUCAAGGAGCUUCAGUCUAGUAGGGG <u>AUGAGACAUACUAGACUGUGAGCUCCUCGAGG</u> GCAGG	183
<i>miR-152-1</i>	UGUCCCCCCCCGGCCAGGUUCUGUGAUACACUC <u>CGACUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGAC</u> <u>AGAACUUGGGCCCGGAAGGACC</u>	184

10

20

30

40

【表 15】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
miR-152-2	GGCCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGACUCGGG CUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAACUUGG GCCCCGG	185
miR-153-1-1	CUCACAGCUGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUCUG CAGCUAGUAUUCUCACUCCAGUUGCAUAGUCA CAAAAGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGC	186
miR-153-1-2	UCUCUCUCUCCCUCACAGCUGCCAGUGUCAUU GUCACAAAAGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGCUG CUGCAUG	187
miR-153-2-1	AGCGGUGGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGC AGCUAGUAAUAUGAGCCCAGUUGCAUAGUCAC AAAAGUGAUCAUUGGAAACUGUG	188
miR-153-2-2	CAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCUAGUAA UAUGAGCCCAGUUGCAUAGUCACAAAAGUGAU CAUUG	189
miR-154-1	GUGGUACUUGAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCC UUCGCUUUAUUUGUGACGAAUCAUACACGGUU GACCUAUUUUCAGUACCAA	190
miR-154-2	GAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCGCUUUA UUUGUGACGAAUCAUACACGGUUGACCUAUUU UU	191
miR-155	CUGUUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUUUUGC CUCCAACUGACUCCUACAUAUUAGCAUUAACA G	192
miR-156 = miR-157=overla p miR-141	CCUAACACUGUCUGGUAAAGAUGGCUCCCGGG UGGGUUCUCUCGGCAGUAACCUUCAGGGAGCC CUGAAGACCAUGGAGGAC	193
miR-158- small = miR-192	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAU GAAUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCU GGCUGCCAAUUCCAUAGGUACAGGUAUGUUC GCCUCA AUGCCAGC	194
miR-159-1- small	UCCCGCCCCUGUAACAGCAACUCCAUGUGGA AGUGCCCACUGGUUCCAGUGGGGCGUCUGUUA UCUGGGGCGAGGGCCA	195
miR-161- small	AAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAG GUGACUGGUCUGGGCUACGCUAUGCUGCGGCG CUCGGG	196
miR-163- 1b-small	CAUUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUC GAGUCCCACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGAAUU	197
miR-163-3- small	CCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAGUCCAC CUGGGGUAGAGGUGAAAGUUCUUAUACGGAA UUUUUU	198

10

20

30

【表 16】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-162</i>	CAAUGUCAGCAGUGCCU <u>UAGCAGCACGUA</u> AAU AUUGGCGUUAAGAUUCUAAAAUU <u>AUCUCCAGU</u> AUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGACCAU ACUCUACAGUUG	199
<i>miR-175- small=miR- 224</i>	GGGCUUUCAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGU AGAUGAUUGUGCAUUGUUUCAAAAUGGUGCCC UAGUGACUACAAAGCCC	200
<i>miR-177- small</i>	ACGCAAGUGUCCUAAGGUGAGCUCAGGGAGCA CAGAAACCUCAGUGGAACAGAAGGGC ~~AAAAG~~ CUCAUU	201
<i>miR-180- small</i>	CAUGUGUCACUUUCAGGUGGAGUUUCAAGAGU CCCUUCCUGGUUCACCGUCUCCUUUGCUCUCC ACAAC	202
<i>miR-181a</i>	AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACU CCAAGGAACA <u>UUCAAACGCUGUCGGUGAGUUUG</u> GGAUUUGAAAAAACACUGACCGUUGACUGUA CCUUGGGGUCCUUA	203
<i>miR-181b-1</i>	CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUAAAAGGUCACA AUCAACA <u>UUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACU</u> GUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAA CUGUGGCCCCGCUU	204
<i>miR-181b-2</i>	CUGAUGGCUGCACUCAACA <u>UUCAUUGCUGUCG</u> <u>GUGGGUUUGAGUCUGAAUCAACUCACUGAUC</u> AUGAAUGCAAACUGCGGACCAAACA	205
<i>miR-181c</i>	CGGAAAAUUUGCCAAGGGUUUGGGGGAACA <u>UU</u> CAACCUUGCGGUGAGUUUGGGCAGCUCAGGCA AACCAU <u>CGACCGUUGAGUGGACCCUGAGGCCU</u> GGAAUUGCCAUCU	206
<i>miR-182-as</i>	GAGCUGCUUGCCUCCCCCGUUUUUGGCAAUG GUAGAACUCACACUGGUGAGGUAAACAGGAUCC GGUGGUUCUAGACUUGCCAACU <u>UUGGGCGAG</u> GACUCAGCCGGCAC	207
<i>miR-182</i>	UUUUUGGCAAUGGUAGAACUCACACUGGUGAG GUAACAGGAUCCGGUGGUUCUAGACUUGCCAA CUAUGG	208
<i>miR-183</i>	CCGCAGAGUGUGACUCCUGUUCUGUGUAUGGC ACUGGUAGAAUUCACUGUGAACAGUCUCAGUC AGUGAAUUACCGAAGGGCCAUAACAGAGCAG AGACAGAUCCACGA	209
<i>miR-184-1</i>	CCAGUCACGUCCCCUUAUCACUUUCCAGCCCA GCUUUGUGACUGUAAGUGUUGGACGGAGAACU GAUAAGGGUAGGUGAUUGA	210
<i>miR-184-2</i>	CCUUAUCACUUUCCAGCCCAGCUUUGUGACU GUAAGUGUUGGACGGAGAACUGAUAAGGGUAG G	211

10

20

30

40

【表 17】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
miR-185-1	AGGGGGCGAGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGUUC CUGAUGGUCCCCUCCCCAGGGGCUGGCUUUC UCUGGUCCUUCCCUCCCA	212
miR-185-2	AGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGUUCUGAUGGU CCCCUCCCCAGGGGCUGGCUUCCUCUGGUCCU U	213
miR-186-1	UGCUGUAACUUCUCAAAGAAUUCUCCUUUUG GGCUUUCUGGUUUUAUUUUAAGCCCAAAGGUG AAUUUUUUGGGAAGUUUGAGCU	214
miR-186-2	ACUUUCCAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCUUUCU GGUUUUAUUUUAAGCCCAAAGGUGAAUUUUU GGGAAGU	215
miR-187	GGUCGGGCUCACCAUGACACAGUGUGAGACUC GGGCUACAACACAGGACCCGGGGCGCUGCUCU GACCCUUCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGGAGGG ACGCAGGUCCGCA	216
miR-188-1	UGCUCUCCUCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGA GGGUGAGCUUUCUGAAAACCCUCCCACAUGC AGGGUUGCAGGAUGGCGAGCC	217
miR-188-2	UCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGUGAGCU UUCUGAAAACCCUCCCACAUGCAGGGUUGC AGGA	218
miR-189-1	CUGUCGAUUGGACCCGCCCUCCGGUGCCUACU GAGCUGAUUACAGUUCUCAUUUACACACUGG CUCAGUUCAGCAGGAACAGGAGUCGAGCCCU GAGCAA	219
miR-189-2	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUACAGUUCUC AUUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACA GGAG	220
miR-190-1	UGCAGGCCUCUGUGUGAUUUGUUUGAUUAUU AGGUUGUUAUUUAAUCCAACUAUAUAUCAAAC AUAUCCUACAGUGUCUUGCC	221
miR-190-2	CUGUGUGAUUUGUUUGAUUAUUUAGGUUGUUA UUUAAUCCAACUAUAUAUCAAACAUAUCCUA CAG	222
miR-191-1	CGGCUGGACAGCGGGCAACGGAAUCCCAAAAG CAGCUGUUGUCUCCAGAGCAUCCAGCUGCGC UUGGAUUUCGUCCCCUGCUCUCCUGCCU	223
miR-191-2	AGCGGGCAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUGUUG UCUCCAGAGCAUCCAGCUGCGCUUGGAUUUC GUCCCCUGCU	224
miR-192- 2/3	CCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUG AAUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUG GCUGCCAAUCCAUAGGUCACAGGUAUGUUCG CCUCAUUGCCAG	225

10

20

30

40

【表 18】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
miR-192	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAU GAAUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCU GGCUGCCAAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUC GCCUCAUAGCCAGC	226
miR-193-1	CGAGGAUAGGGAGCUGAGGGCUGGGUCUUUGCG GGCGAGAUGAGGGUGUCGGAUCAACUGGCCUA CAAAGUCCCAGUUCUCGGCCCCCG	227
miR-193-2	GCUGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGAGGGUGUCG GAUCAACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	228
miR-194-1	AUGGUGUUAUCAAGUGUAAACAGCAACUCCAUG UGGACUGUGUACCAAUUCCAGUGGAGAUGCU GUUACUUUGAUGGUUACCAA	229
miR-194-2	GUGUAAACAGCAACUCCAUGUGGACUGUGUACC AAUUUCCAGUGGAGAUGCUGUACUUUUGAU	230
miR-195-1	AGCUUCCCUGGCUCUAGCAGCACAGAAUAUU GGCACAGGGAAGCGAGUCUGCCAAUAUUGGCU GUGCUGCUCCAGGCAGGGUGGUG	231
miR-195-2	UAGCAGCACAGAAUAUUGGCACAGGGAAGCG AGUCUGCCAAUAUUGGCUGUGCUGCU	232
miR-196-1	CUAGAGCUUGAAUUGGAACUGCUGAGUGAAUU AGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUGGGUUUCU GAACACAACAACAUAAACCACCCGAUUCACG GCAGUUACUGCUC	233
miR-196a-1	GUGAAUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUG GGUUUCUGAACACAACAACAUAAACCACCCG AUUCAC	234
miR-196a-2 (miR-196-2)	UGCUCGCUCAGCUGAUCUGUGGCUUAGGUAGU UUCAUGUUGUUGGGAUUGAGUUUUGAACUCGG CAACAAGAAACUGCCUGAGUUACAUCAGUCGG UUUUCGUCGAGGGC	235
miR-196	GUGAAUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUG GGUUUCUGAACACAACAACAUAAACCACCCG AUUCAC	236
miR-196b	ACUGGUCGGUGAUUUAGGUAGUUUCCUGUUGU UGGGAUCCACCUUUCUCUCGACAGCAGCAGAC UGCCUUCAUUACUUCAGUUG	237
miR-197	GGCUGUGCCGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGGU AAGAGCUCUUCACCCUUCACCACCUUCUCCACC CAGCAUGGCC	238
miR-197-2	GUGCAUGUGUAUGUAUGUGUGCAUGUGCAUGU GUAUGUGUAUGAGUGCAUGCGUGUGUGC	239
miR-198	UCAUUGGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUCCUGUG AUUUUCCUUCUUCUCUAUAGAAUAAAUGA	240

10

20

30

40

【表 19】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-199a-1</i>	GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGA GGCUCUCAUGUGUACAGUAGUCUGCACAUUG GUUAGGC	241
<i>miR-199a-2</i>	AGGAAGCUUCUGGAGAUCCUGCUCCGUCGCCC CAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGACAAUGCC GUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGACUG GGCAAGGGAGAGCA	242
<i>miR-199b</i>	CCAGAGGACACCUCACUCCGUCUACCCAGUGU UUAGACUAUCUGUUCAGGACUCCCAAUUGUA CAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGGCUGGGCUGG GUUAGACCCUCGG	243
<i>miR-199s</i>	GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGA GGCUCUCAUGUGUACAGUAGUCUGCACAUUG GUUAGGC	244
<i>miR-200a</i>	GCCGUGGCCAUUCUACUGGGCAGCAUUGGAUG GAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAAUGAU GACGGC	245
<i>miR-200b</i>	CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUCUACUGGG CAGCAUUGGAUGGAGUCAGGUCUCUAAUACUG CCUGGUAAUGAUGACGGCGGAGCCUGCACG	246
<i>miR-200c</i>	CCCUCGUCUACCCAGCAGUGUUGGGUGCGG UUGGGAGUCUCUAAUACUGCCGGGUAAUGAUG GAGG	247
<i>miR-202</i>	GUUCCUUUUUCCUAUGCAUAUACUUCUUUGAG GAUCUGGCCUAAAGAGGGUAUAGGGCAUGGGAA GAUGGAGC	248
<i>miR-203</i>	GUGUUGGGGACUCGCGCGCUGGGUCCAGUGGU UCUUAACAGUUCAACAGUUCUGUAGCGCAAU GUGAAAUGUUUAGGACCACUAGACCCGGCGGG CGCGGCGACAGCGA	249
<i>miR-204</i>	GGCUACAGUCUUUCUUCUUGACUCGUGGAC UUCUUUUGUCAUCCUAGCCUGAGAAUUAU GAAGGAGGCUGGGAAGGCAAAGGGACGUUCAA UUGUCAUCACUGGC	250
<i>miR-205</i>	AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUGCUUCUCUU GUCCUUCAUUCCACCGGAGUCUGUCUUAUACC CAACCAGAUUUCAGUGGAGUGAAGUUCAGGAG GCAUGGAGCUGACA	251
<i>miR-206-1</i>	UGC UCCCCGAGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCC CCAUAUGGAUUAUUGCUAUGGAAUGUAAGG AAGUGUGUGGUUUCGGCAAGUG	252
<i>miR-206-2</i>	AGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCCCCAUUAUGGA UUACUUUGCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG GUUUU	253

10

20

30

40

【表 20】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
miR-208	UGACGGGCGAGCUUUUGGCCCGGGUUAUACCU GAUGCUCACGU <u>AUAAGACGAGCAAAAAGCUUG</u> UUGGUCA	254
miR-210	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCC UGCCCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCCAC <u>UGUGCGUGUGACAGCGGCUGAUCUGUGCCUGG</u> GCAGCGCGACCC	255
miR-211	UCACCUGGCCAUGUGACUUGUGGGCUUCCCUU <u>UGUCAUCCUUCGCCUAGGGCUCUGAGCAGGGC</u> AGGGACAGCAAAGGGGUGCUCAGUUGUCACUU CCCACAGCACGGAG	256
miR-212	CGGGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACC UUGGCUCUAGACUGCUUACUGCCCCGGGCGCC CUCAGUAAACAGUCUCCAGUCACGGCCACCGAC GCCUGGCCCCGCGC	257
miR-213-2	CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUAAAAGGUCACA AUC <u>AA</u> CAUUC <u>AU</u> UGCUGUCGGUGGGUUGAACU GUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAA CUGUGGCCCCGCUU	258
miR-213	GAGUUUUGAGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAAC GCUGUCGGUGAGUUUGGAAUUA <u>AAA</u> UCAA <u>AA</u> C <u>CAUCGACCGUUGAUUGUACC</u> CUAUGGCUAACC AUC <u>AUC</u> UACUCC	259
miR-214	GGCCUGGCUGGACAGAGUUGUCAUGUGUCUGC CUGUCUACACUUGCUGUGCAGAACAUCCGCUC ACCUGUACAGCAGGCACAGACAGGCAGUCACA UGACAACCCAGCCU	260
miR-215	AUCAUUCAGAAAUGGUUAUACAGGAAA <u>U</u> GACC UAUGAAUUGACAGACAAUAUAGCUGAGUUUGU CUGUCAUUUCUUUAGGCCAAUAUUCUGUAUGA CUGUGCUACUCAA	261
miR-216	GAUGGCUGUGAGUUGGCUUA <u>AUC</u> UCAGCUGGC <u>AACUGUGAGAU</u> GUUCAUACAAUCCCUACAGU GGUCUCUGGGAUUAUGCUAAACAGAGCAAUUU CCUAGCCCUCACGA	262
miR-217	AGUAUAAUUAUACAUAUAGUUUUUGAUGUCGCA GAUACUGCAUCAGGAACUGAUUGGAUAAGAAU CAGUCACCAUCAGUCCUAAUGCAUUGCCUUC AGCAUCUAAACAAG	263
miR-218-1	GUGAUAAUGUAGCGAGAUUUUCUGUUGUGCUU <u>GAUCUAACCAUGUGGUUGCGAGGUAUGAGUAA</u> AACAUGGUUCCGUCAAGC <u>ACCAUGGAACGUCA</u> CGCAGCUUUCUACA	264

10

20

30

40

【表 2 1】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
miR-218-2	GACCAGUCGCGUGCGGGGCUUCCUUGUGCUU GAUCUAACCAUGUGGUGGAACGAUGGAAACGG AACAUGGUUCUGUCAAGCACCGCGGAAAGCAC CGUGCUCUCCUGCA	265
miR-219	CCGCCCCGGGCGCGGCUCCUGAUUGUCCAAAC GCAAUUCUCGAGUCUAUUGGCUCGCGCGAGAG UUGAGUCUGGACGUCCCGAGCCGCGCCCCCAA ACCUCGAGCGGG	266
miR-219-1	CCGCCCCGGGCGCGGCUCCUGAUUGUCCAAAC GCAAUUCUCGAGUCUAUUGGCUCGCGCGAGAG UUGAGUCUGGACGUCCCGAGCCGCGCCCCCAA ACCUCGAGCGGG	267
miR-219-2	ACUCAGGGGCUUCGCCACUGAUUGUCCAAACG CAAUUCUUGUACGAGUCUGCGGCCAACCGAGA AUUGUGGCUGGACAUCUGUGGCUGAGCUCGG G	268
miR-220	GACAGUGUGGCAUUGUAGGGCUCCACACCGUA UCUGACACUUGGGCGAGGGCACCAUGCUGAA GGUGUUCAUGAUGCGGUCUGGGAACUCCUCAC GGAUCUACUGAUG	269
miR-221	UGAACAUCAGGUCUGGGGCAUGAACCUGGCA UACAAUGUAGAUUUCUGUGUUCGUUAGGCAAC AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUCAGGCUACCU GGAAACAUGUUCUC	270
miR-222	GCUGCUGGAAGGUGUAGGUACCCUCAUUGGCU CAGUAGCCAGUGUAGAUCUGUCUUCGUAAU CAGCAGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUCUGAU GGCAUCUUCUAGCU	271
miR-223	CCUGGCCUCCUGCAGUGCCACGCUCGUGUAU UUGACAAGCUGAGUUGGACACUCCAUGUGGUA GAGUGUCAGUUUGUCAAAUACCCCAAGUGCGG CACAUGCUUACCAG	272
miR-224	GGGCUUUCAAGUCACUAGUUGGUUCCGUUAGU AGAUGAUUGUGCAUUGUUUCAAUAUGGUGCCC UAGUGACUACAAAGCCC	273

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
miR-294-1 (chr16)	CAAUCUCCUUAUCAUGGUAUUGAUUUUUA GUGCUUCCCUUUUGUGUGAGAGAAGUA	274
miR-296	AGGACCCUCCAGAGGGCCCCCUCAAUCCUG UUGUGCCUAAUUCAGAGGGUUGGGUGGAGGCU CUCCUGAAGGGCUCU	275

10

20

30

40

【表 2 2】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-299</i>	AAGAAAUGGUUUACCGUCCCAUACAUUUUG AAUAUGUAUGUGGGGAUGGUAACCGCUUCUU	276
<i>miR-301</i>	ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUUGCACU ACUGUACUUUACAGCUAGCAGUGCAAUAGUAU UGUCAAGCAUCUGAAAGCAGG	277
<i>miR-302a</i>	CCACCACUUAACGUGGAUGUACUUGC UUUGA AACUAAAGAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUUGGU GAUGG	278
<i>miR-302b</i>	GCUCCCUUCAACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC UGUGACUUUAAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUU AGUAGGAGU	279
<i>miR-302c</i>	CCUUUGC UUUAACAUGGGGGUACCUGCUGUGU GAAACAAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUG GAGG	280
<i>miR-302d</i>	CCUCUACUUUAACAUGGAGGCACUUGCUGUGA CAUGACAAAAUAAGUGCUUCCAUGUUUGAGU GUGG	281
<i>miR-320</i>	GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUCUUC CCGGUUC UCCCCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGG GCGAAAAGGAUGAGGU	282
<i>miR-321</i>	UUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGA GUCCCACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGA	283
<i>miR-323</i>	UUGGUACUUGGAGAGAGGUGGUCCGUGGCGCG UUCGCUUUAUUUAUGGCGCACAUAACACGGUC GACCUCUUUGCAGUAUCUAAUC	284
<i>miR-324</i>	CUGACUAUGCCUCCCCGCAUCCCUAGGGCAUU GGUGUAAAGCUGGAGACCCACUGCCCCAGGUG CUGCUGGGGGUUGUAGUC	285
<i>miR-325</i>	AUACAGUGCUUGGUUCCUAGUAGGUGUCCAGU AAGUGUUUGUGACAUAUUUGUUUAUUGAGGA CCUCCUAUCAAUCAAGCACUGUGCUAGGCUCU GG	286
<i>miR-326</i>	CUCAUCUGUCUGUUGGGCUGGAGGCAGGGCCU UUGUGAAGGCGGGUGGUGCUCAGAUCCGCCUCU GGGCCCUUCCUCCAGCCCCGAGGCGGAUUCA	287

10

20

30

【表 2 3】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-328</i>	UGGAGUGGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGGAGA AAGUGCAUACAGCCCCUGGCCCUUCUCUGCCCUU CCGUCCCCUG	288
<i>miR-330</i>	CUUUGGCGAUCACUGCCUCUCUGGGCCUGUGU CUUAGGCUCUGCAAGAUAACCGAGCAAAGCA CACGGCCUGCAGAGAGGCAGCGCUCUGCCC	289
<i>miR-331</i>	GAGUUUGGUUUUGUUUGGGUUUGUUCUAGGUA UGGUCCCAGGGAUCCAGAUCAAACCAGGCC CUGGGCCUAUCCUAGAACCAACCUAAGCUC	290
<i>miR-335</i>	UGUUUUGAGCGGGGGUCAAGAGCAAUAACGAA AAUUGUUUGUCAUAAACCGUUUUUCAUUAUUG CUCCUGACCUCUCUCAUUGCUAUUAUUA	291
<i>miR-337</i>	GUAGUCAGUAGUUGGGGGUGGGGAACGGCUUC AUACAGGAGUUGAUGCACAGUUAUCCAGCUCC UAUAUGAUGCCUUUCUUAUCCCCUUA	292
<i>miR-338</i>	UCUCCAACAUAUCCUGGUGCUGAGUGAUGAC UCAGGCGACUCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA AGA	293
<i>miR-339</i>	CGGGGCGGCCGCUCUCCCUUGUCCUCCAGGAGCU CACGUGUGCCUGCCUGUGAGCGCCUCGACGAC AGAGCCGGCGCCUGCCCCAGUGUCUGCGC	294
<i>miR-340</i>	UUGUACCUGGUGUGAUUAUAAAGCAAUGAGAC UGAUUGUCAUAUGUCGUUUGUGGGAUCCGUCU CAGUUAUUAUAGCCAUAUCCUGGUAUCUUA	295
<i>miR-342</i>	GAAACUGGGCUCAAGGUGAGGGGUGCUAUCUG UGAUUGAGGGACAUGGUUAAUGGAAUUGUCUC ACACAGAAAUCGCACCCGUCACCUUGGCCUAC UUA	296
<i>miR-345</i>	ACCCAAACCCUAGGUCUGCUGACUCCUAGUCC AGGGCUCGUGAUGGCUGGUGGGCCUGAACGA GGGGUCUGGAGGCCUGGGUUUGAAUAUCGACA GC	297
<i>miR-346</i>	GUCUGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCUCUGUUG CUCUGAAGGAGGCAGGGGCUGGGCCUGCAGCU GCCUGGGCAGAGCGGCUCUCCUGC	298
<i>miR-367</i>	CCAUUACUGUUGCUAAUAUGCAACUCUGUUGA AUUAAAUUGGAAUUGCACUUUAGCAAUGGUG AUGG	299

10

20

30

40

【表 2 4】

前駆体名	配列 (5' から 3' へ) *	SEQ ID NO.
<i>miR-368</i>	AAAAGGUGGAUAUCCUUCUAUGUUUAUGUUA UUUAUGGUUAAACA <u>UAGAGGAAAUUCCACGUU</u> UU	300
<i>miR-369</i>	UUGAAGGGAGAUCGACCGUGUUAUAUUCGCUU UAUUGACUUCGAAUAAUACAUGGUUGAU <u>CUUU</u> UCUCAG	301
<i>miR-370</i>	AGACAGAGAAGCEAGGUCACGUCUCUGCAGUU ACACAGCUCACGAGUGCCUGCUGGGGUGGAAC <u>CUGGUCUGUCU</u>	302
<i>miR-371</i>	GUGGCACUCAAACUGUGGGGGCACUUUCUGCU CUCUGGUGAAAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU UAC	303
<i>miR-372</i>	GUGGGCCUCAA <u>AUGUGGAGCACUAUUCUGAUG</u> UCCAAGUGGAAAGUGCUGCGACA <u>UUUGAGCGU</u> CAC	304
<i>miR-373</i>	GGGAUACUCAA <u>AUGGGGGCGCUUCCUUUUU</u> GUCUGUACUGGGAAGUGCUUCGAUUUUGGGGU GUCCC	305
<i>miR-374</i>	UACAUCGGCCA <u>UUUAUAUACAACCUGAUAAGU</u> GUUAUAGCACUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUUG UCUGUGUA	306
<i>miR-hes1</i>	AUGGAGCUGCUCACCCUGUGGGCCUCAA <u>AUGU</u> GGAGGAACUAUUCUGAUGUCCAAGUGGAAAGU GCUGCGACA <u>UUUGAGCGUCACCGGUGACGCCC</u> AUAUCA	307
<i>miR-hes2</i>	GCAUCCCCUCAGCCUGUGGCACUCAAACUGUG GGGGCACUUUCUGCUCUCUGGUGAAAGUGCCG CCAUCUUUUGAGUGUUACCGCUUGAGAAGACU CAACC	308
<i>miR-hes3</i>	CGAGGAGCUCAUACUGGGGAUACUCAA <u>AUGGG</u> GGCGCUUCCUUUUUGUCUGUUACUGGGAAGU GCUUCGAUUUUGGGGUGUCCCGUUUGAGUAG GGCAUC	309

*前駆体配列中の下線を付した配列は、プロセッシングを受けた成熟miR転写物である
(表1b参照)。同一の前駆体由来の2種類の異なる成熟miRを示す2個の下線を付した
配列を有する前駆体配列もある。配列はすべてヒト由来である。

*前駆体配列内の下線の配列は成熟型の、プロセッシングされたmiR転写産物に対応する
(表1b参照)。いくつかの前駆体配列は同一の前駆体に由来する2種類の異なる成熟mi
iRを表す2カ所の下線の配列を有する。全配列はヒトのものである。

【0028】

表1b—ヒト成熟マイクロRNAの配列

10

20

30

40

【表 25】

表1b ヒト成熟マイクロRNA配列

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>let-7a</i>	ugagguaguagguuguauaguu	310	<i>let-7a-1</i> ; <i>let-7a-2</i> ; <i>let-7a-3</i> ; <i>let-7a-4</i>
<i>let-7b</i>	ugagguaguagguugugugguu	311	<i>let-7b</i>
<i>let-7c</i>	ugagguaguagguuguauugguu	312	<i>let-7c</i>
<i>let-7d</i>	agagguaguagguugcauagu	313	<i>let-7d</i> ; <i>let-7d-v1</i>
<i>let-7e</i>	ugagguaggagguuguauaguu	314	<i>let-7e</i>
<i>let-7f</i>	ugagguaguagauuguauaguu	315	<i>let-7f-1</i> ; <i>let-7f-2-1</i> ; <i>let-7f-2-2</i>
<i>let-7g</i>	ugagguaguaguuguacagu	316	<i>let-7g</i>
<i>let-7i</i>	ugagguaguaguugugcu	317	<i>let-7i</i>
<i>miR-1</i>	uggaauguaaagaagua	318	<i>miR-1b</i> ; <i>miR-1b-1</i> ; <i>miR-1b-2</i>
<i>miR-7</i>	uggaagacuagauuuuguu	319	<i>miR-7-1</i> ; <i>miR-7-1a</i> ; <i>miR-7-2</i> ; <i>miR-7-3</i>
<i>miR-9</i>	ucuuugguuaucuaagcuguaug a	320	<i>miR-9-1</i> ; <i>miR-9-2</i> ; <i>miR-9-3</i>
<i>miR-9*</i>	uaaagcuagauaacgaaagu	321	<i>miR-9-1</i> ; <i>miR-9-2</i> ; <i>miR-9-3</i>
<i>miR-10a</i>	uaccugugaauccgaauuugug	322	<i>miR-10a</i>
<i>miR-10b</i>	uaccugugaauccgaauuugu	323	<i>miR-10b</i>
<i>miR-15a</i>	uagcagcacauaauugguuugug	324	<i>miR-15a</i> ; <i>miR-15a-2</i>
<i>miR-15b</i>	uagcagcacaucaugguuuaca	325	<i>miR-15b</i>
<i>miR-16</i>	uagcagcacguaaauuuggcg	326	<i>miR-16-1</i> ; <i>miR-16-2</i> ; <i>miR-16-13</i>
<i>miR-17-5p</i>	caaagugcuuacagugcagguag u	327	<i>miR-17</i>
<i>miR-17-3p</i>	acugcagugaaggcacuugu	328	<i>miR-17</i>
<i>miR-18</i>	uaaggugcaucuagugcagaua	329	<i>miR-18</i> ; <i>miR-18-13</i>

10

20

30

【表 2 6】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>miR-19a</i>	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	330	<i>miR-19a</i> ; <i>miR-19a-13</i>
<i>miR-19b</i>	ugugcaaauccaugcaaaacuga	331	<i>miR-19b-1</i> ; <i>miR-19b-2</i>
<i>miR-20</i>	uaaagugcuuauagucaggua	332	<i>miR-20 (miR-20a)</i>
<i>miR-21</i>	uagcuuauacagacugauguuga	333	<i>miR-21</i> ; <i>miR-21-17</i>
<i>miR-22</i>	aagcugccaguugaagaacugu	334	<i>miR-22</i>
<i>miR-23a</i>	aucacauugccagggaauuucc	335	<i>miR-23a</i>
<i>miR-23b</i>	aucacauugccagggaauaccac	336	<i>miR-23b</i>
<i>miR-24</i>	uggcucaguucagcaggaacag	337	<i>miR-24-1</i> ; <i>miR-24-2</i> ; <i>miR-24-19</i> ; <i>miR-24-9</i>
<i>miR-25</i>	cauugcacuugucucggucuga	338	<i>miR-25</i>
<i>miR-26a</i>	uucaaguaauccaggauaggcu	339	<i>miR-26a</i> ; <i>miR-26a-1</i> ; <i>miR-26a-2</i>
<i>miR-26b</i>	uucaaguaauucaggauaggu	340	<i>miR-26b</i>
<i>miR-27a</i>	uucacaguggcuaaguuccgcc	341	<i>miR-27a</i>
<i>miR-27b</i>	uucacaguggcuaaguucug	342	<i>miR-27b-1</i> ; <i>miR-27b-2</i>
<i>miR-28</i>	aaggagcucacagucuaauagag	343	<i>miR-28</i>
<i>miR-29a</i>	cuagcaccaucugaaaucgguu	344	<i>miR-29a-2</i> ; <i>miR-29a</i>
<i>miR-29b</i>	uagcaccauuugaaaucagu	345	<i>miR-29b-1</i> ; <i>miR-29b-2</i>
<i>miR-29c</i>	uagcaccauuugaaaucgguaa	346	<i>miR-29c</i>
<i>miR-30a-5p</i>	uguaaacauccucgacuggaagc	347	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30a-3p</i>	cuuucagucggauguuugcagc	348	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30b</i>	uguaaacauccuacacucagc	349	<i>miR-30b-1</i> ; <i>miR-30b-2</i>
<i>miR-30c</i>	uguaaacauccuacacucagc	350	<i>miR-30c</i>
<i>miR-30d</i>	uguaaacaucgccgacuggaag	351	<i>miR-30d</i>

10

20

30

40

【表 27】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>miR-30e</i>	uguaaacauccuugacugga	352	<i>miR-30e</i>
<i>miR-31</i>	ggcaagaugcuggcagcagcug	353	<i>miR-31</i>
<i>miR-32</i>	uauugcacauuacuaaguugc	354	<i>miR-32</i>
<i>miR-33</i>	gugcauuguaguugcauug	355	<i>miR-33</i> ; <i>miR-33b</i>
<i>miR-34a</i>	uggcagugucuuagcugguug	356	<i>miR-34a</i>
<i>miR-34b</i>	aggcagugucuuagcagauug	357	<i>miR-34b</i>
<i>miR-34c</i>	aggcaguguauguagcagauug	358	<i>miR-34c</i>
<i>miR-92</i>	uauugcacuuguccggccugu	359	<i>miR-92-2</i> ; <i>miR-92-1</i>
<i>miR-93</i>	aaagugcuguucgugcagguag	360	<i>miR-93-1</i> ; <i>miR-93-2</i>
<i>miR-95</i>	uucacggguauuuauugagca	361	<i>miR-95</i>
<i>miR-96</i>	uuuggcacuagcacauuuuugc	362	<i>miR-96</i>
<i>miR-98</i>	ugagguaguaaguuguauuguu	363	<i>miR-98</i>
<i>miR-99a</i>	aacccguagaucgagcuugug	364	<i>miR-99a</i>
<i>miR-99b</i>	cacccguagaaccgaccuugcg	365	<i>miR-99b</i>
<i>miR-100</i>	uacaguacugauaacugaag	366	<i>miR-100</i>
<i>miR-101</i>	uacaguacugauaacugaag	367	<i>miR-101-1</i> ; <i>miR-101-2</i>
<i>miR-103</i>	agcagcauuguacagggcuaua	368	<i>miR-103-1</i>
<i>miR-105</i>	ucaaauugcucagacuccugu	369	<i>miR-105</i>
<i>miR-106-a</i>	aaaagugcuuacagugcagguag c	370	<i>miR-106-a</i>
<i>miR-106-b</i>	uaaagugcugacagugcagau	371	<i>miR-106-b</i>
<i>miR-107</i>	agcagcauuguacagggcuaua	372	<i>miR-107</i>
<i>miR-122a</i>	uggagugugacaaugguguuug u	373	<i>miR-122a-1</i> ; <i>miR-122a-2</i>

10

20

30

40

【表 28】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>miR-124a</i>	uuaaggcacgcggugaaugcca	374	<i>miR-124a-1</i> ; <i>miR-124a-2</i> ; <i>miR-124a-3</i>
<i>miR-125a</i>	uccugagacccuuaaccugug	375	<i>miR-125a-1</i> ; <i>miR-125a-2</i>
<i>miR-125b</i>	uccugagacccuaacuuguga	376	<i>miR-125b-1</i> ; <i>miR-125b-2</i>
<i>miR-126*</i>	cauuauuacuuuugguacgcg	377	<i>miR-126-1</i> ; <i>miR-126-2</i>
<i>miR-126</i>	ucguaccgugaguaauaauugc	378	<i>miR-126-1</i> ; <i>miR-126-2</i>
<i>miR-127</i>	ucggauccgucugagcuuggcu	379	<i>miR-127-1</i> ; <i>miR-127-2</i>
<i>miR-128a</i>	ucacagugaaccggucucuuuu	380	<i>miR-128</i> ; <i>miR-128a</i>
<i>miR-128b</i>	ucacagugaaccggucucuuuc	381	<i>miR-128b</i>
<i>miR-129</i>	cuuuuugcggucugggcuugc	382	<i>miR-129-1</i> ; <i>miR-129-2</i>
<i>miR-130a</i>	cagugcaauguuaaaagggc	383	<i>miR-130a</i>
<i>miR-130b</i>	cagugcaaugaugaagggcau	384	<i>miR-130b</i>
<i>miR-132</i>	uaacagucuacagccauggucg	385	<i>miR-132-1</i>
<i>miR-133a</i>	uuggucccuucaaccagcugu	386	<i>miR-133a-1</i> ; <i>miR-133a-2</i>
<i>miR-133b</i>	uuggucccuucaaccagcua	387	<i>miR-133b</i>
<i>miR-134</i>	ugugacugguugaccagaggg	388	<i>miR-134-1</i> ; <i>miR-134-2</i>
<i>miR-135a</i>	uauggcuuuuauuccuauug a	389	<i>miR-135a</i> ; <i>miR-135a-2</i> (<i>miR-135-2</i>)
<i>miR-135b</i>	uauggcuuuuauuccuauug	390	<i>miR-135b</i>
<i>miR-136</i>	acuccauuuguuuugaugga	391	<i>miR-136-1</i> ; <i>miR-136-2</i>
<i>miR-137</i>	uauugcuuaagaauacgcguag	392	<i>miR-137</i>
<i>miR-138</i>	agcugguguugugaauc	393	<i>miR-138-1</i> ; <i>miR-138-2</i>
<i>miR-139</i>	ucuacagugcagugucu	394	<i>miR-139</i>

10

20

30

【表 29】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>miR-140</i>	agugguuuuaccuauugguag	395	<i>miR-140</i> ; <i>miR-140as</i> ; <i>miR-140s</i>
<i>miR-141</i>	aacacugucugguaaagaugg	396	<i>miR-141-1</i> ; <i>miR-141-2</i>
<i>miR-142-3p</i>	uguaguguuuccuacuuuagg a	397	<i>miR-142</i>
<i>miR-142-5p</i>	cauaaaguagaagcacuac	398	<i>miR-142</i>
<i>miR-143</i>	ugagaugaagcacuguagcuca	399	<i>miR-143-1</i>
<i>miR-144</i>	uacagauuagaugauguacuag	400	<i>miR-144-1</i> ; <i>miR-144-2</i>
<i>miR-145</i>	guccaguuuuuccaggaaucccu u	401	<i>miR-145-1</i> ; <i>miR-145-2</i>
<i>miR-146</i>	ugagaacugaaauccauggguu	402	<i>miR-146-1</i> ; <i>miR-146-2</i>
<i>miR-147</i>	guguguggaaugcuucugc	403	<i>miR-147</i>
<i>miR-148a</i>	ucagugcacuacagaacuuugu	404	<i>miR-148a</i> (<i>miR-148</i>)
<i>miR-148b</i>	ucagugcaucacagaacuuugu	405	<i>miR-148b</i>
<i>miR-149</i>	ucuggcuccgugucuacucc	406	<i>miR-149</i>
<i>miR-150</i>	ucucccaaccuuguaccagug	407	<i>miR-150-1</i> ; <i>miR-150-2</i>
<i>miR-151</i>	acuagacugaagcuccuugagg	408	<i>miR-151</i>
<i>miR-152</i>	ucagugcaugacagaacuugg	409	<i>miR-152-1</i> ; <i>miR-152-2</i>
<i>miR-153</i>	uugcauagucacaaaaguga	410	<i>miR-153-1-1</i> ; <i>miR-153-1-2</i> ; <i>miR-153-2-1</i> ; <i>miR-153-2-2</i>
<i>miR-154</i>	uagguuaucguguugccuucg	411	<i>miR-154-1</i> ; <i>miR-154-2</i>
<i>miR-154*</i>	aaucauacacgguugaccuauu	412	<i>miR-154-1</i> ; <i>miR-154-2</i>
<i>miR-155</i>	uuaaugcuaaucgugauagggg	413	<i>miR-155</i>
<i>miR-181a</i>	aacauucaacgcugucggugagu	414	<i>miR-181a</i>
<i>miR-181b</i>	aacauucauugcugucggugggu u	415	<i>miR-181b-1</i> ; <i>miR-181b-2</i>

【表 30】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>miR-181c</i>	aacauucaaccugucggugagu	416	<i>miR-181c</i>
<i>miR-182</i>	uugggcaaugguagaacucaca	417	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-182*</i>	ugguucuaagacuugccaacua	418	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-183</i>	uauggcacugguagaauucacug	419	<i>miR-183</i>
<i>miR-184</i>	uggacggagaacugauaaggggu	420	<i>miR-184-1; miR-184-2</i>
<i>miR-185</i>	uggagagaaaggcaguuc	421	<i>miR-185-1; miR-185-2</i>
<i>miR-186</i>	caaagaauucuccuuuugggcuu	422	<i>miR-186-1; miR-186-2</i>
<i>miR-187</i>	ucgugucuuguguugcagccg	423	<i>miR-187</i>
<i>miR-188</i>	caucccuugcaugguggagggu	424	<i>miR-188</i>
<i>miR-189</i>	gugccuacugagcugauaucagu	425	<i>miR-189-1; miR-189-2</i>
<i>miR-190</i>	ugauauguuugauauuuaggu	426	<i>miR-190-1; miR-190-2</i>
<i>miR-191</i>	caacggaaucccaaaagcagcu	427	<i>miR-191-1; miR-191-2</i>
<i>miR-192</i>	cugaccuaugaauugacagcc	428	<i>miR-192</i>
<i>miR-193</i>	aacuggccuacaaagucccag	429	<i>miR-193-1; miR-193-2</i>
<i>miR-194</i>	uguaacagcaacuccaugugga	430	<i>miR-194-1; miR-194-2</i>
<i>miR-195</i>	uagcagcacagaaaauuuggc	431	<i>miR-195-1; miR-195-2</i>
<i>miR-196a</i>	uagguaguuucauguuguugg	432	<i>miR-196a; miR-196a-2 (miR196-2)</i>
<i>miR-196b</i>	uagguaguuuuccuguuguugg	433	<i>miR-196b</i>
<i>miR-197</i>	uucaccaccuucuccaccagc	434	<i>miR-197</i>
<i>miR-198</i>	gguccagaggggagauagg	435	<i>miR-198</i>
<i>miR-199a</i>	cccaguguucagacuaccuguuc	436	<i>miR-199a-1; miR-199a-2</i>
<i>miR-199a*</i>	uacaguagucugcacauugguu	437	<i>miR-199a-1; miR-199a-2; miR-199s; miR-199b</i>

10

20

30

40

【表 3 1】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体 ; 表 1 a 参照
<i>miR-199b</i>	cccaguguuuagacuaucuguuc	438	<i>miR-199b</i>
<i>miR-200a</i>	uaacacugucugguaacgaugu	439	<i>miR-200a</i>
<i>miR-200b</i>	cucuaauacugccugguaaugau g	440	<i>miR-200b</i>
<i>miR-200c</i>	aaucugccggguaaugauga	441	<i>miR-200c</i>
<i>miR-202</i>	agagguauagggaugggaaga	442	<i>miR-202</i>
<i>miR-203</i>	gugaaauguuuaggaccacuag	443	<i>miR-203</i>
<i>miR-204</i>	uucccuuugucauccuauGCCU	444	<i>miR-204</i>
<i>miR-205</i>	uccuucuuuccaccggagucug	445	<i>miR-205</i>
<i>miR-206</i>	uggaauguaaggaagugugugg	446	<i>miR-206-1</i> ; <i>miR-206-2</i>
<i>miR-208</i>	auaagacgagcaaaaagcuugu	447	<i>miR-208</i>
<i>miR-210</i>	cugugcgugugacagcggcug	448	<i>miR-210</i>
<i>miR-211</i>	uucccuuugucauccuucgccu	449	<i>miR-211</i>
<i>miR-212</i>	uaacagucuccagucacggcc	450	<i>miR-212</i>
<i>miR-213</i>	accaucgaccguugauuguacc	451	<i>miR-213</i>
<i>miR-214</i>	acagcaggcacagacaggcag	452	<i>miR-214</i>
<i>miR-215</i>	augaccuugaauugacagac	453	<i>miR-215</i>
<i>miR-216</i>	uaaucucagcuggcaacugug	454	<i>miR-216</i>
<i>miR-217</i>	uacugcaucaggaacugauugga u	455	<i>miR-217</i>
<i>miR-218</i>	uugugcuugaucuaaccaugu	456	<i>miR-218-1</i> ; <i>miR-218-2</i>
<i>miR-219</i>	ugauuguccaaacgcaauucu	457	<i>miR-219</i> ; <i>miR-219-1</i> ; <i>miR-219-2</i>
<i>miR-220</i>	ccacaccguaucugacacuuu	458	<i>miR-220</i>
<i>miR-221</i>	agcuacauugucugcuggguuc	459	<i>miR-221</i>

10

20

30

40

【表 3 2】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体; 表 1 a 参照
<i>miR-222</i>	agcuacaucuggcuacugggucuc	460	<i>miR-222</i>
<i>miR-223</i>	ugucaguugucaaaauacccc	461	<i>miR-223</i>
<i>miR-224</i>	caagucacuagugguuccguuuu	462	<i>miR-224</i>
<i>miR-296</i>	agggccccccucaauccugu	463	<i>miR-296</i>
<i>miR-299</i>	ugguuuaccguccacauacau	464	<i>miR-299</i>
<i>miR-301</i>	cagugcaauaguauugucaaagc	465	<i>miR-301</i>
<i>miR-302a</i>	uaagugcuuccauguuuuggug a	466	<i>miR-302a</i>
<i>miR-302b*</i>	acuuuaacauggaagugcuuucu	467	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302b</i>	uaagugcuuccauguuuaguag	468	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302c*</i>	uuuaacauggggguaccugcug	469	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302c</i>	uaagugcuuccauguuucagugg	470	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302d</i>	uaagugcuuccauguuugagug u	471	<i>miR-302d</i>
<i>miR-320</i>	aaaagcuggguugagagggcgaa	472	<i>miR-320</i>
<i>miR-321</i>	uaagccagggauuguggguuc	473	<i>miR-321</i>
<i>miR-323</i>	gcacauuacacgggucgaccucu	474	<i>miR-323</i>
<i>miR-324-5p</i>	cgcaucccuagggauggugu	475	<i>miR-324</i>
<i>miR-324-3p</i>	ccacugccccaggugcugcugg	476	<i>miR-324</i>
<i>miR-325</i>	ccuaguagguguccaguaagu	477	<i>miR-325</i>
<i>miR-326</i>	ccucuggggccuuccuccag	478	<i>miR-326</i>
<i>miR-328</i>	cuggccucucugccuuccgu	479	<i>miR-328</i>
<i>miR-330</i>	gcaaagcacacggccugcagaga	480	<i>miR-330</i>

10

20

30

【表 3 3】

成熟 miRNA 名	成熟 miRNA 配列 (5' から 3' へ)	SEQ ID NO.	対応するマイクロ RNA 前駆体; 表 1 a 参照
<i>miR-331</i>	gccccuggggccuauccuagaa	481	<i>miR-331</i>
<i>miR-335</i>	ucaagagcauaaacgaaaaugu	482	<i>miR-335</i>
<i>miR-337</i>	uccagcuccuauaugaugccuuu	483	<i>miR-337</i>
<i>miR-338</i>	uccagcaucagugauuuuguuga	484	<i>miR-338</i>
<i>miR-339</i>	uccuguccuccaggagcuca	485	<i>miR-339</i>
<i>miR-340</i>	uccgucucaguuacuuuauagcc	486	<i>miR-340</i>
<i>miR-342</i>	ucucacacagaaucgcacccguc	487	<i>miR-342</i>
<i>miR-345</i>	ugcugacuccuaguccagggc	488	<i>miR-345</i>
<i>miR-346</i>	ugucugcccgaugccugccucu	489	<i>miR-346</i>
<i>miR-367</i>	aaugcacuuuagcaaugguga	490	<i>miR-367</i>
<i>miR-368</i>	acauagaggaaauccacguuu	491	<i>miR-368</i>
<i>miR-369</i>	aaauaauacaugguugaucuuu	492	<i>miR-369</i>
<i>miR-370</i>	gccugcugggguggaaccugg	493	<i>miR-370</i>
<i>miR-371</i>	gugccgccaucuuuugagugu	494	<i>miR-371</i>
<i>miR-372</i>	aaagugcugcgacauuugagcgu	495	<i>miR-372</i>
<i>miR-373*</i>	acucaaaaugggggcgcuuucc	496	<i>miR-373</i>
<i>miR-373</i>	gaagugcuucgaauuuuggggugu	497	<i>miR-373</i>
<i>miR-374</i>	uuauaauacaaccugauaagug	498	<i>miR-374</i>

【0029】

少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物の量は前記患者から得た生体試料の細胞中で測定することが出来る。例えば、肺癌を有することが疑われる患者から通常の生検法で組織試料を採取することが出来る。他の態様においては、前記患者から血液試料を採取し、標準的な方法により白血球をDNA抽出のために単離することが出来る。前記血液又は組織試料は好ましくは放射線治療、化学療法又は他の治療方法の前に前記患者から得られる。対応するコントロール組織若しくは血液試料、又はコントロール標準試料は前記患者の非病変組織から、健常なヒト個体若しくは健常個体集団から、又は患者の試料内の大部分の細胞に相当する培養細胞から得ることが出来る。前記患者の試料からの細胞内の任意のmiRNA遺伝子から産生されたmiRNA遺伝子産物の量が前記コントロール試料の細胞からの対応するmiRNA遺伝子産物の量と比較出来るように、前記のコントロール組織又は血液試料はその後、該患者からの試料と同時に処理される。または、標準試料を得て試験試料とは別に（例えば時間をずらして）処理し、該試験試料からの細胞内の任意のmiRNA遺伝子から産生されたmiRNA遺伝子産物の量を該標準試料からの対応するmiRNA遺伝子産物の量と

比較することが出来る。

【0030】

一態様においては、前記試験試料中の前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量は前記コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量よりも多い（すなわち、miR遺伝子産物の発現が「アップレギュレート」されている）。ここで、患者からの細胞又は組織試料中のmiR遺伝子産物の量がコントロール細胞又は組織試料中の同一の遺伝子産物の量よりも多い場合、miR遺伝子産物の発現は「アップレギュレート」されている。他の態様においては、前記試験試料中の前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量は前記コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量よりも少ない（すなわち、miR遺伝子産物の発現が「ダウンレギュレート」されている）。ここで、患者からの細胞又は組織試料中のこの遺伝子から産生されるmiR遺伝子産物の量がコントロール細胞又は組織試料中の同一の遺伝子から産生された量よりも少ない場合、miR遺伝子の発現は「ダウンレギュレート」されている。コントロール及び通常の試料におけるmiR遺伝子相対発現量を1又は複数種のRNA発現量スタンダードに対して測定することが出来る。前記スタンダードには、例えば、ゼロmiR遺伝子発現量、標準的な細胞株における前記miR遺伝子発現量、前記患者の非病変組織中の前記miR遺伝子発現量、又は健常ヒトコントロールの集団についてこれまでに得られているmiR遺伝子平均発現量が含まれ得る。

10

【0031】

前記患者から得られた前記試料中のmiR遺伝子産物量の、コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量に対する変化（すなわち増加又は減少）は、その患者における肺癌の存在の指標である。一態様においては、該試験試料中の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量は該コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量よりも多い。他の態様においては、該試験試料中の少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量は該コントロール試料中の対応するmiR遺伝子産物の量よりも少ない。ある態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a及びlet-7f-1からなる群より選択される。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子はmiR-21、miR-205及びmiR-216からなる群より選択される。他の態様においては、前記肺癌は肺腺癌であり、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-155、miR-210、miR-126*及びmiR-224からなる群より選択される。

20

30

40

【0032】

特定の態様においては、前記miR遺伝子産物はlet-7a-2、let-7c、let-7g、let-7i、miR-7-2、miR-7-3、miR-9、miR-9-1、miR-10a、miR-15a、miR-15b、miR-16-1、miR-16-2、miR-17-5p、miR-20a、miR-21、miR-24-1、miR-24-2、miR-25、miR-29b-2、miR-30、miR-30a-5p、miR-30c、miR-30d、miR-31、miR-32、miR-34、miR-34a、miR-34a-prec、miR-34a-1、miR-34a-2、miR-92-2、miR-96、miR-99a、miR-99b-prec、miR

50

miR-100、miR-103、miR-106a、miR-107、miR-123、miR-124a-1、miR-125b-1、miR-125b-2、miR-126*、miR-127、miR-128b、miR-129、miR-129-1/2 prec、miR-132、miR-135-1、miR-136、miR-137、miR-141、miR-142-as、miR-143、miR-146、miR-148、miR-149、miR-153、miR-155、miR-159-1、miR-181、miR-181b-1、miR-182、miR-186、miR-191、miR-192、miR-195、miR-196-1、miR-196-1 prec、miR-196-2、miR-199a-1、miR-199a-2、miR-199b、miR-200b、miR-202、miR-203、miR-204、miR-205、miR-210、miR-211、miR-212、miR-214、miR-215、miR-217、miR-221及び/又はmiR-223のうちの1又は複数種ではない。

10

【0033】

試料中のmiR遺伝子産物の量は生体試料中のRNA発現量を検出するのに適したどのような手法を用いて測定されてもよい。生体試料（細胞、組織等）中のRNA発現量を測定するのに適した手法（ノーザンブロット分析、RT-PCR、in situ ハイブリダイゼーション等）は当業者に周知である。特定の態様においては、少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量はノーザンブロット分析によって検出される。例えば、核酸抽出バッファの存在下でホモジナイズし、遠心分離することにより全細胞RNAを細胞から精製することが出来る。核酸を沈殿させ、DNAをDNase処理及び沈殿により除去する。その後、前記RNA分子を標準的な方法によりアガロースゲル上でのゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロースフィルターにトランスファーする。このRNAを加熱によって前記フィルター上に固定する。特定のRNAの検出及び定量は、問題のRNAに対して相補的な、適当に標識されたDNA又はRNAプローブを用いて達成される。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook ほか編, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第7章を参照されたい（この開示全体が参照により組み入れられたものとする）。

20

【0034】

任意のmiRNA遺伝子産物のノーザンブロットハイブリダイゼーションのための適したプローブ（例えばDNAプローブ、RNAプローブ）は表1a及び表1bに示した核酸配列から作成することが出来、目的とするmiR遺伝子産物に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%の相補性を有するプローブと、目的とするmiR遺伝子産物に対し完全な相補性を有するプローブとを含むが、これらに限定されるものではない。標識されたDNA及びRNAプローブの調製方法、及びその標的ヌクレオチド配列に対するハイブリダイゼーションの条件はMolecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook ほか編, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第10章及び第11章に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み入れられたものとする。

30

40

【0035】

例えば、前記核酸プローブは ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 又は ^{35}S 等の放射性核種；重金属；標識されたリガンドの特異的結合ペアメンバ（specific binding pair member）として機能し得るリガンド（例えばビオチン、アビジン又は抗体）；蛍光分子；化学発光分子；酵素などによって標識することが出来る。

【0036】

プローブは、Rigbyほか（1977）, J Mol. Biol. 113:237-251のニックトランスレーション法、又はFienbergほか（1983）, Anal. Biochem. 132:6-13のランダムプライム法のいずれかに

50

より高い比活性に標識することが出来る（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。後者は一本鎖DNAから又はRNA鋳型から高比活性の ^{32}P 標識プローブを合成する際に最適な方法である。例えば、既存のヌクレオチドを高い放射性を示すヌクレオチドとニックトランスレーション法で置換することにより、 10^8 cpm/ マイクログラムを優に超えた比活性を有する ^{32}P 標識核酸プローブを調製することが出来る。そして、ハイブリダイゼーションにかけたフィルターを写真フィルムに曝露することにより、ハイブリダイゼーションのオートラジオグラフィーによる検出を行うことが出来る。ハイブリダイゼーションにかけた前記フィルターを曝露した写真フィルムのデンシトメーターによるスキヤニングによってmiR遺伝子転写産物の量の正確な測定が提供される。他のアプローチとしては、Amersham Biosciences, ニュージャージー州ピスカタウェイから入手可能なMolecular Dynamics 4000-B 2D Phosphor imager等のコンピューター化されたイメージングシステムによりmiR遺伝子転写産物の量が定量出来る。

10

【0037】

DNA又はRNAプローブの放射性核種標識が実際的ではない場合、ランダムプライマー法を用いてアナログ、例えばdTTPアナログである5-(N-(N-ビオチニル-イプシロン-アミノカプロイル)-3-アミノアリル)デオキシウリジン三リン酸をプローブ分子に組み込むことが出来る。このビオチン化プローブオリゴヌクレオチドは、蛍光色素又は発色反応を引き起こす酵素に結合したアビジン、ストレプトアビジン及び抗体（例えば抗ビオチン抗体）等のビオチン結合タンパク質との反応によって検出することが出来る。

20

【0038】

ノーザン及び他のRNAハイブリダイゼーション手法以外に、RNA転写産物の量の測定はin situ ハイブリダイゼーションの方法を用いて達成することが出来る。この手法はノーザンブロット法よりも少ない細胞しか必要とせず、細胞全体を顕微鏡のカバーガラス上に設置し、放射性の又は別の方法で標識された核酸（例えばcDNA又はRNA）を含む溶液で該細胞の核酸内容物を調べることを含む。この手法は特に患者からの組織生検試料を分析するのに適している。in situ ハイブリダイゼーション法の実践は米国特許第5,427,916号により詳細に記載されている（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。任意のmiR遺伝子産物のin situ ハイブリダイゼーションに適したプローブは上記のように、表1a及び表1bに示す核酸配列から作成することが出来、目的とするmiR遺伝子産物に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%の相補性を有するプローブと、目的とするmiR遺伝子産物にに対し完全な相補性を有するプローブとを含むが、これらに限定されるものではない。

30

【0039】

細胞中のmiR遺伝子転写産物の相対数はmiR遺伝子転写産物の逆転写を行い、この逆転写された転写産物の増幅をポリメラーゼ連鎖反応によって行う(RT-PCR)ことにより測定することも出来る。miR遺伝子転写産物の量は内部標準、例えば同一試料中に存在する「ハウスキーピング」遺伝子からのmRNAの量との比較で定量することが出来る。内部標準として使用するための適した「ハウスキーピング」遺伝子には、例えばミオシン又はグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(G3PDH)が含まれる。定量及び半定量RT-PCRを行う方法及びその変法は当業者に周知である。

40

【0040】

一部の例においては、試料中の複数の異なるmiR遺伝子産物の発現量を同時に測定することが望ましい場合がある。他の例においては、癌と関連のある全ての公知のmiR遺伝子の転写産物の発現量を測定することが望ましい場合がある。何百ものmiR遺伝子又は遺伝子産物の癌特異的発現量を評価するには多大な時間を必要とし、大量の全RNA（例えば各ノーザンブロットに対し少なくとも20 µg）と放射性同位体を要するオートラジオグラフィー法とが必要である。

50

【0041】

これらの制限を克服するため、mi R遺伝子のセットに対して特異的なオリゴヌクレオチド（例えばオリゴデオキシヌクレオチド）プローブのセットを含んだ、マイクロチップ型のオリゴライブラリー（すなわちマイクロアレイ）を構築することが出来る。RNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを生成し、それらをハイブリダイズしてマイクロアレイ上のオリゴヌクレオチドについて調べ、ハイブリダイゼーション、又は発現プロファイルを生成することにより、このようなマイクロアレイを用いて生体試料中の複数のマイクロRNAの発現量を測定出来る。そして、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルをコントロール試料のものと比較し、どのマイクロRNAが肺癌細胞において変化した発現量を有しているか決定することが出来る。ここで、「プローブオリゴヌクレオチド」又は「プローブオリゴデオキシヌクレオチド」は標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることが出来るオリゴヌクレオチドを表す。「標的オリゴヌクレオチド」又は「標的オリゴデオキシヌクレオチド」は（例えばハイブリダイゼーションによる）検出対象となる分子を表す。「mi R特異的プローブオリゴヌクレオチド」又は「mi Rに対して特異的なプローブオリゴヌクレオチド」とは、特定のmi R遺伝子産物に、又はその特定のmi R遺伝子産物の逆転写産物にハイブリダイズするように選択された配列を有するプローブオリゴヌクレオチドを意味する。

10

【0042】

特定の試料の「発現プロファイル」又は「ハイブリダイゼーションプロファイル」は基本的にその試料の状態のフィンガープリントである；2状態間では任意の特定の遺伝子が同様に発現している場合があるが、多数の遺伝子の同時評価によって細胞の状態に固有の遺伝子発現プロファイルの生成が可能になる。すなわち、正常組織を肺癌組織と区別することが出来、また肺癌組織内において異なった予後状態（例えば、良い又は悪い長期生存見通し）を判定することが出来る。異なった状態の肺癌組織の発現プロファイルを比較することにより、これらの各状態においてどの遺伝子が重要に関する情報（遺伝子のアップレギュレーション及びダウンレギュレーションの両者を含む）が得られる。肺癌組織又は正常肺組織で異なる発現を示す配列、及び異なる予後（prognostic outcome）をもたらし異なった発現の同定により、様々な形でこの情報の利用が可能になる。例えば、特定の治療計画を評価する（例えば、化学療法薬が特定の患者において長期予後を改善する作用を示すかどうか確認する）ことが出来る。同様に、患者の試料を公知の発現プロファイルと比較することにより診断を行うこと又は確認することが出来る。さらに、これらの遺伝子発現プロファイル（又は個々の遺伝子）によって、肺癌発現プロファイルを抑制したり又は悪い予後のプロファイルをより良好な予後のプロファイルに変えたりする薬剤候補のスクリーニングが可能になる。

20

30

【0043】

従って、本発明は患者から得た試験試料からのRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供することと、該標的オリゴデオキシヌクレオチドをmi RNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んだマイクロアレイとハイブリダイズして該試験試料のためのハイブリダイゼーションプロファイルを提供することと、該試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルをコントロール試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較し、ここで少なくとも1種のmi RNAのシグナルの変化が肺癌を有するか又は発症するリスクを有する前記患者の指標であることとを含む、患者が肺癌を有するか又は発症するリスクを有するかを診断する方法を提供する。一態様においては、前記マイクロアレイは全ての公知のヒトmi RNAの実質的な部分に対するmi RNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様においては、前記マイクロアレイは、mi R-21、mi R-191、mi R-126*、mi R-210、mi R-155、mi R-143、mi R-205、mi R-192-prec、mi R-224、mi R-126、mi R-24-2、mi R-30a-5p、mi R-212、mi R-140、mi R-9、mi R-214、mi R-17-3p、mi R-124a-1、mi R-218-2、mi R-95、mi R-145、mi R-198、mi R-216-pr

40

50

ec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a、let-7f-1及びその組み合わせからなる群より選択される1又は複数種のmiRNAに対するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。

【0044】

前記マイクロアレイは公知のmiRNA配列から生成した遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブから作成することが出来る。このアレイは各miRNAに対し2つの異なったオリゴヌクレオチドプローブを含んでいてもよく、その一方は活性のある成熟型の配列を含み、もう一方は該miRNAの前駆体に対して特異的である。このアレイはヒトのオルソログと数塩基しか相違しない1又は複数個のマウスの配列等のコントロールを含むことも出来、これをハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの条件のコントロールとすることが出来る。両種からのtRNA及び他のRNA（例えばrRNA、mRNA）も前記マイクロチップ上にプリントしてよく、これが特異的ハイブリダイゼーションのための、内部の比較的安定なポジティブコントロールとなる。非特異的ハイブリダイゼーションのための1又は複数個の適当なコントロールも前記マイクロチップ上に含めてよい。この用途のためには、どのような公知のmiRNAとも全く相同性が存在しないことを基準に配列が選択される。

【0045】

前記マイクロアレイは公知の手法を用いて制作することが出来る。例えば、適当な長さ、例えば40ヌクレオチドのプローブオリゴヌクレオチドをC6位で5'-アミン修飾し、市販のマイクロアレイシステム、例えばGeneMachine OmniGrid（登録商標）100 Microarrayer及びAmersham CodeLink（登録商標）活性化スライド（activated slides）を用いてプリントする。標的RNAに対応する標識されたcDNAオリゴマーを、標識プライマーを用いて該標的RNAを逆転写することにより調製する。その後、RNA/DNAハイブリッドを変性させ、RNA鋳型を分解する。次に、このように調製された標識された標的cDNAを、例えば6×SSPE/30%フォルムアミド、25℃において18時間というハイブリダイゼーション条件下でマイクロアレイチップとハイブリダイズさせ、0.75×TNT中で37℃にて40分間洗浄する。固定されたプローブDNAが試料中の相補的な標的cDNAを認識するアレイ上の位置でハイブリダイゼーションが起こる。この標識された標的cDNAは結合が生じたアレイ上の正確な位置の印となり、自動検出及び定量が可能となる。アウトプットには前記患者試料内の特定のcDNA配列の相対存在量、従って対応する相補的miRの相対存在量を示す、ハイブリダイゼーション結果のリストが含まれる。一態様によると、前記標識cDNAオリゴマーはビオチン標識cDNAであり、ビオチン標識プライマーから調製される。前記マイクロアレイはその後、Streptavidin-Alexa647コンジュゲート等を用いたビオチン含有転写産物の直接的検出によって処理され、通常のスキャニング法を利用してスキャンされる。前記アレイ上の各スポットの画像強度は前記患者試料内の対応するmiRの存在量に比例する。

【0046】

前記アレイの使用にはmiRNA発現の検出に対していくつかの利点がある。第1に、数百個の遺伝子の全体的な発現を一時点における同一試料中で同定することが出来る。第2に、前記オリゴヌクレオチドプローブの周到な設計により、成熟型及び前駆体分子の両者の発現が識別可能である。第3に、ノーザンブロット分析と比べ、前記チップは少量のRNAしか必要とせず、2.5µgの全RNAを用いて再現性のある結果が得られる。miRNAの数は比較的限られているため（1種あたり数百）、いくつかの種に共通の、それぞれに対して別々のオリゴヌクレオチドプローブを含んだ共通マイクロアレイを構築することが可能である。このようなツールにより、公知の各miRの種を超えた発現の分析

が様々な条件下において可能である。

【0047】

特定のmiRNAの定量的な発現量アッセイのための利用以外にも、miRNAオーム(miRNAome)の実質的部分、好ましくはmiRNAオーム全体、に相当するmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んだマイクロチップを用いて、miRNA発現パターン分析のためのmiRNA遺伝子発現プロファイリングを行うことが出来る。異なるmiRNAシグナチャーは確立している疾病マーカーと、又は直接病状と関連している場合がある。

【0048】

ここに記載された発現プロファイリング法によると、癌(例えば肺癌)を有する疑いのある患者の試料からの全RNAを定量的に逆転写し、該試料中の該RNAに相補的な標識された標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを得る。この標的オリゴデオキシヌクレオチドを次にmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んだマイクロアレイとハイブリダイズさせ、前記試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供する。その結果が、該試料中のmiRNAの発現パターンを示す該試料のハイブリダイゼーションプロファイルである。このハイブリダイゼーションプロファイルは該試料からの標的オリゴデオキシヌクレオチドの、前記マイクロアレイ中のmiRNA特異的プローブに対する結合によるシグナルを含む。このプロファイルは結合の有無(シグナル対ゼロシグナル)として記録され得る。より好ましくは、記録された該プロファイルは各ハイブリダイゼーションからのシグナルの強度を含む。このプロファイルは正常な、例えば非癌性の、コントロール試料から生成された前記ハイブリダイゼーションプロファイルと比較される。前記シグナルの変化は前記患者における癌の存在又は癌を発症し易い傾向の指標である。

【0049】

miRNA遺伝子の発現量を測定する他の手法も公知であり、RNAの転写及び分解の速度を測定するための様々な手法を含む。

【0050】

本発明は患者からの試験試料において肺癌の特定の予後と関連した少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物の量を測定することを含んだ、肺癌を有する患者の予後(例えば良好な又は見通しの明るい(good or positive)予後、悪い又は不良な(poor or adverse)予後)を判定する方法も提供する。これらの方法によると、試験試料における特定の予後と関連したmiRNA遺伝子産物の量の、コントロール試料中の対応するmiRNA遺伝子産物の量に対する変化は、特定の予後を示す肺癌を有する患者の指標である。一態様においては前記miRNA遺伝子産物は不良な(すなわち悪い)予後と関連している。不良な予後の例としては低生存率及び急激な病状悪化等があるが、これらに限定されるものではない。ある態様においては特定の予後と関連する前記の少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物はmiR-155、miR-17-3p、miR-106a、miR-93、let-7a-2、miR-145、let-7b、miR-20及びmiR-21からなる群より選択される。特定の態様においては、前記肺癌は肺腺癌であり、特定の予後と関連する前記の少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物はmiR-155及びlet-7a-2からなる群より選択される。ある態様においては、前記の少なくとも1種のmiRNA遺伝子産物の量は前記患者から得た試験試料からのRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドのセットを提供することと、該標的オリゴデオキシヌクレオチドをmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んだマイクロアレイとハイブリダイズして該試験試料のためのハイブリダイゼーションプロファイルを提供することと、該試験試料ハイブリダイゼーションプロファイルをコントロール試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較することとによって測定される。

【0051】

どのような理論の制約を受けることもなく、細胞内の1又は複数種のmiRNA遺伝子産物の量の変化はこれらのmiRNAが対象とする1又は複数種の標的の脱制御を引き起こす場合があり、これは肺癌の形成をもたらし得る。従って、前記miRNA遺伝子産物の量を変えることにより(例えば肺癌細胞内でアップレギュレートされているmiRNAの量を減少させる

ことにより；肺癌細胞内でダウンレギュレートされているm i Rの量を増加させることにより）前記肺癌を首尾良く治療することが出来る。

【0052】

従って、本発明は少なくとも1種のm i R遺伝子産物が患者の細胞（例えば肺癌細胞）内で脱制御されている（例えばダウンレギュレートされている；アップレギュレートされている）患者における肺癌を治療する方法を含む。一態様においては、試験試料（例えば肺癌試料）内の少なくとも1種のm i R遺伝子産物の量はコントロール試料中の対応するm i R遺伝子産物の量よりも多い。他の態様においては、試験試料（例えば肺癌試料）内の少なくとも1種のm i R遺伝子産物の量はコントロール試料中の対応するm i R遺伝子産物の量よりも少ない。前記の少なくとも1種の単離されたm i R遺伝子産物が前記肺癌細胞内でダウンレギュレートされている場合、本方法は前記の少なくとも1種の単離されたm i R遺伝子産物又はその単離された変異体若しくは生物活性のある断片の有効な量を投与し、前記患者において癌細胞の増殖を抑制することを含む。例えば、m i R遺伝子産物が患者の癌細胞内でダウンレギュレートされている場合、該患者に単離されたm i R遺伝子産物の有効な量を投与することで該癌細胞の増殖を抑制することが出来る。該患者に投与される前記の単離されたm i R遺伝子産物は該癌細胞においてダウンレギュレートされている内在性の野生型m i R遺伝子産物（例えば表1 a及び表1 bに示すm i R遺伝子産物）と同一であるか、又はその変異体若しくは生物活性のある断片であり得る。ここでは、m i R遺伝子産物の「変異体」とは、対応する野生型m i R遺伝子産物に対して100%未満の同一性を有し、この対応する野生型m i R遺伝子産物の1又は複数種の生物活性を有するm i RNAを表すと定義される。このような生物活性の例としては標的RNA分子の発現の抑制（例えば標的RNA分子の翻訳抑制、標的RNA分子の安定性の調節、標的RNA分子のプロセシングの抑制）及び肺癌と関連のある細胞プロセス（細胞分化、細胞増殖、細胞死）の抑制等があるが、これらに限定されるものではない。これらの変異体には、種変異体（species variant）と、m i R遺伝子内の1又は複数個の突然変異（例えば置換、欠失、挿入）の結果である変異体とが含まれる。ある態様においては、前記変異体は対応する野生型m i R遺伝子産物に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%同一である。

【0053】

ここで、m i R遺伝子産物の「生物活性のある断片」とは、対応する野生型m i R遺伝子産物の1又は複数種の生物活性を有する、m i RNA遺伝子産物のRNA断片を表す。上記の通り、このような生物活性の例としては標的RNA分子の発現の抑制及び肺癌と関連のある細胞プロセスの抑制等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ある態様においては前記の生物活性のある断片は少なくとも約5、7、10、12、15、又は17ヌクレオチド長である。特定の態様においては、単離されたm i R遺伝子産物は1又は複数種のさらなる抗癌治療と組み合わせて患者に投与され得る。適した抗癌治療には化学療法、放射線治療及びその組み合わせ（例えば化学放射線療法）が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0054】

前記の少なくとも1種の単離されたm i R遺伝子産物が前記癌細胞内でアップレギュレートされている場合、本方法はこの少なくとも1種のm i R遺伝子産物の発現を抑制する化合物の有効な量を前記患者に投与し、肺癌細胞の増殖を抑制することを含む。このような化合物をここではm i R遺伝子発現抑制化合物と呼ぶ。適したm i R遺伝子発現抑制化合物としては、本明細書に記載されたもの（例えば二本鎖RNA、アンチセンス核酸及び酵素RNA（enzymatic RNA）分子）等があるが、これらに限定されるものではない。特定の態様においては、m i R遺伝子発現抑制化合物は1又は複数種のさらなる抗癌治療と組み合わせて患者に投与され得る。適した抗癌治療には化学療法、放射線治療及びその組み合わせ（例えば化学放射線療法）が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0055】

ある態様においては、肺癌において脱制御されている前記の単離されたmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、miR-205、miR-192-prec、miR-224、miR-126、miR-24-2、miR-30a-5p、miR-212、miR-140、miR-9、miR-214、miR-17-3p、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216-prec、miR-219-1、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-125a-prec、miR-26a-1-prec、miR-146、miR-203、miR-199b-prec、let-7a-2-prec、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c-prec、miR-150、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125a、及びlet-7f-1からなる群より選択される。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-205及びmiR-216からなる群より選択される。他の態様においては、前記肺癌は肺腺癌であって、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-155、miR-210、miR-126*及びmiR-224からなる群より選択される。

【0056】

特定の態様においては、前記のmiR遺伝子産物はlet7a-2、let-7c、let-7g、let-7i、miR-7-2、miR-7-3、miR-9、miR-9-1、miR-10a、miR-15a、miR-15b、miR-16-1、miR-16-2、miR-17-5p、miR-20a、miR-21、miR-24-1、miR-24-2、miR-25、miR-29b-2、miR-30、miR-30a-5p、miR-30c、miR-30d、miR-31、miR-32、miR-34、miR-34a、miR-34a-prec、miR-34a-1、miR-34a-2、miR-92-2、miR-96、miR-99a、miR-99b-prec、miR-100、miR-103、miR-106a、miR-107、miR-123、miR-124a-1、miR-125b-1、miR-125b-2、miR-126*、miR-127、miR-128b、miR-129、miR-129-1/2-prec、miR-132、miR-135-1、miR-136、miR-137、miR-141、miR-142-as、miR-143、miR-146、miR-148、miR-149、miR-153、miR-155、miR-159-1、miR-181、miR-181b-1、miR-182、miR-186、miR-191、miR-192、miR-195、miR-196-1、miR-196-1-prec、miR-196-2、miR-199a-1、miR-199a-2、miR-199b、miR-200b、miR-202、miR-203、miR-204、miR-205、miR-210、miR-211、miR-212、miR-214、miR-215、miR-217、miR-221及び／又はmiR-223のうちの1又は複数種ではない。

【0057】

「治療する」「治療すること」及び「治療」という語はここで、疾病又は状態、例えば肺癌、と関連する症状を改善することを表し、該病徴の発症を予防または遅延させること及び／又は該疾病又は状態の症状の重症度又は頻度を減少させることを含む。「患者」及び「個体」という語はここで霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、又は他のウシ類、ヒツジ類、ウマ類、イヌ類、ネコ類、齧歯類、若しくはネズミ類の種を含むがこれらに限定されない哺乳類等の動物を含むと定義される。好ましい態様においては前記動物はヒトである。

【0058】

ここで、単離されたmiR遺伝子産物の「有効な量」とは、肺癌を患う患者の癌細胞の増殖を抑制するのに十分な量を表す。当業者は任意の患者に投与されるべきmiR遺伝子産物の有効な量を該患者のサイズ及び重量；疾病の浸透（penetration）の度

合い；該患者の年齢、健康及び性別；投与経路；及び該投与が局所投与か全身投与か；等の要素を考慮することによって容易に決定することが出来る。

【0059】

例えば、単離されたmiR遺伝子産物の有効な量は治療対象となる腫瘍のおおよその重量に基づき得る。腫瘍のおおよその重量は該腫瘍のおおよその容積を算出することにより決定し得、ここで1立方センチメートルの容積は大まかには1グラムに匹敵する。この腫瘍の重量に基づく前記の単離されたmiR遺伝子産物の有効な量は腫瘍のグラム当たり約10-500マイクログラムの範囲であり得る。ある態様においては、前記腫瘍は腫瘍のグラム当たり少なくとも約10マイクログラム、腫瘍のグラム当たり少なくとも約60マイクログラム、又は腫瘍のグラム当たり少なくとも約100マイクログラムであり得る。

10

【0060】

単離されたmiR遺伝子産物の有効な量は治療の対象となる患者のおおよその又は推定された体重に基づきうる。好ましくは、このような有効な量はここに記載されるように非経口的に又は経腸的に投与される。例えば、患者に投与される前記の単離されたmiR遺伝子産物の有効な量は約5-3000マイクログラム／体重のkgの範囲、約700-1000マイクログラム／体重のkgの範囲、又は約1000マイクログラム／体重のkgよりも多いものであり得る。

【0061】

当業者は任意の患者への単離されたmiR遺伝子産物の投与のための適当な投与計画も容易に決定し得る。例えば、miR遺伝子産物は前記患者に単回で（例えば一回の注射又はデポジション（deposition）として）投与され得る。又は、miR遺伝子産物は約3ないし約28日、より特別には約7ないし約10日の期間、患者に毎日1又は2回投与され得る。特定の投与計画においては、miR遺伝子産物は7日間、毎日1回投与される。投与計画が複数回の投与を含む場合、前記患者に投与される前記miR遺伝子産物の有効な量は、投与計画全体にわたって投与される遺伝子産物の総量を含み得ると理解される。

20

【0062】

ここで「単離した」miR遺伝子産物とは、合成された、又は人の介在により天然の状態から改変された若しくは取り出されたものを表す。例えば合成miR遺伝子産物、又は天然の状態と同時に存在している物質から部分的に若しくは完全に分離されたmiR遺伝子産物は「単離された」と考えられる。単離されたmiR遺伝子産物は、実質的に精製された形態で存在することが出来、又はmiR遺伝子産物が送達された細胞内に存在することが出来る。このように、意図的に細胞内に送達された又は細胞内で発現させられたmiR遺伝子産物は「単離された」miR遺伝子産物と考えられる。細胞内部でmiR前駆体分子から産生されたmiR遺伝子産物も「単離された」分子であると考えられる。本発明によると、ここに記載された単離されたmiR遺伝子産物は患者（例えばヒト）の肺癌を治療するための薬剤の製造に使用することが出来る。

30

【0063】

単離されたmiR遺伝子産物は多数の標準的な手法を用いて得ることが出来る。例えば、前記miR遺伝子産物は公知の方法を用いて化学的に合成したり又は組換えによって作成することが出来る。一態様においては、miR遺伝子産物は適当に保護されたりボヌクレオシドホスホアミダイト及び通常のDNA/RNA合成機を用いて化学的に合成される。合成RNA分子又は合成試薬の供給業者としては、Proligo（ハンブルク、ドイツ）、Dharmacon Research（コロラド州ラファイエット、米国）、Pierce Chemical（Perbio Scienceの一部、イリノイ州ロックフォード、米国）、Glen Research（バージニア州スターリング、米国）、ChemGenes（マサチューセッツ州アシュランド、米国）及びCruachem（グラスゴー、英国）等が挙げられる。

40

【0064】

あるいは、前記miR遺伝子産物は任意の適したプロモーターを用いて組換え環状又は

50

直鎖DNAプラスミドから発現され得る。プラスミドからRNAを発現するための適したプロモーターとしては、U6若しくはH1 RNA pol IIIプロモーター配列、又はサイトメガロウイルスプロモーター等がある。他の適したプロモーターの選択は公知である。本発明の組換えプラスミドは癌細胞内における前記miR遺伝子産物の発現のための誘導可能な又は調節可能なプロモーターも含む。

【0065】

組換えプラスミドから発現される前記のmiR遺伝子産物は標準的な手法により培養細胞発現系から単離され得る。組換えプラスミドから発現される該miR遺伝子産物を前記癌細胞へ送達することや、該細胞内で直接発現させることも出来る。癌細胞への該miR遺伝子産物送達のための組換えプラスミドの使用はより詳細に以下で議論される。

10

【0066】

前記miR遺伝子産物は別々の組換えプラスミドから発現させることが出来るか、又は同一の組換えプラスミドから発現させることが出来る。一態様においては、前記miR遺伝子産物は単一のプラスミドからのRNA前駆体分子として発現され、該前駆体分子は癌細胞内に現存するプロセシング系を含むがそれに限定されない適したプロセシング系によって機能的なmiR遺伝子産物へとプロセシングされる。他の適したプロセシング系としては、例えば*in vitro* *Drosophila*細胞溶解物系（例えばTuschlほかに対する米国特許出願公開第2002/0086356号に記載の通り；この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）及び*E. coli* RNase III系（例えばYangほかに対する米国特許出願公開第2004/0014113号に記載の通り；この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）が含まれる。

20

【0067】

miR遺伝子産物の発現に適したプラスミドの選択、該遺伝子産物発現のための核酸配列の該プラスミドへの挿入方法、及び該組換えプラスミドの対象細胞への送達方法は公知である。例えば、Zengほか（2002）、*Molecular Cell* 9:1327-1333；Tuschl（2002）、*Nat. Biotechnol.* 20:446-448；Brummelkampほか（2002）、*Science* 296:550-553；Miyagishiほか（2002）、*Nat. Biotechnol.* 20:497-500；Paddisonほか（2002）、*Genes Dev.* 16:948-958；Leeほか（2002）、*Nat. Biotechnol.* 20:500-505；及びPaulほか（2002）、*Nat. Biotechnol.* 20:505-508（これらの開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）を参照されたい。

30

【0068】

一態様においては、前記miR遺伝子産物を発現するプラスミドはCMV中間初期（*intermediate-early*）プロモーターの調節下にmiR前駆体RNAをコードする核酸配列を含む。ここで、プロモーターの「調節下」とは、miR遺伝子産物をコードする前記核酸配列が該プロモーターの3'側に位置し、該プロモーターがmiR遺伝子産物をコードする該配列の転写を開始することが出来るということを意味する。

40

【0069】

前記miR遺伝子産物は組換えウイルスベクターから発現させることも出来る。該miR遺伝子産物は2つの別々の組換えウイルスベクターから又は同一のウイルスベクターから発現させることが出来ると考えられる。この組換えウイルスベクターから発現されたRNAは標準的な方法により培養細胞発現系から単離することも、又は癌細胞において直接発現させることも出来る。癌細胞への前記miRNA遺伝子産物送達のための組換えウイルスベクターの使用はより詳細に以下で議論される。

【0070】

本発明の組換えウイルスベクターは前記miR遺伝子産物をコードする配列と該RNA配列を発現させるための任意の適したプロモーターとを有する。適したプロモーターとし

50

ては、U6若しくはH1 RNA pol IIIプロモーター配列、又はサイトメガロウイルスプロモーター等があるが、これらに限定されるものではない。他の適したプロモーターの選択は公知である。本発明の組換えウイルスベクターは癌細胞内における前記miR遺伝子産物の発現のための誘導可能な又は調節可能なプロモーターも含む。

【0071】

miR遺伝子産物のコード配列を受け入れることの出来るどのようなウイルスベクターも使用することが出来る；例えば、アデノウイルス（AV）；アデノ随伴ウイルス（AAV）；レトロウイルス（例えばレンチウイルス（LV）、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス）；ヘルペスウイルス等に由来するベクター。該ウイルスベクターの親和性は他のウイルスからのエンベロープタンパク質又は他の表面抗原で該ベクターをシュードタイピング（pseudotyping）することにより、又は異なるウイルスキャプシドタンパク質を置換することにより適切なものに改変することが出来る。

10

【0072】

例えば、本発明のレンチウイルスベクターは水疱性口内炎ウイルス（VSV）、狂犬病、エボラ、モコラ等からの表面タンパク質でシュードタイピングすることが出来る。本発明のAAVベクターは、該ベクターを異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するように操作することにより、異なる細胞を標的とするようにすることが出来る。例えば、血清型2型ゲノム上で血清型2型キャプシドを発現するAAVベクターはAAV2/2と呼ばれる。このAAV2/2ベクター中の血清型2型キャプシド遺伝子を血清型5型キャプシド遺伝子に置換してAAV2/5ベクターを作成することが出来る。異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するAAVベクターを構築する手法は公知である；例えば、Rabinowitz, J. E. ほか（2002）, J. Virol. 76:791-801を参照されたい（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。

20

【0073】

本発明における使用に適した組換えウイルスベクターの選択、RNAを発現する核酸配列を該ベクターに挿入する方法、該ウイルスベクターを対象となる細胞に送達する方法、及び発現したRNA産物の回収は公知の範囲内である。例えば、Dornburg（1995）, Gene Therap. 2:301-310；Eglitis（1988）, Biotechniques 6:608-614；Miller（1990）, Hum. Gene Therap. 1:5-14；及びAnderson（1998）, Nature 392:25-30を参照されたい（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。

30

【0074】

特に適したウイルスベクターはAV及びAAVから得られたものである。前記miR遺伝子産物を発現するのに適したAVベクター、組換えAVベクターの構築方法、及び該ベクターを標的細胞へと送達する方法についてはXiaほか（2002）, Nat. Biotech. 20:1006-1010に記載されている（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。前記miR遺伝子産物を発現するのに適したAAVベクター、組換えAAVベクターの構築方法、及び該ベクターを標的細胞へと送達する方法についてはSamulskiほか（1987）, J. Virol. 61:3096-3101；Fisherほか（1996）, J. Virol. 70:520-532；Samulskiほか（1989）, J. Virol. 63:3822-3826；米国特許第5,252,479号；米国特許第5,139,941号；国際特許出願第WO 94/13788号；及び国際特許出願第WO 93/24641号に記載されている（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。一態様においては、前記miR遺伝子産物は前記CMV中間初期プロモーターを含む単一の組換えAAVベクターから発現される。

40

【0075】

ある態様においては、本発明の組換えAAVウイルスベクターは、ヒトU6 RNAプ

50

ロモーターの調節下の、ポリT終結配列と操作可能に連結されたm i R前駆体RNAをコードする核酸配列を有する。ここで、「ポリT終結配列と操作可能に連結された」とは、センス又はアンチセンス鎖をコードする該核酸配列がポリT終結シグナルと5'方向でじかに隣接していることを意味する。前記ベクターからの前記m i R配列の転写の際、このポリT終結シグナルは転写を終結させる役割を果たす。

【0076】

本発明の治療方法の他の態様においては、m i Rの発現を抑制する少なくとも1種の化合物の有効な量を前記患者に投与することが出来る。ここで、「m i Rの発現を抑制する」とは、処置後の前駆体及び／又は活性のある成熟型m i R遺伝子産物の産生が処置前に産生される量よりも少ないことを意味する。当業者は、例えば本明細書で議論されているm i R転写産物量を測定するための手法を用いて、m i R発現が癌細胞において抑制されているかどうかを容易に決定することが出来る。抑制は遺伝子発現のレベルで（すなわち前記m i R遺伝子産物をコードするm i R遺伝子の転写の抑制により）、又はプロセシングのレベルで（例えば、m i R前駆体の成熟した活性のあるm i Rへのプロセシングの抑制により）、起こり得る。

10

【0077】

ここで、m i Rの発現を抑制する化合物の「有効な量」とは、癌（例えば肺癌）を患う患者の癌細胞の増殖を抑制するのに十分な量である。当業者は任意の患者に投与されるべきm i R発現抑制化合物の有効な量を該患者のサイズ及び重量；疾病の浸透の度合い；該患者の年齢、健康及び性別；投与経路；及び該投与が局所投与か全身投与か；等の要素を考慮することによって容易に決定することが出来る。

20

【0078】

例えば、前記発現抑制化合物の有効な量は本明細書に記載されるように治療対象となる腫瘍のおおよその重量に基づき得る。m i Rの発現を抑制する化合物の有効な量は本明細書に記載されるように治療の対象となる患者のおおよその又は推定された体重にも基づきうる。

【0079】

本明細書に記載されるように当業者はm i Rの発現を抑制する化合物の任意の患者への投与のための適当な投与計画も容易に決定し得る。m i R遺伝子の発現を抑制するための適した化合物としては二本鎖RNA（短鎖若しくは低分子干渉RNA又は「s i RNA」、アンチセンス核酸、及びリボザイム等の酵素RNA分子等がある。これらの化合物はそれぞれ任意のm i R遺伝子産物を標的とし、該標的m i R遺伝子産物の発現を（例えば翻訳を抑制することにより、切断及び／又は分解を誘導することにより）妨げることが出来る。

30

【0080】

例えば、前記m i R遺伝子産物の少なくとも一部に対して少なくとも90%、例えば少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列相同性を有する単離された二本鎖RNA（「dsRNA」）分子を用いて該m i R遺伝子のRNA干渉を誘導することにより、任意のm i R遺伝子の発現を抑制することが出来る。特定の態様においては前記dsRNA分子は「短鎖若しくは低分子干渉RNA」又は「s i RNA」である。

40

【0081】

本方法において有用なs i RNAとしては、約17ヌクレオチドから約29ヌクレオチド長、好ましくは約19ヌクレオチドから約25ヌクレオチド長の短い二本鎖RNA等がある。該s i RNAは、共に標準的なワトソン-クリック塩基対相互作用（Watson-Crick base-pairing interactions）でアニールした（以降、「塩基対形成した」）センスRNA鎖と相補的アンチセンスRNA鎖とを含む。該センス鎖は前記標的m i R遺伝子産物内部に含まれる核酸配列と実質的に同一の核酸配列を含む。

【0082】

50

ここで、前記標的mRNA内部に含まれる標的配列と「実質的に同一」のsiRNA内の核酸配列は、該標的配列と同一であるか、又は該標的配列と1若しくは2ヌクレオチドが相違する核酸配列である。前記siRNAの前記センス及びアンチセンス鎖は2つの相補的な一本鎖RNA分子を含み得るか、又は2つの相補的部位が塩基対形成し、一本鎖の「ヘアピン」領域によって共有結合した単一の分子を含み得る。

【0083】

前記siRNAは1又は複数ヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は変更によって天然に存在するRNAとは相違する改変RNAであってもよい。このような改変としては、非ヌクレオチド物質の該siRNAの末端部への若しくは該siRNAの1又は複数個の内部ヌクレオチドへの付加；又は該siRNAをヌクレアーゼによる消化に対して抵抗性にする修飾；又は該siRNA内の1若しくは複数ヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドとの置換；などがあり得る。

10

【0084】

前記siRNAの一方又は両方の鎖は3'オーバーハング(overhang)も有し得る。ここで「3'オーバーハング」とは、二本鎖を形成するRNA鎖の3'末端から伸びる、少なくとも1個の対になっていないヌクレオチドを表す。従って、ある態様においては、前記siRNAは1ないし約6ヌクレオチド(これはリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含む)長、1ないし約5ヌクレオチド長、1ないし約4ヌクレオチド長、又は約2ないし約4ヌクレオチド長の、少なくとも1つの3'オーバーハングを有する。特定の態様においては、この3'オーバーハングは前記siRNAの両鎖に存在し、2ヌクレオチド長である。例えば、該siRNAの各鎖はジチミジル酸(「TT」)又はジウリジル酸(「uu」)の3'オーバーハングを有し得る。

20

【0085】

前記の単離されたmiR遺伝子産物について前述したのと同様に、前記siRNAは化学的に若しくは生物学的に調製するか、又は組換えプラスミド若しくはウイルスベクターから発現させることが出来る。dsRNA又はsiRNA分子を調製又は試験するための典型的な方法はGewirtzに対する米国特許出願公開第2002/0173478号及びReichほかに対する米国特許出願公開第2004/0018176号に記載されており、この両者の開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする。

【0086】

任意のmiR遺伝子の発現はアンチセンス核酸によって抑制することも出来る。ここで、「アンチセンス核酸」とは、RNA-RNA、RNA-DNA又はRNA-ペプチド核酸相互作用によって標的RNAに結合し、該標的RNAの活性を変える核酸分子を指す。本方法における使用に適したアンチセンス核酸は一般的にmiR遺伝子産物内の連続した核酸配列に対し相補的な核酸配列を含んでいる一本鎖核酸(例えばRNA、DNA、RNA-DNAキメラ、ペプチド核酸(PNA))である。該アンチセンス核酸はmiR遺伝子産物内の連続的な核酸配列に対し50-100%相補的な、75-100%相補的な、又は95-100%相補的な核酸配列を含み得る。特定のヒトmiR遺伝子産物の核酸配列を表1a及び表1bに示す。どのような理論の制約を受けることもなく、前記アンチセンス核酸はRNase H又はmiR遺伝子産物/アンチセンス核酸二本鎖を消化する他の細胞性ヌクレアーゼ(cellular nuclease)を活性化すると信じられている。

30

40

【0087】

アンチセンス核酸は、標的特異性、ヌクレアーゼ抵抗性、送達又は該分子の有効性と関連する他の特性を増強するための、核酸骨格に対する又は糖及び塩基部分(若しくはその同等物)に対する修飾も含み得る。このような修飾としてはコレステロール部分、アクリジン等の二本鎖インターカレーター(duplex intercalator)、又は1若しくは複数種のヌクレアーゼ抵抗基等がある。

【0088】

前記の単離されたmiR遺伝子産物について前述したのと同様に、アンチセンス核酸は

50

化学的に若しくは生物学的に調製するか、又は組換えプラスミド若しくはウイルスベクターから発現させることが出来る。調製又は試験するための典型的な方法は公知であり；例えばStein及びCheng（1993）、Science 261：1004及びWoolfほかに対する米国特許第5,849,902号を参照されたい（この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする）。

【0089】

任意のmiR遺伝子の発現を酵素的核酸（enzymatic nucleic acid）によって抑制することも出来る。ここで「酵素的核酸」とは、miR遺伝子産物の連続した核酸の配列に対して相補性を有する基質結合領域を含み、該miR遺伝子産物を特異的に切断することが出来る核酸を表す。前記酵素的核酸の基質結合領域はmiR遺伝子産物内の連続した核酸配列に対して例えば50－100%相補的、75－100%相補的、又は95－100%相補的であり得る。前記酵素的核酸は塩基、糖、及び／又はリン酸基における修飾も有し得る。本方法において用いられる典型的な酵素的核酸はリボザイムである。

10

【0090】

前記の単離されたmiR遺伝子産物について前述したのと同様に、前記酵素的核酸は化学的に若しくは生物学的に調製するか、又は組換えプラスミド若しくはウイルスベクターから発現させることが出来る。dsRNA又はsiRNA分子を調製及び試験するための典型的な方法はWerner及びUhlenbeck（1995）、Nucleic Acids Res. 23：2092－96；Hamannほか（1999）、Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9：25－31；及びCechほかに対する米国特許第4,987,071号に記載されており、これらの開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする。

20

【0091】

少なくとも1種のmiR遺伝子産物、又はmiRの発現を抑制する少なくとも1種の化合物の投与は、癌（例えば肺癌）を有する患者の癌細胞の増殖を抑制するはずである。ここで、「癌細胞の増殖を抑制する」こととは、該細胞を殺すこと、又は該細胞の増殖を永続的に若しくは一時的に停止若しくは減速させることを意味する。癌細胞の増殖の抑制は、前記miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物の投与後、前記患者中のこのような細胞の数が一定を維持しているか又は減少する場合に推定されうる。癌細胞増殖の抑制は、このような細胞の絶対数は増加したが腫瘍の成長速度が減少した場合にも推定される。

30

【0092】

患者の体内の癌細胞数は直接的な測定、又は原発性の若しくは転移性の腫瘍のサイズからの推定によって決定されうる。例えば、患者における癌細胞の数は免疫組織学的方法、フローサイトメトリー、又は癌細胞の特徴的な表面マーカーを検出するように設計された他の手法によって測定することが出来る。

【0093】

腫瘍のサイズは直接的な目視観察、又はX線、磁気共鳴映像法、超音波、及びシンチグラフィ等の画像診断法によって確認することが出来る。該腫瘍のサイズの確認に用いられる画像診断法は公知の造影剤を用いて又は用いずに行うことが出来る。腫瘍のサイズは、組織塊の触診、又はキャリパー等の測定器具を用いた該組織塊の測定等の物理的手段により確認することも出来る。

40

【0094】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は患者の癌細胞にこれらの化合物を送達するのに適したどのような方法によっても患者に投与することが出来る。例えば、該miR遺伝子産物又はmiR発現抑制化合物は、該患者の細胞にこれらの化合物又はこれらの化合物をコードする配列を含んだ核酸をトランスフェクトするのに適した方法によって投与することが出来る。一態様においては、該細胞は少なくとも1種のmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んだプラスミド又はウイルスベ

50

クターでトランスフェクトされる。

【0095】

真核細胞のトランスフェクション法は公知であり、例えば細胞の核又は前核への核酸の直接注入；エレクトロポレーション；リポソームトランスファー（*liposome transfer*）又は脂溶性物質を介したトランスファー（*transfer*）；受容体の媒介による核酸送達、バイオバリスティック（*biobalistic*）又は粒子加速；リン酸カルシウム沈殿、及びウイルスベクターの媒介によるトランスフェクション等がある。

【0096】

例えば、細胞は、DOTAP（N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート、Boehringer-Mannheim）又はLIPOFECTIN等の同等物などを用いてトランスフェクトすることが出来る。本発明の実践においては用いる核酸の量は重大な意味を持たない； 10^5 個の細胞当たり0.1-100マイクログラムの核酸を用いて満足のいく結果が達成され得る。例えば、 10^5 個の細胞当たりで3マイクログラムのDOTAP中の約0.5マイクログラムのプラスミドベクターという割合を用いてもよい。

【0097】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物はどのような適した経腸的又は非経口的投与経路によっても患者に投与することが出来る。本方法のための適した経腸投与経路としては、例えば経口、直腸、又は鼻腔内投与等がある。適した非経口的投与経路としては、例えば血管内投与（静脈内ボラス注射、静脈内注入、動脈内ボラス注射、動脈内注入及び血管系へのカテーテル注入（*catheter instillation*）等）；組織周囲又は組織内注入（腫瘍周囲及び腫瘍内注入、網膜内注入、又は網膜下注入等）；（浸透圧ポンプによる等の）皮下注入を含む皮下注射又はデポジション（*deposition*）；例えばカテーテル又は他の留置装置（網膜ペレット（*retinal pellet*）又は座薬又は多孔性の、非多孔性の、若しくはゼラチン状の物質を含んだ埋没物（*implant*）等）による、対象組織への直接適用；及び吸入等がある。特に適した投与経路は注射、注入、及び前記腫瘍への直接注射である。

【0098】

本方法においては、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子産物発現抑制化合物を、送達試薬と組み合わせたむき出しのRNAとして、又は該miR遺伝子産物又はmiR遺伝子産物発現抑制化合物を発現する配列を含んだ核酸（組換えプラスミド又はウイルスベクター等）として、前記患者に投与することが出来る。適した送達試薬としては、例えばMirus Transit TKO 脂溶性試薬；LIPOFECTIN；リポフェクタミン（*lipofectamine*）；セルフェクチン（*cellfectin*）；ポリカチオン類（ポリリジン等）及びリポソーム等がある。

【0099】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物を発現する配列を含む組換えプラスミド又はウイルスベクター、及びこのようなプラスミド及びベクターを癌細胞へ送達する手法は本明細書で議論され、及び／又は周知である。

【0100】

特定の態様においては、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物（又はこれらをコードする配列を含んだ核酸）を患者に送達するためにリポソームが用いられる。リポソームは該遺伝子産物又は核酸の血中半減期を伸ばすことも出来る。本発明における使用のための適したリポソームは中性の又は負に帯電したリン脂質及びコレステロール等のステロールを一般的に含む標準的なベシクル形成（*vesicle-forming*）脂質類から生成し得る。脂質類の選択は一般的に所望のリポソームサイズ及び該リポソームの血流中における半減期等の要素を考慮して導かれる。リポソームの調製のための様々な方法が公知であり、例えばSzokaほか（1980），Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9：467；及び米国特許第4,235,871号，第4,5

10

20

30

40

50

01, 728号, 第4, 837, 028号及び第5, 019, 369号に記載されている(これらの開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする)。

【0101】

本方法における使用のためのリポソームは、該リポソームに対し癌細胞を標的とさせるリガンド分子を含んでいても良い。癌細胞において優勢である受容体に結合するリガンド、例えば腫瘍細胞抗原に結合するモノクローナル抗体等が好ましい。

【0102】

本方法における使用のためのリポソームは単核マクロファージ系(「MMS」)及び細網内皮系(「RES」)による排除を避けるために修飾されていても良い。このような修飾リポソームは表面上の、又はリポソーム構造内に組み込まれたオプソニン化抑制部分を有する。特に好ましい態様においては、本発明のリポソームはオプソニン化抑制部分及びリガンドの両者を有していてもよい。

【0103】

本発明のリポソームの調製において使用するためのオプソニン化抑制部分は、典型的には該リポソーム膜に結合した大型の親水性ポリマーである。ここで、オプソニン化抑制部分は、それが例えば該膜自体への脂溶性アンカーのインターカレーションにより、又は膜脂質の活性基への直接の結合により化学的又は物理的にこの膜に付着している場合、リポソーム膜に「結合」している。これらのオプソニン化抑制親水性ポリマーは、例えば米国特許第4, 920, 016号(この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする)に記載のように、前記MMS及びRESによる前記リポソームの取り込みを著しく減少させる保護表面層を形成する。

【0104】

リポソームを修飾するのに適したオプソニン化抑制部分は好ましくは約500ないし約40, 000ダルトンの、より好ましくは約2, 000ないし約20, 000ダルトンの数平均分子量を有する水溶性ポリマーである。このようなポリマーとしては、ポリエチレングリコール(PEG)若しくはポリプロピレングリコール(PPG)又はその誘導体; 例えば、メトキシPEG又はPPG、及びPEG又はPPGステアレート; ポリアクリルアミド又はポリN-ビニルピロリドン等の合成ポリマー類; 直鎖、分岐又はデンドリマーのポリアミドアミン類; ポリアクリル酸類; ポリアルコール類、例えばカルボキシル基又はアミノ基が化学的に連結したポリビニルアルコール及びポリキシリトール、並びにガングリオシドGM1等のガングリオシド類等が挙げられる。PEG、メトキシPEG、若しくはメトキシPPGのコポリマー類又はその誘導体も適している。それに加え、前記オプソニン化抑制ポリマーはPEGと、ポリアミノ酸、ポリ多糖、ポリアミドアミン、ポリエチレンアミン、又はポリヌクレオチドのいずれかとのブロックコポリマーであってもよい。前記オプソニン化抑制ポリマー類はアミノ酸を、若しくはガラクトン酸、グルクロン酸、マンヌロン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、ノイラミン酸、アルギン酸、カラギーナン等のカルボン酸を含む天然多糖類; アミノ化した多糖類若しくはオリゴ糖類(直鎖又は分岐); 又はカルボキシル化された多糖類若しくはオリゴ糖類(炭酸の誘導体と反応し、カルボキシル基の連結を生じたもの等)であってもよい。好ましくは、前記オプソニン化抑制部分はPEG、PPG、又はその誘導体である。PEG又はPEG誘導体で修飾されたりポソームは「ペグ化(PEGylated)リポソーム」と呼ばれる場合がある。

【0105】

前記オプソニン化抑制部分は多数の周知の手法のうちいずれによって前記リポソーム膜に結合されてもよい。例えば、PEGのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルはホスファチジルエタノールアミン脂溶性アンカーに結合し、次いで膜に結合することが出来る。同様に、デキストランポリマーはNa(CN)BH₃及び溶剤混合液(例えば30:12の割合のテトラヒドロフラン及び水、60℃)を用いた還元的アミノ化によってステアリルアミン脂溶性アンカーと誘導体化することが出来る。

【0106】

オプソニン化抑制部分で修飾されたりポソームは未修飾のリポソームよりもずっと長く

循環中に残る。そのため、このようなリポソームは「ステルス (s t e a l t h)」リポソームと呼ばれることがある。ステルスリポソームは多孔性又は「漏出性の (l e a k y)」微小血管系によって送り込まれ、組織内に蓄積することが知られている。従って、このような微小血管系異常を特徴とする組織、例えば固形腫瘍 (肺癌等) は、これらのリポソームを効率良く蓄積する; Gabizon ほか (1988), Proc. Natl.

Acad. Sci. U. S. A., 18:6949-53を参照のこと。それに加え、前記RESによる取り込みの減少は、肝臓及び脾臓内における前記リポソームの著しい蓄積を妨げることにより、ステルスリポソームの毒性を低下させる。従って、オプソニン化抑制部分で修飾されたリポソームは前記miR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物 (又はこれらをコードする配列を含んだ核酸) を腫瘍細胞へ送達するのに特に適している。

10

【0107】

前記miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、公知の手法により、患者にそれらが投与される前に「薬剤」と呼ばれる場合のある医薬組成物として製剤されてもよい。従って、本発明は肺癌を治療するための医薬組成物も含む。一態様においては、前記医薬組成物は少なくとも1種の単離されたmiR遺伝子産物、又はその単離された変異体若しくは生物活性のある断片と、薬理学的に許容される担体とを含む。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子産物は肺癌細胞において適したコントロール細胞と比べて発現量が減少しているmiR遺伝子産物に相当する。ある態様においては、前記の単離されたmiR遺伝子産物はmiR-126*、miR-192、miR-224、miR-126、miR-30a-5p、miR-140、miR-9、miR-124a-1、miR-218-2、miR-95、miR-145、miR-198、miR-216、miR-219-1、miR-125a、miR-26a-1、miR-199b、let-7a-2、miR-27b、miR-32、miR-29b-2、miR-220、miR-33、miR-181c、miR-101-1、miR-124a-3、miR-125b-1、let-7f-1及びその組み合わせからなる群より選択される。一態様においては、前記の単離されたmiR遺伝子産物はmiR-15a又はmiR-16-1ではない。さらなる態様においては、前記のmiR遺伝子産物はmiR-210又はmiR-212ではない。他の態様においては、前記のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-143、miR-205又はmiR-9ではない。さらに他の態様においては、前記のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、miR-205、miR-126、miR-30a-5p、miR-140、miR-214、miR-218-2、miR-145、miR-106a、miR-192、miR-203、miR-150、miR-220、miR-212又はmiR-9ではない。

20

30

【0108】

他の態様においては、本発明の前記医薬組成物は少なくとも1種のmiR発現抑制化合物を含む。特定の態様においては、前記の少なくとも1種のmiR遺伝子発現抑制化合物は肺癌細胞においてコントロール細胞よりも発現が多いmiR遺伝子に対して特異的である。ある態様においては、前記miR遺伝子発現抑制化合物はmiR-21、miR-191、miR-210、miR-155、miR-205、miR-24-2、miR-212、miR-214、miR-17-3p、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-146、miR-203、miR-150及びその組み合わせからなる群より選択される1又は複数種のmiR遺伝子産物に対して特異的である。一態様においては、前記の単離されたmiR遺伝子産物はmiR-15a又はmiR-16-1に対して特異的ではない。さらなる態様においては、前記のmiR遺伝子産物はmiR-210又はmiR-212に対して特異的ではない。他の態様においては、前記のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-143、miR-205又はmiR-9に対して特異的ではない。さらに他の態様においては、前記のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-126*、miR-210、miR-155、miR-143、

40

50

miR-205、miR-126、miR-30a-5p、miR-140、miR-214、miR-218-2、miR-145、miR-106a、miR-192、miR-203、miR-150、miR-220、miR-212又はmiR-9に対して特異的ではない。本発明の医薬組成物は少なくとも無菌であり、発熱物質を含まないことを特徴とする。ここで、「医薬組成物」とは、ヒト及び獣医学用途のための製剤を含む。本発明の医薬組成物を調製する方法は公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, ペンシルバニア州イーストン(1985)に記載されている(この開示全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする)。

【0109】

本医薬組成物は、薬理学的に許容される担体と混合された少なくとも1種のmiR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物(又は該miR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んだ少なくとも1種の核酸)(例えば0.1ないし90重量%)又はその生理学的に許容される塩を含む。ある態様においては、本発明の前記医薬組成物はさらに1又は複数種の抗癌剤(例えば化学療法剤)を含む。本発明の前記医薬製剤は、リポソームによって封入された少なくとも1種のmiR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物(又はmiR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んだ少なくとも1種の核酸)、及び薬理学的に許容される担体も含む。一態様においては、前記医薬組成物はmiR-15、miR-16、miR-143及び/又はmiR-145ではないmiR遺伝子又は遺伝子産物を含む。

【0110】

特に適した薬理学的に許容される担体は水、緩衝水、生理食塩水、0.4%食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸等である。

【0111】

特定の態様においては、本発明の医薬組成物は、ヌクレアーゼ類による分解に対して耐性を示す少なくとも1種のmiR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物(又はmiR遺伝子産物若しくはmiR遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んだ少なくとも1種の核酸)を含む。当業者は、例えば前記miR遺伝子産物に2'位が修飾された1又は複数個のリボヌクレオチドを組み込むことによってヌクレアーゼ耐性を有する核酸を容易に合成することが出来る。適した2'位修飾リボヌクレオチドとしては、フルオロ、アミノ、アルキル、アルコキシ及びO-アリルで2'位が修飾されたもの等が挙げられる。

【0112】

本発明の医薬組成物は通常の医薬賦形剤及び/又は添加物も含み得る。適した医薬賦形剤としては、安定化剤、酸化防止剤、オスモル濃度調整剤、緩衝液、及びpH調整剤等がある。適した添加物としては、例えば、生理的に生体適合性の緩衝液(塩酸トロメタミン等);キレート剤(例えばDTPA、又はDTPA-ビスアミド等)若しくはカルシウムキレート複合体(例えばカルシウムDTPA、CaNaDTPA-ビスアミド等)の添加;又は任意に、カルシウム若しくはナトリウム塩類(例えば、塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム若しくは乳酸カルシウム)の添加等が挙げられる。本発明の医薬組成物は液体の形態で使用するために包装するか、又は凍結乾燥してもよい。

【0113】

本発明の固形医薬組成物には通常の非毒性の固形の薬理学的に許容される担体を用いることが出来る;例えば医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウム等。

【0114】

例えば、経口投与のための固形医薬組成物は上記に列挙した担体及び賦形剤のいずれか、並びに10-95%、好ましくは25-75%の少なくとも1種のmiR遺伝子産物若

しくはmi R遺伝子発現抑制化合物（又はこれらをコードする配列を含んだ少なくとも1種の核酸）を含んでいてもよい。エアロゾル（吸入の）投与のための医薬組成物は、リソソーム内に上記のように封入された0.01-20重量%、好ましくは1-10重量%の少なくとも1種のmi R遺伝子産物若しくはmi R遺伝子発現抑制化合物（又はmi R遺伝子産物若しくはmi R遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んだ少なくとも1種の核酸）と、噴霧剤とを含んでいてもよい。担体も所望により含んでいてもよい；鼻腔内投与のためのレシチン等。

【0115】

本発明の医薬組成物はさらに1又は複数種の抗癌剤を含んでいてもよい。特定の態様においては、前記組成物は少なくとも1種のmi R遺伝子産物若しくはmi R遺伝子発現抑制化合物（又はmi R遺伝子産物若しくはmi R遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んだ少なくとも1種の核酸）と、少なくとも1種の化学療法剤とを含む。本発明の方法に適した化学療法剤としてはDNA-アルキル化剤、抗腫瘍性抗生物質、代謝拮抗剤、チューブリン安定化剤、チューブリン脱安定化（destabilizing）剤、ホルモン拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、プロテインキナーゼ阻害薬、HMG-CoA阻害剤、CDK阻害剤、サイクリン阻害剤、カスパーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、アンチセンス核酸、三重らせんDNA、核酸アプタマー、並びに分子修飾されたウイルス、細菌及び外来病原体等があるが、これらに限定されるものではない。本発明の組成物のための適した薬剤としてはシチジンアラビノシド、メトトレキサート、ビンクリスチン、エトポシド（VP-16）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン（CDDP）、デキサメタゾン、アルグラビン（arglabin）、シクロホスファミド、サルコリシン、メチルニトロソウレア、フルオロウラシル、5-フルオロウラシル（5FU）、ビンブラスチン、カンプトセシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、過酸化水素、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、カルムスチン、ストレプトゾシン、CPT-11、タキソール、タモキシフェン、ダカルバジン、リツキシマブ、ダウノルビシン、1-β-D-アラビノフラノシルシトシン、イマチニブ、フルダラビン、ドセタキセル及びFOLFOX4等があるが、これらに限定されるものではない。

【0116】

本発明は、試験薬剤を細胞に供給し、該細胞中の少なくとも1種のmi R遺伝子産物の量を測定することを含んだ、抗肺癌剤を同定する方法も含む。一態様においては、本方法は試験薬剤を細胞に与え、肺癌細胞における減少した発現量と関連した少なくとも1種のmi R遺伝子産物の量を測定することを含む。該細胞中の該mi R遺伝子産物の量の、適したコントロール（例えばコントロール細胞中の該mi R遺伝子産物の量）に対する増加は、この試験薬剤が抗肺癌剤であることの指標である。特定の態様においては、肺癌細胞における減少した発現量と関連した前記の少なくとも1種のmi R遺伝子産物はmi R-126*、mi R-192、mi R-224、mi R-126、mi R-30a-5p、mi R-140、mi R-9、mi R-124a-1、mi R-218-2、mi R-95、mi R-145、mi R-198、mi R-216、mi R-219-1、mi R-125a、mi R-26a-1、mi R-199b、let-7a-2、mi R-27b、mi R-32、mi R-29b-2、mi R-220、mi R-33、mi R-181c、mi R-101-1、mi R-124a-3、mi R-125b-1、let-7f-1及びその組み合わせからなる群より選択される。一態様においては前記mi R遺伝子産物はlet7a-2、let-7c、let-7g、let-7i、mi R-7-2、mi R-7-3、mi R-9、mi R-9-1、mi R-10a、mi R-15a、mi R-15b、mi R-16-1、mi R-16-2、mi R-17-5p、mi R-20a、mi R-21、mi R-24-1、mi R-24-2、mi R-25、mi R-29b-2、mi R-30、mi R-30a-5p、mi R-30c、mi R-30d、mi R-31、mi R-32、mi R-34、mi R-34a、mi R-34a prec、mi R-34a-1、mi R-34a-2、mi R-92-2、mi R-96、mi R-

99a、miR-99b prec、miR-100、miR-103、miR-106a、miR-107、miR-123、miR-124a-1、miR-125b-1、miR-125b-2、miR-126*、miR-127、miR-128b、miR-129、miR-129-1/2 prec、miR-132、miR-135-1、miR-136、miR-137、miR-141、miR-142-as、miR-143、miR-146、miR-148、miR-149、miR-153、miR-155、miR-159-1、miR-181、miR-181b-1、miR-182、miR-186、miR-191、miR-192、miR-195、miR-196-1、miR-196-1 prec、miR-196-2、miR-199a-1、miR-199a-2、miR-199b、miR-200b、miR-202、miR-203、miR-204、miR-205、miR-210、miR-211、miR-212、miR-214、miR-215、miR-217、miR-221及び／又はmiR-223のうちの1又は複数種ではない。

【0117】

他の態様においては、本発明は、試験薬剤を細胞に供給し、肺癌細胞における増加した発現量と関連した少なくとも1種のmiR遺伝子産物の量を測定することを含む。該細胞中の該miR遺伝子産物の量の、適したコントロール（例えばコントロール細胞中の該miR遺伝子産物の量）に対する減少は、この試験薬剤が抗肺癌剤であることの指標である。特定の態様においては、肺癌細胞における増加した発現量と関連した少なくとも1種のmiR遺伝子産物はmiR-21、miR-191、miR-210、miR-155、miR-205、miR-24-2、miR-212、miR-214、miR-17-3p、miR-106a、miR-197、miR-192、miR-146、miR-203、miR-150及びその組み合わせからなる群より選択される。一態様においては前記miR遺伝子産物はlet7a-2、let7c、let7g、let7i、miR-7-2、miR-7-3、miR-9、miR-9-1、miR-10a、miR-15a、miR-15b、miR-16-1、miR-16-2、miR-17-5p、miR-20a、miR-21、miR-24-1、miR-24-2、miR-25、miR-29b-2、miR-30、miR-30a-5p、miR-30c、miR-30d、miR-31、miR-32、miR-34、miR-34a、miR-34a prec、miR-34a-1、miR-34a-2、miR-92-2、miR-96、miR-99a、miR-99b prec、miR-100、miR-103、miR-106a、miR-107、miR-123、miR-124a-1、miR-125b-1、miR-125b-2、miR-126*、miR-127、miR-128b、miR-129、miR-129-1/2 prec、miR-132、miR-135-1、miR-136、miR-137、miR-141、miR-142-as、miR-143、miR-146、miR-148、miR-149、miR-153、miR-155、miR-159-1、miR-181、miR-181b-1、miR-182、miR-186、miR-191、miR-192、miR-195、miR-196-1、miR-196-1 prec、miR-196-2、miR-199a-1、miR-199a-2、miR-199b、miR-200b、miR-202、miR-203、miR-204、miR-205、miR-210、miR-211、miR-212、miR-214、miR-215、miR-217、miR-221及び／又はmiR-223のうちの1又は複数種ではない。

【0118】

適した薬剤には、薬物（drug）（小分子、ペプチド等）及び生体高分子（タンパク質、核酸等）が含まれるが、これらに限定されるものではない。前記薬剤は組換えにより若しくは合成により製造することが出来、又は天然源から単離（すなわち精製）することが出来る。このような薬剤を細胞に供給（例えばトランスフェクション）するための様々な方法が周知であり、このような方法のいくつかは前述の部分において記載されている。少なくとも1種のmiR遺伝子産物の発現を検出するための方法（例えばノーザンブロッ

ティング、*in situ* ハイブリダイゼーション、RT-PCR、発現プロファイリング)も周知である。これらの方法のいくつかは本明細書にも記載されている。

【0119】

以下、本発明を下記の限定されない実施例により例証する。

【実施例1】

【0120】

原発性肺癌における変化したmiRNA発現量

材料及び方法

試料

原発性肺癌及び対応する非癌性肺組織の104組を本研究に用いた。5年間まで経過観察を行うことが出来たさらなる32の症例を独立の検証用データセットとして用いた。これらの組織は外科標本として1990年から1999年までの間にボルティモア大都市圏の患者からインフォームドコンセントを得て倫理調査委員会 (Institutional Review Board) の同意の上で得た。肺癌組織は65名の肺腺癌患者及び39名の肺扁平上皮癌患者から得た。このセットには65才の年齢中央値 (38-84才の範囲) を有する65名の男性及び39名の女性が含まれた。65例の腫瘍がI期、17例がII期、及び22例がIII又はIV期の腫瘍と分類された。大部分の試料について臨床的及び生物学的情報を入手可能であった。組織からの全RNAを、TRIzol (登録商標) Reagent (Invitrogen) を用いて製品の使用説明書記載の方法により精製した。

【0121】

マイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析を先の記載に従って行った (Liu, C. G. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744 (2004))。簡単に述べると、5 µg の全RNAを352種のプローブを三重に含むmiRNAマイクロアレイチップとハイブリダイズした。具体的には、これらのチップは接触技術によってスポットされ、ポリマー・マトリクスに共有結合した161種類のヒトmiRNA、84種類のマウスmiRNA、別の3種からのmiRNA、及びtRNAから生成された遺伝子特異的な40量体オリゴヌクレオチドプローブを含む。前記マイクロアレイを6X SSPE (0.9M NaCl / 60mM NaH₂PO₄ · H₂O / 8mM EDTA, pH 7.4) / 30%ホルムアミド中で25℃において18時間ハイブリダイズし、0.75X TNT (Tris · HCl / NaCl / Tween 20) 中で37℃において40分間洗浄し、ストレプトアビジン-Alexa647複合体 (Molecular Probes、カリフォルニア州カールスバッド) によるビオチン含有転写産物の直接検出法を用いて処理した。処理したスライドは、PerkinElmer ScanArray XL5K Scannerを用い、レーザーを635nmにセットし、Power 80及びPMT 70のセッティングで、10 µmのスキャン解像度によりスキャンした。各miRNAに対する3つの反復スポットの平均値を正規化し、BRB-ArrayTools バージョン3.2.3において分析した。バックグラウンド以下のハイブリダイゼーション強度の負の値を除外した後、チップ当たり中央値正規化法 (per chip on median normalization method) 及びリファレンスとして中央値アレイ (median array) への正規化を用いて正規化を行った。最終的に、50%超の前記試料中に存在する一致する対数値の147種のmiRNAを選択した。群間で異なって発現していた遺伝子をt及びF検定を用いて同定し、遺伝子はそのp値が0.001未満であった場合に統計的に有意であると考えた。群間で発現プロファイルが異なったかというグローバルテスト (global test) も、どのアレイがどの群に対応するかのラベルの順序を変えて行った。各並べ替えにおいて前記p値を再計算し、0.001水準で有意な遺伝子の数に注目した。少なくとも実際のデータと同数の有意な遺伝子を示した並べ替えの割合が前記グローバルテストの有意水準であった。

10

20

30

40

50

【0122】

溶液ハイブリダイゼーション検出分析及リアルタイムRT-PCR分析

成熟miRNAの発現量をmirVana（登録商標）miRNA Detection Kit（Ambion社、テキサス州）を用いて溶液ハイブリダイゼーション検出により測定した。簡単に述べると、1μgの全RNAをこれらのmiRNAに対応する放射標識プローブとインキュベートした。消化によって標的miRNAに結合しなかったいずれのプローブも除いた後、前記の放射標識された産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画した。プローブはT4 Polynucleotide Kinase with mirVana（登録商標）Probe & Marker Kit（Ambion社、テキサス）を用い、製品の使用説明書記載の方法に従って5'末端標識により調製した。定量リアルタイムPCRを記載（Schmittgenほか、Nucleic Acids Res. 32:e43（2004））に従ってApplied BiosystemのSequence Detection Systemにおいて行い、全反応を3回繰り返して行った。簡単に述べると、遺伝子特異的プライマー及びThermoscriptを用いてRNAをcDNAに逆転写し、式： 2^{-dC_T} （ここで、 $dC_T = (C_{T_{miRNA}} - C_{T_{U6}})$ ）を用いて開始メチオニンのtRNAに対する各miRNAの相対量を決定する。

10

【0123】

生存分析

発現が前記患者の生存と有意に関連している遺伝子を同定した。各遺伝子の統計的有意水準をBRB-ArrayTools バージョン3.2.3における一変量コックス比例ハザード回帰モデルに基づき算出した。これらのp値を次に、生存期間及び打ち切りインジケータ（censoring indicator）の順序を任意にアレイ間で変えた多変量並べ替え検定において用いた。遺伝子はそのp値が0.05未満であった場合に統計的に有意であると考えた。

20

【0124】

生存曲線をカプラン・マイヤー法（SAS Institute、ノースカロライナ州カリー）によって推定し、得られた曲線をログランク検定により比較した。共変量（covariables）のジョイントエフェクト（joint effect）をコックス比例ハザード回帰モデルを用いて試験した。統計分析はStatMate（ATMS社、東京、日本）を用いて行った。

30

【0125】

結果

104組の原発性肺癌及び対応する非癌性肺組織におけるmiRNAの発現を分析し、肺癌におけるmiRNAの関与を観察した。いくつかの具体的な群のペアに関するmiRNA発現量の比較を表2に列挙する。5つの表現型的及び組織学的分類において異なった発現を示すmiRNA（表2）が同定された。

【0126】

肺癌組織及び対応する非癌性肺組織におけるmiRNA発現量の比較において、43種のmiRNAが群間で発現量の統計的有意差を示したと同定された（表3）。発明者らのマイクロアレイ分析ツールを用いたクラス比較（class comparison）分析において前記多変量並べ替え検定を多重比較のコントロールのために行った。この検定は過誤発見（false discovery）数が目標水準（target level）を超過しないことを保証する、又は過誤発見を示す遺伝子リストの割合が目標水準を超過しないことを保証する具体的信頼水準を提供する。このように、0.001未満の水準で偶然統計的に有意な少なくとも43種の異なる発現量を示すmiRNAを得る確率は、前記クラス間に実際の差異が無かった場合、前記多変量並べ替え検定によって0と見積もられた。さらに、104例の肺癌の91%が複合共変量予測子（compound covariate predictor）に基づくリーブワンアウト交差検定クラス予測（leave-one-out cross-validated class pre

40

50

dictionary) 法を用いて正確に分類された。2000回の無作為並べ替えによると、実際のデータの交差検定誤り率 (cross-validated error rate) 以下の交差検定誤り率を示す無作為並べ替えの割合として定義される前記 p 値は 0.0005 未満であった。

【0127】

これらの miRNA のうちいくつかは FRA と関連していた (表 3)。特に、3 種の miRNA は染色体不安定部内に位置している (FRA17B における hsa-mir-21、FRA9D における hsa-mir-27b、及び FRA9E における hsa-mir-32)。さらに、これらの同定された miRNA の多くがいくつかの悪性腫瘍において頻繁に欠失又は増幅している領域に位置している (表 3)。例えば、hsa-mir-21 及び hsa-mir-205 は肺癌において増幅している領域に位置している一方、hsa-mir-126* 及び hsa-mir-126 は肺癌において欠失している領域である 9q34.3 に位置している。前駆体 let-7a-2 及び let-7f-1 の減少した発現も 0.05 の p 値カットオフで腺癌及び扁平上皮癌において見いだされた。同様に、肺腺癌と非癌性組織との、及び扁平上皮癌と非癌性組織との比較分析によって、それぞれ 17 種及び 16 種の miRNA において統計的に差異のある発現量が見いだされた (表 4)。6 種の miRNA (hsa-mir-21、hsa-mir-191、hsa-mir-155、hsa-mir-210、hsa-mir-126*、及び hsa-mir-224) は非小細胞肺癌 (NSCLC) の両者の組織学的な型において共有されていた。

【0128】

表 2 臨床病理学的分類の比較分析

【表 34】

分類 (数)	合計	遺伝子数 ^a	FDR ^b	正確に分類された% ^c (p 値)
表現型分類				
全腫瘍 (104) 対全正常 (104)	208	43	0	91 (<0.0005)
腺癌 ^d 腫瘍 (65) 対腺正常 (65)	130	17	0.001	80 (<0.0005)
SCC ^e 腫瘍 (39) 対 SCC 正常 (39)	78	16	0	92 (<0.0005)
組織学的分類				
腺癌腫瘍 (65) 対 SCC 腫瘍 (39)	104	6	0.001	81 (<0.0005)
年齢分類				
全: 年齢 < 67 (56) 対 年齢 ≥ 67 (48)	104	0		
腺癌: 年齢 < 67 (37) 対 年齢 ≥ 67 (28)	65	0		
SCC: 年齢 < 67 (19) 対 年齢 ≥ 67 (20)	39	0		
性別分類				
全: 男 (65) 対 女 (39)	104	0		
腺癌: 男 (39) 対 女 (26)	65	0		
SCC: 男 (26) 対 女 (13)	39	0		
人種分類				
全: アフリカンアメリカン (21) 対 白色アメリカン (83)	104	0		
腺癌: アフリカンアメリカン (13) 対 白色アメリカン (52)	65	0		
SCC: アフリカンアメリカン (8) 対 白色アメリカン (31)	39	0		
病期分類				
全: I 期 (65) 対 II 期 (17) III 期 (16) IV 期 (22)	104	0		
腺癌: I 期 (41) 対 II 期 (8) III 期 (16) IV 期 (16)	65	1		
SCC: I 期 (24) 対 II 期 (9) III 期 (16) IV 期 (6)	39	0		

^a 遺伝子数、0.001 で有意な遺伝子の数。

^b FDR、偶然に有意となる遺伝子の確率である過誤発見率。

^c 正確に分類された% (p 値)。複合共変量予測子に基づくリーブワンアウト交差検定クラス予測法。前記 p 値は実際のデータの交差検定誤り率以下の交差検定誤り率を示す無作為並べ替えの割合である。

^d Adeno、腺癌

^e SCC、扁平上皮癌。

表 3 肺癌組織と非癌性肺組織との間で異なる発現量を示した 43 種の miRNA。

【表 3 5】

miRNA	部位	p値	種類	FRAとの関連 ^a	癌と関連したゲノム領域 ^a	ホスト遺伝子 ^b
<i>hsa-mir-21</i>	17q23.2	p < 1e-07	上方	FRA17B	Amp ^c -神経芽腫; 肺癌	<i>TMEM49</i>
<i>hsa-mir-191</i>	3p21.31	p < 1e-07	上方			新規タンパク質
<i>hsa-mir-126*</i>	9q34.3	p < 1e-07	下方		Del ^d -NSCLC ^e ; HCC ^f	<i>EGFL-7</i>
<i>hsa-mir-210</i>	11p15.5	1.00E-07	上方		Del-卵巣; 肺癌	新規タンパク質
<i>hsa-mir-155</i>	21q21.3	1.00E-07	上方		Amp-直腸癌	<i>BIC</i>
<i>hsa-mir-143</i>	5q32	4.00E-07	下方		Del-前立腺癌	miRNA ^g
<i>hsa-mir-205</i>	1q32.2	4.00E-07	上方		Amp-肺癌	miRNA
<i>hsa-mir-192-prec</i>	11q13.1	5.00E-07	下方	FRA11A	Del-甲状腺癌	miRNA
<i>hsa-mir-224</i>	Xq28	5.00E-07	下方	FRA11F		<i>GABRE</i>
<i>hsa-mir-126</i>	9q34.3	7.00E-07	下方		Del-NSCLC; HCC	<i>EGFL-7</i>
<i>hsa-mir-24-2</i>	19p13.1	1.30E-06	上方			ND ^h
<i>hsa-mir-30a-5p</i>	6q13	4.80E-06	下方			miRNA
<i>hsa-mir-212</i>	17p13.3	5.00E-06	上方			ND
<i>hsa-mir-140</i>	16q22.1	5.10E-06	下方			<i>ATROPIN-1</i>
<i>hsa-mir-9</i>	15q26.1	6.50E-06	下方			新規タンパク質
<i>hsa-mir-214</i>	1q24.3	8.60E-06	上方			ND
<i>hsa-mir-17-3p</i>	13q31.3	9.40E-06	上方			新規タンパク質
<i>hsa-mir-124a-1</i>	8p23.1	1.23E-05	下方		Amp-MFHs ⁱ	新規タンパク質
<i>hsa-mir-218-2</i>	5q34	1.34E-05	下方			<i>SLIT3</i>
<i>hsa-mir-95</i>	4p16.1	1.48E-05	下方			<i>ABLM2</i>
<i>hsa-mir-145</i>	5q32	1.90E-05	下方		Del-前立腺癌	miRNA
<i>hsa-mir-198</i>	3q13.33	2.43E-05	下方			<i>FSTL1</i>
<i>hsa-mir-216-prec</i>	2p16.1	3.05E-05	下方			ND
<i>hsa-mir-219-1</i>	6p21.32	5.56E-05	下方			ND
<i>hsa-mir-106a</i>	Xq26.2	6.20E-05	上方		Del-卵巣癌	ND
<i>hsa-mir-197</i>	1p13.3	7.23E-05	上方			ND
<i>hsa-mir-192</i>	11q13.1	0.000119	上方	FRA11A	Del-甲状腺癌	ND
<i>hsa-mir-125a-prec</i>	19q13.41	0.000143	下方			miRNA
<i>hsa-mir-26a-1-prec</i>	3p22.3	0.000148	下方		Del-上皮癌	<i>NIF1</i>
<i>hsa-mir-146</i>	5q33.3	0.000163	上方			miRNA
<i>hsa-mir-203</i>	14q32.33	0.000267	上方			ND
<i>hsa-mir-199b-prec</i>	9q34.11	0.000304	下方		Del-膀胱癌	<i>GOLGA2</i>
<i>hsa-let-7a-2-prec</i>	11q24.1	0.000398	下方	FRA11B	Del-肺癌	miRNA
<i>hsa-mir-27b</i>	9q22.32	0.000454	下方	FRA9D	Del-膀胱癌	新規タンパク質
<i>hsa-mir-32</i>	9q31.3	0.000458	下方	FRA9E	Del-肺癌	新規タンパク質
<i>hsa-mir-29b-2</i>	1q32.2	0.000466	下方			miRNA
<i>hsa-mir-220</i>	Xq25	0.000630	下方			ND
<i>hsa-mir-33</i>	22q13.2	0.000683	下方		Del-直腸癌	<i>SREBF2</i>
<i>hsa-mir-181c-prec</i>	19p13.12	0.000736	下方			<i>NANOS3</i>
<i>hsa-mir-150</i>	19q13.33	0.000784	上方			ND
<i>hsa-mir-101-1</i>	1p31.3	0.000844	下方	FRA1C	Del-卵巣; 乳癌	ND
<i>hsa-mir-124a-3</i>	20q13.33	0.000968	下方			ND
<i>hsa-mir-125a</i>	19q13.41	0.000993	下方			ND

^a 情報は先の報告 (Calin, G. A. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 2999-3004 (2004)) から得た。

^b 情報は先の報告 (Rodriguez, A. ほか, Genome Res. 14: 1902-1910 (2004)) から得た。

^c Amp、増幅; ^d Del、欠失; ^e NSCLC、非小細胞肺癌; ^f HCC、肝細胞癌; ^g miRNA、mRNA様非コードRNA; ^h ND、定義されず; ⁱ MFHs、悪性線維性組織球腫。

【0129】

選択された前駆体miRNAのリアルタイムRT-PCR分析を行い、前記マイクロアレイ分析からの結果を確認した。まず、16組の肺腺癌及び16組の肺扁平上皮癌からのcDNAをhsa-mir-21、hsa-mir-126*、hsa-mir-205及びU6 (コントロールとして) に対する遺伝子特異的プライマーを用いて調製した。次に、リアルタイムRT-PCR分析を行い、前記のさまざまな試料におけるこれらのmiRNAの発現量を測定した。hsa-mir-21及びhsa-mir-205前駆体miRNAの発現における少なくとも2倍のアップレギュレーション (非癌性組織におけるこれらのmiRNAの発現量と比較した場合) が、それぞれ32例のうちの66%及び56%において見いだされた (図1)。これらの差異は対応のあるt検定においてp<0.001で統計的に有意であった。一方、統計的に有意ではなかったものの試験した32例

10

20

30

40

50

の肺癌のうち31%が前駆体 *hsa-mir-126** の発現量において50%超の減少を示した(図1)。これらの発見は、特定の前駆体 *miRNA* が肺癌において頻繁にアップレギュレートされているか又は減少していることを示しており、マイクロアレイ分析を用いて決定したそれらの成熟 *miRNA* の発現様式と一致している。

【0130】

表4 腺癌組織／肺扁平上皮癌組織と非癌性肺組織との間で異なった発現を示す *miRNA*

【表36】

miRNA	部位	p値	種類
腺癌組織			
<i>hsa-mir-21</i>	17q23.2	$p < 1e-07$	上方
<i>hsa-mir-191</i>	3p21.31	1.20E-06	上方
<i>hsa-mir-155</i>	21q21.3	4.10E-06	上方
<i>hsa-mir-210</i>	11p15.5	9.90E-06	上方
<i>hsa-mir-126*</i>	9q34.3	1.92E-05	下方
<i>hsa-mir-126</i>	9q34.3	4.13E-05	下方
<i>hsa-mir-24-2</i>	19p13.1	0.000228	上方
<i>hsa-mir-219-1</i>	6p21.32	0.000251	下方
<i>hsa-mir-95</i>	4p16.1	0.000303	下方
<i>hsa-mir-192-prec</i>	11q13.1	0.000307	下方
<i>hsa-mir-220</i>	Xq25	0.000309	下方
<i>hsa-mir-216-prec</i>	2p16.1	0.00042	下方
<i>hsa-mir-204-prec</i>	9q21.11	0.000449	下方
<i>hsa-mir-188</i>	Xp11.23	0.000475	下方
<i>hsa-mir-198</i>	3q13.33	0.000494	下方
<i>hsa-mir-145</i>	5q32	0.000579	下方
<i>hsa-mir-224</i>	Xq28	0.000925	下方
肺扁平上皮癌組織			
<i>hsa-mir-205</i>	1q32.2	$p < 1e-07$	上方
<i>hsa-mir-224</i>	Xq28	4.14E-05	下方
<i>hsa-mir-191</i>	3p21.31	5.18E-05	上方
<i>hsa-mir-126*</i>	9q34.3	9.74E-05	下方
<i>hsa-mir-140</i>	16q22.1	0.000132	下方
<i>hsa-mir-210</i>	11p15.5	0.0001383	上方
<i>hsa-mir-17-3p</i>	13q31.3	0.0001772	上方
<i>hsa-mir-29b</i>	1q32.2	0.0002046	下方
<i>hsa-mir-143</i>	5q32	0.0003141	下方
<i>hsa-mir-203</i>	14q32.33	0.0003293	上方
<i>hsa-mir-155</i>	21q21.3	0.0003688	上方
<i>hsa-mir-21</i>	17q23.2	0.0003904	上方
<i>hsa-mir-214</i>	1q24.3	0.0004546	上方
<i>hsa-mir-212</i>	17p13.3	0.0005426	上方
<i>hsa-mir-30a-5p</i>	6q13	0.0006165	下方
<i>hsa-mir-197</i>	1p13.3	0.0008507	上方

【0131】

さらに、前記の3種の前駆体 *miRNA*、*hsa-mir-21*、*hsa-mir-126**、及び *hsa-mir-205* に対する前記マイクロアレイデータが、溶液ハイブリダイゼーション検出法により、それらの成熟 *miRNA* において確認された。具体的には、十分量のRNAが入手可能であった7組の原発性肺癌組織及び対応する非癌性肺組織を分析した。*hsa-mir-21* 及び *hsa-mir-205* の成熟型は前記の対応する非癌性肺組織と比較して明らかに肺癌組織内においてアップレギュレートされていた(図2)が、*hsa-mir-126** は試験したほとんどの肺癌組織においてダウンレギュレートされていた。従って、前記RT-PCRの結果のように、これらの分析によってこの3種の *miRNA* に対する前記マイクロアレイ発現データが確認された。

【実施例2】

【0132】

ヒト肺癌細胞株における異なった *miRNA* 発現シグナチャー

材料及び方法

試料

5種の小細胞肺癌（SCLCs）細胞株及び8種の非小細胞肺癌（NSCLCs）細胞株からなる13種の肺癌細胞株を本研究に用いた。前記の5種SCLC細胞株はDMS 92、NCI-H82、NCI-H146、NCI-H446及びNCI-H417（American Tissue Culture Collection）であった。前記の8種のNSCLC細胞株はNCI-H157、Calu-1、Calu-6、NCI-H292、NCI-H596、A-427、A549及びA2182（American Tissue Culture Collection、バージニア州マナッサス）であった。組織及び培養細胞からの全RNAはTRIzol（登録商標）Reagent（Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド）により、製品の使用説明書記載の方法に従って精製した。

10

【0133】

マイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析を先の記載に従って行った（Liu, C. G. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744（2004）、実施例1も参照のこと）。

【0134】

統計分析

統計分析を前述の部分において記載されたように行った（例えば実施例1を参照のこと）。

20

【0135】

結果

5種の小細胞肺癌（SCLCs）細胞株及び8種の非小細胞肺癌（NSCLCs）細胞株のmiRNA発現プロファイルをマイクロアレイ分析により生成した。NSCLCs及びSCLCsのmiRNA発現プロファイルの比較により、3種のmiRNA（hsa-miR-24-1、hsa-miR-29a、及びhsa-miR-29c）の発現量において統計的有意差（ $p < 0.001$ 、t検定による）が見いだされた。さらに、階層的クラスタ分析を18種の最も異なる発現を示した各試料型のmiRNAに適用した際に異なったクラスターが見いだされ、全NSCLC細胞株がSCLC細胞株のものとは異なるクラスターに分類された（図3A、図3B）。これらの結果は、先の研究（例えばLiu, C. G. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744（2004）；Bhattacharjee, A. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:13790-13795（2001）；Garber, M. E. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:13784-13789（2001）を参照のこと）において見いだされているように、miRNA発現プロファイルが、異なった起源及び／又は種類の細胞で異なりうることを示している。

30

【実施例3】

【0136】

肺癌の臨床病理学的特徴と関連したmiRNAの同定

材料及び方法

マイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析を先の記載に従って行った（Liu, C. G. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744（2004）、実施例1も参照のこと）。

【0137】

統計分析

統計分析を前述の部分において記載されたように行った（例えば実施例1を参照のこと）。

50

40

【0138】

結果

前記マイクロアレイデータが臨床的挙動の異なる肺癌のサブセットに対して特異的な分子シグナチャーを見いだしたかに関して分析を行った。この分析のために、5種類の臨床的及び病理学的情報の関連性を試験した(表2)。組織学的分類においては、NSCLCの2種類の最も一般的な組織学的型である腺癌及び扁平上皮癌において異なった発現を示す6種のmiRNA(hsa-mir-205、hsa-mir-99b、hsa-mir-203、hsa-mir-202、hsa-mir-102及びhsa-mir-204-prec)が同定された。hsa-mir-99b及びhsa-mir-102の発現量は、腺癌において、より高かった。年齢、性別又は人種によって区別した群では異なった発現を示すmiRNAは同定されなかった。

10

【実施例4】

【0139】

hsa-mir-155及びhsa-let-7a-2の発現量と肺腺癌を有する患者の予後との相関

材料及び方法

マイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析を先の記載に従って行った(Liu, C. G. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744 (2004)、実施例1も参照のこと)。

20

【0140】

統計分析

統計分析を前述の部分において記載されたように行った(例えば実施例1を参照のこと)。

【0141】

遺伝子オントロジー(Gene Ontology)分析

hsa-mir-155及びhsa-let-7aの予測される標的(predicted target)をLewisほか(Lewis, B. P. ほか, Cell 120:15-20 (2005))及びPicTar(Krek, A. ほか, Nat. Genet. 37:495-500 (2005))の方法により決定し、特定の遺伝子オントロジー(GO)生物学的グルーピング内のオーバーリプレゼンテーション(over-representation)について分析した。GOターム(GO term)リストをWhole Pathway Scope(WPS)アプリケーションを用いた分析にかけ、0.005未満のフィッシャーの正確確率スコア(Fisher Exact score)を示したこれらのタームをリストアップした。

30

【0142】

結果

miRNA発現量の、患者の生存率との相関を評価した。BRB-ArrayToolsにおけるグローバル並べ替え検定(global permutation test)を用いた一変量コックス比例ハザード回帰モデルにおいて、8種のmiRNA(hsa-mir-155、hsa-mir-17-3p、hsa-mir-106a、hsa-mir-93、hsa-let-7a-2、hsa-mir-145、hsa-let-7b及びhsa-mir-21)が腺癌患者の生存率と相関していた。hsa-mir-155、hsa-mir-17-3p、hsa-mir-106a、hsa-mir-93、又はhsa-mir-21のいずれかの高発現及びhsa-let-7a-2、hsa-let-7b又はhsa-mir-145のいずれかの低発現が有意に悪い予後を示すことが見いだされた。また、41名のI期腺癌患者の生存分析において3種のmiRNA(hsa-mir-155、hsa-mir-17-3p、及びhsa-mir-20)が患者予後と関連していることが明らかになった。これらの結果は、病期に関わりなく、miRNA発現プロファイルと患者の生存率との間に重大な関連性があることを示してい

40

50

る。

【0143】

これらのmiRNAのうちの5種(hsa-mir-155、hsa-mir-17-3p、hsa-let-7a-2、hsa-mir-145、及びhsa-mir-21)が肺癌組織と対応する非癌性肺組織との間で異なった発現を示していたことから、これらのmiRNAをさらなる生存分析に用いた。これら5種のmiRNAそれぞれについて、肺癌における発現量の、対応する非癌性肺組織における発現量に対する比を算出し、前記患者をその発現量比に従って分類した。これらのグルーピングを各miRNAについて用い、カプラン・マイヤー生存分析を行った。カプラン・マイヤー生存率推定においては、hsa-mir-155の高発現又はhsa-let-7a-2の低発現のいずれかを示す肺腺癌患者は、hsa-mir-155の低発現又はhsa-let-7a-2の高発現を示す患者よりも悪い生存の見通しを有することが示された(図4及び図5)。これら2群の予後の差異はhsa-mir-155において高度に有意であった($p=0.006$;ログランク検定)が、hsa-let-7a-2においてはそれほど有意ではなかった($p=0.033$;ログランク検定)。臨床病理学的要因に関する生存分析においては、病期は有意に生存率と相関していたが($p=0.01$;ログランク検定)、年齢、人種、性別、及び喫煙歴は悪い予後の原因ではなかったことが示された(表5A及び5B)。多重比較の補正のため、過誤発見率を0.05に制限してStoreyほか(Storey, J. D. 及びTibshirani, R., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 9440-9445 (2003))の方法を用いた。この率を用いてもまだhsa-mir-155と病期とは統計的に有意であった。次に、これら全ての臨床病理学的及び分子的要因を用いて多変量コックス比例ハザード回帰分析を行った。病期($p=0.013$;リスク比3.27;95% CI、1.31-8.37;表5A)に加え、hsa-mir-155の高発現は他の臨床病理学的要因とは独立に好ましくない予後因子であることが決定された($p=0.027$;リスク比3.03;95% CI、1.13-8.14)。

【0144】

表5A 分子的及び臨床病理学的特徴並びにマイクロアレイ分析によって分析されたmiRNA発現量との関連における、肺腺癌を有する患者の術後生存率。

【表37】

変量	サブセット	ハザード比 (95% CI) ^a	p
一変量分析 (n=65)			
年齢	年齢 ≥ 67 /年齢 <67	1.41 (0.67-3.06)	0.348
性別	男対女	1.36 (0.64-2.93)	0.413
病期	II-IV/I	2.51 (1.29-6.82)	0.010
喫煙履歴	現在/過去	1.32 (0.63-2.79)	0.456
hsa-mir-155 (n=55)	高/低	3.42 (1.42-8.19)	0.006
hsa-let-7a-2 (n=52)	低/高	2.35 (1.08-6.86)	0.033
多変量分析 (n=55) ^{b, c}			
年齢	年齢 ≥ 67 /年齢 <67	1.92 (0.71-5.17)	0.195
性別	男対女	1.23 (0.47-3.22)	0.669
病期	II-IV/I	3.27 (1.31-8.37)	0.013
喫煙履歴	現在/過去	1.49 (0.51-4.34)	0.457
hsa-mir-155	高/低	3.03 (1.13-8.14)	0.027

^a 95% CI、95%信頼区間。

^b 多変量解析、コックス比例ハザード回帰モデル。

^c hsa-let-7a-2 低/高は統計的に有意ではなかった($p=0.089$)。

【0145】

表5B 臨床病理学的特徴及びリアルタイムRT-PCR分析によって解析された前駆体

miRNA発現量との関連における、肺腺癌を有する患者の術後生存率。

【表38】

変数	サブセット	もとのコホート (n=32)		追加コホート (n=32)		全患者 (n=64)	
		ハザード比 (95% CI) ^a	p	ハザード比 (95% CI)	p	ハザード比 (95% CI)	p
一変数分析							
年齢	年齢≥67/年齢<67	1.89 (0.62-5.34)	0.274	1.21 (0.46-3.21)	0.679	1.28 (0.64-2.58)	0.482
性別	男/女	0.53 (0.14-1.56)	0.232	1.37 (0.54-3.63)	0.479	0.99 (0.49-1.98)	0.975
病期	II-IV/I	4.22 (1.91-23.6)	0.003	2.37 (1.01-7.83)	0.048	3.07 (1.82-8.84)	<0.001
喫煙履歴	現在/過去	0.92 (0.31-2.66)	0.921	1.22 (0.47-3.16)	0.674	1.12 (0.56-2.25)	0.757
前駆体	hsa-mir-155 高/低	2.75 (1.05-12.1)	0.047	2.52 (1.10-7.45)	0.033	2.74 (1.53-6.91)	0.002
前駆体	hsa-let-7a-2 低/高	3.01 (1.09-9.86)	0.037	2.22 (0.91-5.71)	0.084	2.73 (1.42-5.88)	0.003
多変数分析 ^b							
年齢	年齢≥67/年齢<67	0.91 (0.22-3.68)	0.899	0.93 (0.30-2.91)	0.914	1.22 (0.58-2.53)	0.593
性別	男/女	0.35 (0.11-1.17)	0.089	0.92 (0.32-2.66)	0.885	0.85 (0.41-1.74)	0.659
病期	II-IV/I	8.99 (1.95-41.2)	0.004	4.91 (1.51-15.9)	0.008	5.58 (2.42-12.8)	<0.001
喫煙履歴	現在/過去	1.01 (0.30-3.38)	0.980	2.27 (0.70-7.34)	0.170	1.89 (0.85-4.21)	0.117
前駆体	hsa-mir-155 高/低	13.3 (2.59-69.0)	0.002	3.77 (1.32-10.6)	0.013	4.98 (2.29-10.8)	<0.001
前駆体	hsa-let-7a-2 低/高	3.93 (1.06-14.5)	0.040	2.97 (1.07-8.23)	0.036	3.55 (1.64-7.69)	0.001

^a 95% CI、95%信頼区間。

^b 多変数解析、コックス比例ハザード回帰モデル。

【0146】

変化したhsa-mir-155及びhsa-let-7a-2発現量の生物学的影響を調べるため、生命情報科学的分析を行い、遺伝子オントロジー (GO) タームに従ってこれらのmiRNAの予測された標的を分類した (表6)。より一般的な機能のGOター

20

及び細胞内シグナル伝達系と関連した遺伝子標的のオーバーリプレゼンテーションを示し、この発見は報告されているlet-7とRASとの間の機能的相互作用 (Johnson, S. M. ほか, Cell 120:635-647 (2005)) と矛盾しない。

【0147】

表6 hsa-mir-155及びhsa-let-7aの予測された転写産物標的の遺伝子オントロジー分析 (生物学的過程)

10

20

30

【表 3 9】

生物学的過程	遺伝子オントロジー	p-値	
hsa-mir-155			
生物学的過程の制御	GO:0050789	3.44343E-05	
ヌクレオベース\ヌクレオシド\ヌクレオチド 及び核酸代謝の制御	GO:0019219	0.000149553	
生理学的過程の制御	GO:0050791	0.000192938	
転写\DNA依存性の制御	GO:0006355	0.000244233	
代謝の制御	GO:0019222	0.000310887	
転写の制御	GO:0045449	0.000367426	10
転写、DNA依存性	GO:0006351	0.000373583	
転写	GO:0006350	0.000749403	
NLS-耐性 (bearing) 基質-核移入 (import)	GO:0006607	0.000871079	
B-細胞分化	GO:0030183	0.00142995	
ヌクレオベース\ヌクレオシド\ヌクレオチド 及び核酸の代謝	GO:0006139	0.0021327	
タンパク質標的化	GO:0006605	0.00238267	
造血	GO:0030097	0.00243434	
細胞性過程	GO:0009987	0.00270393	
ウリジン代謝	GO:0046108	0.0040568	20
B-細胞活性化	GO:0042113	0.00458041	
hsa-let-7a			
タンパク質修飾	GO:0006464	9.02643E-05	
細胞成長及び/又は保守	GO:0008151	9.99217E-05	
細胞生理学的過程	GO:0050875	0.000128316	
タンパク質キナーゼカスケード	GO:0007243	0.000703203	
細胞性過程	GO:0009987	0.000870863	
細胞間シグナリングカスケード	GO:0007242	0.001290613	
輸送	GO:0006810	0.004305096	
クロマチン修飾	GO:0016568	0.004414505	30
局在化	GO:0051179	0.004492152	
リン代謝	GO:0006793	0.00481218	
リン酸代謝	GO:0006796	0.00481218	

【0148】

hsa-mir-155及びhsa-let-7a-2に対してリアルタイムRT-PCR分析を行い、前記前駆体miRNAの発現も腺癌患者の予後に対する影響を有するか決定した。まず、RNAが入手可能であったもとのセットからの32組の腺癌をリアルタイムRT-PCR分析にかけた。肺癌における発現量の、対応する非癌性肺組織における発現量に対する比を算出し、前記患者をこの発現量比に応じて分類した。 Kaplan-Meier生存分析(図6、図7)において、前駆体hsa-mir-155の高発現($p=0.047$;ログランク検定)又は前駆体hsa-let-7a-2の低発現($p=0.037$;ログランク検定)のいずれの患者においても有意に低い生存率が示された(表5B)。さらにここで記載されている予後分類を確認するために、32個の腺癌のさらなる独立したセットをリアルタイムRT-PCR分析を用いて分析した。Kaplan-Meier生存曲線(図8、図9)は、前駆体hsa-mir-155の発現量における明確な相関($p=0.033$;ログランク検定)と、hsa-let-7a-2の発現量における有意傾向(approaching significance)($p=0.084$;ログランク検定)とをこのコホートにおいても示した(表5B)。また、前駆体hsa-mir-155の高度発現は、多変量コックス比例ハザード回帰分析により、悪い予後の独立した予測材料であることが見いだされた(表5B)。前記のもとのセット(32例)及び前

40

50

記の追加セット（32例）において何らかのグルーピングバイアス（grouping bias）が存在したかを確認するため、一変量及び多変量生存分析を全64例において行った。先の結果と一致して、これらの分析は前駆体hsa-mir-155発現量の有意性を示した（表5B；図10）。注目すべきことに、前駆体hsa-let-7a-2の低発現も肺癌患者の予後に対する同様の影響を有しており（表5B；図11）、先の報告（Takamizawa, J. ほか, Cancer Res. 64, 3753-3756（2004））と一致していた。

【0149】

実施例5

NSCLC細胞株におけるmiRNA発現のエピジェネティックな調節の欠如

10

材料及び方法

マイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析を先の記載に従って行った（Liu, C. G. ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:9740-9744（2004））、実施例1も参照のこと）。

【0150】

統計分析

統計分析を前述の部分において記載されたように行った（例えば実施例1を参照のこと）。

【0151】

20

5-アザ-dC及び／又はTSA処理

A549及びNCI-H157肺癌細胞（American Tissue Culture Collectionより入手可能）を1.0 μM 5-アザ-dC（Sigma、ミズーリ州セントルイス）を含んだ培地で48時間インキュベートし、1.0 μM TSA（Sigma、ミズーリ州セントルイス）の存在下でさらに24時間インキュベートした。全RNAをTRIzol（登録商標）Reagent（Invitrogen）で単離し、マイクロアレイ分析を上記の通り行った。各処理は3回繰り返して行った。

【0152】

結果

miRNAマイクロアレイを用い、2種の肺癌細胞株（A549及びNCI-H157）において、DNAメチル化阻害剤である5-アザ-2'-デオキシシチジン（5-アザ-dC）及び／又は強力なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンA（TSA）による処理の際の様々なmiRNAの発現量を分析した。転写をしていないことが知られる遺伝子（MYO18B）の増加した発現量が5-アザ-dC又はTSAによる処理後に確認された（図12）が、前記マイクロアレイからのmiRNAはどれも、どちらの化合物で処理した後にも発現量に統計的に有意な変化が見られず、少なくともこれらの2種の細胞株において過剰メチル化及びヒストン脱アセチル化はmiRNA発現量の減少の原因ではないことが示唆された。

30

【0153】

本明細書に引用され、明確に参照により組み入れられていない全ての出版物の関連する教示は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられたものとする。本発明は特にその好ましい態様に対する参照により示され記載されたが、添付の請求の範囲によって含まれる発明の範囲から逸脱することなく形態及び詳細における様々な変更をそこに加えることが出来ると当業者によって理解される。

40

【図面の簡単な説明】

【0154】

本特許又は出願ファイルは、カラーで生成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を有する本特許又は特許出願公開のコピーは、要請及び必要な料金の支払いに応じて、特許庁より提供される。

【図1】図1にリアルタイムRT-PCR分析で測定されたヒトmiR-21前駆体（h

50

s a - m i r - 2 1 ; 上部パネル)、ヒト m i R - 1 2 6 * 前駆体 (h s a - m i r - 1 2 6 * ; 中央パネル) 及びヒト m i R - 2 0 5 前駆体 (h s a - m i r - 2 0 5 ; 下部パネル) の肺癌 (C a) 及び非癌性 (N) 組織における相対発現量を表すグラフを示す。癌試料は腺癌又は扁平上皮癌 (S C C) のいずれかであった。肺癌組織と非癌性肺組織との間における発現量の統計的有意性を確かめるために対応のある t 検定を行った。

【図 2】図 2 に肺癌試料 (すなわち腺癌 (A d e n o) 及び扁平上皮癌 (S C C)) における溶液ハイブリダイゼーションで検出された m i R - 2 1 (h s a - m i r - 2 1)、m i R - 1 2 6 * (h s a - m i r - 1 2 6 *) 及び m i R - 2 0 5 (h s a - m i r - 2 0 5) の成熟 m i R N A の発現を示す。C a は肺癌組織を表し、N は非癌性肺組織を表す。5 S r R N A をローディングコントロール (l o a d i n g c o n t r o l) とした。

10

【図 3】図 3 A に小細胞肺癌 (S C L C) 及び非小細胞肺癌 (N S C L C) を代表する 1 3 の肺癌細胞株のマイクロ R N A 発現プロファイルに基づく階層的クラスタ分析を表す dendrogram を示す。図 3 B に図 3 A に列挙されたものに対応する 1 3 の肺癌細胞株の m i R N A 発現クラスタ図 (上部) を示す。図の右側に列挙した種々の m i R N A の発現量を色分けして示す。青色は中央値よりも少ない発現量を表し、黒色は中央値におよそ等しい発現量を表し、橙色は中央値よりも多い発現量を表す。灰色は欠落したデータポイント (d a t a p o i n t) を表す。

【図 4】図 4 は腺癌患者のカプラン・マイヤー (K a p l a n - M e i e r) 生存曲線である。ハイブリダイゼーション強度がバックグラウンドと異なる腺癌患者 (実施例 4 参照) を h s a - m i r - 1 5 5 の発現量によって分類し、生存データをログランク検定により比較した。平均発現量比は、平均発現量比 = 腫瘍での発現量の平均 / 非癌性組織での発現量の平均と定義される。前記 h s a - m i r - 1 5 5 高発現量群 (すなわち、平均発現量比 (1. 4 2) 以上の発現量比を示す群; n = 2 7) を対応する非癌性肺組織と比較した。h s a - m i r - 1 5 5 低発現量群 (すなわち、平均発現量比 (1. 4 2) 未満の発現量比を示す群; n = 2 8) を対応する非癌性肺組織と比較した。これらの比は肺癌試料における非癌性コントロールに対するハイブリダイゼーションシグナルの強度を表す。

20

【図 5】図 5 は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。ハイブリダイゼーション強度がバックグラウンドと異なる腺癌患者 (実施例 4 参照) を h s a - l e t - 7 a - 2 の発現量によって分類し、生存データをログランク検定により比較した。平均発現量比は、平均発現量比 = 腫瘍での発現量の平均 / 非癌性組織での発現量の平均と定義される。前記 h s a - l e t - 7 a - 2 高発現量群 (すなわち、平均発現量比 (0. 9 5) 以上の発現量比を示す群; n = 3 4) を対応する非癌性肺組織と比較した。h s a - l e t - 7 a - 2 低発現量群 (すなわち、平均発現量比 (0. 9 5) 未満の発現量比を示す群; n = 1 8) を対応する非癌性肺組織と比較した。

30

【図 6】図 6 は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。もとのコホートからの 3 2 名の腺癌患者を前駆体 h s a - m i r - 1 5 5 の発現量によって分類し、生存データをログランク検定により比較した。平均発現量比は、平均発現量比 = 腫瘍での発現量の平均 / 非癌性組織での発現量の平均と定義される。前記前駆体 h s a - m i r - 1 5 5 高発現量群 (すなわち、平均発現量比 (1. 1 9) 以上の発現量比を示す群; n = 1 3) を対応する非癌性肺組織と比較した。前駆体 h s a - m i r - 1 5 5 低発現量群 (すなわち、平均発現量比 (1. 1 9) 未満の発現量比を示す群; n = 1 9) を対応する非癌性肺組織と比較した。

40

【図 7】図 7 は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。もとのコホートからの 3 2 名の腺癌患者を前駆体 h s a - l e t - 7 a - 2 の発現量によって分類し、生存データをログランク検定により比較した。平均発現量比は、平均発現量比 = 腫瘍での発現量の平均 / 非癌性組織での発現量の平均と定義される。前記前駆体 h s a - l e t - 7 a - 2 高発現量群 (すなわち、平均発現量比 (0. 9 2) 以上の発現量比を示す群; n = 1 8) を対応する非癌性肺組織と比較した。前駆体 h s a - l e t - 7 a - 2 低発現量群 (すなわち、平均発現量比 (0. 9 2) 未満の発現量比を示す群; n = 1 4) を対応する非癌性肺

50

組織と比較した。

【図8】図8は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。独立したさらなるコホートからの32名の腺癌患者を前駆体h s a - l e t - 7 a - 2の発現量によって分類し、生存データをログランク検定により比較した。前駆体h s a - m i r - 1 5 5高発現量群 (n = 14) ; 前駆体h s a - m i r - 1 5 5低発現量群 (n = 18) 。

【図9】図9は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。独立したさらなるコホートからの32名の腺癌患者を前駆体h s a - l e t - 7 a - 2の発現量によって分類し、生存データをログランク検定により比較した。前駆体h s a - l e t - 7 a - 2高発現量群 (n = 15) ; 前駆体h s a - l e t - 7 a - 2低発現量群 (n = 17) 。

【図10】図10は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。2つの独立したコホートの組み合わせからの64名の腺癌患者を、リアルタイムRT-PCR分析によって推定した前駆体h s a - m i r - 1 5 5の発現量によって分類した。生存データをログランク検定により比較した。平均発現量比は、平均発現量比 = 腫瘍での発現量の平均 / 非癌性組織での発現量の平均と定義される。前記前駆体h s a - m i r - 1 5 5高発現量群 (すなわち、平均発現量比 (1. 19) 以上の発現量比を示す群 ; n = 27) を対応する非癌性肺組織と比較した。前駆体h s a - m i r - 1 5 5低発現量群 (すなわち、平均発現量比 (1. 19) 未満の発現量比を示す群 ; n = 37) を対応する非癌性肺組織と比較した。

10

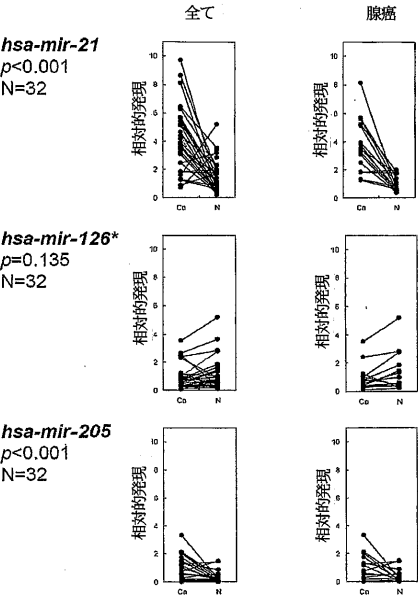
【図11】図11は腺癌患者のカプラン・マイヤー生存曲線である。2つの独立したコホートの組み合わせからの64名の腺癌患者を、リアルタイムRT-PCR分析によって推定した前駆体h s a - l e t - 7 a - 2の発現量によって分類した。生存データをログランク検定により比較した。平均発現量比は、平均発現量比 = 腫瘍での発現量の平均 / 非癌性組織での発現量の平均と定義される。前記前駆体h s a - l e t - 7 a - 2高発現量群 (すなわち、平均発現量比 (0. 92) 以上の発現量比を示す群 ; n = 33) を対応する非癌性肺組織と比較した。前駆体h s a - l e t - 7 a - 2低発現量群 (すなわち、平均発現量比 (0. 92) 未満の発現量比を示す群 ; n = 31) を対応する非癌性肺組織と比較した。

20

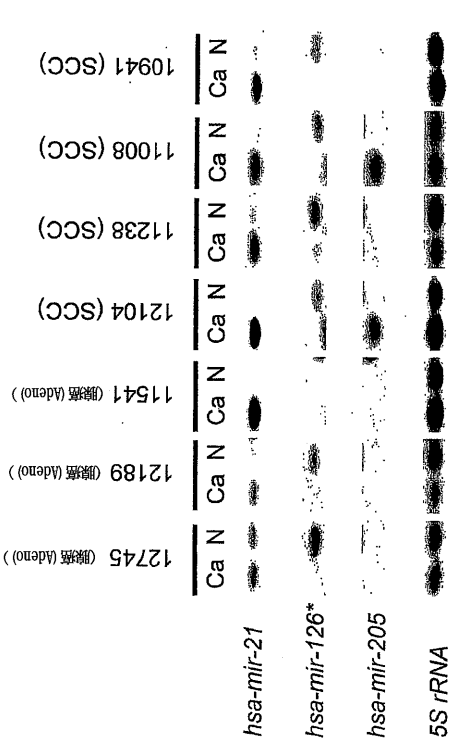
【図12】図12にRT-PCR分析によって測定した2つの肺癌細胞株 (H157、A549) における5-アザードC及び／又はTSA処理後のMYO18B mRNAの発現量を示す。レーン1、非処理 ; レーン2、1. 0 μ M 5-アザードCによる72時間処理 ; レーン3、1. 0 μ M TSAによる24時間処理 ; レーン4、1. 0 μ M 5-アザードCによる72時間処理後、1. 0 μ M TSAによる24時間処理。GAPDHの発現量をローディングコントロールとした。

30

【図 1】



【図 2】



【図 3】

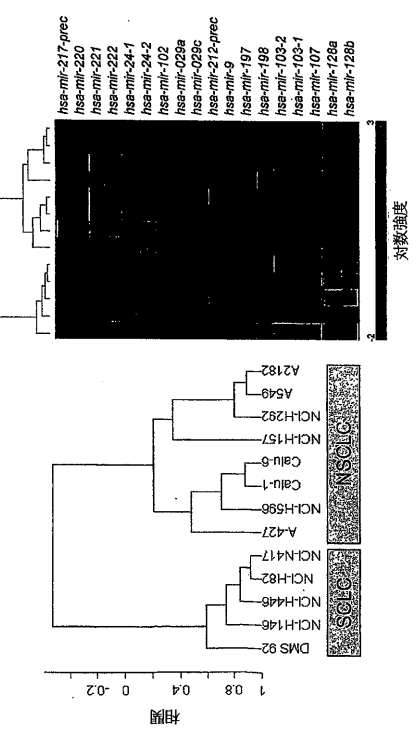
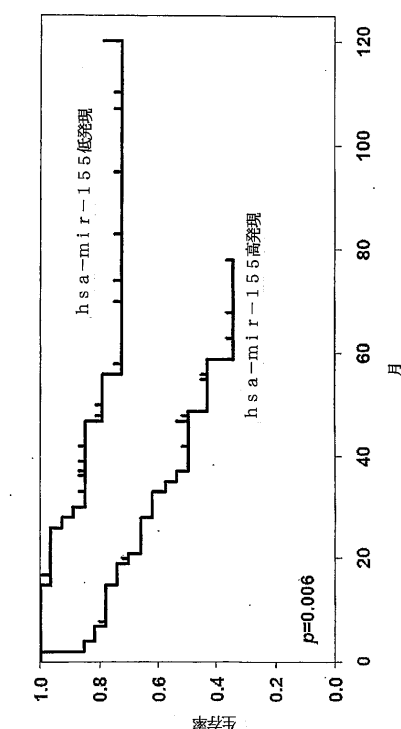


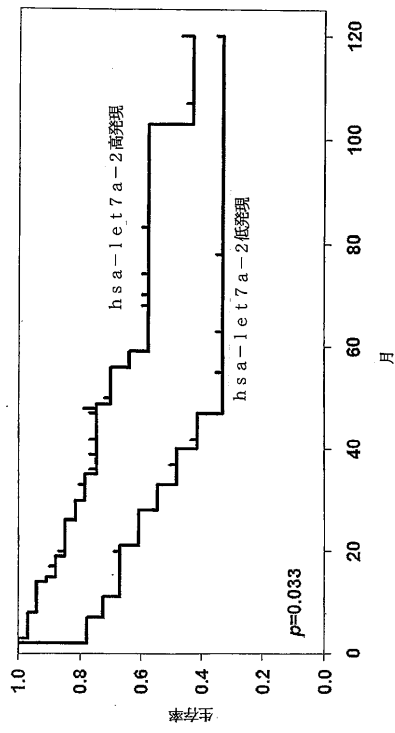
FIG. 3B

FIG. 3A

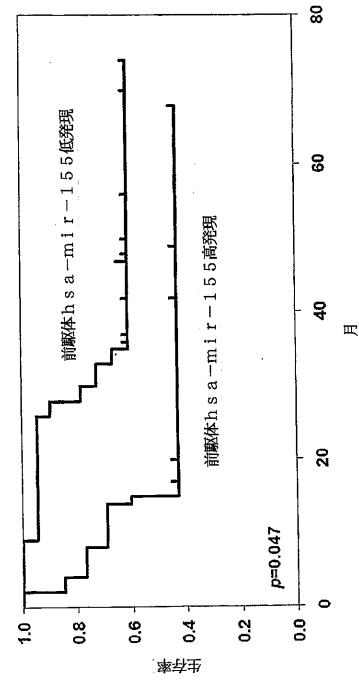
【図 4】



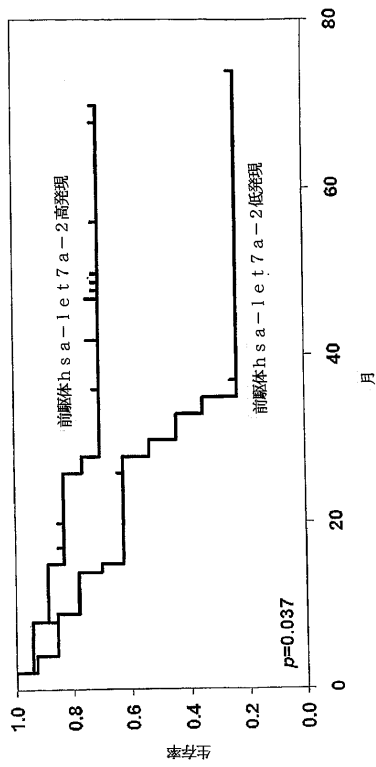
【図 5】



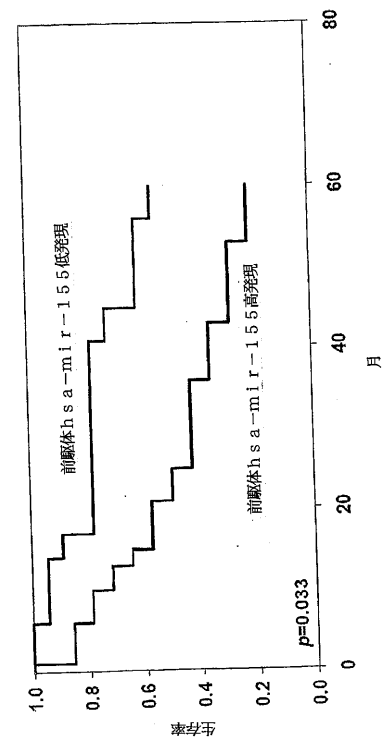
【図 6】



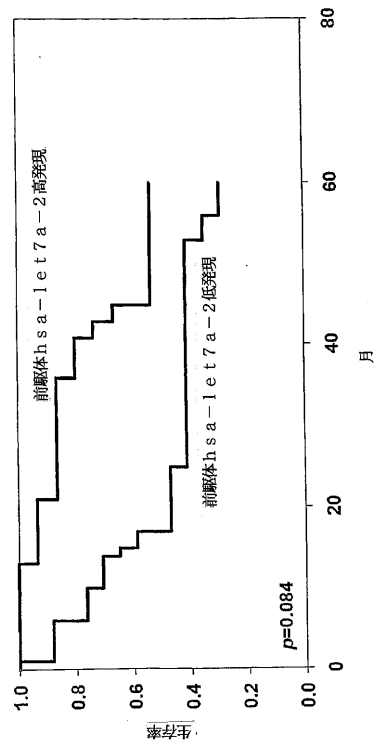
【図 7】



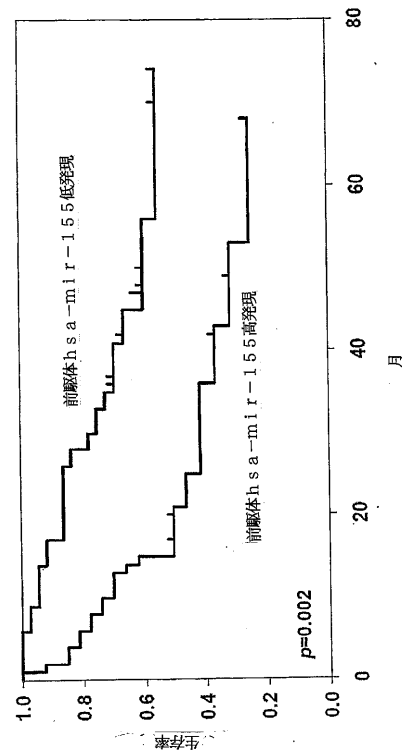
【図 8】



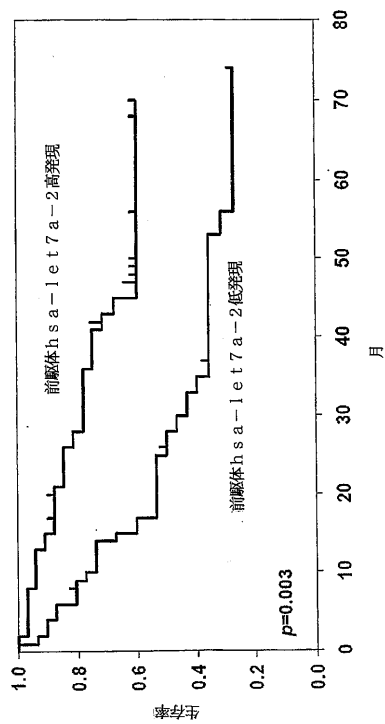
【図 9】



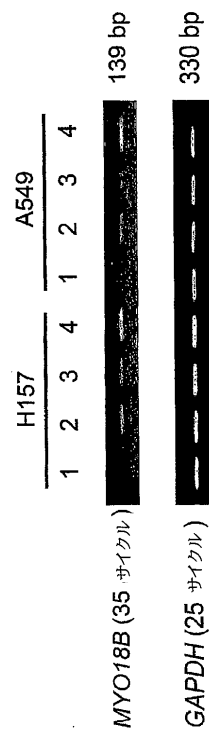
【図 10】



【図 11】



【図 12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(73)特許権者 502006782

アメリカ合衆国

アメリカ合衆国 メリーランド州 20852, ロックヴィル, エグゼクティブ・ブールバード
 6011, スイート 325, ナショナル インスティテューツ・オブ・ヘルス, オフィス・オ
 ブ・テクノロジー・トランスファー

(74)代理人 100140109

弁理士 小野 新次郎

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 クローチェ, カーロ・エム

アメリカ合衆国オハイオ州43221, コロンブス, ケンブリッジ・ブールバード 2140

(72)発明者 ヤナイハラ ノゾム

神奈川県鎌倉市小町1-8-19

(72)発明者 ハリス, クルティス・シー

アメリカ合衆国メリーランド州20896, ガレット・パーク, ウェイバリー・アベニュー 47
 20, ピーオーボックス 77

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 国際公開第2005/078139 (WO, A1)

国際公開第2005/118806 (WO, A1)

Nuc. Aci. Res., 2005年, Vol.33, No.4, pp.1290-1297

Cancer Res., vol. 64, pages 3753-3756 (2004)

Nature, 2005年, Vol.435, pp.834-838

Nature Methods, 2004年, Vol.1, No.1, pp.1-7

Cancer Res., 2005年, Vol.65, pp.7065-7070

PNAS, 2005年, Vol.102, No.10, pp.3627-3632

Cell, vol. 120, pages 635-647 (Mar. 2005)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70

C12N 15/00-15/90

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)

WPI