

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5933010号
(P5933010)

(45) 発行日 平成28年6月8日(2016.6.8)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105 Z N A
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10

請求項の数 19 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-531612 (P2014-531612)
(86) (22) 出願日	平成25年8月19日 (2013.8.19)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/072064
(87) 国際公開番号	W02014/030602
(87) 国際公開日	平成26年2月27日 (2014.2.27)
審査請求日	平成26年10月27日 (2014.10.27)
(31) 優先権主張番号	特願2012-181915 (P2012-181915)
(32) 優先日	平成24年8月20日 (2012.8.20)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	510097747 国立研究開発法人国立がん研究センター 東京都中央区築地五丁目1番1号
(73) 特許権者	303046299 旭化成ファーマ株式会社 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地
(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明
(74) 代理人	100129713 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも以下の：

- (1) 配列番号1又は配列番号2で示されるヌクレオチド配列から成る核酸；
- (2) 部分配列5'-UUACAGU-3'又は5'-UAA CUGG-3'を含み、配列番号1又は配列番号2と70%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列から成る核酸であって、タンパク質発現抑制活性を示す核酸；又は
- (3) 上記(1)又は(2)のヌクレオチド配列及び当該ヌクレオチド配列と相補的な配列を含み、それにより鎖中の全部又は一部に二本鎖構造を形成する一本鎖又は二本鎖の核酸、

を含有することを特徴とする、膀胱癌治療のための医薬。

【請求項2】

前記核酸が、二本鎖の核酸である、請求項1に記載の医薬。

【請求項3】

核酸が配列番号1で示されるヌクレオチド配列から成る、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項4】

核酸が配列番号2で示されるヌクレオチド配列から成る、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項5】

核酸がmiR582のヌクレオチド配列を含み、且つタンパク質発現抑制活性を示す、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項6】

核酸がmiR582及びその前駆体からなる群より選ばれる少なくとも一つの核酸であり、前記前駆体がpri-miR582又はpre-miR582である、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項7】

核酸がmiR582である、請求項1又は2に記載の医薬。

【請求項8】

核酸が修飾された核酸である、請求項1～7のいずれか1項に記載の医薬。

10

【請求項9】

膀胱癌が、miR582の発現が減少している膀胱癌である請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項10】

膀胱癌が、グレード2以上の膀胱癌である請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項11】

請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸を含有する、膀胱癌の転移を抑制又は予防するための医薬。

【請求項12】

経尿道的に哺乳動物に投与される、請求項1～11のいずれか1項に記載の医薬。

20

【請求項13】

請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬の膀胱癌治療効果を予測する方法であって、以下の；

(1) 請求項1～12のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された正常組織又は正常細胞及び請求項1～12のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程、

(2) 正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間で配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度を比較する工程、及び

(3) 癌組織又は癌細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度が、正常組織又は正常細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度よりも低い場合に、請求項1～12のいずれかに記載の医薬が治療効果があると予測する工程、

30

を含む方法。

【請求項14】

請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬の膀胱癌治療効果を予測する方法であって、以下の；

(1) 請求項1～12のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された正常組織又は正常細胞及び請求項1～12のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数を測定する工程、

40

(2) 正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間でmiR582のゲノムのコピー数を比較する工程、及び

(3) 癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数が、正常組織又は正常細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数よりも低い場合に、請求項1～12のいずれかに記載の医薬が治療効果があると予測する工程、

を含む方法。

【請求項15】

請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬の膀胱癌治療効果を判定する方法であって、以下の；

(1) 請求項1～12のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌

50

細胞及び請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与後に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程、

(2) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞と請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与後に患者から摘出された癌組織又は癌細胞との間で配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を比較する工程、及び

(3) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与後に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度が、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度よりも高い場合に、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬が治療効果があると判定する工程

を含む方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の膀胱癌治療効果を判定する方法であって、以下の；

(1) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞及び請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与後に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を測定する工程、

(2) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞と請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与後に患者から摘出された癌組織又は癌細胞との間で m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を比較する工程、及び

(3) 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与後に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数が、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬投与前に患者から摘出された癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数よりも高い場合に、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の医薬が治療効果があると判定する工程

を含む方法。

【請求項 1 7】

膀胱癌治療の予後を判定する方法であって、以下の；

(1) 患者から摘出された正常組織又は正常細胞及び患者から摘出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程

(2) 正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間で配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を比較する工程、及び

(3) 癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度が、正常組織又は正常細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度よりも低い場合に、癌治療の予後が悪いと判定する工程

を含む方法。

【請求項 1 8】

膀胱癌治療の予後を判定する方法であって、以下の；

(1) 患者から摘出された正常組織又は正常細胞及び患者から摘出された癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を測定する工程、

(2) 正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間で m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を比較する工程、及び

(3) 癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数が、正常組織又は正常細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数よりも低い場合に、癌治療の予後が悪いと判定する工程

を含む方法。

【請求項 1 9】

10

20

30

40

50

配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸を特異的に検出し得る核酸プローブを含み、該核酸プローブが、配列番号 1 又は配列番号 2 で表されるヌクレオチド配列に含まれる 15 塩基以上の連続したヌクレオチド配列又はその相補配列を含むポリヌクレオチドである、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬の効果判定するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の治療剤、特に癌の細胞増殖抑制剤、癌の転移抑制又は予防剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

RNA 干渉

RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 技術は、生命科学研究に頻りに利用され、その有用性は広く確認されてきている。RNAi とは、二本鎖 RNA によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象をいう。2001 年に 21 塩基の低分子二本鎖 RNA が哺乳動物細胞内で RNAi を媒介できることが報告されてから (非特許文献 1)、siRNA (small interference RNA) は、標的遺伝子の発現抑制方法として頻用されている。また、siRNA は、医薬品への応用や、癌を含む種々の難治性疾患の治療への応用が期待されている。

【0003】

miRNA

miRNA (マイクロ RNA) は、ゲノム上にコードされた内在性の 20 ~ 25 塩基程度の非コード (non-coding) RNA である。miRNA は、ゲノム DNA 上の miRNA 遺伝子から、まず数百 ~ 数千塩基程度の長さの一次転写物 (Primary miRNA: 以下、「Pri-miRNA」と呼ぶことがある。) として転写され、次にプロセッシングを受けて約 60 ~ 70 塩基程度のヘアピン構造を有する pre-miRNA (precursor miRNA) となる。その後、核から細胞質内へ移動し、さらにプロセッシングを受けて 20 ~ 25 塩基程度の二本鎖成熟 miRNA となる。二本鎖成熟 miRNA は、そのうちの一本鎖が RISC (RNA-Induced Silencing Complex) と呼ばれるタンパク質との複合体を形成し、標的遺伝子の mRNA に作用することで、標的遺伝子の翻訳を阻害する働きをすることが知られている (非特許文献 1)。miRNA は、ヒトやマウスなどで 1000 種類以上が知られており、それぞれが複数の標的遺伝子の発現を調節し、細胞の増殖や分化など、様々な生命現象に関与することが示唆されている。例えば、造血細胞や神経細胞の分化などに関与する miRNA についての報告がある (非特許文献 2)。また、癌細胞の増殖に関与する miRNA についても報告があり、miRNA の発現パターンを癌の臨床診断に利用することや、miRNA の発現を抑制することで癌細胞の増殖を抑制する癌の治療法について、提案がなされている (特許文献 1、2)。mir582 は miRNA の一つとして知られている。

(非特許文献 3)

【0004】

膀胱癌

膀胱の癌は前癌性の病変として一般に生じ、浸潤性癌へと変化し得る。一部は転移して増殖することもある。最も一般的な膀胱癌は、上皮起源の移行上皮癌であり、全ての膀胱癌の 90% を占めている。表在性膀胱悪性腫瘍の患者は外科的に除去することができるが再発の傾向が大きい。また、下部筋肉組織へ深く浸潤する膀胱悪性腫瘍の場合は、5 年生存率が約 50% まで減じる。

【0005】

いずれにせよ、外科手術がこれら膀胱癌の主要な治療法である。手術の範囲は疾患の病期により決定されるが、早期疾患は、一般に膀胱内化学療法及び経尿道的切除により治療

10

20

30

40

50

可能である。膀胱壁と同じ部位又は他の部位での癌の発現及び再発の重症度を減じるために、外科手術は化学療法薬又は免疫療法薬の補助的膀胱内注入と組み合わされることが多い。外科手術に適さない膀胱癌患者のためには一般に決定的（根治的）放射線療法が用いられる。表面的、低悪性度の疾患の場合には化学療法を膀胱内に直接施して腫瘍部位に薬物を集積させ、切除後の任意の残存腫瘍塊を除去する。進行性の膀胱癌に対応するためには、全身的化学療法も使用される。

【0006】

ドキシソルピシン及びエピルピシンのようなアントラサイクリンは膀胱癌を治療することが分かっている。アントラサイクリンの投与は術後の再発のリスクを低下すると考えられているが、これらの化合物は全身毒性を有する。この毒性は、薬物を膀胱へ直接注入することにより低下させることができるが、膀胱が手術により何らかの損傷を受けている場合には薬物が他の器官系に侵入し得る。さらにこれらの化合物は、投与経路とは無関係に、潜在的に発癌性であると考えられている。従って侵襲性疾患の進行を予防する、より安全な治療方法の開発が重要である。また、膀胱癌は外科的手術、化学療法を行っても比較的再発率が高いことが特徴である。このため、再発率を下げるような治療法が開発が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2008-86201公報

【特許文献2】特開2006-506469公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Elbashir SM et al., Nature, 411: 494-498 (2001)

【非特許文献2】Science, 303: 83-86 (2004)

【非特許文献3】Proc. Natl. Acad. Sci., 103: 3687-3692 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、より効果的な癌の治療法を提供することにある。例えば、癌の治療剤、特に、癌の細胞増殖抑制剤や癌の転移抑制又は予防剤、前記各剤を利用した医薬、癌治療の効果を判定する方法、癌治療の予後を予測する方法、癌の増殖を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法、又は癌の転移を阻害する作用を有する物質のスクリーニング方法の少なくとも一つが意図される。

【課題を解決するための手段】

【0010】

これまで「mir582」と癌細胞の増殖や転移との関連性は全く知られていなかった。本発明者らは、驚くべきことに膀胱癌細胞において、miRNAの一種である「miR582」の発現が顕著に減少していることを初めて見出した。さらに重要なことに、膀胱癌細胞にmiR582を恒常発現させると、当該癌細胞の増殖が抑制されること及び癌細胞の浸潤性が抑制されることを初めて見出した。加えて、miR582を導入した癌細胞では、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、RAB27A等の特定のRNAの発現が抑制されていることも見出した。

【0011】

発現が抑制された上記のRNAのうち、KCNC1を除く4遺伝子は、いずれも癌や細胞増殖との関連性が示唆されている。つまり、PGGT1Bは癌の浸潤に関与することが報告されている(Cell Biol. Int., 34: 815-826 (2010))。LRRK2は細胞の増殖に関与するAktなどのタンパク質をリン酸化することが報告

10

20

30

40

50

されている (F E B S L e t t . , 5 8 5 : 2 1 6 5 - 2 1 7 0 (2 0 1 1)) 。また、 D I X D C 1 も細胞の増殖に関与することが報告されており (C a n c e r S c i . , 1 0 0 : 1 8 0 1 - 1 8 0 8 (2 0 0 9)) 、 R A B 2 7 A については、増殖因子の分泌に関与することが報告されている (M o l . C a n c e r . R e s . , 6 : 3 7 2 - 3 8 2 (2 0 0 8)) 。理論に拘束されることは好まないが、それらの R N A の機能が抑制されることにより癌細胞の増殖や浸潤性が影響されているのかもしれない。

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明者らは、ヒト膀胱癌の臨床検体を用いた解析から、膀胱癌の悪性度 (グレード) に伴って m i R 5 8 2 の発現が低下している患者の割合が増加していることも見出した。

【 0 0 1 3 】

従って、本発明は以下のものを包含する：

〔 1 〕 少なくとも以下の：

(1) 配列番号 1 又は配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列から成る核酸；

(2) 配列番号 1 又は配列番号 2 と 7 0 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列から成る核酸であって、タンパク質発現抑制活性を示す核酸、又は

(3) 上記 (1) 又は (2) のヌクレオチド配列及び当該ヌクレオチド配列と相補的な配列を含み、それにより鎖中の全部又は一部に二本鎖構造を形成する一本鎖又は二本鎖の核酸、

を含有することを特徴とする、癌治療のための医薬。

〔 1 - 2 〕 前記核酸が、 P G G T 1 B 、 L R R K 2 、 D I X D C 1 、及び R A B 2 7 A からなる群から選択される少なくとも一つの R N A とハイブリッドを形成し得る核酸である、前記〔 1 〕に記載の医薬。

〔 1 - 3 〕 前記核酸が、 K C N C 1 、 P G G T 1 B 、 L R R K 2 、 D I X D C 1 、及び R A B 2 7 A からなる群から選択される少なくとも一つのタンパク質の発現を抑制し得る核酸である、前記〔 1 〕に記載の医薬。

〔 2 〕 前記核酸が、二本鎖の核酸である、前記〔 1 〕に記載の医薬。

なお、上記のように〔 1 〕を引用する項は、〔 1 〕の枝番として表した〔 1 - 2 〕等が存在する場合、当該項も同時に引用する。以下、同じである。

〔 3 〕 核酸が配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列又はその部分配列から成る、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 3 - 2 〕 核酸が配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列から成る、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 4 〕 核酸が配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列又はその部分配列から成る、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 4 - 2 〕 核酸が配列番号 2 で示されるヌクレオチド配列から成る、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 5 〕 核酸が m i R 5 8 2 のヌクレオチド配列を含み、且つタンパク質発現抑制活性を示す、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 6 〕 核酸が m i R 5 8 2 及びその前駆体からなる群より選ばれる少なくとも一つの核酸である、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 6 - 2 〕 m i R 5 8 の前駆体が p r i - m i R 5 8 2 又は p r e - m i R 5 8 2 である、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 7 〕 核酸が m i R 5 8 2 である、前記〔 1 〕～〔 2 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 8 〕 核酸が修飾された核酸である、前記〔 1 〕～〔 7 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 9 〕 癌が、 m i R 5 8 2 の発現が減少している癌である前記〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 1 0 〕 癌が、膀胱癌である前記〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の医薬。

〔 1 1 〕 癌が、グレード 2 以上の膀胱癌である前記〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の医薬。

10

20

30

40

50

〔 1 2 〕 前記〔 1 〕～〔 8 〕のいずれかに記載の核酸を含有する、癌の転移を抑制又は予防するための医薬。

〔 1 3 〕 経尿道的に哺乳動物に投与される、前記〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかに記載の医薬。

【 0 0 1 4 】

〔 1 4 〕 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬の治療効果を予測する方法又は当該予測を補助するための方法であって、癌における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程を含む方法。

〔 1 4 - 2 〕 以下の(1)～(3)の工程を含む、前記〔 1 4 〕に記載の方法；

(1) 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された正常組織又は正常細胞及び前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程、

(2) 正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間で配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を比較する工程、及び

(3) 癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度が、正常組織又は正常細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度よりも低い場合に、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬が治療効果があると予測する工程。

〔 1 5 〕 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬の治療効果を予測する方法又は当該予測を補助するための方法であって、癌における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を測定する工程を含む方法。

〔 1 5 - 2 〕 以下の(1)～(3)の工程を含む、前記〔 1 5 〕に記載の方法；

(1) 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された正常組織又は正常細胞及び前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を測定する工程、

(2) 正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間で m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を比較する工程、及び

(3) 癌組織又は癌細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数が、正常組織又は正常細胞における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数よりも低い場合に、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬が治療効果があると予測する工程。

〔 1 6 〕 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬の治療効果を判定する方法又は当該判定を補助するための方法であって、癌における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程を含む方法。

〔 1 6 - 2 〕 以下の(1)～(3)の工程を含む、前記〔 1 6 〕に記載の方法；

(1) 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞及び前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与後に患者から抽出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程、

(2) 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞と前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与後に患者から抽出された癌組織又は癌細胞との間で配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度を比較する工程、及び

(3) 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与後に患者から抽出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度が、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞における配列番号 1 又は配列番号 2 に記載の核酸の発現レベル又は濃度よりも高い場合に、前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬が治療効果があると判定する工程。

〔 1 7 〕 前記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の医薬の治療効果を判定する方法又は当該判定を補助するための方法であって、癌における m i R 5 8 2 のゲノムのコピー数を

10

20

30

40

50

測定する工程を含む方法。

〔17-2〕以下の(1)～(3)の工程を含む、前記〔17〕に記載の方法；

(1)前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞及び前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬投与後に患者から抽出された癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数を測定する工程、

(2)前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞と前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬投与後に患者から抽出された癌組織又は癌細胞との間でmiR582のゲノムのコピー数を比較する工程、及び

(3)前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬投与後に患者から抽出された癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数が、前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬投与前に患者から抽出された癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数よりも高い場合に、前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬が治療効果があると判定する工程。

10

〔18〕癌治療の予後を判定する方法又は当該判定を補助するための方法であって、癌における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程を含む方法。

〔18-2〕以下の(1)～(3)の工程を含む、前記〔18〕に記載の方法；

(1)患者から抽出された正常組織又は正常細胞及び患者から抽出された癌組織又は癌細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度を測定する工程

20

(2)正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間で配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度を比較する工程、及び

(3)癌組織又は癌細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度が、正常組織又は正常細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現レベル又は濃度よりも低い場合に、癌治療の予後が悪いと判定する工程。

〔19〕癌治療の予後を判定する方法又は当該判定を補助するための方法であって、癌におけるmiR582のゲノムのコピー数を測定する工程を含む方法。

〔19-2〕以下の(1)～(3)の工程を含む、前記〔19〕に記載の方法；

(1)患者から抽出された正常組織又は正常細胞及び患者から抽出された癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数を測定する工程、

30

(2)正常組織又は正常細胞と癌組織又は癌細胞との間でmiR582のゲノムのコピー数を比較する工程、及び

(3)癌組織又は癌細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数が、正常組織又は正常細胞におけるmiR582のゲノムのコピー数よりも低い場合に、癌治療の予後が悪いと判定する工程。

〔20〕癌が膀胱癌である、前記〔14〕～〔19〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕配列番号1又は配列番号2に記載の核酸を特異的に検出し得る核酸プローブを含む、前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の医薬の効果を判定するための組成物。

〔22〕以下の(1)～(3)の工程を含む、癌の増殖を抑制し得る物質を探索する方法；

40

(1)被検物質と配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現を測定可能な細胞とを接触させる工程、

(2)被検物質を接触させた細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を測定し、該発現量を被検物質を接触させない対照細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量と比較する工程、及び

(3)上記(2)の比較結果に基づいて、配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を上昇制御する被検物質を、癌の増殖を阻害し得る物質として選択する工程。

〔23〕以下の(1)～(3)の工程を含む、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質を探索する方法；

(1)被検物質と配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現を測定可能な細胞とを接

50

触させる工程；

(2) 被検物質を接触させた細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を測定し、該発現量を被検物質を接触させない対照細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸発現量と比較する工程、及び

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を上昇制御する被検物質を、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質として選択する工程。

〔24〕 少なくとも以下の：

(1) 配列番号1又は配列番号2で示されるヌクレオチド配列から成る核酸；

(2) 配列番号1又は配列番号2と70%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列から成る核酸であって、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、及びRAB27Aからなる群から選択される少なくとも一つのタンパク質の発現抑制活性を示す核酸、又は

(3) 上記(1)又は(2)のヌクレオチド配列及び当該ヌクレオチド配列と相補的な配列を含み、それにより鎖中の全部又は一部に二本鎖構造を形成する一本鎖又は二本鎖の核酸、

を含有することを特徴とする、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、及びRAB27Aからなる群から選択される少なくとも一つのタンパク質の発現抑制剤。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、癌の治療剤、特に膀胱癌の治療剤、癌の転移を抑制又は予防する剤、又は前記剤を利用した医薬の少なくとも一つを提供することができる。また本発明により、癌の治療効果を判定する方法、癌治療の予後を予測する方法、癌の増殖を抑制する作用を有する物質のスクリーニング方法、又は癌の転移を阻害する作用を有する物質のスクリーニング方法の少なくとも一つを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】各種膀胱癌細胞におけるmiR582の発現量を示す図である。図中、「Normal」は正常細胞を示し、縦軸の値は、Normalに対する比として表している。

【図2】各種膀胱癌細胞におけるmiR582の染色体領域のコピー数を示す図である。縦軸の値は、HT1376細胞に対する比として表している。

【図3】miR582によるヒト膀胱癌細胞株の増殖抑制を示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示し、縦軸の値は、NCに対する比として表している。

【図4】miR582によるヒト膀胱癌細胞株の浸潤能の抑制を示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示し、縦軸の値は、NCに対する比として表している。

【図5】マウス膀胱癌モデルでのmiR582投与による治療効果を示す図である。図中、Scrambleは陰性対照である。

【図6】マウス膀胱癌モデルでのmiR582投与による癌転移抑制効果を示す図である。図中、Scrambleは陰性対照である。

【図7】miR582によりKCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、RAB27Aの遺伝子発現が抑制されることを示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示し、縦軸の値は、NCに対する比として表している。

【図8】PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、RAB27AがmiR582の直接的な標的分子であり、KCNC1が間接的な標的分子であることを示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示し、縦軸の値は、NCに対する比として表している。

【図9】miR582によるKCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、RAB27Aの蛋白質発現抑制を示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示す。

【図10】miR582の上記標的遺伝子に対するsiRNAを導入することにより、ヒト膀胱癌細胞株の増殖抑制を示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示し、縦軸の値は、NCに対する比として表している。

10

20

30

40

50

【図11】miR582の上記標的遺伝子に対するsiRNAを導入することにより、ヒト膀胱癌細胞株の浸潤抑制を示す図である。図中、「NC」は陰性対照を示し、縦軸の値は、NCに対する比として表している。

【図12】膀胱癌のヒト臨床検体におけるmiR582の発現量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明を、好ましい実施態様（以下、「本実施の形態」と略すことがある。）に基づいて具体的に説明するが、本発明の範囲は下記に説明する特定の態様に限定されない。また、本明細書及び配列表において、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、該配列ないし対応する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が理解されるべきである。

10

【0018】

本発明は、後記の実施例で示すとおり、「miR582」が、（1）癌細胞、特に膀胱癌細胞の増殖を抑制する機能を有すること、（2）癌細胞、特に膀胱癌細胞の浸潤又は転移を抑制する機能を有すること、（3）ヒト膀胱癌患者の癌組織で発現が低下していることの発見及び実証に基づいて、「miR582」及びその機能的類似物を、癌治療剤の有効成分として利用することを意図する。

1. 有効成分

20

a. 配列番号1又は2で示される核酸及び機能的類似物

有効成分に関する本実施の形態としては、まず、配列番号1（以下、「miR582-5p」と呼ぶことがある。）又は配列番号2（以下、「miR582-3p」と呼ぶことがある。）で表されるヌクレオチド配列から成る核酸が挙げられる。それらの核酸は、本発明の最も典型的な有効成分である。加えて、当該核酸の機能的類似物もまた、本発明の有効成分として使用可能である。

【0019】

つまり、本明細書において、「機能的類似物」の用語は、ヌクレオチド配列、高次構造、又は化学構造のいずれか又はその組合せにおいて天然型配列とは完全に一致しないが、以下で説明する本発明の所望の生理活性の少なくともいずれか一つを示し得る核酸を指す。例えば、本実施の態様における機能的類似物は、前記配列番号1又は2のいずれかと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、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列から成る核酸を含む。

30

【0020】

なお、ヌクレオチド配列の「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。例えば、ヌクレオチド配列の同一性は、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、（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=ON）の条件にて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。

40

【0021】

本実施の態様における別の好適な機能的類似物は、配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列に対して1もしくは複数のヌクレオチドが欠失、置換、挿入又は付加されたヌクレオチド配列から成り得る。そのようなヌクレオチド配列としては、例えば、

50

- (1) 配列番号1又は配列番号2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又は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又は配列番号2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又は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又は配列番号2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又は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又は配列番号2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又は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、又は
 (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又は2個))

が挙げられる。

【0022】

b. 部分配列

本実施の態様における機能的類似物はまた、配列番号1又は配列番号2の「部分配列」から成ることが好ましい。本実施の形態に関連する「部分配列」とは、miRNAが標的遺伝子を認識するのに必要な最小限のヌクレオチド配列を含む核酸を意味する。この最小限のヌクレオチド配列はシード配列としてその存在がよく知られている(Proc. Natl. Acad. Sci., 104: 19291-6 (2007))。つまり、miRNAにおいてはシード配列と呼ばれる5'末端から2～8番目の塩基配列が非常に重要で、miRNAの標的となるmRNAの多くはその3'非翻訳領域にこのシード配列と相補的な配列を持っている。これにより、miRNAはそのシード配列と相補的な配列を持っている特定のmRNAを認識しその機能を抑制する。また、シード配列は7塩基という短い配列で構成されているため、1つのmiRNAがシード配列と相補的な配列を持っている複数のmRNAを標的にして、本来のmiRNA活性を発揮することが可能となる。例えば、配列番号1のシード配列としては、3' - U G A C A U U - 5' が挙げられる。また、配列番号2のシード配列としては、3' - G G U C A A U - 5' が挙げられる。従って、本実施の形態における有効成分は、配列番号1又は2の上記シード配列から成るか、或いは当該シード配列を含む連続する15塩基以上、より好ましくは17塩基以上、よりいっそう好ましくは19塩基以上、最も好ましくは20塩基を有してよい。

【0023】

c. 核酸の長さ及び構造

一方、本実施の形態における核酸及び機能的類似物(以下、当該核酸と機能的類似物をまとめて「本発明の核酸」または「本実施の形態における核酸」等ということがある。)は、後述する本発明の所望の活性のうちの少なくとも一つ以上を示す限り、その長さには上限はない。しかし、合成の容易さや抗原性の問題等を考慮すると、本実施の形態における核酸の長さは、上限としては、例えば200塩基以下、好ましくは130塩基以下、より好ましくは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7塩基以上、典型的には15塩基以上、好ましくは、17塩基以上である。なお、本明細書において、核酸がヘアピンループ型の構造をとることにより部分的に2本鎖構造を形成する場合であっても、その核酸の長さは一本鎖の長さとして計算するものとする。

【0024】

つまり、本実施の形態における核酸は1本鎖核酸に限定されず、2本鎖の形態であってよい。2本鎖の態様には、2本鎖RNA、2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及びキメラ核酸/DNAハイブリッドが含まれる。なお、キメラ核酸とは、1本鎖又は2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又はキメラ核酸でもう一方の鎖がDNA又はキメラ核酸である核酸をいう。総じて、本実施の形態における核酸は、好ましくは1本鎖RNA、1

10

20

30

40

50

本鎖キメラ核酸、2本鎖RNA、2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又はキメラ核酸/DNAハイブリッドであり、より好ましくは1本鎖RNA、1本鎖キメラ核酸、2本鎖RNA、2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又はRNA/キメラ核酸ハイブリッドであり、さらに好ましくは2本鎖RNA、2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又はキメラ核酸/DNAハイブリッドであり、特に好ましくは2本鎖RNAである。

【0025】

d. 「miR582」分子

上記配列番号1で表されるヌクレオチド配列から成る核酸と配列番号2で表されるヌクレオチド配列から成る核酸により構成される2本鎖形態のRNA(式(I))は、「成熟型miR582」として公知である(非特許文献3)。

【化1】

式(I)

5' -UUACAGUUGUUCAACCAGUUACU-3' (配列番号1)

3' -CCAAGUCAACAAGUUGGUCAAU-5' (配列番号2)

したがって、本実施の形態の有効成分は、上記成熟型miR582であってよい。

【0026】

e. 「miR582」の前駆体

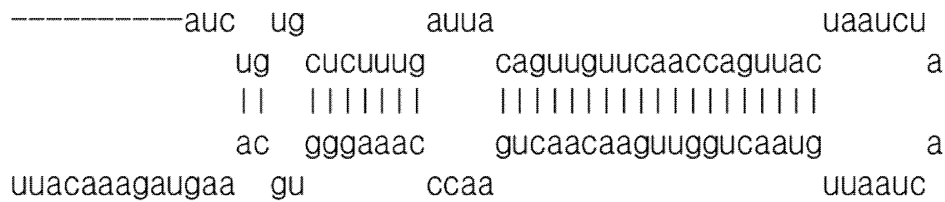
本実施の形態の有効成分は、miR582の前駆体でもあり得る。miR582の前駆体とは、細胞内のプロセシングや2本鎖核酸の開裂の結果として、細胞内において成熟型miR582を生じ得る核酸を意味する。具体的には、miR582のpri-miRNAやpre-miRNA等を挙げることができる。pri-miRNAはmiRNA遺伝子の一次転写産物(1本鎖RNA)であり、通常数百~数千塩基程度の長さを有する。pre-miRNAは、pri-miRNAが細胞内プロセシングを受けることにより生じるヘアピン構造を有する1本鎖RNAであり、通常90~110塩基の長さを有する。miR582のpri-miRNAやpre-miRNA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。miR582の好適なpre-miRNAとしては、「MI0003589」として知られるヌクレオチド配列からなる1本鎖RNAを挙げることが出来る。

【0027】

また、pre-miRNAと類似の構造をとるものとして、例えば、配列番号1又は配列番号2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が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2本鎖構造の形状を有する核酸も本実施の形態における核酸の好ましい態様の1つである。上記「MI0003589」を例にとって説明すると、本実施の形態における好ましい核酸は、下記の式(II)(配列番号3)で表される構造をとってよい。

【化2】

式 (I I)



【0028】

10

本実施の形態における核酸は、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、又は化学的に合成することにより、又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。さらに適宜市販されている核酸を用いることも可能である。そのような市販品の一つは、「Human miRIDIAN microRNA Mimic」（製品名、Dharmacon社）として入手可能である。

【0029】

f. 修飾された核酸

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場合がある。従って、本実施の形態における核酸には、各種分解酵素に対して抵抗性となるように修飾された核酸（以下、「修飾体」と呼ぶことがある。）も含まれる（例えば、Curr. Top. Med. Chem., 6: 913 - 25 (2006) 及び Mol. Biosyst., 6: 862 - 70 (2010) 参照。）。具体的には、前記の核酸のいずれかを、後述する本発明の所望の生理活性の全てが損なわれることのないように修飾したものが本実施の形態における核酸に含まれる。当該修飾体の例としては、糖鎖部分が修飾されているもの（例えば、2' - Oメチル化）、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、核酸自体を修飾してもよい。核酸自体を修飾するとは、例えば、その5'端又は3'端にコレステロール、ビタミン等の脂質性物質や蛍光物質の付加を施すことが挙げられる。また、例えば、miR582と同一の領域と、その配列と60%～100%未満相補的である相補領域とを含む合成核酸であってもよい。或いは、国際公開第W02006/627171号パンフレットに記載のような合成RNA分子としてもよい。

20

30

【0030】

また、本実施の形態における核酸は、5'又は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。

【0031】

40

本実施の形態における核酸の好ましい態様としては、配列番号1又は配列番号2からなる核酸、成熟型miR582、その前駆体等の核酸を挙げることができる。本実施の形態における核酸の好ましい別の態様としては、成熟型miR582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miR582を模倣するように合成された、「miR582 mimic Human miRIDIAN microRNA Mimic」（製品名、Dharmacon社）などを使用することができる。また、その他の例として、Pre-miR^TM miRNA precursor molecule（Life Technologies社製）が挙げられる。

【0032】

g. 核酸の活性

50

本実施の形態における核酸は、癌細胞内へ取り込まれると、癌細胞の浸潤増殖抑制活性、癌細胞の転移を抑制する作用を示し得る。また、当該作用は、本実施の形態における核酸がタンパク質発現抑制活性を有することに起因するものと考えられる。従って、本実施の形態における核酸は、少なくともタンパク質発現抑制活性を有する必要がある。タンパク質発現抑制には、標的mRNAの発現を抑制すること（この作用をRNA発現抑制活性と呼ぶことがある）、及び標的mRNAの翻訳を阻害することが含まれる。前記標的mRNAの発現を抑制することには、転写されて生成した標的mRNAを分解し、結果として標的mRNAの発現量を減少させることが含まれる。より特定的には、本実施の形態において、「miR582活性を有する核酸」を本実施の形態における医薬に使用することが好ましい。ここで、「miR582活性」とは、いずれかの天然型「miR582」分子の標的となり得るmRNAに関連するタンパク質のうちの少なくとも一つの発現を抑制する活性であり、典型的な例としては当該mRNAのうちの少なくとも一つの発現を抑制する活性を言う。しかして、本実施の形態の「miR582活性を有する核酸」は、天然型「miR582」分子の標的mRNAに関連するタンパク質のうちの少なくとも一つの発現を抑制するか、或いは当該mRNAのうちの少なくとも一つの発現を抑制する核酸であればよい。天然型「miR582」が発現を抑制する標的mRNAとしては、例えばPGGT1B (Gene ID 5229)、LRRK2 (Gene ID 120892)、DIXDC1 (Gene ID 85458)、RAB27A (Gene ID 5873)、KCNC1 (Gene ID 3746)、TEX19 (Gene ID 400629)、又はASGR1 (Gene ID 432)が挙げられる。

10

20

【0033】

従って、本実施の形態における「miR582活性を有する核酸」の具体例は、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1やRAB27A等を標的mRNAとし、その発現を抑制する核酸であり得る。当該「miR582活性を有する核酸」が、LRRK2の発現を抑制することが好ましく、LRRK2及びDIXDC1の発現を抑制することがより好ましく、LRRK2、DIXDC1、及びRAB27Aの発現を抑制することがさらに好ましく、LRRK2、DIXDC1、RAB27A及びPGGT1Bの発現を抑制することがさらに好ましく、LRRK2、DIXDC1、RAB27A、PGGT1B及びKCNC1の発現を抑制することが最も好ましい。

【0034】

より特定の態様に言及すれば、本実施の形態では、核酸がmiR582であり、それによりPGGT1Bの発現を抑制することが好ましい。また、miR582を用いてPGGT1B及びLRRK2の発現を抑制することがより好ましく、PGGT1B、LRRK2、及びDIXDC1の発現を抑制することがさらに好ましく、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、及びRAB27Aの発現を抑制することがさらにいっそう好ましく、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1、RAB27A、KCNC1の発現を抑制することが最も好ましい。また、別の特定の態様では、核酸としてmiR582-5pを用いて、LRRK2の発現を抑制することが好ましく、LRRK2及びDIXDC1の発現を抑制することがより好ましく、LRRK2、DIXDC1、及びRAB27Aの発現を抑制することがさらに好ましく、LRRK2、DIXDC1、RAB27A、及びKCNC1の発現を抑制することが特に好ましい。さらに別の特定の態様では、核酸としてmiR582-3pを用いて、LRRK2の発現を抑制することが好ましく、LRRK2及びDIXDC1の発現を抑制することがより好ましく、LRRK2、DIXDC1、及びKCNC1の発現を抑制することが最も好ましい。

30

40

【0035】

なお、本実施の形態における「miR582活性を有する核酸」が、miR582の標的mRNAに関連するタンパク質のうちの少なくとも一つの発現を抑制する機序としては、標的mRNAの発現を抑制すること、標的mRNAの翻訳を抑制することのほかに、miR582の標的タンパクの機能を抑制することであってもよい。要は、本実施の形態における核酸が、miR582の標的mRNAに関連するタンパク質又は当該mRNAの発

50

現等を実質的に抑制すればよい。例えば、本実施の形態における核酸が、標的 mRNA に関連するタンパク質又は当該 mRNA の発現を少なくとも 10% 以上抑制すれば、当該核酸が標的 mRNA に関連するタンパク質又は当該 mRNA の発現を実質的に抑制したと見做し得る。本実施の形態における核酸が miR582 の標的 mRNA に関連するタンパク質又は当該 mRNA の発現を 20% 以上抑制することが好ましく、30% 以上抑制することがより好ましく、40% 以上抑制することがさらに好ましく、50% 以上抑制することが特に好ましく、60% 以上抑制することが最も好ましい。発現抑制能は、例えば本明細書の実施例 7 乃至 9 のいずれかに記載の方法により確認することができる。

【0036】

一方で、本実施の形態における「miR582 活性を有する核酸」が、天然型 miR582 の標的 mRNA のうちの少なくとも一つと実質的にハイブリッドを形成することが必要十分条件とも言い得る。例えば、本実施の形態における「miR582 活性を有する核酸」が、その標的 mRNA のうちの少なくとも一つと、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、25℃ の条件下でハイブリッドを形成し得るならば、当該核酸はその標的 mRNA のうちの少なくとも一つと実質的にハイブリッドを形成したと見做し得る。天然型 miR582 がハイブリッドを形成する標的 mRNA としては、例えば PGGT1B、LRRK2、DIXDC1 や RAB27A が挙げられる。

【0037】

従って、本実施の形態における「miR582 活性を有する核酸」が、PGGT1B とハイブリッドを形成することが好ましく、PGGT1B 及び DIXDC1 とハイブリッドを形成することがより好ましく、PGGT1B、DIXDC1、及び LRRK2 とハイブリッドを形成することがさらに好ましく、PGGT1B、DIXDC1、LRRK2、及び RAB27A とハイブリッドを形成することが最も好ましい。

【0038】

より特定の態様に言及すれば、本実施の形態では、核酸が miR582-5p 又は miR582 であり、それらが PGGT1B とハイブリッドを形成することが好ましく、PGGT1B 及び DIXDC1 とハイブリッドを形成することがより好ましく、PGGT1B、DIXDC1、及び LRRK2 とハイブリッドを形成することがさらに好ましく、PGGT1B、DIXDC1、LRRK2、及び RAB27A とハイブリッドを形成することが特に好ましい。また、別の特定の態様では、核酸が miR582-3p であり、それが PGGT1B とハイブリッドを形成することが好ましく、PGGT1B 及び DIXDC1 とハイブリッドを形成することがより好ましく、PGGT1B、DIXDC1、及び LRRK2 とハイブリッドを形成することがさらに好ましい。なお、ハイブリッド形成能は、例えば本明細書の実施例 6 乃至 8 に記載の方法により確認することができる。

【0039】

h. 治療 / 予防対象

本実施の形態における治療対象の癌細胞は、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）の癌細胞である。そのような癌の種類は、miR582 の発現が減少している癌であれば特に限定されないが、例えば、膀胱癌、乳癌、肺癌、肺臓癌、前立腺癌、骨肉腫、食道癌、肝臓癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、尿管腫瘍、脳腫瘍、胆嚢癌、胆管癌、胆道癌、腎癌、卵巣癌、子宮頸癌、甲状腺癌、睾丸腫瘍、カポジ肉腫、上顎癌、舌癌、口唇癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、筋肉腫、皮膚癌などの固形癌、骨髄腫、又は白血病等が例示される。治療の対象となる癌としては、膀胱癌が好ましく、転移性の膀胱癌がより好ましい。また、治療の対象となる膀胱癌としては、グレード 2 又はグレード 3 の膀胱癌であることが好ましく、グレード 2 の膀胱癌であることがより好ましい。また、一態様として、グレード 3 の膀胱癌を好適に治療し得る。

【0040】

より特定の態様について言及すれば、本実施の形態における医薬が癌の細胞増殖を阻害する活性を有するか否かは、上記治療 / 予防対象の癌細胞株を用いることにより確認して

10

20

30

40

50

もよい。特に、本実施の形態における医薬が膀胱癌の細胞増殖を阻害する活性を有するか否かは、本明細書の実施例3や実施例5に記載の、UM-UC-3細胞のような膀胱癌細胞株を用いることにより確認してもよい。さらに、本実施の形態における医薬が癌細胞の浸潤能を阻害する活性を有するか否かについても、本明細書の実施例4や実施例5に記載のUM-UC-3細胞のような浸潤性の高い膀胱癌細胞株を用いることにより確認してもよい。

【0041】

i. 医薬

本実施の形態における医薬は、有効量の本実施の形態における核酸に加え、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。

10

【0042】

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、ペ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。

【0043】

本実施の形態における核酸の癌細胞内への導入を促進するために、本実施の形態における医薬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、リボソーム、ナノパーティクル、リポフェクチン、リプフェクタミン、DOGS(トランスフェクタム)、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、或いはポリエチレンイミン等の陽イオン性脂質等を用いることが出来る。

20

【0044】

本実施の形態における医薬をアテロコラーゲンに含ませることにより、標的となる癌細胞に本実施の形態における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。

30

【0045】

本実施の形態における医薬は、経口的に又は非経口的に、哺乳動物に対して投与することが可能であるが、非経口的に投与するのが望ましい。

【0046】

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、水性及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、水性及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或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、有効成分及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又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出来る。また、膀胱癌の治療に用いるための製剤は、経尿道的に投与される局所注入剤とすることも好ましい。

40

【0047】

本実施の形態における医薬組成物中の核酸の含有量は、例えば、医薬組成物全体の約0.1ないし100重量%が例示される。

【0048】

本実施の形態における医薬の投与量は、投与の目的、投与方法、癌の種類、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、核酸の量として 1 pmol/kg 以上 10 nmol/kg 以下、全身投

50

与では $2 \text{ nmol} / \text{kg}$ 以上 $200 \text{ nmol} / \text{kg}$ 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。

【0049】

本実施の形態における医薬は、その有効成分である本実施の形態における核酸が癌組織（癌細胞）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。

【0050】

本実施の形態における核酸は、癌の細胞増殖を抑制する活性を有する。本実施の形態における医薬を、癌の患者等に対して投与することにより、癌疾患を治療することが出来る。また、本実施の形態における核酸が、癌細胞の浸潤能を阻害する活性を有することも好ましい。本実施の形態における医薬を、癌患者や、転移リスクを有する癌の治療後の患者等に対して投与することにより、癌の浸潤、転移を抑制し、癌の浸潤、転移に起因する疾患を治療又は予防することが出来る。従って、本実施の形態における医薬は、癌の治療剤として極めて有用である。

【0051】

なお、本明細書にいう「転移抑制」とは、癌細胞が原発巣から異なる部位へ到達し、該部位において癌を二次的に生じることを抑制することを意味する。

【0052】

前記のとおり、本実施の形態における医薬が適用し得る癌としては、miR582の発現が減少している癌であれば特に限定されないが、例えば、乳癌、肺癌、肺臓癌、前立腺癌、骨肉腫、食道癌、肝臓癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、尿管腫瘍、脳腫瘍、胆嚢癌、胆管癌、胆道癌、腎癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、甲状腺癌、睾丸腫瘍、カポジ肉腫、上顎癌、舌癌、口唇癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、筋肉腫、皮膚癌、網膜芽腫などの固形癌、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。膀胱癌や転移性の癌に対して本実施の形態における医薬を適用することが好ましい例として挙げられる。

【0053】

転移性癌としては、例えば、乳癌、肺癌、肺臓癌、前立腺癌、腎癌、多発性骨髄腫、甲状腺癌、腺癌、白血病及びリンパ腫を含む血液細胞悪性腫瘍、頭頸部癌、胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、肝癌を含む消化管癌、卵巣癌、子宮内膜癌及び子宮頸癌を含む女性生殖管の悪性腫瘍、膀胱癌、神経芽細胞腫を含む脳腫瘍、肉腫、骨肉腫及び悪性黒色腫、並びに扁平上皮癌を含む皮膚癌などの転移性癌が例示できる。膀胱癌の転移性癌に対して本実施の形態における医薬を適用することが好ましい例として挙げられる。また、癌の転移に起因する疾患としては、例えば、転移性癌、癌の増大や癌性胸膜炎による呼吸不全等が挙げられる。

【0054】

本実施の形態における医薬は、他の抗癌剤と併用することができる。他の抗癌剤としては、例えば、タキサン類等の微小管作用剤だけでなく、代謝拮抗剤、DNAアルキル化剤、DNA結合剤（白金製剤）、抗癌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、シクロホスファミド、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、メシル酸イマニチブ、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。

【0055】

2. 本実施の形態における医薬の治療効果を予測する方法

本実施の形態としては、癌におけるmiR582の発現レベルを測定すること、及び当該発現レベルが癌では正常組織と比較して低下することに基づき、本実施の形態における医薬の治療効果を予測する方法ないし医師が当該予測を行うことを補助する方法（以下、それらの両方法をまとめて「予測方法」等と略すことがある。）が挙げられる。

【0056】

10

20

30

40

50

本実施の形態における予測方法においては、本実施の形態における医薬投与前に測定対象患者から摘出された癌組織もしくは癌細胞におけるmiR582の発現レベルが測定される。また、本明細書の実施例2にあるようにmiR582の染色体領域のコピー数を測定することにより、miR582の発現レベルを推定することも可能である。本実施の形態における予測方法を適用することの出来る癌の種類としては、上記「h. 治療/予防対象」の項において詳述されている癌を挙げることが出来る。本実施の形態における予測方法は、好ましくは膀胱癌に対して適用できる。

【0057】

本実施の形態における予測方法において発現レベルが測定されるmiR582には、配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列、成熟型miR582、pri-miRNA及びpre-miRNAが含まれるが、好ましくは、これら全ての型の発現レベルの合計又は配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列又は成熟型の発現レベル、より好ましくは配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列の発現レベルが測定される。

10

【0058】

例えば、miR582の発現レベルは、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、ノザンプロッティング、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。又は、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。

20

【0059】

miR582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又は配列番号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又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。同じく、miR582活性を有する核酸を検出し得る核酸プローブとしても、配列番号1、配列番号2又はそれらと相補的な配列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又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。

【0060】

30

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： ^{125}I 、 ^{31}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等）、酵素（例： α -ガラクトシダーゼ、 α -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。或いは、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。

40

【0061】

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。核酸プローブ又はプライマーは、例えば、配列番号1、配列番号2又はそれらと相補的な配列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。

【0062】

上記のようにして測定されたmiR582の発現レベルに基づいて、癌の治療効果が予測される。後述の実施例に示すように、膀胱癌では正常膀胱組織と比較してmiR582の発現レベルが低下する。従って、上記予測は膀胱癌と正常組織におけるmiR582の発現レベルの違いに基づき行われる。

50

【 0 0 6 3 】

例えば、本実施の形態における予測は、膀胱癌患者から抗癌治療を行う前に癌組織を摘出し（又は癌細胞を得て）、癌組織周辺の癌ではない組織と癌組織におけるmiR582の発現レベルを比較することで行い得る。発現レベルの比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。そして、miR582の発現レベルの比較結果より、癌組織におけるmiR582の発現レベルが相対的に低い場合は、miR582又はmiR582活性を有する核酸を抗癌剤として用いる癌治療或いはmiR582の発現レベルを上昇させる抗癌治療が有効であると予測することができる。逆に、測定対象のmiR582の発現レベルが相対的に高い場合にはmiR582又はmiR582活性を有する核酸を抗癌剤として用いる癌治療、或いはmiR582の発現レベルを上昇させる抗癌治療が有効ではないと予測することができる。

10

【 0 0 6 4 】

本実施の形態における医薬の治療対象としては、癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが低下している膀胱癌の患者が望ましいため、本実施の形態における予測方法は、本実施の形態における医薬による治療効果が期待できる患者、特に当該膀胱癌患者の選別に有用である。具体的には、本実施の形態における予測方法で選別される患者としては、その患者の癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが、正常細胞におけるmiR582の発現レベルに比して、75%以下であることが例示され、50%以下であることが好ましく、25%以下であることがより好ましい。

【 0 0 6 5 】

また、同様に、膀胱癌患者から摘出された癌組織及びその周辺の癌ではない正常組織及びにおけるmiR582のゲノム領域のコピー数を比較し、miR582の発現レベルを推定することで、本実施の形態における予測方法を実施し得る。miR582のゲノム領域のコピー数の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。そして、miR582のゲノム領域のコピー数の比較結果より、測定対象のmiR582のゲノム領域のコピー数が、正常組織に対して、癌組織において相対的に少なくなる場合には、治療効果が高い癌組織であると予測することができる。逆に、測定対象のmiR582のゲノム領域のコピー数が、癌組織においても正常組織と同等以上である場合には、治療効果の低い癌組織であると予測することができる。

20

【 0 0 6 6 】

具体的には、本実施の形態における医薬の治療対象としては、癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582のゲノム領域のコピー数が、正常細胞におけるmiR582のゲノム領域のコピー数に比して、75%以下であることが例示され、50%以下であることが好ましく、25%以下であることがより好ましい。

30

【 0 0 6 7 】

上記の説明から明らかなように本実施の形態は、上述のmiR582又はmiR582活性を有する核酸を特異的に検出し得る核酸プローブを含む、本実施の形態における医薬の治療効果を予測するための組成物（以下、「本実施の形態における組成物」と呼ぶことがある。）を提供するものである。本実施の形態における組成物は、抗癌剤の治療効果を予測するためのキットであり得る。本実施の形態における組成物を用いることにより、上述の予測方法により容易に本実施の形態における医薬の治療効果について予測することができる。

40

【 0 0 6 8 】

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、或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、本実施の形態における組成物に含まれる。

【 0 0 6 9 】

本実施の形態における組成物はまた、miR582又はmiR582活性を有する核酸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、ノザンプロッティングや核酸アレイを測定に用いる場合には、本実施の形

50

態における組成物は、プロットング緩衝液、標識化試薬、プロット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、本実施の形態における組成物は、標識化試薬、発色基質等をさらに含むことができる。

【0070】

3. 本実施の形態における医薬の治療効果を判定する方法

本実施の形態としては、癌におけるmiR582の発現レベルを測定すること、及び当該発現レベルが癌では正常組織と比較して低下することに基づき、本実施の形態における医薬の治療効果を判定する方法ないし医師が当該判定を行うことを補助する方法（以下、それらの両方法をまとめて「判定方法」等と略すことがある。）が挙げられる。

【0071】

本実施の形態における判定方法においては、測定対象患者から摘出された癌の癌組織もしくは癌細胞におけるmiR582の発現レベルが測定される。また、後記実施例2にあるようにmiR582の染色体領域のコピー数を測定することによりmiR582の発現レベルを推定することも可能である。本実施の形態における判定方法を適用することの出来る癌の種類としては、「h. 治療/予防対象」の項において詳述されている癌を挙げることが出来る。本実施の形態における判定方法は、好ましくは膀胱癌に対して適用できる。

【0072】

本実施の形態における判定方法において発現レベルが測定されるmiR582には、配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列、成熟型miR582、pri-miRNA及びpre-miRNAが含まれるが、好ましくは、これら全ての型の発現レベルの合計又は配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列又は成熟型の発現レベル、より好ましくは配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列の発現レベルが測定される。

【0073】

例えば、miR582の発現レベルは、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、ノザンプロットング、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。又は、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。

【0074】

miR582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、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又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。同じく、miR582活性を有する核酸を検出し得る核酸プローブとしても、配列番号1、配列番号2又はそれらと相補的な配列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又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。

【0075】

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： ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等）、酵素（例：ーガラクトシダーゼ、ーグルコシダーゼ、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。或いは、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。

10

20

30

40

50

【0076】

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。核酸プローブ又はプライマーは、例えば、配列番号1、配列番号2又はそれらと相補的な配列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。

【0077】

上記のようにして測定されたmiR582の発現レベルに基づいて、抗癌剤の治療効果が判定される。後述の実施例に示すように、膀胱癌では正常膀胱組織と比較してmiR582の発現レベルが低下する。従って、上記判定は膀胱癌と正常組織におけるmiR582の発現レベルの違いに基づき行われる。

10

【0078】

例えば、膀胱癌患者から抗癌治療を行う前に癌組織を摘出し（又は癌細胞を得て）、癌組織周辺の癌ではない組織（ネガティブコントロール）及び、癌組織（ポジティブコントロール）と、同一患者の抗癌治療を行った後に摘出した癌組織におけるmiR582の発現レベルを比較することで本実施の形態における判定方法を行い得る。発現レベルの比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。そして、miR582の発現レベルの比較結果より、測定対象のmiR582の発現レベルが治療を行うことにより、治療前と比較して相対的に高くなっていた場合には、行われている抗癌治療が有効であると判定することができる。逆に、測定対象のmiR582の発現レベルが相対的に低くなる場合には、行われている抗癌治療が有効ではないと判定することができる。

20

【0079】

具体的には、行われている抗癌治療が有効であると判定する場合、抗癌治療前の癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが、正常細胞におけるmiR582の発現レベルに比して、75%以下であることが例示され、50%以下であることが好ましく、25%以下であることがより好ましい。また、癌治療後の癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが、癌治療前の癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルに比して、125%以上であることが例示され、150%以上であることが好ましく、200%以上であることがより好ましい。

【0080】

また、同様に、膀胱癌患者から摘出された抗癌治療を行う前の癌組織及び抗癌治療を行った後の癌組織におけるmiR582のゲノム領域のコピー数を比較し、発現レベルを推定することで、本実施の形態における予測方法を実施し得る。miR582のゲノム領域のコピー数の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。そして、miR582のゲノム領域のコピー数の比較結果より、測定対象のmiR582のゲノム領域のコピー数が抗癌治療を行う前の癌組織に対して抗癌治療を行なった後の癌組織において相対的に少なくなる場合には、治療効果が低い癌組織であると判定することができる。逆に、測定対象のmiR582のゲノム領域のコピー数が、抗癌治療を行う前の癌組織に対して抗癌治療を行なった後の癌組織において同等以上である場合には、治療効果が高い癌組織であると判定することができる。

30

【0081】

具体的には、行われている抗癌治療が有効であると判定する場合、抗癌治療前の癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582のゲノム領域のコピー数が、正常細胞におけるmiR582のゲノム領域のコピー数に比して、75%以下であることが例示され、50%以下であることが好ましく、25%以下であることがより好ましい。また、癌治療後の癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582のゲノム領域のコピー数が、癌治療前の癌組織（又は癌細胞）におけるゲノム領域のコピー数に比して、125%以上であることが例示され、150%以上であることが好ましく、200%以上であることがより好ましい。

40

【0082】

また、miR582又はmiR582活性を有する核酸が抗癌剤として投与された場合、投与された癌組織において同様にmiR582又はmiR582活性を有する核酸の量

50

を測定し、投与前の癌組織におけるmiR582の発現と比較して治療効果を判定することが可能である。即ち、miR582又はmiR582活性を有する核酸の投与後、癌組織において、miR582又はmiR582活性を有する核酸の量の増加が認められた場合、行われている抗癌治療が有効であると判定することができる。

【0083】

本実施の形態における医薬の治療対象としては、癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが低下している膀胱癌の患者が望ましいため、本実施の形態における判定方法は、本実施の形態における医薬による治療効果が得られた患者、特に当該膀胱癌患者の判断に有用である。

【0084】

上記の説明から明らかなように、本実施の形態は、上述のmiR582又はmiR582活性を有する核酸を特異的に検出し得る核酸プローブを含む、抗癌剤の治療効果を判定するための組成物（以下、「本実施の形態における組成物」と呼ぶことがある。）を提供するものである。本実施の形態における組成物は、本実施の形態における医薬の治療効果を判定するためのキットであり得る。本実施の形態における組成物を用いることにより、上述の判定方法により容易に本実施の形態における医薬の治療効果について判定することができる。

【0085】

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、或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、本実施の形態における組成物に含まれる。

【0086】

本実施の形態における組成物は、miR582又はmiR582活性を有する核酸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、ノザンプロットティングや核酸アレイを測定に用いる場合には、本実施の形態における組成物は、プロットティング緩衝液、標識化試薬、プ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、本実施の形態における組成物は、標識化試薬、発色基質等をさらに含むことができる。

【0087】

4. 癌治療の予後を判定する方法

本実施の形態としては、癌におけるmiR582の発現レベルを測定すること、及び当該発現レベルが癌では正常組織と比較して低下すること、或いはmiR582のゲノム領域のコピー数を測定し、miR582の発現量を予測することに基づき、癌治療の予後を判定する方法ないし医師が当該予後の判定を行うことを補助する方法（以下、それらの両方法をまとめて「予後判定方法」等と略すことがある。）が挙げられる。

【0088】

本実施の形態における予後判定方法においては、測定対象患者から摘出された癌の癌組織もしくは癌細胞におけるmiR582の発現レベルが測定される。また、miR582の染色体領域のコピー数を測定することによりmiR582の発現レベルを推定することも可能である。本実施の形態における予後判定方法を適用することの出来る癌の種類としては、上記「h. 治療/予防対象」の項において詳述されている癌を挙げることが出来る。本実施の形態における予後判定方法は、好ましくは膀胱癌に対して適用できる。

【0089】

本実施の形態における予後判定方法において発現レベルが測定されるmiR582には、配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列、成熟型miR582、pri-miRNA及びpre-miRNAが含まれるが、好ましくは、これら全ての型の発現レベルの合計又は配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列又は成熟型の発現レベル、より好ましくは配列番号1又は配列番号2で表されるヌクレオチド配列の発現レベルが測定される。

【0090】

例えば、miR582の発現レベルは、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、ノザンプロットティング、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。又は、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。

【0091】

miR582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又は配列番号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又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。

10

【0092】

また、miR582の発現レベルは該miRNAがコードされるゲノム領域のコピー数を測定することにより推定することが可能である。

【0093】

miR582がコードされるゲノム領域を特異的に検出し、コピー数を測定し得る核酸プローブとしては、例として、後記の配列番号4又は配列番号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又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。

【0094】

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： ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等）、酵素（例： α -ガラクトシダーゼ、 α -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。或いは、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。

20

【0095】

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。核酸プローブ又はプライマーは、例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号4又は配列番号5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。

【0096】

上記のようにして測定されたmiR582の発現レベルに基づいて、癌治療の予後が判定される。後述の実施例に示すように、膀胱癌では正常膀胱組織と比較してmiR582の発現レベルが低下する。従って、上記予測は膀胱癌と正常組織におけるmiR582の発現レベルの違い、或いはmiR582のゲノム領域のコピー数を測定し、miR582の発現量を推定することに基づき行われる。

40

【0097】

例えば、膀胱癌患者から癌組織を摘出し（又は癌細胞を得て）、癌組織周辺の癌ではない正常組織及び、癌組織におけるmiR582の発現レベルを比較することで本実施の形態における予後判定方法を行い得る。発現レベルの比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。そして、miR582の発現レベルの比較結果より、測定対象のmiR582の発現レベルが、正常組織に対して、癌組織において相対的に高くなる場合には、予後の良い癌組織であると判定することができる。逆に、測定対象のmiR582の発現レベルが相対的に低くなる場合には、予後の悪い癌組織であると判定することができる。

50

【0098】

具体的には、予後が悪いと判定する癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが、正常細胞におけるmiR582の発現レベルに比して、75%以下であることが例示され、50%以下であることが好ましく、25%以下であることがより好ましい。

【0099】

また、同様に、膀胱癌患者から摘出された癌組織及びその周辺の癌ではない正常組織及びにおけるmiR582のゲノム領域のコピー数を比較し発現レベルを推定することで、本実施の形態における予後判定方法を実施し得る。miR582のゲノム領域のコピー数の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。そして、miR582のゲノム領域のコピー数の比較結果より、測定対象のmiR582のゲノム領域のコピー数が、正常組織に対して、癌組織において相対的に少なくなる場合には、低いmiR582の発現レベルが予測され、予後の悪い癌組織であると判定することができる。逆に、測定対象のmiR582のゲノム領域のコピー数が正常組織と同等以上である場合には、高いmiR582の発現レベルが予測され、予後の良い癌組織であると判定することができる。

10

【0100】

具体的には、予後が悪いと判定する癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582のゲノム領域のコピー数が、正常細胞におけるmiR582のゲノム領域のコピー数に比して、75%以下であることが例示され、50%以下であることが好ましく、25%以下であることがより好ましい。

【0101】

本実施の形態における医薬の治療対象としては、癌組織（又は癌細胞）におけるmiR582の発現レベルが低下している膀胱癌の患者が望ましいため、本実施の形態における予後判定方法は、本実施の形態における医薬による治療の予後が良好な患者、特に当該膀胱癌患者の判定に有用である。

20

【0102】

上記の説明から明らかなように、本実施の形態は、上述のmiR582を特異的に検出し得る核酸プローブ、或いはmiR582のゲノム領域を特異的に検出しそのコピー数を測定し得る核酸プローブを含む、癌治療の予後を判定するための組成物（以下、「本実施の形態における組成物」と呼ぶことがある。）を提供するものである。本実施の形態における組成物は、癌治療の予後を判定するためのキットであり得る。本実施の形態における組成物を用いることにより、上述の判定方法により容易に癌治療の予後について判定することができる。

30

【0103】

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、或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、本実施の形態における組成物に含まれる。

【0104】

本実施の形態における組成物は、miR582の測定方法、或いはmiR582のゲノム領域のコピー数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、ノザンプロットティングや核酸アレイを測定に用いる場合には、本実施の形態における組成物は、プロットティング緩衝液、標識化試薬、プ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、本実施の形態における組成物は、標識化試薬、発色基質等をさらに含むことができる。

40

【0105】

5. 膀胱癌の増殖を抑制し得る物質、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質等を探索する方法

本実施の形態としては、被検物質がmiR582の発現を増強するか否かを評価することを含む、癌の増殖を抑制する物質を探索する方法、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得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が挙げられる。本実施

50

の形態における探索方法においては、miR582の発現を上方制御する物質が、癌の増殖を抑制し得る物質、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質として選択される。

【0106】

本実施の形態における探索方法に供される被検物質は、いかなる公知化合物及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、或いは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

【0107】

本実施の形態における、癌の増殖を抑制し得る物質を探索する方法は、以下の(1)～(3)の工程を含む：

10

(1) 被検物質と配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現を測定可能な細胞とを接触させる工程、

(2) 被検物質を接触させた細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を測定し、該発現量を被検物質を接触させない対照細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量と比較する工程、及び

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を上昇制御する被検物質を、癌の増殖を阻害し得る物質として選択する工程。

【0108】

また、本実施の形態における、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質を探索する方法は、以下の(1)～(3)の工程を含む：

20

(1) 被検物質と配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現を測定可能な細胞とを接触させる工程、

(2) 被検物質を接触させた細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を測定し、該発現量を被検物質を接触させない対照細胞における配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量と比較する工程、及び

(3) 上記(2)の比較結果に基づいて、配列番号1又は配列番号2に記載の核酸の発現量を上昇制御する被検物質を、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質として選択する工程。

【0109】

30

本実施の形態における探索方法において、発現レベルが測定される配列番号1又は配列番号2に記載の核酸には、成熟型miR582、pri-miRNA及びpre-miRNAが含まれるが、好ましくは、これら全ての型の発現レベルの合計又は成熟型の発現レベル、より好ましくは成熟型の発現レベルが測定される。

【0110】

「発現を測定可能な細胞」とは、測定対象のmiRNAの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miRNAを天然で発現可能な細胞が挙げられる。

【0111】

測定対象、即ちmiR582を天然で発現可能な細胞は、miR582を潜在的に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。miR582を天然で発現可能な細胞としては、例えば上記「h. 治療/予防対象」の項において詳述されている癌の細胞を挙げることができる。好ましくは、膀胱癌細胞であり、より好ましくは、転移性又は浸潤能の高い膀胱癌細胞である。

40

【0112】

被検物質とmiR582の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、miR582の発現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

50

時間である。

【0113】

miR582の発現量の測定は、「2.本実施の形態における医薬の治療効果を予測する方法」の項で述べた方法に従い行うことができる。

【0114】

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miR582の発現量は、被検物質を接触させた細胞におけるmiR582の発現量の測定に対し、事前に測定した発現量であっても、同時に測定した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発現量であることが好ましい。

10

【0115】

そして、比較の結果得られた、miR582の発現量を上方制御する物質が、癌細胞の増殖を抑制し得る物質、癌の転移又は癌細胞の浸潤能を阻害し得る物質として選択される。

【0116】

本実施の形態における探索方法で得られる化合物は、新たな癌の治療剤の開発のための候補物質として有用である。

【実施例】

【0117】

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。なお、本明細書において、特に断りのない限りヌクレオチド配列は5'から3'方向に向けて記載される。また、以下の実施例においては、配列番号1と配列番号2とが二本鎖を形成したRNA(式()参照)を「miR582」と略記する。また、配列番号1とその相補鎖とで二本鎖を形成し、さらに両鎖の3'末端に塩基「aa」が付加した二本鎖のRNAを「miR582-5p」と略記する。さらに、配列番号2とその相補鎖とで二本鎖を形成し、さらに両鎖の3'末端に塩基「aa」が付加した二本鎖のRNAを「miR582-3p」と略記する。

20

【0118】

〔実施例1〕膀胱癌細胞におけるmiR582の発現

ヒト膀胱癌細胞株UM-UC-3、5637、T24及びHT1376、並びにヒト膀胱移行上皮性乳頭腫細胞株RT4及びマウス膀胱癌細胞MBT2細胞から、RNAを、QIAzol(製品名、Invitrogen社)とmiRNeasy Mini Kit(製品名、Qiagen)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って精製した。ヒト膀胱癌細胞のRNAはAmbion社のHuman Bladder Total RNAを用いた。miR582-5pとmiR582-3pの発現はTaqMan MicroRNA Assays(製品名、Applied Biosystems社)を用いて定量した。定量PCR反応はABI7300(製品名、Applied Biosystems社)を用い、内部標準にはヒトRNU6B(4373381、Applied Biosystems社)或いはhas-miR-103(Applied Biosystems社)を用いた。ヒト膀胱移行上皮性乳頭腫細胞株RT4及び正常膀胱細胞では、miR582-5p及びmiR582-3pの発現は高かった。膀胱癌細胞UM-UC-3、5637、HT1376及びMBT2では、全体的にmiR582-5p及びmiR582-3pの発現は低下しており、浸潤能の高い膀胱癌細胞株であるUM-UC-3、HT1376及びMBT2では明らかに発現が低下していた(図1)。T24は浸潤能の高い膀胱癌細胞株であるが、この細胞株ではmiR582-5p及びmiR582-3pの発現の著しい低下は認められなかった。

30

40

【0119】

以上の結果から、膀胱癌細胞では、miR582-5p及びmiR582-3pの発現が低下している割合が高い可能性が示唆された。

【0120】

50

〔実施例2〕miR582の染色体領域のコピー数の検討

ヒト膀胱癌細胞UM-UC-3、T24及びHT1376からゲノムDNAを、GenElute 哺乳動物用ゲノムDNAミニプレップキット(Sigma-Aldrich社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って抽出した。染色体5q12上のmiR582領域の定量PCRは、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(製品名、Invitrogen社)を用いて行った。定量PCRに用いたプライマー配列を配列番号4と配列番号5に示す。

【0121】

【化3】

CCACAACAAGTCAATCTGTGC (配列番号4)

TATTGAAGGGGGTTCTGGTG (配列番号5)

10

【0122】

内部標準にはRNase Pを用いて、TaqMan Copy Number Reference Assay RNase P(4403326、Applied Biosystems社)とPlatinum Quantitative PCR SuperMix-UDG(製品名、Invitrogen)で定量を行い、先のmiR582領域の定量PCRデータの補正を行った。定量を行った結果、T24及びHT1376と比較して、転移能及び浸潤能の高い膀胱癌細胞であるUM-UC-3では、miR582の染色体領域のコピー数は約半分に減少していた(図2)。以上の結果から、miR582の発現低下にはmiR582のゲノムのコピー数が関与している可能性が示唆された。

20

【0123】

〔実施例3〕miR582によるヒト膀胱癌細胞株UM-UC-3の増殖抑制活性

ヒト膀胱癌細胞株UM-UC-3の増殖抑制活性の確認には、miR582、miR582-5p及びmiR582-3pを用いた。それらは、いずれもBONAC社より購入した。ネガティブコントロールにはAllstars negative control siRNA(Qiagen)を用いた。UM-UC-3細胞株に上記の各miRNAを、各々25nMの濃度で、DharmaFECT1(Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入した。その細胞を、37、5% CO₂で24時間培養後、3,000細胞/wellで96穴プレートに播種し直した。さらに3日間培養後、生細胞数を、Tetra Color One Assay Kit(製品名、生化学工業社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って450nmの吸光度をEnvision(PerkinElmer社)で測定することで評価した。

30

【0124】

その結果、ネガティブコントロールに比べ、miR582、miR582-5p及びmiR582-3pを導入したUM-UC-3細胞株では、その細胞増殖が有意に抑制された(図3、p<0.01)。この結果から、miR582等は、膀胱癌細胞の増殖を抑制する活性を有することが明らかになった。

【0125】

〔実施例4〕miR582によるヒト膀胱癌細胞株UM-UC-3の浸潤抑制活性

UM-UC-3細胞株に、実施例3で用いたものと同様の、miR582、miR582-5p及びmiR582-3p、或いはAllstars negative control siRNA(Qiagen)を、各々25nMの濃度で、DharmaFECT1(Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入した。その細胞を、37、5% CO₂で24時間培養後、細胞浸潤アッセイに供した。当該アッセイは、24-well Biocoat Matrigel invasion chamber(8µm、Becton Dickinson社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って行った。詳細には、細胞を100,000細胞/wellで24穴プレートのアッパーチャンバーに播種し、ロアーチャンバーの培養液には終濃度10%でFBSを添加した。37、5% CO₂で24時間培養後、透過膜のアッパーチ

40

50

チャンパー側に付着した細胞をふき取り、ロアーチャンパー側に浸潤した細胞をディフ・クイック（シスメックス社）で固定、染色した。顕微鏡下でランダムな3視野における浸潤した細胞数をカウントし、各実験群における浸潤細胞数を求めた。

【0126】

その結果、コントロールに比べ、miR582、miR582-5p及びmiR582-3pを導入したUM-UC-3細胞株では、その細胞浸潤が有意に抑制された（図4、 $p < 0.01$ ）。この結果から、miR582等は、膀胱癌細胞の浸潤を抑制する活性を有することが明らかになった。

【0127】

〔実施例5〕miR582によるマウス膀胱癌モデルの治療効果

10

マウスに対して、ルシフェラーゼ遺伝子を発現するUM-UC-3細胞（UM-UC-3-LUC）の5,000,000細胞個を膀胱内投与して癌移植を行った。癌の増殖と転移は週に1回の頻度で、*in vivo imaging*により観察した。すなわち、D-luciferin（Promega社）を150mg/kgで腹腔内投与し10分間放置した後、癌組織における生物発光をIVIS Imaging System（Xenogen社）を用いて、製品に添付の方法に従ってフォトンカウントで検出し、癌の増殖を測定した。データ解析はLiving Image software（version 2.5、Xenogen社）で行った。癌移植後4日目に移植した癌の大きさを生物発光で測定し、群間で発光量が揃うようにマウスを2群に分けた。

【0128】

20

実施例3で用いたものと同様のmiR-582、或いはmiR582-scrambleコントロール（配列番号6と配列番号7）とLIC101（日本新薬）とを1:16（w/w）の比で用いて複合体形成させた。当該複合体を、癌移植後、5、7、9、11、13、15日目に、経尿道的に10 μ g（核酸量）/70 μ lで投与した。生物発光観察は、癌移植後1、2、3、4週間目に行い、癌の大きさを測定した。

【0129】

【化4】

UACGUACGUCGUCUAAUUAUCU （配列番号6）

AUUAUUAGACGACGUACGACC （配列番号7）

30

【0130】

その結果、3週目からmiR-582投与群で癌組織の増殖抑制が観察され、4週目にはscrambleコントロール投与群と比較して有意な癌の増殖抑制が観察された（図5、 $p < 0.05$ ）。また、癌移植後28日目にマウスを屠殺し、肺に転移したUM-UC-3-LUCの検出を、生物発光を指標に行った。その結果、Scrambleコントロール投与群では8匹中5匹のマウスで転移（metastasis）を認めたが、miR582投与群では10匹中1匹のマウスでしか転移が認められなかった（表1）。

【0131】

【表1】

40

	Metastasis (%)
Scramble	5/8 (63)
miR-582	1/10 (10)

【0132】

また、肺に転移したUM-UC-3-LUCの定量を、生物発光を指標に行った結果、

50

scrambleコントロール投与群と比較してmiR582投与群で有意な発光低下を観察した(図6、 $p < 0.05$)。

【0133】

以上の結果から、miR582は動物モデルにおいても膀胱癌細胞の増殖と転移を抑制する活性を有することが明らかになった。

【0134】

〔実施例6〕miR582の標的遺伝子の予測

miR582の標的遺伝子を同定するため、以下の実験を行い、各実験において標的候補遺伝子を抽出した。

1) 下記の実験に用いる安定発現細胞を以下のように樹立した。pHA-hAGO2-Puro(RA703A-1、SBI)はVirapower Packaging Mix(K4975-00、Invitrogen)と共に、製品に添付のプロトコールに従ってL293T細胞へトランスフェクトした。その細胞を37、5% CO₂で48時間培養後、培養上清を回収しウイルス溶液とした。製品に添付のプロトコールに従ってウイルスをUM-UC-3細胞に感染させ、2μg/mlのpuromycin存在下で、37、5% CO₂で2週間培養し、HA-AGO2を安定的に発現するUM-UC-3/HA-AGO2を得た。Pre-miR582配列は配列番号8と配列番号9をプライマーに用いて、HT1376細胞株のゲノムDNAからPCR増幅させ、pCDH-CMV-MCS-EF1-GreenPuro cDNA cloning and expression Vector(CD513B-1、SBI)のEcoRIとBamHIサイトにクローニングした。

【0135】

【化5】

AAAGAATTTCGTATGTTGCTTCAAGTCATTC (配列番号8)

AAAGGATCCAAAGGCACCATGTAGCTTGTA (配列番号9)

【0136】

このプラスミドをVirapower Packaging Mix(K4975-00、Invitrogen)と共に、製品に添付のプロトコールに従ってL293T細胞へトランスフェクトした。その細胞を37、5% CO₂で48時間培養後、培養上清を回収しウイルス溶液とした。製品に添付のプロトコールに従ってウイルスをUM-UC-3細胞に感染させ、2μg/mlのpuromycin存在下で、37、5% CO₂で2週間培養し、miR582を安定的に発現するUM-UC-3/miR582を得た。Lenti-scramble shRNA(MZIP000PA-1、SBI)はVirapower Packaging Mix(K4975-00、Invitrogen)と共に、製品に添付のプロトコールに従ってL293T細胞へトランスフェクトした。その細胞を37、5% CO₂で48時間培養後、培養上清を回収しウイルス溶液とした。製品に添付のプロトコールに従ってウイルスをUM-UC-3細胞に感染させ、2μg/mlのpuromycin存在下で、37、5% CO₂で2週間培養し、scrambleコントロールのshRNAを安定的に発現するUM-UC-3/shNCを得た。

【0137】

2) HA-AGO2を発現するUM-UC-3細胞にmiR582或いはコントロールsiRNA(Allstars negative control siRNA、Qiagen)を、各々25nMの濃度で、Dharmafect1(Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入し、37、5% CO₂で48時間培養した。その後RIP-assay kit for microRNA(MBL社)と抗HAアガロースビーズ(和光純薬社)を用いてRNA-結合タンパク質免疫沈降(RIP)を行った。AGO2に結合したRNAをHAペプチド(和光純薬社)で溶出し、QIAzol(Invitrogen社)とmiRNeasy Mini Kit(

Qiagen)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って抽出、精製した。得られたRNAはLow Input Quick Amp Labeling Kit, one color (Agilent社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従いCy3で標識し、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K (製品名、Agilent社)にハイブリダイズさせ、マイクロアレイデータを取得した。得られたマイクロアレイデータはGeneSpring GX11.5 (トミーデジタル)で解析を行った。その結果、AGO2とmiR582と複合体を形成したmiR582の標的候補遺伝子を9,266遺伝子同定した。

【0138】

3) UM-UC-3細胞にmiR582、或いはAllstars negative control siRNAを、各々25nMの濃度で、DharmaFECT1 (Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入した。その細胞を、37、5% CO₂で48時間培養後、各々の細胞からRNAを、QIAzol (Invitrogen社)とmiRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って抽出、精製した。得られたRNAは、製品に添付のプロトコールに従い、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one color (製品名、Agilent社)を用いてCy3で標識し、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K (製品名、Agilent社)にハイブリダイズさせ、マイクロアレイデータを取得した。得られたマイクロアレイデータはGeneSpring GX11.5 (トミーデジタル)で解析を行った。miR582をトランスフェクトしたUM-UC-3細胞とAllstars siRNAをトランスフェクトしたUM-UC-3細胞の発現データを比較し、miR582を導入したUM-UC-3細胞で発現低下している遺伝子をmiR582の標的候補遺伝子として7,399遺伝子を同定した。

【0139】

4) UM-UC-3/miR582とUM-UC-3/shNCの各々からRNAを、QIAzol (Invitrogen社)とmiRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って抽出、精製した。得られたRNAは、製品に添付のプロトコールに従い、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one color (製品名、Agilent)を用いてCy3で標識し、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K (製品名、Agilent)にハイブリダイズさせ、マイクロアレイデータを取得した。得られたマイクロアレイデータはGeneSpring GX11.5 (トミーデジタル)で解析を行った。UM-UC-3 miR582細胞とUM-UC-3 shNC細胞の発現データを比較し、UM-UC-3 miR582細胞で発現低下している遺伝子をmiR582の標的候補遺伝子として10,203遺伝子を同定した。

【0140】

5) miR582の直接の標的となる候補遺伝子群として、上記2、3)と4)の群間で重複した259遺伝子(直接標的候補遺伝子群I)を抽出した。その中で癌との関連性が文献等で示唆されている遺伝子は38遺伝子存在し、さらに癌の増殖、浸潤、転移との関連性が文献等で示唆されている遺伝子を19遺伝子抽出した。

【0141】

6) miR582の間接的な標的となる候補遺伝子群として、上記3)と4)の群間で重複し、かつ上記2)とは重複しない遺伝子を1,559遺伝子抽出した(間接標的候補遺伝子群I)。さらに上記3)の実験で発現変動量が2倍以上でP value < 0.05、かつ、上記4)の実験で発現変動量が1.7倍以上でp value < 0.05であった遺伝子を7遺伝子抽出した。

【0142】

7) TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)を行い、miR582-5pの予想標的遺伝子、スコア上位50遺伝子とmiR58

10

20

30

40

50

2 - 3 pの予想標的遺伝子、スコア上位50遺伝子、計100遺伝子を抽出し、癌の増殖、浸潤、転移との関連性が文献等で示唆されている遺伝子を35遺伝子抽出し、上記5)の直接標的遺伝子群I 或いは6)の関節標的遺伝子群Iと重複する遺伝子を20遺伝子抽出した。

【0143】

8) 上記、5)、6)、7)で最終的に抽出された46遺伝子をmiR582の標的遺伝子と予測した。

【0144】

〔実施例7〕miR582の標的遺伝子の同定

実施例6でmiR582の標的遺伝子と予測した46遺伝子のうち、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1及びRAB27A遺伝子の5種について、その遺伝子発現をmiR582が導入されたUM-UC-3細胞で検討した。実施例3で用いたものと同様のmiR582、miR582-5p及びmiR582-3p、或いはコントロールsiRNA(Allstars negative control siRNA、Qiagen)を、各々25nMの濃度で、Dharmafect1(Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入した。その後、37℃、5%CO₂で24時間培養したUM-UC-3細胞からRNAを、QIAzol(Invitrogen社)とmiRNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って抽出、精製した。得られたRNAから、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(製品名、Applied Biosystems社)を用いて、添付のプロトコールに従ってcDNAを合成した。cDNAについて、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(前出)を用いて定量PCRを行って各遺伝子の定量を行った。内部標準には アクチンを用いて、各遺伝子の発現データの標準化を行った。定量PCRに用いた各プライマー配列は、KCNC1については配列番号10と配列番号11、PGGT1Bについては配列番号12と配列番号13、LRRK2については配列番号14と配列番号15、RAB27Aについては配列番号16と配列番号17、DIXDC1については配列番号18と配列番号19、そして アクチンについては配列番号20と配列番号21に示す。

【0145】

【化6】

ATCTGGGCGCTCTTCGAG (配列番号10)

TCGATCTCCGTCTTGTTTAC (配列番号11)

AGCGCTATTCTTCACTCGAGAC (配列番号12)

CCTGCAGGGAATAAATCCAC (配列番号13)

GGGCTACAACCGGAAAAATAC (配列番号14)

TGATGTCCCAAACGGTCAAG (配列番号15)

AAGAGGAGGAAGCCATAGCAC (配列番号16)

CCATTGGCAGCACTAGTTTC (配列番号17)

TACGAAGGGCAACAAAGGTC (配列番号18)

AATGGACTCGCTCTTTGCAC (配列番号19)

GGCACCACCATGTACCCTG (配列番号20)

CACGGAGTACTTGCGCTCAG (配列番号21)

【0146】

その結果、KCNC1、LRRK2、DIXDC1は、miR582、miR582-5p及びmiR582-3pをUM-UC-3細胞にトランスフェクトすることによりそ

の発現が有意に減少した(図7、 $p < 0.01$)。RAB27AはmiR582及びmiR582-5pをUM-UC-3細胞にトランスフェクトすることによりその発現が有意に減少した($p < 0.01$)(図7)。PGGT1Bは、miR582をUM-UC-3細胞にトランスフェクトすることによりその発現が有意に減少した(図8、 $p < 0.01$)。また、miR582-5pでは発現を抑制する傾向にあった(図7)。

【0147】

以上の結果から、KCNC1、LRRK2、DIXDC1は、miR582を構成するmiR582-5p及びmiR582-3pの両配列の標的遺伝子であるが、RAB27AはmiR582を構成するmiR582-5pの標的遺伝子であることが示された。PGGT1BはmiR582を構成するmiR582-5pの標的遺伝子である可能性が示された。

10

【0148】

〔実施例8〕miR582の標的遺伝子の発現抑制機構の解析

KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1及びRAB27A遺伝子の3'-UTR領域を、ヒトゲノムDNAからPCRで増幅し、psiCHECK-2プラスミド(Promega社)のNotIとXhoIサイトにクローニングした。KCNC1の3'-UTR領域(KCNC1-#1; KCNC1 mRNA内の位置、3,955-5,450bp)の増幅に用いたPCRプライマーは配列番号22と配列番号23に、KCNC1の3'-UTR領域(KCNC1-#2; KCNC1 mRNA内の位置、5,712-6,698bp)の増幅に用いたPCRプライマーは配列番号24と配列番号25に示す。PGGT1Bの3'-UTR領域(PGGT1B mRNA内の位置、1,178-2,713bp)の増幅に用いたPCRプライマーは配列番号26と配列番号27に、LRRK2の3'-UTR領域(LRRK2 mRNA内の位置、7,777-9,130bp)の増幅に用いた配列番号28と配列番号29に、RAB27Aの3'-UTR領域(RAB27A mRNA内の位置、1,988-2,533bp)の増幅に用いた配列番号30と配列番号31に示す。DIXDC1の3'-UTR領域(DIXDC1-#1; DIXDC1 mRNA内の位置、2,908-4,420bp)の増幅に用いたPCRプライマーは配列番号32と配列番号33に、DIXDC1の3'-UTR領域(DIXDC1-#2; DIXDC1 mRNA内の位置、5,465-5,890bp)の増幅に用いたPCRプライマーは配列番号34と配列番号35に示す。

20

30

【0149】

【化7】

GCTCGAGTAACCCAGAGTTCTTCCCATTCA	(配列番号22)	
GCGGCCGCAAAGTCAGCACAGCTGGCTTTT	(配列番号23)	
GCTCGAGTAAGCTCTTTTTTGACCAGGATGG	(配列番号24)	
GCGGCCGCAATCTGGTACATACCGGCAGTT	(配列番号25)	
GCTCGAGTAAGGGGGATTGTAGCATAACTG	(配列番号26)	
GCGGCCGCAATACTTTTTTCCCCCACCATCA	(配列番号27)	
GCTCGAGTAATCACATGGAAAGGGTACTCACA	(配列番号28)	
GCGGCCGCAACAATGAAAGAGATAACACTGGAACA	(配列番号29)	10
GCTCGAGTAAGATGTTTCATATTGAAGCAGTCACA	(配列番号30)	
GCGGCCGCAATGGGAGTAGTGGAAGGACAG	(配列番号31)	
GCTCGAGTAATGAATTGTTGCTTGGATGGA	(配列番号32)	
GCGGCCGCAATGTTTGCTGAGAGAAAACCTGACA	(配列番号33)	
GCTCGAGTAACCACAGGTAATGACCAAGCA	(配列番号34)	20
GCGGCCGCAATGCAAACCCCATTTTATTCA	(配列番号35)	

【0150】

これらレポータープラスミド100ngと、各25nMの、実施例3で用いたものと同様のmiR582、miR582-5p及びmiR582-3p、或いはコントロールsiRNA(Allstars negative control siRNA、Qiagen)をUM-UC-3細胞に、Dharmafect Duo transfection試薬(Thermo Fisher Scientific社)を用いて、96穴プレート上でトランスフェクトした。細胞を37、5% CO₂で24時間培養後、Dual-Glo Luciferase assay system(Promega)を用いて、製品に添付のプロトコールに従ってデュアルルシフェラーゼアッセイを行った。レニラルシフェラーゼの値をホタルルシフェラーゼの値で補正し、レポーター活性を求めた。

【0151】

その結果、PGGT1B、LRRK2及びDIXDC1-#1は、miR582、miR582-5p及びmiR582-3pで有意にルシフェラーゼ活性が減少した(図8、 $p < 0.01$)。RAB27Aは、miR582及びmiR582-5pで有意にルシフェラーゼ活性が減少した(図8、 $p < 0.01$)。また、KCNC1-#1とKCNC1-#2は、いずれのmiRNA配列を用いてもルシフェラーゼ活性の減少は認められなかった。

【0152】

以上の結果から、PGGT1B、LRRK2及びDIXDC1の3'-UTRには、miR582、miR582-5p及びmiR582-3pのターゲット配列が存在することが明らかになった。RAB27Aの3'-UTRには、miR582-5pのターゲット配列が存在することが明らかになった。また、KCNC1の3'-UTRには、いずれのmiRNAのターゲット配列も存在せず、この遺伝子は間接的にmiR582で発現抑制を受けることが明らかになった。DIXDC1#2には、miR582-3pのターゲット配列の存在が予測されていたが、この配列は機能していないことが明らかになった。

【0153】

〔実施例9〕miR582による標的遺伝子の蛋白発現抑制

UM - UC - 3細胞に、miR582、或いはコントロールsiRNA (Allstars negative control siRNA、Qiagen)を、各々25nMの濃度でDharmaFECT1 (Thermo Fisher Scientific)を用いてトランスフェクションした。37、5% CO₂で48時間培養後、細胞を回収し、M - PER mammalian protein extraction reagent (製品名、Pierce社)を用いて細胞ライセートを調製した。ライセート中の細胞タンパクをSDS - PAGEで電気泳動し、定法に従ってWestern Blottingを行った。ブロッキング (Blocking ONE、03953 - 95、ナカライテスク社)を行った後、抗KCNC1抗体 (1 : 500希釈、ab84823、Abcam)、抗PGGT1B抗体 (1 : 500希釈、ab55615、Abcam)、抗LRRK2抗体 (1 : 500希釈、ab57329、Abcam)、抗DIXDC1抗体 (1 : 500希釈、ab67763、Abcam)及び抗RAB27A抗体 (1 : 200希釈、ab55667、Abcam)を1次抗体に使用した。HRP - linked anti - mouse secondary antibody (NA931V、GE Healthcare)は1 : 5000の希釈で2次抗体に用いた。目的蛋白質の検出はECL Plus Western blotting system (製品名、GEヘルスケア社)を用いて、LuminoImager (LAS - 3000、富士写真フィルム社)で行った。その結果、miR582をトランスフェクトしたUM - UC - 3細胞では、コントロールと比較してKCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1及びRAB27Aの蛋白量の減少が認められた (図9)。

10

20

【0154】

以上のことから、miR582は、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1及びRAB27Aを標的遺伝子とし、それら蛋白質の発現を抑制する活性があることが明らかになった。

【0155】

〔実施例10〕miR582標的遺伝子のノックダウンと膀胱癌細胞の増殖の抑制効果

下記、試験に用いたKCNC1のsiRNAの配列を配列番号36と配列番号37に、PGGT1BのsiRNA配列を配列番号38と配列番号39に、LRRK2のsiRNA配列を配列番号40と配列番号41に、RAB27AのsiRNA配列を配列番号42と配列番号43に、DIXDC1のsiRNA配列を配列番号44と配列番号45に示す。

30

【0156】

【化8】

c c a a c a a g g u a g a g u u c a u T T	(配列番号36)
a u g a a c u c u a c c u u g u u g g T T	(配列番号37)
g a g a c a a g c a g g u u g a c a a T T	(配列番号38)
u u g u c a a c c u g c u u g u c u c T T	(配列番号39)
g c a a a u g a a c u a a g a g a u a T T	(配列番号40)
u a u c u c u u a g u u c a u u u g c T T	(配列番号41)
g g a c c a g a g a g u a g u g a a a T T	(配列番号42)
u u u c a c u a c u c u c u g g u c c T T	(配列番号43)
g a a c a g a a c a g a a g g g a c a T T	(配列番号44)
u g u c c c u u c u g u u c u g u u c T T	(配列番号45)

40

【0157】

UM - UC - 3細胞株に、各siRNA或いはAllstars negative control siRNA (Qiagen)を25nMの濃度で、DharmaFECT1 (Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入した。37、5% CO₂で24時間培養後、細胞を3,000細胞/wellで96穴プレ

50

ートに播種し直した。その細胞をさらに3日間培養後、生細胞数を、Tetra Color One Assay Kit (生化学工業社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って450nmの吸光度をEnvision (PerkinElmer社)で測定することで評価した。その結果、コントロールに比べ、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1 或いはRAB27AのsiRNAを導入したUM-UC-3細胞株では、いずれもその細胞増殖が有意に抑制された(図10、 $p < 0.01$)。この結果から、miR582の標的遺伝子であるKCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1及びRAB27Aには、膀胱癌細胞の増殖を誘導する活性があることが明らかになった。

【0158】

〔実施例11〕miR582標的遺伝子のノックダウンと膀胱癌細胞の浸潤抑制効果

UM-UC-3細胞株に、KCNC1のsiRNA(配列番号36と配列番号37)、PGGT1BのsiRNA(配列番号38と配列番号39)、LRRK2のsiRNA(配列番号40と配列番号41)、RAB27AのsiRNA(配列番号42と配列番号43)、DIXDC1のsiRNA(配列番号44と配列番号45) 或いはAllstar s negative control siRNA(Qiagen)を25nMの濃度で、DharmaFECT1(Dharmacon社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って導入した。その細胞を37、5% CO₂で24時間培養し後、細胞浸潤アッセイを行った。当該アッセイは、24-well Biocoat Matrigel invasion chamber(8μm、Becton Dickinson社)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って行った。詳細には、細胞を100,000細胞/wellで24穴プレートの上チャンパーに播種した。ロアーチャンパーの培養液には終濃度10%でFBSを添加した。37、5% CO₂で24時間培養後、透過膜の上チャンパー側に付着した細胞をふき取り、ロアーチャンパー側に浸潤した細胞をディフ・クイック(シスメックス社)で固定、染色した。顕微鏡下でランダムな3視野における浸潤した細胞数をカウントし、各実験群における浸潤細胞数を求めた。

【0159】

その結果、コントロールに比べ、KCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1 或いはRAB27AのsiRNAを導入したUM-UC-3細胞株ではいずれにおいてもその細胞浸潤が有意に抑制された(図11、 $p < 0.01$)。この結果から、miR582の標的遺伝子であるKCNC1、PGGT1B、LRRK2、DIXDC1及びRAB27Aは、膀胱癌細胞の浸潤を誘導する活性があることが明らかになった。

【0160】

〔実施例12〕ヒト膀胱癌検体におけるmiR582の発現

29人の膀胱癌患者から経尿道的切除、或いは根治的膀胱切除術によってヒト膀胱組織を摘出し、検体とした。癌組織と正常上皮組織はホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、組織切片を作成し、顕微鏡観察を行い、レーザー・キャプチャー・ダイセクションで目的とする細胞を得た。得られた細胞からRNAを、QIAzol(Invitrogen)とmiRNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いて、製品に添付のプロトコールに従って精製した。miR582-5pとmiR582-3pの発現は、miRNA assays(Applied Biosystems社)を用いて定量した。定量PCR反応はABI7300(Applied Biosystems社)を用い、内部標準にはas-miR-103(Applied Biosystems社)を用いた。その結果、同一患者の非癌細胞と癌細胞でmiR582-5pとmiR582-3pの発現を比較すると、いずれも癌細胞では有意にそれらの発現が低下していた(図12中のグラフA、miR582-5pは $p < 0.0001$ 、miR582-3pは $p = 0.0003$)。また、miR582-5p 或いはmiR582-3pの癌細胞での発現低下が2.5倍以上の患者数を膀胱癌のグレード別に区分すると、いずれについても癌のグレードに伴い、発現が低下する患者の数が増えていく傾向にあることが判明した(図12中のグ

10

20

30

40

50

ラフ B、表 2)。

【 0 1 6 1 】

【表 2】

Down-regulation in clinical samples (Fold change>2.5)

	grade1	grade2	grade3
miR-582-5p	33%	50%	100%
miR-582-3p	22%	66.7%	85.7%

10

【 0 1 6 2 】

以上の結果から、ヒト膀胱癌組織において、miR582-5pとmiR582-3pは正常組織と比較してその発現が低下することが明らかになった。また、癌の進行とこれらのmiRNAの発現が負の相関している傾向にあることが明らかになった。

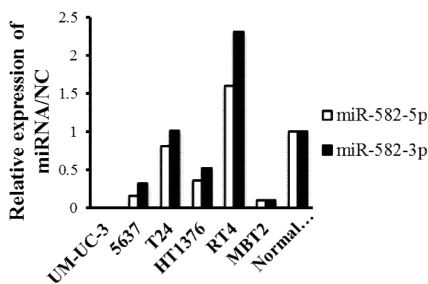
【産業上の利用可能性】

【 0 1 6 3 】

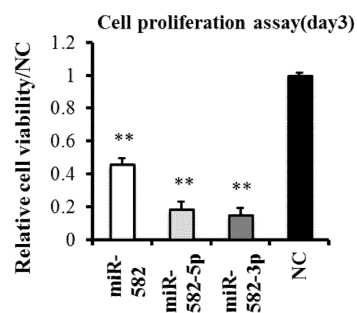
本発明の癌治療のための医薬は、癌、癌の転移に起因する疾患に対する治療や予防に有用である。本発明の方法により、癌や膀胱癌又はそれら癌の浸潤能又は転移能を判定することができ、癌や膀胱癌の治療効果や予後を判定するための剤、及び癌の増殖を抑制する作用を有する物質や、癌の転移を阻害する作用を有する物質のスクリーニング方法を提供することができる。

20

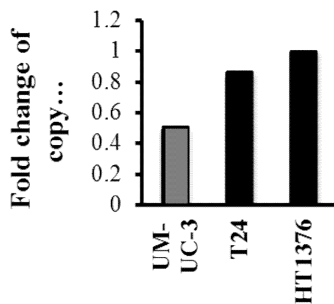
【 図 1 】



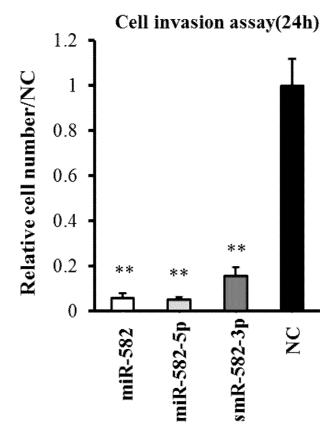
【 図 3 】



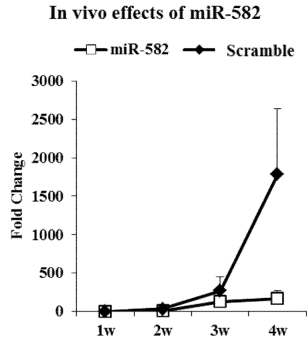
【 図 2 】



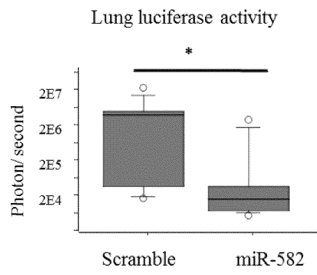
【 図 4 】



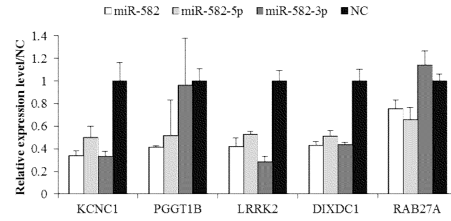
【 5 】



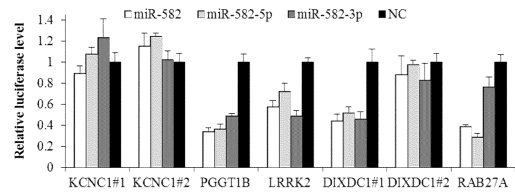
【 6 】



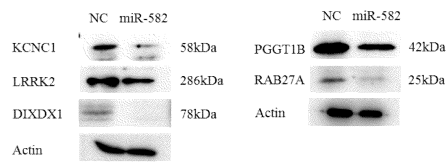
【 7 】



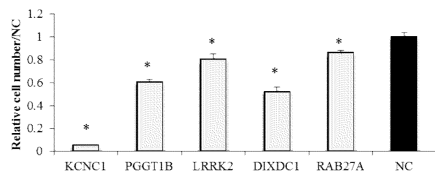
【 8 】



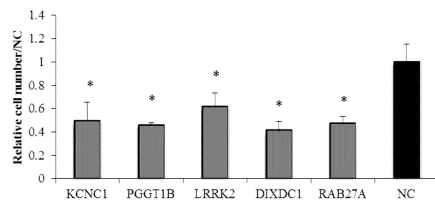
【 9 】



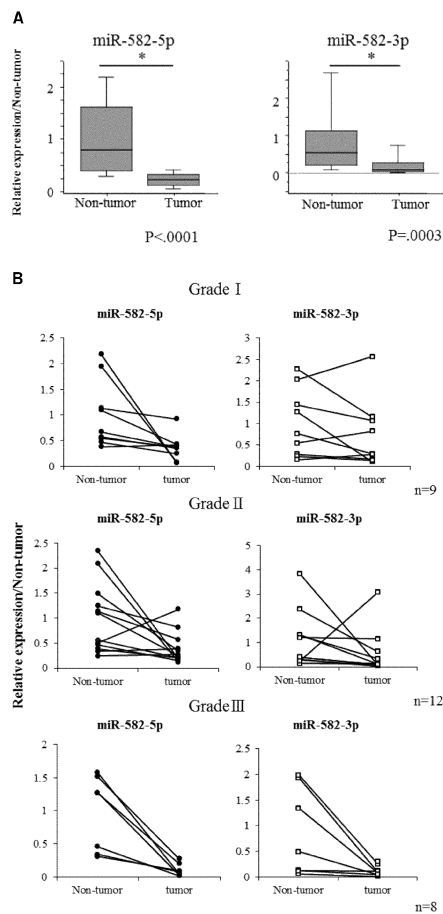
【 10 】



【 11 】



【 12 】



【配列表】

0005933010000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)		A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	P
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/00	A
		C 1 2 N 15/00	G

- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 230105223
弁護士 城山 康文
- (72)発明者 落谷 孝広
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
- (72)発明者 竹下 文隆
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
- 審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 UCHINO K et al , Therapeutic Effects of MicroRNA-582-5p and -3p on the Inhibition of Bladder Cancer Progression , Molecular Therapy , 2 0 1 3年 3月 , vol.21 , p.610-619
SETH S et al , RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer , Mol Ther , 2 0 1 1年 5月 , vol.19 , no.5 , p.928-935
HUANG L et al , MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3 , Int J Cancer , 2 0 1 1年 4月15日 , vol.128 , no.8 , p.1758-1769
LOPEZ JA et al , Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on SiHa cells proliferation apoptosis, migration a , Biochem Biophys Res Commun , 2 0 1 1年 6月10日 , vol.409 , no.3 , p.513-519
KUOKKANEN S et al , Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression , Biol Reprod , 2 0 1 0年 4月 , vol.82 , no.4 , p.791-801
ZHENG B et al , MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer , Clin Cancer Res , 2 0 1 1年12月 , vol.17 , no.24 , p.7574-7583
HURST CD , High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based copy , Oncogene , 2 0 0 4年 , vol.23 no.12 , p.2250-2263

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 ~ 3 1 / 8 0
A 6 1 K 4 8 / 0 0
A 6 1 P 1 / 0 0 ~ 4 3 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 6 8
G 0 1 N 3 3 / 0 0 ~ 3 3 / 9 8
C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
P u b M e d