

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6153932号
(P6153932)

(45) 発行日 平成29年6月28日(2017.6.28)

(24) 登録日 平成29年6月9日(2017.6.9)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z	
A 61 K 31/712 (2006.01)	A 61 K 31/712		
A 61 K 31/711 (2006.01)	A 61 K 31/711		
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		
C 12 N 15/113 (2010.01)	C 12 N 15/00	G	

請求項の数 12 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-529090 (P2014-529090)	(73) 特許権者	505043041
(86) (22) 出願日	平成24年9月7日(2012.9.7)	株式会社スリー・ディー・マトリックス	
(65) 公表番号	特表2014-527807 (P2014-527807A)	東京都千代田区麹町三丁目2番4号	
(43) 公表日	平成26年10月23日(2014.10.23)	(73) 特許権者	510097747
(86) 國際出願番号	PCT/IB2012/002626	国立研究開発法人国立がん研究センター	
(87) 國際公開番号	W02013/034989	東京都中央区築地五丁目1番1号	
(87) 國際公開日	平成25年3月14日(2013.3.14)	(74) 代理人	110001896
審査請求日	平成27年8月4日(2015.8.4)	特許業務法人朝日奈特許事務所	
(31) 優先権主張番号	61/531,942	(72) 発明者	落谷 孝広
(32) 優先日	平成23年9月7日(2011.9.7)	東京都中央区築地5-1-1-218	
(33) 優先権主張国	米国(US)	(72) 発明者	藤原 智洋
(31) 優先権主張番号	61/696,981	東京都中央区勝どき6-3-2-305	
(32) 優先日	平成24年9月5日(2012.9.5)	審査官	吉田 知美
(33) 優先権主張国	米国(US)		

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】骨肉腫のためのマイクロRNAに基づく方法およびアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

マイクロRNA(miRNA)、miR-133aに特異的なアンチセンス分子を有効量含む骨肉腫の治療剤。

【請求項2】

アンチセンス分子が安定化RNAである請求項1記載の治療剤。

【請求項3】

安定化RNAがロッド状核酸(LNA)オリゴヌクレオチドである請求項2記載の治療剤。

【請求項4】

アンチセンス分子がDNAである請求項1記載の治療剤。

【請求項5】

アンチセンス分子が、20~30ヌクレオチド長であり、
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (配列番号9) または
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (配列番号12)

に少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を含む請求項1記載の治療剤。

【請求項6】

アンチセンス分子が、21~30ヌクレオチド長であり、
5'-CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA-3' (配列番号9) または
5'-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3' (配列番号12)

10

20

に少なくとも 95% 同一なヌクレオチド配列を含む請求項 5 記載の治療剤。

【請求項 7】

アンチセンス分子の配列が、

5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 9) または

5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 12)

である請求項 6 記載の治療剤。

【請求項 8】

アンチセンス分子が核酸送達ビヒクルに関連付けられている請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の治療剤。

【請求項 9】

骨肉腫が転移性骨肉腫である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の治療剤。

10

【請求項 10】

抗がん治療に対する骨肉腫の抵抗性を評価する方法であって、

骨肉腫細胞を含む組織試料から CD133 を発現する細胞を単離する工程；

miR-1、miR-10b および miR-133a からなる群より選択される少なくとも 1 つのマイクロ RNA (miRNA) の該 CD133 発現細胞による第 1 の発現レベルを測定する工程；

該 CD133 発現細胞を抗がん療法と接触させる工程；ならびに

該少なくとも 1 つの miRNA の該 CD133 発現細胞による第 2 の発現レベルを測定する工程を含み、第 1 の発現レベルよりも高い第 2 の発現レベルが、その骨肉腫が抗がん療法に抵抗性であることを示す方法。

20

【請求項 11】

抗がん療法が、シスプラチン、ドキソルビシン、メトトレキサートおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

骨肉腫をモニタリングする方法であって、

(a) 骨肉腫を有する対象または骨肉腫の治療をしている対象から得られた組織試料において、miR-133a の発現レベルを特異的に定量することができるアッセイを行う工程；ならびに

(b) 対象由来の後に得られた組織試料において工程 (a) を繰り返す工程を含み、先に得られた試料におけるその miR-133a の発現レベルよりも高い後に得られた試料におけるその miR-133a の発現レベルが、その骨肉腫が進行性であることを示し、そして先に得られた試料におけるその miR-133a の発現レベルよりも低い後に得られた試料におけるその miR-133a の発現レベルが、その骨肉腫が退行性であることを示す工程

30

を含む骨肉腫をモニタリングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【関連出願の相互参照】

40

本出願は、2011年9月7日に出願された米国仮特許出願第 61/531,942 号および 2012 年 9 月 5 日に出願された米国仮特許出願第 61/696,981 号に基づく優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍が幹細胞様の性質を有する細胞の小集団を含むという証拠が増加している。しばしば「がん幹細胞」(CSCs) または「腫瘍開始細胞」(TICs) のいずれかと称されるこれらの細胞は、腫瘍の大部分の形成を負っている。これらの CSCs は、自己複製能および分化能の両方をもち、腫瘍の不均一性を生じさせると考えられている。さらに、それらは腫瘍の最も致死的特徴 - 薬物耐性や転移と関連付けられることが示されている。C

50

S C s の存在についての最初の証拠は、1994年の血液悪性腫瘍の研究によってもたらされた。より最近には、C S C s は、乳がん、脳腫瘍、皮膚がん、肺がん、大腸がん、胰臓がん、肝臓がん、頭部および頸部がん、前立腺がん、卵巣がん、ならびに胃がんなどの多数の固形がんにおいて同定されている。

【 0 0 0 3 】

骨肉腫は、最もよく見られる原発性骨悪性腫瘍であり、全ての小児悪性骨腫瘍の60%を占めている。多剤併用化学療法の導入前には、切断による長期生存率はわずか~20%であった。1970年代以来、化学療法と患肢温存手術との組み合わせが骨肉腫の主要な治療となっている。現在では、骨肉腫患者の5年生存は50%~80%であると報告されている。しかしながら、この生存率は、過去10年にわたって改善されておらず、骨肉腫患者の全く40%がそれらの疾患が原因で亡くなっている。

10

【 0 0 0 4 】

腫瘍形成において重要な分子を標的とすることは、「標的療法」として知られ、ここ10年のがん治療のエキサイティングな進展である。しかしながら、現在骨肉腫に利用できる標的療法は存在しない。したがって、新しい骨肉腫治療の開発が非常に必要とされている。

【 0 0 0 5 】

CD133は、AC133およびプロミニン1（PROM1）としても知られ、機能が分かっていない5-膜貫通糖タンパク質である。プロミニンファミリーの最初に同定されたメンバーが5-膜貫通糖タンパク質であった。1997年には、Yin et alが、AC133抗原、すなわちCD133のグリコシル化依存性エピトープを認識する新規なモノクローナル抗体を作製し、そして彼らは成人の血液由来のCD34陽性前駆細胞においてAC133の発現を検出した。CD133 cDNAは、細胞外N-末端、細胞質C-末端、およびN-結合グルコシル化のための8つのコンセンサス部位を含む2つの細胞外大ループを有する5-膜貫通ドメイン分子をコードする。CD133の特徴的な性質は、細胞分化のあいだのその迅速な下方調節である。この性質が、CD133を、いくつかの組織における幹細胞および前駆細胞の同定ならびに単離のためのユニークな細胞表面マーカーとしている。CSC理論によれば、CSCsは、正常な幹細胞の幹細胞マーカーのいくつかを発現する。したがって、CD133を独立して、または他の幹細胞もしくは前駆細胞マーカーと組み合わせて発現する腫瘍細胞は、CSCsに相当すると考えられる。しかしながら、これまで、CD133細胞表面マーカーを発現するCSCsの表現型の基礎にある分子的機序は、はっきりしていないままである。

20

【 0 0 0 6 】

マイクロRNAs（miRNA）は、最初に1993年にタンパク質非コード低分子RNAとして発見されたものであり、それらの標的遺伝子の発現を調節し、発達、分化、細胞増殖、アポトーシスおよびストレス応答などの様々な生理学的および病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たす低分子の制御RNAである。miRNAの生合成は、機能的に成熟したmiRNAを得るために、いくつかの転写後のプロセッシング段階が必要とされる。ここ数年にかけて、多くのmiRNAsが種々のヒトがんにおいて研究されている。miRNAsの発現の脱制御が、欠失、増幅、またはmiRNA遺伝子座に関する変異、エピジェネティックサイレンシング、特定のmiRNAを標的とする転写因子の異常調節、またはプロセッシングの阻害など種々の種類の機序によりがんの発達に寄与していることが示されている。miRNA発現プロファイリングは、有用な診断および予測ツールとしての重要性が増しており、多くの研究が、miRNAsはがん遺伝子または腫瘍抑制因子のいずれかとして作用するということを指摘している。

30

40

【 0 0 0 7 】

ヒトmiRNAs、miR-1およびmiR-133aは、同じ染色体領域に、1つにかたまって位置する。筋肉が強化される場合、前駆細胞の増殖を阻害し、ヒストンデアセチラーゼ4（HDAC4）および血清応答因子（SRF）それぞれを標的とすることにより筋形成を促進するのがmRNAsである。miR-1は、冠動脈疾患の個体において過

50

剥発現されることが報告されており、一方これらのm i R N A sは両方とも心臓肥大において低レベルで発現されていることが報告されている。多くの研究にもかかわらず、筋肉の生理学および疾患におけるそれらの重要性はなお不明なままである。最近は、m i R - 1 3 3 a (この名前はC D 1 3 3と何の関係もない)は、骨格筋の正常な発達と機能に重要でないとみなされている。しかしながら、これらのm i R N A sおよびC S C sとの間の関係は、これまで知られていない。

【0008】

ヒトm i R N A、m i R - 1 0 bは、高悪性度の悪性腫瘍と正に関連付けられることが見出された。この関係は、様々な種類のがんに当てはまる。m i R - 1 0 bは、高度の転移性のがんおよび/または浸潤性がんの2つのタイプの、ヒト肺臓腺がんおよびグリア芽腫において最も有意に上方調節されたm i R N A sの1つである。このm i R N Aは、細胞株として増殖されている転移性がん細胞、ならびに患者由来の転移性の乳房の腫瘍において高度に発現され、転移性ではないものと比較して転移性肝細胞がんにおいても上方調節されている。肉腫の発達におけるm i R - 1 0 bの重要性はこれまで報告されていない。

10

【発明の概要】

【0009】

本発明の1つの実施態様は、骨肉腫を治療する方法である。その方法は、それを必要とする対象に、m i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 aから選択されるマイクロR N A (m i R N A)に特異的なアンチセンス分子を有効量投与する工程を含む。

20

【0010】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、安定化R N Aである。

【0011】

1つの実施形態においては、安定化R N Aは、ロックド核酸 (L N A)オリゴヌクレオチドである。

【0012】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子はD N Aである。

【0013】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、20~30ヌクレオチド長であり、
5' - ACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号4)、
5' - ACAATTCTGGTTCTACAGGGT - 3' (配列番号5)または
5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号6)
に少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を含む。

30

【0014】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、21~30ヌクレオチド長であり、
5' - ACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号4)、
5' - ACAATTCTGGTTCTACAGGGT - 3' (配列番号5)または
5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号6)
に少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を含む。

40

【0015】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子の配列は、
5' - ACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号4)、
5' - ACAATTCTGGTTCTACAGGGT - 3' (配列番号5)または
5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号6)
である。

【0016】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、20~30ヌクレオチド長であり、
5' - AUACAUACUUCUUACAUUCCA - 3' (配列番号7)、
5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3' (配列番号8)、
5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号9)、

50

5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 10)、
 5' - CACAAATTGGTTCTACAGGGTA - 3' (配列番号 11) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 12)
 に少なくとも 90% 同一なヌクレオチド配列を含む。

【0017】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、21~30ヌクレオチド長であり、
 5' - AUACAUACUUUUACAUUCCA - 3' (配列番号 7)、
 5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3' (配列番号 8)、
 5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 9)、
 5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 10)、
 5' - CACAAATTGGTTCTACAGGGTA - 3' (配列番号 11) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 12) 10
 に少なくとも 95% 同一なヌクレオチド配列を含む。

【0018】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子の配列は、
 5' - AUACAUACUUUUACAUUCCA - 3' (配列番号 7)、
 5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3' (配列番号 8)、
 5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 9)、
 5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 10)、
 5' - CACAAATTGGTTCTACAGGGTA - 3' (配列番号 11) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 12) 20
 である。

【0019】

1つの実施形態においては、アンチセンス分子は核酸送達ビヒクルと関連付けられる。

【0020】

1つの実施形態においては、骨肉腫は転移性骨肉腫である。

【0021】

本発明の1つの実施態様は、5' - ACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 4)、
 5' - ACAAAATTGGTTCTACAGGGT - 3' (配列番号 5) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 6) に少なくとも 90% 同一なヌクレオ
 チド配列を含む 20~30 ヌクレオチド長の単離された核酸分子である。30

【0022】

1つの実施形態においては、単離された核酸分子は、21~30 ヌクレオチド長であり
 、5' - ACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 4)、
 5' - ACAAAATTGGTTCTACAGGGT - 3' (配列番号 5) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 6)
 に少なくとも 95% 同一なヌクレオチド配列を含む。

【0023】

1つの実施形態においては、単離された核酸分子の配列は、5' - ACATACTTCTTACATT
 CA - 3' (配列番号 4)、
 5' - ACAAAATTGGTTCTACAGGGT - 3' (配列番号 5) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 6) 40
 である。

【0024】

本発明の1つの実施態様は、5' - AUACAUACUUUUACAUUCCA - 3' (配列番号 7)、
 5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3' (配列番号 8)、
 5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 9)、
 5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 10)、
 5' - CACAAATTGGTTCTACAGGGTA - 3' (配列番号 11) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3' (配列番号 12) に少なくとも 90% 同一なヌクレ 50

オチド配列を含む 20 ~ 30 ヌクレオチド長の単離された核酸分子である。

【0025】

1つの実施形態においては、単離された核酸分子は、21 ~ 30 ヌクレオチド長であり、
 5' - AUACAUACUUCUUACAUCCA - 3' (配列番号 7)、
 5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3' (配列番号 8)、
 5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 9)、
 5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 10)、
 5' - CACAAATTCTGGTTCTACAGGGTA - 3' (配列番号 11) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 12)

に少なくとも 95 % 同一なヌクレオチド配列を含む。

10

【0026】

1つの実施形態においては、単離された核酸分子の配列は、
 5' - AUACAUACUUCUUACAUCCA - 3' (配列番号 7)、
 5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3' (配列番号 8)、
 5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 9)、
 5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 10)、
 5' - CACAAATTCTGGTTCTACAGGGTA - 3' (配列番号 11) または
 5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 12)

である。

20

【0027】

1つの実施形態においては、核酸分子は核酸送達ビヒクルと関連付けられる。

【0028】

本発明の1つの実施態様は、抗がん治療に対する骨肉腫の抵抗性を評価する方法である。その方法は、

骨肉腫細胞を含む組織試料を得る工程；

試料から CD133 を発現する細胞を単離する工程；

miR-1、miR-10b および miR-133a からなる群より選択される少なくとも 1 つのマイクロ RNA (miRNA) の CD133 発現細胞による第 1 の発現レベルを測定する工程；

その CD133 発現細胞を抗がん療法と接触させる工程；ならびに

30

その少なくとも 1 つの miRNA の CD133 発現細胞による第 2 の発現レベルを測定する工程であって、第 1 の発現レベルよりも高い第 2 の発現レベルが、その骨肉腫が抗がん療法に抵抗性であることを示す工程

を含む。

【0029】

1つの実施形態においては、抗がん療法は、シスプラチン、ドキソルビシン、メトトレキサートおよびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0030】

本発明の1つの実施態様は、骨肉腫のスクリーニング方法である。その方法は、対象由来の組織試料において、miR-1、miR-10b および miR-133a からなる群より選択される少なくとも 1 つのマイクロ RNA (miRNA) を特異的に検出できるアッセイを行う工程を含み、アッセイによる、少なくとも 1 つの miRNA の試料中における存在の検出が、対象が骨肉腫を有する危険性があることを示す。

40

【0031】

1つの実施形態においては、組織は血液である。

【0032】

1つの実施形態においては、組織は血清である。

【0033】

本発明の実施態様は、骨肉腫をモニタリングする方法である。その方法は、

(a) 骨肉腫を有する対象または骨肉腫の治療をしている対象から得られた組織試料にお

50

いて、m i R - 1、m i R - 1 0 b およびm i R - 1 3 3 a からなる群より選択される少なくとも1つのマイクロRNA (m i R N A) の発現レベルを特異的に定量することができるアッセイを行う工程；ならびに

(b) 対象由来の後に得られた組織試料において工程 (a) を繰り返す工程を含み、先に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i R N A の発現レベルよりも高い後に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i R N A の発現レベルが、その骨肉腫が進行性であることを示し、そして先に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i R N A の発現レベルよりも低い後に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i R N A の発現レベルが、その骨肉腫が退行性 (regressive) であることを示す。

【0034】

10

1つの実施形態においては、組織は血液である。

【0035】

1つの実施形態においては、組織は血清である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】CD 1 3 3 (X軸) およびCD 4 4 (Y軸) のそれらの発現に基づく、種々の示されたヒト骨肉腫細胞株の7つの代表的なF A C S 分析である。

【図2】CD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 SaOS 2 細胞の選択を示すF A C S 分析 (上パネル) ; CD 1 3 3 ^高 集団における1日目および8日目の非対称細胞分裂を示す4枚の顕微鏡写真 (中央パネル) ; および14日目の各集団に対するP K H 染色による2つのF A C S 分析 (下パネル) を含むコラージュである。スケールバー、50 mm。

20

【図3】新しく単離したCD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 HOS - G F P 細胞におけるスフェア形成アッセイを示す4枚の顕微鏡写真と棒グラフである。写真は、5日目に撮影し、各ウェルにおけるスフェアの数を計数した (n = 3 / 群、^{**} P < 0 . 0 1)。スケールバー、200 μ m。

【図4】CD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 SaOS 2 細胞集団の薬物感受性を示す棒グラフである。ドキソルビシン (D O X、0 . 0 3 μ M) 、シスプラチニン (C D D P、2 . 5 μ M) およびメトトレキサート (M T X、0 . 3 2 μ M) への相対生存細胞を分析した (n = 3 / 群、^{*} P < 0 . 0 5、^{**} P < 0 . 0 1)。

【図5】CD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 SaOS 2 細胞集団における浸潤アッセイを示す1対の顕微鏡写真および棒グラフである (n = 3 / 群、^{**} P < 0 . 0 1)。スケールバー、200 μ m。

30

【図6】CD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 SaOS 2 細胞集団の、幹細胞関連、多剤耐性トランスポーターおよび転移関連遺伝子の定量ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) 分析を示すグラフである。アクチンを内部対照として使用した。

【図7】CD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 HOS - 1 u c 細胞集団のマウスにおける腫瘍原性を示す8枚の写真画像である。CD 1 3 3 ^高 (動物の右大腿部) およびCD 1 3 3 ^低 (動物の左大腿部) HOS - 1 u c 細胞で異種移植された腫瘍の発光を、インビボイメージングシステム (I V I S) により同定した。CD 1 3 3 ^高 集団は、わずかに100個の細胞で腫瘍を形成した (n = 5 / 群)。

40

【図8】臨床骨肉腫標本におけるCD 1 3 3 ^高 細胞集団を示す1対のF A C S 分析である。

【図9】CD 1 3 3 発現に基づく骨肉腫患者に対する無転移生存率を示すグラフである。CD 1 3 3 の発現の高い患者は、60カ月よりも短い平均無転移生存率であった (n = 3 5、ログランク検定、P = 0 . 0 2 6 2)。

【図10】SaOS 2 およびHOSのCD 1 3 3 ^高 およびCD 1 3 3 ^低 細胞における上方調節および下方調節されたm i R N A s を示すベン図である。

【図11】SaOS 2 およびHOS細胞のCD 1 3 3 ^高 集団においてCD 1 3 3 ^低 集団と比較して上方調節されたm i R - 1、m i R - 1 0 b およびm i R - 1 3 3 a を示す棒グラフである (^{*} P < 0 . 0 5、^{**} P < 0 . 0 1、^{***} P < 0 . 0 0 1)。

50

【図12】m i R N AオリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 S a O S 2細胞におけるm i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 aの発現を、m i R - N C（陰性対照）オリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 S a O S 2細胞と比較して示すグラフである（ログスケール、n = 3 / 群、* P < 0 . 0 5、** P < 0 . 0 1、*** P < 0 . 0 0 1）。

【図13】m i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 a、またはN Cオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした精製C D 1 3 3 低 細胞における浸潤アッセイを示すグラフである（* P < 0 . 0 5、** P < 0 . 0 1、*** P < 0 . 0 0 1）。

【図14】m i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 a、またはm i R - N CオリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 細胞における薬物耐性を示すグラフである（M T X、メトトレキサート0 . 2 2 m M、* P < 0 . 0 5、** P < 0 . 0 1）。

【図15】C D 1 3 3 低 細胞におけるm i R - 1 3 3 aの安定な過剰発現に用いられるプラスミドベクターの略図である。N r u I、N o t I、X b a I：制限エンドヌクレアーゼ部位；P_{CMV}：サイトメガロウイルスプロモータ；M C S：多重クローニング部位；I V S：介在配列；I R E S：内部リボソーム侵入部位；H y g^r：ハイグロマイシン耐性遺伝子；S V 4 0 ポリA：S V 4 0 ポリA尾部。

【図16】m i R - 1 3 3 aを安定に発現するC D 1 3 3 低 H O S - 1 u c 細胞（右足）の腫瘍原性を、対照のC D 1 3 3 低 H O S - 1 u c 細胞（左足）と比較して示す4対の写真画像である。各部位は、示された細胞数（1 0²~1 0⁵）を注射され、発光評価は注射後90日で行った。

【図17】m i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 aオリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞におけるC D 1 3 3 メッセンジャーR N A（m R N A）の発現を示すグラフである。これらのm i R N Aの変化は、C D 1 3 3 発現レベルを変化させなかった。比較は、m i R - N C（陰性対照）オリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたC D 1 3 3 高 細胞に対して行った（n = 3 / 群）。

【図18】新たに切除した患者の生検のC D 1 3 3 高 集団におけるm i R - 1 3 3 aの発現を示すグラフである。

【図19】個々のm i R N A s およびm i R N A s の種々の組み合わせの、示されたm i R N A s でトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞の浸潤性に対する効果を示す一連の顕微鏡写真および関連棒グラフである。比較のために、C D 1 3 3 高 S a O S 2 細胞についてのデータも提示する。N C：陰性対照。

【図20】個々のm i R N A s およびm i R N A s の種々の組み合わせの、示されたm i R N A s でトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 M N N G / H O S 細胞の浸潤性に対する効果を示す一連の顕微鏡写真および関連棒グラフである。N C：陰性対照。

【図21】非トランスフェクトC D 1 3 3 高 S a O S 2 細胞および示されたm i R N A s でトランスフェクトしたC D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞の増殖を示す棒グラフである。N C：陰性対照。細胞は計数前4日間培養で維持された。

【図22】（左）1 4 3 B 細胞におけるドキソルビシン（D O X）およびシスプラチン（C D D P）によるC D 1 3 3 に関するm R N Aの誘導；（中央）1 4 3 B 細胞におけるD O Xによるm i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 aの誘導；（右）1 4 3 B 細胞におけるC D D Pによるm i R - 1、m i R - 1 0 bおよびm i R - 1 3 3 aの誘導を示す3つのグラフである（* P < 0 . 0 5、** P < 0 . 0 1、*** P < 0 . 0 0 1）。

【図23】シスプラチン（C D D P）処置C D 1 3 3 低 H O S - 1 u c 細胞のマウスにおける腫瘍原性を示す1対の並べた写真画像である。C D D P - 処置細胞（動物の右大腿部）および生理食塩水処置対照細胞（動物の左大腿部）で異種移植された腫瘍の発光を、インビボイメージングシステム（I V I S）により同定した。C D D P - 処置C D 1 3 3 低 細胞は、わずかに1 0 0 細胞で腫瘍を形成した（n = 5 / 群）。

【図24】ロックド核酸（L N A）- 1、L N A - 1 0 b、L N A - 1 3 3 a およびL N A - N CオリゴヌクレオチドでトランスフェクトしたC D 1 3 3 高 S a O S 2 細胞における

10

20

30

40

50

るm i R - 1、m i R - 1 0 b およびm i R - 1 3 3 発現のノックダウンを示すグラフである。

【図25】C D 1 3 3 高 および C D 1 3 3 低 細胞におけるL N A - 1 3 3 a およびL N A - N C (陰性対照) オリゴヌクレオチドのトランスフェクション後4日目の細胞増殖を示すグラフである (n = 3 / 群、***P < 0 . 0 0 1)。

【図26】(左) L N A - 1 3 3 a またはL N A - N C でのトランスフェクション24時間後に測定された、ドキソルビシン (D O X、0 . 4 μM、48 h) またはシスプラチニン (C D D P、5 μM、48 h) の存在下で培養された示した細胞種の細胞生存率；および(右) L N A - 1 3 3 a またはL N A - N C でのトランスフェクション24時間後に測定された、シスプラチニン (C D D P、5 μM、48 h) の存在下 (+) または非存在下 (-) で培養された示した細胞種におけるアポトーシスを起こした細胞の割合を示す対のグラフである。

【図27】示したL N A 処置S a O S 2 C D 1 3 3 高 および C D 1 3 3 低 集団 (n = 3 / 群、**P < 0 . 0 1) における浸潤アッセイを示すグラフである。

【図28】L N A - 1 3 3 a およびL N A - N C オリゴヌクレオチドでトランスフェクトされたC D 1 3 3 高 細胞における骨肉腫の幹細胞性、薬物耐性および転移と関連した遺伝子の定量ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) 分析を示すグラフである。アクチンを内部対照として使用した。

【図29】1 4 3 B - 1 u c - 保持マウスに対するL N A - 1 3 3 a (L N A) およびシスプラチニン (C D D P) 投与スケジュールを示す図である。I V I S : インビボイミーティングシステム。

【図30】L N A - 1 3 3 a の用量による1 4 3 B - 1 u c 脳腫におけるm i R - 1 3 3 a の発現を示すグラフである (n = 3 / 群)。

【図31】1 4 3 B - 1 u c 脳腫を保持し、生理食塩水単独、L N A - 1 3 3 a 単独、シスプラチニン (C D D P) 単独またはL N A - 1 3 3 + C D D P で処置したマウスにおけるm i R - 1 3 3 a の相対発現を示すグラフである。(*P < 0 . 0 5、***P < 0 . 0 0 1)。

【図32】1 4 3 B - 1 u c 脳腫を保持し、生理食塩水単独、L N A - 1 3 3 a 単独、シスプラチニン (C D D P) 単独またはL N A - 1 3 3 + C D D P で処置したマウスの、36日目の顕微鏡像を示す4枚の写真画像である。スケールバー、1 0 m m。

【図33】示した各処置群由来の、36日目での1 4 3 B - 1 u c 脳腫の重量を示すグラフである (**P < 0 . 0 1)。

【図34】1 4 3 B - 1 u c 脳腫を保持し、生理食塩水単独、L N A - 1 3 3 a 単独、シスプラチニン (C D D P) 単独またはL N A - 1 3 3 + C D D P で処置したマウスの生存率を示すグラフである。カプラン - マイヤー分析およびログランク検定 (n = 5 / 群、P = 0 . 0 0 1 3)。

【図35】m i R - 1 3 3 a の標的遺伝子を同定するために使用される戦略を示す図である。抗 - A g o 2 I P : 抗 - A g o 2 抗体免疫沈降。

【図36】相補的D N A (c D N A) マイクロアレイおよびコンピュータのデータベース分析による、m i R - 1 3 3 a の候補標的メッセンジャーR N A s (m R N A s) を示すベン図である。

【図37】1 0 種類のs i R N A s による、トランスフェクション72時間後のシスプラチニンの存在下、細胞トランスフェクションアレイにおける細胞増殖の阻害を示すグラフである (n = 3 / 群；N C : 陰性対照；**P < 0 . 0 1、***P < 0 . 0 0 1)。

【図38】1 0 種類のs i R N A s による、トランスフェクション72時間後の細胞トランスフェクションアレイにおける浸潤アッセイを示すグラフである (n = 3 / 群；N C : 陰性対照；*P < 0 . 0 5、**P < 0 . 0 1、***P < 0 . 0 0 1)。

【図39】示した推定m i R - 1 3 3 a 標的遺伝子について、m i R - 1 3 3 a オリゴヌクレオチドおよびルシフェラーゼレポーターで同時トランスフェクトされたS a O S 2 細胞におけるルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

【図40】定量的逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) による測定での、*miR-133a* の示した標的について、CD133 (CD133^高 対 CD133^低) およびメッセンジャーRNA (mRNA) の発現間の逆相関を示すグラフである。

【図41】定量的逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) による測定での、*miR-133a* オリゴヌクレオチドのトランスフェクション 48 時間後の CS133 低 SaOS2 細胞における示した *miR-133a* 標的遺伝子に関するメッセンジャーRNA (mRNA) の発現の減少を、*miR-NC* (陰性対照) オリゴヌクレオチドと比較して示すグラフである。

【図42】LNA-133a で処置したマウス由来の 143B-1uc 脳腫瘍における SGMS2 についてのメッセンジャーRNA (mRNA) の発現の増加を示すグラフである。 10

【図43】*miR-133a* 標的遺伝子、SGMS2、UBA2、SNX30、DUSP11、MAST4 および ANXA2 それぞれについてのセンサ付骨肉腫患者の無転移生存率を示す一連の 6 つのグラフである。*miR-133a* の直接標的 (DUSP11 以外) の低い発現は、予後不良と有意に相關した (カプラン - マイヤー分析およびログランク検定; P 値は示す通り)。

【発明を実施するための形態】

【0037】

がん幹細胞 (CSC) 仮説の提唱以来、骨肉腫のがん幹細胞を同定するためのいくつかの研究が行われている。これらの細胞は、足場非依存性、血清飢餓培養条件下スフェロイド状クローンで、Hoechst 33342 色素の排出に基づくサイド・ポピュレーション (SP) 細胞として、または細胞表面マーカーを用いてソートされる CD117 および stro-1 細胞として検出されている。これらの方法を考慮し、本発明者らは、ごく一部の骨肉腫細胞において高度に発現されるヒト CD133 のマウスホモログのプロミニン-1 を同定した。この CD133^高 画分由来の細胞は、足場非依存性環境においてクラスター・フェアを形成し、自己複製能および分化能を示し、幹細胞関連マーカーを発現し、そして CD133^低 画分と比較してより浸潤性を示した。 20

【0038】

骨肉腫 CSCs の表現型の特徴を受けて、本発明者らは、CD133^高 画分の細胞とそれより分化した子孫とを区別するいくつかの *miRNAs* の発現をプロファイルした。これらの *miRNAs* のうち、*miR-1*、*miR-10b*、*miR-133a* は、骨肉腫細胞の CD133^低 画分と比較して CD133^高 画分において上方調節されることが見出された。驚くべきことに、本発明者らは、これらの *miRNAs* が骨肉腫細胞の化学抵抗性および浸潤性を促進することを発見した。これらの所見は、*miR-1*、*miR-10b* および *miR-133a* が骨肉腫のがん幹細胞のレギュレーターであることを示唆する。特に、テイラード薬物送達システムとの組み合わせで、*miRNAs* を標的とする新規治療剤 (たとえば、アンチセンスヌクレオチド) は、メトトレキサート、シスプラチニンおよびドキソルビシンなどの従来の化学療法剤に加えて、骨肉腫に対してかなり有望であることを示す。 30

【0039】

miRNAs は、がんの治療剤としてまたはがん治療剤の有効な標的として現在は使用されていないが、成功したインビボにおける研究は、それらが、まだ満たされていないニーズに対処するための革新的な治療剤として使用できるという意見を支持するものである。乳がんの同所性マウスモデルにおける抗-*miR-10b* の全身送達は、原発性腫瘍に対しては明らかな効果はないが、肺転移の数と大きさに有意な減少を示した。Ma et al. (2010) Nat Biotechnol 28: 341-7。さらに、*miRNAs* の血清または血漿中の新規バイオマーカーとしての最近の発見は、血液での診断的スクリーニングの新しいアプローチを示している。Brase et al. (2010) Mol Cancer 9: 306。本願発明により同定された *miRNAs* はまた、すべて骨肉腫の患者の予後に影響を及ぼす因子である、化学療法剤に対する感受性の素早い評価、局所再発または遠隔転移の早期検出に使用され得るバイオマーカーとしての可能性を有する。 40

【0040】

本発明の1つの実施態様は、骨肉腫を治療する方法である。この方法は、それを必要とする対象に、miR-1、miR-10bおよびmiR-133aから選択されるマイクロRNA(miRNA)に特異的なアンチセンス分子を有効量投与する工程を含む。あるいはまたはさらに、この方法は、miRNAの発現をノックダウンする任意の薬剤を対象に投与する工程を含み得る。

【0041】

本明細書において使用される場合、用語「治療すること(treating)」および「治療すること(to treat)」は、疾患または望まれない症状を、改善するまたは治すことを意味する。たとえば、骨肉腫を治療することは、骨肉腫を患う対象における骨肉腫細胞という負担を減少するまたは取り除くことを意味する。

10

【0042】

本明細書において使用される場合、「対象」は、哺乳類を意味する。1つの実施形態においては、対象はヒトである。

【0043】

マイクロRNAに特異的なアンチセンス分子の有効量が治療を必要とする対象に投与される。本明細書において使用される場合、「有効量」は、所望の生物学的結果をもたらすのに十分な量である。たとえば、骨肉腫を治療するための有効量は、骨肉腫を患う対象において、骨肉腫細胞のポピュレーションを減少させるまたは取り除くのに十分な量である。有効量は、腫瘍の大きさ、対象のサイズ、対象の全身状態、投与経路、活性薬剤の正体、活性薬剤の組成または処方などの因子、その他医学および薬学の分野における周知の因子により変化し得る。

20

【0044】

いかなる特定の投薬量にも限定されることを意味するものではないが、有効量は、一般的に、非経口投与経路により投与される場合、1日につき、活性薬剤0.01マイクログラム(μg)/kg体重～1000mg/kg体重まで変化する。経口または経腸投与については、有効量は、一般的に、1日につき、活性薬剤0.1μg/kg体重～10,000mg/kg体重まで変化する。有効量は、たとえば、インビトロ試験およびインビトロ動物試験、ならびに臨床試験にもとづき決定することができる。

30

【0045】

マイクロRNAs(miRNAs)は、mRNAsの安定性および翻訳の両方に影響を与えることにより多細胞生物における遺伝子発現の転写後制御に関与する、短い(20～24nt)非コードRNAsである。miRNAsは、RNAポリメラーゼIIにより、タンパク質をコードしていてもコードしていなくてもよい、キャップ付加されポリアデニル化された一次転写産物(pri-miRNAs)の一部として転写される。一次転写産物は、DrosophilaリボヌクレアーゼIII酵素により切断され、およそ70ntステムループ前駆体miRNA(pre-miRNA)を生じる。このpre-miRNAは、さらに細胞質Dicerリボヌクレアーゼにより切断され、成熟したmiRNAおよびアンチセンスmiRNAスター(miRNA*)産物を生じる。成熟したmiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれる。RISCは、miRNAとの不完全な塩基対形成により標的メッセンジャーRNAs(mRNAs)を認識し、通常、標的mRNAの翻訳阻害または不安定化を生じる。

40

【0046】

miRNAは、miR-1、miR-10bおよびmiR-133aから選択することができる。1つの実施形態においては、miRNAはmiR-1である。1つの実施形態においては、miRNAはmiR-10bである。1つの実施形態においては、miRNAはmiR-133aである。これらのmiRNAsは、本技術分野において説明されてきているが、本発明の前には、これらの特定のmiRNAsが骨肉腫、特に骨肉腫の薬物耐性、および/または積極的な浸潤または転移表現型と関係する、または関係し得ることは、全く認識も予想もされていなかった。

50

【0047】

m i R - 1 は、配列 5' - UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU - 3' (配列番号 1) を有する 22 ヌクレオチド長の m i R N A とされている。

【0048】

m i R - 1 0 b は、配列 5' - UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG - 3' (配列番号 2) を有する 23 ヌクレオチド長の m i R N A とされている。

【0049】

m i R - 1 3 3 a は、配列 5' - UUUGGUCCCCUUCACCAGCUG - 3' (配列番号 3) を有する 22 ヌクレオチド長の m i R N A とされている。

【0050】

アンチセンスは、文献において十分に説明されている。一般的に、アンチセンス試薬は、標的核酸分子の配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸ベースの分子であり、それにより、アンチセンス分子とその標的分子とのあいだの会合が、標的核酸分子の発現量を減少させる。

10

【0051】

1 つの実施形態において、アンチセンス分子（抗 - m i R N A ）は、安定化 R N A 、すなわち、天然に生じる R N A と比較して、インビトロまたはインビボでヌクレアーゼ介在性分解に相対的に耐性を示す R N A である。様々な形態の安定化された核酸が、 R N A を含めて知られている。いくつかの安定化された R N A s は、ポリ A 3' - 末端を含む。核酸の化学的に修飾された形態は、たとえば、限定的なものではないが、ロックド核酸 (L N A s) 、ホスホロチオエート骨格修飾核酸および 2' - O - メチル (2' - O M e) 核酸などであって、十分に説明されており、本明細書においてさらなる説明を必要とするものではない。Kruetzfeldt et al. (2005) Nature 438:685-9; Ma et al. (2010) Nat Biotechnol 28:341-7.

20

【0052】

1 つの実施形態においては、アンチセンス分子は、ロックド核酸 (L N A) オリゴヌクレオチドである。ロックド核酸ヌクレオチドは、修飾リボヌクレオチドである。 L N A ヌクレオチドのリボース部分が 2' 酸素と 4' 炭素とを結合する特別ブリッジ (extra bridge) で修飾されている。ブリッジは、リボースを 3' - エンドコンホメーションに「ロックする」。 L N A ヌクレオチドは、イマニシとその仲間ならびにウェンゲルとその仲間により最初に開発された。Obika et al. (1997) Tetrahedron Lett. 38: 8735-8; Koshkin et al. (1998) Tetrahedron 54: 3607-30.

30

【0053】

ロックド核酸 (L N A) オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドのポリマーであり、そのヌクレオチドの少なくとも 1 つが L N A ヌクレオチドである。 L N A オリゴヌクレオチドにおける非 - L N A ヌクレオチドはいずれも、 L N A オリゴヌクレオチドが、その対象とする標的に関してアンチセンス分子として機能的であるならば、天然に存在するまたは修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドであっても、またはそれらのアナログであってもよい。1 つの実施形態においては、 L N A オリゴヌクレオチドにおける非 - L N A ヌクレオチドはいずれもデオキシリボヌクレオチドであり、そして少なくとも 3' - 末端ヌクレオチドが L N A ヌクレオチドである。1 つの実施形態においては、 L N A オリゴヌクレオチドにおける非 - L N A ヌクレオチドはいずれも、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドであり、そして少なくとも 3' - 末端の 2 つのヌクレオチドが L N A ヌクレオチドである。1 つの実施形態においては、 L N A オリゴヌクレオチドは、もっぱら L N A ヌクレオチドのみから構成される。

40

【0054】

1 つの実施形態においては、アンチセンス分子は D N A である。

【0055】

1 つの実施形態においては、 m i R - 1 に特異的なアンチセンス分子は、配列 5' - AC ATACTTCTTACATTCCA - 3' (配列番号 4) を含む。

50

【 0 0 5 6 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - ACATACTTCTTACATTCCA - 3'（配列番号4）である。

【 0 0 5 7 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 0 b に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - ACAAATTCGGTTCTACAGGGT - 3'（配列番号5）を含む。

【 0 0 5 8 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 0 b に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - ACAAATTCGGTTCTACAGGGT - 3'（配列番号5）である。

【 0 0 5 9 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 3 3 a に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3'（配列番号6）を含む。

【 0 0 6 0 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 3 3 a に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3'（配列番号6）である。

【 0 0 6 1 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - AU ACAUACUUUUACAUUCCA - 3'（配列番号7）を含む。

【 0 0 6 2 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - AU ACAUACUUUUACAUUCCA - 3'（配列番号7）である。

【 0 0 6 3 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 0 b に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3'（配列番号8）を含む。

【 0 0 6 4 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 0 b に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - CACAAAUUCGGUUCUACAGGGUA - 3'（配列番号8）である。

【 0 0 6 5 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 3 3 a に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAA - 3'（配列番号9）を含む。

30

【 0 0 6 6 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 3 3 a に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - CAGCUGGUUGAAGGGGACCAA - 3'（配列番号9）である。

【 0 0 6 7 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - AT ACATACTTCTTACATTCCA - 3'（配列番号10）を含む。

【 0 0 6 8 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - ATACATACTTCTTACATTCCA - 3'（配列番号10）である。

【 0 0 6 9 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 0 b に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA - 3'（配列番号11）を含む。

40

【 0 0 7 0 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 0 b に特異的なアンチセンス分子の配列は、5' - CACAAATTCGGTTCTACAGGGTA - 3'（配列番号11）である。

【 0 0 7 1 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 3 3 a に特異的なアンチセンス分子は、配列5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA - 3'（配列番号12）を含む。

【 0 0 7 2 】

1つの実施形態においては、m i R - 1 3 3 a に特異的なアンチセンス分子の配列は、

50

5' - CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA - 3' (配列番号 12) である。

【0073】

本発明はさらに、上述のアンチセンス分子配列のいずれか1つと少なくとも90パーセント同一である連続した配列を含む20~30ヌクレオチド長のアンチセンス分子を包含する。そのようなアンチセンス分子は、標的とされるm i R N A sと特異的にハイブリダイズすることができるか、またはその発現をノックダウンすることができるということは理解されるべきである。

【0074】

本発明はさらに、上述のアンチセンス分子配列のいずれか1つと少なくとも95パーセント同一である連続した配列を含む21~30ヌクレオチド長のアンチセンス分子を包含する。そのようなアンチセンス分子は、標的とされるm i R N A sと特異的にハイブリダイズすることができるか、またはその発現をノックダウンすることができるということは理解されるべきである。

10

【0075】

上述の各実施形態において、1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、1つ以上のロックド核酸(L N A)ヌクレオチドを含む。さらに、1つの実施形態においては、アンチセンス分子は、ロックド核酸(L N A)ヌクレオチドのみから構成される。

【0076】

1つの実施形態においては、特定のマイクロR N Aに特異的なアンチセンス分子は、核酸送達ビヒクルと関連付けられる。本明細書において使用される場合、「核酸送達ビヒクル」は、細胞の細胞質に核酸分子を送達するために有用な生物学的に適合するベクターを意味する。アンチセンス分子は、核酸送達ビヒクルに結合され得る。あるいはまたはさらに、アンチセンス分子は核酸送達ビヒクルによりカプセル化され得る。好適な核酸送達ビヒクルの例としては、リポソーム、脂質、コレステロール、ホルモンおよびその他の標的化分子が挙げられる。リポソームについては、アンチセンス分子は、リポソームの外表面、リポソームの内側、またはリポソームの外側と内側の両方と関連付けることができる。

20

【0077】

1つの実施形態においては、骨肉腫は、限局性骨肉腫、たとえば1つの肢または1つの骨に限局している骨肉腫である。

【0078】

30

1つの実施形態においては、骨肉腫は、転移性骨肉腫である。

【0079】

本発明の1つの実施態様は、抗がん治療に対する骨肉腫の抵抗性を評価する方法である。この方法は、以下の工程、

骨肉腫細胞を含む組織試料を得る工程；

試料からC D 1 3 3 発現細胞を単離する工程；

m i R - 1、m i R - 1 0 b およびm i R - 1 3 3 a からなる群より選択される少なくとも1つのマイクロR N A(m i R N A)の、C D 1 3 3 発現細胞による第1の発現レベルを測定する工程；

C D - 1 3 3 発現細胞を抗がん治療と接触させる工程；および

40

その少なくとも1つのm i R N Aの、C D 1 3 3 発現細胞による第2の発現レベルを測定する工程を含み、第1の発現レベルよりも高い第2の発現レベルが、骨肉腫が抗がん治療に抵抗性であることを示す。

【0080】

C D 1 3 3 発現細胞は、組織試料から任意の適切な手段を用いて単離され得る。たとえば、細胞懸濁液をその組織から調製し得、その後細胞を、たとえば抗C D 1 3 3 抗体を負荷した磁気ビーズなどと免疫クロマトグラフィーに付するか、または適切に標識された抗C D 1 3 3 抗体を用いて蛍光活性化細胞選別(F A C S)する。モノクローナル抗ヒトC D 1 3 3 抗体は、多くのサプライヤーから市販されている。

【0081】

50

m i R N A の発現レベルは、任意の好適な方法を用いて行うことができる。たとえば、発現レベルは、適切に選択されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いる逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を使用して決定され得る。あるいはまたはさらに、発現レベルは、適切に選択、標識化されたハイブリダイゼーションプローブでのノーザンプロット法を用いて決定され得る。

【 0 0 8 2 】

本明細書において使用される場合、「抗がん治療」は、がんを治療するために有用な任意の治療の様式を意味する。そのような様式には、一般的に、化学療法、外照射療法、免疫療法、ホルモン療法およびそれらの組み合わせが挙げられる。化学療法剤は、低分子(分子量約 1 k D a 未満)であり、医学分野において周知である。骨肉腫に使用される一般的な化学療法剤としては、シスプラチニン (シス - ジアミンジクロロ白金 (I I)、C D D P やシスプラチニン (cisplatinum) としても公知、プラチノールおよびプラチノール - A Q として市販されている)、ドキソルビシン (ヒドロキシダウノルビシンとしても公知、アドリアマイシンとして市販されている) およびメトトレキサート (アメトブテリンとしても公知) が挙げられる。1つの実施形態においては、抗がん治療は、シスプラチニン、ドキソルビシン、メトトレキサートおよびそれらの任意の組み合わせから選択される。これらの薬剤は2つ以上を組み合わせて、同時にまたは連続して使用してもよい。加えて、そのような抗がん治療の任意の1つまたは組み合せは、他の抗がん様式、たとえば外照射療法と組み合わせて使用することもできる。

【 0 0 8 3 】

種々の実施形態においては、骨肉腫は、*m i R - 1*、*m i R - 1 0 b* および *m i R - 1 3 3 a* の少なくとも1つの第2の発現レベルが第1の発現レベルよりも客観的に高い場合に抗がん治療に抵抗性であると同定される。種々の実施形態においては、骨肉腫は、*m i R - 1*、*m i R - 1 0 b* および *m i R - 1 3 3 a* の少なくとも1つの第2の発現レベルが、第1の発現レベルよりも、少なくとも10パーセント、少なくとも20パーセント、少なくとも30パーセント、少なくとも40パーセント、少なくとも50パーセント、少なくとも60パーセント、少なくとも70パーセント、少なくとも80パーセント、少なくとも90パーセント、または少なくとも100パーセント高い場合に抗がん治療に抵抗性であると同定される。

【 0 0 8 4 】

1つの実施形態においては、その方法はさらに、骨肉腫が抗がん治療に抵抗性であることが判明した場合、抗がん治療の用量を調整するまたは抗がん治療を変更する工程を含む。たとえば、骨肉腫が抗がん治療に抵抗性であることが判明した場合、その抗がん治療は、他の好適な抗がん治療で補充されるか、または他の好適な抗がん治療に変更され得る。

【 0 0 8 5 】

本発明の1つの実施態様は、骨肉腫のスクリーニング方法である。この方法は、対象から得られた組織試料に、*m i R - 1*、*m i R - 1 0 b* および *m i R - 1 3 3 a* からなる群より選択される少なくとも1つのマイクロ*R N A* (*m i R N A*) を特異的に検出可能なアッセイを行う工程を含み、アッセイによる、少なくとも1つの*m i R N A* の試料中の存在の検出が、対象が骨肉腫を有する危険性があるということを示す。1つの実施形態においては、*m i R N A* は *m i R - 1* である。1つの実施形態においては、*m i R N A* は *m i R - 1 0 b* である。1つの実施形態においては、*m i R N A* は *m i R - 1 3 3 a* である。1つの実施形態においては、少なくとも1つの*m i R N A* は *m i R - 1*、*m i R - 1 0 b* および *m i R - 1 3 3 a* の任意の組み合わせである。

【 0 0 8 6 】

m i R - 1、*m i R - 1 0 b* および *m i R - 1 3 3 a* からなる群より選択される少なくとも1つのマイクロ*R N A* (*m i R N A*) を特異的に検出することが可能なアッセイは、たとえば、適切に選択されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いる R T - P C R であり得る。あるいはまたはさらに、アッセイは、適切に選択、標識されたハイブリダイゼーションプローブでのノーザンプロット法であり得る。

10

20

30

40

50

【0087】

1つの実施形態においては、組織は血液である。1つの実施形態においては、組織は血清である。1つの実施形態においては、組織は血漿である。

【0088】

1つの実施形態においては、この方法はさらに、対象が骨肉腫を有する危険性があると決定された場合、骨肉腫の存在を、任意の好適な方法を用いて検証する工程を含む。たとえば、骨肉腫の存在の検証には、X線を使用する骨検索または特異的骨造影分析または他の好適な骨画像技術、核磁気共鳴画像法（MRI）、コンピュータ断層撮影法（CT）、生検、およびそれらの任意の組み合わせを行うことが含まれる。

【0089】

1つの実施形態においては、この方法はさらに、対象を骨肉腫について治療する工程を含む。

【0090】

本発明の1つの実施態様は、骨肉腫をモニタリングする方法である。その方法は、（a）骨肉腫を有する対象または骨肉腫の治療をしている対象から得られた組織試料において、m i R - 1、m i R - 10 b およびm i R - 133 a からなる群より選択される少なくとも1つのマイクロRNA（m i RNA）の発現レベルを特異的に定量することができるアッセイを行う工程；ならびに

（b）対象由来の後に得られた組織試料において工程（a）を繰り返す工程を含み、先に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i RNAの発現レベルよりも高い後に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i RNAの発現レベルが、その骨肉腫が進行性であることを示し、そして先に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i RNAの発現レベルよりも低い後に得られた試料におけるその少なくとも1つのm i RNAの発現レベルが、その骨肉腫が退行性であることを示す。

【0091】

m i R - 1、m i R - 10 b およびm i R - 133 a からなる群より選択される少なくとも1つのマイクロRNA（m i RNA）の発現レベルを特異的に定量することができるアッセイは、たとえば適切に選択されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いるRT - PCR であり得る。

【0092】

1つの実施形態においては、組織は血液である。1つの実施形態においては、組織は血清である。1つの実施形態においては、組織は血漿である。

【0093】

1つの実施形態においては、その方法はさらに、骨肉腫が進行性であると判明した場合、抗がん治療の用量を調整するかまたは抗がん治療を変更する工程を含む。たとえば、骨肉腫が進行性であると判明した場合、その抗がん治療は、他の好適な抗がん治療で補充されるか、または他の好適な抗がん治療に変更され得る。

【0094】

1つの実施形態においては、その方法はさらに、骨肉腫が退行性であると判明した場合、抗がん治療の用量を調整するかまたは抗がん治療を変更する工程を含む。たとえば、骨肉腫が退行性であると判明した場合、その抗がん治療は減少されるかまたは一時中断され得、または抗がん治療は、他の好適な抗がん治療に変更され得る。

【0095】

本発明を、これまで一般的に開示したが、以下の非限定的な実施例によりさらに説明する。

【実施例】

【0096】

全般的な方法

新鮮な臨床試料からの骨肉腫細胞の精製

新鮮なヒト骨肉腫試料は、人体実験に関する規制委員会の倫理規範にしたがって、20

10

20

30

40

50

10年10月～2011年6月の間に日本の国立がんセンター病院で診断的切開生検を受けた2人の患者から、ネオアジュバント化学療法の前に骨肉腫の原発部位から得た。骨肉腫および組織学的亜型の診断は、有資格病理学者により決定された。外科的標本は、手術時に得られ、10分以内に研究室に受け入れられ、直ちに機械的にバラバラにされ、コラゲナーゼ（新田ゼラチン（株））で消化され、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で2回洗浄された。単細胞懸濁液は、70 μm フィルター（BDバイオサイエンス）を用いるる過により得た。細胞を、10%熱不活化ウシ胎児血清（FBS）（ギブコBRL）およびペニシリン（100 U / mL）およびストレプトマイシン（100 μg / mL）を含有するダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（インビトロジェン）で、5%CO₂下で加湿インキュベータにおいて37℃で培養した。

10

【0097】

細胞および細胞培養物

ヒト骨肉腫HuO9細胞株は、出願人の研究室にて以前に確立された。ヒト骨肉腫細胞株SaOS2、U2OS、MG63、HOS、MNNNG/HOSおよび143Bを、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から購入した。形質転換胚性腎細胞株293もATCCから得た。SaOS2およびHuO9細胞は、RPMI 1640培地（ギブコBRL）において培養した。U2OS、MG63、HOS、MNNNG/HOS、143Bおよび293細胞は、DMEM（インビトロジェン）において培養した。すべての培地には、10%熱不活化FBS（ギブコBRL）およびペニシリン（100 U / mL）およびストレプトマイシン（100 μg / mL）を補充した。細胞は、5%CO₂下で加湿インキュベータにおいて37℃で維持した。

20

【0098】

細胞ソーティングおよびフローサイトメトリー

フローサイトメトリーによる細胞ソーティングを、フィコエリトリン（PE）結合モノクローナルマウス抗-ヒトCD133/2（293C3、ミルテニーバイオテク）およびアロフィコシアニン（APC）結合モノクローナルマウス抗-ヒトCD44（eBioscience）を用いて骨肉腫細胞株および臨床試料に行った。アイソタイプ対照マウスIgG1-PE（eBioscience）を対照とした。試料をJSAN細胞ソーター（ベイバイオサイエンス）およびBD FACS Aria II（BDバイオサイエンス）で分析および選別した。生存率は、トリパンブルー色素排除法を用いて評価した。結果をFlowJsoftウェア(Tree Star)で解析した。

30

【0099】

細胞増殖および細胞毒性アッセイ

細胞増殖率および細胞生存率を細胞のドキソルビシン、シスプラチンおよびメトトレキサートへの相対感受性に関する指標として、製造者の取扱説明書にしたがい、TetraColor ONE Cell proliferation Assay System（生化学）を用いて決定した。対数期で増殖する細胞を96ウェルプレート（5 × 10³ / ウェル）に播種し、一晩接着させ、その後、ドキソルビシン（シグマ）、シスプラチン（アレクシス（Alexis））およびメトトレキサート（シグマ）の様々な用量で72時間処理した。三重のウェルを各処置群について使用した。吸光度は、EnVision（ワラック）において参照波長650 nmを用いて450 nmで測定した。生細胞の相対数を細胞生存率のパーセントとして表した。

40

【0100】

スフェア形成

骨肉腫細胞を、20 ng / mLのヒト組換え表皮増殖因子（EGF）（シグマ-アルドリッヂ）、10 ng / mLのヒト組換え塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）（インビトロジェン）、4 μg / mLのインスリン（シグマ-アルドリッヂ）、B-27（登録商標）（1:50、インビトロジェン）、500 単位 / mLのペニシリン（インビトロジェン）および500 μg / mLのストレプトマイシン（インビトロジェン）を補充した300 μLの血清不含DMEM/F12培地（インビトロジェン）中、5,000 ~ 10,000細胞 / ウェルで置いた。細胞を24ウェルの超低接着表面プレート（コーニング）に

50

おいて懸濁培養した。細胞に1日おきに30μLの補充培地を補充した。三重のウェルにおいて5日目にスフェアを計数した。細胞培養は、5%CO₂加湿インキュベータにおいて37℃で行った。

【0101】

浸潤アッセイ

浸潤アッセイは、マトリゲルを備えた24ウェルBD BioCoat Invasion Chambers (ベクトン・デッキンソン) を用いて行った。500μLのFBS不含D MEMまたはRPMI 1640培地に懸濁した1×10⁵細胞を上部チャンバーに加え、10%FBS含有D MEMまたはRPMI 1640培地を下部チャンバーに加えた。24時間または36時間のインキュベーション後、フィルターの上部表面上の細胞を綿棒でそれらをふき取ることにより完全に取り除いた。フィルターをメタノールで固定し、1%四ホウ酸ナトリウム中1%トルイジンブルー(シスメックス)で染色した。その後、フィルターをスライド上に載せ、下部表面上の細胞を計数した。各アッセイは、三重で行った。

【0102】

miRNAプロファイリング

miRNA発現プロファイリングは、アジレントテクノロジーズ(Agilent Technologies) (サンタクララ、CA) により製造され、いずれも866ヒトmiRNAsを含むmiRNAマイクロアレイを用いて行った(Agilent Technologies [http://www.chem.agilent.com/scripts/PHome.asp])。単離直後のCD133^高およびCD133^低細胞の3つの独立して抽出されたRNA試料を、各細胞株におけるアレイ分析のために用いた。全RNA試料の標識化およびハイブリダイゼーションは、製造者のプロトコルにしたがって行った。マイクロアレイの結果は、Agilent Feature Extractionソフトウェア(v10.7.3.1)を用いて抽出され、GeneSpring GX 11.0.2ソフトウェア(アジレントテクノロジーズ)を用いて分析した。

【0103】

CD133、miR-133aおよびmiR-133aの標的の生存相関研究のための臨床試料

骨肉腫組織試料は、診断的切開生検により、1997年6月～2010年9月の間に日本の国立がんセンター病院で、ネオアジュvant化学療法の前に骨肉腫の原発部位から得た。40歳より年を取っていて、四肢の外側に位置する原発性腫瘍を有する患者は除外した。各新鮮な腫瘍試料を2つに切断し、その1つを直ちに液体窒素中に凍結保存し、そしてもう1つをホルマリンで固定した。骨肉腫および組織学的亜型の診断は、有資格病理学者により決定された。骨芽細胞組織学的亜型、軟骨芽細胞組織学的亜型、線維芽細胞組織学的亜型および血管拡張性組織学的亜型を有する骨肉腫試料のみが含まれられた。化学療法への応答は、腫瘍壊死の範囲が90%以上であった場合に良好として分類された。CD133およびmiR-133aの標的の生存相関研究のために、cDNAライブラリーから利用可能な35個のcDNA試料を用い、一方、利用可能な48個のホルマリン固定、パラフィン包埋(FFPE)試料由来のRNAをmiR-133aの相関研究に用いた。患者の臨床情報は、表7および10(下記)に記載している。すべての患者は、研究目的のそれらの試料の採取および使用を容認する書面のインフォームドコンセントを提供した。臨床情報を得るため、および試料を採取するための研究プロトコルは、日本の国立がん研究センターの施設内倫理委員会により承認された。

【0104】

RNAの単離とmRNAsおよびmiRNAsの定量的リアルタイムRT-PCR

全RNAは、細胞および腫瘍組織から、RNeasy Mini KitおよびRNAs e-Free DNase Set(キアゲン)により精製した。mRNAsの定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)のため、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(アプライドバイオシステムズ)を用いてcDNAを合成した。各qPCR反応について、等量のcDNAをPlatinum SY

B E R G r e e n q P C R S u p e r M i x (インビトロジェン) および特異的プライマー(表1)と混合した。遺伝子発現レベルをベータアクチン(A C T B) またはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G A P D H)により正規化した。m i R N A s の q P C R のために、m i R N A を T a q M a n M i c r o R N A R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n K i t (アプライドバイオシステムズ)を用いて c D N A に変換した。R N U 6 B 核内低分子R N A を内部対照として増幅した。q P C R は、リアルタイムP C Rシステム7300のT a q M a n M i c r o R N A A s s a y およびS D S ソフトウェア(アプライドバイオシステムズ)に含まれる各m i R N A - 特異的プローブを用いて行った。

【 0 1 0 5 】

10

【表1】

表1. リアルタイムRT-PCR分析用プライマーの配列

遺伝子	For/Rev	配列 (5'-配列-3')	配列番号:
CD133	For	GGACCCATTGGCATTCTC	13
	Rev	CAGGACACAGCATAGAATAATC	14
Oct3/4	For	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	15
	Rev	ACACTCGGACCACATCCTTC	16
Nanog	For	CAGTCTGGACACTGGCTGAA	17
	Rev	CTCGCTGATTAGGCTCCAAC	18
Sox2	For	TGGTACGGTAGGAGCTTG	19
	Rev	TTTTCGTCGCTTGGAGACT	20
ABCB1	For	CATGCTCCCAGGCTGTTAT	21
	Rev	GTAACATTGGCAGTTCACTG	22
AGCG2	For	TGCAACATGTACTGGCGAAGA	23
	Rev	TCTTCCACAAAGCCCCAGG	24
ABCC2	For	ACAGAGGCTGGTGGCAACC	25
	Rev	ACCATTACCTTGTCACTGTCCATGA	26
エズリン	For	CGGGACAAGTACAAGGCACTGCGGCAGATCCGG	27
	Rev	CCGGATCTGCCGCAGTGCCTTGTACTTCCG	28
β4-インテグリン	For	TGACGATCTGGACAACCTCAAGCA	29
	Rev	ATCCAATGGTAGTCGCTGGTGA	30
MMP13	For	GATACGTTCTTACAGAAGGC	31
	Rev	ACCCATCTGGCAAAATAAAC	32
CXCR4	For	GGAGGGATCAGTATATACA	33
	Rev	GAAGATGATGGAGTAGATGG	34
SGMS2	For	CAATTCTTGCTGCTTCTCC	35
	Rev	GCCTTGTTTGCTCCTCAG	36
UBA2	For	AAAAAGGGTGTGACCGAGTG	37
	Rev	GCATCTTCTCCCCAAACAA	38
SNX30	For	CCTGAACGCCTACAAGAAGC	39
	Rev	ATGGTTCCCAGTTGAGTGC	40
DOLPP1	For	GAGAGGAGTGAGGCAACAGG	41
	Rev	ACCCCAGACACAGGTTGAG	42
DUSP11	For	GAGACGCGACTTTCAAGGAC	43
	Rev	GATCCAAAGGGAAAAGCAT	44

CUL4B	For	GTTCTGGCGAAAAATCCAAA	45
	Rev	TCGAACAATTGCAGCATCA	46
ROD1	For	CATTCCCTGGGGCTAGTGGTA	47
	Rev	CCATCTGAACCAAGGCATT	48
ZNF701	For	ATCCCGTGGAGTGAAGGTC	49
	Rev	TCTCCAGCATCACGTCTTG	50
MAST4	For	AGCCCATTTCATTGCAC	51
	Rev	TCGTCTGGTGTGGTTGGTA	52
ANXA2	For	CCTGAGCGTCCAGAAATGG	53
	Rev	GGACTGTTATTCGCAAGCTGGTT	54
ACTB	For	CATGAAGTGTGACGTGGACA	55
	Rev	CACGGAGTACTTGCCTCAG	56
GAPDH	For	GACTTCAACAGCGACACCC	57
	Rev	GCCAAATTGTTGTACATACCA	58

【0106】

20

合成mRNAs、LNAsおよびsiRNAsでのトランスフェクション

合成hsa-miRs (Pre-miR-hsa-miR-1、-10b、-133aおよび陰性対照 (NC; アプライドバイオシステムズ、表2) およびロックド核酸 (LNAs) (LNA-1、-10b、-133aおよび陰性対照、Exiqon、表3) を、DharmaFECT 1 (GEヘルスケア) を用いてそれぞれ30nM (最終濃度) で各種の細胞にトランスフェクトした。合成siRNAs ((株)ボナック、表4) を、DharmaFECT 1 (GEヘルスケア) を用いてそれぞれ100nM (最終濃度) で各種の細胞にトランスフェクトした。24時間インキュベーション後、細胞を、細胞毒性アッセイのために化学療法剤で処置するか、浸潤アッセイのために浸潤チャンバーに再び播種した。

30

【0107】

【表2】

表2. miRNA産物の配列

miRNA	センス/アンチセンス	配列 (5'-配列-3')	配列番号:
hsa-miR-1-2	センス	UGGAAUGUAAAGAAGUAUUGUAU	1
	アンチセンス	UACAUACUUCUUAUGUACCC	59
hsa-miR-10b	センス	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	2
	アンチセンス	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAU	60
hsa-miR-133a-1	センス	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	3
	アンチセンス	AGCUGGUAAAAUGGAACCAAAU	61

【0108】

【表3】

表3. LNA産物の配列

miRNA	配列 (5'-配列-3')	配列番号:
hsa-miR-1-2	ACATACTTCTTACATTCCA	10
hsa-miR-10b	ACAAATTCTGGTTCTACAGGGT	11
hsa-miR-133a-1	CAGCTGGTTGAAGGGGACCAA	12
【0109】		10

【表4】

表4. siRNAsの配列

遺伝子	センス/アンチセンス	配列 (5'-配列-3')	配列番号:
SGMS2	センス	CCACUAGAGUGGUGGAAAdTdT	62
	アンチセンス	UUUUCACCACUCUAGUGGdTdT	63
UBA2	センス	GGACUGGGCUGAAGUACAAAdTdT	64
	アンチセンス	UUGUACUUCAGCCCAGUCCdTdT	65
SNX30	センス	CCGAGAAGUUUGUGGUAAAdTdT	66
	アンチセンス	UUUACCACAAACUUCUCGGdTdT	67
DOLPP	センス	CUUCCUAUCCGAGACACAdTdT	68
	アンチセンス	UGUGUCUCGGAUUAGGAAGdTdT	69
DUSP11	センス	CCAGAGGAUUUGCCAGAAAdTdT	70
	アンチセンス	UGUGUCUCGGAUUAGGAAGdTdT	71
CUL4B	センス	GGUGAACACUUAACAGCAAdTdT	72
	アンチセンス	UUGCUGUUAAGUGUUCACCdTdT	73
ROD1	センス	GGGAAUGACAGCAAGAAAAdTdT	74
	アンチセンス	AUUUCUUGCUGUCAUUCCCdTdT	75
ZNF701	センス	CCAUAAUGAAGGAGGUCUdTdT	76
	アンチセンス	AAGACCUCCUUCAUUAUGGdTdT	77
ANXA2	センス	UGACCAAGAUGCUCGGGAudTdT	78
	アンチセンス	AUCCCGAGCAUCUUGGUCAdTdT	79
MAST4	センス	GGAGGUACCUUCUCCAAAdTdT	80
	アンチセンス	UAUCAAACUUCUCCUCUUCUGdTdT	81

【0110】

m i R - 1 3 3 a 安定発現細胞株の確立

m i R - 1 3 3 a ベクターは、p I R E S - h y g ベクター（クローンテック）に成熟 50

マイクロRNA配列の全長を含むクローニング配列を挿入することにより構築した。マイクロRNAおよび対照ベクターを、新たに単離した骨肉腫CD133低HOS細胞にリン酸カルシウム共沈殿法によりトランスフェクトした。形質転換体は分けられ、200μg/mLのハイグロマイシンを含む選択培地において培養された。ハイグロマイシン耐性コロニーが選択され、200μg/mLのハイグロマイシンを含有する培地で拡張された。m i R - 1 3 3 a 構築物の配列は、DNA配列決定法（A B I 3 1 3 0 シーケンサー、アプライドバイオシステムズ）により確認され、マイクロRNA過剰発現は、q R T - P C R により確認された。RNU6Bを内因性の対照として供した。

【0111】

腫瘍移植実験

10

動物実験は、国立がんセンター研究所の動物実験のための施設の指針に従って行った。無胸腺ヌードマウスまたはNOD/SCIDマウス（CLEA、日本）を4週齢で購入し、腫瘍移植前に少なくとも1週間新しい環境に適合させた。0日目、マウスを3%イソフルランで麻酔し、右足を70%エタノールで消毒した。細胞を、27-G針で1mLのツベルクリン注射器に吸引した。針は、皮質の破壊を避けるために回転運動をさせながら、脛骨の前結節の皮質を経て挿入した。一旦骨を越えると、針はさらに挿入され、脛骨の後部皮質を破壊する。100μL容量の新しく単離されたCD133高およびCD133低HOS-Luc（部位につき10²、10³、10⁴、10⁵細胞）または143B-Luc（1.5×10⁶）を含む溶液を、ゆっくりと針を後退させながら注射した。

【0112】

LNA-抗-miR-133aあり/なしでの腫瘍成長、肺転移および毒性のモニタリング

20

CD133高およびCD133低HOS-Luc細胞の間の腫瘍原性の評価のために、NOD/SCIDマウスに腹腔内注射によりD-ルシフェリン（150mg/kg、プロメガ）を注射した。10分後、萤ルシフェラーゼ由来の光子を、製造業者の取扱説明書にしたがいIVISイメージングシステム（キセノゲン（Xenogen）社）を用いて計数した。各実験条件は1群5匹であり、1週間に1回モニタリングした。骨肉腫モデルマウスの自発肺転移へのLNA-抗-miR-133a投与の評価のため、個々のマウスに尾静脈より10mg/kgのLNA-抗-miR-133aまたは生理食塩水を注射した。LNAは、143B-Luc細胞の接種後4、11、18、25、32日目に注射した。各実験条件は、各群10匹とした。後の肺転移の発達は、1週間に1回で5週間、上述の生物発光イメージングによりインビボでモニタリングした。すべてのデータは、LivingImageソフトウェア（バージョン2.50、キセノゲン）を用いて分析した。36日目に、各群5匹のマウスにおいて、原発性腫瘍および肺を、それらの重量、生物発光および組織学的分析のために剖検で切除した。血液検査、体重、および心臓、肝臓および骨格筋の重量、および病理組織学的検査を毒性の評価のために行った。残りのマウスについては、それらの生存期間を観察した。

30

【0113】

miR-133a標的mRNAsの包括的収集と同定

40

miR-133aの包括的な下流の標的を収集するために、2つの実験的アプローチからcDNAマイクロアレイプロファイリングを行った。1つ目は、候補遺伝子を、miR-133aまたは陰性対照（NC）を形質導入したSaOS2 CD133低細胞の回収された全RNAから行われたcDNAマイクロアレイ分析から収集した。2つ目は、cDNAマイクロアレイ分析を、miR-133aまたはNCを形質導入したCD133低細胞における抗-Ago2抗体免疫沈降（Ago2-IP）から回収された全RNAから行った。前者の方法において1.5倍減少（fold decrease）で下方調節された遺伝子と、後者の方法において2.0倍増加で上方調節された遺伝子をコンピュータデータベース、TargetScanHuman 6.0（<http://www.targetscan.org/>）を参照して候補として定義した。

【0114】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

50

S G M S 2 の 3 ' U T R (N M _ 1 5 2 6 2 1 の n t 1 6 5 6 - 1 8 7 9 (結合部位)) 、 U B A 2 の 3 ' U T R (N M _ 0 0 5 4 9 9 の n t 2 5 2 7 - 2 6 5 4 (結合部位)) 、 D U S P 1 1 の 3 ' U T R (N M _ 0 0 3 5 8 4 の n t 1 1 8 0 - 1 5 7 2 (結合部位)) 、 M A S T 4 の 3 ' U T R (N M _ 0 0 1 1 6 4 6 6 4 の n t 8 0 1 7 - 8 0 9 6 (結合部位)) 、 S N X 3 0 の 3 ' U T R (N M _ 0 0 1 0 1 2 9 4 4 の n t 6 6 5 9 - 7 6 1 1 (結合部位)) および A N X A 2 の C D S (N M _ 0 0 1 0 0 2 8 5 7 の n t 2 4 4 - 7 4 3 (結合部位)) の各フラグメントを増幅し、 p s i C H E C K - 2 ベクター (プロメガ) の蛍ルシフェラーゼレポーター遺伝子およびウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子の X h o I および N o t I 部位にクローニングした。プラスミドにクローン化されたすべての P C R 産物を D N A 配列決定により検証し、それらが変異をもたず、正しいクローニング方向であることを確認した。プライマー配列を表 5 に挙げる。ルシフェラーゼレポーターアッセイのために、 H O S 細胞を 1 0 0 n g のルシフェラーゼ構築物と 1 0 0 n M の合成 m i R - 1 3 3 a 分子または対照 (非標的化 s i R N A オリゴヌクレオチド、キアゲン) と同時トランスクレプトした。蛍ルシフェラーゼ活性およびウミシイタケルシフェラーゼ活性を D u a l - L u c i f e r a s e R e p o r t e r A s s a y (プロメガ) を用いてトランスクレクションの 4 8 時間後に測定した。結果は相対ウミシイタケルシフェラーゼ活性 (ウミシイタケルシフェラーゼ / 蛍ルシフェラーゼ) として示した。

【 0 1 1 5 】

【表5】

表5. ルシフェラーゼレポーター・アッセイ用プライマーの配列

遺伝子	For/Rev	配列 (5'-配列-3')	配列番号:
SGMS2-UTR	For	GCTCGAGTAAAGCAAAACAAAGGCATCAGC	82
	Rev	GCAGGCCGCAAGGCTTGTACCAATGAATGA	83
SGMS2mu-UTR	For	AAATGTCAACCATTGTGTAAACGATT	84
	Rev	AAATGGTTGACATTCTTCATTACAG	85
UBA2-UTR	For	GCTCGAGTAATACCGCCTGGTATGTCTGTG	86
	Rev	GCAGGCCGCAATGCAGATGCCATTATTGGT	87
UBA2mu-UTR	For	TTATGTCAACCATAATGGCATCTGCATT	88
	Rev	TTATGGTTGACATAAGTATAGTCGTTAT	89
SNX30-1-UTR	For	GCTCGAGTAACCCTGTTGGACAGGGATTGAT	90
	Rev	GCAGGCCGCAATTAAAGAAAGCATCTTTATGG	91
SNX30mu-1-UTR	For	TCTTATCAACCCACTTCAGTCAGAAATGT	92
	Rev	AGTGGGTTGATAAGACTGCGAACATCA	93
DUSP11-UTR	For	GCTCGAGTAAAACCTGTCCTGGATTCTACC	94
	Rev	GCAGGCCGCAAGATGGCCTTGGGTCAATAA	95
DUSP11mu-UTR	For	CTGGATCAACGAGCTGGCCTGAAAATTAC	96
	Rev	GCTCGTTGATCCAGGTAGAATTCCAGGA	97
MAST4-UTR	For	GCTCGAGTAACTCCCCCAGCTAGGAAACAG	98
	Rev	GCAGGCCGCAAAGAGATGGGGCGGTCACT	99
MAST4mu-UTR	For	GACGTTCAACCGCCATCCCCAGCCCCAAA	100
	Rev	TGGCGGTTGAACGTCTGCCCACGTT	101
ANXA2-UTR	For	GCTCGAGTAAGCGGGATGCTTGAACATT	102
	Rev	GCAGGCCGCAACTCCAGCGTCATAGAGATCC	103
ANXA2mu-UTR	For	ATCAATCAACCAGGTGTGGATGAGGTAC	104
	Rev	ACCTGGTTGATTGATGGCTGTTCAATG	105

【0116】

免疫組織化学

CD133 および miR-133a の標的の染色については、骨肉腫臨床試料および異種移植腫瘍のスライドを作製した。内因性ペルオキシダーゼを 1% の H₂O₂ (30 分) で阻害した。スライドを、抗原回復のために 10 mM のクエン酸ナトリウム (pH 6.0) において加熱した。その後、スライドを、モノクローナルマウス抗-ヒト CD133/2 (1:10 希釀、ミルテニーバイオテク)、モノクローナルマウス抗-ヒト SGMS2 (1:50 希釀、Abcam) またはアイソタイプを適合させた対照抗体と共に 4 度で一晩インキュベートした。免疫検出は、製造業者の取扱説明書にしたがい、IMMPRESS ペルオキシダーゼポリマー検出試薬 (ベクターラボラトリーズ) および Metal Enhanced DAB Substrate Kit (サーモ フィッシュ サイエンティフィック) を用いて行った。染色は、ヘマトキシリンによる対比染色により示した。

【0117】

統計的分析

棒グラフにおける有意差を除き、すべての統計的分析は、S P S S ソフトウェア (S P S S 社、シカゴ、 I L) を用いて行い、その場合、分析は、スチューデントの t 検定を適用することにより行った。異なる臨床病理データの間の C D 1 3 3 発現の差異は、キー二乗 (χ^2) 検定により分析した。平均値よりも低い C t の場合は、高 C D 1 3 3 発現を示すとして分類し、一方、平均値よりも高い C t の場合は、低 C D 1 3 3 発現を示すとして分類した。 C D 1 3 3 ^高 および C D 1 3 3 ^低 原発性腫瘍の患者の生存を比較するために、カプラン - マイヤー法およびログランク検定を用いた。生存期間は、診断から死までの時間として規定したが、生きている患者については、最後の経過観察の時点で打ち切りとした。 m i R - 1 3 3 a およびその標的の発現における差異の計算について、同じ手法を適用した。これらの分析すべてにおいて、0 . 0 5 以下の P 値を有意差であるとみなした。 10

【 0 1 1 8 】

実施例 1

骨肉腫細胞株の細胞のごく一部が C D 1 3 3 を発現する。

骨肉種細胞株 S a O S 2 、 H O S 、 U 2 O S 、 M N N G / H O S 、 M G 6 3 、 1 4 3 B および H u O 9 を、肉腫の起源とみなされている間葉系幹細胞または神経幹細胞のマーカーについてスクリーニングした。 Basu-Roy, U et al. (2011) Oncogene 31: 2270-82; Ku hn, NZ et al. (2010) J. Cell. Physiol. 222: 268-77。結果として、 C D 1 3 3 、すなわちプロミニン - 1 の構造的ホモログは、全ての細胞株において、0 . 0 4 % ~ 8 . 4 7 % というごく一部に見出されたが、 C D 4 4 は、大部分で見出された (図 1)。 S a O S 2 、 M N N G / H O S および H O S は、 C D 1 3 3 のそれらの発現が特に強いことが分かった (それぞれ 8 . 4 7 、 8 . 1 3 および 7 . 6 9 %)。 20

【 0 1 1 9 】

新たに単離された細胞集団の単細胞増殖は、 P K H 染料を用いて観察された。 P K H 染料は、細胞膜に結合し、各細胞分裂後に娘細胞に分離される蛍光色素である。通常、 P K H 濃度は細胞分裂ごとに減少する、そのため静止細胞は P K H ^高 のままで、分裂細胞は徐々に P K H ^低 となる。さらに、通常、 P K H 6 7 染料は、娘細胞の間に均等に分配されるが、急速に分裂する細胞、たとえばがん細胞では、均等でない分割を示す。 30

【 0 1 2 0 】

C D 1 3 3 ^高 細胞集団は、異なる増殖結果を有する C D 1 3 3 ^高 および C D 1 3 3 ^低 の両集団を生じた。 1 つは静止 (P K H ^高) で、もう 1 つは活発に分裂 (P K H ^低) である。 C D 1 3 3 ^高 画分の単一の P K H 2 6 ^高 細胞は、均等でない分裂を示した。休眠細胞として提示する少数の P K H 2 6 ^高 細胞が、 8 日目に P K H 2 6 ^低 細胞に取り囲まれて観察され、 F A C S 分析では C D 1 3 3 ^高 および C D 1 3 3 ^低 の両細胞を有する画分として同定された。他方、 C D 1 3 3 ^低 S a O S 2 画分の単一の P K H 6 7 ^高 細胞は、対称分裂を示し、すなわち P K H 6 7 ^低 細胞を有するコロニーが観察された。これは、単離 2 週間後の F A C S 分析において、 C D 1 3 3 ^低 画分として同定された (図 2)。 C D 4 4 の発現による細胞分裂における差異は観察されなかった。 40

【 0 1 2 1 】

さらなる実験は、 C D 1 3 3 ^高 および C D 1 3 3 ^低 集団の他の表現型を同定するために行った。合計 $5 \times 1 0^3$ の C D 1 3 3 ^高 および C D 1 3 3 ^低 細胞をソートし、直ちに血清不含で、成長因子が補充された足場非依存性環境の条件下で培養した。培養 2 週間以内に、より多くの骨肉腫細胞が C D 1 3 3 ^低 細胞よりも C D 1 3 3 ^高 細胞から観察された (図 3)。

【 0 1 2 2 】

実施例 2

C D 1 3 3 ^高 細胞は、増強された薬物抵抗性、浸潤性および腫瘍原性を示す。

薬物抵抗性は、 T I C s の重要な性質の 1 つであるため、 C D 1 3 3 ^高 および C D 1 3 3 ^低 細胞の集団を、ドキソルビシン (D O X) 、シスプラチン (C D D P) およびメトト 50

レキサート (M T X) での治療条件において観察した。これらは骨肉腫に対する標準的な化学療法剤である。CD133^高細胞は、CD133^低細胞よりもこれらの化学療法剤により抵抗性であった (図4)。さらに、CD133^高細胞は、CD133^低細胞よりもより高い浸潤能を示した (図5)。新しく単離したCD133^高およびCD133^低細胞由来のmRNAのqRT-PCRは、CD133^高SaOS2細胞は、増強されたレベルの、Oct3/4、NanogおよびSox-2 (これらは、胚性幹細胞やCSCsまたはTICsの自己複製能の維持および分化万能性の維持において重要な役割を果たす転写因子である (Levings, PP et al. (2009) Cancer Res. 69: 5648-55; Basu-Roy U et al. (2011) Oncogene 31: 2270-82)) ; 多剤耐性トランスポーター遺伝子ABC B1、ABC C2、ABC G2 ; ならびに転移関連遺伝子、4-インテグリン、エズリン、MMP-13およびCXCR4 (Tang, N et al. (2008) Clin. Orthop. Relat. Res. 466: 2114-30; Osaki, M et al. (2011) Mol. Ther. 19: 1123-30) を発現したことを明らかにした (図6)。最も重要なことは、CD133^高HOS画分は、インビボにおいてCD133^低HOS画分よりも強い腫瘍原性を示し、CD133^高細胞は、わずかに100個の細胞から腫瘍を形成し得るが、CD133^低細胞は、形成できないということである (図7)。結果は表6にも示す。

【0123】

【表6】

表6. 骨肉腫CD133^高およびCD133^低単独の集団を用いたインビボでの腫瘍発達

細胞の種類	腫瘍発生率	細胞数
CD133 ^高	5/5	100,000
	5/5	10,000
	5/5	1,000
	4/5	100
CD133 ^低	4/5	100,000
	1/5	10,000
	1/5	1,000
	1/5	100

【0124】

実施例3

CD133メッセンジャーRNAの高度な発現は、骨肉腫患者の不良な生存率についてのマーカーである。

CD133の臨床的な重要性を評価するために、新しいヒト骨肉腫生検から確立された細胞株を、フローサイトメトリーにより分析し、ごく稀な頻度<10%でCD133^高集団を含有することを見出した (図8)。さらに、35人の骨肉腫患者の臨床試験は、CD133メッセンジャーRNA (mRNA) の高い発現レベルが、骨肉腫患者のかなり悪い全生存率と相關したことを明らかにした (ログランク検定、P = 0.0262)。結果を図9および表7に示す。

【0125】

10

20

30

40

【表7】

表7. 35の症例における臨床病理学的変量とCD133発現とのあいだの単変量分析、多変量分析および関係

変量	症例数	CD133 低	CD133 高	相関 (CD133) χ^2 (P値)
年齢(年)				0.120
0-10	7	6	1	10
11-20	25	11	14	
21+	3	1	2	
性別				0.164
男性	23	14	9	
女性	12	4	8	
部位				0.319
大腿骨	21	12	9	20
脛骨	9	5	4	
上腕骨	2	1	1	
その他	3	0	3	
組織学				0.394
骨芽細胞様	16	9	7	
軟骨芽細胞様	6	4	2	
線維芽細胞様	2	0	2	
その他、NA*	11	5	6	
診断時に転移				0.045
有	4	0	4	30
無	31	18	13	
ネオアジュバント化学療法				0.425
MTX+DOX/CDDP	21	10	11	
IFO+DOX/CDDP	13	8	5	
その他	1	0	1	
ネオアジュバント化学療法への応答				0.088
良好(懐死>90%)	11	6	5	
不良(懐死<90%)	20	12	8	
NA*	4	0	4	
CD133 mRNA 発現				40
高	17	0	17	
低	18	18	0	

【0126】

実施例4

miR-1、miR-10bおよびmiR-133aは、CD133^低細胞と比較してCD133^高細胞において上方調節される。

miRNA発現プロファイリングは、有用な診断および予測ツールとなることが報告されており、多くの研究が、特定のmiRNAsが、がん遺伝子または腫瘍抑制因子のいずれかとして作用することを示している。Croce, CM (2009) Nat. Rev. Genet. 10:704-10

。さらにCD133^高およびCD133^低表現型の基礎にある分子機構を特徴付けるため、単離したCD133^高およびCD133^低骨肉腫SaOS2およびHOS細胞のmRNAプロファイリングを、866種類の配列確認済ヒトmRNAsを含むマイクロアレイ分析を用いて行った。図10および表8に示す結果は、3種類のmRNAsが、CD133^高細胞においてCD133^低細胞と比較して変動比(Fold change) > 2で上方調節されたことを明らかにした。2回目のqPCRの有効性確認試験では、mR-1、mR-10bおよびmR-133aがマイクロアレイのデータと一致することが明らかとなった(図11)。

【0127】

【表8】

表8. CD133^高対CD133^低骨肉腫細胞のmicroRNA発現プロファイル

miRNA	変動比 (Fold change) (SaOS2 CD133 ^高 vs CD133 ^低)	調節	変動比 (Fold change) (HOS CD133 ^高 vs CD133 ^低)	調節
<u>CD133^低細胞と比較したCD133^高細胞での変動比>2でSaOS2およびHOSにおいて 共通して上方調節されたmiRNAs</u>				
10				
hsa-miR-1	7.23	up	3.81	up
hsa-miR-500*	5.39	up	3.99	up
hsa-miR-660	2.09	up	2.05	up
<u>CD133^低細胞と比較したCD133^高細胞での変動比>2でSaOS2において上方調節され たmiRNAs</u>				
20				
hsa-miR-551b	9.49	up		
hsa-miR-30e	9.19	up		
hsa-miR-148b	8.26	up		
hsa-miR-193a-3p	7.77	up		
hsa-miR-1	7.23	up		
hsa-miR-221*	6.76	up		
hsa-miR-24-1*	6.36	up		
hsa-miR-1825	5.78	up		
hsa-miR-500*	5.39	up		
hsa-miR-92a-2*	4.36	up		
hsa-miR-1202	3.39	up		
hsa-miR-424	3.23	up		
hsa-miR-19b-2*	2.87	up		
hsa-miR-29c	2.42	up		
hsa-miR-494	2.37	up		
hsa-miR-10b	2.16	up		
hsa-miR-374a	2.11	up		
hsa-miR-660	2.09	up		
hsa-miR-30e*	2.03	up		
30				
<u>CD133^低細胞と比較したCD133^高細胞での変動比<2でSaOS2において下方調節され たmiRNAs</u>				
40				
hsa-miR-1281	9.45	down		
hsa-miR-195	6.56	down		
hsa-miR-129-5p	5.74	down		
hsa-miR-129-3p	4.98	down		

hsa-miR-183	4.89	down	
hsa-miR-1305	4.76	down	
hsa-miR-1275	4.65	down	
hsa-miR-484	4.55	down	
hsa-miR-1268	4.51	down	
hsa-miR-186	4.51	down	
hsa-miR-181a*	4.46	down	
hsa-miR-744*	2.72	down	10
hsa-miR-96	2.65	down	
hsa-miR-142-3p	2.35	down	
hcmv-miR-US25-2-5p	2.31	down	

CD133^低 細胞と比較したCD133^高 細胞での変動比>2でHOSにおいて上方調節された miRNAs

hsa-miR-1181	12.78	up	
hsa-miR-133b	7.22	up	
hsa-miR-532-5p	7.10	up	20
hsa-miR-338-3p	6.30	up	
hsa-miR-9	5.95	up	
hsa-miR-34c-5p	5.37	up	
hsa-miR-378*	5.26	up	
hsa-miR-181a*	5.04	up	
hsa-miR-145*	4.97	up	
hsa-miR-1271	4.97	up	
hsa-miR-362-3p	4.67	up	
hsa-miR-152	4.63	up	30
hsa-miR-663	4.46	up	
hsa-miR-9*	4.15	up	
hsa-miR-340	4.10	up	
hsa-miR-744	4.07	up	
hsa-miR-500*	3.99	up	
hsa-miR-1	3.81	up	
hsa-miR-1305	3.33	up	
hsa-miR-744*	3.11	up	40
hsa-miR-629	2.88	up	
hsa-miR-629*	2.71	up	
hsa-miR-145	2.55	up	
hsa-miR-1246	2.47	up	
hsa-miR-21*	2.39	up	
hsa-miR-450a	2.35	up	

hsa-miR-425*	2.31	up	
hsa-miR-148a	2.30	up	
hsa-let-7f-1*	2.26	up	
hsa-miR-301b	2.21	up	
hsa-miR-1826	2.15	up	
hsa-miR-128	2.15	up	
hsa-miR-378	2.14	up	
hsa-miR-126	2.13	up	10
hsa-miR-598	2.06	up	
hsa-miR-1915	2.05	up	
hsa-miR-660	2.05	up	
hsa-miR-933	2.02	up	

CD133^低 細胞と比較したCD133^高 細胞での変動比<2でHOSにおいて下方調節されたmiRNAs

hsv1-miR-H6	4.60	down	
hsa-miR-1539	4.02	down	20
hsa-miR-483-3p	3.76	down	
hsa-miR-328	3.72	down	
hsa-miR-132*	3.67	down	
hsa-miR-129*	3.66	down	
hsa-miR-548c-5p	3.13	down	
hsa-miR-1825	2.05	down	

hsa、ホモサピエンス

【 0 1 2 8 】

m i R N A および m i R N A * は、ステムループ前駆体 m i R N A の D i c e r プロセッシングによる二本鎖 R N A 産物の 2 つの鎖である。 m i R N A は、最終的に R I S C に入る「ガイド」鎖であり、 m i R N A * は、他の「パッセンジャー」鎖である。細胞内に存在する m i R N A * のレベルは低い（対応する m i R N A に対して 15 %）。細胞内に存在するパッセンジャー鎖の割合がより高い場合は、 m i R N A - 3 p / m i R N A - 5 p の命名が m i R N A / m i R N A * の代わりに使用される。 m i R N A - 3 p は、前駆体 m i R N A の 3' アームから誘導された m i R N A であり、 m i R N A - 5 p は、前駆体 m i R N A の 5' アームから誘導された m i R N A である。

【 0 1 2 9 】

実施例 5

m i R - 1 3 3 での C D 1 3 3 低 細胞のトランスフェクションは、 C D 1 3 3 高 細胞と関連付けられる性質を与え、 m i R - 1 3 3 a の高い発現は、臨床的予後の不良と相關する。これらの m i R N A s が、骨肉腫腫瘍開始細胞のこれらの表現型を阻害できるかどうかを決定するために、 m i R - 1 、 m i R - 1 0 b および m i R - 1 3 3 a の発現レベルを C D 1 3 3 低 細胞において操作した（図 1 2 ）。これらの m i R N A s 、特に m i R - 1 3 3 a は、 m i R - N C (陰性対照) オリゴヌクレオチドと比較して、 C D 1 3 3 低 細胞の浸潤性を増強した（図 1 3 ）。興味深いことに、これらすべての m i R N A s のトランスフェクションは、 C D 1 3 3 低 細胞の浸潤を劇的に増強した（図 1 3 ）。細胞増殖および薬物抵抗性は、 m i R - 1 3 3 トランスフェクションにより C D 1 3 3 低 細胞においてわずかに強められた（図 1 4 ）。安定に過剰発現する m i R - 1 3 3 a H O S C D 1 3

30

40

50

3 低細胞 (図 15) は、足場血清不含環境下で対照 CD133 低細胞よりもスフェア形成に強い (> 2 倍) 能力を示し、インビボでわずか 100 個の細胞で腫瘍を発達させた一方、対照 CD133 低細胞ではできなかった (図 16 および表 9)。

【 0 1 3 0 】

【表 9】

表9. 安定にmiR-133aを過剰発現する骨肉腫CD133^低を用いたインビボでの腫瘍発達

細胞の種類	腫瘍発生	細胞数	
CD133 ^低 miR-133a	5/5	100,000	10
	4/4	10,000	
	5/5	1,000	
	2/5	100	
CD133 ^低 EV ¹	5/5	100,000	20
	1/4	10,000	
	0/5	1,000	
	0/5	100	
CD133 ^低 CDDP ²	5/5	100	
CD133 ^低 生理食塩水 ³	0/5	100	

¹ EV、空のベクター

² CDDP、CDDPで処理した細胞

³ 生理食塩水、生理食塩水で処理した細胞

【 0 1 3 1 】

miR-133a のトランスフェクションは、CD133^高 細胞において上方調節された分子 (図 6 参照) のメッセンジャー RNA (mRNA) レベルも増加させたが、CD133 mRNA は増加させず、miR-133a は、CD133 の上流経路における分子の発現には影響しないことが示唆された (図 17)。これらの結果は、miR-133a が、骨肉腫 TICs の表現型を調節できる候補 mRNA であることを明らかにした。実際、miR-133a の発現も骨肉腫生検の CD133^高 画分において高く (図 18)、miR-133a の高い発現は、患者の芳しくない予後と有意に相關した (表 10)。

【 0 1 3 2 】

【表10】

表10. 48の症例における臨床病理学的変量とmiR-133a発現とのあいだの単変量分析、多変量分析および関係

変量	症例数	miR-133a 低	miR-133a 高	相関 (CD133) χ^2 (P値)
年齢(年)				0.228
0-10	9	9	0	
11-20	30	23	7	10
21+	9	8	1	
性別				1.000
男性	31	26	5	
女性	17	14	3	
部位				0.566
大腿骨	26	22	4	
脛骨	16	14	2	
上腕骨	2	1	1	20
その他	4	3	1	
組織学				0.142
骨芽細胞様	25	23	2	
軟骨芽細胞様	7	6	1	
線維芽細胞様	2	2	0	
その他、NA*	14	9	5	
診断時に転移				0.330
有	7	5	2	
無	41	35	6	30
ネオアジュvant化学療法				0.902
MTX+DOX/CDDP	29	24	5	
IFO+DOX/CDDP	18	15	3	
Other	1	1	0	
ネオアジュvant化学療法への応答				0.173
良好(懐死>90%)	17	16	1	
不良(懐死<90%)	26	21	5	
NA*	5	3	2	
miR-133a 発現				40
高	8	0	8	
低	40	40	0	

【0133】

実施例6

miRNAsでのCD133低SaOS2細胞のトランスフェクションは、増殖の増加をもたらす。

CD133低SaOS2細胞は、細胞ソーティングにより単離され、その後、陰性対照(NC)RNA、miR-1単独、miR-10b単独、miR-133a単独、miR

- 1 + mi R R - 1 0 b、mi R R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a、mi R - 1 + mi R - 1 3 3 a または mi R - 1 + mi R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a でトランスフェクトされた。CD 1 3 3 高細胞も細胞ソーティングにより単離され、その後、陰性対照 (NC) RNA でトランスフェクトされた。細胞の各集団は、3 ~ 7 日間組織培養で別々に維持し、その後、細胞増殖を評価するために光学顕微鏡で調べた。結果を図 19 に示す。図 19 から明らかなように、mi R - 1 単独、mi R - 1 0 b 単独、mi R - 1 3 3 a 単独、mi R - 1 + mi R R - 1 0 b、mi R R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a、mi R - 1 + mi R - 1 3 3 a または mi R - 1 + mi R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a でトランスフェクトされた CD 1 3 3 低 SaOS 2 細胞は、陰性対照 RNA でトランスフェクトされた CD 1 3 3 高 SaOS 2 細胞よりもより高い程度まで増殖した。mi R - 1 + mi R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a でトランスフェクトされた CD 1 3 3 低 SaOS 2 細胞は、陰性対照 RNA でトランスフェクトされた CD 1 3 3 高 SaOS 2 細胞と同程度付近まで増殖した。組み合わせのこの効果は、少なくとも相加効果であった。 10

【0134】

同様の結果が、SaOS 2 細胞の代わりにMNNNG / HOS 細胞での実験において得られた (図 20)。

【0135】

実施例 7

mi RNAs での CD 1 3 3 低 SaOS 2 細胞のトランスフェクションは、薬物抵抗性をもたらす 20

CD 1 3 3 低 SaOS 2 細胞は、細胞ソーティングにより単離され、その後、実施例 1 と同様に陰性対照 (NC) RNA、mi R - 1 単独、mi R - 1 0 b 単独、mi R - 1 3 3 a 単独、または mi R - 1 + mi R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a でトランスフェクトされた。トランスフェクトされた細胞の各集団は、その後、30 nM のドキソルビシン、2.5 μM のシスプラチニンまたは 320 nM のメトトレキサートの存在下、4 日間組織培養で別々に維持し、その後、細胞を計数した。結果を図 21 に示す。図 21 から明らかなように、mi R - 1 3 3 a 単独または mi R - 1 + mi R - 1 0 b + mi R - 1 3 3 a でトランスフェクトされた CD 1 3 3 低 SaOS 2 細胞は、シスプラチニン存在下、およびメトトレキサート存在下での陰性対照よりも高い程度まで増殖した。したがって、mi R - 1 3 3 a の添加は、シスプラチニンおよびメトトレキサートに対する抵抗性の増加と関連していた。 30

【0136】

実施例 8

mi R - 1、mi R - 1 0 b および mi R - 1 3 3 a は、シスプラチニン処置により誘導される

mi R - 1、mi R - 1 0 b および mi R - 1 3 3 a ならびに CD 1 3 3 の発現は、シスプラチニン処置により誘導された。qRT - PCR 分析は、DOX - 処置または CDDP - 処置 (3 日間) 143B 細胞が、未処置 143B 細胞に対して増加したレベルの mi R - 1、mi R - 1 0 b および mi R - 1 3 3 a を発現したことを示した (図 22)。また、mi R - 1 3 3 a の発現は、CD 1 3 3 低 HOS 細胞において、シスプラチニンにより増強された。さらに、CDDP - 処置 CD 1 3 3 低 HOS 細胞は、わずか 100 細胞 / 注射で腫瘍を形成できたが、未処置 CD 1 3 3 低 HOS 細胞はできなかつた (図 23 および表 9)。これらのデータは、TIC 表現型、ならびに CD 1 3 3 mRNA および mi R - 1 3 3 a の発現は、化学療法剤により増強され得るということを示す。したがって、本発明者は、化学療法前または化学療法中の mi R - 1 3 3 a のサイレンシングが、TIC 表現型を増強しつつ化学療法剤により誘導される mi R - 1 3 3 a の発現の増加を防ぐと結論付けた。 40

【0137】

実施例 9

miR-133aに対するアンチセンスは、CD133^高細胞の増殖を減少する。miR-133aのサイレンシングが、骨肉腫の悪性表現型を抑制するかどうかを評価するために、実施例8の実験と反対の実験を、ロッド核酸(LNA)抗-miR-133aを導入することにより行った。LNAは、相補的DNAおよびRNAに対する非常に高い親和性と優れた特異性を有する核酸アナログの1分類であり、LNAオリゴヌクレオチドは、インビトロおよびインビボの両方でアンチセンス分子として適用されている。Elmeen, J et al. (2008) *Nature* 452: 896-9; Obad, S et al. (2011) *Nat. Genet.* 43: 371-8。SaOS2およびHOS細胞のCD133^高集団は、細胞ソーティングにより単離され、LNA-抗-miR-133a(LNA-133a)およびLNA-陰性対照(LNA-NC)でトランスフェクトした。対照として、単離されたCD133^低SaOS2およびHOS細胞も、LNA-NCでトランスフェクトした。LNA-133aのmiR-133のサイレンシングに対する有効性は、リアル-タイムRT-PCR分析により確認した(図24)。LNA-133aでトランスフェクトされたCD133^高SaOS2およびHOS細胞は、LNA-NCでトランスフェクトされたCD133^低細胞と同レベルの増殖率に抑制された(図25)。

【0138】

実施例10

LNA-133a-形質導入CD133^高細胞は、増強された薬物感受性および減少された浸潤性を示す。

LNA-133a-形質導入CD133^高細胞は、DOXおよびCDDPに対して、LNA-NC形質導入CD133^低細胞のレベルで増強された感受性を示した。これらの結果は、CD133^高細胞において、アポトーシス性の核凝集および断片化を示すヘキスト染色細胞を計数することにより正しいことが確認された。対照CD133^高細胞と比較して、LNA-133a-形質導入CD133^高細胞において、アポトーシス細胞死率は有意に高かった(図26)。さらに、LNA-133aは、CD133^高SaOS2およびHOS集団の浸潤性(図27)およびCD133^高表現型に関連する分子の発現(図28)を減少させた。まとめると、これらの結果は、CD133^高細胞におけるmiR-133aのサイレンシングが、薬物抵抗性および浸潤などの骨肉腫TICsの悪性表現型を減少させることができるということを示唆する。

【0139】

実施例11

miR-133aのインビボでのサイレンシングは、骨肉腫の治療に有効であり、CDDPとの組み合わせで相乗効果を示す。

インビトロでの知見を拡大し、miR-133aのサイレンシングが骨肉腫治療のための有効な治療の選択肢となり得るかどうかを決定するために、骨肉腫の自発的な肺転移モデルに対するLNA-133aの効果を調べた。実験的に、萤ルシフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされた143B(143B-1uc)の 1.5×10^6 細胞を無胸腺ヌードマウスの右脛骨近位端に同所的に移植した。移植した腫瘍の成長および遠隔転移の存在を、インビボイメージングシステム(IVIS)を用いてルシフェラーゼ生物発光について毎週分析した。新しい治療プロトコルは、インビトロ実験において見られた、化学療法による薬物抵抗性を減少し、かつTIC表現型の誘導を阻害するために、CDDP(2.5mg/kg⁻¹)(図29)の腹腔内(i.p.)注射の24時間前のLNA-133a静脈内(i.v.)投与(10mg/kg⁻¹)とした。このプロトコルの動物実験の前に、本発明者らは、生理食塩水-処置マウス由来のものと比較してLNA-133a-処置マウス由来の骨肉腫組織におけるmiR-133aレベルの減少を確認した(図30)。この新しい治療プロトコルの有効性を評価するために、結果を3つの対照群(n=各10):生理食塩水対照群、LNA群およびCDDP群と比較した。5週間で、各群の半数のマウスをさらなる分析のために安樂死させ、残りのマウスを生存についてモニターした。

【0140】

結果

10

20

30

40

50

腫瘍のm i R - 1 3 3 aの発現は、L N A - 1 3 3 aの存在下で減少した（図3 1）。L N A - 1 3 3 a (1 0 m g k g ⁻¹i.v.) およびC D D P (2 m g k g ⁻¹i.p.) を投与したマウスは、他の群と比較して有意に小さい腫瘍成長を示した（図3 2 および3 3）。C D D P 単独の存在下または非存在下での腫瘍の成長における有意差は観察されなかった。さらに、肺の転移は、3 5 日目で生理食塩水群で1 0 / 1 0 (1 0 0 %) 、L N A 群で7 / 1 0 (7 0 %) 、C D D P 群で8 / 1 0 (8 0 %) 、そして組み合わせ群 (L N A - 1 3 3 a + C D D P) ではたった3 / 1 0 (3 0 %) が観察された（表1 1）。

【0 1 4 1】

【表1 1】

表11. 骨肉腫のマウスにおけるLNA治療の結果

10

群	腫瘍重量(平均)(g)	肺転移	肺の発光(平均)
対照	3.928	10 / 10	5047
LNA	3.143	7 / 10	1744
CDDP	3.957	8 / 10	2855
LNA + CDDP	1.901	3 / 10	582

【0 1 4 2】

胸部領域での平均発光は、L N A - 1 3 3 a およびC D D P の組み合わせで処置されたマウスにおいて有意に減少した。すべての肺葉での肺転移の数と大きさの両方は、ルシフェラーゼアッセイおよび組織病理学検査において確認された。

20

【0 1 4 3】

とりわけ、併用療法 (L N A - 1 3 3 a + C D D P) の効果は、肺転移の相乗的な阻害を示すことが分かった。

【0 1 4 4】

さらに、併用療法 (L N A - 1 3 3 a + C D D P) は、腫瘍保持マウスの生存期間を有意に延長した（ログランク検定、P = 0 . 0 0 8 4 、図3 4）。成熟したヒトm i R - 1 3 3 a およびマウスm i R - 1 3 3 a の高さに保存された配列にもかかわらず（たとえば、ジーンバンク受入番号N R _ 0 2 9 6 7 6 : 5 ' - UUUGGUCCCCUUCACCAGCUG - 3 ' ; 配列番号3）、全てのマウスは、観察期間中、心臓、肝臓および骨格筋などの種々の組織について最小限の毒作用を示した。したがって、L N A - 1 3 3 a の全身投与は、シスプラチン存在下で、高転移性骨肉腫の異種移植片モデルにおいて腫瘍の成長および肺転移の抑制に対して有効である。

30

【0 1 4 5】

実施例 1 2

m i R - 1 3 3 a の遺伝子標的の同定

上述の実施例は、m i R - 1 3 3 a がC D 1 3 3 高骨肉腫T I C s の悪性度を調節し、骨肉腫細胞におけるm i R - 1 3 3 a 発現の阻害が腫瘍の発達を阻害するということを確立するものである。C D 1 3 3 高骨肉腫T I C s においてm i R - 1 3 3 a により調節される機序を理解するために、候補m R N A 発現プロファイリングを、コンピュータ予測と共に、2 つの異なるマイクロアレイ分析により行った（図3 5）。本発明者らは、1 8 1 2 種類の少なくとも1 . 2 倍減少 (fold decrease) で下方調節された遺伝子を、m i R - 1 3 3 a またはN C を形質導入したS a O S 2 C D 1 3 3 低細胞から回収された全R N A の最初のマイクロアレイ分析において検出した一方、m i R - 1 3 3 a またはN C を形質導入したC D 1 3 3 低細胞において抗 - A g o 2 抗体免疫沈降から回収されたR N A におけるm R N A 発現の2 回目のマイクロアレイ分析において、少なくとも2 . 0 倍増加 (fold increase) で4 9 7 6 種類の上方調節された遺伝子を検出した（図3 6）。その後、2 2 6 個の遺伝子を両方法により回収し（表1 2）、2 0 種類の遺伝子を、コンピュータデータベースで公に利用可能なものの1 つであるT a r g e t S c a n H u m a n 6 . 0 において同定した（図3 6）。

40

50

【0146】

【表12】

表12. cDNAマイクロアレイおよびコンピュータ予測の2つの解析によるmiR-133aについて予測された遺伝子標的

遺伝子記号	ジーンバンク 受入番号	遺伝子名	増加、 miR-133a- Ago2複合体	減少、 miR-133a トランスフェクション
PGAP1	NM_024989	タンパク質へのGPI結合後1 (post-GPI attachment to protein 1)	7.60	-0.42
C1orf118	XR_041258	染色体1オープンリーディングフレーム118	7.19	-0.28
DYNLT3	NM_006520	ダイニン、軽鎖、3型Tetex	7.17	-0.42
AGFG1	NM_001135187	FGリピートを有するArfGAP1	6.69	-0.28
WDR44	NM_019045	WDリピートドメイン44	6.36	-0.43
FLYWCH1	NM_020912	FLYWCH型ジンクフィンガー1	5.62	-0.32
CARKD	NM_018210	炭水化物キナーゼドメイン含有 (carbohydrate kinase domain containing)	5.50	-0.66
CUL4B	NM_003588	クリン4B	5.30	-0.40
ETS1	NM_005238	v-ets赤芽球ウイルスE26がん遺 伝子ホモログ1(トリ)	5.29	-0.74
HDAC6	NM_006044	ヒストンデアセチラーゼ6	5.20	-0.36
C19orf10	NM_019107	染色体19オープンリーディングフレーム10	5.17	-0.36
RASA2	NM_006506	RASp21タンパク質アクチベータ2	5.15	-0.44
KIAA1958	NM_133465	KIAA1958	5.14	-0.28
LOC645851	NR_024395	仮定LOC645851	5.09	-0.37
TBPL1	NM_004865	TBP-様1	4.86	-0.33
SNX26	NM_052948	ソーティングネキシン26	4.73	-0.27
SCRN1	NM_001145513	セセルニン1	4.72	-0.55
LOC100132672	XR_038504	グルコシルトランスフェラーゼ8ドメ イン含有3と類似	4.61	-0.36
AP4S1	NM_001128126	アダプター関連タンパク質複合体 4、シグマ1サブユニット	4.39	-0.59
SF3B3	NM_012426	スプライシング因子3b、サブユニッ ト3、130kDa	4.34	-0.27
LMBR1	NM_022458	リム領域1ホモログ(マウス)	4.31	-0.40
HERC4	NM_022079	ヘクトドメインおよびRLD4	4.26	-0.69
ADAMTS1	NM_006988	トロンボスピングジン1型モチーフを 有するADAMメタロペプチダーゼ1	4.17	-0.47
CYB5R4	NM_016230	シトクロムb5リダクターゼ4	4.14	-0.29
LHFPL2	NM_005779	脂肪腫HMGIC融合パートナー様2	4.11	-0.30

FAM13AOS	NR_002806	FAM13A逆鎖(非一タンパク質コード)	4.04	-0.28	
RALGAPA1	NM_194301	Ral GTPase活性化タンパク質、アルファサブユニット1(触媒)	4.00	-0.53	
TNFRSF13C	NM_052945	腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、メンバー13C	3.99	-0.44	
LOC100131829	AK124002	仮定タンパク質LOC100131829	3.95	-0.43	
C1orf58	NM_144695	染色体1オープンリーディングフレーム58	3.92	-0.54	
TNFRSF10D	NM_003840	腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10d、切断型デスマインを有するデコイ	3.75	-0.45	10
ZDHHC17	NM_015336	ジンクフィンガー、DHHC-型含有17	3.68	-0.36	
LOC729603	NR_003288	カルシウム結合タンパク質P22偽遺伝子	3.62	-0.34	
SNX30	NM_001012994	ソーティングネキシンファミリーメンバー30	3.55	-0.41	
TSTD2	NM_139246	チオ硫酸硫黄トランスフェラーゼ(ロダネーゼ)一様ドメイン含有2	3.52	-0.38	20
SPRYD4	NM_207344	SPRYドメイン含有4	3.51	-0.35	
PTPMT1	NM_175732	タンパク質チロシンホスファターゼ、ミトコンドリア1	3.50	-0.38	
KLHDC4	NM_017566	ケルチドメイン含有4	3.43	-0.43	
SLC30A7	NM_133496	溶質キャリアファミリー30(亜鉛トランスポーター)、メンバー7	3.38	-0.48	
TCEA3	NM_003196	転写延長因子A(SII)、3	3.32	-0.39	
GORASP1	NM_031899	ゴルジ再構築積層タンパク質1、65kDa	3.17	-0.51	30
RBM15B	NM_013286	RNA結合モチーフタンパク質15B	3.13	-0.80	
PDGFRB	NM_002609	血小板由来成長因子受容体、ベータポリペプチド	3.13	-0.37	
ITPRIPL2	NM_001034841	イノシトール1, 4, 5-トリホスフェート受容体相互作用タンパク質様2	3.09	-0.34	
FBXO3	NM_033406	F-ボックスタンパク質3	3.01	-0.35	
FAM122B	NM_001166600	配列類似性を有するファミリー122B	3.00	-0.30	
MINPP1	NM_004897	多イノシトールポリリン酸ヒスチジンホスファターゼ、1	2.98	-0.28	40
SPOPL	NM_001001664	スペックル型POZタンパク質-様	2.94	-0.47	
FAM86B1	NM_001083537	配列類似性を有するファミリー86、メンバーB1	2.85	-0.44	

LOC100128071	XM_001724939	hCG41624と類似	2.83	-0.31	
CCNT1	NM_001240	サイクリンT1	2.82	-0.53	
AP2M1	NM_004068	アダプター関連タンパク質複合体2、mu1サブユニット	2.80	-0.44	
AKIRIN1	NM_024595	アキリン1	2.73	-0.27	
CHMP5	NM_016410	クロマチン修飾タンパク質5	2.69	-0.61	
PPM1K	NM_152542	タンパク質ホスファターゼ1K(PP2Cドメイン含有)	2.67	-0.53	
MICALL2	NM_182924	MICAL-様2	2.66	-0.29	10
DGKZ	AK123378	ジアシルグリセロールキナーゼ、ゼータ104kDa	2.65	-0.39	
SCARNA16	NR_003013	カハール小体特異的RNA16	2.65	-0.50	
SERPINE1	NM_000602	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードE(ネキシン、プラスミノーゲンアクチベータ阻害剤1型)、メンバ-1	2.65	-0.61	
STARD13	NM_178006	StAR関連脂質転移(START)ドメイン含有13	2.58	-0.28	
ROD1	NM_005156	ROD1 分化の調節因子1(S. Pombe)	2.55	-0.36	20
VEGFC	NM_005429	血管内皮成長因子C	2.45	-0.35	
MYH9	NM_002473	ミオシン、重鎖9、非筋肉	2.43	-0.39	
CCNJ	NM_019084	サイクリンJ	2.41	-0.26	
WDR66	NM_144668	WDリピートドメイン66	2.38	-0.32	
CSRNP1	NM_033027	システインーセリンーリッチ核タンパク質1	2.34	-0.28	
MYBL1	NM_001144755	v-myb骨髄芽球症ウイルスがん遺伝子ホモログ(トリ)-様1	2.32	-0.29	
EME2	BC041011	本態減数分裂エンドヌクレアーゼ1ホモログ2(S. Pombe)	2.31	-0.44	30
MGC27382	AK091757	仮定MGC27382	2.27	-0.33	
MMP14	NM_004995	マトリックスメタロペプチダーゼ14(膜挿入)	2.27	-0.42	
WASH1	NM_182905	WASタンパク質ファミリーホモログ1	2.26	-0.32	
RIMS2	NM_014677	調節シナプス膜エクソサイトーシス2	2.25	-0.45	
HSPG2	NM_005529	ヘパラン硫酸塩プロテオグリカン2	2.25	-0.45	
HDAC8	NM_018486	ヒストンデアセチラーゼ8	2.21	-0.34	
AK2	NM_013411	アデニレートキナーゼ2	2.20	-0.30	40
SRRM2	NM_016333	セリン／アルギニン反復マトリックス2	2.19	-0.28	
LOC731419	XM_001132610	仮定タンパク質LOC731419	2.19	-0.32	

SYNGR3	NM_004209	シナプトグリン3	2.11	-0.33	
PRUNE2	NM_015225	ブルーンホモログ2(ショウジョウバエ)	2.11	-0.38	
MLKL	NM_152649	混合系統キナーゼドメインー様	2.10	-0.30	
DST	NM_001723	ジストニン	2.10	-0.44	
PBXIP1	NM_020524	プレーBー細胞白血病ホメオボックス相互作用タンパク質1	2.03	-0.78	
ANTXR2	NM_058172	炭疽毒素受容体2	1.98	-0.61	
NSF	NM_006178	N-エチルマレイミド感受性因子	1.98	-0.32	10
APH1A	NM_001077628	咽頭前部欠損(anterior pharynx defective)1ホモログA(C、エレガント)	1.98	-0.34	
RASA1	NM_002890	RASp21タンパク質アクチベータ(GTPase活性化タンパク質)1	1.95	-0.46	
BAIAP2	NM_017451	BAI1関連タンパク質2	1.91	-0.29	
GARNL3	NM_032293	GTPase活性化Rap/RanGAPドメイン様3	1.90	-0.49	
CKLF	NM_016951	ケモカイン様因子	1.89	-0.38	
SNORD17	NR_003045	核小体低分子RNA、C/Dボックス17	1.88	-0.27	20
TRIT1	NM_017646	tRNAイソペンテニルトランスフェラーゼ1	1.88	-0.43	
FILIP1L	NM_182909	フィラミンA相互作用タンパク質1様	1.88	-0.36	
VAMP2	NM_014232	ベシクル関連膜タンパク質2(シナプトブレビン2)	1.87	-0.31	
TBL1X	NM_005647	トランスデューション(ペータ)様1Xー関連	1.87	-0.30	
LOC729314	XR_037423	POM121様タンパク質1と類似	1.85	-0.63	30
RHD	NM_016124	Ph血液群、D抗原	1.84	-0.28	
HERC2	NM_004667	ヘクトドメインおよびRLD2	1.81	-0.36	
KIAA1967	NM_021174	KIAA1967	1.78	-0.32	
YIPF2	NM_024029	Yip1ドメインファミリー、メンバー2	1.71	-0.48	
MLL5	NM_182931	骨髄系/リンパ系または混合系統白血病5(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ)	1.71	-0.41	
DUSP11	NM_003584	二重特異性ホスファターゼ11(RNA/RNP複合体1ー相互作用)	1.70	-0.28	
ABL2	NM_001100108	v-ablアベルソンマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ2(arg、アベルソン関連遺伝子)	1.68	-0.30	40
RBMX2	NM_016024	RNA結合モチーフタンパク質、Xー関連2	1.65	-0.37	

ALS2CR8	NM_024744	筋萎縮性側索硬化症2(若年性) 染色体領域、候補8	1.65	-0.30	
IDH1	NM_005896	イソクエン酸脱水素酵素1(NADP+) 、可溶性	1.65	-0.31	
NT5C3L	NM_052935	5'-ヌクレオチダーゼ、細胞質III様	1.63	-0.40	
ERMP1	NM_024896	小胞体メタロペプチダーゼ1	1.59	-0.86	
GPSM1	NM_015597	G-タンパク質シグナル伝達モジ ュレーター1(AGS3様、C. エレガ ンス)	1.53	-0.47	
ARHGEF10L	NM_018125	Rhoグアニンヌクレオチド交換因 子(GEF)10様	1.52	-0.32	10
MFN2	NM_014874	ミトフシン(mitofusin)2	1.52	-0.32	
CG030	NR_026928	仮定CG030	1.49	-0.30	
UBXN7	NM_015562	UBXドメインタンパク質7	1.49	-0.35	
CCDC45	NM_138363	コイルドコイルドメイン含有45	1.47	-0.39	
ZNF701	NM_018260	ジンクフィンガータンパク質701	1.46	-0.68	
LOC642406	AK024257	コンタクチン関連タンパク質様3B と類似	1.46	-1.34	
PHF8	NM_015107	PHDフィンガータンパク質8	1.44	-0.28	20
MED23	NM_015979	メディエーター複合体サブユニット 23	1.42	-0.29	
ARHGAP11B	NM_001039841	PhoGTPase活性化タンパク質11 B	1.42	-0.29	
MYST4	NM_012330	MYSTヒストンアセチルトランスフ エラーゼ(単球白血病)4	1.41	-0.31	
SYT17	NM_016524	シナプトタグミンXVII	1.40	-0.39	
DPM2	NM_003863	ドリコリルホスフェートマンノシルト ランスフェラーゼポリペプチド2、制 御サブユニット	1.30	-0.35	30
TUB	NM_003320	tubbyホモログ(マウス)	1.30	-0.27	
TBPL1	NM_004865	TBP様1	1.30	-0.28	
FAM40B	NM_020704	配列類似性を有するファミリー40、 メンバーB	1.30	-0.62	
DOLPP1	NM_020438	ドリコリルピロホスフェートホスファ ターゼ1	1.29	-0.34	
HIST1H2BM	NM_003521	ヒストンクラスター1、H2bm	1.29	-0.35	
ZBTB7A	NM_015898	ジンクフィンガーおよびBTBドメイ ン含有7A	1.28	-0.28	40
SLC30A7	NM_133496	溶質キャリアファミリー30(亜鉛ト ランスポーター)、メンバー7	1.25	-0.36	
HCRTR1	NM_001525	ヒポクレチン(オレキシン)受容体1	1.22	-0.27	

DNAJB6	NM_005494	DnaJ(Hsp40)ホモログ、サブファミリーB、メンバー6	1.22	-0.56	
QPRT	NM_014298	キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ	1.20	-0.32	
CCDC75	NM_174931	コイルドコイルドメイン含有75	1.20	-0.29	
NPTXR	NM_014293	神経細胞ペントラキシン受容体	1.19	-0.63	
RHOB	NM_004040	rasホモログ遺伝子ファミリー、メンバーB	1.19	-0.48	
CDH7	NM_004361	カドヘリン7、2型	1.17	-0.34	10
COL5A1	AK057231	コラーゲン、V型、アルファ1	1.17	-0.50	
SGMS2	NM_152621	スフィンゴミエリン合成酵素2	1.16	-0.32	
LOC643802	XM_001716860	M期リンタンパク質10と類似(U3 核小体低分子リボヌクレオタンパク質)	1.15	-0.53	
BCL11A	NM_018014	B-細胞CLL/リンパ腫11A(ジンクフィンガータンパク質)	1.14	-0.28	
GEN1	NM_182625	Genホモログ1、エンドヌクレアーゼ(ショウジョウバエ)	1.14	-0.28	
ZP1	NM_207341	透明帯糖タンパク質1(精子受容体)	1.12	-0.30	20
EFTUD1	NM_024580	伸長因子TuGTP結合ドメイン含有1	1.12	-0.47	
REEP6	NM_138393	受容体付属タンパク質6	1.10	-0.58	
UBA2	NM_005499	ユビキチン様修飾因子活性化酵素2	1.08	-0.38	
BRIP1	NM_032043	BRCA1相互作用タンパク質C末端ヘリカーゼ1	1.06	-0.27	
KPTN	NM_007059	カプチン(アクチン結合タンパク質)	1.06	-0.57	
DZIP1	NM_014934	DAZ相互作用タンパク質1	1.04	-0.35	30
MGC16275	NR_026914	仮定タンパク質MGC16275	1.04	-0.29	
APTX	NM_017692	アプラタキシン	1.03	-0.29	
P2RX4	NM_002560	プリン受容体P2X、リガンド依存性イオンチャネル、4	1.02	-0.29	
PCDH24	NM_017675	プロトカドヘリン24	1.00	-0.37	

【0147】

全体として、m i R - 1 3 3 a 標的遺伝子の推定候補は、これらのデータの併用で選択された。つぎに、これらの分子の発現は、これらの候補が骨肉腫細胞におけるm i R - 1 3 3 a の機能的に重要な標的かどうかを調査するためにs i R N A - 誘導遺伝子ノックダウンシステムを用いて減少された。結果として、C D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞における4つの候補 (A N X A 2、D U S P 1 1、M A S T 4 およびR O D 1) のノックダウンが、薬物抵抗性を増強し(図37)、5つの候補 (A N X A 2、D U S P 1 1、S G M S 2、S N X 3 0 およびU B A 2) のノックダウンが、C D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞の浸潤性を増強した(図38)。

【0148】

もちろん、これらの推定標的遺伝子のノックダウンの効果は、これらの同じ遺伝子に対するm i R - 1 3 3 a によってもたらされる効果と同様であり、その結果、薬物抵抗性の増強およびC D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞の浸潤性の増強がもたらされるであろう。逆に、C D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞におけるm i R - 1 3 3 a のサイレンシングは、推定標的遺

伝子の発現を許容し、それにより薬物抵抗性および C D 1 3 3 低 S a O S 2 細胞の浸潤性が減少されることが期待されるであろう。

【 0 1 4 9 】

これらの分子が m i R - 1 3 3 a により調節されるかどうかを確認するために、推定 m i R - 1 3 3 a 結合部位を含む 3' U T R (非翻訳領域) フラグメントを、ルシフェラーゼコード配列の下流にクローニングし、ルシフェラーゼレポーターおよび m i R - 1 3 3 a オリゴヌクレオチドを S a O S 細胞に同時トランスフェクトした。対照として、ルシフェラーゼレポーターおよび N C オリゴヌクレオチドを、 S a O S 2 細胞に同時トランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性は、 N C オリゴヌクレオチドで同時トランスフェクトされた細胞と比較して、 m i R - 1 3 3 a で同時トランスフェクトされた細胞において、およそ 39 ~ 73 % 減少した (図 3 9) 。このアッセイの結果から、 A N X A 2 、 D U S P 1 1 、 M A S T 4 、 S G M S 2 、 S N X 3 0 および U B A 2 は、 m i R - 1 3 3 a の直接的な標的として機能することが分かった。 10

【 0 1 5 0 】

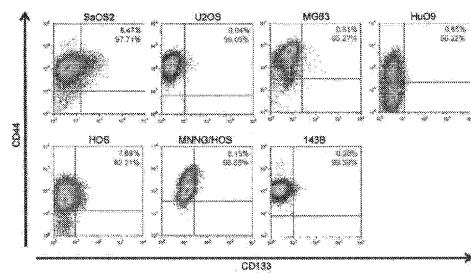
実際、これらの標的遺伝子またはそれらのファミリー遺伝子は、ある他のがんにおいて腫瘍抑制因子として機能することが以前に示唆された。 Gostissa, M et al. (1999) EMBO J. 18:6462-71; Caprara, G et al. (2009) J. Cell. Mol. Med. 13: 2158-70; Nguyen, L N et al. (2006) Clin. Cancer Res. 12: 6952-9. A N X A 2 は、骨肉腫における腫瘍抑制機能と関連付けられることが報告されているが (Gillette, J M (2004) J. Cell Bioc hem. 92: 820-32) 、 M A S T 4 は、腫瘍生物学においては知られていない (Garland, P (2008) Brain Res. 21: 12-19) 。 20

【 0 1 5 1 】

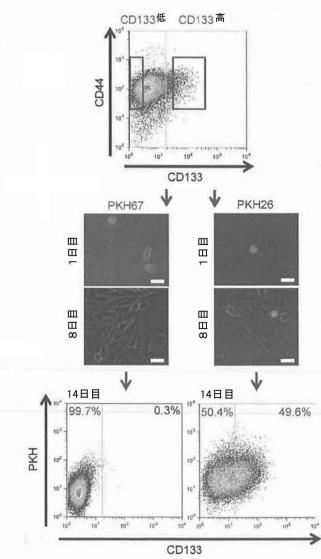
実際、本発明により開示されているように、これらすべての標的の発現は、 C D 1 3 3 高細胞において m i R - 1 3 3 a のサイレンシングにより増加し (図 4 0) 、 C D 1 3 3 低細胞における m i R - 1 3 3 a の上方調節により減少し (図 4 1) 、異種移植腫瘍と臨床試料 (結果は示さず) との両方での C D 1 3 3 および m i R - 1 3 3 a の発現の観察された逆相関 (図 4 2) と一致した。 m i R - 1 3 3 a のサイレンシングによる標的の発現の増加は、 L N A - 処置腫瘍の q R T - P C R (結果は示さず) および免疫組織化学 (結果は示さず) により確認した。最後に、これらの標的の発現と骨肉腫患者の予後との間の関係の研究において、 m i R - 1 3 3 a 標的の m R N A 発現と患者の予後との間に際立つて密接な相関関係が見出された (図 4 3) 。これらの標的を高いレベルで発現している患者は、より低いレベルで発現している患者よりもより長く生存した。これは、これらの標的が骨肉腫における新規な腫瘍抑制因子として機能し得ることを示す。 30

【図1】

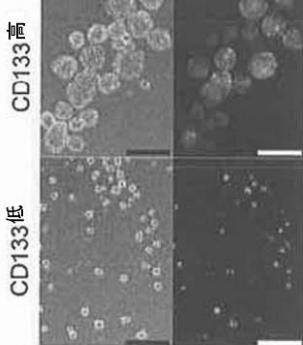
Fig.1



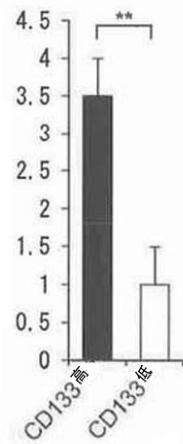
【図2】



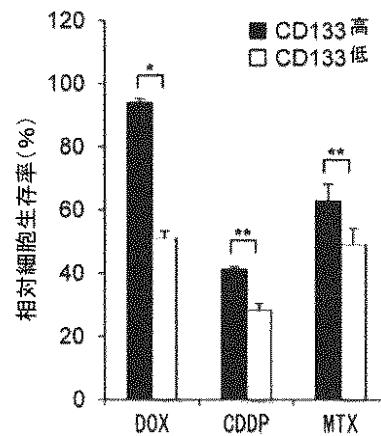
【図3】



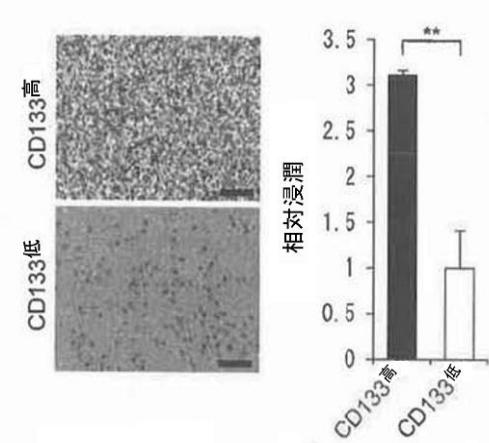
相対スフェロイド形成



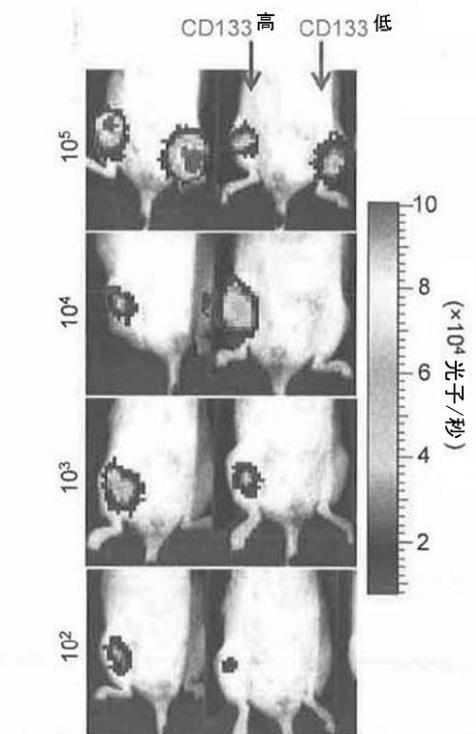
【図4】



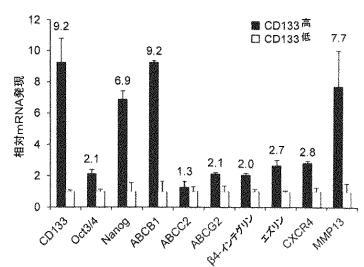
【図5】



【図7】

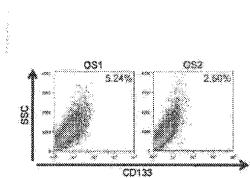


【図6】

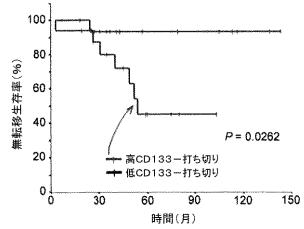


【図8】

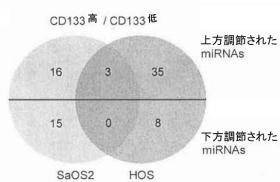
Fig. 8



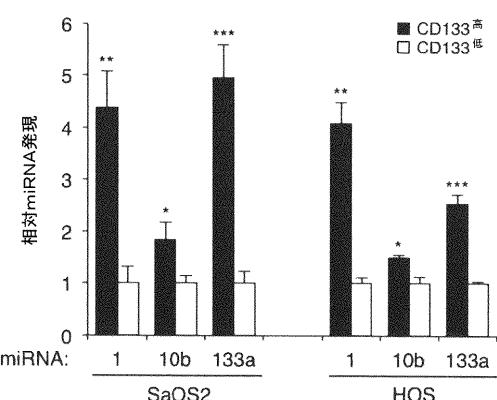
【図9】



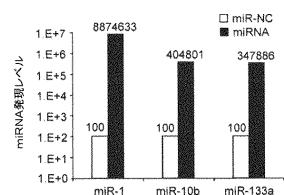
【図10】



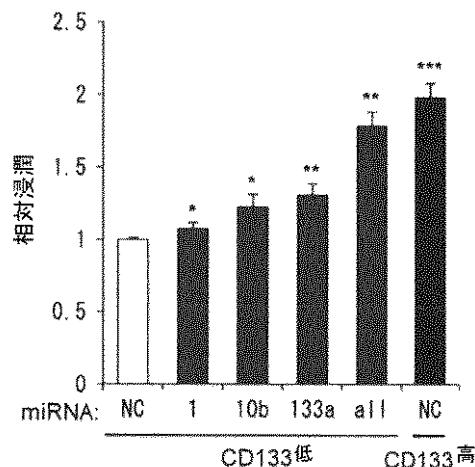
【図11】



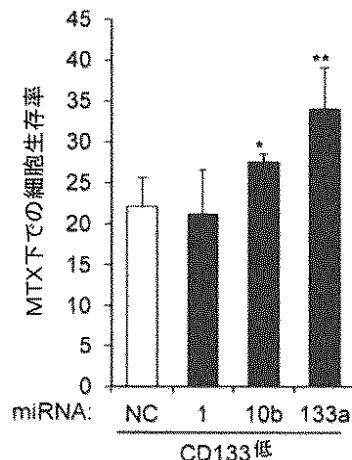
【図12】



【図13】

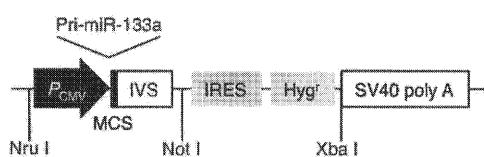


【図14】

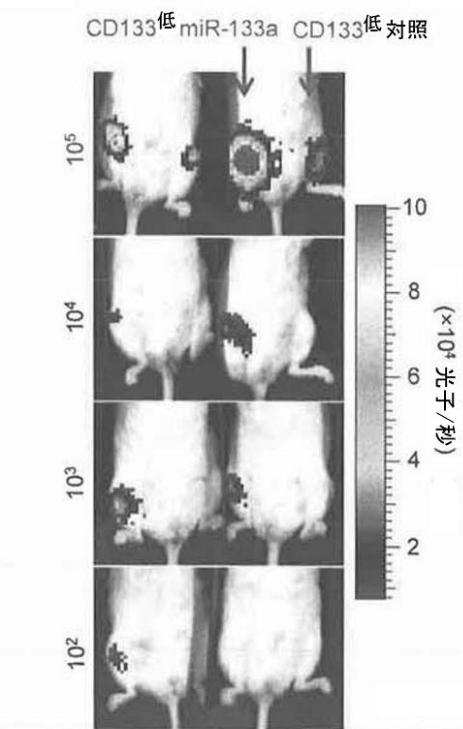


【図15】

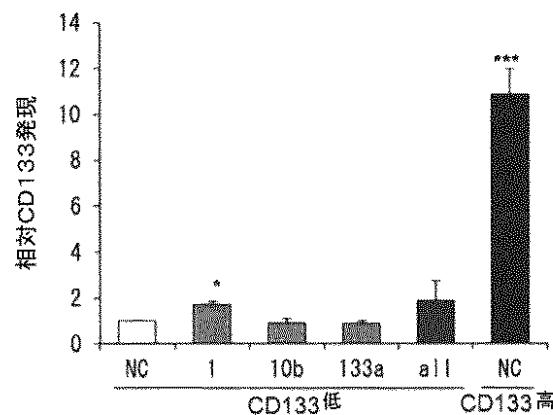
Fig. 15



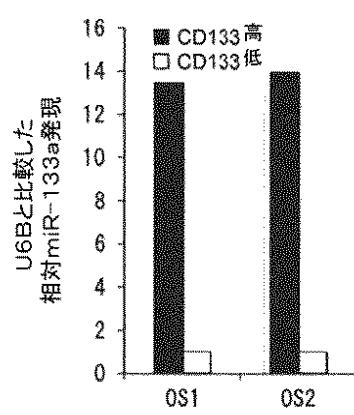
【図16】



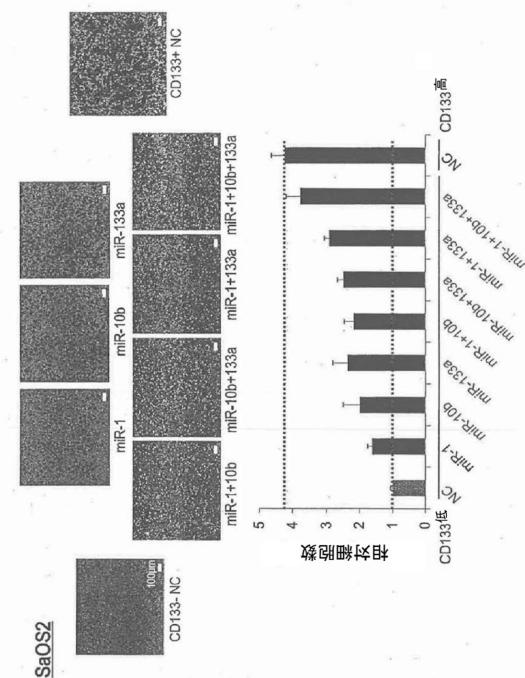
【図17】



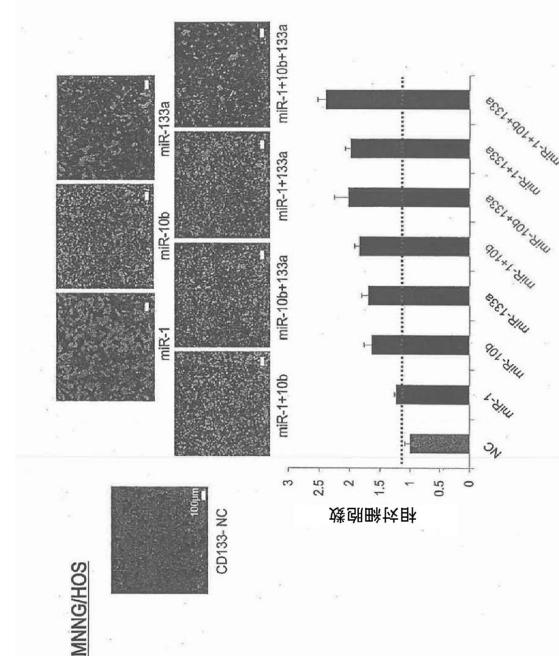
【図18】



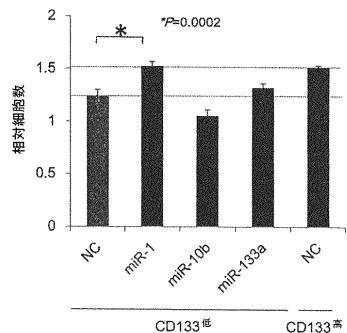
【図19】



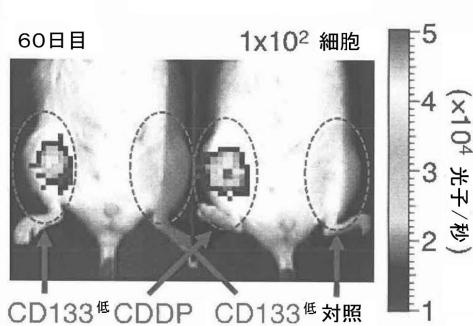
【図20】



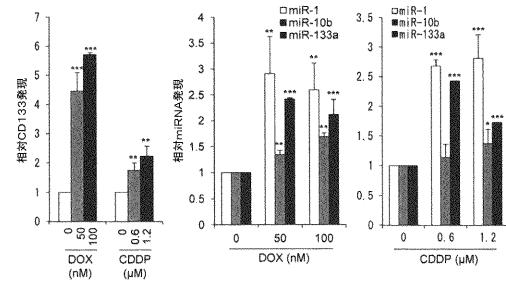
【図21】



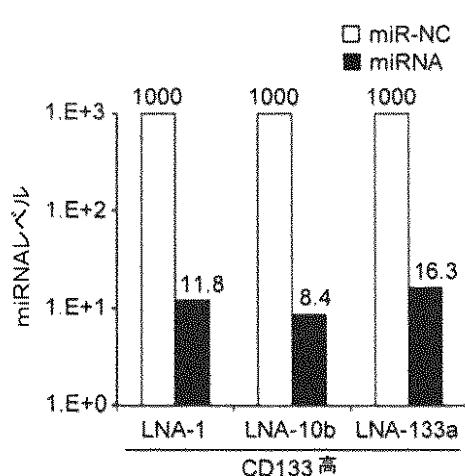
【図23】



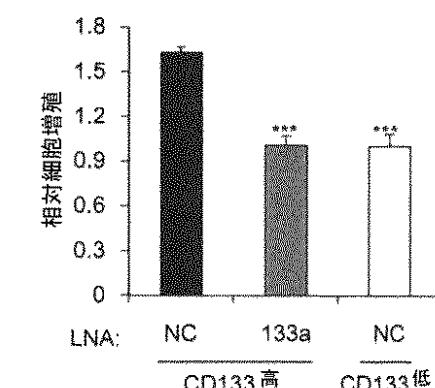
【図22】



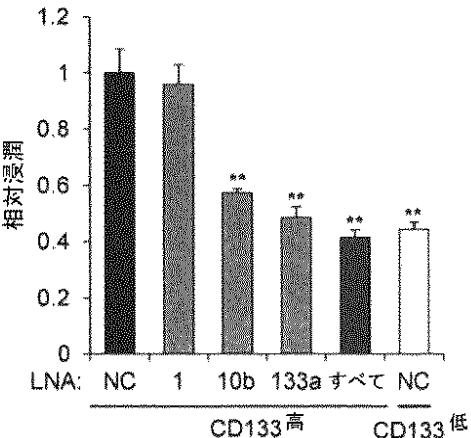
【図24】



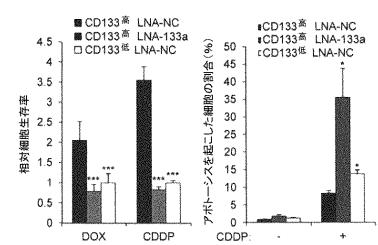
【図25】



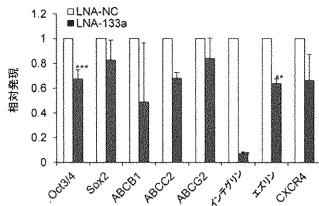
【図27】



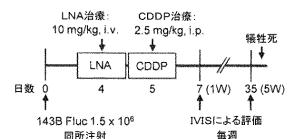
【図26】



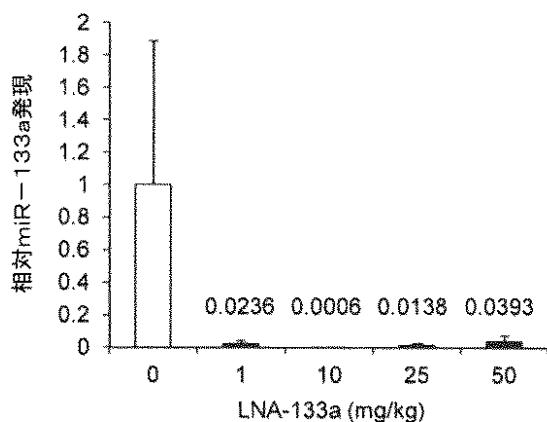
【図28】



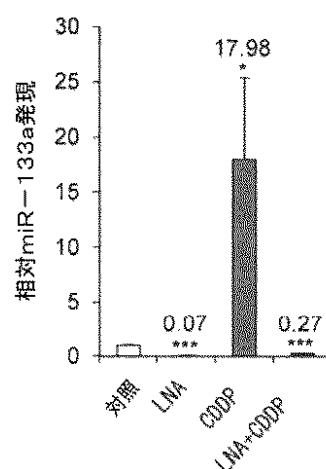
【図29】



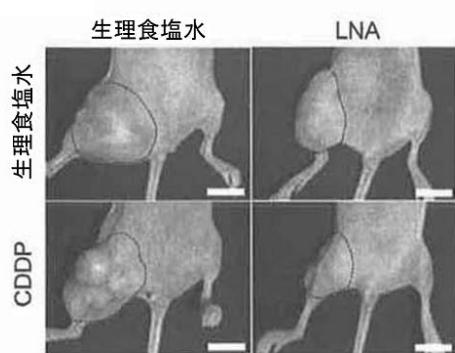
【図30】



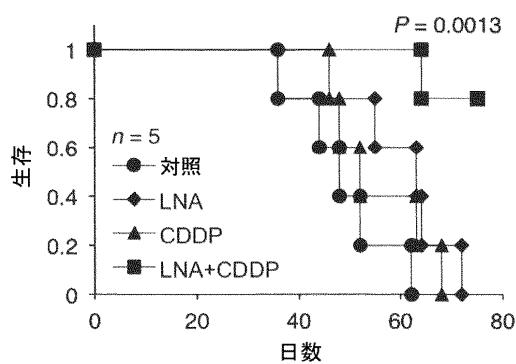
【図31】



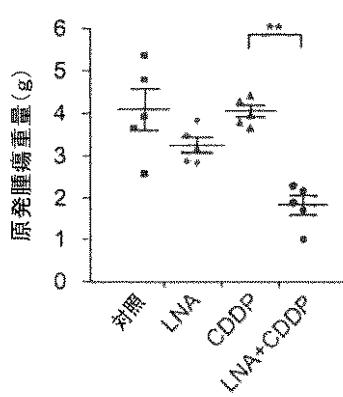
【図32】



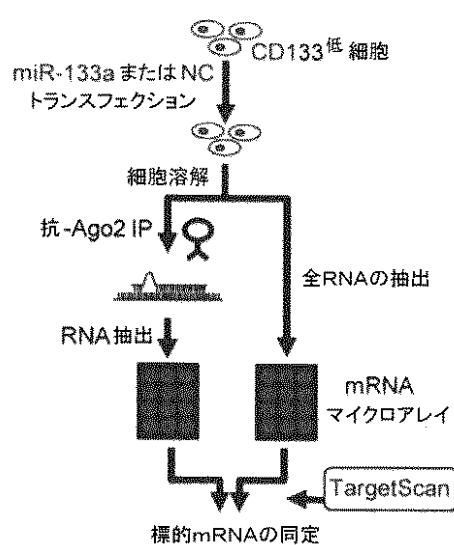
【図34】



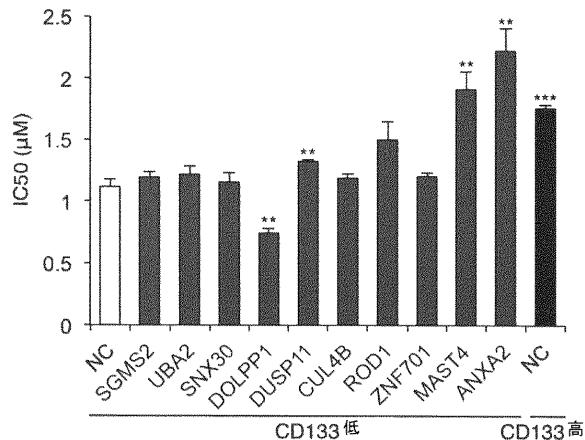
【図33】



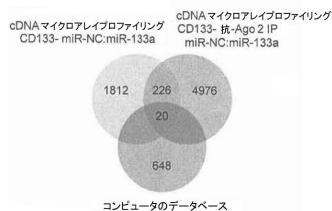
【図35】



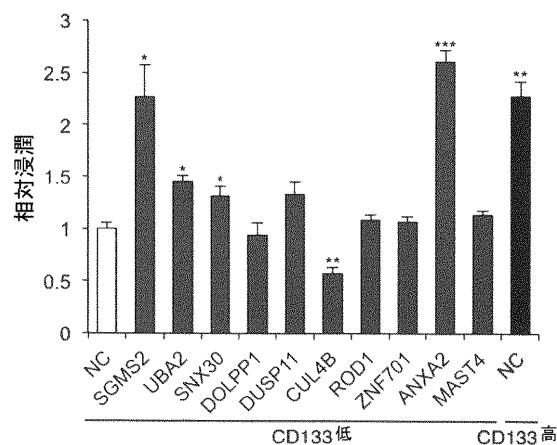
【図37】



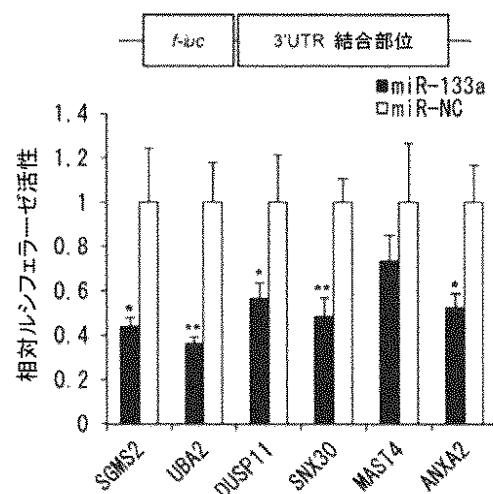
【図36】



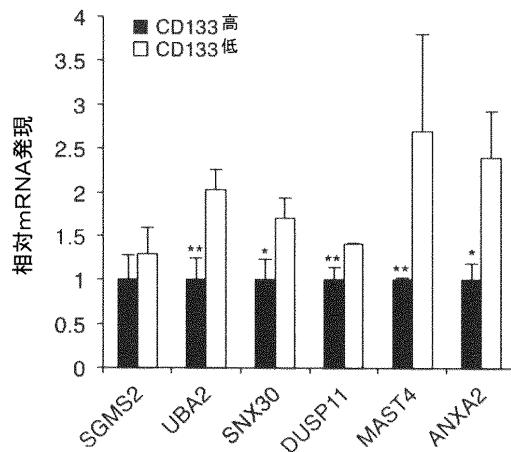
【図38】



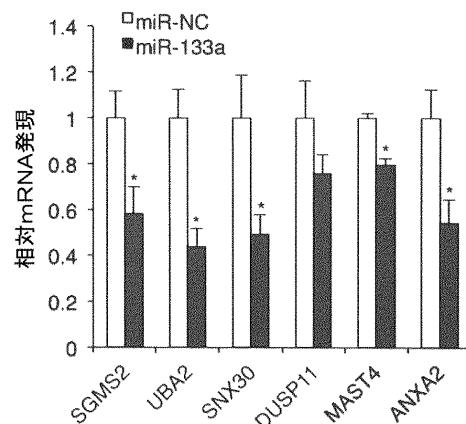
【図39】



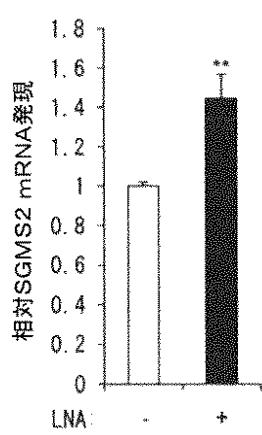
【図40】



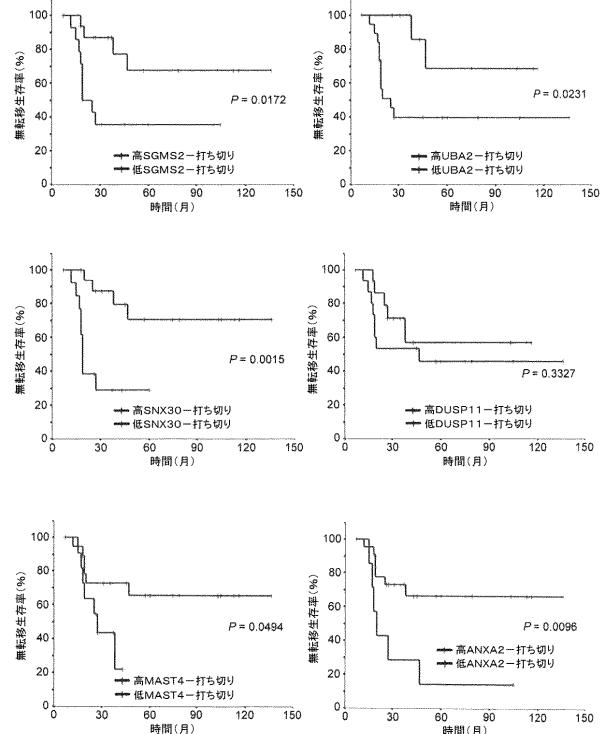
【図41】



【図42】



【図43】



フロントページの続き

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

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0185027(US, A1)
米国特許出願公開第2009/0005336(US, A1)
国際公開第2010/022166(WO, A1)
中国特許出願公開第102080086(CN, A)
Lihua Sun, et al., Brain Research, 2011年 3月, vol. 1389, pp. 9-18
藤原智洋, 外8名, 日本整形外科学会雑誌, 2012年 6月, vol. 86, no. 6, S837, I-3-FP
3-4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
W P I
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d
S c i e n c e D i r e c t