

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年9月13日(13.09.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/121178 A1

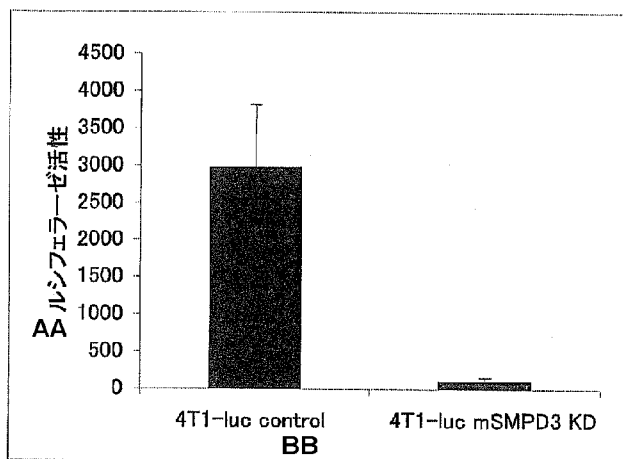
- (51) 国際特許分類:
A61K 31/7105 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/055476
- (22) 国際出願日: 2012年3月2日(02.03.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-047647 2011年3月4日(04.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP). 大日本住友製薬株式会社(DAINIPPON SUMITOMO PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 落谷 孝広(OCHIYA, Takahiro) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 小坂 展慶(KOSAKA, Nobuhiro) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 井口 晴久(IGUCHI, Haruhisa) [JP/JP]; 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番9号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

[続葉有]

(54) Title: TUMOR ANGIOGENESIS INHIBITOR

(54) 発明の名称: 腫瘍血管形成阻害剤

[図1]



AA - Luciferase activity
BB - 4T1-luc control

(57) Abstract: An inhibitor cited in (a) below, or a tumor therapeutic agent containing a nucleic acid cited in (b) below: (a) an miR-151-3p inhibitor, an miR-886-3p inhibitor, or an SMPD3 inhibitor; and (b) (1) a nucleic acid comprising a nucleotide sequence having at least 70% identity with a nucleotide sequence represented by any of SEQ ID NO: 1 to 6, or miR-29b-1*, has-miR-221*, miR-138, miR-584, miR-30a, or miR-146a, the nucleic acid containing a nucleotide having inhibitory activity on the expression of a target gene; or (2) a nucleic acid that is an expression vector capable of expressing the nucleic acid of (1).

(57) 要約: 以下の(a)に記載の阻害剤、あるいは(b)に記載の核酸を含有する腫瘍治療剤: (a) miR-151-3p阻害剤、miR-886-3p阻害剤、またはSMPD3阻害剤、(b) (1) miR-29b-1*、has-miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、または配列番号1~6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり且つ標的遺伝子発現抑制活性を有するヌクレオチドを含む核酸、又は(2)上記(1)の核酸を発現し得る発現ベクターである核酸。



SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：腫瘍血管形成阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍の血管形成を抑制する薬剤、前記薬剤を利用した医薬、悪性がんを判定する方法、悪性がんを判定するための剤、及び腫瘍の血管形成を阻害する作用を有する物質のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、がん細胞は自らの増殖、浸潤、転移に都合のよいように周辺細胞を飼い馴らし、所謂“がん微小環境”を形成するという仮説が提唱されており（非特許文献1、2）、がん細胞由来の細胞間情報伝達物質の重要性が示唆されている。

腫瘍血管とは、無秩序に発達し、口径不同、接合不全といった構造的な不完全性を有する血管をいい、組織への酸素、栄養供給といった血管本来の目的を達成できないだけでなく、結果的にがん微小環境が低酸素に維持され、そこに存在するがん細胞は高い薬剤抵抗性と浸潤・転移能を獲得することとなる（非特許文献3）。しかしながら、その分子メカニズムは明らかとされておらず、腫瘍血管の是正をする治療法も十分なものは得られていない。

最近の血管新生に関する研究から、正常に形成された血管では、過剰な血管形成を防ぐために、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)シグナルを適度に抑制するメカニズムが存在することが分かってきた(非特許文献17、18)。その機構の一つとして、DLL4-Notchシグナル経路がいわゆるネガティブフィードバックシグナルとしてVEGFシグナルを抑制することが示唆されている(非特許文献19)。DLL4-Notchシグナルが阻害されると、血管形成異常が引き起こされることが知られている。

DLL4(Delta-like ligand 4)は1回膜貫通型の膜タンパク質で、同じく1回膜貫通型Notchタンパクのリガンドとして機能する。DLL4刺激によりNotchタンパクはADAM metalloproteinaseと γ -secretaseにより切断され、細胞内ドメ

インNotch intracellular domain (NICD)が産生される。次いで、NICDが核内に移行し、RBPJ/CSL転写因子を活性化することで、様々な遺伝子発現を制御することが知られている(非特許文献20)。また、DLL4の発現はVEGFにより増加することが知られており、その活性化にはAkt3が介在するとの報告がなされている(非特許文献21)。

[0003] スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ(SMPD)3は2つの膜貫通ドメインを有する膜結合型酵素であり、その生理作用は、細胞内シグナル伝達、酸化ストレス応答等多岐にわたる。その一次配列は全体的には細菌由来のSMPDとはほとんど相同性が無いものの、酵素活性中心の限られたアミノ酸残基は保存されている。生体内におけるSMPD3の役割としては、骨形成、歯質形成に関与することが、遺伝子変異マウスの研究から明らかとなってきた(非特許文献4)。がんとSMPD3との関わりとしては、一部の乳がん細胞においてSMPD3遺伝子のメチル化が報告されているのみ(非特許文献5)であり、その機能を示唆するような報告はなされていない。

[0004] マイクロRNAはがん発症において非常に重要な役割をしていることが知られており、これまでに、miR-16、miR-21、let-7等多くのがん原マイクログRNAが同定されている。加えて、血管新生を制御するマイクログRNAとして、miR-126、miR-210が同定されている(非特許文献6)が、以下に示すマイクログRNAと血管新生との関わりは知られていない。

[0005] miR-29b-1は、胆管がんにおいてc-Myc、Hedgehog、NF-KappaBにより発現が負に制御されていることが知られている(非特許文献7)ものの、パッセンジャー配列であるmiR-29b-1*のがん細胞における発現変動、生理機能については報告がない。

miR-221*は、miR-221のパッセンジャー配列として生体内に存在することは知られていたが、マイクログRNAとしての生理作用を有することは報告されていなかった。

miR-138は、Srivastava等により、心筋の発生段階で重要な働きをすることが示唆されている(非特許文献8)。がんと関わりにおいては、Head and

Neck squamous cell carcinoma(HNSCC細胞)の転移を抑制することが示されている(非特許文献9)ものの、血管新生に対する作用は知られていない。

miR-584は、正常腎臓細胞であるHK-2細胞と比較して、腎がん細胞であるRC C細胞において発現量が抑制されており、更に細胞増殖を促進する因子であるROCK-1遺伝子が標的遺伝子であることから腎がんにおけるがん抑制遺伝子の一つであると報告されている(非特許文献10)。また、がん抑制遺伝子の一つであるNasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 (NGX6)により発現量が抑制されるとの報告からもがん細胞内では、腫瘍増殖に抑制的に働くことが示唆されている(非特許文献11)。

miR-30aは、がん細胞の1種であるA549というがん細胞株で発現が増加しているとの報告があるものの、正常がん細胞にmiR-30aを形質導入しても細胞増殖能、腫瘍形成能、薬剤感受性などに変化が認められなかった(非特許文献12)。また、食道がん等、別のがん種でも発現増加していることは報告されているものの、生理作用はいまだ示されていない(非特許文献13)。

miR-146aは、パピローマ甲状腺がんなどのがんだけでなく、リウマチ、乾癬などの自己免疫疾患でも高発現することが知られている。そして、標的遺伝子の中で最も重要なのは免疫活性化、細胞増殖促進活性を有するNF- κ Bという転写因子であることが分かっている(非特許文献14)。

miR-151-3pは、肝がんにおいて発現上昇することが報告されており、同一遺伝子上に存在するmiR-151-5pは転移を促進する効果を有することが示されている(非特許文献15)が、miR-151-3pの機能についての報告はなされていない。

miR-886-3pは、ヒストローマ細胞において、細胞走化性因子であるStromal Derived Factor 1 (SDF1, CXCL12) の3' UTR配列上に結合配列があり、その発現を負に制御することが知られている。実際に、HS27a細胞にmiR-886-3pを形質導入すると、Jurkat細胞の遊走が抑制され、逆に、anti-miR-886-3pを導入するとJurkat細胞の遊走が促進されることが知られている(非特許文献16)。

近年、マイクロRNAが細胞から分泌されて、細胞間のシグナル伝達物質として機能することが明らかとなりつつある(非特許文献22)。分泌型マイクロRNAががん細胞から大量に分泌されることも報告されている(非特許文献23)ことから、がん細胞由来の分泌型マイクロRNAが腫瘍血管形成等のがん微小環境形成に関与することが予想される。しかし、これらがん細胞由来分泌型マイクロRNAの機能を抑制する方法は確立されていない。

一方、細胞内のマイクロRNAの活性を抑制する方法として、当該マイクロRNAの相補配列を有する核酸(anti-miR)を用いるanti-miR法、当該マイクロRNAの標的mRNAの相補配列を有する核酸(target-mask)によりマイクロRNAとその標的mRNAとの結合を阻害するtarget-mask法、当該マイクロRNAの5'末端部分配列(シード配列)を複数発現するベクター(sponge vector又はdecoy vector)により、当該マイクロRNAをトラップするsponge法又はdecoy法等が知られている(非特許文献24)。

一般に、anti-miRは化学修飾された一本鎖の核酸で、内在性のマイクロRNAに特異的に結合し、その機能を阻害するように設計されている。化学修飾はanti-miRの生体内ヌクレアーゼに対する耐性の付与、マイクロRNAとの間で形成された二重鎖の安定性の向上を目的として行われ、2'-O-メチルRNA、locked nucleic acid(LNA)、Peptide nucleic acid(PNA)などを挙げることが出来る(非特許文献25)。ここで、LNA修飾核酸とは、核酸の2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレン残基を介して架橋した2つの環状構造を持つ核酸誘導体を指す。locked nucleic acid(LNA)は2',4'-BNA(2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid)とも呼ばれている。非臨床試験において、LNA修飾を施したanti-miRを非ヒト霊長類に全身投与することにより、効率的で持続的な標的マイクロRNAのサイレンシングに成功したとの報告もなされている(非特許文献26)。

天然核酸(DNAやRNA)は化学構造上形の自由度(コンフォメーションの自由度)が大きくなっている。そのためDNA-DNA、RNA-RNA間の二重鎖形成(ハイブリダイズ)において熱力学的に不利となっており、結合親和性(ハイブ

リダイズ能)を向上させる事が核酸医薬の課題となっている。LNAは、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋することで、熱力学的に安定化させることで、標的となるDNAやRNAに対する結合親和性を高め、かつヌクレアーゼ(核酸分解酵素)耐性を付与出来ることが知られている(非特許文献27)。

しかし、具体的に、anti-miR中のどの核酸にLNA修飾を施せば、上記した効果を最大限に引き出すことが出来るのかは明確にはなっていない(非特許文献28、29)。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Bhowmick, N.A. et al. Nature 432, 332-337 (2004)
非特許文献2: Mantovani, A. et al. Nature 454, 436-444 (2008)
非特許文献3: 実験医学 vol.28 No.17 189-195 (2010)
非特許文献4: Nature Genetics 37(8), 803-805 (2005)
非特許文献5: Genes, Chromosomes & Cancer 48, 83-97 (2009)
非特許文献6: Current Drug Targets 11(8), 943-9 (2010)
非特許文献7: Journal of Cellular Biochemistry 110, 1155-1164 (2010)
非特許文献8: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(46), 17830-5 (2008)
非特許文献9: Cancer Letters 286, 217-222 (2009)
非特許文献10: British Journal of Cancer 104, 308-315 (2011)
非特許文献11: Mol. Cell. Biochem. 345, 283-290 (2010)
非特許文献12: PLOS ONE 5, e9219 (2010)
非特許文献13: International Journal of Cancer 127, 2804-2814 (2010)
非特許文献14: Scandinavian Journal of Immunology 71, 227-231 (2010)
非特許文献15: Nature Cell Biology 12, 390-399 (2010)
非特許文献16: PLOS ONE 5, e14304 (2010)
非特許文献17: Nature Reviews Cancer 7, 327-331 (2007)
非特許文献18: Nature Reviews Clinical Oncology 6(6), 315-326 (2009)

- 非特許文献19 : Clin Cancer Res 13, 7243-7246 (2007)
- 非特許文献20 : Science 284(5415), 770-776 (1999)
- 非特許文献21 : Mol Cell Biol 23(1), 14-25 (2003)
- 非特許文献22 : J Biol Chem 285(23), 17442-52 (2010)
- 非特許文献23 : Curr Drug Discov Technol 7(2), 95-105 (2010)
- 非特許文献24 : Nature 469(7330), 336-42 (2011)
- 非特許文献25 : Chem Commun 455 (1998)
- 非特許文献26 : Nature 452(7189) 896-9 (2008)
- 非特許文献27 : Chemistry & Biology 8, 1-7 (2001)
- 非特許文献28 : Nucleic Acids Research 34, 8, 2294-2304 (2006)
- 非特許文献29 : Nucleic Acids Research 33, 1, 439-447 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明の目的は、腫瘍の血管形成を抑制する薬剤、前記薬剤を利用した医薬、悪性がんを判定する方法、悪性がんを判定するための剤、及び腫瘍の血管形成を阻害する作用を有する物質のスクリーニング方法等を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者等は、鋭意検討を行った結果、悪性度の高いがん細胞で高い分泌量を示す24種のマイクロRNA (miR-29b-1*, miR-221*, miR-138, miR-584, miR-30a, miR-146a, miR-151-3p, miR-886-3p, miR-100, miR-221, miR-126, miR-130a, miR-222, miR-125b, miR-29a, miR-720, miR-224, miR-29b, miR-1274b, miR-1280, miR-210, miR-140-3p, miR-593, miR-483-3p) を同定し、これらのマイクロRNAのうちmiR-29b-1*, miR-221*, miR-138, miR-584, miR-30aまたはmiR-146aを細胞に導入すると血管新生が抑制され、miR-151-3pまたはmiR-886-3pを細胞に導入すると血管新生は促進されることを見出した。

更に、本発明者等は、SMPD3遺伝子をノックダウンした乳がん細胞をヌードマウスに移植したところ、腫瘍内の血管新生が抑制されかつ、転移能も抑制

されることを見出した。

本発明者等は、これらの知見により、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、SMPD3のsiRNAなどのSMPD3阻害剤等は腫瘍治療剤として有用であり、また、anti-miR-151-3pなどのmiR-151-3p阻害剤やanti-miR-886-3pなどのmiR-886-3p阻害剤も血管形成を阻害すると考えられることから、腫瘍治療剤として有用であるということを見出して本発明を完成させた。

[0009] 即ち、本発明は以下に関する。

[1] 以下の (a) に記載の阻害剤、あるいは (b) に記載の核酸を含有する腫瘍治療剤：

(a) miR-151-3p阻害剤、miR-886-3p阻害剤、またはSMPD3阻害剤、

(b) (1) miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、または配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり且つ標的遺伝子発現抑制活性を有するヌクレオチドを含む核酸、又は(2)上記(1)の核酸を発現し得るベクターである核酸。

[2] miR-151-3p阻害剤が、以下の(1)又は(2)に記載の核酸である、

[1] に記載の剤：

(1) 配列番号9で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-151-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドを含む核酸、

(2) 上記(1)の核酸を発現し得る発現ベクターである核酸。

[3] miR-886-3p阻害剤が、以下の(1)又は(2)に記載の核酸である、

[1] に記載の剤：

(1) 配列番号10で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-886-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドを含む核酸、

(2) 上記(1)の核酸を発現し得る発現ベクターである核酸。

[4] SMPD3阻害剤が、以下の(1)～(5)からなる群より選択される物質である、[1]に記載の剤：

- (1) SMPD3をコードする遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、
- (2) SMPD3をコードする遺伝子の転写産物に対するリボザイム核酸、
- (3) SMPD3をコードする遺伝子の転写産物に対してRNAi活性を有する核酸もしくはその前駆体、
- (4) SMPD3と結合する抗体、
- (5) SMPD3と結合する低分子化合物。

[5] 核酸が一本鎖または二本鎖である、[1]～[4]のいずれかに記載の剤。

[6] 核酸が配列番号1～6、9、10のいずれかで表されるヌクレオチド配列またはその部分配列からなるRNA、あるいはその修飾体である、[1]～[3]のいずれかに記載の剤。

[7] 核酸が配列番号1～6、9、10のいずれかで表されるヌクレオチド配列からなるRNAまたはその修飾体である、[1]～[3]および[6]のいずれかに記載の剤。

[8] 核酸が配列番号9または配列番号54で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖RNAまたはその修飾体である、[2]に記載の剤。

[9] 核酸が、少なくとも1以上の、2'-OMe修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドのいずれかの修飾ヌクレオチドを含む一本鎖RNAである、[8]に記載の剤。

[10] 一本鎖RNAが3個以上のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[9]に記載の剤。

[11] 一本鎖RNAが4個以上のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[9]に記載の剤。

[12] 一本鎖RNAが3から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[9]に記載の剤。

[13] 一本鎖RNAが4から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[9]

記載の剤。

[14] 一本鎖RNAがその5'末端と3'末端の両方に少なくとも1個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[8]～[13]記載の剤。

[15] 全てのヌクレオチドが2'-OMe修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドのいずれかの修飾ヌクレオチドからなる一本鎖RNAである、[8]～[14]記載の剤。

[16] 一本鎖RNAが配列番号：30～38、及び43～50から選択されるいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖RNAである、[10]記載の剤。

[17] 一本鎖RNAが配列番号：43～48および50から選択されるいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖RNAである、[10]記載の剤。

[18] 血管形成を阻害するための、[1]～[17]のいずれかに記載の剤。

[19] 腫瘍血管新生を阻害するための、[1]～[17]のいずれかに記載の剤。

[20] 腫瘍転移を抑制するための、[1]～[17]のいずれかに記載の剤。

[21] 腫瘍が乳がんである、[1]～[20]のいずれかに記載の剤。

[22] miR-151-3pの過剰発現による血管形成異常を抑制するための、[3]および[8]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸。

[23] 腫瘍を治療するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸。

[24] 血管形成を阻害するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸。

[25] 腫瘍血管新生を阻害するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸。

[26] 腫瘍転移を抑制するための、[1]～[17]のいずれかに記載の

阻害剤または核酸。

[27] 腫瘍治療剤を製造するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸の使用。

[28] 血管形成阻害剤を製造するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸の使用。

[29] 腫瘍血管新生阻害剤を製造するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸の使用。

[30] 腫瘍転移抑制剤を製造するための、[1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸の使用。

[31] [1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける腫瘍の治療方法。

[32] [1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける血管形成を阻害する方法。

[33] [1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける腫瘍血管新生を阻害する方法。

[34] [1]～[17]のいずれかに記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける腫瘍転移を抑制する方法。

[35] 被検試料におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルもしくは濃度を測定すること、および該分泌レベルもしくは該濃度と悪性がんとの間の正の相関に基づき、悪性がんの罹患の有無を判定することを含む、がんの判定方法。

[36] がんが、乳がんである[35]記載の方法。

[37] miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR

-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pを特異的に検出し得る核酸プローブを含む、悪性がんを判定するための剤。

[38] がんが、乳がんである [37] 記載の剤。

[39] 以下の工程を含む、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質を探索する方法：

(1) 被検物質とmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌または発現を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を測定し、該分泌量または発現量を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量または発現量と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を上方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質として選択すること。

[40] 以下の工程を含む、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質を探索する方法：

(1) 被検物質とmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌、発現または機能を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を測定し、該分泌量、発現量または機能を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量、発現量または機能と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を下方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質として選択すること。

[41] 配列番号9または配列番号54で表されるヌクレオチド配列からなり、全てのヌクレオチドが2'-OMe修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドのいずれかの修飾ヌクレオチドからなり、且つ、3から12個のLNA修飾

ヌクレオチドを含む、一本鎖RNA。

[42] 一本鎖RNAが4から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[41]記載の一本鎖RNA。

[43] 一本鎖RNAがその5'末端と3'末端の両方に少なくとも1個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、[41]又は[42]記載の一本鎖RNA。

[44] 配列番号：30～38および43～50から選択されるいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる[42]記載の一本鎖RNA。

発明の効果

[0010] 本発明により、腫瘍の血管形成を抑制する剤、特に乳がんにも有効な腫瘍治療剤、および前記剤を利用した医薬を提供することができる。

また本発明により、悪性がんの罹患の有無を判定することができるがんの判定方法、当該判定する方法を実施するための剤、腫瘍の血管形成を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法も提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]SMPD3ノックダウンによる、皮下移植モデルにおける乳がん細胞の転移抑制を示した図である。

[図2]SMPD3ノックダウンは、尾静脈投与モデルにおいては乳がん細胞の転移を抑制しないことを示した図である。

[図3]Anti- mmu-miR-151-3pの細胞内miR-151-3p活性抑制活性の評価結果を示した図である。

[図4]Anti- mmu-miR-151-3pの血清中の安定性評価の結果を示した図である。

[図5]Anti- mmu-miR-151-3pと成熟型miR-151-3pの二本鎖形成能の評価結果を示した図である。

[図6]Anti- mmu-miR-151-3pの分泌型mmu-miR-151-3p活性抑制活性の評価結果を示した図である。

[図7]miR-151-3p過剰分泌細胞の皮下移植モデルにおけるリンパ節転移の評価結果を示した図である。

[図8]miR-151-3p過剰分泌細胞の皮下移植モデルにおける腫瘍血管形成の評価

結果を示した図である。

[図9]miR-151-3pによるDLL4シグナルの抑制を示した図である。

[図10]miR-151-3pがhAkt3 3' UTRベクターを導入したHEK293細胞のルシフェラーゼ活性を抑制することを示した図である。

[図11]hsa-miR-151-3pの導入により内因性のhAkt3タンパク量が減少することを示した図である。

[図12]Akt3遺伝子のノックダウンによりDLL4の発現上昇がキャンセルされることを示した図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0013] 1. 本発明の剤

本発明者等は、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、anti-miR-151-3pなどのmiR-151-3p阻害剤、anti-miR-886-3pなどのmiR-886-3p阻害剤、およびSMPD3阻害剤は腫瘍の血管形成を阻害し、優れた腫瘍治療剤として有用であることを見出した。

即ち、本発明は、

(a) miR-151-3p阻害剤、miR-886-3p阻害剤、またはSMPD3阻害剤、および
(b) (1) miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、もしくは配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり且つ標的遺伝子発現抑制活性を有するヌクレオチドを含む核酸、又は(2)上記(1)の核酸を発現し得る発現ベクターである核酸、
を提供するものである。

本発明の剤は、腫瘍の治療剤として有用であり、特に乳がんに対して有用である。本発明の剤は、血管形成阻害活性を有するために腫瘍の転移を抑制することが期待される。

[0014] 本発明において核酸は、RNA、RNAとDNAのキメラ核酸（以下、キメラ核酸と称する）またはハイブリッド核酸である。ここにおいて、キメラ核酸とは、

一本鎖又は二本鎖の核酸において一本の核酸の中にRNAとDNAを含むことをいい、ハイブリッド核酸とは、二本鎖において、一方の鎖がRNAまたはキメラ核酸でもう一方の鎖がDNAまたはキメラ核酸である核酸をいう。

[0015] 本発明の核酸は、一本鎖または二本鎖である。二本鎖の態様には、二本鎖RNA、二本鎖キメラ核酸、RNA/DNAハイブリッド、RNA/キメラ核酸ハイブリッド、キメラ核酸/キメラ核酸ハイブリッドおよびキメラ核酸/DNAハイブリッドが含まれる。本発明の核酸は、好ましくは一本鎖RNA、一本鎖キメラ核酸、二本鎖RNA、二本鎖キメラ核酸、RNA/DNAハイブリッド、RNA/キメラ核酸ハイブリッド、キメラ核酸/キメラ核酸ハイブリッドまたはキメラ核酸/DNAハイブリッドであり、より好ましくは一本鎖RNA、一本鎖キメラ核酸、二本鎖RNA、二本鎖キメラ核酸、RNA/DNAハイブリッド、キメラ核酸/キメラ核酸ハイブリッドまたはRNA/キメラ核酸ハイブリッドである。

[0016] 本発明の核酸の長さは、哺乳動物（好ましくはヒト）の血管形成を抑制する活性を有する限り、その長さに上限はない。しかし、合成の容易さや抗原性の問題等を考慮すると、本発明の核酸の長さは、例えば約200塩基以下、好ましくは約130塩基以下、より好ましくは約50塩基以下であり、最も好ましくは30塩基以下である。下限としては、例えば15塩基以上、好ましくは、17塩基以上である。すなわち、本発明の核酸の長さは、好ましくは15～50塩基、より好ましくは15～30塩基、さらに好ましくは17～30塩基である。なお、核酸がヘアピンループ型の構造をとることにより二本鎖構造を形成する場合の核酸の長さは、一本鎖の長さとして考えるものとする。

[0017] 本発明の核酸は、細胞内へ取り込まれると血管形成を阻害する活性、特に腫瘍細胞内へ取り込まれると、腫瘍細胞の血管形成を阻害する活性を有する。

[0018] 腫瘍細胞は、通常、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト、好ましくはヒト）の細胞である。腫瘍の種類としては、乳腺がんや乳管がんを含めた乳がん、肺がん、膵臓がん、前立腺がん、骨肉腫、食道がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん、

直腸がん、結腸がん、尿管腫瘍、脳腫瘍、胆嚢がん、胆管がん、胆道がん、腎がん、膀胱がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、睾丸腫瘍、カポジ肉腫、上顎がん、舌がん、口唇がん、口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、筋肉腫、皮膚がんなどの固形がん、骨髄腫、白血病等が例示できる。腫瘍は、具体的には乳がんが好ましい。核酸が細胞の血管形成を抑制する活性を有するか否かは、例えば正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC細胞)や正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HMVEC細胞)の細胞株を用いることにより確認することが出来る。

- [0019] (A) miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、または配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり且つ標的遺伝子発現抑制活性を有するヌクレオチドを含む核酸

miR-29b-1*は、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものが挙げられる。ここでmiR-29b-1*には、miR-29b-1*と同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号1 (miRBaseにAccession No. MIMAT0004514として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-29b-1*とは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

- [0020] miR-221*は、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものを意味する。ここでmiR-221*には、miR-221*と同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号2 (miRBaseにAccession No. MIMAT0004568として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-221*とは、配列番号2で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

- [0021] miR-138は、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものを意味する。ここでmiR-138には、miR-138と同じ配列を有し、ゲ

ノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号3 (miRBaseにAccession No. MIMAT0000430として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-138とは、配列番号3で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

[0022] miR-584は、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものを意味する。ここでmiR-584には、miR-584と同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号4 (miRBaseにAccession No. MIMAT0003249として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-584とは、配列番号4で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

[0023] miR-30aは、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものを意味する。ここでmiR-30aには、miR-30aと同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号5 (miRBaseにAccession No. MIMAT0000087として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-30aとは、配列番号5で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

[0024] miR-146aは、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものを意味する。ここでmiR-146aには、miR-146aと同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号6 (miRBaseにAccession No. MIMAT0000449として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-146aとは、配列番号6で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

[0025] 本発明において、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを含む核

酸は、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列からなるmiRNAが有する当該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列をmRNAに有する標的遺伝子発現抑制活性を有するものであれば限定はない。当該核酸は、好ましくは血管形成を抑制する活性を有する。

本発明において、「標的遺伝子発現抑制活性」は、対象miRNAに相補的なヌクレオチド配列をmRNAに有する標的遺伝子の発現を抑制する活性をいう。一例として、配列番号1で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを含む核酸の場合、標的遺伝子発現抑制活性を有するとは、配列番号1で表されるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列をmRNAに有する標的遺伝子の発現を抑制する活性を有することをいう。当該活性は、例えば、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）の3'末端側に対象miRNAに対して相補的な合成配列を有する発現ベクターと対象miRNAを発現するベクターを共に細胞に導入し、対象miRNAの発現が標的遺伝子の発現に及ぼす影響を、レポータータンパク質（例えば、ルシフェラーゼ）の活性を測定することにより確認することができる（実施例6又は9記載の方法を参照）が、これに限定されるものではなく、標的遺伝子発現抑制活性を評価するために使用される公知の方法であればいずれの方法を用いてもよい。

本発明において、「血管形成を抑制する活性を有する」とは、具体的には、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aと生体条件で（例えば0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 25℃で）ハイブリッドを形成し、且つ血管形成を抑制する活性を有するヌクレオチドを意味する。より具体的には、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる核酸と生体条件で（例えば0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 25℃で）ハイブリッドを形成し、且つ腫瘍細胞内に取り込まれると、該細胞の血管形成を抑制する活性を有するヌクレオチドを意味する。細胞の血管形成を抑制するか否かについては、実施例に記載の方法などの公知の方法で評価することができる。

[0026] 本発明において用いられる「血管形成を抑制する活性を有するヌクレオチ

ド」のヌクレオチド配列は、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する。

[0027] 「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのヌクレオチド配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全ヌクレオチド残基に対する、同一ヌクレオチド残基の割合（%）を意味する。

[0028] 本明細書において、ヌクレオチド配列における同一性は、例えば相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST-2 (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（ギャップオープン=5ペナルティ；ギャップエクステンション=2ペナルティ；x_ドロップオフ=50；期待値=10；フィルタリング=0N）にて2つのヌクレオチド配列をアラインすることにより、計算することができる。

[0029] 配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列としては、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列において1もしくは複数のヌクレオチドが欠失、置換、挿入または付加されたヌクレオチド配列、例えば、(1)配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列中の1～6個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが欠失したヌクレオチド配列、(2)配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列に1～6個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが付加されたヌクレオチド配列、(3)配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列に1～6個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが挿入されたヌクレオチド配列、(4)配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列中の1～6個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチ

ドが他のヌクレオチドで置換されたヌクレオチド配列、または(5)上記(1)～(4)の変異が組み合わせられたヌクレオチド配列（この場合、変異したヌクレオチドの総和が、1～6個（好ましくは1～3個、より好ましくは1または2個））である。

[0030] 配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列は、好ましくは、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列に含まれる連続する15塩基以上（好ましくは17塩基以上、より好ましくは19塩基以上、最も好ましくは20塩基）の部分配列またはそれを含む配列である。

[0031] 天然型の核酸は、細胞中に存在する核酸分解酵素によって容易に分解されるので、本発明の核酸は、各種分解酵素に対して抵抗性となるように修飾し、修飾体としてもよい。本発明の修飾体には、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有し、且つ、前述の標的遺伝子発現抑制活性、又は血管形成を抑制する活性を有するヌクレオチドの範囲で、配列の修飾も含めた各種修飾をされた修飾体が含まれる。修飾体における修飾の例としては、例えば、糖鎖部分が修飾されているもの（例えば、2'-Oメチル化、LNA化）、塩基部分が修飾されているもの、リン酸部分やヒドロキシル部分が修飾されているもの（例えば、ビオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等）を挙げることができるが、これに限定されない。

また、ヌクレオチド鎖の5'末端、3'末端をアミノ基修飾、ポリエチレングリコール修飾、コレステロール修飾等してもよい。

[0032] 本発明の核酸は、5'または3'末端に、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基の長さは、通常5塩基以下である。該付加的塩基は、DNAでもRNAでもよいが、DNAを用いると核酸の安定性を向上させることができる場合がある。このような付加的塩基の配列としては、例えばug-3'、uu-3'、tg-3'、tt-3'、ggg-3'、guuu-3'、gttt-3'、ttttt-3'、uuuuu-3'などの配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0033] 本発明の核酸の好ましい態様としては、成熟型miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146a、それらの前駆体等の核酸を挙げることができる。本発明の核酸の好ましい別の態様としては、成熟型miRNAと同様の活性を有するヌクレオチドを含む核酸、例えば、内在性の成熟型miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aを模倣するように合成され、これらの標的遺伝子発現抑制活性を保持した核酸などを使用することができる。また、市販のものを利用することもできる。例えば、Pre-miR™ miRNA precursor molecule (Applied systems社) が例示できる。

[0034] miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの前駆体とは、細胞内のプロセッシングや、二本鎖核酸の開裂の結果、細胞内において成熟型miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aを生じ得る核酸を意味する。該前駆体としては、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aのpri-miRNAやpre-miRNA等を挙げることができる。pri-miRNAはmiRNA遺伝子の一次転写産物（一本鎖RNA）であり、通常数百～数千塩基程度の長さを有する。pre-miRNAは、pri-miRNAが細胞内プロセッシングを受けることにより生じるヘアピン構造を有する一本鎖RNAであり、通常90～110塩基の長さを有する。

miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aのpri-miRNAやpre-miRNAは公知の分子であり、例えばサンガー研究所が作成しているmiRBaseデータベース：<http://microrna.sanger.ac.uk/>等に開示されている。

[0035] また、ヘアピンループ部分を介して、例えば、配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列（第1の配列）と、その相補配列（第2の配列）とが連結された一本鎖核酸であって、ヘアピンループ型の構造をとることにより、第1の配列が第2の配列と二本鎖構造状の形状を有する核酸も本発明の核酸の好ましい態様の1つである。

[0036] 本発明の核酸は、従来公知の手法を用いて、哺乳動物細胞（ヒト細胞等）から単離することにより、または化学的に合成することにより、または遺伝

子組み換え技術を用いて産生することにより得ることができる。また、適宜市販されている核酸を用いることも可能である。

[0037] (B) 上記 (A) の核酸を発現し得る発現ベクター

本発明の別の具体例として、上記の「miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、または配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり且つ標的遺伝子発現抑制活性を有するヌクレオチドを含む核酸」を発現するように設計されたベクターを、挙げるができる。

本明細書における「発現ベクター」は、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自律的に増殖できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、かつ検出可能なマーカをもつ発現ベクターに、前記プロモーターの制御下に置かれるように本発明の核酸が導入されたものを挙げるができる。

具体的には、pRC/RSV、pRC/CMV(Invitrogen社製)等のプラスミド、ウシパピローマウイルスプラスミドpBPV(Amersham Bioscience社製)、EBウイルスプラスミドpCEP4(Invitrogen社製)等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができる。

[0038] 本明細書における発現ベクターは、本発明の核酸の上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明の核酸を宿主細胞で発現させることが可能な発現ベクターを構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、該発現ベクターが宿主細胞に導入された際に、該宿主細胞において本発明の核酸がプロモーターの制御下に転写され発現するように、当該プロモーターと本発明の核酸とを結合させることを意味する。

ここで用いられるプロモーターは、本発明の核酸が導入される細胞で機能可能なものであればよく、例えばSV40ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター (CMVプロモーター)、ラウス肉腫ウイルスプロモーター (RSVプロモーター)、 β アクチン遺伝子プロモーター、CMV early enhanc

er/chicken beta actin (CAG) プロモーター、SR α プロモーター、Thymidine Kinase (TK) プロモーター、elongation factor-1 α プロモーター、又はマウス乳頭腫ウイルス(MMTV)プロモーター等のpolII系のプロモーターが挙げられるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウスおよびヒトのU6-snRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

発現ベクターに本発明の核酸を導入するために用いられる制限酵素は、宝酒造等から市販されているものを適宜用いればよい。又、このようなプロモーターをマルチクローニング部位の上流に含む市販のベクターを利用してもよい。

一般的には、宿主細胞で機能可能なプロモーターと本発明の核酸とが機能可能な形で結合されてなるDNAを、宿主細胞で利用可能なベクターに組込んで、これを宿主細胞に導入する。宿主細胞において機能可能なプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合には、ベクター保有のプロモーターと本発明の核酸とが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明の核酸を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpRC/RSV、pRC/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明の核酸を挿入し動物細胞へ導入することにより、本発明の核酸を発現させることができる。さらなる高発現を導くことが必要な場合には、本発明の核酸の上流にリボゾーム結合領域を連結してもよい。用いられるリボゾーム結合領域としては、Guarente, L.ら (Cell 1980; 20: 543-53) や谷口ら (Genetics of Industrial Microorganisms, 1982, p202, 講談社) による報告に記載されたものを挙げるができる。

[0039] 本発明の核酸を発現する発現ベクターとして市販のものを利用することもできる。例えば、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aおよび

miR-146aの各前駆体の発現ベクターの市販品として、Precursor miRNA clones カタログNo. HmiR0120-MR01, 04 (miR-29b-1*)、HmiR0369-MR01, 04 (miR-221*)、HmiR0431-MR01, 04 (miR-138)、HmiR0083-MR01, 04 (miR-584)、HmiR0096-MR01, 04 (miR-30a) およびHmiR0087-MR01, 04 (miR-146a) (いずれもGenecopoeia社製)が例示できる。

[0040] (C) miR-151-3p阻害剤

miR-151-3pは、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものが挙げられる。ここでmiR-151-3pには、miR-151-3pと同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (miR-151-3p isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号7 (miRBaseにAccession No. MIMAT0000757として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヒトmiR-151-3p (hsa-miR-151-3p) が挙げられる。すなわち、成熟型miR-151-3pとしては、配列番号7で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAが挙げられる。また、miR-151-3pの具体例として、上記の配列番号7で表されるヌクレオチド配列からなるヒトmiR-151-3pの他、配列番号53 (miRBaseにAccession No. MIMAT0000161として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるマウスmiR-151-3p (mmu-miR-151-3p) 等の他の動物種のオルソログを挙げる事ができる。

[0041] miR-151-3p阻害剤は、miR-151-3pの機能を阻害する物質であれば良く、その作用機序については限定されない。

「miR-151-3pの機能」としては、

(1) miR-151-3pに相補的なヌクレオチド配列をmRNAに有する標的遺伝子の発現を抑制する活性 (以下、miR-151-3pの標的遺伝子発現抑制活性)、または

(2) 細胞の血管形成を促進する活性、

が挙げられる。

miR-151-3pの標的遺伝子発現抑制活性は、例えば、レポーター遺伝子 (例えば、ルシフェラーゼ) の3'末端側にmiR-151-3pに対して相補的な合成配列を有する発現ベクターとmiR-151-3pを発現するベクターを共に細胞に導入し

、miR-151-3pの発現が標的遺伝子の発現に及ぼす影響を、レポータータンパク質（例えば、ルシフェラーゼ）の活性を測定することにより確認することができる（実施例6又は9記載の方法を参照）。また、細胞の血管形成を促進する活性は、例えば、管形成能のある血管内皮細胞（例えば、ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVEC）にmiR-151-3pを発現するベクターを導入し、細胞外マトリックス上での管形成の程度を測定することにより確認することができる（実施例10記載の方法を参照）が、これに限定されるものではなく、血管形成能を評価するために使用される公知の方法であればいずれの方法を用いてもよい。

「miR-151-3pの機能を阻害する」とは、miR-151-3pの上記の機能を抑制する活性を有することを意味し、miR-151-3pの機能を阻害するか否かについては、実施例に記載の方法などの公知の方法で確認することができる。

[0042] miR-151-3p阻害物質としては、具体的には、以下の核酸が例示される。

(a) miR-151-3pの相補鎖配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-151-3pの機能を阻害するヌクレオチドを含む核酸、または

(b) 上記(a)を発現する発現ベクターである核酸。

本発明において、miR-151-3pの相補鎖とは、具体的には、配列番号9で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドが示される。

[0043] 「miR-151-3pの機能を阻害するヌクレオチド」とは、miR-151-3pと生体条件で（例えば0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 25℃で）ハイブリッドを形成し、且つmiR-151-3pの機能を抑制するものを意味する。より具体的には、miR-151-3pと生体条件で（例えば0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 25℃で）ハイブリッドを形成し、且つ腫瘍細胞内に取り込まれると、該細胞におけるmiR-151-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドを意味する。

[0044] 本発明において用いられる「miR-151-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチド」のヌクレオチド配列は、miR-151-3pの相補鎖である配列番号9で表されるヌクレオチド配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好まし

くは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する。具体的には、配列番号54で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドが挙げられる。

[0045] 配列番号9で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列としては、配列番号9で表されるヌクレオチド配列において1もしくは複数のヌクレオチドが欠失、置換、挿入または付加されたヌクレオチド配列、例えば、(1)配列番号9で表されるヌクレオチド配列中の1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが欠失したヌクレオチド配列、(2)配列番号9で表されるヌクレオチド配列に1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが付加されたヌクレオチド配列、(3)配列番号9で表されるヌクレオチド配列に1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが挿入されたヌクレオチド配列、(4)配列番号9で表されるヌクレオチド配列中の1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されたヌクレオチド配列、または(5)上記(1)~(4)の変異が組み合わせられたヌクレオチド配列（この場合、変異したヌクレオチドの総和が、1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個））である。

[0046] 配列番号9で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列は、好ましくは、配列番号9で表されるヌクレオチド配列に含まれる連続する15塩基以上（好ましくは17塩基以上、より好ましくは19塩基以上、最も好ましくは21塩基）の部分配列またはそれを含む配列である。

[0047] 本発明の核酸の具体例としては、例えば、anti-miR-151-3pやmiR-151-3pに対するデコイRNAが挙げられる。

本明細書において「anti-miR-151-3p」とは、miR-151-3pのマイクロRNA活性阻害分子の1形態であり、miR-151-3p配列に対して相補性を持つ核酸をいう。

一般にanti-miRは化学修飾された一本鎖の核酸で、内在性のマイクロRNAに特異的に結合し、その機能を阻害するように設計されている。従って、本発

明のanti-miR-151-3pは、各種分解酵素に対して抵抗性となるように修飾し、修飾体としてもよい。本発明の修飾体には、配列番号9で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有し、且つ、miR-151-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドの範囲で、配列の修飾も含めた各種修飾をされた修飾体が含まれる。

例えば、核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、OR（R=CH₃（2'-O-Me）、F（2'-F）、CH₂CH₂OCH₃（2'-O-MOE）、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

[0048] 核酸の糖部のコンフォメーションはC2'-endo（S型）とC3'-endo（N型）の2つが支配的であり、一本鎖核酸ではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素をメチレン残基を介して架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したLNA（Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004; Singh SK, Nielsen P, Koshkin A, et al. LNA(locked nucleic acids): Synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. Chem Commun. 455, 1998) や2'酸素と4'炭素をエチレン残基を介して架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したEN A（Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003) もまた、好ましく用いられ得る。

また、ヌクレオチド鎖の5'末端、3'末端をアミノ基修飾、ポリエチレングリコール修飾、コレステロール修飾等してもよい。

さらに、リン酸糖エステルの代わりに、ペプチド鎖を骨格として合成された核酸であるPeptide nucleic acid(PNA)なども用いることが出来る(Singh S K, Nielsen P, Koshkin A, et al. LNA(locked nucleic acids): Synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. Chem Commun.455, 1998)。

[0049] 本発明の核酸は、5' または3' 末端に、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基の長さは、通常5塩基以下である。該付加的塩基は、DNAでもRNAでもよいが、DNAを用いると核酸の安定性を向上させることができる場合がある。このような付加的塩基の配列としては、例えばug-3'、uu-3'、tg-3'、tt-3'、ggg-3'、guuu-3'、gttt-3'、ttttt-3'、uuuuu-3'などの配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0050] 例えば、本発明のanti-miR-151-3pは、一本鎖核酸（好ましくは一本鎖RNA）の任意の位置に修飾ヌクレオチド、好ましくは、2'-Oメチル修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドを含んでいてもよく、2個以上の異なる修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。ここで、LNA修飾ヌクレオチドとは、RNAにおいて、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレン基を介して架橋された修飾ヌクレオチドを表す。好ましい形態としては、一本鎖RNAが3個以上（より好ましくは4個以上）、より好ましくは3~12個（より好ましくは4~12個）のLNA修飾ヌクレオチドを含む核酸であり、一本鎖RNAが3個以上のLNA修飾ヌクレオチドを含む一本鎖RNAの場合は、その5'末端と3'末端の両方に少なくとも1個のLNA修飾ヌクレオチドを含む核酸であることが好ましい。また、一本鎖RNAがLNA修飾ヌクレオチドを含む場合、LNA修飾されていない残り全てのヌクレオチドが2'-Oメチル修飾されていることが好ましい。

具体的なanti-miR-151-3pとしては、実施例10に記載の配列番号43~50（好ましくは、配列番号43~48および50）で表されるヌクレオチド配列からなる修飾核酸、および実施例6に記載の配列番号30~38で表されるヌクレオチド配列からなる修飾核酸が挙げられる。

[0051] 本発明のanti-miR-151-3pは、miR-151-3pの配列に基づいてmRNAもしくは初

期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。また、上記した各種修飾を含むanti-miR-151-3pも、いずれも自体公知の手法により、化学的に合成することができる。

[0052] いかなる理論にも拘束されないが、anti-miR-151-3pは、動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト、好ましくはヒト）の細胞または非ヒト動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サルなど）において、標的マイクロRNA（即ち、miR-151-3p）と二本鎖を形成することにより、当該細胞または非ヒト動物において血管形成を促進する機能を発揮し得る当該標的マイクロRNAの量（即ち有効量）を減少させ、その結果、miR-151-3pの機能を阻害すると考えられる。後述の実施例に記載するようにmiR-151-3pが過剰発現すると血管形成異常が引き起こされる。ここでmiR-151-3pの過剰発現は、悪性がん細胞において見られるmiR-151-3pの分泌レベルまたは濃度が正常細胞や良性がん細胞に比べて高い状態であり得る。またmiR-151-3pの過剰発現は、miR-151-3pまたはmiR-151-3p発現ベクターを細胞にトランスフェクションすることによっても引き起こされ得る。anti-miR-151-3pは、そのようなmiR-151-3pの過剰発現による血管形成異常を抑制することができる。

ここでmiR-151-3pの過剰発現による血管形成異常とは、miR-151-3pの過剰発現による血管形成の促進をいう。血管形成の促進は、例えば後述の実施例に記載の方法などの公知の方法により、血管の長さ及び／又は分岐点数の増加等を指標として確認することができる。

[0053] 本明細書において「miR-151-3pに対するデコイRNA」とは、miR-151-3pに部分的に相補的な配列を持ち、かつmiR-151-3pと塩基対を形成後も切断、分解を受けにくい2次構造を持ったRNAをいう。デコイRNAは、標的マイクロRNAと結合することでその機能を阻害する点はanti-miRと同じであるが、その構造がヘアピン型のRNA鎖であり、1分子のデコイRNA中に複数の標的マイクロRNA

結合配列を有する点で、anti-miRと異なる。代表的なデコイRNAとして、対向するマイクロRNA結合配列によりバブル部分が形成されたステムループ構造が挙げられる。マイクロRNA結合配列とステム構造との間に1-5塩基のリンカー配列を挿入することにより、マイクロRNA結合配列と標的マイクロRNAとの結合を容易にすることができる。また、マイクロRNA結合配列として、標的マイクロRNAと完全相補的でない配列（例えば、完全相補的な配列の3' 端から10番目と11番目の塩基の間に4塩基を挿入した配列等）を使用することにより、標的マイクロRNAを含むRISC複合体によるデコイRNAの切断を回避することができる（Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. Haraguchi T, Ozaki Y, Iba H. Nucleic Acids Res. 2009 Apr;37(6) e43）。

[0054] 本発明の核酸は、従来公知の手法を用いて、化学的に合成することにより、または遺伝子組換え技術を用いて産生することにより得ることができる。

[0055] また、本発明の別の具体例として、上記の「(a) miR-151-3pの相補鎖配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-151-3pの機能を阻害するヌクレオチドを含む核酸」を発現するように設計されたベクターを、挙げるることができる。ここで「発現ベクター」としては、上記(B)と同様に、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、検出可能なマーカースをもつ発現用ベクターに、上記(a)の核酸が導入されたものを挙げるができる。尚、プロモーターとして、U6-snRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどのpolIII系プロモーターを使用する場合、anti-miR-151-3pやmiR-151-3pに対するデコイRNAについて前記したリンカー配列や切断回避のためのギャップ配列は、4個以上Uが連続しないように設計すべきである。

[0056] miR-151-3p阻害剤として、市販のものを利用することもできる。anti-miR-151-3pの市販品としてはAnti-miR™ miRNA inhibitor (Applied Biosystems社

製)、miR-151-3pに対するデコイRNAの市販品としてはmiArrest™ miRNA inhibitors (カタログNo. HmiR-AN0211-SN-5, -10, -20 (合成オリゴ), HmiR-AN0211-AM01, 02, 03, 04 (発現ベクター)(いずれもGenecopoeia社製))が例示できる。

[0057] (D) miR-886-3p阻害剤

miR-886-3pは、すでに公知の分子であり、代表的には、成熟型miRNAと呼ばれているものを意味する。ここでmiR-886-3pには、miR-886-3pと同じ配列を有し、ゲノム上の異なる位置に存在するマイクロRNA (miR-886-3p isomer) も含まれる。具体的には、例えば、配列番号8 (miRBaseにAccession No. MI MAT0004906として登録されている) で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドを意味する。成熟型miR-886-3pとは、配列番号8で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖または二本鎖のRNAを意味する。

[0058] miR-886-3p阻害剤は、miR-886-3pの機能を阻害する物質であれば良く、その作用機序については限定されない。

「miR-886-3pの機能」とは、

(1) miR-886-3pに相補的なヌクレオチド配列をmRNAに有する標的遺伝子の発現を抑制する活性 (以下、miR-886-3pの標的遺伝子発現抑制活性)、または

(2) 細胞の血管形成を促進する活性、
を意味する。

「miR-886-3pの機能を阻害する」とは、miR-886-3pの機能を抑制する活性を有することを意味し、miR-886-3pの機能を阻害するか否かについては、実施例に記載の方法などの公知の方法で確認することができる。

[0059] miR-886-3p阻害物質としては、具体的には、以下の核酸が例示される。

(a) miR-886-3pの相補鎖配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-886-3pの機能を阻害するヌクレオチドを含む核酸、または

(b) 上記 (a) を発現する発現ベクターである核酸。

本発明において、miR-886-3pの相補鎖とは、具体的には、配列番号10で表されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチドが示される。

[0060] 「miR-886-3pの機能を阻害するヌクレオチド」とは、miR-886-3pと生体条件で（例えば0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 25℃で）ハイブリッドを形成し、且つmiR-886-3pの機能を抑制するものを意味する。より具体的には、miR-886-3pと生体条件で（例えば0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0) 25℃で）ハイブリッドを形成し、且つ腫瘍細胞内に取り込まれると、該細胞におけるmiR-886-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドを意味する。

[0061] 本発明において用いられる「miR-886-3pの機能を阻害するヌクレオチド」のヌクレオチド配列は、miR-886-3pの相補鎖である配列番号10で表されるヌクレオチド配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する。

[0062] 配列番号10で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列としては、配列番号10で表されるヌクレオチド配列において1もしくは複数のヌクレオチドが欠失、置換、挿入または付加されたヌクレオチド配列、例えば、(1)配列番号10で表されるヌクレオチド配列中の1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが欠失したヌクレオチド配列、(2)配列番号10で表されるヌクレオチド配列に1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが付加されたヌクレオチド配列、(3)配列番号10で表されるヌクレオチド配列に1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが挿入されたヌクレオチド配列、(4)配列番号10で表されるヌクレオチド配列中の1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個）のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されたヌクレオチド配列、または(5)上記(1)~(4)の変異が組み合わされたヌクレオチド配列（この場合、変異したヌクレオチドの総和が、1~6個（好ましくは1~3個、より好ましくは1または2個））である。

[0063] 配列番号10で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌク

レオチド配列は、好ましくは、配列番号10で表されるヌクレオチド配列に含まれる連続する15塩基以上（好ましくは17塩基以上、より好ましくは19塩基以上、最も好ましくは21塩基）の部分配列またはそれを含む配列である。

[0064] 本発明の核酸の具体例としては、例えば、anti-miR-886-3pやmiR-886-3pに対するデコイRNAが挙げられる。

本明細書において「anti-miR-886-3p」とは、miR-886-3pのマイクロRNA活性阻害分子の1形態であり、miR-886-3p配列に対して相補性を持つ核酸をいう。

上記のanti-miR-151-3pと同様、本発明のanti-miR-886-3pは、各種分解酵素に対して抵抗性となるように修飾し、修飾体としてもよい。

本明細書において「miR-886-3pに対するデコイRNA」とは、miR-886-3pに部分的に相補的な配列を持ち、かつmiR-886-3pと塩基対を形成後も切断、分解を受けにくい2次構造を持ったRNAをいう。上記のmiR-151-3pに対するデコイRNAと同様、標的マイクロRNAと完全相補的でない配列（例えば、完全相補的な配列の3'端から10番目と11番目の塩基の間に4塩基を挿入した配列等）を使用することにより、標的マイクロRNAを含むRISC複合体によるデコイRNAの切断を回避することができる。

[0065] また、本発明の別の具体例として、上記の「(a) miR-886-3pの相補鎖配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-886-3pの機能を阻害するヌクレオチドを含む核酸」を発現するように設計されたベクターを、挙げることができる。ここで「発現ベクター」としては、上記(B)と同様に、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、検出可能なマーカースをもつ発現用ベクターに、上記(a)の核酸が導入されたものを挙げるができる。尚、プロモーターとして、U6-snRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどのpolIII系プロモーターを使用する場合、anti-miR-886-3pやmiR-886-3pに対するデコイRNAについて前記したリン

カー配列や切断回避のためのギャップ配列は、4個以上Uが連続しないように設計すべきである。

[0066] miR-886-3p阻害剤として、市販のものを利用することもできる。anti-miR-886-3pの市販品としてはAnti-miR™ miRNA inhibitor (Applied Biosystems社製)、miR-886-3pに対するデコイRNAの市販品としてはmiArrest™ miRNA inhibitors (カタログNo. HmiR-AN0813-SN-5, -10, -20 (合成オリゴ), HmiR-AN0813-AM01, 02, 03, 04 (発現ベクター)(いずれもGenecopoeia社製))が例示できる。

[0067] (E) SMPD3阻害剤

SMPD3阻害剤は、SMPD3の発現を抑制する物質またはSMPD3の機能を抑制する物質であれば良く、その作用機序については限定されない。SMPD3は、エキソソームと呼ばれる膜小胞中のマイクロRNAの分泌を制御することが知られている (J Biol Chem. 2010 Jun 4;285(23):17442-52)。

SMPD3の発現もしくは機能を抑制する物質は、腫瘍血管新生を抑制することによって、腫瘍の転移を抑制するので、腫瘍の治療に有用である。

[0068] SMPD3は、すでに公知の分子であり、中性スフィンゴミエリナーゼ2と呼ばれているものを意味する。SMPD3は、配列番号：12で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。本明細書において、タンパク質およびペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）で記載される。

具体的には、例えば、配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなるヒトタンパク質 (RefSeq No. NP_061137)、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ (例えば、マウス (RefSeq No. NP_067466)、アカゲザル (RefSeq No. XP_001091683)、イヌ (RefSeq No. XP_546863)、ラット (RefSeq No. NP_446057)、ウシ (RefSeq No. NP_001179292) 等)、さらにはそれらのスプライスバリエント、アレル変異体などがあげられる。

SMPD3は、ヒトや他の温血動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ニ

ワトリ、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、MCF7細胞、血管細胞、脳細胞)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織(例えば、乳腺組織、小肺動脈、脳)等から、自体公知のタンパク質分離精製技術により単離・精製されるものであってもよい。

[0069] 「配列番号：12で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列」とは、

(a) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列と約80%以上の相同性を有するアミノ酸配列；

(b) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列において、1~50個のアミノ酸が置換および／または欠失および／または挿入および／または付加されたアミノ酸配列；

(c) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなるヒトタンパク質の他の哺乳動物におけるオルソログのアミノ酸配列；または

(d) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなるヒトタンパク質もしくは上記(c)のオルソログのスプライスバリエント、アレル変異体もしくは多型におけるアミノ酸配列を意味する。

[0070] ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント(好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである)における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合(%)を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸(Phe、Trp、Tyr)、脂肪族アミノ酸(Ala、Leu、Ile、Val)、極性アミノ酸(Gln、Asn)、塩基性アミノ酸(Lys、Arg、His)、酸性アミノ酸(Glu、Asp)、水酸基を有するアミノ酸(Ser、Thr)、側鎖の小さいアミノ酸(Gly、Ala、Ser、Thr、Met)などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない(即ち、保存

的アミノ酸置換である)ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文献に記載されている(例えば、Bowieら, *Science*, 247: 1306-1310 (1990)を参照)。

[0071] 本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; ギャップを許す; マトリクス=BLOSUM62; フィルタリング=OFF)にて計算することができる。アミノ酸配列の相同性を決定するための他のアルゴリズムとしては、例えば、Karlinら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0)に組み込まれている(Altschulら, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997))]、Needlemanら, *J. Mol. Biol.*, 48: 444-453 (1970)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれている]、MyersおよびMiller, *CABIOS*, 4: 11-17 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(version 2.0)に組み込まれている]、Pearsonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448 (1988)に記載のアルゴリズム[該アルゴリズムはGCGソフトウェアパッケージ中のFASTAプログラムに組み込まれている]等が挙げられ、それらも同様に好ましく用いられ得る。

[0072] 上記(a)において、より好ましくは、「配列番号: 12で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列」とは、配列番号: 12で表されるアミノ酸配列と、約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、いっそう好ましくは約97%以上、特に好ましくは約98%以上、最も好ましくは約99%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0073] 「配列番号: 12で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質」は、配列番号: 12で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号: 12で表されるア

ミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質である。

ここで「活性」とは、スフィンゴミエリンのホスホジエステル結合を加水分解する活性をいう。また、「実質的に同質」とは、例えば生理学的に、あるいは薬理的にみて、その性質が定性的に同じであることを意味する。

スフィンゴミエリン加水分解活性の測定は、自体公知の方法に準じて、スフィンゴミエリンを加水分解することで産生されるホスホリルコリン量を測定し、比較することによって行うことができる。例えば、市販のSphingomyelinase Assay kit(Cayman)を用いて測定することが出来る。

[0074] また、本発明におけるSMPD3として、上記(b)に示すとおり、例えば、(i) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列中の1~50個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数(5、4、3もしくは2)個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列に1~50個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数(5、4、3もしくは2)個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列に1~50個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数(5、4、3もしくは2)個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列中の1~50個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数(5、4、3もしくは2)個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、付加、欠失または置換されている場合、その挿入、付加、欠失または置換の位置は、スフィンゴミエリン加水分解活性が保持される限り、特に限定されない。

[0075] 本発明において「SMPD3の発現を抑制する物質」とは、SMPD3をコードするSMPD3遺伝子の転写レベル、転写後調節のレベル、SMPD3への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル等のいかなる段階で作用するものであってもよい。従って、S

MPD3の発現を抑制する物質としては、例えば、SMPD3遺伝子の転写を阻害する物質（例、アンチジーン）、初期転写産物からmRNAへのプロセッシングを阻害する物質、mRNAの細胞質への輸送を阻害する物質、mRNAからSMPD3への翻訳を阻害するか（例、アンチセンス核酸、miRNA）あるいはmRNAを分解する（例、siRNA、リボザイム、miRNA）物質、初期翻訳産物の翻訳後修飾を阻害する物質などが含まれる。いずれの段階で作用するものであっても好ましく用いることができるが、mRNAに相補的に結合してSMPD3への翻訳を阻害するかあるいはmRNAを分解する物質が好ましい。

[0076] SMPD3遺伝子のmRNAからSMPD3への翻訳を特異的に阻害する（あるいはmRNAを分解する）物質として、好ましくは、これらのmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸が挙げられる。

SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と実質的に相補的な塩基配列とは、哺乳動物の生理的条件下において、該mRNAの標的配列に結合してその翻訳を阻害し得る（あるいは該標的配列を切断する）程度の相補性を有する塩基配列を意味し、具体的には、例えば、該mRNAの塩基配列と完全相補的な塩基配列（すなわち、mRNAの相補鎖の塩基配列）と、オーバーラップする領域に関して、約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約97%以上の相同性を有する塩基配列である。

本発明における「塩基配列の相同性」は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=0N；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算することができる。

[0077] より具体的には、SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列としては、(a)配列番号：11で表される塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列、または(b)「配列番号：11で表される塩基配列の相補鎖とストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質と

実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする配列」と、相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列が挙げられる。ここで「実質的に同質の活性」とは前記と同義である。

[0078] ストリンジেন্টな条件とは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999に記載される条件、例えば、6×SSC (sodium chloride/sodium citrate) /45°Cでのハイブリダイゼーション、次いで0.2×SSC/0.1% SDS/50~65°Cでの一回以上の洗浄等が挙げられるが、当業者であれば、これと同等のストリンジエンシーを与えるハイブリダイゼーションの条件を適宜選択することができる。

[0079] SMPD3遺伝子のmRNAの好ましい例としては、配列番号：11で表される塩基配列を含むヒトSMPD3遺伝子 (RefSeq No. NM_018667)、あるいは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ (例えば、マウス (RefSeq No. NM_021491)、アカゲザル (RefSeq No. XM_001091683)、イヌ (RefSeq No. XM_546863)、ラット (RefSeq No. NM_053605)、ウシ (RefSeq No. NM_001192363) 等)、さらにはそれらのスプライスバリエント、アレル変異体、多型などのmRNAがあげられる。

[0080] 「SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列の一部」とは、SMPD3遺伝子のmRNAに特異的に結合することができ、且つ該mRNAからのタンパク質の翻訳を阻害 (あるいは該mRNAを分解) し得るものであれば、その長さや位置に特に制限はないが、配列特異性の面から、標的配列に相補的もしくは実質的に相補的な部分を少なくとも10塩基以上、好ましくは約15塩基以上、より好ましくは約20塩基以上含むものである。

[0081] 具体的には、SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸として、以下の(a)~(c)のいずれかのものが好ましく例示される。

(a) SMPD3遺伝子のmRNAに対するアンチセンス核酸

(b) SMPD3遺伝子のmRNAに対するリボザイム核酸

(c) SMPD3遺伝子のmRNAに対してRNAi活性を有する核酸もしくはその前駆体

[0082] (a) SMPD3遺伝子のmRNAに対するアンチセンス核酸

本発明における「SMPD3遺伝子のmRNAに対するアンチセンス核酸」とは、該mRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸であって、標的mRNAと特異的かつ安定した二重鎖を形成して結合することにより、タンパク質合成を抑制する機能を有するものである。

アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、P

リンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

[0083] 上記の通り、アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、mRNA中の配列だけでなく、SMPD3遺伝子の初期翻訳産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。イントロン配列は、ゲノム配列と、SMPD3遺伝子のcDNA塩基配列とをBLAST、FASTA等のホモロジー検索プログラムを用いて比較することにより、決定することができる。

[0084] 本発明のアンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてSMPD3への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、SMPD3をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題等を考慮すれば、約10～約40塩基、特に約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいが、それに限定されない。具体的には、SMPD3遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域または3'端ヘアピンループなどを、アンチセンス核酸の好ましい標的領域として選択しうるが、それらに限定されない。

- [0085] さらに、本発明のアンチセンス核酸は、SMPD3遺伝子のmRNAや初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるこれらの遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAへの転写を阻害し得るもの（アンチジーン）であってもよい。
- [0086] アンチセンス核酸を構成するヌクレオチド分子は、天然型のDNAもしくはRNAでもよいが、安定性（化学的および／または対酵素）や比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、OR（R=CH₃（2'-O-Me）、F（2'-F）、CH₂CH₂OCH₃（2'-O-MOE）、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。
- [0087] 核酸の糖部のコンフォメーションはC2'-endo（S型）とC3'-endo（N型）の2つが支配的であり、一本鎖核酸ではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素をメチレン残基を介して架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定した核酸誘導体であるLNA（Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004）や2'酸素と4'炭素をエチレン残基を介して架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定した核酸誘導体であるENA（Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003）もまた、好ましく用いられ得る。
- [0088] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、SMPD3遺伝子のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決

定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。また、上記した各種修飾を含むアンチセンス核酸も、いずれも自体公知の手法により、化学的に合成することができる。

[0089] (b) SMPD3遺伝子のmRNAに対するリボザイム核酸

SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸の他の好ましい例としては、該mRNAをコード領域の内部で特異的に切断し得るリボザイム核酸が挙げられる。「リボザイム」とは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイム核酸として最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイム核酸は、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。SMPD3遺伝子のmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

[0090] (c) SMPD3遺伝子のmRNAに対してRNAi活性を有する核酸もしくはその前駆体
本明細書においては、SMPD3遺伝子のmRNAに相補的なオリゴRNAとその相補

鎖とからなる二本鎖RNA、いわゆるsiRNAもまた、SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸に包含されるものとして定義される。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉 (RNAi) と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、この現象が動物細胞でも広く起こることが確認されて以来 [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として汎用されている。

[0091] siRNAは、標的遺伝子のcDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)) の提唱する規則に従って設計することができる。siRNAの標的配列としては、例えばAA+(N)19、AA+(N)21もしくはNA+(N)21 (Nは任意の塩基) 等が挙げられるが、それらに限定されない。標的配列の位置も特に制限されるわけではない。選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて16-17塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 等のホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認する。例えば、AA+(N)19、AA+(N)21もしくはNA+(N)21 (Nは任意の塩基) を標的配列とする場合、特異性の確認された標的配列について、AA (もしくはNA) 以降の19-21塩基にTTもしくはUUの3' 末端オーバーハングを有するセンス鎖と、該19-21塩基に相補的な配列及びTTもしくはUUの3' 末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる二本鎖RNAをsiRNAとして設計してもよい。また、siRNAの前駆体であるショートヘアピンRNA (shRNA) は、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列 (例えば、5-25塩基程度) を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

[0092] siRNA及び/又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Ambionが提供するsiRNA Target Finder (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) 及びpSilencer™ Expression Vector用インサート

デザインツール (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/silencer_converter.html)、RNAi Codexが提供するGeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>) が挙げられるが、これらに限定されない。

[0093] siRNAを構成するリボヌクレオシド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のアンチセンス核酸の場合と同様の修飾を受けていてもよい。

[0094] siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、siRNAの前駆体となるシングルヘアピンRNA (shRNA) を合成し、これをダイサー (dicer) を用いて切断することにより調製することもできる。

[0095] 本明細書においては、生体内でSMPD3遺伝子のmRNAに対するsiRNAを生成し得るようにデザインされた核酸もまた、SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸に包含されるものとして定義される。そのような核酸としては、上記したshRNAやsiRNAを発現するように構築された発現ベクターなどが挙げられる。shRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖を適当なループ構造を形成しうる長さ (例えば5～25塩基程度) のスペーサー配列を間に挿入して連結した塩基配列を含むオリゴRNAをデザインし、これをDNA/RNA自動合成機で合成することにより調製することができる。shRNAを発現するベクターには、タンデムタイプとステムループ (ヘアピン) タイプとがある。前者はsiRNAのセンス鎖の発現カセットとアンチセンス鎖の発現カセットをタンデムに連結したもので、細胞内で各鎖が発現してアニーリングすることにより二本鎖のsiRNA (dsRNA) を形成するというものである。一方、後者はshRNAの発現カセットをベクターに挿入したもので、細胞内でshRNAが発現しdicerによるプロセッシングを受けてdsRNAを形成するというものである。プロモーターとしては、pol I系プロモーター (例えば、CMV前初期プロモーター) を使用することもでき

るが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウスおよびヒトのU6-snrRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

このようにして構築したsiRNAもしくはshRNA発現カセットを、次いでプラスミドベクターやウイルスベクターに挿入する。このようなベクターとしては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターや、動物細胞発現プラスミドなどが用いられる。

[0096] SMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸は、リボソーム、ミクروسフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療に適用されたり、付加された形態で与えられることができうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端または5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができうる。その他の基としては、核酸の3' 端または5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

[0097] これらの核酸のSMPD3発現抑制活性は、SMPD3遺伝子を導入した形質転換体、生体内や生体外のSMPD3遺伝子発現系、または生体内や生体外のSMPD3翻訳

系を用いて調べることができる。

[0098] 本発明におけるSMPD3の発現を抑制する物質は、上記のようなSMPD3遺伝子のmRNAの塩基配列と相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含む核酸に限定されず、SMPD3の産生を直接的または間接的に阻害する限り、低分子化合物などの他の物質であってもよい。そのような物質は、例えば、後述する本発明のスクリーニング方法により取得することができる。

[0099] 本発明において「SMPD3の機能を抑制する物質」とは、いったん機能的に産生されたSMPD3が、血管形成を促進するのを抑制する、マイクロRNAの分泌を抑制する、あるいは腫瘍の転移を抑制する限りいかなるものでもよい。SMPD3の機能を抑制するか否かについては、実施例に記載の方法などの公知の方法で確認することができる。SMPD3の機能を抑制する物質としては、例えば、SMPD3に結合して腫瘍の血管形成を抑制する物質、GW4869 (3,3'-(1,4-Phenylene)bis[N-[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]-2-propenamide]) などのスフィンゴミエリン加水分解を阻害する物質を挙げることができる。

[0100] 具体的には、SMPD3の機能を抑制する物質として、例えば、SMPD3に対する抗体が挙げられる。該抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。これらの抗体は、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。また、該抗体は、標的抗原を特異的に認識し結合するための相補性決定領域 (CDR) を少なくとも有するものであれば特に制限はなく、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール (PEG) 等のタンパク質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。

好ましい一実施態様において、SMPD3に対する抗体はヒトを投与対象とする医薬品として使用されることから、該抗体 (好ましくはモノクローナル抗体) はヒトに投与した場合に抗原性を示す危険性が低減された抗体、具体的に

は、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、マウスーヒトキメラ抗体などであり、特に好ましくは完全ヒト抗体である。ヒト化抗体およびキメラ抗体は、常法に従って遺伝子工学的に作製することができる。また、完全ヒト抗体は、ヒトーヒト（もしくはマウス）ハイブリドーマより製造することも可能ではあるが、大量の抗体を安定に且つ低コストで提供するためには、ヒト抗体産生マウスやファージディスプレイ法を用いて製造することが望ましい。

[0101] SMPD3は腫瘍血管形成を制御することによって、腫瘍の転移、特に、原発巣から血流へのがん細胞の溢出過程において重要な役割を担っているので、SMPD3の機能を抑制する物質は、細胞膜透過性に優れた物質であることが望ましい。したがって、SMPD3の機能を抑制するより好ましい物質は、Lipinski's Ruleに見合った低分子化合物である。そのような化合物は、例えば、後述する本発明のスクリーニング法を用いて取得することができる。

[0102] (1-1) 本発明の核酸、siRNAおよびその前駆体を含有する医薬

本発明の剤は、有効量の上記(A)～(D)のいずれかの核酸または上記(E)のSMPD3の発現を阻害する核酸に加え、任意の担体、例えば医薬上許容される担体を含むことができ、医薬組成物の形態で医薬として適用される。

[0103] 医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリド等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

[0104] 本発明の剤の腫瘍細胞内への導入を促進するために、本発明の剤は更に核酸導入用試薬を含むことができる。該核酸導入用試薬としては、アテロコラーゲン；リポソーム；ナノパーティクル；リポフェクチン、リプフェクタミン(lipofectamine)、DOGS(トランスフェクタム)、DOPE、DOTAP、DDAB、D

HDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンジミン）（PEI）等の陽イオン性脂質等を用いることができる。

[0105] 本発明の剤をアテロコラーゲンに含ませることにより、標的となる腫瘍細胞に、本発明の核酸を効率よく送達し、当該細胞に効率よく取り込ませることができる。

[0106] 本発明の剤は、経口的にまたは非経口的に、哺乳動物に対して投与することが可能であるが、本発明の剤は、非経口的に投与するのが望ましい。

[0107] 非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

非経口的な投与に好適な別の製剤としては、噴霧剤等を挙げることができる。

[0108] 医薬組成物中の本発明の剤の含有量は、例えば、医薬組成物全体の約0.1ないし100重量%である。

[0109] 本発明の剤の投与量は、投与の目的、投与方法、腫瘍の種類、大きさ、投与対象者の状況（性別、年齢、体重など）によって異なるが、成人に注射により局所投与する場合、通常、本発明の核酸の量として $1 \text{ pmol} / \text{kg}$ 以上 $10 \text{ nmol} / \text{kg}$ 以下、全身投与では $2 \text{ nmol} / \text{kg}$ 以上 $50 \text{ nmol} / \text{kg}$ 以下が望ましい。かかる投与量を1～10回、より好ましくは5～10回投与することが望ましい。

[0110] 本発明の剤は、その有効成分である本発明の核酸が腫瘍組織（腫瘍細胞）に送達されるように、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウ

サギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト) に対して安全に投与される。

[0111] (1-2) SMPD3に対する抗体、SMPD3の発現もしくは機能を抑制する低分子化合物等を含有する医薬

SMPD3に対する抗体や、SMPD3の発現もしくは機能を抑制する低分子化合物は、SMPD3の産生または活性を阻害することができる。したがって、これらの物質は、生体内におけるSMPD3の発現もしくは機能を抑制し、腫瘍の血管形成または転移を抑制するので、腫瘍の予防および／または治療剤として使用することができる。

上記の抗体や低分子化合物を含有する医薬は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的(例、血管内投与、皮下投与など)に投与することができる。

[0112] 上記の抗体や低分子化合物は、それ自体を投与してもよいし、または適当な医薬組成物として投与してもよい。投与に用いられる医薬組成物としては、上記の抗体もしくは低分子化合物またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであってもよい。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

[0113] 非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、鼻腔内投与剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、上記本発明の抗体もしくは低分子化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyo

xyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)] 等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

[0114] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

[0115] 上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。抗体や低分子化合物は、投薬単位剤形当たり通常0.1～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mg含有されていることが好ましい。

[0116] 上記の抗体もしくは低分子化合物またはその塩を含有する上記医薬の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、腫瘍の治療・予防のために使用する場合には、抗体もしくは低分子化合物を1回量として、通常0.0001～20mg/kg体重程度、低分子化合物であれば1日1～5回程度、経口または非経口で、抗体であれば1日～数ヶ月に1回、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

[0117] 本発明の剤が適用できる腫瘍としては、例えば、乳がん、肺がん、膵臓が

ん、前立腺がん、骨肉腫、食道がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん、直腸がん、結腸がん、尿管腫瘍、脳腫瘍、胆嚢がん、胆管がん、胆道がん、腎がん、膀胱がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、睾丸腫瘍、カポジ肉腫、上顎がん、舌がん、口唇がん、口腔がん、咽頭がん、喉頭がん、筋肉腫、皮膚がん、網膜芽腫などの固形がん、骨髄腫、白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫、悪性黒色腫、血管腫、真性多血症、神経芽腫等が例示できる。

[0118] 本発明の剤が適用できる腫瘍としては、具体的には、がんが好ましく、乳がんがより好ましい。

本発明の剤は、血管形成を抑制する活性を有するので、本発明の剤をがんの患者、特に乳がん患者に対して投与することにより、腫瘍を治療することができる。また、血管形成を抑制する活性を有するので、腫瘍の転移を抑制できる。

従って、本発明の剤は、腫瘍の治療剤として極めて有用である。

[0119] 2. 本発明の剤と抗腫瘍剤との併用

本発明の核酸と抗腫瘍剤とを併用することによって、腫瘍そのものの増大をより効果的に抑制する効果が得られるため、根治的に腫瘍を治療することができる。従って、本発明は、上述の本発明の核酸と抗腫瘍剤とを併用してなる腫瘍治療剤を提供するものである。

[0120] 本発明の併用剤に使用することのできる抗腫瘍剤としては、特に制限はないが、腫瘍そのものの増殖を抑制する活性を有するものが好ましい。そのような抗腫瘍剤としては、タキサン類等の微小管作用薬だけでなく、代謝拮抗剤、DNAアルキル化剤、DNA結合剤（白金製剤）、抗がん性抗生物質などが挙げられる。具体的には、塩酸アムルピシン、塩酸イリノテカン、イホスファミド、エトポシドラステット、ゲフィニチブ、シクロフォスファミド、シスプラチン、トラスツズマブ、フルオロウラシル、マイトマイシンC、メシル酸イマチニブ、メソトレキサート、リツキサン、アドリアマイシンなどが挙げられる。

[0121] 本発明の核酸と抗腫瘍剤との併用に際しては、本発明の核酸と抗腫瘍剤の

投与時期は限定されず、本発明の核酸と抗腫瘍剤とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。

投与対象としては、好ましくは乳がん患者を挙げることができる。また、投与対象として、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3pまたはmiR-886-3pの分泌レベルが相対的に高いがんの患者が望ましい。

[0122] 本発明の剤の有効成分の投与量は、適用疾患の予防・治療を達成し得る範囲で特に限定されず、上記（1. 本発明の剤）の項で記載した投与量範囲で投与可能である。

[0123] 抗腫瘍剤の投与量は、臨床において当該抗腫瘍剤を単剤で投与する際に採用される投与量に準じて決定することが出来る。

[0124] 本発明の剤と抗腫瘍剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に、本発明の剤と抗腫瘍剤とが組み合わせられていればよい。このような投与形態としては、例えば、

（1）本発明の剤と抗腫瘍剤とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、

（2）本発明の剤と抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、

（3）本発明の剤と抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、

（4）本発明の剤と抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、

（5）本発明の剤と抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与（例えば、本発明の剤→抗腫瘍剤の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）等が挙げられる。

[0125] 本発明の剤と抗腫瘍剤とを併用してなる剤は、上記（1. 本発明の剤）の項の記載に準じ、常法により製剤化することが出来る。本発明の剤と抗腫瘍剤とを別々に製剤化する場合には、抗腫瘍剤の剤型は、臨床において当該抗

腫瘍剤を単剤で投与する際に採用される剤型に準じて選択することが出来る。

[0126] 上述の本発明の剤と抗腫瘍剤をそれぞれ別々に製剤化して併用投与するに際しては、本発明の剤と抗腫瘍剤とを同時期に投与してもよいが、抗腫瘍剤を先に投与した後、本発明の剤を投与してもよいし、本発明の剤を先に投与し、その後で抗腫瘍剤をを投与してもよい。時間差をおいて投与する場合、時間差は投与する有効成分、剤形、投与方法により異なるが、例えば、抗腫瘍剤を先に投与する場合、抗腫瘍剤を含有する製剤を投与した後1分～3日以内、好ましくは10分～1日以内、より好ましくは15分～1時間以内に本発明の剤を投与する方法が挙げられる。本発明の剤を先に投与する場合、本発明の剤を投与した後、1分～1日以内、好ましくは10分～6時間以内、より好ましくは15分～1時間以内に抗腫瘍剤を投与する方法が挙げられる。

[0127] 本発明の併用剤においては、2種以上の抗腫瘍剤を用いてもよい。

本発明の併用剤は、上記（1. 本発明の剤）の項において「本発明の剤が適用できる腫瘍」として詳述されている腫瘍に適用することができる。本発明の併用剤は、具体的には、乳がんに応用するのが好ましい。

[0128] 3. がんの判定方法

本発明は、被検試料におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルもしくは濃度を測定すること、および該分泌レベルまたは該濃度と悪性がんとの間の正の相関に基づき、悪性がんであるかどうかについて判定することを含む、悪性がんを判定する方法を提供するものである。本発明の方法は、特に悪性乳がんの判定に有用である。

本明細書において「悪性がん」とは、良性がんと比較して、腫瘍形成能に富み、転移能力が高いがんをいい、患者の死亡率が高いがんのことを指す。

[0129] 被検試料とは、測定対象者から採取された細胞、血液または組織である。

被検試料は、公知の方法に従って測定対象者から採取することができる。

被検試料は、特に限定されないが、乳腺が好ましく、乳腺細胞がさらに好ましい。

本発明の判定方法においては、被検試料中のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルまたは濃度が測定される。

[0130] 本発明の判定方法において分泌レベルまたは濃度が測定されるmiRNAには、成熟型、pri-miRNAおよびpre-miRNAが含まれるが、好ましくは、これら全ての型の分泌レベルの合計または成熟型の分泌レベル、より好ましくは成熟型の分泌レベルが測定される。

[0131] 例えば、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルまたは濃度は、該miRNAを特異的に検出し得る核酸プローブを用いて、自体公知の方法により測定することが出来る。該測定方法としては、例えば、RT-PCR、ノザンブロットティング、in situ ハイブリダイゼーション、核酸アレイ等を挙げることができる。または、市販のキット（例えば、TaqMan（登録商標）MicroRNA Cells-to-CT™Kit）によっても測定できる。

[0132] miR-29b-1*を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号1で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0133] miR-221*を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号2で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、よ

り好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

[0134] miR-138を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号3で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

[0135] miR-584を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号4で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

[0136] miR-30aを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号5で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

[0137] miR-146aを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号6で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

[0138] miR-151-3pを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号7で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

[0139] miR-886-3pを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号8で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。

- [0140] miR-100を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号13で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。
- [0141] miR-221を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号14で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。
- [0142] miR-126を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号15で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。
- [0143] miR-130aを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号16で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。
- [0144] miR-222を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号17で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。
- [0145] miR-125bを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号18で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げる事が出来る。
- [0146] miR-29aを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号19で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、よ

り好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0147] miR-720を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号20で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0148] miR-224を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号21で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0149] miR-29bを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号22で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0150] miR-1274bを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号23で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0151] miR-1280を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号24で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0152] miR-210を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号25で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0153] miR-140-3pを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号26で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0154] miR-593を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号27で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0155] miR-483-3pを特異的に検出し得る核酸プローブとしては、配列番号28で表されるヌクレオチド配列に含まれる、15塩基以上、好ましくは18塩基以上、より好ましくは約20塩基以上、最も好ましくはその全長の連続したヌクレオチド配列またはその相補配列を含むポリヌクレオチドを挙げることが出来る。

[0156] 核酸プローブは、特異的検出に支障を生じない範囲で付加的配列（検出対象のポリヌクレオチドと相補的でないヌクレオチド配列）を含んでいてもよい。

また、核酸プローブは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（例：¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C、³²P、³³P、³⁵S等）、酵素（例： β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等）、蛍光物質（例：フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等）、発光物質（例：ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等）などで標識されていてもよい。あるいは、蛍光物質（例：FAM、VIC等）の近傍に該蛍光物質の発する蛍光エネルギーを吸収するクエンチャー（消光物質）がさらに結合されていてもよい。かかる実施態様においては、検出反応の際に蛍光物質とクエンチャーとが分離して蛍光が検出される。

[0157] 核酸プローブは、DNA、RNA、キメラ核酸のいずれであってもよく、また、

一本鎖であっても二本鎖であってもよい。核酸プローブまたはプライマーは、例えば、配列番号1～8または13～28で表されるヌクレオチド配列の情報に基づいて、DNA/RNA自動合成機を用いて常法に従って合成することができる。

[0158] 次に、測定されたmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルまたは濃度に基づいて、被検試料が悪性がんであるかどうかについて判定される。

後述の実施例に示すように、正常細胞や良性がん比べ、悪性がん細胞はmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593およびmiR-483-3pの分泌レベルまたは濃度が高い。

したがって、上記判定は、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルまたは濃度と悪性がんとの間の正の相関に基づき行われる。

[0159] 例えば、がんではないがん患者または良性がん患者(ネガティブコントロール)および、悪性がんである患者(ポジティブコントロール)から細胞または組織を採取し、対象患者のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルがポジティブコントロールおよびネガティブコントロールのそれと比較される。あるいは、特定の細胞または組織におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、mi

R-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルと悪性がんとの相関図をあらかじめ作成しておき、対象患者から採取した被検試料における分泌レベルをその相関図と比較してもよい。分泌レベルの比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。

そして、分泌レベルの比較結果より、測定対象のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルが相対的に高い場合には、被検試料が悪性がんである可能性が相対的に高いと判定することができる。逆に、測定対象のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルが相対的に低い場合には、被検試料が悪性がんである可能性が相対的に低いと判定することができる。

[0160] 本発明の剤の治療対象としては、被検試料中のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3pまたはmiR-886-3pの分泌レベルが相対的に高いがんの患者が望ましいため、本発明の方法は患者の選別に有用である。

[0161] また、本発明は、上述のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pを特異的に検出し得る核酸プローブを含む、がんの罹患の有無または悪性度を判定するための剤（以下、「本発明の剤（I）」と呼ぶ。）を提供するものである。本発明の剤（I）は、被検試料の悪性がんの罹患の有無または悪性度を判

定するためのキットであり得る。本発明の剤（ⅠⅠ）を用いることにより、上述の判定方法により容易に被検試料が悪性がんであるかどうか判定することができる。

[0162] 核酸プローブは、通常、水もしくは適当な緩衝液（例：TEバッファー、PBSなど）中に適当な濃度となるように溶解された水溶液の態様で、あるいは該核酸プローブが固相担体上に固定された核酸アレイの態様で、本発明の剤（ⅠⅠ）に含まれる。

[0163] 本発明の剤（ⅠⅠ）は、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの測定方法に応じて、当該方法の実施に必要な他の成分を構成としてさらに含んでもよい。例えば、ノザンブロットティングや核酸アレイを測定に用いる場合には、本発明の剤（ⅠⅠ）は、ブロットティング緩衝液、標識化試薬、ブロットティング膜等をさらに含むことができる。in situ ハイブリダイゼーションを測定に用いる場合には、本発明の剤（ⅠⅠ）は、標識化試薬、発色基質等をさらに含むことができる。

[0164] 4. 腫瘍の血管形成を抑制し得る物質を探索する方法

本発明は、被検物質がmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌もしくは発現を増強するか否かを評価することを含む、血管形成を抑制する物質を探索する方法、並びに当該方法により得られうる物質を提供する。

本発明の探索方法においては、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌または発現を上方制御する物質が、血管形成を抑制する薬剤、すなわち腫瘍の転移を抑制しえる物質又は腫瘍治療剤として選択される。

[0165] 本発明の探索方法は、以下の工程を含む：

(1) 被検物質とmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたは

miR-146aの分泌または発現を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を測定し、該分泌量または発現量を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量または発現量と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を上方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質として選択すること。

[0166] また、本発明は、被検物質がmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌、発現量または機能を抑制するか否かを評価することを含む、血管形成を抑制する物質を探索する方法、並びに当該方法により得られうる物質を提供する。

本発明の探索方法においては、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌または機能を下方制御する物質が、血管形成を抑制する薬剤、すなわち腫瘍の転移を抑制しえる物質または腫瘍治療剤として選択される。

[0167] 本発明の探索方法は、以下の工程を含む：

(1) 被検物質とmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌または発現を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を測定し、該分泌量、発現量または機能を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量、発現量または機能と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を下方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質として選択すること。

[0168] また、本発明は、被検物質がmiR-151-3pの分泌、発現量または機能を抑制するか否かを評価することを含む、VEGFシグナルとそのフィードバックシグナルであるAkt3-DLL4経路とをデュアルに阻害することにより血管形成異常を

抑制する物質を探索する方法、並びに当該方法により得られうる物質を提供する。

本発明の探索方法においては、miR-151-3pの分泌または機能を下方制御する物質が、血管形成異常を抑制する薬剤、すなわち腫瘍の転移を抑制しうる物質または腫瘍治療剤として選択される。

この場合、本発明の探索方法は、さらにAkt3および／またはDLL4の発現量を測定する工程を含んでもよい。Akt3および／またはDLL4の発現量は、例えば、Akt3および／またはDLL4を特異的に認識する抗体等を用いて自体公知の方法により測定することができる。

[0169] 本発明の探索方法は、以下の工程を含む：

(1) 被検物質とmiR-151-3pの分泌または発現を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-151-3pの分泌量、発現量または機能を測定し、該分泌量、発現量または機能を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量、発現量または機能と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-151-3pの分泌量、発現量または機能を下方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成異常を抑制し得る物質として選択すること。

[0170] 本発明の探索方法に供される被検物質は、いかなる公知化合物および新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、ランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0171] 本発明の探索方法において、分泌レベルまたは発現レベルが測定されるマイクロRNA (miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3pまたはmiR-886-3p) には、成熟型、pri-miRNAおよびpre-miRNAが含まれるが、好ましくは、これら全ての型の分泌レベルまたは発現レベルの合計または成熟型の分泌レベルまたは発現レベル、より好ましくは成熟型

の分泌レベルまたは発現レベルが測定される。

[0172] 「分泌または発現を測定可能な細胞」とは、測定対象のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌レベルまたは発現レベルを評価可能な細胞をいう。該細胞としては、測定対象のmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3を天然で分泌または発現可能な細胞が挙げられる。

[0173] 測定対象、即ちmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3を天然で分泌または発現可能な細胞は、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3を潜在的に分泌または発現するものである限り特に限定されず、当該細胞として、哺乳動物（例えばヒト、マウス等）の初代培養細胞、当該初代培養細胞から誘導された細胞株などを用いることができる。miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3を天然で分泌または発現可能な細胞としては、例えば上記（1. 本発明の剤）の項において「本発明の剤が適用できる腫瘍」として詳述されている腫瘍の細胞を挙げることができる。好ましくは、乳がん細胞であり、より好ましくは、悪性乳がん細胞である。

[0174] 被検物質とmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌または発現を測定可能な細胞との接触は、培養培地中で行われる。培養培地は、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌を測定可能な細胞に応じて適宜選択されるが、例えば、約5~20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）などである。培養条件も同様に適宜決定されるが、例えば、培地のpHは約6~約8であり、培養温度は通常約30~約40℃であり、培養時間は約12~約72時間である。

[0175] miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-

3p、miR-886-3p またはSMPD3の分泌量または発現量の測定は、（2. がんを判定する方法）の項で述べた方法などの公知方法に従い行うことができる。

SMPD3の機能レベルの測定は、（1. 本発明の剤）の項で述べた公知のSMPD3の機能を評価することにより測定することができる。

[0176] 分泌量または発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれ得る。なお、被検物質を接触させない対照細胞におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量または発現量は、被検物質を接触させた細胞におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量または発現量の測定に対し、事前に測定した分泌量または発現量であっても、同時に測定した分泌量または発現量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した分泌量または発現量であることが好ましい。

[0177] そして、比較の結果得られたmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を上方制御する物質、あるいはmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を下方制御する物質が、血管形成を抑制し得る物質、特に腫瘍の血管形成を阻害し得る物質、あるいは腫瘍の転移を抑制し得る物質として選択される。

[0178] 本発明の探索方法で得られる化合物は、新たな腫瘍の治療剤の開発のための候補物質として有用である。

[0179] 尚、本願の配列表において、ヌクレオチド配列を便宜的にRNAの配列を用いて記載したが、これは、該配列番号により特定された核酸がRNAのみを示すことを意味するものではなく、適宜U（ウラシル）をT（チミン）と読み替えることにより、DNAやキメラ核酸のヌクレオチド配列をも示すものであることを理解すべきである。

実施例

[0180] 以下に本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例になんら限定されるものではない。

[0181] 参考例1 ホタルルシフェラーゼ安定発現4T1細胞(4T1-Luc細胞)の作製

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むpNeoLuc 1 μ gを、LipofectamineLTXキット (Invitrogen社) を用いて、当該試薬キットに添付される手順書に従って、1 \times 10⁶個/ウェル (6穴プレート) の濃度で播種したマウス乳ガン細胞株である4T1細胞(ATCC社CRL-2539)に導入した。翌日、培地を0.5mg/mL Genetic in(Invitrogen社)を含む10%FBS/RPMI培地(Invitrogen社)に交換し、2週間培養を続けることで、安定発現細胞を選択した。複数の安定発現細胞のホタルルシフェラーゼ活性をBright Glo反応液(Promega社)、Envision 2101 Multilabel Reader(Wallac社製)を用いて測定し、最も活性の強い細胞を選抜した。その結果、10,000個の細胞当たり、約3,000RLUの発光量を示す細胞を樹立することができた。これ以降、当該細胞株をホタルルシフェラーゼ安定発現4T1細胞(4T1-luc細胞)として使用した。

[0182] 参考例2 SMPD3ノックダウン4T1-luc細胞の作製

マウスSMPD3遺伝子のsiRNA(GTACATCCTGTATGATGTT)を含むプラスミドpBAsi-mU6 Pur(宝バイオ TA0715-1-C) 1 μ gを、LipofectamineLTXキット (Invitrogen社) を用いて、当該試薬キットに添付される手順書に従って、1 \times 10⁶個/ウェル (6穴プレート) の濃度で播種した実施例1記載の方法で樹立した4T1-luc細胞に導入した。翌日、培地を2 μ g/mL Puromycin(Invitrogen社)を含む10%FBS/RPMI培地(Invitrogen社)に交換し、2週間培養を続けることで、安定発現細胞を選択した。複数の安定発現細胞のマウスSMPD3遺伝子の発現量をマウスSMPD3 TaqMan Reagent(Applied Biosystems社)を用いて定量した。まず、安定発現細胞からtotal RNAをRNeasy mini kit(Qiagen社)を用いて調製した。次に、当該total RNAを基にHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems社)を用いてcDNA合成を行った。すなわち、0.5 μ gのtotal RNA、1.0 μ L 10 \times RTバッファー、0.4 μ L 25 \times dNTP、1.0 μ L 10 \times RT Primer、0.5 μ L Transcriptase、0.5 μ L RNase Inhibitorを混合し、蒸留水にて10 μ Lにメスアップし、25 $^{\circ}$ C 10分間、37 $^{\circ}$ C 2時間、85 $^{\circ}$ C 5秒間の保温工程を行うことで、cDNA合成を行った。次に、当該cDNAを鋳型としてTaqMan RT-P

CR反応を行った。すなわち、2.25 μ Lの当該cDNA溶液、5 μ Lの Platinum qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen社)、0.5 μ LのmSMPD3 TaqMan reagent (Applied Biosystems社)若しくは、マウス β -actin TaqMan reagent (Applied Biosystems社)を混合し、蒸留水にて10 μ Lにメスアップした。当該反応液をABI7300(Applied Biosystems社)を用いて、95°C2分間保温した後、95°C 15秒間、60°C 30秒間の保温サイクルを45回繰り返すことで、マウスSMPD3とマウス β -actinの定量を行った。そして、各安定発現細胞株のマウスSMPD3発現量 \div マウス β -actin発現量を計算し、当該計算値が最も高かった安定発現細胞株(4T1-luc mSMPD3 KD細胞)を以下の実験に使用した。

[0183] 実施例1 SMPD3ノックダウンの皮下移植モデルにおける転移アッセイに対する効果

5匹の7週齢のメスBalb/c athymic nude miceの両鼠径部皮下にPBSに懸濁した 1×10^6 個の4T1-luc mSMPD3 KD細胞を移植した。なお、コントロール群として 1×10^6 個の4T1-luc 細胞を移植したBalb/c athymic nude miceを用いた。移植14日後、生体イメージングを用いてマウスから摘出した肺のルシフェラーゼ活性を測定したところ、4T1-luc mSMPD3 KD細胞を移植したマウスの肺転移はコントロール群と比較して、著しく減少していることが分かった(図1)。

[0184] 実施例2 SMPD3ノックダウンの尾静脈投与モデルにおける転移アッセイに対する効果

5匹の7週齢のメスBalb/c athymic nude miceの尾静脈からPBSに懸濁した 1×10^6 個の4T1-luc mSMPD3 KD細胞を移植した。なお、コントロール群として 1×10^6 個の4T1-luc 細胞を移植したBalb/c athymic nude miceを用いた。移植26日後、生体イメージングを用いてマウスから摘出した肺のルシフェラーゼ活性を測定したところ、4T1-luc mSMPD3 KD細胞を移植したマウスの肺転移はコントロール群と同程度であることが分かった(図2)。このことから、SMPD3ノックダウン4T1-luc細胞は原発巣から血流への溢出の過程が抑制されていることが示唆された。

[0185] 実施例3 SMPD3ノックダウンの皮下移植モデルにおける腫瘍血管形成に対する効果

4T1-luc mSMPD3 KD細胞移植後20日経過したBalb/c athymic nude miceの鼠径部の腫瘍塊を摘出し、ホルマリン固定した。その後、5 μ mのパラフィン包埋切片を以下の手順で血管内皮特異的タンパク質であるCD31に対する抗体(Rabbit polyclonal to CD31 ab28364(Abcam社))を用いて免疫染色を行うことで、腫瘍血管の形成能を評価した。なお、コントロール群として4T1-luc 細胞を移植したBalb/c athymic nude miceの鼠径部の腫瘍塊を用いた。まず、当該切片を5分間、3回キシレンで洗浄した後、99.5%エタノール、80%エタノール、70%エタノールの順に5分間洗浄を行った。更に、蒸留水で5分間、3回洗浄した後、流水中に10分間浸漬した。続いて、蒸留水にて5分間、3回洗浄した後、0.5 M トリスバッファ (pH=10) 中で121 $^{\circ}$ C、5分間オートクレーブを行った。その後、30分間室温で放置することにより冷却した後、蒸留水で5分間、3回の洗浄、更に続けてTBS-T溶液(0.05M トリス、0.3M NaCl、0.1% Tween20水溶液)で5分間、2回洗浄した。スーパーパップペンで組織を囲んだ後、Image-iT Ex Signal Enhancer (Molecular probe社)中に室温、30分間浸漬した。TBS-T溶液で洗浄した後、Dako Protein Block (Dako社)中に室温、20分間浸漬した。そして、Dako Real Antibody Diluent (Dako社)で50倍希釈したRabbit polyclonal to CD31(Abcam社)と室温、30分間反応させた。5分間、3回TBS-T溶液による洗浄を行った後、Dako Real Antibody Diluentで1000倍希釈したAlexa Flour 488 Goat Anti-rabbit IgG (Molecular probe社)と室温、30分間反応させた。5分間、3回TBS-T溶液による洗浄を行った後、Vector Shield Mounting Medium with DAPI (Hard Type)(VECTOR社)を用いて封入した。なお、ネガティブコントロールとしてRabbit polyclonal to CD31に変えて、Negative Control Rabbit Immunoglobulin fraction(Dako社)を用いて上記操作を行った切片を用いた。上述した方法で染色した切片をSuper high pressure mercury lamp power supplyを接続した蛍光顕微鏡(ニコン ECLIPSE TE300)を用いて励起波長505nm、蛍光波長520nmにより蛍光画像を取得した。得られ

た画像を基に、単位面積当たりの蛍光量をACT-1C for DXM1200Cにより計測したところ、4T1-luc mSMPD3 KD腫瘍塊の蛍光発光量はコントロールの58%であることが分かった。以上の結果から、腫瘍中のSMPD3の発現量を抑制することで、腫瘍血管の形成が阻害されることが分かった。

[0186] 実施例4 MDA-MB-231細胞、MCF-7細胞、MCF-10A細胞のマイクロRNA分泌量比較解析

MDA-MB-231細胞はヒト乳がんより単離された細胞株であり、エストロゲン感受性を失った悪性度の高い乳がんのモデルとして利用され、リンパ節等へ転移することが知られている。一方、MCF-7細胞はエストロゲン感受性の乳がん細胞であり、悪性度は低く転移能も認められない。MCF-10A細胞は乳腺上皮由来細胞であり、腫瘍形成能を持たない正常細胞として知られている (Soule HD et al. Cancer Research 50: 6075-6086, 1990)。

MDA-MB-231細胞、MCF7細胞およびMCF-10A細胞(全てATCC社より購入)をRPMI培地にウシ胎児血清(FBS)を10%添加した培地を用いて培養し、 1×10^6 個の細胞あたり1fmolの合成Cel-miR-39(miScript miRNA Mimic: QIAGEN社製)を添加した後、マイクロRNAをRNeasy mini kit(キアゲン社)を用いてキット添付のプロトコールに従って抽出した。次に、得られたマイクロRNAを鋳型としてTaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems社)及びmiR-100 TaqMan MicroRNA Assay、miR-29b-1* TaqMan MicroRNA Assay、miR-221* TaqMan MicroRNA Assay、miR-221 TaqMan MicroRNA Assay、miR-146a TaqMan MicroRNA Assay、miR-126 TaqMan MicroRNA Assay、miR-130a TaqMan MicroRNA Assay、miR-222 TaqMan MicroRNA Assay、miR-125b TaqMan MicroRNA Assay、miR-29a TaqMan MicroRNA Assay、miR-720 TaqMan MicroRNA Assay、miR-224 TaqMan MicroRNA Assay、miR-29b TaqMan MicroRNA Assay、miR-1274b TaqMan MicroRNA Assay、miR-1280 TaqMan MicroRNA Assay、miR-210 TaqMan MicroRNA Assay、miR-138 TaqMan MicroRNA Assay、miR-584 TaqMan MicroRNA Assay、miR-140-3p TaqMan MicroRNA Assay、miR-30a TaqMan MicroRNA Assay、miR-151-3p TaqMan MicroRNA Assay

ay、miR-886-3p TaqMan MicroRNA Assay、miR-593 TaqMan MicroRNA Assay、miR-483-3pTaqMan MicroRNA Assay、Cel-miR-39 TaqMan MicroRNA Assay(すべてApplied Biosystems社製)を用いて逆転写反応を行った。即ち、マイクロRNA溶液 3.3 μ L、100mM dNTPs (with dTTP) 0.05 μ L、MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μ L) 0.33 μ L、10 \times Reverse Transcription Buffer 0.5 μ L、RNase Inhibitor (20U/ μ L) 0.063 μ L、Nuclease-free water 1.387 μ L、TaqMan MicroRNA Assay (5 \times) 1 μ Lを混合し、16 $^{\circ}$ C 30分間、42 $^{\circ}$ C 30分間、85 $^{\circ}$ C 5分間の保温を行った。続いて、当該反応液の3倍希釈液 4.5 μ L、TaqMan MicroRNA Assay (20 \times) 0.5 μ L、TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNGa(Applied Biosystems社) 5 μ Lを混合し、95 $^{\circ}$ C 10分間の保温後、95 $^{\circ}$ C 15秒間、60 $^{\circ}$ C 1分間の保温サイクルを40回繰り返すPCR反応を7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems社)を用いて行うことにより、各マイクロRNAのMDA-MB-231細胞、MCF-7細胞、MCF-10A細胞における分泌量を定量した。

その結果、表1に示される通り、これら24種類のマイクロRNAの分泌量はMCF7細胞、MCF-10A細胞と比較してMDA-MB-231細胞において有意に増加していることが分かった。

[0187]

[表1]

	倍率 ¹⁾	倍率 ²⁾
	MM231/MCF7	MM231/MCF10A
hsa-miR-100	247	6
hsa-miR-29b-1*	∞	3
hsa-miR-221*	84	5
hsa-miR-221	1607	5
hsa-miR-146a	29738	249
hsa-miR-126	3	6
hsa-miR-130a	6654	2
hsa-miR-222	771	3
hsa-miR-125b	44	3
hsa-miR-29a	182	2
hsa-miR-720	2	7
hsa-miR-224	4124	4
hsa-miR-29b	20	6
hsa-miR-1274b	2	18
hsa-miR-1280	2	13
hsa-miR-210	12	3
hsa-miR-138	20738	5
hsa-miR-584	118	12
hsa-miR-140-3p	12	21
hsa-miR-30a	3	7
hsa-miR-151-3p	4	2
hsa-miR-886-3p	86	133
hsa-miR-593	16	2
hsa-miR-483-3p	7	9

1) MM231/MCF7は、MDA-MB-231細胞における分泌量をMCF-7細胞における分泌量で除した値である。

2) MM231/MCF10Aは、MDA-MB-231細胞における分泌量をMCF-10A細胞における分泌量で除した値である。

[0188] 実施例5 マイクロRNAの血管新生阻害活性の評価

100 μ Lの実施例4記載のpre-miR(Applied Biosystems社)と100 μ L OPTI-MEMの混合液と、4 μ L DharmaFECT1(Thermo Scientific社)と196 μ L OPTI-MEMの混合液を、室温で混ぜ合わせた後、30分間静置した。次いで、6穴プレートに当該混合液を加えた後、2mLの内皮細胞添加因子セット-2(Lonza社)を添加した内皮細胞基本培地-2(Lonza社)に懸濁した 1×10^6 個の正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC細胞) (Lonza社)を添加することでマイクロRNAのトランスフェク

ションを行った。翌日、24穴プレートに氷上にて融解したECM gel from Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma(シグマ社)を1穴当たり120 μ L分注し、CO₂ インキュベータ内で、30分間静置することで、ゲルを固化した。次に、前日にトランスフェクションした 2×10^5 個/mL のHUVEC細胞を各ウェル500 μ L分注した。なお、コントロール細胞として、NC1 control miRNA(Applied Biosystems社)をトランスフェクションした細胞を用いた。翌日、血管新生能を評価するために、各ウェルの血管新生の様子を顕微鏡(Nikon ECLIPSE TE200)にて50倍の倍率の写真を撮影した。更に、当該写真中の一定面積当たりの血管長、分岐点数を画像解析ソフトImageJを用いて計測した。

表2に、コントロール細胞に対する各マイクロRNAを導入した細胞が形成した血管長、分岐点数の相対値を%表示で、促進、抑制の評価結果を+(促進活性)、-(抑制活性)の数で示す。+、-の記号の数が多いほど活性が強いことを示す。なお、空欄は促進、阻害いずれの活性も示さなかったことを表す。

その結果、血管新生を促進するマイクロRNAとしてmiR-151-3p、miR-886-3pを、抑制するマイクロRNAとしてmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146aを同定した。miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aおよびmiR-146aは血管新生を抑制するので、腫瘍治療剤として有用であることが判明した。一方で、miR-151-3pとmiR-886-3pは血管新生を促進するため、anti-miR-151-3p等のmiR-151-3p阻害剤やanti-miR-886-3p等のmiR-886-3p阻害剤は血管新生を抑制すると考えられ、腫瘍治療剤として有用であることが判明した。

[0189]

[表2]

	最終濃度(nM)	長さ(%)	分岐点数(%)	評価
hsa-miR-29b-1*	10	0	0	---
	1	77	85	-
	0.1	101	122	
hsa-miR-221*	10	0	0	---
	1	0	0	---
	0.1	129	143	
hsa-miR-138	10	0	0	---
	1	87	70	-
	0.1	78	48	-
hsa-miR-584	10	0	0	---
	1	0	0	---
	0.1	78	59	-
hsa-miR-886-3p	10	167	237	+++
	1	129	144	++
	0.1	95	100	
hsa-miR-30a	10	0	0	---
	1	0	0	---
	0.1	111	111	
hsa-miR-151-3p	10	158	239	+++
	1	114	139	+
	0.1	112	96	
hsa-miR-146a	10	0	0	---
	1	28	9	--
	0.1	79	70	-

[0190] 実施例6 Anti- mmu-miR-151-3pの細胞内miR-151-3p活性抑制活性の評価

miR-151-3pに対するAnti-miRオリゴヌクレオチドの効果を確認するために、配列番号53で表されるヌクレオチド配列からなるマウスmiR-151-3p (mmu-miR-151-3p) に対して完全に相補的で、化学修飾が異なる12種類のAnti- mmu-miR-151-3pオリゴヌクレオチドを、ジーンデザイン社にて合成した(表3)。表3の配列において、下線部はLNA修飾を施した核酸であり、非下線部は2'-O-Me修飾を施した核酸であることを示している。

[0191]

[表3]

名称	配列 (5' →3')	配列番号
mmu-0mer LNA	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	29
mmu-21mer LNA	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	30
mmu-12mer LNA	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	31
mmu-6mer LNA	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	32
mmu-5mer LNA-1	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	33
mmu-5mer LNA-2	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	34
mmu-4mer LNA-1	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	35
mmu-4mer LNA-2	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	36
mmu-3mer LNA-1	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	37
mmu-3mer LNA-2	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	38
mmu-2mer LNA-1	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	39
mmu-1mer LNA-1	CCUCAAGGAGCCUCAGUCUAG	40

[0192] 0.01 μ gのmiR-151-3p sensor vector (SwitchGear Genomics miRNA Synthetic Target)、0.01 μ gのmmu-miR-151-3p発現プラスミド(宝バイオ microRNA Archive Mouse ver.1)及び、所定の量の各種anti- mmu-miR-151-3pを0.25 μ gのLipofectamine2000を含む20 μ LのOPTI-MEM培地と混合し、96ウェルプレートに 5×10^4 個のHEK293細胞と共に加えた。microRNA sensor vectorとは、microRNAが標的mRNAと結合する際に重要な働きをするシード配列と相補的な配列を、海しいたけルシフェラーゼ遺伝子の3' UTR領域に繰り返して挿入したプラスミドベクターをいう。任意のマイクロRNAに対するsensor vectorを細胞に導入し、当該細胞のルシフェラーゼ活性を測定することで、細胞内のそのマイクロRNAの活性を評価することが出来る。翌日、ホタルルシフェラーゼ及び、海しいたけルシフェラーゼの活性測定(Dual-Glo™ Luciferase Assay System:Promega)を行なった。海しいたけルシフェラーゼ活性をホタルルシフェラーゼ活性で除した値が小さいほど、マイクロRNA活性が高いことを表してい

る。その結果、3mer以上のLNA修飾を施すことで細胞内miR-151-3p活性抑制効果が認められ、4mer以上のLNA修飾を施すことで細胞内miR-151-3p活性抑制効果がプラトーに達することが分かった(図3)。

[0193] 実施例7 Anti- mmu-miR-151-3pの血清中の安定性評価

100pmolの各種anti- mmu-miR-151-3pを25% FBS水溶液中で所定の期間、37℃で保温した後、以下の手法でアクリルアミドゲル電気泳動解析を行ない、安定性の評価を行なった。XCell SureLock Mini-Cell(invitrogen社)に15% TBE-Urea Gel 12well(invitrogen社CatNo:EC68852BOX)をセットし、1×TBE Running Buffer(10×TBE Running Buffer(invitrogen社)を蒸留水で希釈)を注いだ。20μL(核酸100pmol量)のサンプルをロードした後、180V、90分間電気泳動した。次に、電気泳動したゲルを0.025% Stains-all液(sigma社)(4%ホルムアミド溶液の25%イソプロパノール水溶液希釈液)中で60分間振とうした。当該染色液を除き、水道水で1~2時間脱色してから、LAS2000(富士フィルム)で写真撮影した。その結果、3mer以上のLNA修飾を施すことで血清中安定性向上効果が認められ、4mer以上のLNA修飾を施すことで血清中安定性向上効果がプラトーに達することが分かった(図4)。また、同じく3merのLNA修飾を施したanti-miRオリゴヌクレオチド(mmu-3mer LNA-1(図4の3mer-1に該当)およびmmu-3mer LNA-2(図4の3mer-2に該当))でも、5'末端と3'末端の両方(5'末端の2mer、3'末端の1mer)にLNA修飾を施したmmu-3mer LNA-2の方が、片方の末端(5'末端の3mer)のみにLNA修飾を施したmmu-3mer LNA-1よりも血清中安定性向上効果が高かった。

[0194] 実施例8 Anti- mmu-miR-151-3pと成熟型miR-151-3pの2本鎖形成能の評価

100pmolの各種anti- mmu-miR-151-3pと等量の成熟型miR-151-3pを混合した後、70℃で5分間保温した後、室温に戻すことで、anti- mmu-miR-151-3pとmiR-151-3pの2本鎖形成を行なった。次いで、実施例7記載の方法でアクリルアミドゲル電気泳動解析を行ない、2本鎖核酸と1本鎖核酸を分離し、2本鎖形成能を評価した。その結果、4mer以上のLNA修飾を施すことで2本鎖形成能向上効果が明確に認められた(図5)。

[0195] 実施例9 Anti- mmu-miR-151-3pの分泌型mmu-miR-151-3p活性抑制活性の評価

5 μ gのmmu-miR-151-3p発現プラスミドを、前日に 5×10^6 個/ T-75フラスコの濃度で播種したHEK293細胞にLipofectamine2000を用いてトランスフェクションした。翌日、細胞をPBSで洗浄した後、15mLのAdvanced-RPMI培地を添加し、2日後培養上清を回収した。当上清を0.2 μ mフィルターでろ過することで、分泌型mmu-miR-151-3pを得た。

0.01 μ gのmiR-151-3p sensor vectorを0.25 μ gのLipofectamine2000を含む20 μ LのOPTI-MEM培地と混合し、96ウェルプレートに 5×10^4 個のHEK293細胞と共に加えた。翌日、培地を除去した後、上述した方法で得られた分泌型mmu-miR-151-3pを100 μ L添加し、更に図6に記載の量の各種anti- mmu-miR-151-3pを加えた。翌日、実施例6記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定し、各ウェルのマイクロRNA活性を評価したところ、3mer以上のLNA修飾を施すことで分泌型マイクロRNA活性抑制効果が認められ、4mer以上のLNA修飾を施すことで分泌型マイクロRNA活性抑制効果がプラトーに達することが分かった(図6)。

[0196] 実施例10 Anti- hsa-miR-151-3pの分泌型hsa-miR-151-3pによる血管形成の抑制活性の評価

配列番号7で表されるヌクレオチド配列からなるヒトmiR-151-3p (hsa-miR-151-3p) に対して完全に相補的で、化学修飾が異なる12種類のAnti-hsa-miR-151-3pオリゴヌクレオチドを、ジーンデザイン社にて合成した(表4)。表4の配列において、下線部はLNA修飾を施した核酸であり、非下線部は2' -OMe修飾を施した核酸であることを示している。

[0197]

[表4]

名称	配列 (5' → 3')	配列番号
hsa-0mer LNA	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	41
hsa-21mer LNA	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	42
hsa-12mer LNA	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	43
hsa-6mer LNA	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	44
hsa-5mer LNA-1	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	45
hsa-5mer LNA-2	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	46
hsa-4mer LNA-1	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	47
hsa-4mer LNA-2	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	48
hsa-3mer LNA-1	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	49
hsa-3mer LNA-2	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	50
hsa-2mer LNA-1	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	51
hsa-1mer LNA-1	<u>CCUCAAGGAGCUUCAGUCUAG</u>	52

[0198] 1×10^6 個の正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC細胞) (Lonza社)を、内皮細胞添加因子セット-2(Lonza社)を添加した内皮細胞基本培地-2(Lonza社)に懸濁し、6穴プレートで1日間培養した。翌日、培地を除去し、mmu-miR-151-3p発現プラスミドに変えて、hsa-miR-151-3p発現プラスミドを用いて、実施例9記載の方法で調製した分泌型miR-151-3pを1mL添加した後、100nmolの各種anti-hsa-miR-151-3pを加え、更に1日培養した。

24穴プレートに氷上にて融解したECM gel from Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma(シグマ社)を1穴当たり120 μ L分注し、CO₂インキュベータ内で、30分間静置することで、ゲルを固化した。次に、上記処理を施した 2×10^5 個/mLのHUVEC細胞を各ウェル500 μ L分注した。翌日、血管新生能を評価するために、各ウェルの血管新生の様子を顕微鏡(Nikon ECLIPSE TE200)にて50倍の倍率の写真を撮影した。更に、当該写真中の一定面積当たりの血管長、分岐点数を画像解析ソフトImageJを用いて計測した。

表3に、コントロール細胞に対する各anti-hsa-miR-151-3pを導入した細胞が形成した血管長、分岐点数の相対値を%表示で示す。その結果、4merから12merのLNA修飾を施したanti-hsa-miR-151-3pが、分泌型hsa-miR-151-3pによる血管形成活性の抑制効果を有することが判明した(表5)。また、3merのLNA修飾を施した2個のanti-miR-151-3p (hsa-3mer LNA-1およびhsa-3mer LNA-2)の内、5'末端および3'末端の両末端にLNA修飾を施したhsa-3mer LNA-2においては、血管形成抑制効果が認められた。21mer全てにLNA修飾を施したものも含め、それ以外の修飾anti-miR-151-3pでは、本試験条件においては抑制効果は認められなかった。miR-151-3pはがん細胞由来分泌型マイクロRNAであることから、in vitroで血管形成に対する抑制効果を示した上記の修飾Anti-miR-151-3pは、がん細胞から分泌された細胞外miR-151-3pに対しても同様に結合し、in vivoにおいても血管形成に対する抑制効果を発揮することが可能であると考えられる。

[0199] [表5]

	長さ(%)	分岐点数(%)	抗miR-151-3p効果の評価
21mer	142	244	-
12mer	87	143	+++
6mer	95	155	+++
5mer-1	126	179	++
5mer-2	111	172	++
4mer-1	139	215	+
4mer-2	126	215	+
3mer-1	156	237	-
3mer-2	119	158	++
2mer-1	160	241	-
1mer-1	174	263	-
0mer	150	227	-
コントロール	158	239	-

分泌型miR-151-3p未処理群を100%とする。

[0200] 実施例11 miR-151-3p過剰分泌細胞の皮下移植モデルにおける転移アッセイに対する効果

マウスmiR-151-3pを含むmmu-miR-151-3p発現プラスミド1 μ gを、LipofectamineLTXキット (Invitrogen社) を用いて、当該試薬キットに添付される手順書に従って、1 \times 10⁶個/ウェル (6穴プレート) の濃度で播種したMDA-MB-231-

Luc D3H1細胞(Xenogen社)に導入した。翌日、培地を2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin(Invitrogen社)を含む10%FBS/RPMI培地(Invitrogen社)に交換し、2週間培養を続けることで、安定発現細胞を選択した。

複数の安定発現細胞のマウスmiR-151-3pの分泌量を測定するために、100 μL の培養上清に1fmolの合成Cel-miR-39(miScript miRNA Mimic: QIAGEN社製)を添加した後、マイクロRNAをRNeasy mini kit(キアゲン社)を用いてキット添付のプロトコールに従って抽出した。次に、得られたマイクロRNAを鋳型としてTaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit(Applied Biosystems社)及びmiR-151-3p TaqMan MicroRNA Assay、Cel-miR-39 TaqMan MicroRNA Assay(Applied Biosystems社製)を用いて逆転写反応を行った。即ち、マイクロRNA溶液 3.3 μL 、100mM dNTPs (with dTTP) 0.05 μL 、MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/ μL) 0.33 μL 、10 \times Reverse Transcription Buffer 0.5 μL 、RNase Inhibitor (20U/ μL) 0.063 μL 、Nuclease-free water 1.387 μL 、TaqMan MicroRNA Assay (5 \times) 1 μL を混合し、16 $^{\circ}\text{C}$ 30分間、42 $^{\circ}\text{C}$ 30分間、85 $^{\circ}\text{C}$ 5分間の保温を行った。続いて、当該反応液の3倍希釈液 4.5 μL 、TaqMan MicroRNA Assay (20 \times) 0.5 μL 、TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNGa(Applied Biosystems社) 5 μL を混合し、95 $^{\circ}\text{C}$ 10分間の保温後、95 $^{\circ}\text{C}$ 15秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ 1分間の保温サイクルを40回繰り返すPCR反応を7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems社)を用いて行うことにより、安定発現細胞のマウスmiR-151-3pの分泌量を定量した。当該計算値が最も高かった安定発現細胞株(miR-151-3p過剰分泌細胞)を以下の実験に使用した。

5匹の7週齢のオスBalb/c athymic nude miceの両鼠径部皮下にPBSに懸濁した 1×10^6 個のmiR-151-3p過剰分泌細胞を移植した。なお、コントロール群として 1×10^6 個のMDA-MB-231-luc D3H1細胞を移植したBalb/c athymic nude miceを用いた。移植14日後、生体イメージング法(IVIS Xenogen社)を用いてリンパ節付近のルシフェラーゼ活性を測定したところ、miR-151-3p過剰分泌細胞を移植したマウスのリンパ節転移はコントロール群と比較して、著しく増

加していることが分かった(図7)。

[0201] 実施例12 miR-151-3p過剰分泌細胞の皮下移植モデルにおける腫瘍血管形成に対する効果

miR-151-3p過剰分泌細胞移植後20日経過したBalb/c athymic nude miceの鼠径部の腫瘍塊を摘出し、ホルマリン固定した。その後、5 μ mのパラフィン包埋切片を以下の手順で血管内皮特異的タンパク質であるCD31に対する抗体(Rabbit polyclonal to CD31 ab28364(Abcam社))を用いて免疫染色を行うことで、腫瘍血管の形成能を評価した。なお、コントロール群として4T1-luc細胞を移植したBalb/c athymic nude miceの鼠径部の腫瘍塊を用いた。まず、当該切片を5分間、3回キシレンで洗浄した後、99.5%エタノール、80%エタノール、70%エタノールの順に5分間洗浄を行った。更に、蒸留水で5分間、3回洗浄した後、流水中に10分間浸漬した。続いて、蒸留水にて5分間、3回洗浄した後、0.5 M トリスバッファ(pH=10)中で121 $^{\circ}$ C、5分間オートクレーブを行った。その後、30分間室温で放置することにより冷却した後、蒸留水で5分間、3回の洗浄、更に続けてTBS-T溶液(0.05M トリス、0.3M NaCl、0.1% Tween 20水溶液)で5分間、2回洗浄した。スーパーパップペンで組織を囲んだ後、Image-iT Ex Signal Enhancer (Molecular probe社)中に室温、30分間浸漬した。TBS-T溶液で洗浄した後、Dako Protein Block (Dako社)中に室温、20分間浸漬した。そして、Dako Real Antibody Diluent (Dako社)で50倍希釈したRabbit polyclonal to CD31(Abcam社)と室温、30分間反応させた。5分間、3回TBS-T溶液による洗浄を行った後、Dako Real Antibody Diluentで1000倍希釈したAlexa Flour 488 Goat Anti-rabbit IgG (Molecular probe社)と室温、30分間反応させた。5分間、3回TBS-T溶液による洗浄を行った後、Vector Shield Mounting Medium with DAPI (Hard Type)(VECTOR社)を用いて封入した。なお、ネガティブコントロールとしてRabbit polyclonal to CD31に変えて、Negative Control Rabbit Immunoglobulin fraction(Dako社)を用いて上記操作を行った切片を用いた。上述した方法で染色した切片をSuper high pressure mercury lamp power supplyを接続した蛍光顕微鏡(ニコン ECLIPSE TE300

)を用いて励起波長505nm、蛍光波長520nmにより蛍光画像を取得した。単位面積当たりの蛍光量をACT-1C for DXM1200Cにより計測したところ、miR-151-3p過剰分泌細胞腫瘍塊の蛍光発光量はコントロールの147%であることが分かった。以上の結果から、miR-151-3pの分泌量を増加することで、腫瘍血管の形成が促進されることが分かった(図8)。

[0202] 実施例13 miR-151-3pの血管形成促進作用のメカニズム解析

実施例5記載の方法で、hsa-miR-151-3pをトランスフェクションしin vitro血管形成アッセイを行なうときに、VEGF受容体2のリン酸化阻害剤であるKI 8751 (Tocris Bioscience) を10nMの濃度で添加したところ、hsa-miR-151-3pによる血管形成促進効果が消失することが分かった(表6)。このことから、miR-151-3はVEGFシグナル経路を調節することで、血管形成促進作用を発揮していることが示唆された。

[0203] [表6]

	長さ(%)	分岐点数(%)
KI 8751 (-)	100	100
KI 8751 (+)	10	22

[0204] 実施例14 miR-151-3pによるDLL4シグナルの抑制

DLL4シグナル経路がhsa-miR-151-3pにより遮断されるか否かを以下に記載するウェスタン解析法で検討したところ、hsa-miR-151-3pトランスフェクションによりHUVEC細胞におけるDLL4の発現抑制が認められた(図9)。1ウェル当たり10 μ gのHUVEC細胞のlysateをポリアクリルアミドゲル(スーパーセップエース10%13well 和光純薬)を用いて、200V、1時間、電気泳動した。得られたアクリルアミドゲルからPVDF膜にセミドライブロットティングシステムを用いて20V、30分間、トランスファーした。次いで、PVDF膜を3%スキムミルク/T-TBS溶液で室温、1時間ブロッキングした後、適宜希釈した抗体(抗hDLL4抗体(DLL4 Antibody(C-term):ABGENT, AP9964a)の場合1/1,000希釈、抗hactin抗体(Anti-Actin, cloneC4:MILLIPORE, MAB1501)の場合1/10,000希釈)で室温、1時間処理した。T-TBS溶液で10分間の洗浄を3回行った後、1/3,000希釈した2次抗体(HRP結合抗マウスIgG抗体又はHRP結合抗ウサギIgG抗体)とインキュ

ベートした。更に、T-TBS溶液で10分間の洗浄を3回行なった後、HRP活性測定試薬(アプライドバイオシステム社)を用いて抗体と結合したタンパク質を検出した(LAS2000 富士フィルム社)。

[0205] 実施例 15 miR-151-3pの標的遺伝子の同定

マイクロRNAの標的遺伝子予測プログラムTargetscan (<http://www.targetscan.org/>)に基づき予測されたmiR-151-3pの標的遺伝子群の中から、血管新生に関連する遺伝子の抽出を試みた。その結果、VEGFシグナル伝達経路を構成するAkt3遺伝子の3' UTR上にmiR-151-3pのシード配列と相補的な配列が存在することが分かった。そこで、has-miR-151-3pがhAkt3の3' UTRに作用しうるか否かをhAkt3 3' UTRベクター(miTarget miRNA 3' UTR Target Sequence Expression Clone : GeneCopia社)を用いて、実施例6記載のルシフェラーゼアッセイを行なうことで、検討した。その結果、miR-151-3pは濃度依存的にhAkt3 3' UTRベクターを導入したHEK293細胞のルシフェラーゼ活性を抑制することが分かった(図10)。

次に、HUVEC細胞にhsa-miR-151-3pを導入した時の内因性のhAkt3タンパク量を以下に記載するウェスタンブロットティング法で検討した。1ウェル当たり10 μ gのHUVEC細胞のlysateをポリアクリルアミドゲル(スーパーセップエース10%13well 和光純薬)を用いて、200V、1時間、電気泳動した。得られたアクリルアミドゲルからPVDF膜にセミドライブロットティングシステムを用いて20V、30分間、トランスファーした。次いで、PVDF膜を3%スキムミルク/T-TBS溶液で室温、1時間ブロッキングした後、適宜希釈した抗体(抗hAkt3抗体(Anti-Akt3/PKB γ , clone GMA104:MILLIPORE, 05-780)の場合1/1,000希釈、抗actin抗体(Anti-Actin, cloneC4:MILLIPORE, MAB1501)の場合1/10,000希釈)で室温、1時間処理した。T-TBS溶液で10分間の洗浄を3回行なった後、1/3,000希釈した2次抗体(HRP結合抗マウスIgG抗体又はHRP結合抗ウサギIgG抗体)とインキュベートした。更に、T-TBS溶液で10分間の洗浄を3回行なった後、HRP活性測定試薬(アプライドバイオシステム社)を用いて抗体と結合したタンパク質を検出した(LAS2000 富士フィルム社)。その結果、図11に示された通り、1

0nMのmiR-151-3pにより半分程度hAkt3タンパクが減少することが分かった。
以上の検討から、Akt3はmiR-151-3pの標的遺伝子の1つであることが分かった。
。

VEGF存在下でAkt3遺伝子をsiRNA (AKT3 HSS115177 invitrogen) を用いて
ノックダウンしたところ、DLL4の発現上昇がキャンセルされることが分かった
(図12)。更に、Akt3 siRNA、DLL4抗体(DLL4 antibody (C-term) ABGENT)
を投与することで血管形成数が増加した(表7)ことから、VEGF→Akt3→DLL4
のシグナルを遮断すると血管形成の異常が生ずることが確認できた。

以上の結果から、miR-151-3pはAkt3、DLL4の発現を抑制することで、VEGF
のフィードバックシグナルを遮断し、血管形成異常を導くことが示唆された。
。

[0206] [表7]

	長さ(%)	分岐点数(%)
Akt3 siRNA	187	195
抗hDLL4抗体	205	234

産業上の利用可能性

[0207] 本発明の腫瘍の治療剤は、腫瘍の血管形成を抑制し、腫瘍の転移や予防、
特に乳がんの治療や予防に有用である。また、本発明のがんの判定方法によ
り、悪性がん、特に悪性の乳がんを判定することができる。さらに本発明は
、悪性がんを判定するための剤、および腫瘍の血管形成を抑制する作用を有
する物質のスクリーニング方法も提供することができる。

[0208] 本出願は日本で出願された特願2011-047647（出願日：201
1年3月4日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるも
のである。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（a）に記載の阻害剤、あるいは（b）に記載の核酸を含有する腫瘍治療剤：

（a）miR-151-3p阻害剤、miR-886-3p阻害剤、またはSMPD3阻害剤、

（b）（1）miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、または配列番号1～6のいずれかで表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり且つ標的遺伝子発現抑制活性を有するヌクレオチドを含む核酸、又は（2）上記（1）の核酸を発現し得るベクターである核酸。

[請求項2] miR-151-3p阻害剤が、以下の（1）又は（2）に記載の核酸である、請求項1に記載の剤：

（1）配列番号9で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-151-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドを含む核酸、

（2）上記（1）の核酸を発現し得る発現ベクターである核酸。

[請求項3] miR-886-3p阻害剤が、以下の（1）又は（2）に記載の核酸である、請求項1に記載の剤：

（1）配列番号10で表されるヌクレオチド配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つmiR-886-3pの機能を抑制する活性を有するヌクレオチドを含む核酸、

（2）上記（1）の核酸を発現し得る発現ベクターである核酸。

[請求項4] SMPD3阻害剤が、以下の（1）～（5）からなる群より選択される物質である、請求項1に記載の剤：

（1）SMPD3をコードする遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、

（2）SMPD3をコードする遺伝子の転写産物に対するリボザイム核酸、

（3）SMPD3をコードする遺伝子の転写産物に対してRNAi活性を有す

る核酸もしくはその前駆体、

(4) SMPD3と結合する抗体、

(5) SMPD3と結合する低分子化合物。

[請求項5] 核酸が一本鎖または二本鎖である、請求項1～4のいずれか1項に記載の剤。

[請求項6] 核酸が配列番号1～6、9、10のいずれかで表されるヌクレオチド配列またはその部分配列からなるRNA、あるいはその修飾体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の剤。

[請求項7] 核酸が配列番号1～6、9、10のいずれかで表されるヌクレオチド配列からなるRNAまたはその修飾体である、請求項1～3および6のいずれか1項に記載の剤。

[請求項8] 核酸が配列番号9または配列番号54で表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖RNAまたはその修飾体である、請求項2に記載の剤。

[請求項9] 核酸が、少なくとも1以上の、2'-OMe修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドのいずれかの修飾ヌクレオチドを含む一本鎖RNAである、請求項8に記載の剤。

[請求項10] 一本鎖RNAが3個以上のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項9に記載の剤。

[請求項11] 一本鎖RNAが4個以上のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項9に記載の剤。

[請求項12] 一本鎖RNAが3から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項9に記載の剤。

[請求項13] 一本鎖RNAが4から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項9に記載の剤。

[請求項14] 一本鎖RNAがその5'末端と3'末端の両方に少なくとも1個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項8～13に記載の剤。

[請求項15] 全てのヌクレオチドが2'-OMe修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドのいずれかの修飾ヌクレオチドからなる一本鎖RNAである

、請求項 8～14 記載の剤。

- [請求項16] 一本鎖RNAが配列番号：30～38、及び43～50から選択されるいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖RNAである、請求項10記載の剤。
- [請求項17] 一本鎖RNAが配列番号：43～48および50から選択されるいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる一本鎖RNAである、請求項10記載の剤。
- [請求項18] 血管形成を阻害するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項19] 腫瘍血管新生を阻害するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項20] 腫瘍転移を抑制するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項21] 腫瘍が乳がんである、請求項1～20のいずれか1項に記載の剤。
- [請求項22] miR-151-3pの過剰発現による血管形成異常を抑制するための、請求項3および8～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸。
- [請求項23] 腫瘍を治療するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸。
- [請求項24] 血管形成を阻害するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸。
- [請求項25] 腫瘍血管新生を阻害するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸。
- [請求項26] 腫瘍転移を抑制するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸。
- [請求項27] 腫瘍治療剤を製造するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸の使用。
- [請求項28] 血管形成阻害剤を製造するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸の使用。

- [請求項29] 腫瘍血管新生阻害剤を製造するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸の使用。
- [請求項30] 腫瘍転移抑制剤を製造するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸の使用。
- [請求項31] 請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける腫瘍の治療方法。
- [請求項32] 請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける血管形成を阻害する方法。
- [請求項33] 請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける腫瘍血管新生を阻害する方法。
- [請求項34] 請求項1～17のいずれか1項に記載の阻害剤または核酸をヒトに投与することを含む該ヒトにおける腫瘍転移を抑制する方法。
- [請求項35] 被検試料におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pの分泌レベルもしくは濃度を測定すること、および該分泌レベルもしくは該濃度と悪性がんとの間の正の相関に基づき、悪性がんの罹患の有無を判定することを含む、がんの判定方法。
- [請求項36] がんが、乳がんである請求項35記載の方法。
- [請求項37] miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30a、miR-146a、miR-151-3p、miR-886-3p、miR-100、miR-221、miR-126、miR-130a、miR-222、miR-125b、miR-29a、miR-720、miR-224、miR-29b、miR-1274b、miR-1280、miR-210、miR-140-3p、miR-593またはmiR-483-3pを特異的に検出し得る核酸プローブを含む、悪性がんを判定するための剤。
- [請求項38] がんが、乳がんである請求項37記載の剤。
- [請求項39] 以下の工程を含む、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質を探索する方法：

(1) 被検物質とmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌または発現を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を測定し、該分泌量または発現量を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量または発現量と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-29b-1*、miR-221*、miR-138、miR-584、miR-30aまたはmiR-146aの分泌量または発現量を上方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質として選択すること。

[請求項40]

以下の工程を含む、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質を探索する方法：

(1) 被検物質とmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌、発現または機能を測定可能な細胞とを接触させること；

(2) 被検物質を接触させた細胞におけるmiR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を測定し、該分泌量、発現量または機能を被検物質を接触させない対照細胞における分泌量、発現量または機能と比較すること；並びに

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、miR-151-3p、miR-886-3pまたはSMPD3の分泌量、発現量または機能を下方制御する被検物質を、腫瘍の血管形成を抑制し得る物質として選択すること。

[請求項41]

配列番号9または配列番号54で表されるヌクレオチド配列からなり、全てのヌクレオチドが2'-OMe修飾ヌクレオチドまたはLNA修飾ヌクレオチドのいずれかの修飾ヌクレオチドからなり、且つ、3から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、一本鎖RNA。

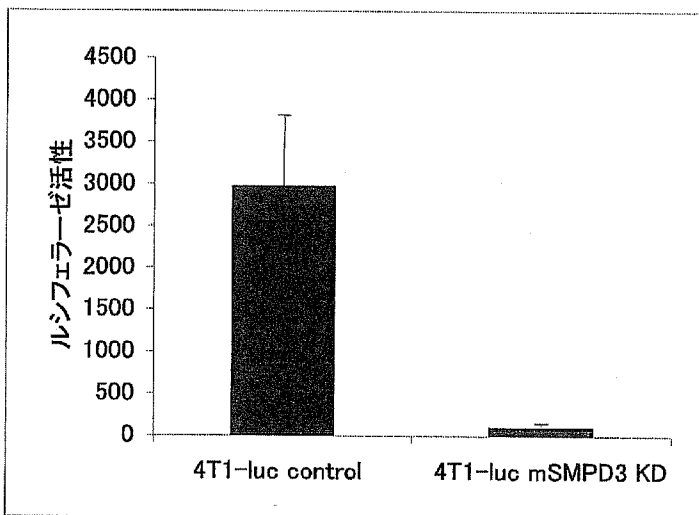
[請求項42]

一本鎖RNAが4から12個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項41記載の一本鎖RNA。

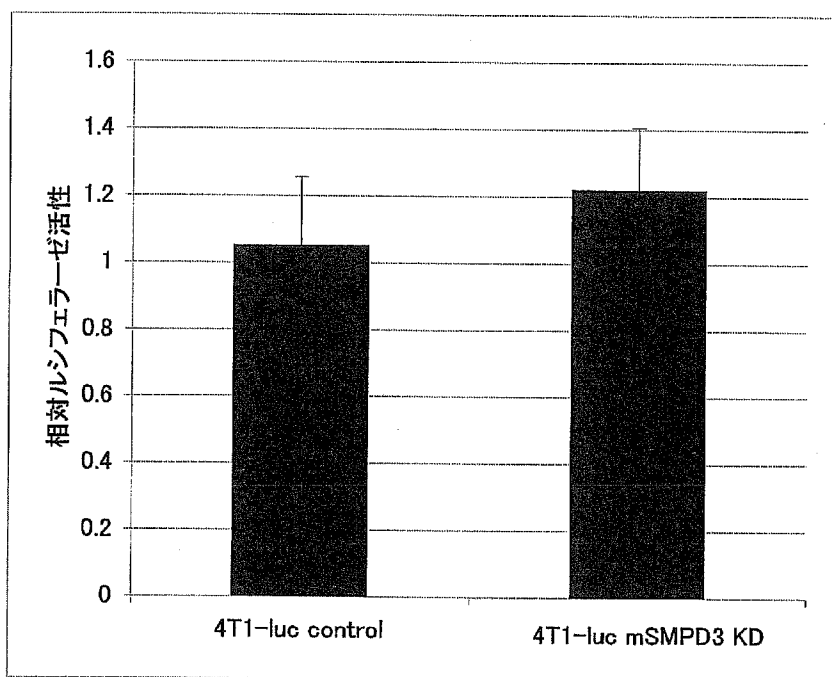
[請求項43] 一本鎖RNAがその5'末端と3'末端の両方に少なくとも1個のLNA修飾ヌクレオチドを含む、請求項41又は42記載の一本鎖RNA。

[請求項44] 配列番号：30～38および43～50から選択されるいずれかで表されるヌクレオチド配列からなる請求項42記載の一本鎖RNA。

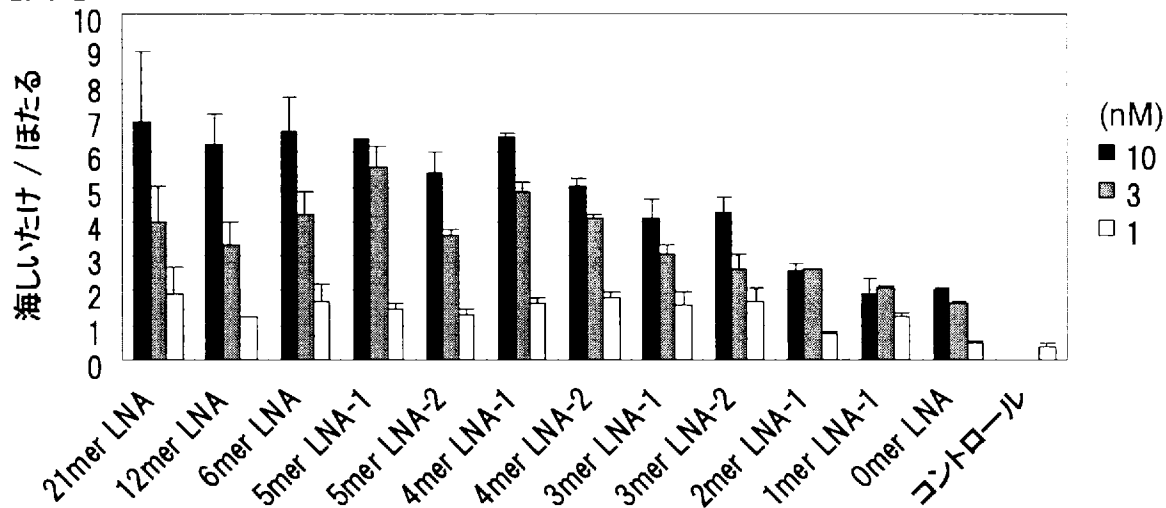
[図1]



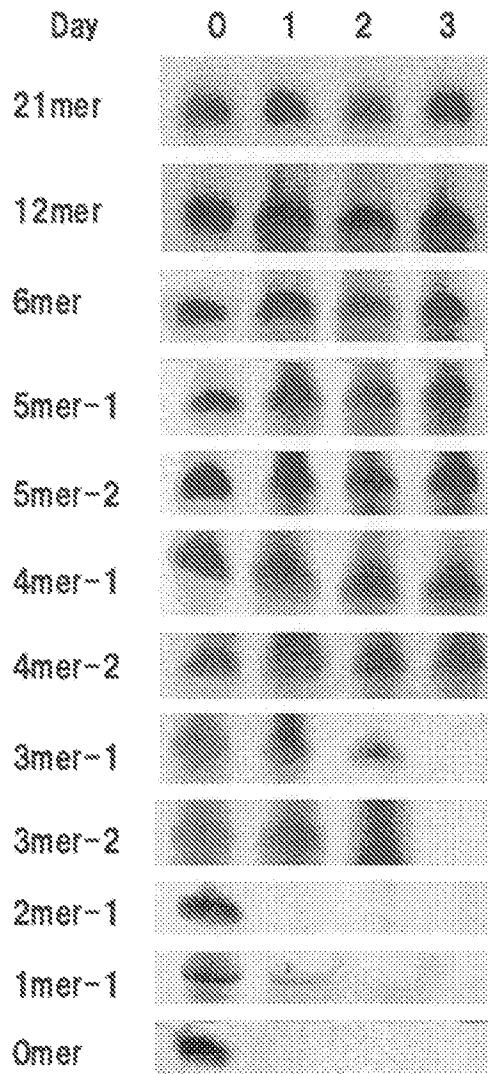
[図2]



[図3]



[図4]

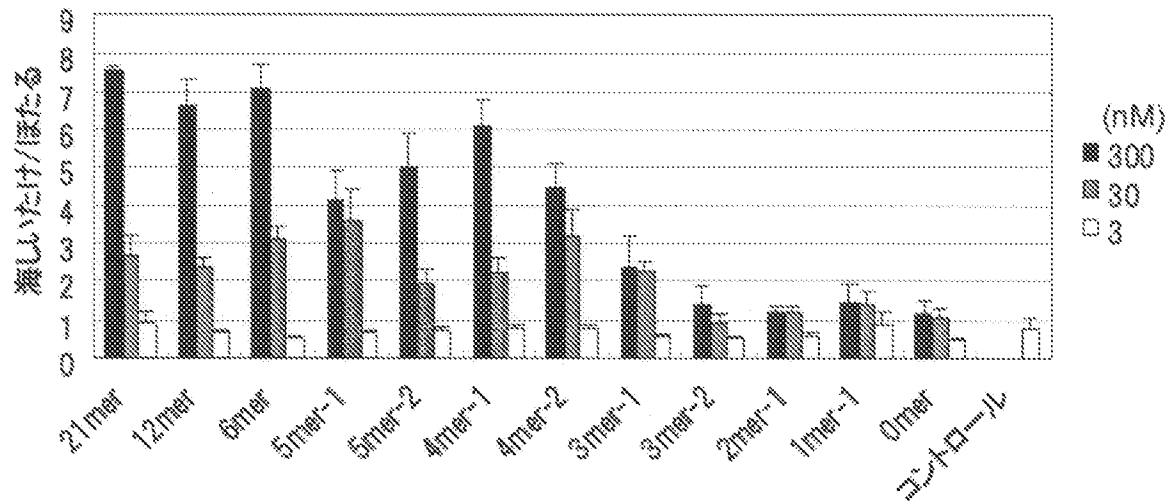


[図5]

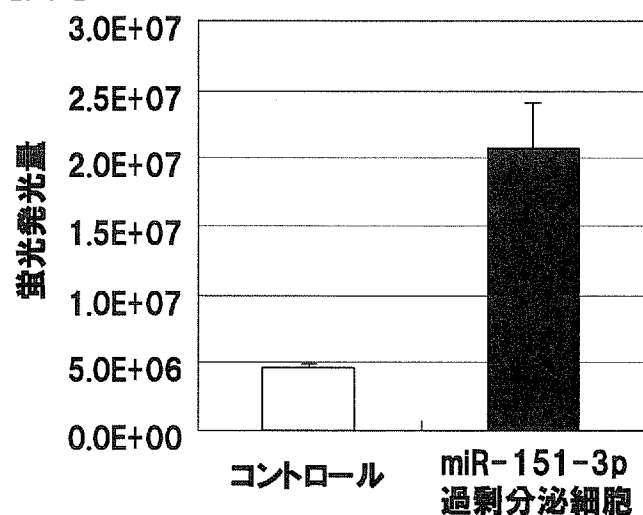


1・・・コントロール(アニーリング操作なし)、2・・・アニーリング操作後

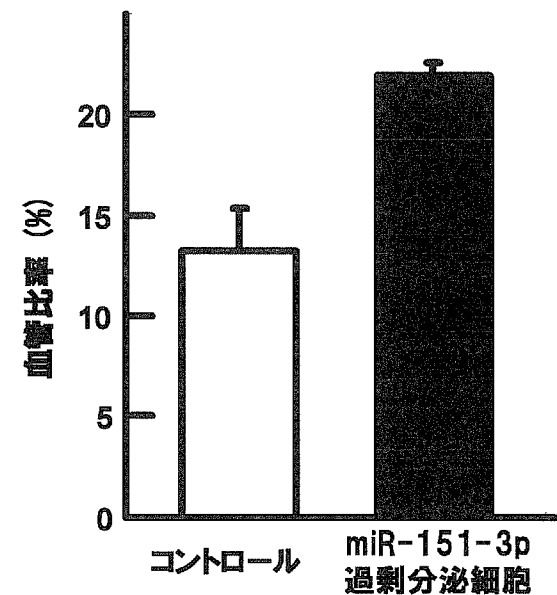
[図6]



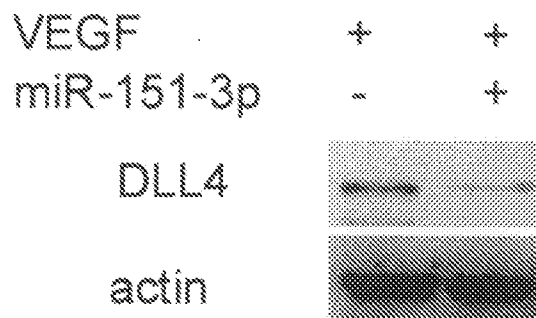
[図7]



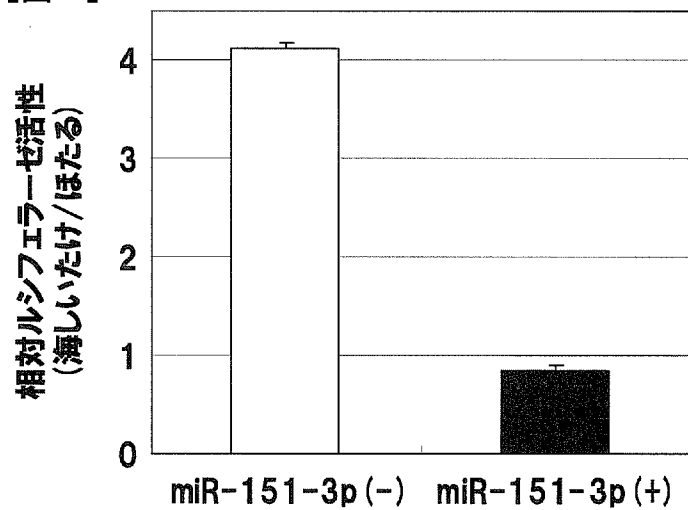
[図8]



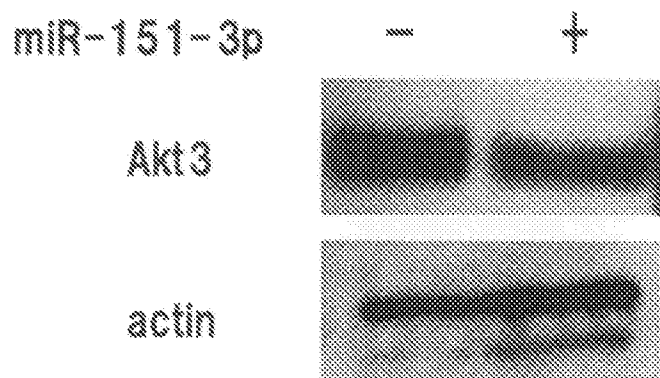
[図9]



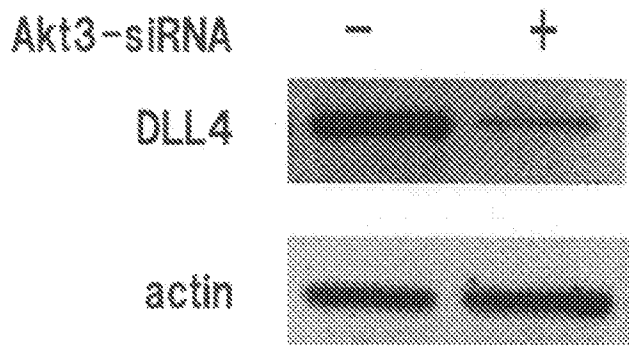
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68
(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/7105, A61K31/712, A61K48/00, A61P35/00, C12N15/09, C12Q1/02,
C12Q1/68, G01N33/15

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> A	Haruhisa IGUCHI et al., "Application of microRNAs to Cancer Therapy", Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 2010, vol.37, no.3, pages 389 to 395	<u>1</u> 2-21, <u>27-30</u> , <u>35-40</u> 22-26, 41-44
<u>Y</u> A	JP 2009-100687 A (National University Corporation Chiba University), 14 May 2009 (14.05.2009), claim 9; paragraph [0005] (Family: none)	2-21, 27-30, <u>35-40</u> 1, 22-26, 41-44

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 May, 2012 (17.05.12)

Date of mailing of the international search report
29 May, 2012 (29.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055476

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 2009/108860 A2 (THE OHIO UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION), 03 September 2009 (03.09.2009), claim 6; paragraph [000186] & JP 2011-517283 A & US 2011/0054009 A1 & EP 2260109 A & AU 2009219197 A & CA 2716938 A & CN 102027129 A	2-21, 27-30, 35-40 1, 22-26, 41-44
<u>X</u> <u>A</u>	Ding G.et al., Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDIA, Nature Cell Biology, 2010, Vol.12, No.4, p.390-399	<u>22-26, 41-44</u> 1-21, 27-30, 35-40
A	Ochiya T.et al., Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes, Molecular therapy, 2010, Vol.18, No.1, p.181-187	1-30, 35-44
A	Ma L.et al., Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model, Nature Biotechnology, 2010, Vol.28, No.4, p.341-347	1-30, 35-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055476

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

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

- 1. Claims Nos.: 31-34
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy.

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/7105, A61K31/712, A61K48/00, A61P35/00, C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y — A	井口晴久他, マイクロRNAのがん治療への応用, 癌と化学療法, 2010, Vol.37, No.3, p.389-395	1 2-21, 27-30, 35-40 22-26, 41-44
Y — A	JP 2009-100687 A (国立大学法人千葉大学) 2009.05.14, 請求項9、 【0005】 (ファミリーなし)	2-21, 27-30, 35-40 1, 22-26, 41 -44

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.05.2012

国際調査報告の発送日

29.05.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

9548

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y — A	WO 2009/108860 A2 (THE OHIO UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 2009.09.03, 請求項6、[000186] & JP 2011-517283 A & US 2011/0054009 A1 & EP 2260109 A & AU 2009219197 A & CA 2716938 A & CN 102027129 A	2-21, 27-30, 35-40 1, 22-26, 41 -44
X A	Ding G..et al., Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDIA, Nature Cell Biology, 2010, Vol.12, No.4, p.390-399	22-26, 41-44 1-21, 27-30, 35-40
A	Ochiya T.et al., Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes, Molecular therapy, 2010, Vol.18, No.1, p.181-187	1-30, 35-44
A	Ma L.et al., Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model, Nature Biotechnology, 2010, Vol.28, No.4, p.341-347	1-30, 35-44

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 31-34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、治療による人体の処置方法に関するものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。