

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6478916号
(P6478916)

(45) 発行日 平成31年3月6日(2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/7105 (2006.01)	A 61 K 31/7105
A 61 K 31/337 (2006.01)	A 61 K 31/337
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00 105
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00

請求項の数 29 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-542832 (P2015-542832)	(73) 特許権者	508152917 ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティー オブ テキサス システム アメリカ合衆国 78701 テキサス州 オースティン ウエスト 第七 ストリ ート 210
(86) (22) 出願日	平成25年11月15日(2013.11.15)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2016-502527 (P2016-502527A)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(43) 公表日	平成28年1月28日(2016.1.28)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕幸
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/070350	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開番号	W02014/078686		
(87) 國際公開日	平成26年5月22日(2014.5.22)		
審査請求日	平成28年11月11日(2016.11.11)		
(31) 優先権主張番号	61/727,481		
(32) 優先日	平成24年11月16日(2012.11.16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】薬物耐性乳癌の予後判定および処置のための治療アジュバントおよびバイオマーカーとしてのmRNA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

hsa-miR-204を含む、化学療法耐性のトリプルネガティブ乳癌(TNBC)細胞の増殖を低下させるための組成物であって、タキサンと併用され、hsa-miR-204の発現が低下している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項2】

癌細胞が、脳由来神経栄養因子(BDNF)またはエズリンを過剰発現する、請求項1記載の組成物。

【請求項3】

癌細胞の増殖が転移性である、請求項1～2のいずれか一項記載の組成物。

【請求項4】

癌細胞におけるhsa-miR-204のレベルが決定される、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。

【請求項5】

hsa-miR-204のレベルが、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)またはアレイハイブリダイゼーションを用いて決定される、請求項4記載の組成物。

【請求項6】

対象から得た血液試料中のhsa-miR-204のレベルが決定される、請求項4または5のいずれか一項記載の組成物。

10

20

【請求項 7】

血液試料中のhsa-miR-204のレベルが、対照と比較して低下している、請求項6記載の組成物。

【請求項 8】

全身投与のために製剤化される、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 9】

静脈内注射により投与される、請求項1～8のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 10】

脂質ベースの送達媒体またはナノ粒子ベースの送達媒体をさらに含む、請求項9記載の組成物。

10

【請求項 11】

タキサンと同時に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項1～10のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 12】

タキサンが投与される前または後に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項1～10のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 13】

タキサンとの投与の時間間隔が1から30日である、請求項12記載の組成物。

【請求項 14】

タキサンが投与された後に投与されるように用いられることを特徴とする、請求項12または13のいずれか一項記載の組成物。

20

【請求項 15】

癌細胞がタキサンに対して耐性となっている、請求項1～14のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 16】

タキサンがパクリタキセルである、請求項15記載の組成物。

【請求項 17】

薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項1～10のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 18】

無菌性、発熱物質、および微粒子、または他の混入物に関する薬局方の要件を満たしている調製物である、請求項17記載の組成物。

30

【請求項 19】

調製物が全身投与のために製剤化されている、請求項17または18のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 20】

対象が哺乳動物である、請求項1～19のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 21】

対象がヒトである、請求項1～20のいずれか一項記載の組成物。

【請求項 22】

対象の細胞におけるhsa-miR-204のレベルを決定する段階を含む、請求項1記載の組成物によるタキサンに対する化学療法耐性のTNBC細胞の増殖を低下させるための治療から効果が得られる可能性がある対象を同定するための方法。

40

【請求項 23】

対象の細胞におけるhsa-miR-204のレベルが、qRT-PCRまたはアレイハイブリダイゼーションを用いて決定される、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

対象から得た血液試料中のhsa-miR-204のレベルが決定される、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

血液試料中のhsa-miR-204のレベルが、対照と比較して低下している、請求項24記載の方法。

50

【請求項 2 6】

阻害されると、治療活性物質の亜致死濃度で培養したTNBC細胞の生存率を増加させる有望な増感剤miRNAをスクリーニングするための方法であって、

候補増感剤miRNAの阻害物質と共に治療活性物質の亜致死濃度を含むmiRNA阻害物質含有培養物中でTNBC細胞を培養する段階；

治療活性物質の亜致死濃度を含むが候補増感剤miRNAの阻害物質が添加されていないmiRNA阻害物質欠如培養物中でTNBC細胞を培養する段階；ならびに

一定期間後に、miRNA阻害物質含有細胞集団と、miRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率を決定する段階であって、miRNA阻害物質含有細胞集団の生存率が、miRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率より有意に高ければ、候補増感剤miRNAが有望な増感剤miRNAとして同定される、段階

を含み、

該有望な増感剤miRNAがhsa-miR-204であり、該治療活性物質がタキサンである、方法。

【請求項 2 7】

治療活性物質の亜致死濃度が、癌細胞株の細胞の80%が72時間培養後になおも生存可能である濃度である、請求項26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

治療活性物質がパクリタキセルである、請求項26または27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 9】

パクリタキセルの亜致死濃度が2~8 nMである、請求項28記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願の相互参照**

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2012年11月16日に提出された米国特許仮出願第61/727,481号の優先権の恩典を主張する。

【0 0 0 2】**A. 発明の分野**

本発明は、癌を処置するためのマイクロRNA (miRNA) の使用、ならびに癌を処置するためのこれらの組成物の使用に関する。

30

【背景技術】**【0 0 0 3】****発明の背景****B. 関連技術の説明**

乳癌全体のおよそ15~20%がトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) である。これらの癌は典型的に、明確な侵攻性の転移パターンを示す。TNBCの診断を受けている患者の予後はしばしば不良であり、そのため乳癌による死亡数は不釣り合いなほど多い。TNBC疾患の初期段階では化学療法に対する奏効率が良好であるにもかかわらず、60%を超えるTNBC患者が化学療法に対する耐性を生じ、これによって早期再発および生存期間の短縮が起こる。

【0 0 0 4】

40

miRNAは、遺伝子調節において広く機能する、低分子非タンパク質コードRNAである。60%を超えるヒトタンパク質コード遺伝子のメッセンジャーRNAが、多くのヒト細胞タイプに豊富に存在するmiRNAの標的でありうる (Friedman, et al., 2009)。ヒトゲノムは、1000種を超えるmiRNAをコードする (1000種を超えるヒトmiRNAがManchester University's miRBaseに記載されている)。

【発明の概要】**【0 0 0 5】**

1つの例において、hsa-miR-204またはその相同体の発現が低下しているまたは有意に低下している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の有効量を投与する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための方

50

法が開示される。ある局面において、脳由来神経栄養因子（BDNF）またはエズリンは、hsa-miR-204またはその相同体の発現が低下しているまたは有意に低下している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象の癌細胞において過剰発現される、または有意に過剰発現される。

【0006】

いくつかの態様において、対象は哺乳動物である。ある局面において、対象はヒトである。対象は、乳癌、卵巣癌、または小児腎腫瘍などの癌を有しうる。ある局面において、対象の乳癌細胞は、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）細胞である。ある局面において、癌細胞の増殖は転移性である。

【0007】

いくつかの態様において、癌細胞の増殖を低下させるための開示の方法はさらに、対象の細胞におけるhsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階を含む。関連する態様において、開示の方法は、対象の細胞におけるhsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させる治療から効果が得られる可能性がある対象を同定するための方法である。

【0008】

ある局面において、hsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）に基づく方法またはアレイハイブリダイゼーションに基づく方法を用いることによって行われる。いくつかの局面において、hsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階は、対象から得られた血液試料中のhsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階である。いくつかの局面において、対象から得られた血液試料中のhsa-miR-204またはその相同体のレベルは、低下しているレベルであると決定される。

【0009】

いくつかの態様において、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物は、全身投与のために製剤化されている。ある局面において、この組成物は、静脈内注射によって投与される。あるさらなる局面において、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物はさらに、脂質ベースの送達媒体またはナノ粒子ベースの送達媒体を含む。

【0010】

さらなる態様において、対象は、第二の活性物質を含む組成物をさらに投与される。さらなる局面において、第二の活性物質は、細胞傷害性化学療法剤、ナノバイオコンジュゲート、またはhsa-miR-204もしくはその相同体以外のmiRNAである。あるさらなる局面において、細胞傷害性化学療法剤は、タキサンを含み、ある追加のさらなる局面において、タキサンはパクリタキセルである。

【0011】

第二の活性物質を含む組成物の投与を含むいくつかの態様において、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の投与は、第二の活性物質を含む組成物の投与と同時である。いくつかの追加の態様において、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の投与は、第二の活性物質を含む組成物の投与の前または後である。ある局面において、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物と第二の活性物質との投与の時間間隔は、1から30日であつてよく、または0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれらを超える時間もしくは日数、またはそれらから導出可能な任意の整数の時間もしくは日数であつてよい。

【0012】

第二の活性物質を含む組成物の投与も含むある態様において、第二の活性物質を含む組成物の投与は、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の前に投与される。この、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の前に第二の活性物質を含む組成物の投与を含むあるさらなる局面において、癌細胞は、第二の活性物質に対して耐性となっている。ある追加のさらなる局面において、第二の活性物質を含む組成物は、hsa-miR-204またはその

10

20

30

40

50

相同体を含む組成物の前に投与され、第二の活性物質は化学療法剤である。ある追加のさらなる局面において、第二の活性物質はタキソールである。ある追加のさらなる局面において、第二の活性物質はパクリタキセルである。

【0013】

上記の方法のいくつかの態様において、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物は、薬学的に許容される担体を含む調製物から得られる。いくつかの局面において、調製物はさらに、無菌性、発熱物質、および微粒子、もしくは他の混入物に関する薬局方の要件を満たしているか、または全身投与のために製剤化されているか、または上記の薬局方の要件を満たし、なおかつ全身投与のために製剤化されている。

【0014】

さらに、阻害されると、治療活性物質の亜致死濃度で培養した癌細胞株の細胞の生存率を増加させる有望な増感剤miRNAに関してスクリーニングするための方法が開示され、該方法は、候補増感剤miRNAの阻害物質と共に治療活性物質の亜致死濃度を含むmiRNA阻害物質含有培養物中で一定期間、癌細胞株の細胞を培養する段階；同じ期間、治療活性物質の亜致死濃度を含むが候補増感剤miRNAの阻害物質を添加しない、miRNA阻害物質欠如培養物中で、癌細胞株の細胞を培養する段階；および一定期間の後、miRNA阻害物質含有細胞集団とmiRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率を決定する段階であって、miRNA阻害物質含有細胞集団（治療活性物質と候補増感剤miRNA阻害物質と共に培養）の生存率がmiRNA阻害物質欠如細胞集団（治療活性物質を含むが候補増感剤miRNAの阻害物質が添加されていない培養）の生存率より高ければ、または有意に高ければ、候補増感剤miRNAが有望な増感剤miRNAとして同定される段階を含む。

【0015】

このスクリーニング方法のある局面において、有望な増感剤miRNAは、hsa-miR-204、hsa-miR-185、hsa-miR-211、hsa-miR-367-5p (hsa-miR-367*とも呼ばれる)、またはhsa-miR-133A、またはこれらのmiRNAのいずれか1つの相同体である。ある局面において、治療活性物質の亜致死濃度は、癌細胞株細胞の80%が72時間の培養後になおも生存可能である濃度である。あるさらなる局面において、治療活性物質は、例えば亜致死濃度2~8 nMの、タキソールおよび／または他の化学療法剤である。ある追加の局面において、癌細胞株の細胞はTNBC細胞である。

【0016】

さらに、阻害されると、治療活性物質の亜致死濃度で培養した癌細胞株の細胞の生存率を低下させる有望な減感剤miRNAに関してスクリーニングするための方法が開示され、該方法は、候補減感剤miRNAの阻害物質と共に治療活性物質の亜致死濃度を含むmiRNA阻害物質含有培養物中で一定期間、癌細胞株の細胞を培養する段階；同じ期間、治療活性物質の亜致死濃度を含むが候補減感剤miRNAの阻害物質が添加されていないmiRNA阻害物質欠如培養物中で、癌細胞株の細胞を培養する段階；および一定期間の後、miRNA阻害物質含有細胞集団と、miRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率を決定する段階であって、miRNA阻害物質含有細胞集団（治療活性物質と候補減感剤miRNA阻害物質と共に培養）の生存率がmiRNA阻害物質欠如細胞集団（治療活性物質を含むが候補減感剤miRNAの阻害物質が添加されていない培養）の生存率より有意に低ければ、候補減感剤miRNAが有望な減感剤miRNAとして同定される、段階を含む。

【0017】

このスクリーニング方法のある局面において、有望な減感剤miRNAは、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-216a、hsa-miR-1237、hsa-miR-1915*、hsa-miR-320d、またはこれらのmiRNAのいずれか1つの相同体である。ある局面において、治療活性物質の亜致死濃度は、72時間培養後に癌細胞株の細胞の80%がなおも生存可能である濃度である。あるさらなる局面において、治療活性物質は、例えば亜致死濃度2~8 nMの、タキソールおよび／または他の化学療法剤である。ある追加の局面において、癌細胞株の細胞はTNBC細胞である。

【0018】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、増感剤miRNAの発現が低下しているまたは有意に低下している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に、増感剤miRNAまたは増感剤miRNAの相同体を含む組成物の有効量を投与する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための方法が開示される。いくつかの態様において、減感剤miRNAの発現が有意に増加している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に、減感剤miRNAの阻害物質または減感剤miRNA相同体の阻害物質を含む組成物の有効量を投与する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための方法が開示される。

【 0 0 1 9 】

いくつかの態様において、対象の細胞における増感剤miRNAまたは増感剤miRNA相同体のレベルを決定する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための治療から効果が得られる可能性がある対象を同定する方法が開示される。ある局面において、この方法の増感剤miRNAは、hsa-miR-204、hsa-miR-185、hsa-miR-211、hsa-miR-367-5p (hsa-miR-367* とも呼ばれる)、hsa-miR-133A、またはこれらの増感剤miRNAの1つの相同体である。

【 0 0 2 0 】

いくつかの態様において、対象の細胞における減感剤miRNAまたは減感剤RNA相同体のレベルを決定する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための治療から効果が得られる可能性がある対象を同定する方法が開示される。ある局面において、この方法の減感剤miRNAは、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-216a、hsa-miR-1237、hsa-miR-1915*、hsa-miR-320d、またはこれらの減感剤miRNAの1つの相同体である。

【 0 0 2 1 】

増感剤miRNAであるhsa-miR-204、hsa-miR-185、hsa-miR-211、hsa-miR-367-5p (hsa-miR-367* とも呼ばれる)、およびhsa-miR-133A (すなわち、hsa-miR-133A-2)、ならびに減感剤miRNAであるhsa-miR-129-3p (すなわち、hsa-miR-129-1の-3p領域)、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-216a、hsa-miR-1237、hsa-miR-1915*、およびhsa-miR-320dのステムループ配列の配列および配列番号を表1に示す。

【 0 0 2 2 】

miRNAに関連して用いられる「相同体」という用語は、例えば基準miRNAと同様に遺伝子発現を標的とすることができる、基準miRNAと同様に機能するオリゴヌクレオチドを意味する。相同体は典型的に、本開示を考慮して当業者によって基準配列の相同体であると同定される、基準miRNAと類似したレベルの特性 (例えば、配列および構造) を有する (例えば、miRNAMinerなどのmiRNA相同体同定ツールをデフォルト / ストリンジエントパラメータで用いて ; 例えばgroups.csail.mit.edu/pag/mirnaminer/でオンライン入手可能なmiRNAMinerツールを参照されたい ; 同様にArtzi, et al., 2008も参照されたい)。

【 0 0 2 3 】

それ以外であることを明記している場合 (例えば、配列相同性またはアライメントに関して) を除き、化合物に関して本明細書において表記されるパーセント値は、重量パーセントであり、組成物全体に関する割合である。

【 0 0 2 4 】

「有意に」という用語 (例えば「低下した」または「増加した」、「低い」または「高い」、「抑制された」または「過剰発現された」、「超えない」または「超える」、または類似のタイプの修飾語に関連して用いる場合) は、少なくとも修飾語が適用される特徴を評価するために用いられるアッセイの標準誤差の大きさより大きい基準試料または試験試料中のレベルを意味する。いくつかの例において、基準または試験試料の統計学的有意性は、0.25、0.15、0.10、0.05、0.025、0.01、0.005、0.001、0.0005、または0.0001未満のP値に関連しうる。

【 0 0 2 5 】

薬学的に許容される担体としては、ウイルス、リポソーム、ナノ粒子、またはポリマー、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられうるが、これらに限定されるわけではない。関連する送達媒体としては、リポソーム、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む生物適合性のポリマー、リポタンパク質、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、人工のウイル

10

20

30

40

50

スエンベロープ、無機（金属を含む）粒子、ならびに細菌、またはバキュロウイルス、アデノウイルス、およびレトロウイルスなどのウイルス、バクテリオファージ、コスミド、またはプラスミドベクターが挙げられうるがこれらに限定されるわけではない。

【0026】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって理解されるように、近いという意味で定義され、1つの非制限的な態様において、この用語は、10%以内、好ましくは5%以内、より好ましくは1%以内、および最も好ましくは0.5%以内であると定義される。

【0027】

「阻害する」、「低下させる」、「処置する」という用語、またはこれらの用語の任意の変化形は、所望の結果を達成するための任意の測定可能な低下または完全な阻害を含む。同様に、「有効な」という用語は、所望の、予想される、または意図される結果を達成するために適切であることを意味する。

10

【0028】

用語「含む」に関連して用いる場合の「1つの」または「1つの（an）」という用語の使用は、「1つ」を意味しうるが、同様に「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つより多く」という意味とも一致する。

【0029】

用語「含む（comprising）」（ならびに「含む（comprise）」および「含む（comprises）」などの含むの任意の変化形）、「有する（having）」（ならびに「有する（have）」および「有する（has）」などの有するの任意の変化形）、「含む（including）」（ならびに「含む（includes）」および「含む（include）」などの含むの任意の変化形）、または「含有する（containing）」（ならびに「含有する（contains）」および「含有する（contain）」などの含有するの任意の変化形）は、包括的であるかまたは制限がなく、全組成物に関連して列挙されていない追加の要素または方法の段階を除外しない。

20

【0030】

組成物およびそれらを使用するための方法は、明細書を通して開示される成分または段階のいずれか「を含む」、「から本質的になる」、または「からなる」ことができる。

【0031】

本明細書において考察された任意の態様は、本発明の任意の方法または組成物に関して実行することができ、およびその逆もまた同様であると企図される。さらに、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するために用いることができる。

30

【0032】

[本発明1001]

hsa-miR-204またはその相同体の発現が低下している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の有効量を投与する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための方法。

[本発明1002]

癌細胞が、脳由来神経栄養因子（BDNF）またはエズリンを過剰発現する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

癌細胞が、乳癌細胞、卵巣癌細胞、または小児腎腫瘍細胞である、本発明1001～1002のいずれかの方法。

40

[本発明1004]

乳癌細胞がトリプルネガティブ乳癌（TNBC）細胞である、本発明1003の方法。

[本発明1005]

癌細胞の増殖が転移性である、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

癌細胞におけるhsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階をさらに含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

50

hsa-miR-204またはその相同体のレベルが、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）またはアレイハイブリダイゼーションを用いて決定される、本発明1006の方法。

[本発明1008]

対象から得た血液試料中のhsa-miR-204またはその相同体のレベルが決定される、本発明1006または1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

血液試料中のhsa-miR-204またはその相同体のレベルが、対照と比較して低下している、本発明1008の方法。

[本発明1010]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物が全身投与のために製剤化される、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物が、静脈内注射により投与される、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物が、脂質ベースの送達媒体またはナノ粒子ベースの送達媒体をさらに含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

対象が、第二の活性物質を含む組成物をさらに投与される、本発明1001～1012のいずれかの方法。

20

[本発明1014]

第二の活性物質が、細胞傷害性化学療法剤、ナノバイオコンジュゲート、またはhsa-miR-204もしくはその相同体以外のmiRNAを含む、本発明1013の方法。

[本発明1015]

細胞傷害性化学療法剤がタキサンである、本発明1014の方法。

[本発明1016]

タキサンがパクリタキセルである、本発明1015の方法。

[本発明1017]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物が、第二の活性物質を含む組成物と同時に投与される、本発明1013～1016のいずれかの方法。

30

[本発明1018]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物が、第二の活性物質を含む組成物が投与される前または後に投与される、本発明1013～1016のいずれかの方法。

[本発明1019]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物と第二の活性物質を含む組成物との投与の時間間隔が1から30日である、本発明1018の方法。

[本発明1020]

第二の活性物質を含む組成物が、hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物の前に投与される、本発明1018または1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

癌細胞が第二の活性物質に対して耐性となっている、本発明1013～1020のいずれかの方法。

40

[本発明1022]

第二の活性物質がパクリタキセルである、本発明1021の方法。

[本発明1023]

hsa-miR-204またはその相同体を含む組成物が薬学的に許容される担体を含む、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1024]

調製物が、無菌性、発熱物質、および微粒子、または他の混入物に関する薬局方の要件を満たしている、本発明1023の方法。

50

[本発明1025]

調製物が全身投与のために製剤化されている、本発明1023または1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

対象が哺乳動物である、本発明1001～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

対象がヒトである、本発明1001～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

対象の細胞におけるhsa-miR-204またはその相同体のレベルを決定する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための治療から効果が得られる可能性がある対象を同定するための方法。

10

[本発明1029]

対象の細胞におけるhsa-miR-204またはその相同体のレベルが、qRT-PCRまたはアレイハイブリダイゼーションを用いて決定される、本発明1028の方法。

[本発明1030]

対象から得た血液試料中のhsa-miR-204またはその相同体のレベルが決定される、本発明1029の方法。

[本発明1031]

血液試料中のhsa-miR-204またはその相同体のレベルが、対照と比較して低下している、本発明1030の方法。

20

[本発明1032]

阻害されると、治療活性物質の亜致死濃度で培養した癌細胞株の細胞の生存率を増加させる有望な増感剤miRNAをスクリーニングするための方法であって、

候補増感剤miRNAの阻害物質と共に治療活性物質の亜致死濃度を含むmiRNA阻害物質含有培養物中で癌細胞株の細胞を培養する段階；

治療活性物質の亜致死濃度を含むが候補増感剤miRNAの阻害物質が添加されていないmiRNA阻害物質欠如培養物中で癌細胞株の細胞を培養する段階；ならびに

一定期間後に、miRNA阻害物質含有細胞集団と、miRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率を決定する段階であって、miRNA阻害物質含有細胞集団の生存率が、miRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率より有意に高ければ、候補増感剤miRNAが有望な増感剤miRNAとして同定される、段階

30

を含む、方法。

[本発明1033]

有望な増感剤miRNAが、hsa-miR-204、hsa-miR-185、hsa-miR-211、hsa-miR-367-5p、またはhsa-miR-133A、またはそれらの相同体である、本発明1032の方法。

[本発明1034]

有望な増感剤mRNAがhsa-miR-204またはその相同体である、本発明1033の方法。

[本発明1035]

治療活性物質の亜致死濃度が、癌細胞株の細胞の80%が72時間培養後になおも生存可能である濃度である、本発明1032～1034のいずれかの方法。

40

[本発明1036]

治療活性物質がパクリタキセルである、本発明1032～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

パクリタキセルの亜致死濃度が2～8 nMである、本発明1035の方法。

[本発明1038]

癌細胞株の細胞がTNBC細胞である、本発明1032～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

阻害されると、治療活性物質の亜致死濃度で培養した癌細胞株の細胞の生存率を低下させる有望な減感剤miRNAをスクリーニングするための方法であって、

候補減感剤miRNAの阻害物質と共に治療活性物質の亜致死濃度を含むmiRNA阻害物質含有

50

培養物中で癌細胞株の細胞を培養する段階；

治療活性物質の亜致死濃度を含むが候補減感剤miRNAの阻害物質が添加されていないmiRNA阻害物質欠如培養物中で癌細胞株の細胞を培養する段階；および

一定期間後にmiRNA阻害物質含有細胞集団とmiRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率を決定する段階であって、miRNA阻害物質含有細胞集団の生存率が、miRNA阻害物質欠如細胞集団の生存率より有意に低ければ、候補減感剤miRNAが有望な減感剤miRNAとして同定される、段階

を含む、方法。

[本発明1040]

有望な減感剤miRNAが、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-216a、hsa-miR-123 7、hsa-miR-1915*、hsa-miR-320d、またはそれらの相同体である、本発明1039の方法。

10

[本発明1041]

治療活性物質の亜致死濃度が、癌細胞株の細胞の80%が72時間培養後になおも生存可能である濃度である、本発明1039または1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

治療活性物質がパクリタキセルである、本発明1039～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

パクリタキセルの亜致死濃度が2～8 nMである、本発明1042の方法。

[本発明1044]

癌細胞株の細胞がTNBC細胞である、本発明1039～1043のいずれかの方法。

20

[本発明1045]

増感剤miRNAの発現が有意に低下している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に、増感剤miRNAまたはその相同体を含む組成物の有効量を投与する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための方法。

[本発明1046]

減感剤miRNAの発現が有意に増加している癌細胞を有するまたは有することが疑われる対象に、減感剤miRNAまたはその相同体の阻害物質を含む組成物の有効量を投与する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための方法。

[本発明1047]

対象の細胞における増感剤miRNAまたはその相同体のレベルを決定する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための治療から効果が得られる可能性がある対象を同定するための方法。

30

[本発明1048]

増感剤miRNAが、hsa-miR-204、hsa-miR-185、hsa-miR-211、hsa-miR-367-5p、またはhsa-miR-133A、またはそれらの相同体である、本発明1047の方法。

[本発明1049]

対象の細胞における減感剤miRNAまたはその相同体のレベルを決定する段階を含む、癌細胞の増殖を低下させるための治療から効果が得られる可能性がある対象を同定するための方法。

[本発明1050]

40

有望な減感剤miRNAが、hsa-miR-129-3p、hsa-miR-296-5p、hsa-miR-216a、hsa-miR-123 7、hsa-miR-1915*、hsa-miR-320d、またはそれらの相同体である、本発明1049の方法。

本発明の他の目的、特色、および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、この詳細な説明から当業者には、本発明の精神および範囲に含まれる様々な変更および改変が明らかとなることから、詳細な説明および具体例は、本発明の具体的な態様を示しているが、単なる例証のために提供されると理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1A～1G。癌におけるmiR-204のゲノム喪失。図1A。miR-204欠失を有する（左）または有しない（右）選択された小児腎腫瘍に関する高解像度miRNA-CGH（比較ゲノムハ

50

イブリダイゼーション）。miRNAを含むゲノム座の欠失を、垂直方向の破線で示す。点は、CGHアレイにおいて三つ組で表されるコピー数の変化を反映する各プローブの位置および値を示す。傾向線は、各腫瘍に関して三種類のプローブの平均値を表す。図1B。欠失を有するまたは有しない癌のサブセットを表す卵巣癌の高解像度CGHのメタ分析から得られたグラフ（n = 354；TCGAから得た）。hsa-miR-204を含むゲノム座の欠失は、垂直方向の破線で示される。図1CおよびD。小児腎腫瘍（C）および卵巣癌（D）におけるhsa-miR-204ゲノム座の対立遺伝子PCR。Y軸は、log₂変換した相対的定量値を示す。破線は、コピー喪失の閾値を示す。図1E～G。対応する正常対照腎（n = 38）、正常卵巣組織（n = 5）、および対応する正常乳房組織（n = 10）と比較した、小児腎腫瘍（n = 38、E）、進行期卵巣癌（n = 11、F）、および乳癌（n = 10、G）におけるmiR-204レベルを示すqRT-PCR分析のグラフ表示。

【図2】図2A～D。hsa-miR-204は、腫瘍の増殖および転移を阻害する。図2A。hsa-miR-204は足場非依存性増殖を阻害する。グラフは、スクランブルまたはmiR-204のいずれかを安定に過剰発現し、さらにmiR-204阻害物質をトランスフェクトしたHEK-293細胞によって軟寒天ウェルに形成されたコロニー数を示す。（*）P < 0.05；（**）P < 0.01。結果は3回の独立した実験の平均値である。図2B。hsa-miR-204の過剰発現は、腫瘍の増殖を阻害する。スクランブル対照またはhsa-miR-204のいずれかを安定に過剰発現するHEK-293細胞。棒グラフの表示は、hsa-miR-204（n = 9）およびスクランブル対照（n = 9）トランスフェクタントの平均腫瘍体積に対応する。（*）P < 0.001。図2C。スクランブル（対照）またはhsa-miR-204（miR-204）のいずれかを過剰発現する腫瘍異種移植片からの切片の組織学分析。右のパネルの画像は、左のパネルに示される枠で囲った領域の拡大図を表す。対照トランスフェクタントにおける腫瘍の浸潤は、腎組織への腫瘍の浸潤によって表される。図2D。75 nMスクランブル配列（対照）もしくはhsa-miR-204模倣体（miR-204）をトランスフェクトしたMDA-MB-231細胞、またはhsa-miR-204阻害物質をさらにトランスフェクトしたhsa-miR-204模倣体トランスフェクト細胞（miR-204 + 阻害物質）の基底膜マトリクス浸潤アッセイ。棒グラフ表示は、フィルター毎に異なる5カ所の視野で顕微鏡下で計数した浸潤細胞数の平均値に対応する。（***）P < 0.001。

【図3】図3A～B。miR-204の全身送達は、腫瘍の転移を抑制する。図3A。陰性対照群における転移病巣を有する代表的な肺の切片。図3B。hsa-miR-204注射マウスにおいて肝毒性は認められない。hsa-miR-204注射マウスの肝臓の切片は肝毒性の徴候を示さない。

【図4】図4A～H。hsa-miR-204は、癌におけるBDNFの発現を調節する。図4A～C。高いBDNF発現は、多数の癌において低いhsa-miR-204発現と強く相関する。対応する正常対照腎（n = 38）、正常卵巣組織（n = 5）、および対応する正常乳房組織（n = 10）と比較した、小児腎腫瘍（n = 38、A）、進行期卵巣癌（n = 11、B）、および乳癌（n = 10、C）におけるhsa-miR-204とBDNF発現の逆相関を明らかにするqRT-PCR分析のグラフ表示。図4D。BDNF 3'-UTRにおける推定のmiR-204結合配列の概略図。図4E。BDNF特異的プライマーを用いた、hsa-miR-204過剰発現細胞およびhsa-miR-204阻害物質トランスフェクト細胞のqRT-PCR分析。図4F。抗BDNF抗体（1 : 1000）を用いたmiR-204模倣体トランスフェクトHEK-293細胞のウェスタンプロット分析。-アクチンをローディング対照として用いた。ゲルの写真は、3つの独立した実験の代表である。図4G。Total Labs TL100 1Dゲル分析ソフトウェアを用いて定量したバンド強度のグラフ表示（n = 3）。対照のBDNFタンパク質レベルを100に設定した。

【図5】5A～C。hsa-miR-204は、AKT/mTOR/Rac1シグナル伝達を変化させることによって、腫瘍細胞の遊走および浸潤を阻害する。図5A。hsa-miR-204は、AKTおよびmTORシグナル伝達の活性化を抑制する。hsa-miR-204をトランスフェクトしたHEK-293細胞を、無血清条件で増殖させて、抗ホスホ-Ser⁴⁷³-AKT（1 : 1000）、抗総AKT（1 : 1000）、抗ホスホ-Ser^{235/236}-S6（1 : 1000）、抗総S6（1 : 1000）、抗ホスホ-Thr^{37/46}-4E-BP1（1 : 1000）、および抗総4E-BP1（1 : 1000）を用いてウェスタンプロット分析に供した。-アクチン（1 : 10,000）をローディング対照として用いた。ゲルの写真は独立した3回の実験の代表である。図5B。FITC-アネキシンVアポトーシス検出キットを用いてアネキシンV/PI染色によ

って決定したところ、hsa-miR-204は、アポトーシスに対するHEK-293細胞の感受性を増加させる。示される細胞集団のパーセンテージは、独立した3回の実験の平均値±SEMである。図5C。抗カスパー-3(1:500)抗体および抗PARP(1:1000)を用いたhsa-miR-204トランスクレクトHEK-293細胞のウェスタンプロット分析により、カスパー-3およびPARPの切断の増加が明らかとなる。-アクチン(1:10,000)をローディング対照として用いた。ゲルの写真は、独立した3回の実験の代表である。

【図6】974種の阻害物質のアッセイに成功したスクリーニング。パクリタキセル(Pac)によるMDA-468細胞のスクリーニングにより、生存率の比(v.r.)が<0.85であるmiRNA増感剤47種を得た。これらの中で、miRNA 10種がp<0.05レベルで有意であった。記載された基準をスクリーニングに適用することにより、増感剤および減感剤miRNAの選択を行った。これらのmiRNAの1つ、増感剤hsa-miR-204(miR-204)は、過剰発現されると、パクリタキセルの存在下でのMDA-468細胞の生存率を対照と比較して有意に低下させた。

【図7】hsa-miR-204(miR-2x4)とその標的遺伝子BDNFおよびエズリンの発現の逆相関。

【図8】BDNF発現およびエズリン発現は、hsa-miR-204(miR-2x4)の真の標的である。

【図9】図9A～B。腫瘍におけるmiRNAを含む染色体領域のコピー数の喪失。図9A。様々なヒトmiRNAおよび卵巣癌、乳癌、および小児腎腫瘍の試料の結果。図9B。欠失を有するまたは有しない癌のサブセットを表す乳癌の高解像度CGHのメタ分析から得られたグラフ。hsa-miR-204を含むゲノム座の欠失を、垂直方向の破線で示す。

【図10】図10A～B。hsa-miR-204は腫瘍発生に関連する遺伝子を標的とする。図10A。BDNFを含む40個より多くの遺伝子のlog2変化倍率。図10B。生物機能毎のダウンレギュレートされた遺伝子。様々なカテゴリの生物機能のダウンレギュレートされた遺伝子の中でBDNFが多いことに注目されたい。

【図11】BDNFは、hsa-miR-204関連または誘導表現型を回復する。図11A。BDNFは、hsa-miR-204によって誘導される細胞「非」遊走表現型を回復する。図11B。BDNFは、hsa-miR-204誘導細胞「非」浸潤表現型を回復する。

【図12】hsa-miR-204(miR-204)は、TRPM3レベルに影響を及ぼさない。

【図13】miR-296-5p阻害は、トリプルネガティブ乳癌におけるパクリタキセルに対して応答性にする。

【図14】miR-296-5pは、トリプルネガティブ乳癌の遊走および浸潤を阻害する。

【図15】TNBCの処置におけるこれらのmiRNAの効能をさらに確証するために、本発明者らは、デンタルスponジ上で腫瘍組織片(1 mm³)を培養した。腫瘍移植片は、上の2つのパネルに示されるように腫瘍の構造を維持した。

【図16】リポソーム製剤を用いて増感剤miRNAを単独で添加することにより腫瘍細胞が死滅した。

【発明を実施するための形態】

【0034】

例示的な態様の説明

本発明者らは、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)細胞における薬物感受性/耐性の媒介にmiRNAが重大な役割を果たすことを証明した。ハイスループットmiRNA/miRNA阻害物質ライブラリスクリーニングを通して、本発明者らは、TNBC状態の第一選択処置として一般的に用いられる薬剤であるパクリタキセルに対する薬物耐性TNBC細胞の感受性を独自に増加させるmiRNAを同定した。これらのスクリーニングによって、耐性TNBC細胞のパクリタキセルに対する感受性を増加させるmiRNAが、健康な兄弟からの血清と比較して、再発した転移性TNBC患者の血清中に有意に低レベルで存在しうることも判明している。

【0035】

加えて、候補増感剤miRNAは、いくつかの癌において発現が劇的に低下しており、強力な腫瘍抑制因子として作用することが示されている。リポソームに基づくアプローチを用いて、本発明者らは、候補増感剤miRNAの全身送達が、肝毒性を生じることなく乳癌の肺転移を抑制することを前臨床マウス腫瘍モデルにおいて示している。

【0036】

10

20

30

40

50

本発明者らは、候補増感剤miRNAが、腫瘍発生に関係する遺伝子を標的とすることによりその機能を発揮することを証明している。これらの遺伝子には、腫瘍の血管新生および浸潤を促進することが知られているニューロトロフィンファミリーメンバーである脳由来神経栄養因子 (BDNF) をコードする遺伝子が挙げられる。原発腫瘍の分析により、候補増感剤miRNAの発現の顕著な低下が、BDNFまたはその受容体であるトロポミオシン関連キナーゼB (TrkB) の発現の増加を伴うことが判明した。これらの分析はまた、候補増感剤miRNAの喪失によって、BDNFの過剰発現が起こるのみならず、低分子GTPアーゼRacのその後の活性化ならびにAKT/mTORシグナル伝達経路を通してのアクチン再構築の両方が起こり、その結果癌細胞の遊走および浸潤が起こることも明らかにした。

【0037】

10

本発明者らの重要な具体的な証明のいくつかを、以下に挙げる：候補増感剤miRNAによる、薬物耐性癌細胞のパクリタキセルに対するmiRNAを介した感受性増加；候補増感剤miRNAの全身送達後のTNBC肺転移の抑制；およびTNBC患者血清中で候補増感剤miRNAが低レベルであること（診断目的にとっておそらく有意）。薬物感受性を付与するmiRNAが特定されることは、新世代の治療物質を提供するために役立つうるのみならず、TNBC細胞のmiRNA発現プロファイルの分析を通して、特定の薬物に対するTNBC処置の応答をモニターするための新規予後判定ツールを提供するために役立つうる。加えて、パクリタキセルは、多くのタイプの癌を処置するために用いられていることから、本発明は、単に乳癌の処置のみならず、他の多くのタイプの癌の処置にとっても有益な意味を有する。

【0038】

20

本発明者らは、腫瘍抑制因子hsa-miRNA-204のゲノム喪失が、AKT/mTOR/Rac1シグナル伝達およびアクチン再構築を活性化することによって、癌細胞の遊走および浸潤を促進することを証明した。

【0039】

マイクロRNAを含む染色体領域は、癌において機能的に重要である。本発明者らは、hsa-miR-204をコードするゲノム座がしばしば、卵巣癌、小児腎腫瘍、および乳癌を含む多数の癌において失われていることを証明した。特に、hsa-miR-204は、いくつかの癌において発現が劇的に低下していることが示されており、強力な腫瘍抑制因子として作用し、全身送達された場合にインビボで腫瘍の転移を阻害する。

【0040】

30

本発明者らは、hsa-miR-204が、腫瘍の血管新生および浸潤を促進することが知られているニューロトロフィンファミリーメンバーである脳由来神経栄養因子 (BDNF) を含む腫瘍発生に関係する遺伝子を標的とすることによってその機能を発揮することを証明している。原発腫瘍の分析により、BDNFまたはその受容体であるトロポミオシン関連キナーゼB (TrkB) の発現の増加が、hsa-miR-204の発現の顕著な低下と平行して起こることが判明している。hsa-miR-204の喪失によって、BDNFの過剰発現が起こり、次いで低分子GTPアーゼRacの活性化が起こると共に、AKT/mTORシグナル伝達経路を通してアクチンの再構築が起こり、癌細胞の遊走および浸潤に至る。

【0041】

hsa-miR-204を含むゲノム座の微小欠失は、腫瘍の増殖および転移に不可欠な刺激を与える重要な腫瘍発生経路の脱制御に直接関連する。したがって、本発明者らは、腫瘍の転移を抑制するためにhsa-miR-204レベルを治療的に操作した。

40

【0042】

本明細書において同定されたhsa-miR-204および他のmiRNAの配列を表1に提供する。

【0043】

（表1）選択したmiRNAのmiRBaseアクセション番号、SEQ ID NO、および配列：

各miRNAの二行目および四行目のサブ配列は、当てはまる場合は、それぞれ-5pおよび-3pのサブ配列である。

miRNA	miRBase MI000---- アクセッショ ン番号	SEQ ID NO:	配列
hsa-miR- 204	0284	1	GGCUACAGUCUUUCUCAUGUGACUCGUGGAC
		2	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
		3	GAGAAUUAUAUGAAGGAG
		4	GCUGGGAAGGCAGAAGGGACGU
		5	UCAAUUGUCAUCACUGGC
hsa-miR- 185	0482	6	AGGGGGCGAGGGAU
		7	UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA
		8	UGGUCCCCUCCCC
		9	AGGGCUGGCUUUCCUCUGGUC
		10	CUUCCCUCCCA
hsa-miR- 211	0287	11	UCACCUGGCCAUGUGACUUGUGGGC
		12	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCU
		13	AGGGCUCUGAGCAGG
		14	GCAGGGACAGCAAAGGGUGC
		15	UCAGUUGUCACUUUCCACAGCACGGAG
hsa-miR- 367	0775	16	CCAUU
		17	ACUGUUGCUAAUAUGCAACUCU
		18	GUUGAAUUAUAUUGG
		19	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA
		20	UGG

10

20

30

miRNA	miRBase MI000---- アクセッショ ン番号	SEQ ID NO:	配列
hsa-miR-133A-2	0451	21	GGGAGCCAAAUGCUCUUGCUAG
		22	AGCUGGUAAAUGGAACCAAAU
		23	CGACUGUCCAAUGGA
		24	UUUGGUCCCCUUCUCAACCAGCUG
		25	UAGCUGUGCAUUGAUGGCGCCG
hsa-miR-129-1	0252	26	GGAU
		27	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
		28	UGUUCCUCUCAACAGUAGUCAGG
		29	AAGCCCUUACCCAAAAAGUAU
		30	CU
hsa-miR-296	0747	31	AGGACCCUUCCAG
		32	AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU
		33	UGUGCCUAAUUCA
		34	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC
		35	UGAAGGGCUCU
hsa-miR-216a	0292	36	GAUGGCUGUGAGUUGGCU
		37	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA
		38	GAUGUUC
		39	UCACAGUGGUCUCUGGGAUUAU
		--	--
hsa-miR-1237	6327	40	GUGGGAGGGCCCAGGCGCGGGCAGGGGUGGG
		41	GGUGGCAGAGCGCUGUCC
		42	CGGGGGCGGGGCCGAAGCGCG
		43	GCGACCGUAAC
		--	UCCUUCUGCUCCGUCCCCCAG
hsa-miR-1915*	8336	44	UGAGAGGCCGC
		45	ACCUUGCCUUGCUGCCCCGGGCC
		46	GUGCACCCGUGGG
		47	CCCCAGGGCGACGCCGGCGGG
		48	GGCGGCCCUAGCGA

miRNA	miRBase MI000---- アクセッショ ン番号	SEQ ID NO:	配列
hsa-miR- 320d-1	8190	49	UUCUCGUCCCAGUUCUUCCAAAGUUGAG
		50	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA
		--	--
		--	--
		--	--

10

【0044】

A. マイクロRNAおよび癌

癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子を有する染色体領域が特定されたことにより、腫瘍の病因がよりよく理解され、より良好な治療転帰が得られている (Bayani, et al., 2007)。いくつかの癌関連遺伝子が、染色体異常を有する領域において同定されているが (Albertson, et al., 2003)、癌の増殖および進行において重要な要因を有する無秩序なまたは再発性の染色体異常を有する追加の領域を同定する必要がある。最近の研究から、マイクロRNA (miRNA) が1つのそのような要因群であることが示されている (Varambally, et al., 2008)。miRNAは、標的mRNAの3' 非翻訳 (UTR) 領域に結合することによって、転写後遺伝子発現を調節する低分子の内因性非コードRNAである。miRNAは、発達および分化を含む多数の生物プロセスにおいて重要な機能を有することが知られている (Bartel, et al., 2004)。miRNAの発現の脱制御は、癌を含むいくつかのヒト疾患に関係している (Bartels, et al., 2009)。miRNAが癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子として作用しうることは、証拠により示唆されている (Esquela-Kerscher, et al., 2006)。

20

【0045】

hsa-miR-204は、多数の癌においてしばしば失われていると同定されている。本発明者らによる研究の結果から、hsa-miR-204が、脳由来神経栄養因子 (BDNF) を含む、腫瘍発生に関連する遺伝子の機能を抑制することによって、強力な腫瘍抑制因子として作用することが証明されている。BDNFは、チロシンキナーゼ受容体であるトロポミオシン関連キナーゼB (TrkB) に結合してその後活性化することによって、神経系の発達において重大な役割を果たす、生理的に重要な神経成長因子である (Lewin, 1996; Segal, et al., 1996)。加えて、BDNF/TrkB経路は、それが増殖、分化、血管新生、および腫瘍の浸潤を促進することから、腫瘍発生において重大な役割を有すると報告されている (Au et al., 2009)。BDNF/TrkBの過剰発現はまた、神経芽腫、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、および肺癌を含むいくつかの固形腫瘍の予後不良に関係している (Brodeur, 2003; Edsjo, et al., 2003 ; Nakagawara, et al., 1994)。hsa-miR-204の喪失によって、BDNF/TrkB過剰発現が起こり、同時にAKT/mTOR/Rac1シグナル伝達経路が活性化されて、アクチン再構築が起こり、それによって癌細胞の遊走および浸潤が起こる。これらの結果は、特異的miRNAを含む染色体領域が、腫瘍発生において特定の機能的重要性を有しうることを強調する。

30

【0046】

B. 癌におけるhsa-miR-204の体細胞喪失

ヒトの癌における異常な染色体領域に関連するmiRNAを同定するために、高解像度カスタムmiRNA比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) を、卵巣癌、乳癌、および小児腎腫瘍に関する高密度CGHパブリックデータセットと共に用いた。この分析により、これらの腫瘍の最小の染色体欠失および増幅領域におけるいくつかのmiRNAが明らかとなつた。miRNAに関連する染色体座の腫瘍発生における機能的重要性の理解から始めるために、ゲノム喪失を示すmiRNAを調べた (図1および、例えは図9A)。hsa-miR-204を含む9q21.12染色体領域は、卵巣癌の44.63% (158/354)、乳癌の28% (10/35)、および小児腎

40

50

腫瘍の40% (15/38)においてしばしば失われており (小児腎腫瘍および卵巣癌に関しては、それぞれ、図1Aおよび1Bも参照されたく、乳癌に関しては図9Bを参照されたい)、このことを、定量的ゲノムリアルタイムPCR分析によってさらに確認する (図1Cおよび1D)。さらに、成熟miR-204のレベルの低下もまた、3つ全ての腫瘍タイプにおいてそのゲノムDNA含有量と強く相関した (図1E、1F、および1G)。

【0047】

C. hsa-miR-204は腫瘍の増殖および転移の強力な抑制因子として作用する

多数の癌組織においてhsa-miR-204の発現が劇的に低下していることは、腫瘍発生におけるhsa-miR-204の役割に取り組むきっかけとなった。最初に、足場非依存性増殖に及ぼすhsa-miR-204の効果に取り組んだ。52回を超えて継代したHEK-293細胞は、高度に腫瘍発生性であると報告されており (Shen, et al., 2008)、hsa-miR-204を過剰発現する胎児腎HEK-293細胞は、コロニー形成能の低下を示した。しかし、コロニー形成能は、hsa-miR-204の阻害物質を過剰発現させることによって回復した (図2A)。類似の結果はまた、乳癌MDA-MB-231細胞および卵巣癌SKOV3細胞におけるhsa-miR-204の過剰発現に関しても得られた (データは示していない)。さらに、hsa-miR-204の可能性ある腫瘍抑制因子様活性を確認するために、hsa-miR-204またはスクランブル配列のいずれかを安定に過剰発現する高継代HEK-293細胞を、ヌードマウスの腎被膜に注射して、腫瘍の増殖および転移を注射後24日目に評価した。対照腫瘍とは際立って対照的に、hsa-miR-204過剰発現腫瘍の大きさは劇的に低下した。次に、hsa-miR-204が腫瘍細胞の浸潤も阻害するか否かを調べた。異種移植片腫瘍切片の組織学分析により、対照と比較してmiR-204を過剰発現する腫瘍の腎組織への浸潤の劇的な低下が示されたかまたは浸潤は示されなかった (図2C)。これと一貫して、hsa-miR-204過剰発現は乳癌 (MDA-MB-231) および卵巣癌 (SKOV3) 細胞の遊走および浸潤能をインビトロで劇的に低下させた (図2D、データは示していない)。

【0048】

D. hsa-miR-204の治療的ターゲティング

hsa-miR-204の転移抑制活性をさらに実証するために、乳癌の肺転移モデルにおいて治療実験を行った。最初に、ルシフェラーゼ-GFPを発現するMDA-MB-231乳癌細胞を尾静脈に注射することによって、肺転移を確立した。次に、hsa-miR-204またはhsa-miR-204変異体オリゴ (陰性対照) を、LANCErII脂質ベースのインビトロ送達媒体を用いて、これらのヌードマウスの尾静脈に30日間にわたって5日毎に注射した。興味深いことに、hsa-miR-204の全身送達によって、肺転移の有意な減少または消失が起こったが、これに対し、hsa-miR-204変異体オリゴを注射したマウスは重度の肺転移を含む転移を有した (図3A)。特に、hsa-miR-204を注射したマウスは、肝毒性または体重の変化がなかったことから明白であるように、少なくとも明白な副作用を示さなかった (図3B、データは示していない)。これらの結果は、hsa-miR-204およびその相同体が、腫瘍の増殖および転移を処置するための安全かつ実行可能な治療計画の基礎となりうることを示している。

【0049】

類似の実験において、マウスにトリプルネガティブ乳癌細胞を移植して、2群のマウスにmiR-204オリゴまたはシード配列を変異させたオリゴのいずれかを尾静脈に注射した。尾静脈注射を、30日間にわたって6日毎に行った。興味深いことに、miR-2x4の全身送達により、肺転移の有意な減少または消失が起こったが、miR-2x4変異体オリゴ注射マウスは重度の肺転移を示した。これらの結果は、miR-204が腫瘍の増殖および転移を処置するための治療標的となりうることを示している。

【0050】

E. hsa-miR-204は、腫瘍発生に関連する遺伝子を標的とする。

hsa-miR-204が腫瘍発生において果たしうる役割を補強するメカニズムを理解するために、miR-204によって調節される遺伝子を同定した。ほとんどのmiRNAは、標的mRNAレベルを低下させるように作用することから (Guo, et al., 2010)、hsa-miR-204を過剰発現する細胞について遺伝子発現分析を行って、hsa-miR-204の有望な標的を決定した。hsa-miR-204過剰発現細胞において変化した遺伝子の中で、ダウンレギュレートされた遺伝子は、

10

20

30

40

50

hsa-miR-204の直接の標的である可能性がある。興味深いことに、ダウンレギュレートされた遺伝子のいくつかは、癌関連プロセスに関連しており、経路に基づく分析によって明らかとなるように、物理的または機能的に互いに相互作用する（図10Aおよび10B）。これらの遺伝子の中で、1つのそのような遺伝子、すなわちBDNFについて詳細な分析を行ったところ、BDNFは、マイクロアレイ分析において高レベルの変化を示し、予想される全ての生物学的経路において最も機能が濃縮された重要性を有することを特徴とした。BDNFは、その受容体TrkBと共に、腫瘍の血管新生および転移において重大な役割を果たすことが知られている（Edsjo, et al., 2003; Nakagawara, et al., 1994）。その上、SvMicro（Li u, et al., 2010）、ベイズ決定融合アプローチ（Yue, et al., 2010）、および本発明者らが作成したmiRmate（Du, et al., 2009）、ならびにTargetScan（Lewis, et al., 2005）、およびPictar（Krek, et al., 2005）を含む多数の標的予測アルゴリズムもまた、BDNFがhsa-miR-204の標的であることを予測した。さらに、hsa-miR-204結合部位は、脊椎動物全体で進化的に保存されていることが見出され、これは多様な種を超えて重要な調節機能を有することを示唆している。重要なことに、hsa-miR-204およびBDNF/TrkB発現は、いくつかの腫瘍において強い逆相関を示した（図4A、4B、および4C）。

【0051】

マイクロアレイおよび標的予測結果を検証するために、BDNFの3' UTRにおける予想部位に結合することによってhsa-miR-204がBDNFを標的とするか否かを最初に調べた（図4D）。実際に、BDNF 3'-UTRを含むpMIRレポーター構築物のルシフェラーゼ活性は有意に抑制され、これは3'-UTRを含まない構築物と比較するとhsa-miR-204を過剰発現する細胞ではさらに低下した。これに対し、BDNF 3'-UTR含有構築物においてシード配列を変異させると、野生型構築物のルシフェラーゼ活性近くまでルシフェラーゼ活性を回復したのみならず、変異体構築物からの転写物はhsa-miR-204過剰発現に対して非感受性となり、これによりhsa-miR-204とBDNF 3'-UTR内の予想結合部位とのあいだに特異的相互作用があることを確認した。

【0052】

これらの結果をさらに実証するために、hsa-miR-204を過剰発現する細胞におけるBDNFのレベルを決定した。miR-204過剰発現により、RNAレベルおよびタンパク質レベルのいずれにおいてもBDNFの有意な減少が起こった（図4E、4F、および4G）。次に、BDNFがmiR-204の機能的に重要な標的であるか否かを調べた。これに取り組むために、レスキューティングを行った。BDNFの再導入により、足場非依存性増殖、細胞遊走および浸潤を含むhsa-miR-204誘導表現型が回復した（図11Aおよび11B、データは示していない）。これらの結果は、hsa-miR-204によるBDNFの調節が、癌細胞の増殖、遊走、および浸潤において重要な事象であることを示唆している。

【0053】

F. hsa-miR-204の喪失は、癌細胞におけるAKT/mTORシグナル伝達およびRac1ransスローションを活性化する。

hsa-miR-204がその腫瘍の増殖および転移の抑制活性を示しうるメカニズムを決定するために、AKT/mTORシグナル伝達経路に及ぼすhsa-miR-204の効果を、これまでにAKT経路を活性化することが示されているBDNFの観点から調べた（Troca-Martin, et al., 2010）。加えてmTORによるAKTの選択的活性化は、癌細胞の遊走および浸潤を調節することが示されている。興味深いことに、hsa-miR-204過剰発現によって、AKTならびにmTORの下流の標的である4E-BP1およびS6の活性の低下が起こった（図5A）。4E-BP1は、リン酸化されるとeIF4Eから解離してタンパク質の翻訳を可能にする翻訳阻害物質であり、S6は、そのリン酸化によりリボソームのアセンブリを促進して、次いでmRNAの翻訳を促進するリボソームタンパク質である。AKTは、アクチン構築、細胞間接着、および細胞移動に関係する多数のプロセスを調節することによって、細胞の浸潤を制御する（Kim, et al., 2011; Grill e, et al., 2003; Enomoto, et al., 2005）。

【0054】

miR-204がこのプロセスにおいて直接の役割を果たしうるか否かを決定するために、低

10

20

30

40

50

分子Gタンパク質Rac1の活性化に及ぼすhsa-miR-204過剰発現の効果を評価した。低分子Gタンパク質Rac1は、AKT/mTORと機能的に相互作用して、BDNF (zadran, et al., 2010)、または上皮細胞増殖因子 (EGF) (Kim, et al., 2011) によって誘導される細胞遊走およびアクチン再構築において重要な役割を果たすことが報告されている。BDNFまたはEGFによってMDA-MB-231細胞 (およびSKOV3またはHEK-293細胞) を刺激すると、膜の波打ちを誘導し、この刺激により、Rac1は波打ち領域にトランスロケートした (データは示していない)。これに対し、hsa-miR-204を過剰発現する細胞では、膜の波打ちおよびRac1のトランスロケーションは、BDNFまたはEGFによって誘導しても観察されなかつた (データは示していない)。腫瘍の増殖および進行にとって重大であるアポトーシスの回避 (Hanahan, et al., 2000) は、hsa-miR-204の喪失を示す癌において腫瘍発生の中心となるもう1つのメカニズムでありうる。その上、AKT/mTOR活性の増加もまた、癌におけるアポトーシスの減少に関連している (Krishnan, et al., 2006)。実際に、hsa-miR-204の過剰発現により、細胞およびゲノムの完全性に対する非可逆的損傷の指標である活性化カスパーゼ-3およびポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) のレベルはいずれも有意に増加して、その結果アポトーシス活性が増加した (図5Bおよび5C)。まとめると、これらの知見は、hsa-miR-204の喪失が、腫瘍発生シグナル伝達カスケードの公知の調節因子であるその標的遺伝子を活性化することによって、腫瘍細胞の増殖、遊走、および浸潤を促進することを示唆している。

【0055】

G. ハイスループット機能的スクリーニング

hsa-miR-204は、腫瘍抑制因子であるのみならず、化学療法剤パクリタキセルに対する薬物耐性乳癌の感受性を増加させるmiRNAであることが認められている。

【0056】

パクリタキセル耐性TNBC細胞のパクリタキセルに対する感受性を増加させうるmiRNAを同定するために、不偏の包括的アプローチを行った： 974種の化学合成miRNA阻害物質のライブラリをハイスループットスクリーニングプラットフォームで用いて、TNBC細胞の80%がなおも生存可能である用量である亜致死量のパクリタキセル (2から8 nM) の存在下でTNBC細胞生存率を低下させるmiRNAを同定して、選択された候補物質を検証した。TNBC細胞株MDA-468を用いた。

【0057】

その各々が974種のヒトマイクロRNAの1つを標的とする阻害物質を、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて1種の阻害物質につき1ウェルの形式でアレイにした。パクリタキセル耐性MDA-468細胞のトランスフェクションを、薬物の存在下 (亜致死濃度) および非存在下で三つ組分析を六つ組で行った。細胞を、5日間のMTSアッセイから導出したIC₂₀以下の薬物への72時間曝露に供した。細胞生存率は、CellTiter-Glo生存率アッセイ (Promega) を用いて測定した。

【0058】

プレート間の比較を行うことができるように、未加工値を、各プレート上の内部標準対照試料 (陽性および陰性対照) に対して正規化した。各miRNA阻害物質に、薬物の非存在下での平均生存率でパクリタキセル中での平均生存率を除して算出される生存率比 (パクリタキセルの平均値/担体の平均値) を割り当てる。ハイスループットスクリーニングでは、統計学的比較の数は、生物学的反復実験の数を有意に超える。各miRNA阻害物質に関し二標本t-検定 (合併分散による) を行って、2つの実験条件 (薬物の存在下および非存在下) での平均値に有意差があるか否かを決定した。得られた未加工p値を、偽発見率 (FDR) を制御するベンジャミン-ホックバーグ法に基づいて、全てのp値の分布におけるそれらの階級に基づいて拡大した。このプロトコールは、全ゲノムRNAiに基づく合成致死スクリーニング試験において首尾よく応用されており、それによってヒット数18の再現性の高いリストが同定された (図6)。

【0059】

このスクリーニングによって、異なるカテゴリのmiRNAが同定された： (1) 減感剤：阻

10

20

30

40

50

害されると、担体と比較してパクリタキセルの存在下で細胞生存率を低下させたmiRNA（過剰発現されると、これらのmiRNAが細胞の生存率を支持することを示している）；（2）増感剤：阻害されると、担体と比較してパクリタキセルの存在下で細胞生存率を増加させたmiRNA（過剰発現されると、これらのmiRNAが細胞生存率を低下させることを示している）；および（3）中性薬物：阻害されると、パクリタキセルと担体とのあいだで比較した場合に、細胞生存率に対して有意な効果を有しなかったmiRNA。

【0060】

1つの増感剤であるhsa-miR-204は、阻害されると、無処理の担体保持細胞と比較してパクリタキセル処理TNBC細胞において細胞生存率の最も大きな増加を示した。図6に示されるように、増感剤hsa-miR-204の過剰発現の結果、無処理（担体）対照と比較した場合にパクリタキセルの亜致死用量の存在下でTNBC細胞の生存率が有意に（およそ4倍より多く；p = 0.006）低下した。
10

【0061】

H. エズリン

本発明者らはまた、エズリンRNAに対するhsa-miR-204の結合、およびエズリン3'-UTR領域における対応する5'-AAAGGGAA-3'配列に対する、hsa-miR-204のシード領域における配列3'-UUUCCCUU-5'の特異的結合も同定した。エズリンは、エズリン／ラジキシン／モエシン（ERM）ファミリーのメンバーであり、細胞の形質膜およびアクチン細胞骨格の機能を連結することにより細胞骨格の再構築を促進する。エズリンは、いくつかの成人および小児腫瘍の腫瘍増殖および転移に関係しており、エズリンの強い多巣性発現は、いくつかの腫瘍の予後不良に関連している。P-糖タンパク質は、fermドメインの149から242番目のアミノ酸残基でエズリンに結合して、ヒト骨肉腫の多剤耐性において重要な役割を果たす。
20

【0062】

hsa-miR-204とBDNF座（図4A、4B、4C、4E、4F、および4G）の発現の逆相関と同様に、hsa-miR-204とエズリン座の発現のあいだには逆相関がある（図7）。BDNF発現と同様に、エズリン発現はhsa-miR-204の真の標的である（図8）。

【0063】

I. 追加の検討

癌に関連する多くのmiRNAが、ゲノムの脆弱部位に位置することが知られている（Calin, et al., 2004）。しかし、意外にも、miRNAを含む染色体異常を有する領域の機能的重要性に関してはほとんどわかっていない。染色体異常の発見を目的とした最初の遺伝子スクリーニング（典型的に解像度がより低い比較ゲノムハイブリダイゼーション）は、miRNAを含むゲノム領域の変化を見落とす可能性がある。miRNAは、細胞の増殖およびアポトーシスを調節する1つまたは複数の経路のいくつかの遺伝子に影響を及ぼし、脱制御されると腫瘍の形成に寄与することから、miRNAをコードするより小さいゲノム領域を厳密に調べることにより、腫瘍発生メカニズムに関する重要な洞察がもたらされうる。ほとんどのmiRNAは、癌においてダウンレギュレートされると提唱されており、特異的miRNAを含む遺伝子領域の微小欠失は、ヒト癌の発症および進行において重要な役割を果たす事象である。
30

【0064】

腫瘍増殖および転移の強力な抑制因子として作用するhsa-miR-204が、いくつかのヒト癌において体細胞から失われているという証拠が、本明細書において提供される。hsa-miR-204が腫瘍において血管新生促進性タンパク質BDNFおよびその受容体TrkBの発現および機能を調節することは、hsa-miR-204の喪失が、Rac1のトランスロケーションおよびアクチン再構築につながるAKT/mTOR経路を活性化することによってBDNF（またはEGF）誘導性の癌細胞の遊走および浸潤を促進することと共に証明されている。AKTおよびRac1は、互いにその活性化を必要とすることから（Kim, et al., 2011; Higuchi, et al., 2001）、これらの知見は、ヒト腫瘍におけるhsa-miR-204発現の喪失が、増殖因子によって誘導される癌細胞の遊走および浸潤の際にBDNF/AKT1とRac1のあいだの正のフィードバックループを誘導しうることを示唆している。これを支持して、EGFはAKTを活性化してRac1の細胞膜
40

へのトランスロケーションを促進することが示されており、EGFRとTrkBの相互作用が、癌細胞の遊走を誘導することが示されている (Qiu, et al., 2006)。その上、EGFに対する応答は、癌細胞浸潤の際の重要な段階であり、転移に直接関係している (Wyckoff, et al., 2004)。BDNF/TrkBの過剰発現がAKTの安定化および活性化に関係し、それによってアポトーシスの減少が起こることから (Siu, et al., 2009)、癌細胞の遊走および浸潤に加えて、BDNF/TrkBシグナル伝達の活性化もまた、hsa-miR-204枯渇細胞におけるアポトーシスの回避に寄与しうる。このことと一貫して、これらの結果は、hsa-miR-204過剰発現によってリン酸化の低下が起こり、mTORの下流の標的である4E-BP1およびS6キナーゼの活性化が起こることを証明する。

【0065】

hsa-miR-204は、一過性受容器電位カチオンチャネルファミリータンパク質メンバーである一過性受容器電位カチオンチャネルメンバー3 (TRPM3) 遺伝子内に存在し、これらのタンパク質は、細胞のカルシウムシグナル伝達および恒常性にとって重要であることが知られていることから、宿主遺伝子TRPM3が、hsa-miR-204を含む染色体座のゲノム喪失に関連する表現型にも寄与する可能性があるという推測も生じ得る。しかし、本明細書における結果は、hsa-miR-204単独の導入後に腫瘍の増殖および転移の抑制を示し、hsa-miR-204模倣体または阻害物質過剰発現癌細胞においてTRPM3遺伝子レベルの変化は認められない (図12)。このことは、hsa-miR-204関連腫瘍抑制因子表現型がTRPM3によって媒介されるのではないことを明らかに示唆している。しかし、hsa-miR-204とその宿主遺伝子TRPM3とが相乗的に作用して、腫瘍の増殖の抑制ならびに腫瘍細胞の遊走および浸潤の抑制を調節する可能性を除外することはできない。腫瘍発生におけるTRPM3の明確な役割は報告されていないことから、TRPM3の可能性のある腫瘍抑制因子としての役割およびhsa-miR-204とのその相乗効果 (もしあれば) を調べる詳細な試験は、将来の研究主題でありうる。

【0066】

まとめると、本明細書における知見は、特異的miRNAを含む遺伝子座が重要な腫瘍発生経路を調節することによって、癌の増殖および転移において原因的役割を果たしうることを示唆している。hsa-miR-204が、正常な細胞プロセスにおいて重要な役割を有しながら侵襲性の癌において過剰発現されるBDNF/TrkBを標的とすることができることは、hsa-miR-204が重要な調節メカニズムを制御しうること、およびそのような制御の脱制御により、正常な発達 / 分化事象が変化を受けやすくなりうることを示している。それゆえ、治療計画においてhsa-miR-204を用いることをねらいとした戦略は、癌細胞において不適切に活性化された段階をより正常な状態へと逆転させる利点を有する。本明細書において強力な腫瘍抑制因子としてhsa-miR-204が同定されたことは、本明細書においてその治療能および無視できる肝毒性が証明されたことと共に、癌を処置するための実行可能な治療計画の重要な構成要素としてhsa-miR-204を開発するための強い理論的根拠を確立する。

【実施例】

【0067】

以下の実施例は、本発明のある非制限的な局面を証明するために含められる。以下の実施例に開示される技術は、本発明者らによって本発明の実践において良好に機能すると発見された技術を表すことは当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示の具体的な態様に多くの変更を行うことができ、それでもなお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様のまたは類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

【0068】

以下の実施例の多くは、例示的な材料および方法に関するさらなる詳細を提供する。

【0069】

実施例1

(正常および腫瘍組織試料および細胞株)

実験に用いた小児腎腫瘍 (HEK293; 胎児腎細胞株)、卵巣癌 (SKOV3)、および乳癌 (MDA-MB-231) を代表する細胞株を、ATCCプロトコールに従って培養した。76例の小児腎腫

10

20

30

40

50

癌および対応する正常な腎臓を、Children's Oncology Group (Arcadia, CA) から得た。11例の進行期卵巣腫瘍および5例の正常な卵巣組織をUT MD Anderson Cancer Center (Houston, TX) から得た。15例の乳癌組織および対応する正常組織をUT Health Science Center (San Antonio, TX) から得た。

【 0 0 7 0 】

実施例2

(RNAおよびタンパク質分析)

総RNAを腫瘍および正常組織、ならびに全ての細胞株から抽出して、以前に記述されたように (Imam, et al., 2010) qRT-PCR分析に供した。ウェスタンプロット分析は、以前に記述されたように (Imam, et al., 2010) 行った。-アクチンに対する抗体 (AC-74-A 5316) および -チューブリンに対する抗体 (T6199) は、Sigma Aldrichから購入した。B DNFに対する抗体は、Santa Cruzから購入し、カスパーゼ-8に対して特異的な抗体 (IC12-9746)、カスパーゼ-3に対して特異的な抗体 (8G10-9665)、カスパーゼ-9に対して特異的な抗体 (9502)、PARPに対して特異的な抗体 (9542S)、AKTに対して特異的な抗体 (9272)、ホスホ-AKTに対して特異的な抗体 (9271)、S6リボソームタンパク質に対して特異的な抗体 (2217)、およびホスホS6リボソームタンパク質に対して特異的な抗体 (5G10-2211S) を含む他の抗体は、Cell Signalingから購入した。

【 0 0 7 1 】

実施例3

(ゲノムPCRアッセイ)

小児腎腫瘍 (n = 38) および進行期 (IIIおよびIV期) 卵巣癌ならびに対応する正常腎組織 (n = 38) および対応する正常卵巣組織 (n = 4) からのゲノムDNAを、DNeasyゲノムDNA抽出キット (Qiagen) によって単離した。hsa-miR-204のゲノム分析に関して、記述されるように (Varambally, et al., 2008) SYBRグリーンに基づく定量的PCR (qRT-PCR) を用いて 2^{-C_t} 法を適応させた。簡単に説明すると、ゲノムDNA 25 ngを鑄型として用いて、hsa-miR-204座を増幅した。代表的な対照組織試料を、あらゆる試料をそれに対して比較するキャリブレータとしてあらゆるアッセイにおいて用いて、相対的定量 (RQ) 値を得た。正常な男性試料 (1×) および正常な女性試料 (2×) (Promega) からのゲノムDNAを用いて、ホスホグリセレートキナーゼ1 (PGK1) レベル、ならびに5つのX-染色体特異的miRN A、すなわちhsa-miR-424、hsa-miR-503、hsa-miR-766、hsa-miR-222、およびhsa-miR-221のレベルを比較し、様々なmiRNA座における喪失の程度を較正した。男性のゲノムDNAにおけるこれらの領域のRQ値を、非X-染色体TATA結合タンパク質 (TBP) 遺伝子を基準として用いて評価した。2つの異なるデータ集団を分離できることに基づいて、0.5以下のRQ値は、ゲノム座の少なくとも1コピーの喪失として見なされた。

【 0 0 7 2 】

実施例4

(高解像度miRNA比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) アッセイ)

Agilentカスタムデザインマイクロアレイを製造元のプロトコールに従って用いて、小児腎腫瘍試料から単離したゲノムDNAについて、miRNA CGH分析を行った。カスタムアレイは、Agilent 2 × 105K Human Whole Genome Genomic Microarrayに基づいてAgilent's eArrayプログラム (earray.chem.agilent.com/earrayで入手可能) を用いて、全てのmiRNA領域をカバーする追加のプローブ (信頼性を高めるために、miRBase v13からの各miRNAの200 bp前、miRNA内、および200 bp後の3種類のプローブ) を用いて設計した。DNAの変化を定量するために、アレイCGHデータ分析をNexus Copy Number (BioDiscovery) によって行った。特異的miRNA部位でのコピー数変化を有するまたは有しない試料を決定した後、複合グラフ表示を得るために、全てのアレイCGHデータをMALTABにロードした。プローブの位置および正規化コピー数を示すアレイCGHは、GEO/NCBIデータベース (GSE28397) に提出されている。

【 0 0 7 3 】

実施例5

10

20

30

40

50

(メタ分析)

354例の卵巣癌 (The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトから得た、オンラインでは<cancergenome.nih.gov>にある)、および35例の乳癌 (GSE15130) に関するパブリックドメインの高密度CGHデータセットについてメタ分析を行った。全ての腫瘍からのアレイCGHデータをNexus Copy Numberにインポートした。コピー数喪失閾値を、 $\log_2 0.5$ に設定した ($\log_2 0.2$ のデフォルト設定よりストリンジエントである)。遺伝子発現分析のメタ分析を、GEO/NCBIからのパブリックドメイン遺伝子発現データセット (GSE22820)について行った。乳癌試料におけるTRPM3 (miR-204を含む座) の差次的発現を、最初にRMA/変位値正規化 (quantile normalization) を行い、次に同じデータセット内の正常な隣接組織と比較することによって決定した。

10

【0074】

実施例6

(遺伝子発現分析)

ヒト遺伝子発現マイクロアレイデータをAgilent Human Whole Genome 4x44K array (Agilent Technologies) を用いて作製した。miR-204をトランスフェクトしたHEK-293細胞から単離した総RNAを、製造元のプロトコールに従って、ダイスワップ反復実験を行って、スクランブルオリゴ (対照) をトランスフェクトしたHEK-293細胞からのRNAと同時ハイブリダイズさせた。相対的遺伝子発現比をAgilent's Feature Extractionソフトウェア (バージョン9.5.3.1、Agilent Technologies) によって抽出した。MATLAB Bioinformatics Toolbox (R2009a, Mathworks) によって、変位値正規化を行った。遺伝子の差次的発現を決定するために、正規化した発現データにStudent's t-検定を適用した。FDR調整後にP<0.05 (ベンジャミン-ホックバーグ) および変化倍率>2に基づいて、シグネチャー遺伝子セットを選択した。差次的遺伝子発現データセットは、GEO/NCBIデータベースに寄託されている (GSE28400)。

20

【0075】

実施例7

(プラスミドの構築)

pMIR-BDNF 3'-UTR構築物に関して、BDNF遺伝子の3'-UTRセグメントを増幅して、pMIR-REPORTベクター (Ambion) のHindIIIおよびSpeI部位でルシフェラーゼ遺伝子の下流にサブクローニングした。pSilencer-miR-204構築物に関して、およそ500 bpのpri-miR-204ゲノム配列を増幅して、pSilencer 4.1 Puroベクター (Ambion) のBamHIおよびHindIII部位にクローニングした。

30

【0076】

実施例8

(細胞の増殖および軟寒天アッセイ)

pSilencer-miR-204およびpSilencerスクランブル (対照) 安定細胞株を用いた細胞の増殖および軟寒天コロニー形成アッセイを、以前に記述されたように (Imam, et al., 2010) 行った。

【0077】

実施例9

40

(SCIDマウスにおける腫瘍形成アッセイ)

pSilencer-miR-204またはpSilencerスクランブルのいずれかを安定に過剰発現するHEK-293細胞200万個をRAG2^{-/-}、c^{-/-}SCID雄性マウス (Taconic) 9匹および対照マウス9匹の腎被膜に注射した。腫瘍の体積を、式 $1/6 \times (L \times D \times W)$ を用いて移植後24日目に評価し、式中Lは腫瘍の長さ、Dは腫瘍の深さ、およびWは幅である。6マイクロメートルのパラフィン包埋腫瘍切片をヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。動物を必要とする実験技法は全て、施設内倫理ガイドラインに従って行った。

【0078】

実施例10

(トランスウェル細胞遊走および基底膜マトリクス浸潤アッセイ)

50

トランスウェル細胞遊走アッセイを既に記述されたように (Imam, et al., 2010) 行った。75 nMのmiR-204模倣体または陰性対照模倣体をトランスフェクトして、さらに75 nMのmiR-204特異的阻害物質または25 ngのpBluescript KS⁺対照を48時間トランスフェクトしたMDA-MB-231細胞について浸潤アッセイを行った。トランスフェクションの48時間後、Matrigel (1 mg/mL) (BD Biosciences) を予めコーティングした24ウェルトランスウェルプレートのインサートに、細胞を播種した。血清含有培地およびフィブロネクチン (5 μg/mL) を、化学誘引物質として下のチャンバーに添加した。24時間インキュベートした後、トランスウェルインサート上の細胞を洗浄して固定し、非浸潤細胞およびECマトリクスを綿棒で軽く除去した。下のチャンバーに位置する浸潤細胞を、記述されたように (Imam, et al., 2010) クリスタルバイオレット (0.1%) によって染色して、空気乾燥させて写真を撮影した。 10

【0079】

実施例11

(治療実験)

MDA-MB-231-GFP-luc細胞100,000個を尾静脈に注射した。腫瘍細胞注射後7日目から、RN ALancer IIインビオ送達製剤 (Bioo Scientific) と複合体を形成したhsa-miR-204オリゴ (n = 6) またはhsa-miR-204変異体オリゴ (n = 6) を、1 mgオリゴ/kg体重の割合で5日毎に30日間注射した。6回目の注射後に動物を全て屠殺した。肺を固定して、転移病変に関して分析した。蛍光顕微鏡を用いて (GFP⁺ および luc⁺ 病巣に関して) 肺の画像を得た。hsa-miR-204注射マウスでは、転移および肝毒性を評価するために、肝臓も採取した。 20

【0080】

実施例12

(アポトーシスアッセイ)

75 nM hsa-miR-204模倣体または陰性対照模倣体をトランスフェクトしたHEK293またはHeLa細胞におけるアネキシンV/PI染色を、以前に記述されたように (32) FITCアネキシンVアポトーシス検出キット (BD Pharmingen) を用いて、三つ組ウェルで行った。 20

【0081】

実施例13

(免疫蛍光)

細胞を4%パラホルムアルデヒドによって固定して0.2%Triton X-100によって室温 (RT) 30) で15分間透過処理した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) によって洗浄し、PBS中で10%ヤギ血清によってRTで45分間ブロックした。細胞を、PBS中で希釈したRac1マウスモノクローナル抗体 (ab33186、Abcam) と共にRTで2時間インキュベートした。細胞を3回洗浄した後、1:200 Alexa Fluor 647およびAlexa Fluor 488ファロイジンコンジュゲート二次抗体 (A12379、Invitrogen, Molecular Probes) と共にRTで1時間インキュベートした。3回洗浄後、細胞を、DAPI (Polysciences) を含むAqua-Poly/Mount培地中でスライドガラスに載せた。光学顕微鏡写真をNikon Eclipse TE2000-U顕微鏡において倍率200倍で撮影した。

【0082】

実施例14

(統計分析)

グラフ中の全ての値およびエラーバーは、平均値 ± SEMである。それぞれのn値を図の説明文に示す。P値は両側Student t-検定により決定した。 40

【0083】

実施例15

(miR-296-5p阻害は、トリプルネガティブ乳癌におけるパクリタキセル応答の感受性を増加させる)

トリプルネガティブ乳癌細胞に、スクランブル対照またはmiR-296-5p阻害物質を3日間トランスフェクトした後、担体または8 nMパクリタキセルのいずれかによる処理をさらに2日間行った。細胞の生存率を、CellTiter-Glo (Promega Inc.) を用いて担体処理miR-29 50

6-5pトランスフェクト細胞と薬物処理miR-296-5pトランスフェクト細胞とのあいだで比較した。miR-296-5pの阻害により、パクリタキセルの存在下での細胞の生存率が有意に低下した。棒グラフは、溶媒対照 (DMSO) またはパクリタキセル (8 nM) によって処理した対照およびmiR-296-5pトランスフェクト細胞におけるTNBC細胞生存率のパーセンテージを示す。図13。

【0084】

実施例16

(miR-296-5pは、トリプルネガティブ乳癌細胞の遊走および浸潤を阻害する)

トリプルネガティブ乳癌細胞に、スクランブル対照またはmiR-296-5p阻害物質を48時間トランスフェクトした。トランスフェクション後48時間目に、細胞をトリプシン処理して、無血清培地に再懸濁して、孔サイズ3 μmのトランスウェルチャンバー (Corning, Corning, NY, USA) の上部にロードした。血清含有培地を、化学誘引物質として下のチャンバーに入れて、細胞を37 °Cでインキュベートし、走化性チャンバーの中に24時間遊走させた。チャンバー底部の遊走細胞を、10% ホルマリンで固定して、0.4% クリスタルバイオレットによって3時間染色した。実験を三つ組で繰り返して、遊走細胞を顕微鏡下で計数した。miR-296-5p阻害物質トランスフェクト細胞は、対照トランスフェクト細胞と比較すると、有意により低い遊走能を示した。代表的な画像は、浸潤細胞を示す。Nikon顕微鏡を用いて写真を撮影した。図14。

【0085】

実施例17

(処置の効能)

TNBCの処置におけるこれらのmiRNAの効能をさらに確証するために、本発明者らは、エクスピボ腫瘍外植片モデルを用いた。新しく切除した乳癌組織を1 mm³標本に切断して、37 °C およびCO₂インキュベーター内で、ヒドロコルチゾンおよびインスリンを添加した外植片培地で水和させたゼラチンスポンジ上に載せた。TNBC患者からの腫瘍外植片をパクリタキセルによって処理して、組織を優しく取り出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定して、パラフィンブロックのために加工処理した。Ki67レベルを決定するためにIHC分析を行った。外科標本および外植片のIHCから、外植片が当初の外科標本の組織構築および増殖特性を保持していることが明らかとなる。意外にも外植片のパクリタキセル処理により、非再発TNBCにおけるKi67染色の阻害が明らかとなったが、進行期TNBCは、パクリタキセルに応答しなかった。図15。

【0086】

実施例18

(リポソーム製剤)

ゼラチンスポンジ上で増殖した腫瘍外植片を、増感剤miRNA (75 nM) 単独、またはパクリタキセル (1 μM) 単独、またはmiRNA (75 nM) とパクリタキセル (1 μM) の併用によって処理した。(外植片培地中に添加することによる)パクリタキセル単独の48時間処理によって、応答性TNBC (初期段階の癌) におけるKi67レベル (腫瘍細胞の増殖を示す) の有意な阻害が起こった。しかし、パクリタキセル処理によって、パクリタキセルに応答性ではない再発したTNBC外植片のKi67レベルに有意な変化は起こらなかった。リポソーム製剤を用いて増感剤miRNA (75 nM) のみを48時間添加すると、進行期TNBCの腫瘍外植片のKi67レベル (腫瘍細胞の増殖を示す) が中等度に阻害された。しかし、効果は、増感剤miRNA (75 nM) をパクリタキセル (1 μM) と併用して用いた場合、はるかに強力であった。図16。

【0087】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書における記載の内容を補助する例示的な技法または他の詳細を提供する程度に、具体的に参照により本明細書に組み入れられる。

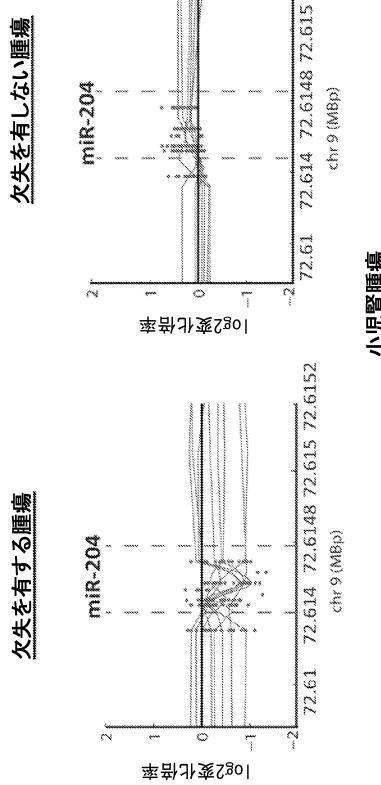
- Albertson & Pinkel, *Hum Mol Genet*. 12 Spec. No. 2:R145-152, 2003.
- Artzi, et al., *BMC Bioinformatics*. 9:39, 2008.
- Au, et al., *Cancer Lett*. 281:151-161, 2009.
- Bartel, *Cell*. 116: 281-297, 2004.
- Bartels & Tsongalis, *Clin Chem*. 55:623-631, 2009.
- Bayani, et al., *Semin Cancer Biol*. 17:5-18, 2007.
- Brodeur, *Nat Rev Cancer* 3:203-216, 2003.
- Calin, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2999-3004, 2004.
- Du, et al., *Mol Cancer Res*. 7:1234-1243, 2009.
- Edsjo, et al., *Lab Invest*. 83:813-823, 2003.
- Enomoto, et al., *Dev Cell*. 9:389-402, 2005.
- Esquela-Kerscher & Slack, *Nat Rev Cancer*. 6:259-269, 2006.
- Friedman, et al., *Genome Res*. 19(1):92-105, 2009
- Grille, et al., *Cancer Res*. 63:2172-2178, 2003.
- Guo, et al., *Nature*. 466:835-840, 2010.
- Hanahan & Weinberg, *Cell*. 100:57-70, 2000.
- Higuchi, et al., *Curr Biol* 11:1958-1962, 2001.
- Imam, et al., *Oncogene*. 29:4971-4979, 2010.
- Kim, et al., *Oncogene*. 30:2954-2963, 2011.
- Krek, et al., *Nat Genet*. 37:495-500, 2005.
- Krishnan, et al., *Clin Exp Metastasis* 23:227-236, 2006.
- Lewin, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 351:405-411, 1996.
- Lewis, et al., *Cell*. 120:15-20, 2005.
- Liu, et al., *BMC Genomics*. 11 Suppl. 3:S12, 2010.
- Nakagawara, et al., *Mol Cell Biol*. 14:759-767, 1994.
- Qiu, et al., *Int J Oncol* 29:1003-1011, 2006.
- Segal, et al., *J Biol Chem*. 271:20175-20181, 1996.
- Shen, et al., *Biologicals*. 36:263-268, 2008.
- Siu, et al., *Expert Opin Ther Targets*. 13:1169-1178, 2009.
- Troca-Marin, et al., *Mol Cell Neurosci*. 43:308-314, 2010.
- Varambally et al., *Science*. 322:1695-1699, 2008.
- Wyckoff, et al., *Cancer Res*. 64:7022-7029, 2004.
- Yue, et al., *ACM International conference on Bioinformatics and Computational Biology*, 2010.
- Zadran, et al., *J. Neurosci*. 30:1086-1095, 2010.

10

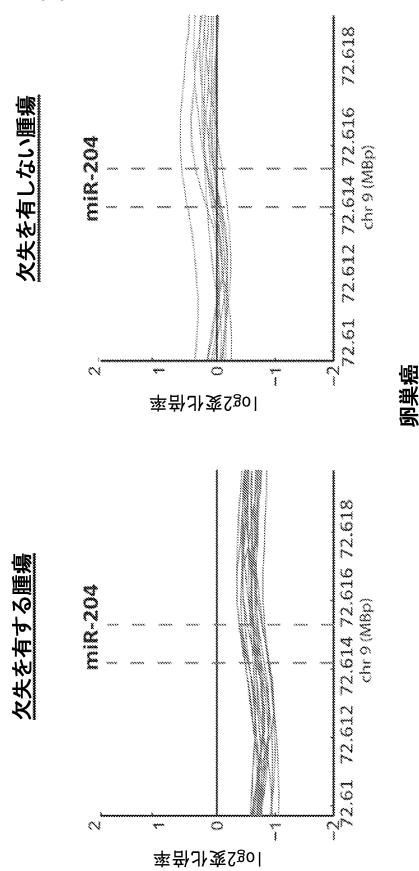
20

30

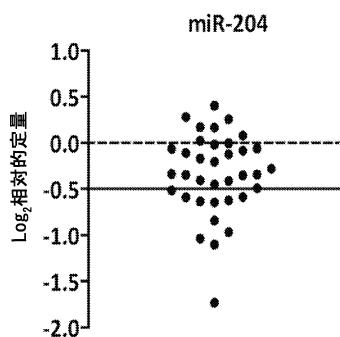
【図 1 A】



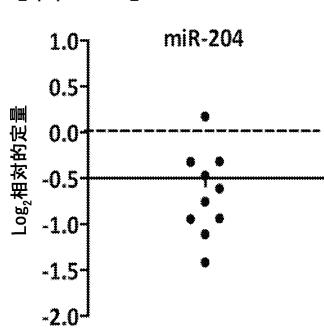
【図 1 B】



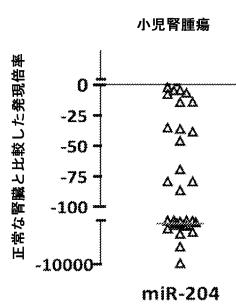
【図 1 C】



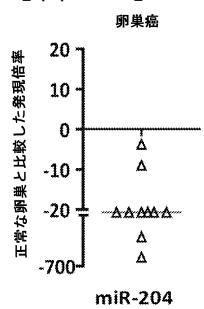
【図 1 D】



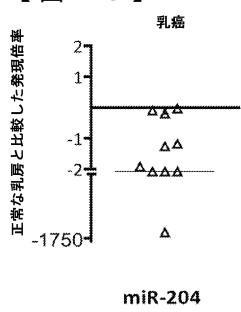
【図 1 E】



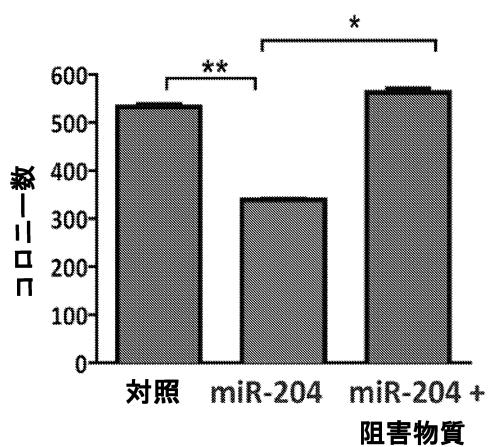
【図 1 F】



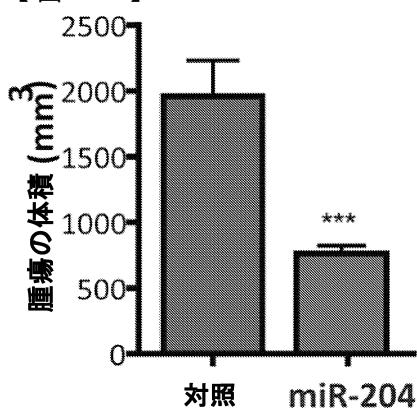
【図 1 G】



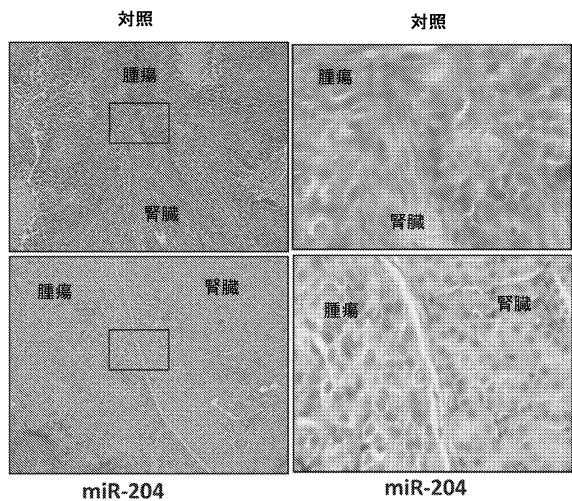
【図 2 A】



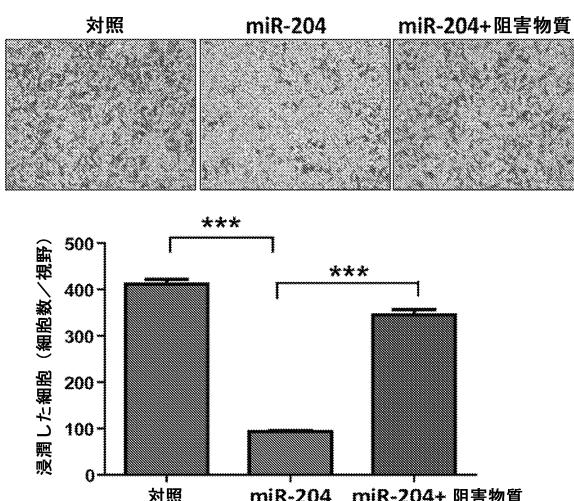
【図 2 B】



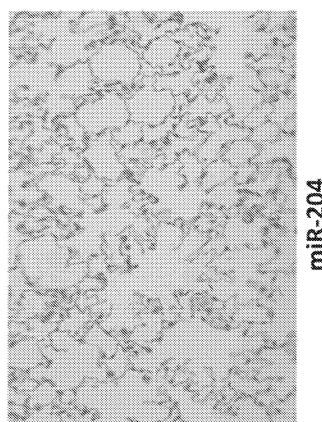
【図 2 C】



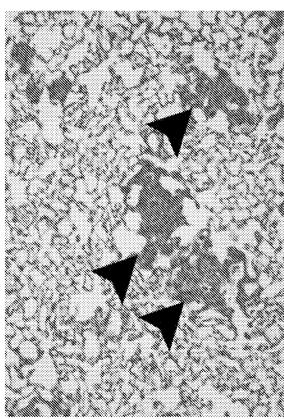
【図 2 D】



【図3 A】

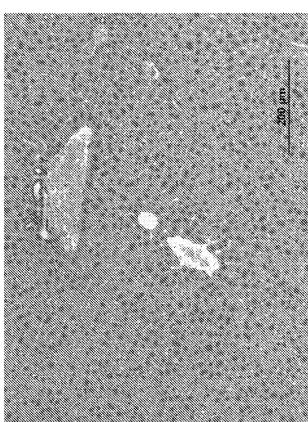


miR-204



陰性对照

【図3 B】

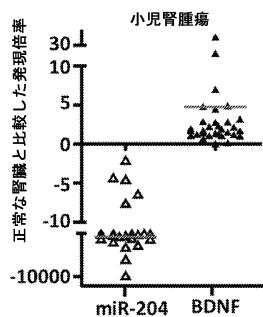


miR-204注射マウス番号2

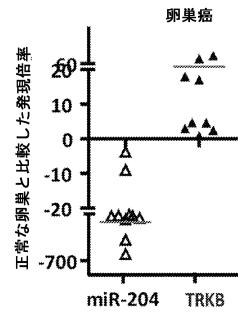


miR-204注射マウス番号1

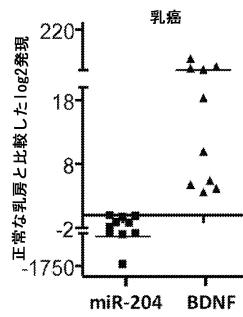
【図4 A】



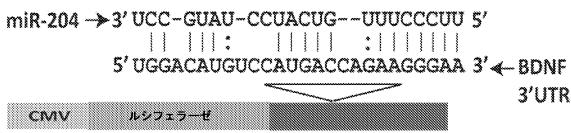
【図4 B】



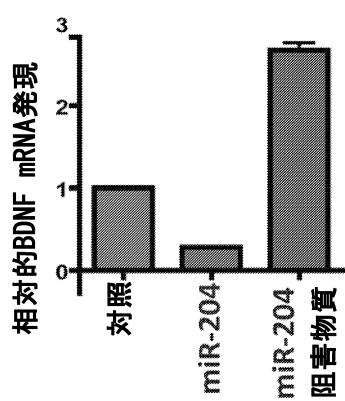
【図4 C】



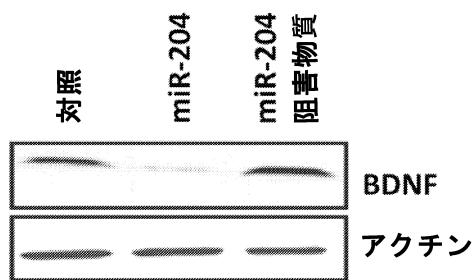
【図4 D】



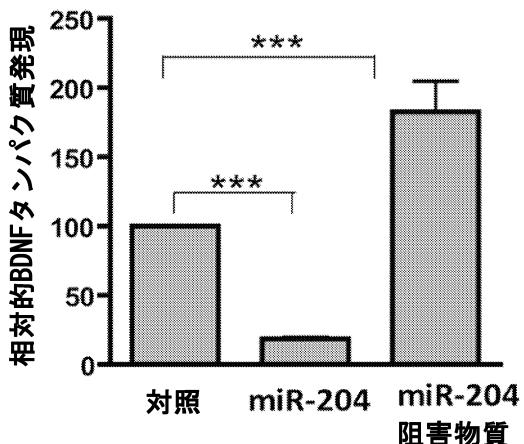
【図4 E】



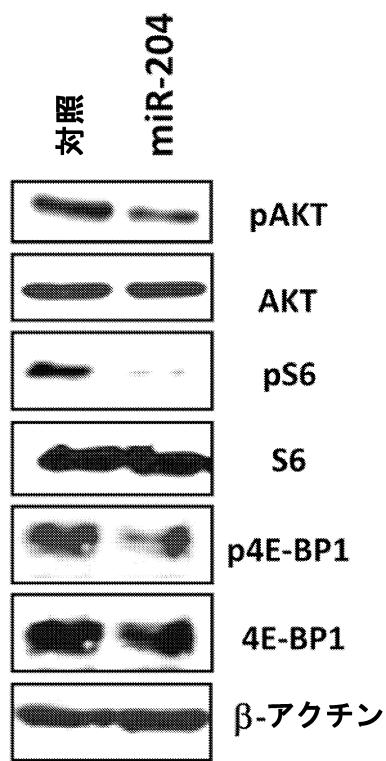
【図4 F】



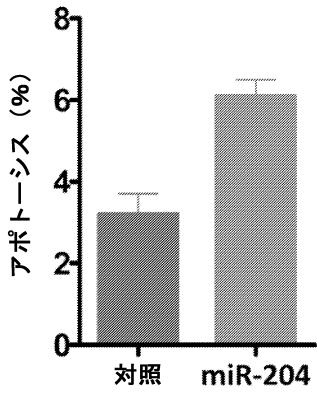
【図4 G】



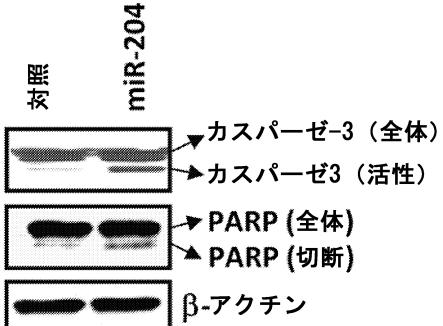
【図5 A】

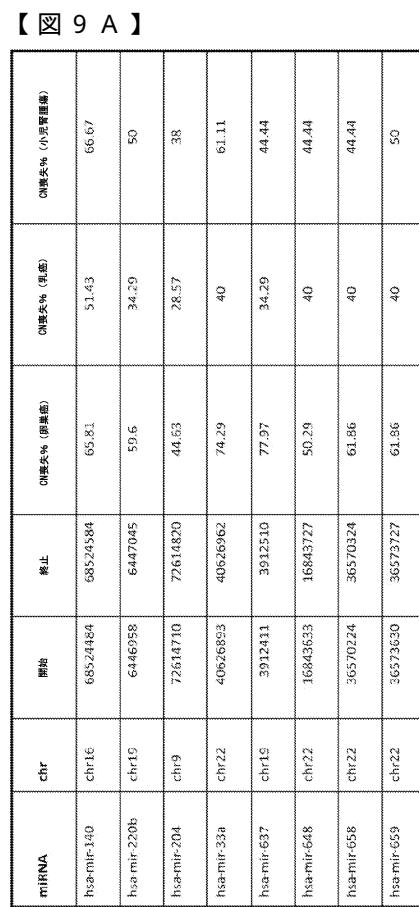
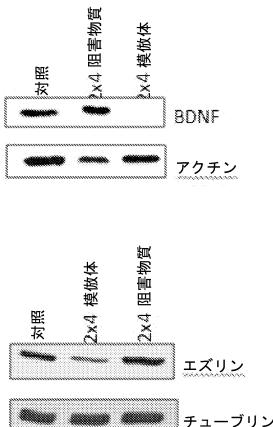
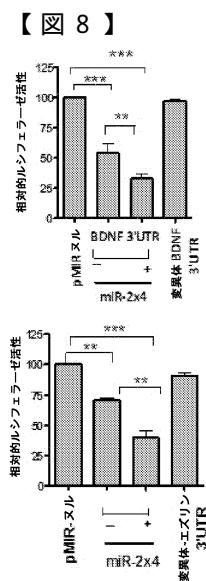
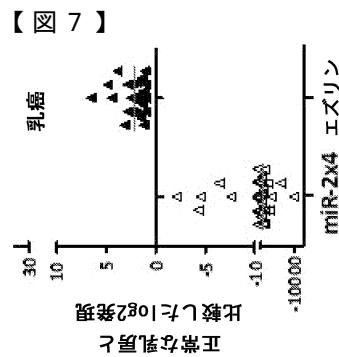
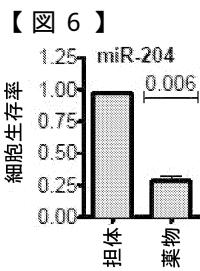


【図5 B】

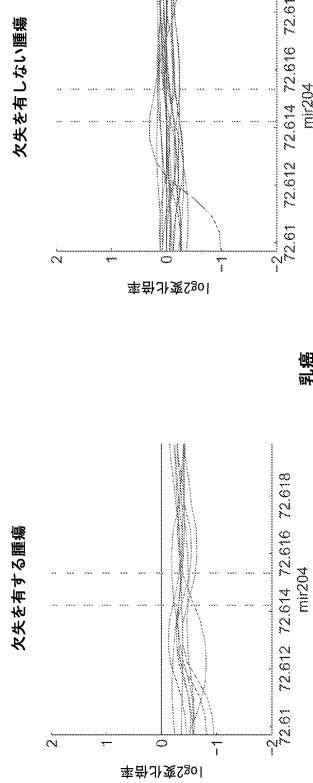


【図5 C】





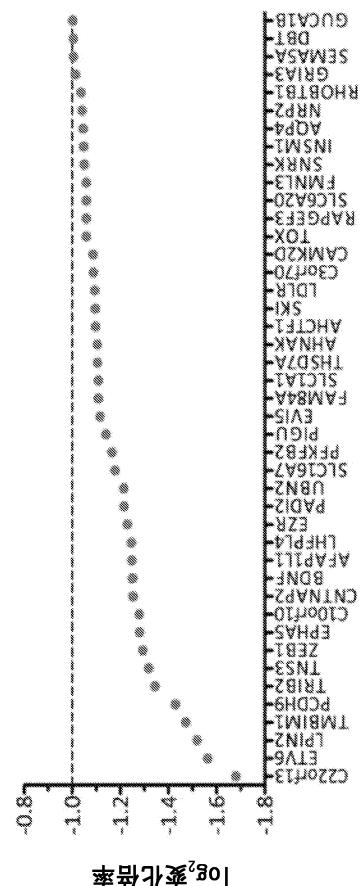
【図 9 B】



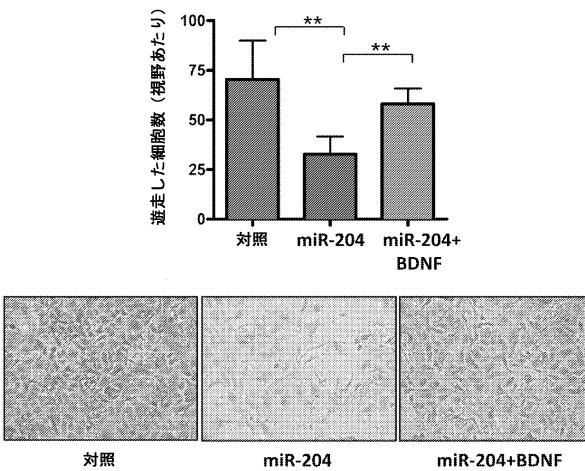
【図 10 B】



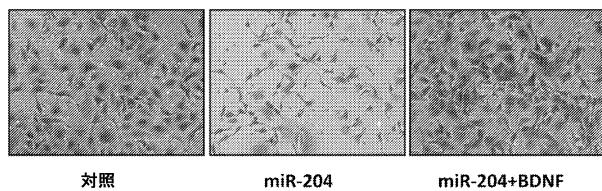
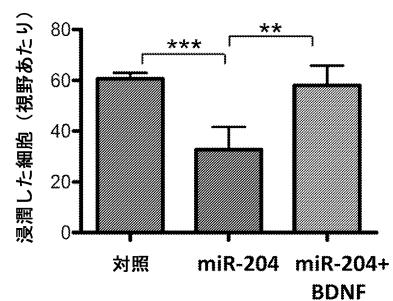
【図 10 A】



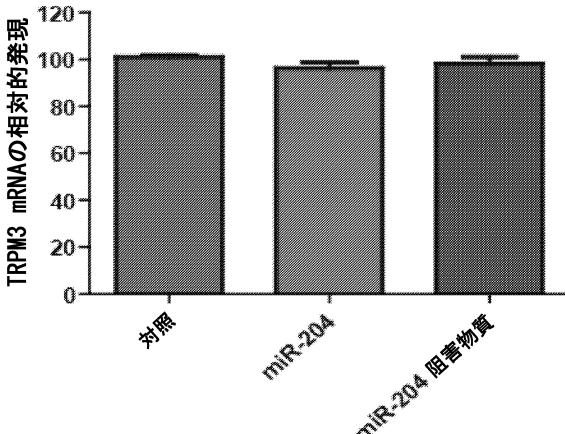
【図 11 A】



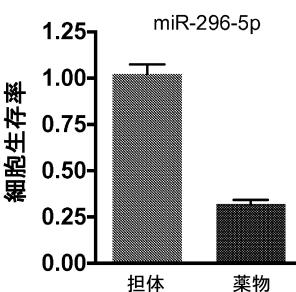
【図11B】



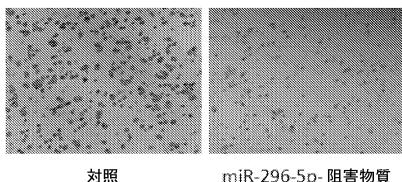
【図12】



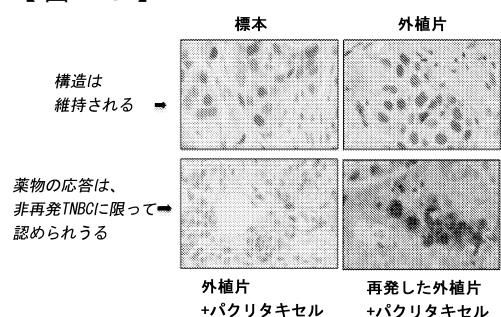
【図13】



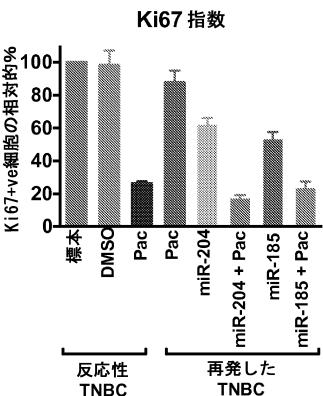
【図14】



【図15】



【図16】



【配列表】

0006478916000001.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
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ラオ マンジート ケイ .
アメリカ合衆国 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7702
(72)発明者 イマーム ジャフェール エス .
アメリカ合衆国 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7702
(72)発明者 ゾヒ ベハール
アメリカ合衆国 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7702
(72)発明者 チャン ヤオ フ
アメリカ合衆国 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7702
(72)発明者 スバラヤル パネードス
アメリカ合衆国 テキサス州 サンアントニオ フロイド カール ドライブ 7702

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 Cancer Cell , 2012年 , vol.21 , p.532-546
Neuro-Oncology , 2012年 , vol.14, no.8 , p.1007-1017
International Journal of Cancer , 2012年 , vol.130 , p.1036-1045
British Journal of Cancer , 2012年 , vol.107 , p.967-976
Am. J. Transl. Res. , 2011年 , vol.3, no.2 , p.209-218
Cell Death and Disease , 2012年 , vol.3, e423

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K	3 1 / 7 1 0 5
A 6 1 K	3 1 / 3 3 7
A 6 1 K	4 8 / 0 0
A 6 1 P	3 5 / 0 0
A 6 1 P	3 5 / 0 4
A 6 1 P	4 3 / 0 0
C 1 2 Q	1 / 6 8

C 1 2 Q 1 / 6 8 1 3

C 1 2 Q 1 / 6 8 4 4

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)