

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年5月6日(06.05.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/050109 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/004465
- (22) 国際出願日: 2009年9月9日(09.09.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-279228 2008年10月30日(30.10.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 大槻高史(OHTSUKI, Takashi), 宍戸昌彦(SISIDO, Masahiko), 公文裕巳(KUMON, Hiromi), 柏倉祐司(KASHI-WAKURA, Yuji), 落合和彦(OCHIAI, Kazuhiko).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所(HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-

MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

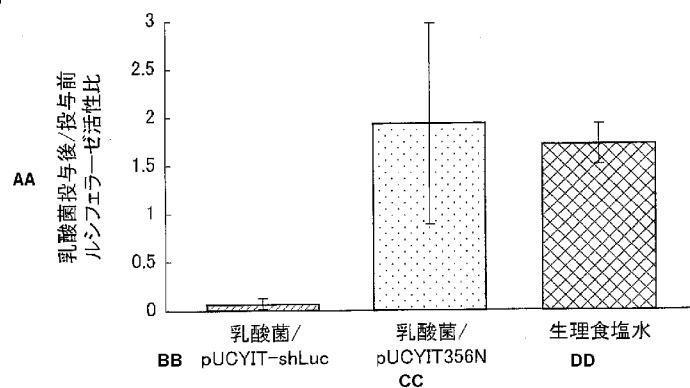
— 国際調査報告(条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: KIT FOR PRODUCING DOUBLE-STRANDED RNA WITH LACTIC ACID BACTERIUM, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット及びその利用

[図7]



AA RATIO OF LUCIFERASE ACTIVITY AFTER ADMINISTRATION OF LACTIC ACID BACTERIUM TO THAT BEFORE ADMINISTRATION OF LACTIC ACID BACTERIUM
BB LACTIC ACID BACTERIUM/pUCYT-shLuc
CC LACTIC ACID BACTERIUM/pUCYT356N
DD PHYSIOLOGICAL SALINE

(57) Abstract: Disclosed is a kit for producing double-stranded RNA with a lactic acid bacterium. The kit comprises a vector carrying a promoter that can act in a mammal. The kit can induce RNAi in an enterobacterium in a human or animal body conveniently and stably.

(57) 要約: 本発明の乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキットは、哺乳動物内で機能するプロモーターを含むベクターを備えている。これにより、人間や動物の腸内細胞内で、簡便に且つ安定してRNAiを起こす。



WO 2010/050109 A1



-
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット及びその利用に関するものである。さらに詳しくは、二本鎖RNAをコードするDNAを発現可能とした乳酸菌によって二本鎖RNAを生成するための、乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット及びそれを利用した技術に関するものである。

背景技術

[0002] RNAiとは、RNA interference (RNA干渉)によって特定の遺伝子の発現を抑制する技術である。例えば、二本鎖RNAを細胞、組織、器官、個体等に導入することによりRNAiを引き起こすことができる。標的遺伝子のmRNAに二本鎖RNAがハイブリダイズすると当該mRNAの分解が促進される。これにより、標的遺伝子の発現が抑制されるのである。

[0003] 従来、遺伝子発現抑制法としては、アンチセンス法及びリボザイム法等が知られていたが、これらの方法と比べて、RNAiは遺伝子発現を抑制する効果が長時間持続することが判明してきた。

[0004] そのため、近年、RNAiは分子生物学・細胞生物学研究において急速に広まりつつある。さらに、人間及び動物にも適用できることが明らかになったことから、分子生物学における哺乳動物研究の新技术として脚光を浴びており、医薬品及び食品への応用が期待されている。

[0005] RNAiの医薬品及び食品への応用として、(1)がん、高脂血症、糖尿病等の、特定の遺伝子の過剰な活性発現を原因とする疾患の治療に利用すること(例えば、特許文献1参照)、(2)人間及び動物の体内に寄生している線虫、回虫等の寄生虫を、その生存に必要な遺伝子の発現を抑制することにより駆除すること等が提案されている。例えば、dsRNAをコードする

遺伝子の発現ベクターを導入した大腸菌を、土壤生息性の線虫である *Caenorhabditis elegans* に食べさせて、当該線虫の有する特定遺伝子の発現を抑制する方法も提案されている（非特許文献 1 参照）。

- [0006] また、RNAi を行なうための方法として、合成高分子又はウイルスを二本鎖 RNA 発現ベクターのキャリアとして細胞等に導入する方法、動物の受精卵に二本鎖 RNA 発現遺伝子を導入する方法等が報告されている。特許文献 2 には、キャリアとして細菌ミニ細胞を用いる方法が提案されている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献 1：日本国公開特許公報「特開 2006-246787 号公報（2006 年 9 月 21 日公開）」
特許文献 2：日本国公開特許公報「特表 2005-505296 号公報（2005 年 2 月 24 日公表）」

非特許文献

- [0008] 非特許文献 1：Lisa Timmons and Andrew Fire, Specific interference by ingested dsRNA, NATURE, 1998, vol. 395, 29 OCTOBER, p. 854

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] しかしながら、従来の方法では、人間及び動物の腸内で、簡便に且つ安定して RNAi を起こすことが困難であるという問題を生じる。
- [0010] 例えば、非特許文献 1 に開示の、二本鎖 RNA をコードする遺伝子を発現可能な大腸菌を用いる場合、人間及び動物の腸内で RNAi を起こさせるために当該大腸菌を経口投与すると、当該大腸菌は腸内に到達することなく胃酸等により死滅してしまう確率が高い。また、大腸菌を経口投与することは安全性の面でも問題があり、特に、大量投与は困難であるため、腸内で効率よく RNAi を起こすことが困難である。一方、経口投与以外の方法により腸内に当該大腸菌を導入することは簡便ではない。よって、腸内で RNAi

の効果を簡便且つ安定に得ることはできない。

[0011] また、特許文献 1 及び 2 に開示の、ウイルス、合成高分子又は細菌ミニ細胞をキャリアとする方法でも、胃酸等の影響により、当該キャリアを腸内に到達させることが困難であるため、腸内で安定して RNA i を起こすことはできない。

[0012] なお、ウイルス又は合成高分子をキャリアとして用いる方法では、キャリア自体の安全性も問題となるため、そもそも人間及び動物に投与することは好ましくない。また、細菌ミニ細胞は細菌細胞から核を除去したものであり、細菌細胞とは全く異なる物質である。そのため、細菌ミニ細胞をキャリアとして用いる方法では、当該キャリア自体は増幅せず、RNA i による効果を長時間安定して得ることができない。

[0013] そもそも、非特許文献 1、特許文献 1 及び 2 のような従来の RNA i に関する報告からは、人間及び動物の腸内で RNA i を起こすという課題すら想到し得ない。例えば、非特許文献 1 で適用した線虫は土壌生息性であり、土壌は人間及び動物の腸内とは全く環境が異なる。そのため、非特許文献 1 から、腸内で RNA i を起こすという課題に想到することすら困難である。

[0014] 本発明は、上記の問題点に鑑みて、上述のように全く新たな課題を解決するためになされたものであり、その目的は、人間及び動物の腸内で簡便に且つ安定して RNA i を起こすために、人間及び動物の腸内の細胞内において二本鎖 RNA（特に、siRNA 又は shRNA と呼ばれる、哺乳動物細胞に対して RNA i 効果を発揮する短い二本鎖 RNA）を生成させるキット及びこれらを利用した技術を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0015] 上記課題を解決するために、本発明に係る乳酸菌により二本鎖 RNA を生成するキットは、哺乳動物内で機能するプロモーターを含むベクターを備えていることを特徴としている。

[0016] 本発明に係るキットでは、上記哺乳動物内で機能するプロモーターは、P_o I I I I によって転写されるプロモーターであることがより好ましい。

- [0017] 本発明に係るキットでは、上記 P o l I I I I によって転写されるプロモーターが、U 6 プロモーターであることがより好ましい。
- [0018] また、本発明に係る乳酸菌は、哺乳動物内で機能するプロモーターに二本鎖 RNA をコードする DNA が作動可能に連結されたベクターを、含有していることを特徴としている。
- [0019] 本発明に係る乳酸菌では、上記哺乳動物内で機能するプロモーターは、P o l I I I I によって転写されるプロモーターであることがより好ましい。
- [0020] また、本発明に係る腸内疾患用治療組成物は、上記の本発明に係る乳酸菌を含んでいることを特徴としている。

発明の効果

- [0021] 本発明に係る乳酸菌により二本鎖 RNA を生成するキットは、P o l I I I I によって転写されるプロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターを含むベクターを備えているので、人間及び動物の腸内における当該人間及び動物の細胞内において安定して且つ簡便に RNA i の効果を得ることができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

- [0022] [図1] p U C Y I T - s h L u c を導入して得たコロニーをコロニー PCR に供した結果を示す図である。
- [図2] リアルタイム PCR 法により乳酸菌内の p U C Y I T - s h L u c を定量した結果を示す図である。
- [図3] CHO 細胞内における p U C Y I T - s h L u c による RNA i の効果を確認した結果を示す図である。
- [図4] 実施例 4 において、2 1 1 H - L u c をマウスに投与した様子を示す図である。
- [図5] 実施例 4 において、実施例 1 にて得た乳酸菌をマウスに局所注射する様子を示す図である。
- [図6] 実施例 4 において、サンプルの投与の前後におけるマウスの様子を、I V I S 2 0 0 を用いて観察した結果を示す図である。

[図7]実施例4において、サンプルの投与の前後におけるF L u c 活性比を算出した結果を示す図である。

[図8]実施例5において胃ゾンテ法を用いて乳酸菌を経口投与している様子を示す図である。

[図9]実施例5において乳酸菌をマウスに経口投与してルシフェラーゼ活性を観察した結果を示す図であり、図9の(a)はp U C Y I T - L u c L a c t o b a c i l l i を投与した結果を示し、図9の(b)は比較のために作製したp U C Y I T - L u c ベクター溶液を投与した結果を示し、図9の(c)は参考として示すマウスの解剖図である。

発明を実施するための形態

[0023] < 1. 本発明に係る乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット >

本発明に係る乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット（以下、単に「キット」と表記する）は、P o l I I I I によって転写されるプロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターを含むベクターを備えていればよい。

[0024] 本発明に係るキットを用いれば、二本鎖RNA（以下、「d s RNA」と表記する。）を、乳酸菌を利用して人及び動物の腸内の細胞内にて生成させることができる。換言すれば、本発明に係るキットを用いれば、人及び動物細胞内でd s RNAを生成するための発現ベクターを乳酸菌に保持させて、人及び動物の腸内まで運搬することができる。

[0025] 乳酸菌は、人間及び動物に経口投与しても、生きたまま腸内に辿り着くことができる。そして、当該人間及び動物の細胞内にてd s RNAを発現してRNA i を起こすことができる。よって、本発明に係るキットを用いれば、d s RNAを生成することができる乳酸菌を作製して、これを経口投与するだけで、人間及び動物の腸内で安定してd s RNAを生成することができる。これにより、例えば、d s RNAとして、腸内疾患の原因タンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制するd s RNA（s i RNA又はs h RNAと呼ばれる、哺乳動物細胞に対してRNA i 効果を発揮する短鎖d s RNA）を用いれば腸内疾患の治療を行なうことも可能となる。

[0026] 従来、dsRNAをコードするDNAを発現することが可能な乳酸菌に関する報告は無かった。これは、大腸菌等と比べ、乳酸菌を宿主細胞として用いた遺伝子操作および形質転換技術に関する知見が極めて少ないことが理由の一つとして挙げられる。

[0027] なお、本明細書において用語「dsRNA」は、上述の通り二本鎖RNAを意図する。「dsRNA」は、長鎖の2本鎖RNAを指して用いられる場合もあるが、本明細書ではsiRNA及びshRNA等の短鎖の2本鎖RNAをも含めて「dsRNA」と表記する。また、本明細書において「乳酸菌により二本鎖RNAを生成する」とは、乳酸菌によってdsRNAを生成することを意味し、具体的には、乳酸菌の細胞内のベクターが当該乳酸菌とは別の細胞に移って、当該別の細胞内において当該ベクターが発現してdsRNAを生成する等の形態も包含される。

[0028] [1-1. ベクターの構成]

本発明に係るキットが備えるベクターは、哺乳動物内で機能するプロモーターを含むものであればよい。哺乳動物内で機能するプロモーターとしては、PoliIIIによって転写されるプロモーター、SVプロモーター等が挙げられるが、PoliIIIによって転写されるプロモーターがより好ましい。以下、説明の簡単のため「PoliIIIによって転写されるプロモーター」を「PoliIII系プロモーター」という。当該ベクターに含まれるPoliIII系プロモーターとしては、例えば、U6プロモーター、H1プロモーター等が挙げられる。中でもU6プロモーターが好ましい。U6プロモーターを用いれば、高い効率で、かつ人間及び動物の細胞内にて、dsRNAをコードするDNAを発現させることができ、さらに、U6プロモーターを用いれば、短鎖のdsRNAをコードするDNAを好適に発現させることができる。

[0029] なお、PoliIII系プロモーター、SVプロモーターは、哺乳動物内で働くプロモーターであり、且つ、乳酸菌内では働かないことが分かっているプロモーターである。しかし、本発明者らは鋭意検討した結果、このような

プロモーターを含むベクターを用いることにより、乳酸菌を用いて生体内で *dsRNA* を好適に発現させることに想到したのである。つまり、このようなプロモーターを含むベクターを乳酸菌に導入して哺乳動物に投与すると、哺乳動物の体内で乳酸菌の細胞内から細胞外へベクターの放出が起こり、その後当該ベクター中のプロモーター等が機能して *dsRNA* を好適に発現する。乳酸菌を用いるにもかかわらず、乳酸菌内では働かないプロモーターを用いるという発想は、当業者では容易に想到しないものであり、本発明者らは独自の着眼によって本発明に想到したのである。

[0030] 本発明に係るキットが備えるベクターの種類は特に限定させるものではなく、当該ベクター中に導入された *P o l I I I I* 系プロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターが作動可能であればよい。例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いる方法が挙げられるが特に限定されない。

[0031] 本発明に係るキットが備えるベクターは、*P o l I I I I* 系プロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターの下流に *dsRNA* をコードする *DNA* を導入するための領域を設けていてもよく、キットの用途等に応じて予め *dsRNA* を導入していてもよい。

[0032] *P o l I I I I* 系プロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターの下流に *dsRNA* をコードする *DNA* を導入するための領域を設けておく場合、従来公知の制限酵素部位等を設けることにより、当該領域を形成すればよい。予め *dsRNA* をコードする *DNA* を導入しておく場合、当該 *dsRNA* としては、後述の、腸内の疾患の原因となるタンパク質をコードする *DNA* の発現を阻害する *dsRNA* 等を例示できるが、これに限定されるものではない。

[0033] 本発明に係るキットが備えるベクターは、*dsRNA* をコードする *DNA* の下流、又は当該 *DNA* を導入するための領域の下流にターミネーターを含んでもよい。ターミネーターとしては、特に限定されるものではなく、プロモーターの種類等に応じて適宜選択すればよい。例えば *P o l I I I I* 系プロ

モーターとしてU6プロモーターを採用した場合、U6ターミネーターを採用することが好ましいが、これに限定されるものではない。

[0034] 本発明に係るキットに含まれる、RNAポリメラーゼをコードするDNAの形態は、特に限定されるものではなく、種々の形態で含むことができる。例えば、P_o I I I I系プロモーターを含むベクターに、さらにRNAポリメラーゼをコードするDNAが導入されていてもよいし、RNAポリメラーゼをコードするDNAを含むベクターが別途備えられていてもよい。

[0035] このような本発明に係るキットが備えるベクターは、従来公知の制限酵素及び／又はリガーゼ等を用いる慣用的な手法によって作製することができる。

[0036] 本発明に係るキットの構成は、哺乳動物内で機能するプロモーターを含むベクターを備える限り、特に限定されるものではなく、他の試薬及び器具を含んでもよい。例えば、ベクターを安定的に保持するための試薬、バッファー等を含んでもよいし、当該ベクターにdsRNAを導入するための制限酵素、リガーゼ等の試薬を含んでもよい。また、当該ベクターの宿主細胞である乳酸菌を含んでもよいし、当該ベクターを乳酸菌に導入するためのリン酸カルシウム、リポソーム等の試薬を含んでもよい。また、本発明に係るキットは、複数の異なる試薬を、適切な容量及び／又は形態で混合していてもよいし、それぞれ別の容器により提供してもよい。

[0037] また、本発明に係るキットには、ベクターにdsRNAを導入するための手順及び／又はdsRNAを導入した後のベクターを乳酸菌に導入するための手順等を記載した指示書を含んでもよい。紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能なディスク又はCD-ROM等のような電子媒体に付されてもよい。

[0038] [1-2. 本発明に係るキットの使用方法]

本発明に係るキットは、当該キットに備えられるベクターに、適宜選択したdsRNAを導入して用いればよい。つまり、本発明に係るキットが備え

るベクターには、使用者の目的に応じて様々な dsRNA をコードする DNA を挿入することができる。なお、予めベクターに dsRNA が挿入されている場合は、そのまま乳酸菌に導入すればよい。

[0039] 本発明に係るキットが備えるベクターに dsRNA を挿入する場合、dsRNA の種類としては、特に限定されるものでない。

[0040] また、哺乳動物等の細胞におけるタンパク質遺伝子の発現を抑制するためには、当該タンパク質をコードする DNA に由来する mRNA にハイブリダイズするように設計した dsRNA を発現するようにすればよい。腸内疾患の原因タンパク質を標的として、当該原因タンパク質の遺伝子の発現を阻害することで、腸内疾患の治療が可能となる。

[0041] なお、哺乳動物等の細胞におけるタンパク質遺伝子の発現を抑制するためには、dsRNA における RNA の二本鎖領域の長さを 20～30 bp とした短鎖 dsRNA が採用されることが多い。このように dsRNA における二本鎖領域のサイズは用途によって異なるが、本発明に係るキットによれば、上述のように、短鎖 dsRNA を好適に、乳酸菌に生成させることができる。

[0042] 本発明に係るキットが備えるベクターに、dsRNA をコードする DNA を挿入する方法は限定されるものではなく、従来公知の制限酵素及び／又はリガーゼ等を用いる慣用的な手法に従って方法により行なえばよい。

[0043] dsRNA をコードする DNA が導入されたベクター（以下、「dsRNA 発現ベクター」と表記する。）は、乳酸菌内に導入すればよい。dsRNA 発現ベクターの宿主細胞として用いる乳酸菌の種類は特に限定されるものではなく、*Lactobacillus casei*、*L. rhamnosus*、*L. plantarum*、*L. delbrueckii*、*L. acidophilus*、*Lactococcus lactis* 等の従来公知の乳酸菌を例示できる。中でも、*L. casei* は、胃酸に対する抵抗力が強く、生きたまま腸内に届く確率が高いため、好ましい。

[0044] dsRNA 発現ベクターを、乳酸菌に導入する方法、即ち形質転換法は、

特に限定されるものではなく、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の従来公知の方法を好適に用いることができる。

[0045] 人間及び動物等の被験体の腸内細胞内において、本発明に係る乳酸菌に dsRNA を生成させるためには、dsRNA 発現ベクターが導入された本発明に係る乳酸菌を、当該被験体に経口投与すればよい。乳酸菌は胃酸に対して強い抵抗性を有しているので、生きたまま腸内に到達する。腸内に到達した乳酸菌は、例えば、腸内で疾患を生じている細胞に取り込まれ、当該細胞内で RNAi を起こして、当該疾患の原因となるタンパク質遺伝子の発現を阻害することで腸内疾患を治療することができる。

[0046] なお、本発明に係るキットにより作製した乳酸菌の利用方法は、被験体への経口投与に限定されるものではない。また、乳酸菌は様々な生物に対して安全に腸内送達しうるので、様々な生物における RNAi の研究に用いることができる。

[0047] 以上の説明にも示されているように、P_oIIIII によって転写されるプロモーターを含むベクターによって乳酸菌を形質転換し、人間及び動物の腸内にて RNAi を起こす方法も本発明の範疇である。

[0048] < 2. 本発明に係る乳酸菌 >

本発明に係る乳酸菌は、哺乳動物内で機能するプロモーターに dsRNA をコードする DNA が作動可能に連結されたベクターを、含有していればよい。哺乳動物内で機能するプロモーターとしては、P_oIIIII 系プロモーター、SV プロモーター等が挙げられるが、P_oIIIII 系プロモーターがより好ましい。換言すれば、本発明に係る乳酸菌は、dsRNA をコードする DNA が P_oIIIII 系プロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターによって発現可能なように、当該 DNA と当該プロモーターとが連結されたベクターを含有していればよい。

[0049] dsRNA をコードする DNA が P_oIIIII 系プロモーター等の哺乳動物内で機能するプロモーターに作動可能に連結されているので、本発明に係

る乳酸菌は、dsRNAをコードするDNAを発現することができる。また、宿主細胞は乳酸菌であるので、胃酸に対して優れた耐性を有している。そのため、本発明に係る乳酸菌を人間及び動物に経口投与しても、胃を通過して、生きたまま腸内に到達する。そして、腸内細胞内においてdsRNAを発現する。よって、本発明に係る乳酸菌によれば、人間及び動物の腸内に簡便に導入することが可能で、且つ腸内細胞内にて安定してRNAi効果を得ることができる。

[0050] 本発明に係る乳酸菌が備えるベクター及び宿主細胞としての乳酸菌に関する説明は、上述の本発明に係るキットの説明に準ずる。

[0051] 本発明に係る乳酸菌は、従来公知の方法により作製することができる。例えば、まず、P_o I I I I系プロモーター及びdsRNAをコードするDNAを、当該DNAが当該プロモーターによって作動可能に連結されるように、制限酵素及び／又はリガーゼを用いてベクターに導入することでdsRNA発現ベクターを構築する。そして、当該dsRNA発現ベクターを電気穿孔法等によって乳酸菌に導入しても、本発明に係る乳酸菌を作製できる。

[0052] < 3. 本発明に係る乳酸菌の利用 >

本発明は、腸内における癌等の疾患を治療するための腸内疾患用治療組成物を提供する。

[0053] 本発明に係る腸内疾患用治療組成物は、上記の本発明に係る乳酸菌を含んでいればよい。

[0054] 本明細書において「腸内疾患用治療組成物」は、本発明に係る乳酸菌を含む治療組成物であって、人間及び動物の腸内疾患を治療の対象として用いる治療組成物を意図する。

[0055] 本発明に係る腸内寄生虫駆除用組成物に含まれる乳酸菌としては、上述の本発明に係る乳酸菌であればよい。例えば、本発明に係る乳酸菌であって、腸内の疾患の原因となるタンパク質遺伝子の発現を阻害するdsRNAを生成するように作製した乳酸菌を含めばよい。

[0056] 腸内の疾患の原因となるタンパク質遺伝子の発現を阻害するdsRNAと

しては、対象の疾患に応じて適宜設定したものを用いればよい。例えば疾患として大腸癌を対象とする場合、K-Ras変異体タンパク質のmRNAにハイブリダイズするように設計したものを用いればよい。K-Ras変異体タンパク質は、例えば、ヒト大腸癌細胞SW480で高発現しているタンパク質であり、通常のヒト細胞が発現するK-Rasタンパク質の変異体である。具体的には、12番目のコドンがGGT（グリシン）からGTT（バリリン）に変異している。K-Ras変異体mRNAの配列は、当業者であれば容易に得ることができる。例えば、K-Ras変異体mRNA配列の一例として、GenBankのaccession No. M54968が挙げられる。また、Matilde E. Leonart, Santiago Ramon y Cajal, John D. Groopman and Marlin D. Friesen, Sensitive and specific detection of K-ras mutations in colon tumors by short oligonucleotide mass analysis, Nucleic Acids Research, 2004, vol. 32, no. 5 e53にもK-Ras遺伝子の変異について開示されている。

[0057] また、本発明に係る治療用組成物が治療の対象とする腸内疾患はこれに限定されるものではなく、例えば、ウイルスの関与する腸内疾患が挙げられる。つまり、当該ウイルスの遺伝子発現を抑制することで、当該腸内疾患を治療することができる。dsRNAにおける二本鎖領域の長さは、当該dsRNAがRNAiを起こしうる限り限定されるものではないが、例えば、一般に哺乳動物細胞の中でRNAiを起こすために、20～30bp程度の長さの短鎖dsRNAがよく用いられる。

[0058] また、本発明において、乳酸菌を生体内に導入することにより遺伝子の発現を調節することによって、哺乳動物において癌または細胞増殖障害を治療または予防することができる。治療または予防の対象となる増殖細胞は、例えば、上述のように大腸癌であってもよいし、結腸癌細胞または膵臓癌細胞であってもよい。大腸癌の場合、RNAiの標的は変異K-Ras遺伝子、EGFR遺伝子及び β -カテニン遺伝子等である。1つの態様において、該結腸癌細胞はSW480細胞である。また、別の1つの態様において、該膵

臓癌細胞はC A P A N - 1 細胞である。また、様々な炎症性腸疾患の治療及び予防も本発明によって可能である。この場合、R N A i の標的は例えばT N F - α 遺伝子である。

[0059] 本発明に係る腸内疾患用治療組成物に含まれる乳酸菌の形態は、腸内でd s R N A を生成可能である限り限定されるものではない。例えば、本発明に係る腸内疾患用治療組成物は、本発明に係る乳酸菌を含有する培養液、当該培養液から菌体を回収して粗精製物又は精製物を含んでもよく、本発明に係る乳酸菌を凍結乾燥等により休眠状態としたものを含んでもよい。

[0060] 本発明に係る腸内疾患用治療組成物は、本発明に係る乳酸菌以外の組成を含んでもよい。本発明に係る乳酸菌以外の組成としては、人間、動物等の投与対象に対して害が少なく且つ当該乳酸菌の機能を損なわないものであれば限定されない。

[0061] 例えば、本発明に係る腸内疾患用治療組成物は、水、生理食塩水、湿潤剤又は乳化剤、p H 緩衝化物質、安定化剤、抗酸化剤等のような補助物質を含み得る。

[0062] また、本発明に係る乳酸菌を経口投与しても、腸内まで生きたまま到達して、腸内細胞内にてd s R N A を発現し、病気となっている細胞を駆除できるので、本発明に係る腸内疾患用治療組成物は経口投与用に調製されることが好ましい。

[0063] そして、本発明に係る腸内疾患用治療組成物を、経口投与用に調製する場合、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチを含み得る。また、さらに結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤滑剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合してもよい。

[0064] 上述のように、本発明に係る腸内疾患用治療組成物は経口投与用に調製されることが好ましいので、その形態としては錠剤、カプセル等の形態が好ましいがこれに限定されるものではない。

[0065] 本発明に係る腸内疾患用治療組成物の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的および当該医薬の投与対象である患者の年齢、体重、症状によっ

て適宜設定され一定ではない。投与は、所望の投与量範囲内において、1日
内において単回で、または数回に分けて行ってもよい。また、本発明に係る
腸内疾患用治療組成物はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加し
て日常的に摂取させることもできる。

[0066] 以上の説明にも示されているように、本発明に係る乳酸菌を投与すること
により腸内疾患を処置する方法も本発明の範疇である。

[0067] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する
。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部につい
ては様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述
した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更
が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる
実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記
載された特許文献及び非特許文献の全てが、本明細書中において参考として
援用される。

実施例

[0068] <実施例1：実験材料の調製>

〔プラスミド〕

本実施例では、乳酸菌に導入するプラスミドとしてpUCYIT-shLuc
を用いた。

[0069] erythromycin耐性遺伝子及び乳酸菌内での複製に必要なrepB
遺伝子が導入されたベクターpUCYIT356N (Genbank
accession No. AB119527) (ヤクルト株式会社中央研
究所より供与された) (配列番号1に示す。なお、GenBankにACCESSION
No. AB119527として登録されている。)のEcoRI-SalIサイトに、U6プロモーター、shRNAをコードするDNA
を導入した。当該shRNAは、ホタルルシフェラーゼ (Genbank
ACCESSION No. AB076905.1) のmRNAを標的
とし、ホタルルシフェラーゼコード領域の1188-1206位に相補的な

配列を有するものである。

[0070] 作製した pUCYIT-shLuc の配列を配列番号 2 に示す。このベクターは乳酸菌の中で安定に保たれるが、その中では shRNA 遺伝子の転写は起こらず、このベクターが哺乳動物細胞内に移ったときに U6 プロモーターによって shRNA 遺伝子の転写が起こる。

[0071] U6 プロモーター、shRNA をコードする DNA の、それぞれの塩基配列は、配列番号 2 に示す塩基配列のうち、1339 位～1596 位、1603 位～1654 位である。なお、1333 位～1338 位は EcoRI サイトであり、1658 位～1663 位は SalI サイトである。なお、pUCYIT-shLuc の発現によって、得られる shRNA の塩基配列を配列番号 3 に示す。

[0072] [乳酸菌]

乳酸菌として、Lactobacillus casei を用いた (American Type Culture Collection より購入した (ATCC27139))。

[0073] [エレクトロポレーションによるプラスミドの導入]

本実施例では、L. casei に対するベクターの導入を、エレクトロポレーション法により行なった。

[0074] まず、MRS 液体培地 2 ml に、L. casei のグリセロールストック 20 μ l を加えて、終夜 37℃ で静置培養した。次に、MRS 液体培地から 100 μ l 採取して、10 ml の新鮮な MRS 液体培地に添加して培養した。次に、L. casei の対数増殖期に、MRS 液体培地から 4 ml 採取して、2000 g $\times$ 5 min で遠心して上清を取り除いた。得られた沈殿物に、10% グリセロール溶液 40 μ l を加えて懸濁させた。このグリセロール溶液に、導入するベクター (500 ng/ μ l) を 1 μ l 加えて、ピペッティングすることで攪拌した。

[0075] 次に、キュベット (BIORAD 社製 0.2 cm) に溶液を移し氷上で 5 分間静置した後、Gene Pulser (BioRad 社製) を用いて、1

5 kV、200 Ω 、25 μ Fでエレクトロポレーションした。その後、すぐに、0.9 mlのMRS培地（+Em 20 μ g/ml）を加えて37°Cで2時間培養した。次に、培養後のMRS培地をMRSプレート（+Em 20 μ g/ml）上に播いて、MRSプレートが乾かないようにタッパーの中に入れて37°C静置培養した。2～3日培養すると、コロニーが生えた。このようにして、ベクターの導入された*L. casei*を得た。

[0076] なお、ベクターの導入の確認はコロニーPCRにより行なった。まず、8連チューブに2×TET（20mM Tris-HCl, pH8.0, 2mM EDTA, 1% Triton X-100）を10 μ l入れた後、爪楊枝を用いてコロニーを軽くつつくことで菌体を採取して、上記2×TETに懸濁させた。次に、95度で5分間インキュベートした後、卓上遠心機で5分間遠心して、上清1 μ lを回収した。これをコロニーPCRの鋳型として用いた。

[0077] 次に、当該上清1 μ l（鋳型）に、Vent DNA polymerase 0.1 μ l（New England Biolabs社製）、10×Vent Buffer 1 μ l（Vent DNA polymeraseに付属）、2mM dNTPs 1 μ l、正鎖プライマー（GCAAGGCGATTAAAGTTGGG；配列番号4） 0.2 μ l、逆鎖プライマー（AGGTCCACCAAATAGTCG；配列番号5） 0.2 μ l、超純水6.5 μ lを混合して、全量を10 μ lとした。また、上記超純水とは、Milli-Qシステム（ミリポア社製）を用いて精製した超純水である。

[0078] 温度条件としては、95°Cで3分間インキュベートした後、95°Cで30秒間、54°Cで30秒間、72°Cで30秒間を30サイクル行なった。コロニーPCRを行なった後、反応後の溶液5 μ lを3%アガロースゲルによる電気泳動に供して、エチジウムブロマイド染色を行なうことによって、コロニーPCRの結果を確認した。

[0079] コロニーPCRの結果の例として、pUCYIT-shLucを導入した

場合のコロニーPCRの結果を図1に示す。図1はpUCYIT-shLucを導入して得たコロニーをコロニーPCRに供した結果を示す図であり、レーン1はベクターを導入したコロニーの結果を示す。また、レーン2は、2本鎖DNAのサイズマーカー（New England Biolabs社 2-Log DNA Ladder）を示す。レーン3は、pUCYIT356Nを導入した*L. casei*のコロニーPCR結果、レーン4は鋳型を用いずに同条件でPCRした結果を示す。当該コロニーPCRでは、420bpのPCR断片が得られればプラスミドが導入されたコロニーであることを示す。図1に示すように、レーン1に供したコロニーから420bpのPCR断片が確認できた（レーン3、4では確認できない）。よって、*L. casei*にpUCYIT-shLucが導入されたことが確認できた。

[0080] <実施例2：リアルタイムPCRによる乳酸菌内のpUCYIT-shLucの定量>

本実施例では、実施例1で作製したpUCYIT-shLucを用いて形質転換した*L. casei*の中に存在するプラスミドの量を、リアルタイムPCR装置を用いて測定した。

[0081] まず、pUCYIT-shLucを用いて形質転換した*L. casei*をMRS培地（+Em 20 μ g/ml）中で静置培養した。培養した細胞を計数して細胞数 2×10^7 cell/ μ Lの懸濁液を作り、これを1 μ L（すなわち 2×10^7 cell/ μ L）とて上記2 $\times$ TETを加え、全量を20 μ Lにした。次に、95度で5分間インキュベートした後、卓上遠心機で5分間遠心して、上清を回収した。これをPCRの鋳型として用いた。

[0082] 次に、当該上清を10倍希釈した溶液1 μ L（鋳型； 1×10^5 cell/分に含まれるDNA）に、Fast SYBR green Mix（2 $\times$ ）5 μ L（Applied Biosystems社製）、2 μ M 5U6-2プライマー（CCGAGCTCGAATTCAAGGTCGGGCAGG；配列番号6）1 μ L、2 μ M 3U6プライマー（GGTGTTTTCG

T C C T T T C C A C ; 配列番号 7) $1 \mu\text{l}$ 、超純水 $2 \mu\text{l}$ を混合して、全量を $10 \mu\text{l}$ の PCR 反応液とした。検量線用に、上記細胞抽出液 $1 \mu\text{l}$ の代わりに、 30 pg 、 300 pg 、 3 ng 、 30 ng の pUCYIT-shLuc をそれぞれ含む $1 \mu\text{l}$ 溶液を用いて、上記 PCR 反応液と同様に PCR 反応液を調製した。これらの PCR 反応液に対して、リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 社製 StepOne) を用いて目的プラスミドを定量した。PCR 条件は、 95°C を 5 秒間、次に (95°C で 18 秒間、 60°C で 30 秒間) を 40 サイクル、 60°C で 1 分間、 95°C 15 秒間とした。なお、各測定点について 3 セットずつサンプルを用意して、測定した。このリアルタイム PCR により目的プラスミドが検出された場合、増幅される DNA の長さは 278 bp となる。結果を図 2 に示す。図 2 はリアルタイム PCR 法により乳酸菌内の pUCYIT-shLuc を定量した結果を示す図であり、縦軸 CT (threshold cycle) は、PCR 増幅曲線が threshold line (指数関数的増幅期に設定した閾値) と交差したサイクル数を示し、横軸はリアルタイム PCR に供した pUCYIT-shLuc の量を示す。

[0083] 図 2 に示されるように、リアルタイム PCR による計測によって、細胞 1.0×10^5 個中に 1.2 ng のプラスミドが含まれていることが示された。

[0084] <実施例 3 : shRNA 発現ベクターによる RNAi の確認>

本実施例では、実施例 1 で構築した pUCYIT-shLuc による RNAi を確認した。

[0085] pUCYIT-shLuc 70 ng 、ホタルルシフェラーゼ (FLuc) 発現ベクター (Promega 社製 pGL3-control) 70 ng 及びウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc) 発現ベクター (Promega 社製 pRL-SV40) 70 ng を、CHO 細胞に導入した。pGL3-control、及びそれにコードされている FLuc 配列をそれぞれ配列番号 8 及び 9 に示す。なお、配列番号 8 は GenBank に ACCESSION No. U47296 として登録されている。配列番号 9 に示される

アミノ酸配列からなるペプチドは、配列番号8に示すpGL3-Contro
lの280～1932位にコードされている。なお、配列番号9はGen
BankにACCESSION No. AAA89084として登録され
ている。pRL-SV40、及びそれにコードされているRLuc配列を配
列番号10及び11に示す。なお、配列番号10はGenBankにACC
ESSION No. AF025845として登録されている。配列番号
11に示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、配列番号10に示すpR
L-SV40の694～1629位にコードされている。なお、配列番号1
1はGenBankにACCESSION No. AAB82577として
登録されている。また、当該CHO細胞はInvitrogen社より得た
(製品名: Flip-In-CHO細胞)。また、RNAの細胞内導入につい
ては、Effectene (登録商標) transfection re
gent (QIAGEN社製) を用いて、これに添付の取扱説明書に従って
行なった。

[0086] プラスミドベクターを導入したCHO細胞を室温で24時間、培養した後
、翌日Dual-Luciferase Reporter Assay
System (Promega社製) によってルシフェラーゼ活性を測定し
た。ネガティブコントロールとして、(1) FLuc発現ベクター及びRL
uc発現ベクターのみを導入したCHO細胞、(2) FLuc発現ベクター
及びRLuc発現ベクターに加えpUCYIT356Nを導入したCHO細
胞を用いた。ネガティブコントロールでは、pUCYIT-shLucを用
いなかった以外は本実施例に記載の方法と同じ方法を行なった。結果を図3
に示す。図3はCHO細胞内におけるpUCYIT-shLucによるRNA
iの効果を確認した結果を示す図である。

[0087] 図3に示されるように、ネガティブコントロールと比べて、pUCYIT
-shLucを導入したCHO細胞では、特異的にFLucの発現抑制が起
こっていることが確認された。すなわち、pUCYIT-shLucが哺乳
動物細胞内でRNAi効果を持つことが確認された。

[0088] <実施例4：shRNA発現ベクターを保持する乳酸菌による、マウス皮下の悪性腫瘍細胞におけるRNAiの確認>

腸内におけるRNAi効果を検証する指標として、ヒト腫瘍細胞に対して*in vivo*でRNAi効果を確認することを目的として、次のモデル実験を行った。

[0089] ノードマウス（雄、6週齢）20匹に対し、ヒト悪性中皮腫株化細胞FLuc発現株（211H-Luc）を 10^7 cellsずつ右側足根部皮下に投与した。その様子を図4に示す。図4は本実施例において、211H-Lucをマウスに投与した様子を示す図である。なお、摂取させる際、211H-Lucが生着しやすいように細胞はマトリゲル（BD biosciences社製、BD Matrigel Basement Membrane Matrix）100 μ Lに懸濁させて投与した。211H-Luc細胞の腫瘍が十分な大きさに成長するまで約3週間飼育した。その後、RNAi効果を送達するための乳酸菌（実施例1にて得た、pUCYIT-shLucにより形質転換されたもの）を腫瘍が生着した部位に局所注射した。その様子を図5に示す。図5は、実施例1にて得た乳酸菌をマウスに局所注射する様子を示す図である。局所注射の2日後にFLuc活性を測定した。FLuc活性測定については、イソフルランを用いて麻酔をかけた後、マウスの腹腔にルシフェリン（30mg/ml in PBSバッファー）（Promega, Beetle Luciferin）を50 μ L投与し、5～10分後に、IVIS 200 Imaging System（Xenogen社）を用いて行なった（0.02秒で計測）。ネガティブコントロール実験として、空ベクター（pUCYIT356N）で形質転換した乳酸菌の局所注射、及び、乳酸菌を投与せずに生理食塩水を局所注射した場合についてもFLuc活性を測定した。なお、pUCYIT-shLucにより形質転換された乳酸菌、上記空ベクターにより形質転換された乳酸菌、共に、それぞれ 2×10^8 cells/200 μ lの濃度で生理食塩水に懸濁させたものを200 μ l投与した。

- [0090] 結果を図6及び7に示す。図6はサンプルの投与の前後におけるマウスの様子を、I V I S 2 0 0を用いて観察した結果を示す図であり、図7はサンプルの投与の前後におけるF L u c活性比を算出した結果を示す図である。なお、図7の縦軸は、次のようにして算出した値である。即ち、マウスのF L u cイメージにおいて、腫瘍部位付近を円で囲み、その部分のF L u c活性を計測する。次に、サンプル投与前後及びネガティブコントロール実験においても全て同様に同じサイズの円で囲んだ領域のF L u c活性を計測する。そして、サンプル投与後のF l u c活性をサンプル投与前のF L u c活性で割ったものが当該縦軸の数値である。
- [0091] 図6及び7に示すように、ネガティブコントロールと比べて、p U C Y I T — s h L u cを保持する乳酸菌を投与したマウス群では、有意にF L u c活性の低減が確認され、R N A i効果が確認された。この実験を繰り返し行ったところ再現性が確認された。また、図6で投与した乳酸菌（ 2×10^8 c e l l s）に含まれるプラスミド量（ $2.4 \mu g$ ）と等量のp U C Y I T — s h L u cを $200 \mu l$ の生理食塩水に溶かしてマウスに投与しても、全くR N A i効果が見られなかった。これらの結果から、乳酸菌はs h R N A発現ベクターをヒト腫瘍細胞内に運び入れ、当該s h R N AによるR N A i効果が当該ヒト腫瘍細胞内にて発揮されたことが確認された。
- [0092] 発明の詳細な説明の項においてなされた具体的な実施形態または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。
- [0093] <実施例5：ルシフェラーゼの発現の確認>
- 本実施例では、P o l I I I Iによって転写されるプロモーターと同じく、哺乳動物内で機能するプロモーターであるS Vプロモーターを備えた、p U C Y I T 3 5 6 N由来のベクターを保持する乳酸菌をマウスに経口投与することで、そのベクターがマウス腸内細胞に伝わることを確認した。

[0094] [5-1: ルシフェラーゼ発現ベクターの作製]

pGL3-control vector (Promega社) をKpn I 及びS a l I で切断し、アガロースゲル電気泳動により2440bpの断片を精製した。この断片は哺乳動物細胞内で働くSVプロモーターの下流に、ホタル(firefly) ルシフェラーゼ遺伝子が続く配列である。配列を配列番号12に示す。配列番号12において、1位～6位がKpn I 配列であり、2448位～2453位がS a l I 配列であり、48位～250位がプロモーターであり、280位～1932位がルシフェラーゼ遺伝子である。次に、この断片を、実施例1で用いたものと同じベクターであるpUCYIT356N (配列番号1) のKpn I -S a l I サイトに組み込んだ。これによって、哺乳動物細胞内に入るとルシフェラーゼ遺伝子を発現するベクター[pUCYIT-Luc] を作製した。pUCYIT-Lucは乳酸菌内で安定に保持されるが、乳酸菌内ではルシフェラーゼ遺伝子の発現は起らない。

[0095] [5-2: ルシフェラーゼを哺乳動物細胞内で発現する乳酸菌の作製]

実施例1の[エレクトロポレーションによるプラスミドの導入]の項と同様に、pUCYIT-LucをL. caseiの細胞内に導入した。

[0096] [5-3 強制給餌法によるマウスへの乳酸菌投与(1日3回投与×3日間)と観察]

強制給餌法を用いてマウスへの乳酸菌投与を行なうことで、生体内でのpUCYIT-Lucベクターの移行を観察した。具体的には、Xenogen社製IVIS 200 Imaging Systemを用いてルシフェラーゼの発光を観察することで、マウスの腸内の細胞内にpUCYIT-Lucベクターが移行したか否かを調べた。

[0097] (1) 乳酸菌の集菌

2mL MRS培地(+Em 20μg/mL)中にpUCYIT-Lucを導入させた乳酸菌(pUCYIT-Luc Lactobacilli)を加え、プレ培養を行なった。翌日プレ培養した培養液2mLを800m

L MRS培地（+Em $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）に加えた。OD=1.0（A600）になるまで37℃で静置培養した。その後、全培養液を遠心した（ $2000 \times G$ 4℃ 4min）。上清を除き、生理食塩水200mLで懸濁してから遠心した（ $2000 \times G$ 4℃ 4min）。再び上清を除き生理食塩水を加え、遠心（ $2000 \times G$ 4℃ 4min）した。上清を取り除いてから全量8mLになるよう生理食塩水を加え、5mLの乳酸菌溶液（ $2 \times 10^9 \text{ cells}/\text{mL}$ ）を得た。

[0098] なお、比較のため、 $2 \times 10^9 \text{ cells}/\mu\text{L}$ の乳酸菌内に含まれる量と同じ量を含むpUCYIT-Lucベクター溶液も生理食塩水で調製した（ $24 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

[0099] （2）乳酸菌の投与

乳酸菌は、胃ゾンテ法（シリンジに投与したい溶液を入れ、そのシリンジにつなげたチューブを胃まで届かせて注入する方法）を用いて強制給餌した。給餌している様子を図8に示す。図8は本実施例において胃ゾンテ法を用いて乳酸菌を経口投与している様子を示す図である。一回一匹当たり400 μL （ $8 \times 10^8 \text{ cells}$ ）ずつ投与した。1日3回（10:00、13:00、16:00）を3日間続けて行なった（投与した乳酸菌は投与前日に培養・集菌したものをを用いた）。投与最終日の翌日、IVIS 200 Imaging Systemを用いて、マウスのルシフェラーゼ発光を調べた。ルシフェリンは50 μL 腹腔投与した。ルシフェリンは30mg/mLに希釈したものをを用いた。

[0100] （3）腸内の観察

まずマウスを頸椎脱臼させ安楽死させた。その後、マウス腹部を切断し十二指腸～直腸までを摘出した。これをPBSで洗浄し、新しいPBSの入ったシャーレに移してからIVIS 200 Imaging Systemを用いてルシフェラーゼ発光を調べた。シャーレ内にルシフェリンは50 μL 添加した。ルシフェリンは30mg/mLに希釈したものをを用いた。

[0101] （4）結果

結果を図9に示す。図9は本実施例において乳酸菌をマウスに経口投与してルシフェラーゼ活性を観察した結果を示す図であり、図9の(a)はpUCYIT-Luc Lactobacilliを投与した結果を示し、図9の(b)は比較のために作製したpUCYIT-Lucベクター溶液を投与した結果を示し、図9の(c)は参考として示すマウスの解剖図である。図9に示すように、pUCYIT-Luc Lactobacilliを投与することで、腸の存在位置付近にルシフェラーゼ活性を確認できた。

[0102] 以上のように、pUCYIT356N由来のルシフェラーゼ発現ベクターが伝わり、機能したことが、ルシフェラーゼの発光を確認することによって確認された。

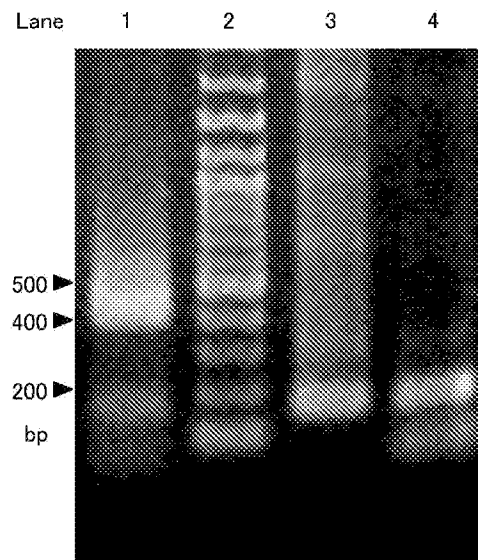
産業上の利用可能性

[0103] 本発明に係るキットは、乳酸菌を用いて、人間及び動物の細胞内においてdsRNAを生成させることができる。このため、人間及び動物の腸内で安定してRNAiを起こすことができる。よって、本発明は、製薬産業、食品産業及びその関連産業に利用可能である。

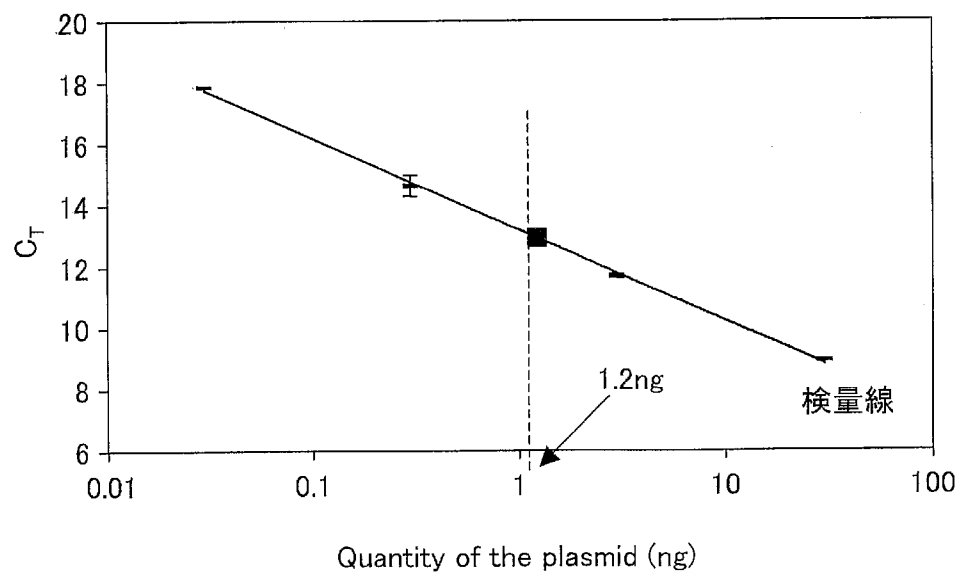
請求の範囲

- [請求項1] 哺乳動物内で機能するプロモーターを含むベクターを備えていることを特徴とする乳酸菌により二本鎖RNAを生成するキット。
- [請求項2] 上記哺乳動物内で機能するプロモーターは、P o l I I I Iによって転写されるプロモーターであることを特徴とする請求項1に記載のキット。
- [請求項3] 上記P o l I I I Iによって転写されるプロモーターが、U 6プロモーターであることを特徴とする請求項2に記載のキット。
- [請求項4] 哺乳動物内で機能するプロモーターに二本鎖RNAをコードするDNAが作動可能に連結されたベクターを、含有していることを特徴とする乳酸菌。
- [請求項5] 上記哺乳動物内で機能するプロモーターは、P o l I I I Iによって転写されるプロモーターであることを特徴とする請求項4に記載の乳酸菌。
- [請求項6] 請求項4又は5に記載の乳酸菌を含んでいることを特徴とする腸内疾患用治療組成物。

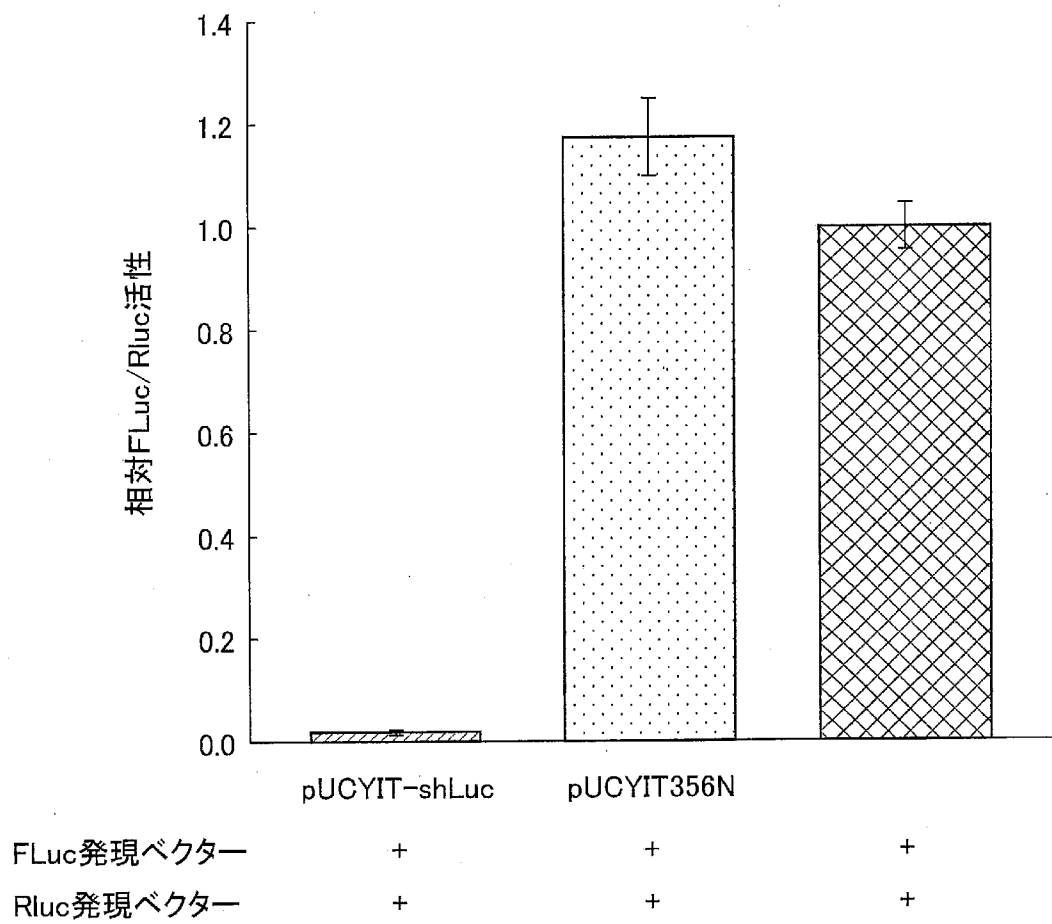
[図1]



[図2]



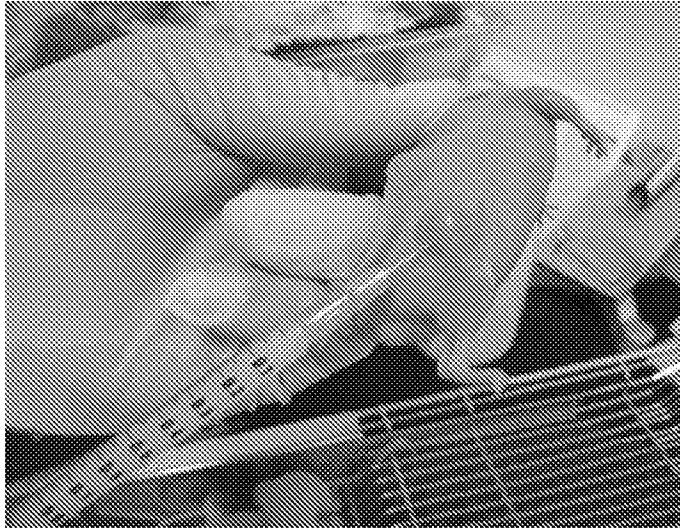
[図3]



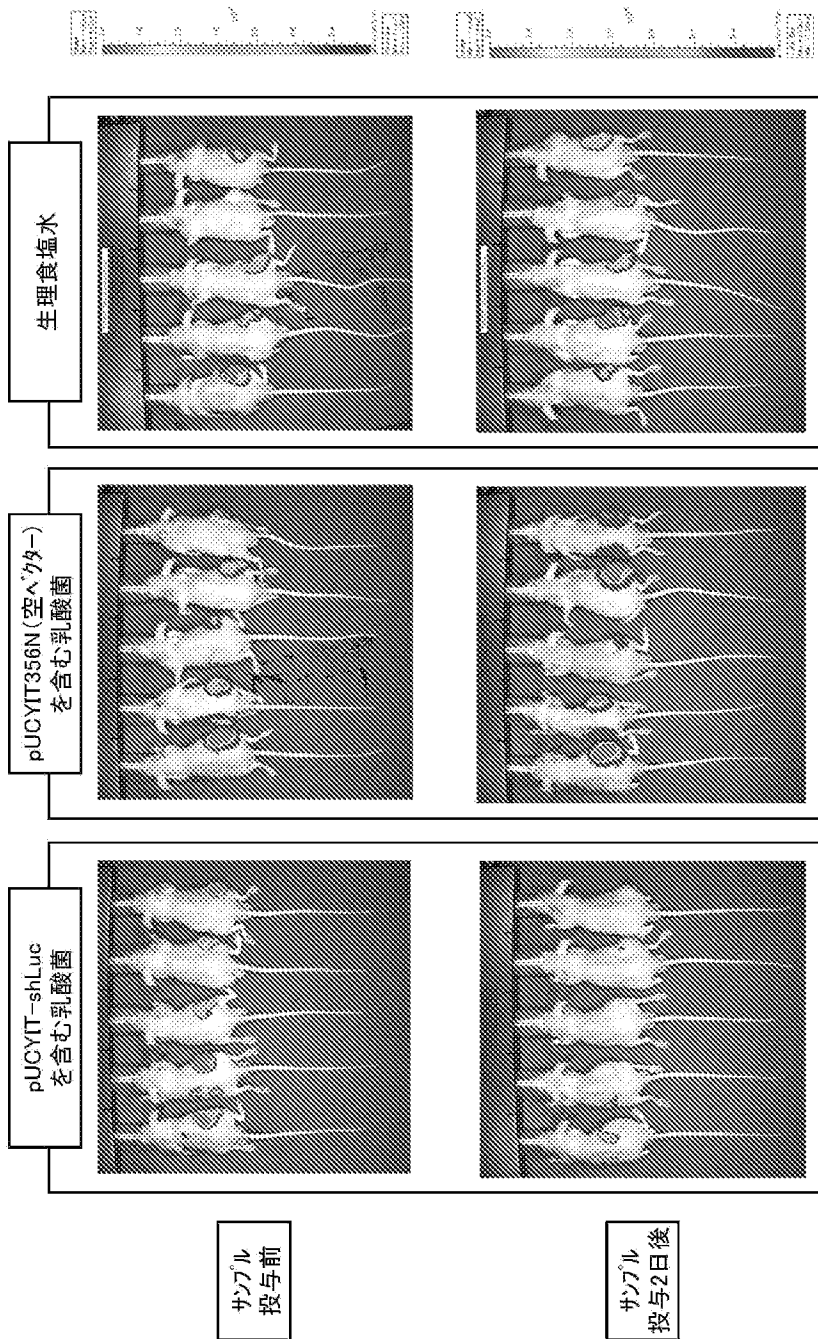
[図4]



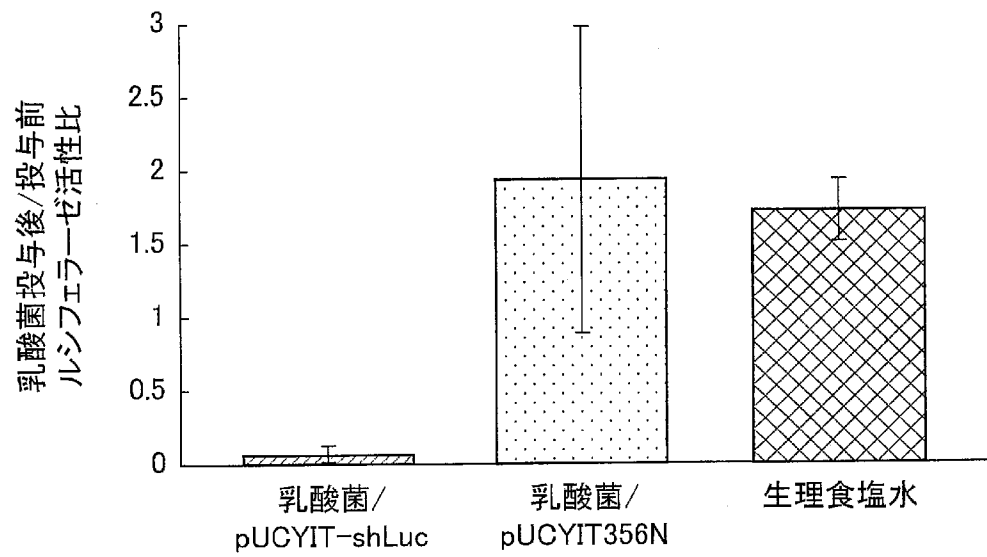
[図5]



[図6]



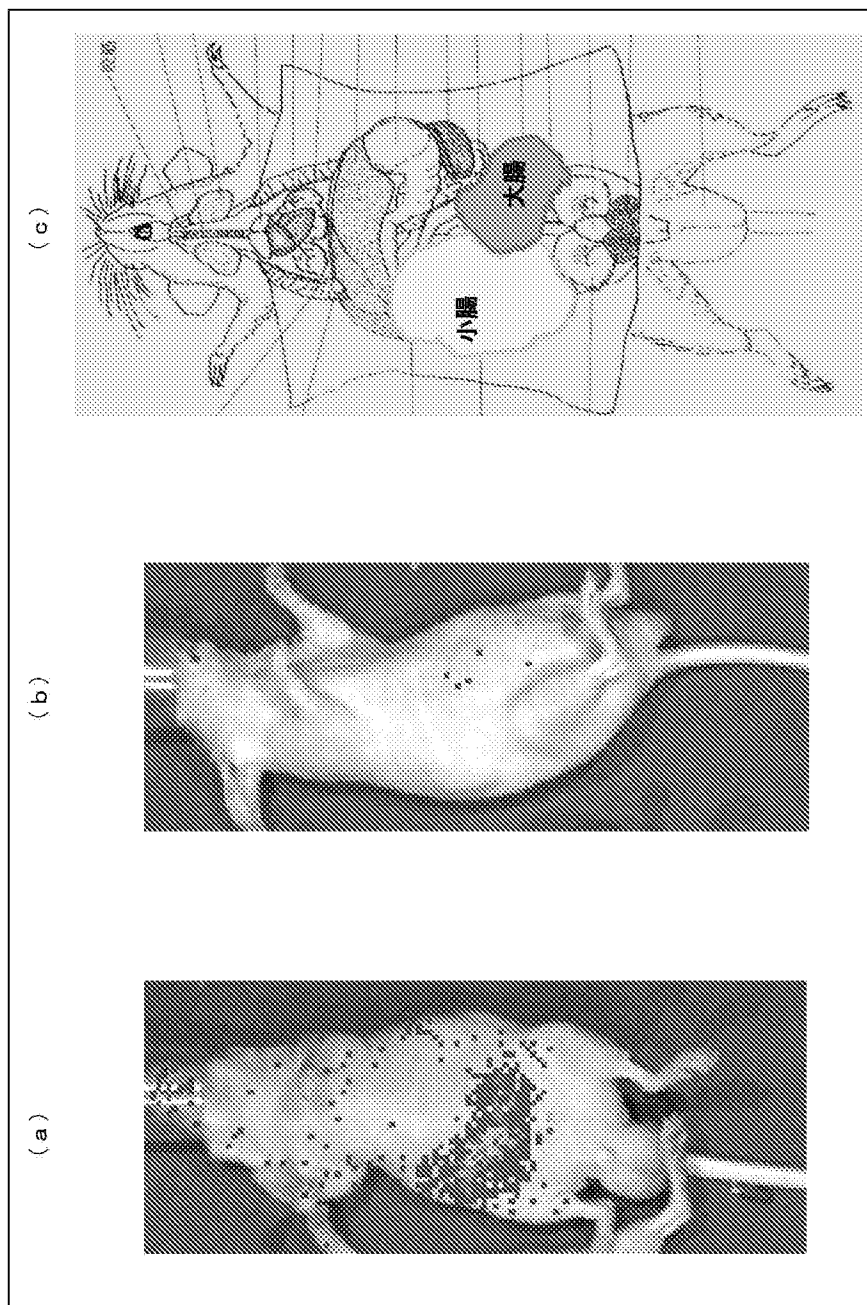
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004465

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K35/74, A61P1/00, C12N1/21

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	KUWAHARA, A. et al., Delivery of dsRNA with lactic acid bacteria for RNA interference, Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.), 2007, No.51, p.413-414	$\frac{1, 4, 6}{2, 3, 5}$
Y	JP 2008-510794 A (EnGeneIC Molecular Delivery Pty. Ltd.), 10 April 2008 (10.04.2008), & US 2007/0298056 A1 & US 2008/0299084 A1 & EP 1791959 A & WO 2006/021894 A2 & CA 2577938 A & CN 101072876 A & NZ 553910 A	2, 3, 5
P, X	JP 2008-301812 A (Okayama University), 18 December 2008 (18.12.2008), claims 1 to 6 (Family: none)	1, 4, 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 October, 2009 (13.10.09)

Date of mailing of the international search report
27 October, 2009 (27.10.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61P1/00(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K35/74, A61P1/00, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	KUWAHARA, A. et al., Delivery of dsRNA with lactic acid bacteria for RNA interference, Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.), 2007, No. 51, p. 413-414	1, 4, 6 2, 3, 5
Y	JP 2008-510794 A (エンジェネイック モレキュラー デリバリー ピーティーワイ リミテッド) 2008. 04. 10, & US 2007/0298056 A1 & US 2008/0299084 A1 & EP 1791959 A & WO 2006/021894 A2 & CA 2577938 A & CN 101072876 A & NZ 553910 A	2, 3, 5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 3 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 7 . 1 0 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

3 6 4 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	JP 2008-301812 A (国立大学法人 岡山大学) 2008.12.18, 【請求項1】－【請求項6】 (ファミリーなし)	1, 4, 6