

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512489

(P2019-512489A)

(43) 公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 31/7105 (2006.01)	A 61 K 31/7105	Z N A	2 G 045
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		4 B 063
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1	4 C 076
A61K 9/127 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1	4 C 084
A61K 47/69 (2017.01)	A 61 K 9/127		4 C 086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 142 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-547943 (P2018-547943)	(71) 出願人	508285606 ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービシーズ アメリカ合衆国, メリーランド 20892-7660, ベセスダ, エグゼキュティブ ブールバード 6011, スイート 325, エムエスシー 7660
(86) (22) 出願日	平成29年3月7日 (2017.3.7)	(71) 出願人	518316929 ミリキュール, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, ボルティモア ロード 22
(85) 翻訳文提出日	平成30年11月2日 (2018.11.2)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/021178		
(87) 國際公開番号	W02017/156015		
(87) 國際公開日	平成29年9月14日 (2017.9.14)		
(31) 優先権主張番号	62/304,844		
(32) 優先日	平成28年3月7日 (2016.3.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マイクロRNAおよびその使用方法

(57) 【要約】

被験体において腫瘍を処置するための方法が本明細書で開示され、上記方法は、腫瘍において変化した発現を有する1種もしくはこれより多くのm i R N A核酸、またはそのバリエント（例えば、ミニックまたはミメティック）を被験体に投与することを包含する。1種またはこれより多くのm i R N A核酸を含む組成物もまた、本明細書で開示される。いくつかの例では、上記m i R N A核酸は、例えば、改変m i R N A、ならびに1もしくはこれより多くの改変ヌクレオチドならびに／または5'末端および／もしくは3'末端改変を含むm i R N A核酸である。特定の例では、上記改変m i R N A核酸は、m i R - 30a核酸である。1種またはこれより多くのm i R N A核酸の変化した発現を有する腫瘍を有すると、被験体を診断するための方法が本明細書にさらに開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

がんを有する被験体を処置するための方法であって、該方法は、有効量の、m i R - 3 0 核酸、m i R - 2 6 a - 5 p 核酸、m i R - 2 6 b - 5 p 核酸、m i R - 1 4 5 - 5 p 核酸、m i R - 3 3 8 - 3 p 核酸、m i R - 2 0 5 - 5 p 核酸、m i R - 3 7 5 核酸、m i R - 2 9 核酸、m i R - 2 7 核酸、m i R - 1 0 1 核酸、これらのうちのいずれかのミミックおよび／もしくはミメティック、またはこれらのうちのいずれか 2 種もしくはこれより多くの組み合わせを含む単離されたマイクロ RNA (m i RNA) 核酸を該被験体に投与し、それによってがんを有する該被験体を処置することを包含する、方法。

【請求項 2】

前記 m i R - 3 0 核酸は、m i R - 3 0 a - 5 p 核酸、m i R - 3 0 b - 5 p 核酸、m i R - 3 0 c - 5 p 核酸、m i R - 3 0 d - 5 p 核酸、m i R - 3 0 e - 5 p 核酸、またはこれらのミミックおよび／もしくはミメティックである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 m i R - 3 0 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 4 2 および配列番号 5 6 の二重鎖、配列番号 4 2 および配列番号 5 7 の二重鎖、または配列番号 1 ~ 1 1 、配列番号 3 7 ~ 6 1 、および配列番号 6 6 のうちの 1 つもしくはこれより多くを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 m i R - 3 0 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 7 3 ~ 9 2 、配列番号 5 0 および配列番号 6 1 の二重鎖、配列番号 7 3 および配列番号 6 1 の二重鎖、または配列番号 7 4 および配列番号 6 1 の二重鎖のうちの 1 つもしくはこれより多くを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 m i R - 2 6 a - 5 p 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 1 2 を含み、前記 m i R - 2 6 b - 5 p 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 1 5 を含み、前記 m i R - 1 4 5 - 5 p 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 1 8 を含み、前記 m i R - 3 3 8 - 3 p 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 2 1 を含み、前記 m i R - 3 7 5 核酸またはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、配列番号 1 7 を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 m i R - 2 6 a - 5 p ミミックまたはミメティックは、配列番号 6 4 、配列番号 6 5 、および配列番号 1 0 5 ~ 1 1 5 のうちの 1 つまたはこれより多くを含み、前記 m i R - 1 4 5 - 5 p ミミックまたはミメティックは、配列番号 6 6 、配列番号 6 7 、および配列番号 1 1 6 ~ 1 2 5 のうちの 1 つまたはこれより多くを含み、前記 m i R - 3 7 5 ミミックまたはミメティックは、配列番号 6 2 、配列番号 6 3 、および配列番号 9 3 ~ 1 0 4 のうちの 1 つまたはこれより多くを含み、前記 m i R - 1 0 1 ミミックまたはミメティックは、配列番号 1 2 6 ~ 1 3 5 のうちの 1 つまたはこれより多くを含み、前記 m i R - 2 9 ミミックまたはミメティックは、配列番号 1 3 6 ~ 1 4 6 のうちの 1 つまたはこれより多くを含み、または前記 m i R - 2 7 ミミックまたはミメティックは、配列番号 1 4 7 ~ 1 5 8 のうちの 1 つまたはこれより多くを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法は、有効量の、前記 m i R - 3 0 核酸、前記 m i R - 2 6 a - 5 p 核酸、前記 m i R - 1 4 5 - 5 p 核酸、ならびに前記 m i R - 3 7 5 核酸またはこれらのミミックおよび／もしくはミメティックを投与することを包含する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記 m i RNA 核酸および／またはそのミミックもしくはミメティックは、表 6 ~ 1 4 に列挙される 1 つまたはこれより多くの m RNA の発現を減少させる、請求項 1 ~ 7 のいず

10

20

30

40

50

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

1 種またはこれより多くの前記単離された m i R N A 核酸は、リポソーム組成物において投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記リポソームは、該リポソームを前記がんに向かわせる 1 種またはこれより多くの分子をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記標的化分子は、抗トランスフェリンレセプター抗体またはそのフラグメントを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記がんは、扁平上皮癌を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記扁平上皮癌は、頭頸部の扁平上皮癌、肺の扁平上皮癌、または子宮頸部の扁平上皮癌を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記がんは、上皮起源のがんであり、子宮頸部の腺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、乳房腺癌、および膵臓癌の群から選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

1 種またはこれより多くのさらなる治療を投与することをさらに包含する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 1 種またはこれより多くのさらなる治療は、外科手術、放射線療法、および化学療法を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも 1 種の m i R - 3 0 ミミックもしくはミメティック核酸、少なくとも 1 種の m i R - 3 7 5 ミミックもしくはミメティック核酸、少なくとも 1 種の m i R - 2 6 a - 5 p ミミックもしくはミメティック核酸、または少なくとも 1 種の m i R - 1 4 5 - 5 p ミミックもしくはミメティック核酸を含む、組成物。

【請求項 18】

少なくとも 1 種の m i R - 1 0 1 ミミックもしくはミメティック核酸、少なくとも 1 種の m i R - 2 9 ミミックもしくはミメティック核酸、または少なくとも 1 種の m i R - 2 7 ミミックもしくはミメティック核酸を含む、組成物。

【請求項 19】

前記ミミックまたはミメティック核酸は、5' 末端改変、および / または 3' 末端改変の、1 種もしくはこれより多くの改変核酸を含む、請求項 17 または 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記ミミックまたはミメティック核酸は、2' - O - メチル改変、2' - メトキシエトキシ改変、2' - ジメチルアミノオキシエトキシ改変、2' - アミノプロポキシ改変、および 2' - フルオロ改変のヌクレオチドのうちの 1 種またはこれより多くを含む、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記ミミックまたはミメティック核酸は、5' - アミノ C 3 改変、5' - アミノ C 6 改変、または 5' - アミノ C 1 2 改変を含む、請求項 17 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記ミミックまたはミメティック核酸は、配列番号 3 7 ~ 6 7、配列番号 4 2 および配列番号 5 6 の二重鎖、または配列番号 4 2 および配列番号 5 7 の二重鎖のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 17 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

前記ミミックまたはミメティック核酸は、配列番号 73～125、配列番号 50 および配列番号 61 の二重鎖、配列番号 73 および配列番号 61 の二重鎖、または配列番号 74 および配列番号 61 の二重鎖のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 17 または 19～21 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記ミミックまたはミメティック核酸は、配列番号 126～158 のいずれか 1 つを含む、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記ミミックまたはミメティック核酸は、ナノ粒子またはリポソームの中に組み込まれる、請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の組成物。 10

【請求項 26】

前記リポソームは、前記ナノ粒子またはリポソームを腫瘍に向かわせる 1 種またはこれより多くの分子をさらに含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記標的化分子は、抗トランスフェリンレセプター抗体またはそのフラグメントを含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む、請求項 27～27 のいずれか 1 項に記載の組成物。 20

【請求項 29】

固体腫瘍を有する被験体を処置するための方法であって、該方法は、有効量の、請求項 17～28 のいずれか 1 項に記載の組成物を該被験体に投与することを包含する、方法。

【請求項 30】

腫瘍を有する被験体を診断するための方法であって、該方法は、

該被験体から得られたサンプル中で少なくとも 1 種のマイクロ RNA (miRNA) 核酸の発現を検出することであって、ここで該少なくとも 1 種の miRNA 核酸は、表 1、表 3、表 4、表 5、表 18、および表 20 のうちのいずれか 1 つに列挙される miRNA 核酸のうちの少なくとも 1 種を含む、こと；ならびに

該被験体から得られた該サンプル中の該 miRNA 核酸のうちの少なくとも 1 種の発現を、コントロールと比較すること、 30

を包含し、

ここで該コントロールと比較した該被験体から得られた該サンプル中の該 miRNA 核酸の変化した発現は、腫瘍を有する被験体を同定する、方法。

【請求項 31】

前記少なくとも 1 種の miRNA 核酸は、miR-30、miR-26a-5p、miR-26b-5p、miR-145-5p、miR-375、miR-338-3p、miR-375、miR-27、miR-29、または miR-101 核酸を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記少なくとも 1 種の miRNA 核酸は、miR-30、miR-26a-5p、miR-26b-5p、miR-145-5p、miR-375、および miR-338-3p の各々を含む、請求項 31 に記載の方法。 40

【請求項 33】

前記被験体は、扁平上皮癌の腫瘍を有する、請求項 30～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記被験体に由来する前記サンプルは、該被験体に由来する腫瘍サンプルである、請求項 30～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記 miRNA の前記変化した発現が、前記コントロールと比較して減少した発現である 50

場合に、表1、表3、表4、表5、表18、表20、表21、および表23のうちのいずれか1つに列挙されるm i R N A核酸のうちの少なくとも1種の有効量を前記被験体に投与することをさらに包含する、請求項30～34のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2016年3月7日に出願された米国仮出願第62/304,844号の利益を請求し、その全体が、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

分野

本開示は、がんの処置および／または診断、特に、マイクロR N Aを利用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

マイクロR N A(m i R)発現の脱制御は、がんの複雑な悪性表現型を媒介する異常に発現したm R N Aの潜在的に重要な寄与駆動因子として明らかになった(Stahlhut and Slack, Genome Med. 5:111, 2013)。どのm i Rが、悪性表現型を調整する多様な経路および遺伝子プログラム内の極めて重要なm R N A標的を共制御するかは、それほど明らかではない。単一のm i Rが複数のm R N Aを同時に標的とし得るので、m i Rベースの治療剤は、がんにおいて単一のがん遺伝子または経路を標的とするより選択的な低分子または生物学的治療を使用して観察される固有のまたは獲得した抵抗性を緩和するのに役立ち得る。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Stahlhut and Slack, Genome Med. 5:111, 2013

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

要旨

がんにおいて増加または減少した発現を有するm i R N Aが本明細書で開示される。開示されるm i R N Aまたはそのミミックおよび／もしくはミメティックは、がん（例えば、悪性腫瘍）を有する被験体を処置および／または診断するための方法において利用され得る。

【0006】

がんを有する被験体を処置するための方法が、本明細書で開示される。上記方法は、腫瘍において変化した発現を有する1種またはこれより多くのm i R N A核酸（またはそのミミックもしくはミメティック）を被験体に投与することを包含する。いくつかの例では、上記方法は、がんを有する被験体に、有効量の、m i R - 30核酸、m i R - 26a - 5 p核酸、m i R - 26b - 5 p核酸、m i R - 145 - 5 p核酸、m i R - 338 - 3 p核酸、m i R - 375核酸、m i R - 29核酸、m i R - 27核酸、m i R - 101核酸、これらのミミックもしくはミメティック、m i R - 30、m i R - 26a - 5 p、m i R - 26b - 5 p、m i R 145 - 5 p、m i R - 338 - 3 p、m i R - 375のうちのいずれか1種に相補的なm i R、またはこれらのうちのいずれか2種もしくはこれより多くの組み合わせを投与することを包含する。特定の例では、上記被験体は、扁平上皮癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC））を有する。さらなる例では、上記方法は

40

50

、有効量の、表1、表3、表4、表5、表18、表20、表21、および表23のうちのいずれか1つに列挙されるm i RNA核酸のうちの少なくとも1種、これらのミミックもしくはミメティック、相補的オリゴヌクレオチド、またはこれらのうちのいずれか2種もしくはこれより多くの組み合わせを上記被験体に投与することを包含する。いくつかの例では、上記m i RNA核酸は、二重鎖m i RNA核酸として投与される、および／またはベクターの中に含まれる。いくつかの例では、上記m i RNA核酸および／またはそのミミックもしくはミメティックは、表6～14に列挙される1つまたはこれより多くのm RNAの発現を減少させる。

【0007】

1種またはこれより多くのm i RNA核酸（例えば、表1、表3、表4、表5、表18、表20、表21、および表23のうちのいずれか1つに列挙されるm i RNAのうちの少なくとも1種）を含む組成物も、本明細書で開示される。いくつかの例では、m i RNA核酸は、改変m i RNA（例えば、1もしくはこれより多くの配列改変、改変ヌクレオチド、ならびに／または5'末端および／もしくは3'末端の改変を含むm i RNA核酸）である。特定の例では、上記改変m i RNA核酸は、m i R - 30a核酸（配列番号37～61として本明細書で提供される改変m i RNAが挙げられるが、これらに限定されない）である。他の例では、上記改変m i RNA核酸は、配列番号62～67として本明細書で提供されるm i RNA核酸を含む。なおさらなる例では、上記改変m i RNA核酸は、配列番号73～158として本明細書で提供されるm i RNA核酸を含む。いくつかの例では、上記m i RNA核酸は、二重鎖m i RNA核酸を含む、および／またはベクターの中に含まれる。

【0008】

1種またはこれより多くのm i RNA核酸の変化した発現を有する腫瘍を有すると、被験体を診断するための方法が、本明細書でさらに開示される。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体に由来するサンプル中で、表1、表3、表4、表5、表18、および表20のうちのいずれか1つに列挙される1種もしくはこれより多くのm i RNAの発現を検出すること、ならびに上記被験体に由来するサンプル中の発現を、コントロールと比較することを包含する。いくつかの例では、上記コントロールと比較したm i RNA発現の変化した量は、上記被験体が腫瘍を有することを示す。いくつかの例では、上記方法は、m i R - 30核酸、m i R - 26a - 5p核酸、m i R - 26b - 5p核酸、m i R - 145 - 5p核酸、m i R - 338 - 3p核酸、またはm i R - 375核酸のうちの1種またはこれより多くの発現を検出すること、および上記m i RNAのうちの1種またはこれより多くの発現が、上記コントロールと比較して減少する場合に、上記被験体が腫瘍（扁平上皮癌の腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない）を有することを決定することを包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、1種またはこれより多くのm i RNA核酸を上記被験体に投与することをさらに包含する（例えば、m i R - 30核酸、m i R - 26a - 5p核酸、m i R - 26b - 5p核酸、m i R - 145 - 5p核酸、m i R - 338 - 3p核酸、m i R - 375核酸、またはこれらのミミックもしくはミメティックのうちの1種またはこれより多く）。

【0009】

本開示の前述および他の特徴は、添付の図面を参照しながら進められる以下の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、HNSCCにおけるm i R - 30発現および機能のスクリーニングおよび検証のための例示的方法を示す模式図である。

【0011】

【図2A-B】図2Aおよび図2Bは、粘膜コントロールと比較した場合に、T C G A（図2A）およびU S M C（図2B）両方のHNSCC腫瘍コホートにおいてS A M s e qによって差次的に発現されると同定された33種のm i RNAを示すグラフの対である。

10

20

30

40

50

各々について、左：線形スケールで表される、腫瘍と粘膜との間の発現の中央値の倍数変化。右： \log_{10} RPMとしての粘膜および腫瘍の発現分布の中央値の箱ひげ図。中央値は、中央部にある濃い黒線によって表され、バーは、25パーセンタイルおよび75パーセンタイルを表し、アウトライアは、個々の点として示される。FDR 0.05。

【0012】

【図2C-D】図2Cおよび2Dは、TCGA(図2C)およびUMSC(図2D)のHNSCCコホートにおける9種のmiRNAの低下した発現を示すグラフの対である。腫瘍と粘膜コントロールとの間の発現の中央値の倍数変化を、各グラフの左側に示す。粘膜および腫瘍の発現分布の中央値の箱ひげ図は、 \log_{10} RPM(100万個の塩基対あたりのリード数)として各グラフの右側に示される。中央値は、中央部にある濃い黒線によって表され、バーは、25パーセンタイルおよび75パーセンタイルを表し、アウトライアは、個々の点として示される。FDR 0.05。

10

【0013】

【図3A-B】図3A～3Dは、NSCC増殖に際して減少した発現を有するmiRNAの効果を示す一連のグラフである。マイクロRNAは、HNSCC細胞株UM-SCC-1のインビトロでのゲノムワイドRNAiスクリーニングにおいて抗増殖活性を示した。散布図は、TCGA(図3A)およびUMSC(図3B)の発現データを使用して、増殖スコア(絶対偏差の中央値(MAD))の統計的分布に対する差次的に発現されるマイクロRNA(y軸において粘膜に対する \log_2 腫瘍)を示す。上記プロットの左下部分のボックスは、RNAiスクリーニングにおける抗増殖活性(x軸)とともに抑制されたマイクロRNA発現比(y軸)を示す。miR-30-5pファミリーメンバーは、赤色で印が付けられる。図3Cは、miRNAミミックコントロールのパーセンテージとして示される、UM-SCC-1におけるトランسفエクションの96時間後のmiRNAミミックの抗増殖性を示すグラフである。図3Dは、TCGAコホートに由来する粘膜および腫瘍標本におけるhsa-miR-30-5pファミリーメンバーの発現を示す。バーは、SEMを示し、*は、($q < 0.2$ samseqツール)を示す。miR-30a-5pおよびmiR-30e-5pは、粘膜標本において最高に発現されたファミリーメンバーであり、腫瘍標本において最大の低下を示す。

20

【図3C-D】図3A～3Dは、NSCC増殖に際して減少した発現を有するmiRNAの効果を示す一連のグラフである。マイクロRNAは、HNSCC細胞株UM-SCC-1のインビトロでのゲノムワイドRNAiスクリーニングにおいて抗増殖活性を示した。散布図は、TCGA(図3A)およびUMSC(図3B)の発現データを使用して、増殖スコア(絶対偏差の中央値(MAD))の統計的分布に対する差次的に発現されるマイクロRNA(y軸において粘膜に対する \log_2 腫瘍)を示す。上記プロットの左下部分のボックスは、RNAiスクリーニングにおける抗増殖活性(x軸)とともに抑制されたマイクロRNA発現比(y軸)を示す。miR-30-5pファミリーメンバーは、赤色で印が付けられる。図3Cは、miRNAミミックコントロールのパーセンテージとして示される、UM-SCC-1におけるトランسفエクションの96時間後のmiRNAミミックの抗増殖性を示すグラフである。図3Dは、TCGAコホートに由来する粘膜および腫瘍標本におけるhsa-miR-30-5pファミリーメンバーの発現を示す。バーは、SEMを示し、*は、($q < 0.2$ samseqツール)を示す。miR-30a-5pおよびmiR-30e-5pは、粘膜標本において最高に発現されたファミリーメンバーであり、腫瘍標本において最大の低下を示す。

30

【0014】

【図4】図4は、HNSCC TCGAデータセットからのmRNA発現(\log_{10} RSEM(期待値最大化によるRNA-Seq), y軸)に対するmiR-30a-5pの発現(\log_{10} RPM, x軸)を示す一連のパネルであり、推定miR-30結合部位を含むmRNAに関してフィルタリングされる。線形回帰散布図は、示されたmRNAについて、p値とともに示される。

40

50

【0015】

【図5】図5は、miR陰性コントロール(neg Con)、miR-30a、または抗miR-30aコントロールオリゴヌクレオチドで72時間トランスフェクトしたUM-SCC-46細胞における選択されたmiR-30標的遺伝子のqRT-PCR測定値を示す一対のグラフである。全てのデータは3回の独立した実験の平均を表し、エラーバーは、SEMを表す。*スチューデントのT検定によるp値<0.05。

【0016】

【図6A】図6A～6Eは、HNSCC細胞株におけるmiR-30a推定標的の検証を示す一連のパネルである。図6Aは、Mfold(unafold.rna.albany.edu/?q=mfoldにおいてワールドワイドウェブ上で入手可能)によって推定される、miR-30a(配列番号1)と標的mRNA EGFR(配列番号68)、IGFIR(配列番号69)、MET(配列番号70)、およびIRS-1(配列番号71)の3'UTRとの塩基対合を示す。赤色の塩基は、シード配列の結合を示す。mRNAにおける下線を付した塩基は、変異体3'UTRコントロールレポーターにおいて欠失させた。図6Bは、miR30aまたは抗30aおよびRenillaルシフェラーゼ遺伝子の後ろにクローニングされた野生型3'UTR(左側)または変異体3'UTR(右側)を含むベクターでのUM-SCC-46細胞の共トランスフェクションの48時間後に測定した相対的ルシフェラーゼ活性を示す。5×miR-30結合部位を含む陽性コントロールベクター(Pos Con)および陰性GAPDH 3'UTRコントロールもまた、示す。全てのデータは、3回の独立した実験の平均を表し、エラーバーは、SEMを表す。(*)は、スチューデントのT検定によるp値<0.05を示す。図6Cおよび6Dは、miR-30a、抗30a、または陰性コントロールmiR(NC)オリゴヌクレオチドでのトランスフェクションの72時間後のヒト口腔ケラチノサイト(HOK)またはUM-SCC-46細胞からの全細胞溶解物を使用する、miR-30標的の発現(図6C)および下流のシグナル伝達分子のリン酸化(図6D)を示すウェスタンプロットの画像である。図6Eは、三連の実験から分析したmiR-30-5p標的のタンパク質レベルを示すグラフである。

【図6B】図6A～6Eは、HNSCC細胞株におけるmiR-30a推定標的の検証を示す一連のパネルである。図6Aは、Mfold(unafold.rna.albany.edu/?q=mfoldにおいてワールドワイドウェブ上で入手可能)によって推定される、miR-30a(配列番号1)と標的mRNA EGFR(配列番号68)、IGFIR(配列番号69)、MET(配列番号70)、およびIRS-1(配列番号71)の3'UTRとの塩基対合を示す。赤色の塩基は、シード配列の結合を示す。mRNAにおける下線を付した塩基は、変異体3'UTRコントロールレポーターにおいて欠失させた。図6Bは、miR30aまたは抗30aおよびRenillaルシフェラーゼ遺伝子の後ろにクローニングされた野生型3'UTR(左側)または変異体3'UTR(右側)を含むベクターでのUM-SCC-46細胞の共トランスフェクションの48時間後に測定した相対的ルシフェラーゼ活性を示す。5×miR-30結合部位を含む陽性コントロールベクター(Pos Con)および陰性GAPDH 3'UTRコントロールもまた、示す。全てのデータは、3回の独立した実験の平均を表し、エラーバーは、SEMを表す。(*)は、スチューデントのT検定によるp値<0.05を示す。図6Cおよび6Dは、miR-30a、抗30a、または陰性コントロールmiR(NC)オリゴヌクレオチドでのトランスフェクションの72時間後のヒト口腔ケラチノサイト(HOK)またはUM-SCC-46細胞からの全細胞溶解物を使用する、miR-30標的の発現(図6C)および下流のシグナル伝達分子のリン酸化(図6D)を示すウェスタンプロットの画像である。図6Eは、三連の実験から分析したmiR-30-5p標的のタンパク質レベルを示すグラフである。

【図6C-E】図6A～6Eは、HNSCC細胞株におけるmiR-30a推定標的の検証を示す一連のパネルである。図6Aは、Mfold(unafold.rna.albany.edu/?q=mfoldにおいてワールドワイドウェブ上で入手可能)によっ

10

20

30

40

50

て推定される、m i R - 3 0 a (配列番号 1) と標的 m R N A E G F R (配列番号 6 8)、I G F I R (配列番号 6 9)、M E T (配列番号 7 0)、および I R S - 1 (配列番号 7 1) の 3' U T R との塩基対合を示す。赤色の塩基は、シード配列の結合を示す。m R N A における下線を付した塩基は、変異体 3' U T R コントロールレポーターにおいて欠失させた。図 6 B は、m i R 3 0 a または抗 3 0 a および R e n i l l a ルシフェラーゼ遺伝子の後ろにクローニングされた野生型 3' U T R (左側) または変異体 3' U T R (右側) を含むベクターでの U M - S C C - 4 6 細胞の共トランスフェクションの 4 8 時間後に測定した相対的ルシフェラーゼ活性を示す。5 × m i R - 3 0 結合部位を含む陽性コントロールベクター (P o s C o n) および陰性 G A P D H 3' U T R コントロールもまた、示す。全てのデータは、3 回の独立した実験の平均を表し、エラーバーは、S E M を表す。(*) は、スチューデントの T 検定による $p < 0.05$ を示す。図 6 C および 6 D は、m i R - 3 0 a、抗 3 0 a、または陰性コントロール m i R (N C) オリゴヌクレオチドでのトランスフェクションの 7 2 時間後のヒト口腔ケラチノサイト (H O K) または U M - S C C - 4 6 細胞からの全細胞溶解物を使用する、m i R - 3 0 標的の発現 (図 6 C) および下流のシグナル伝達分子のリン酸化 (図 6 D) を示すウェスタンプロットの画像である。図 6 E は、三連の実験から分析した m i R - 3 0 - 5 p 標的のタンパク質レベルを示すグラフである。

10

20

30

40

50

【0 0 1 7】

【図 7 A - B】図 7 A ~ 7 I は、H N S C C 細胞成長、コロニー形成、シスプラチン感受性、および細胞生存性に対する m i R - 3 0 a ミミックの効果を示す一連のパネルである。図 7 A は、初代ヒト口腔ケラチノサイト (H O K) および 10 種の H N S C C 細胞株にわたるコントロール (N C) または m i R - 3 0 a ミミックでのトランスフェクション後 5 日目に、6 回反復での X T T アッセイによって測定した増殖を示すグラフである。図 7 B は、対数増殖期にある場合の H O K 細胞および 10 種の H N S C C 細胞株における q R T - P C R によって測定した m i R - 3 0 a 発現の基底レベルを示すグラフである。相対的 m i R - 3 0 a 発現レベルを、上記細胞株の平均発現に対して正規化した。

【0 0 1 8】

【図 7 C - D】図 7 C は、m i R - 3 0 a または抗 m i R 3 0 a オリゴヌクレオチドでのトランスフェクションの 4 8 時間後の、U M - S C C - 4 6 細胞のコロニー形成アッセイを示すグラフである。コロニーを、3 個のウェルにおいて計数し、3 回の独立した実験において反復した。図 7 D は、m i R - 3 0 a - 5 p ミミックで 4 8 時間トランスフェクトし、2 μ M シスプラチンで 3 時間処理し、次いで洗浄した U M - S C C - 4 6 細胞を示すグラフである。細胞密度を、シスプラチン処理の 7 2 時間後に X T T アッセイによって測定した。少なくとも 3 回の実験の平均 \pm S E M、* は、スチューデントの t 検定による $p < 0.05$ を示す。

【0 0 1 9】

【図 7 E - G】図 7 E は、m i R 3 0 a および抗 m i R - 3 0 a オリゴヌクレオチドでのトランスフェクションの 4 8 時間後の U M - S C C - 4 6 細胞のコロニー形成のグラフである。コロニーを 3 個のウェルにおいて計数し、3 回の独立した実験において反復した。図 7 F は、m i R - 3 0 a ミミックで 4 8 時間トランスフェクトし、2 μ M シスプラチンで 3 時間処理し、次いで、洗浄した U M - S C C - 4 6 細胞の細胞密度を示すグラフである。細胞密度を、シスプラチン処理の 7 2 時間後に X T T アッセイによって測定した。全てのデータは、少なくとも 3 回の実験の平均を表し、エラーバーは、S E M を表す。図 7 G は、コントロール (N e g c o n)、m i R - 3 0 a、または抗 m i R - 3 0 a 二重鎖でトランスフェクトした U M - S C C - 4 6 細胞の細胞生存性を示すグラフである。* スチューデントの T 検定による $p < 0.05$ 。

【0 0 2 0】

【図 7 H - I】図 7 H は、コントロール、m i R - 3 0 a - 5 p、または抗 3 0 a トランスフェクションでのコロニー形成アッセイの代表的画像を示すデジタル画像である。図 7 I は、コントロール、m i R - 3 0 a - 5 p、またはその抗 m i R でのトランスフェクシ

ヨン、または I C 5 0 用量でのシスプラチン処理との組み合わせたコントロール、m i R - 3 0 a - 5 p、またはその抗 m i R でのトランスフェクションの後の 0 日目、1 日目、3 日目、および 5 日目における 6 回反復の X T T アッセイによる U M - S C C - 4 6 細胞の増殖を示す一対のグラフである。

【 0 0 2 1 】

【図 8 A - B】図 8 A ~ 8 D は、H N S C C 細胞の運動性および侵入性に対する m i R - 3 0 a の効果を示す一連のパネルである。U M - S C C - 1 細胞（左側）および U M - S C C - 6 細胞（右側）を、創傷を作る前に m i R - 3 0 a または抗 m i R オリゴヌクレオチドで 4 8 時間トランスフェクトした。コントロールにおいて創傷閉鎖まで細胞移動を追跡した。創傷治癒の代表的な光学顕微鏡画像（1 0 0 ×）を示す（図 8 A）。U M - S C C - 1、左側、時間 0；右側、時間 2 0 時間。U M - S C C - 6、左側、時間 0；右側、時間 6 0 時間。経時的な細胞移動を定量した（図 8 B）。図 8 C は、U M - S C C - 1 の侵入膜の代表的な光学顕微鏡画像である（1 0 0 ×）。図 8 D は、U M - S C C - 1（左側）および U M - S C C - 4 6（右側）の侵入している細胞の相対的定量のグラフである。全てのデータは、少なくとも 3 回の実験の平均を表し、エラーバーは、S E M を表す。（*）は、スチューデントの T 検定による p 値 < 0 . 0 5 を表す。

【図 8 C - D】図 8 A ~ 8 D は、H N S C C 細胞の運動性および侵入性に対する m i R - 3 0 a の効果を示す一連のパネルである。U M - S C C - 1 細胞（左側）および U M - S C C - 6 細胞（右側）を、創傷を作る前に m i R - 3 0 a または抗 m i R オリゴヌクレオチドで 4 8 時間トランスフェクトした。コントロールにおいて創傷閉鎖まで細胞移動を追跡した。創傷治癒の代表的な光学顕微鏡画像（1 0 0 ×）を示す（図 8 A）。U M - S C C - 1、左側、時間 0；右側、時間 2 0 時間。U M - S C C - 6、左側、時間 0；右側、時間 6 0 時間。経時的な細胞移動を定量した（図 8 B）。図 8 C は、U M - S C C - 1 の侵入膜の代表的な光学顕微鏡画像である（1 0 0 ×）。図 8 D は、U M - S C C - 1（左側）および U M - S C C - 4 6（右側）の侵入している細胞の相対的定量のグラフである。全てのデータは、少なくとも 3 回の実験の平均を表し、エラーバーは、S E M を表す。（*）は、スチューデントの T 検定による p 値 < 0 . 0 5 を表す。

【 0 0 2 2 】

【図 9 A - B】図 9 A ~ 9 E は、インビボでの H N S C C 異種移植片腫瘍に対する m i R - 3 0 a - 5 p ミミックの効果を示す一連のパネルである。図 9 A は、U M - S C C - 4 6 細胞を筋肉内注射した無胸腺 n u / n u 雌性マウスの腫瘍および器官の一連の画像である。その腫瘍を、約 3 0 0 mm³ へと成長させ、次いで、そのマウスに、1 0 0 μ g（約 5 mg / k g）の複合体化 F I T C 標識コントロールオリゴヌクレオチドまたはコントロールビヒクリルを静脈内（I V）注射した。注射の 2 4 時間後に、腫瘍および器官を採取するためにマウスを屠殺した。図 9 B は、月曜日、水曜日、および金曜日（M W F）に 3 週間にわたって、6 0 μ g（約 mg / k g）の、ナノ粒子の中にパッケージした複合体化 m i R - 3 0 a ミミック（m i R - 3 0 a - s c L）またはコントロールを 9 用量 I V 注射した、U M - S C C - 4 6 異種移植片腫瘍 約 1 5 0 mm³ を有するマウスにおける腫瘍成長のグラフである。グラフは、各群の平均腫瘍容積を示し、エラーバーは、S E M を示す。2 4 日目の処置終了時の腫瘍サイズの代表的画像を、コントロールおよび m i R - 3 0 a - s c L 処置マウス（上）および処置の間のマウス体重（下）について図 9 C に示す。図 9 D は、コントロールまたは m i R - 3 0 a - s c L で処置したマウス間のカプラン - マイヤー生存分析を示す。図 9 E は、M W F スケジュールで 6 0 μ g m i R - 3 0 a - s c L またはコントロールの 4 用量で I V 注射した、約 1 5 0 mm³ へと成長させた H P V + U M - S C C - 4 7 異種移植片腫瘍を有するマウスの平均腫瘍容積を示す。最後の処置の 2 4 時間後に、マウスを屠殺し、腫瘍組織を分子分析のために集めた。エラーバーは、S E M を示し、（*）は、スチューデントの T 検定による p 値 < 0 . 0 5 を示す。

【図 9 C - E】図 9 A ~ 9 E は、インビボでの H N S C C 異種移植片腫瘍に対する m i R - 3 0 a - 5 p ミミックの効果を示す一連のパネルである。図 9 A は、U M - S C C - 4 6 細胞を筋肉内注射した無胸腺 n u / n u 雌性マウスの腫瘍および器官の一連の画像であ

10

20

30

40

50

る。その腫瘍を、約 300 mm^3 へと成長させ、次いで、そのマウスに、 $100\text{ }\mu\text{g}$ （約 5 mg / kg ）の複合体化F I T C標識コントロールオリゴヌクレオチドまたはコントロールビヒクリを静脈内（I V）注射した。注射の24時間後に、腫瘍および器官を採取するためにマウスを屠殺した。図9Bは、月曜日、水曜日、および金曜日（MWF）に3週間にわたって、 $60\text{ }\mu\text{g}$ （約 mg / kg ）の、ナノ粒子の中にパッケージした複合体化m i R - 30aミミック（m i R - 30a - s c L）またはコントロールを9用量I V注射した、UM - S C C - 46異種移植片腫瘍 約 150 mm^3 を有するマウスにおける腫瘍成長のグラフである。グラフは、各群の平均腫瘍容積を示し、エラーバーは、S E Mを示す。24日目の処置終了時の腫瘍サイズの代表的画像を、コントロールおよびm i R - 30a - s c L処置マウス（上）および処置の間のマウス体重（下）について図9Cに示す。図9Dは、コントロールまたはm i R - 30a - s c Lで処置したマウス間のカプラン-マイヤー生存分析を示す。図9Eは、MWFスケジュールで $60\text{ }\mu\text{g}$ m i R - 30a - s c Lまたはコントロールの4用量でI V注射した、約 150 mm^3 へと成長させたH P V + UM - S C C - 47異種移植片腫瘍を有するマウスの平均腫瘍容積を示す。最後の処置の24時間後に、マウスを屠殺し、腫瘍組織を分子分析のために集めた。エラーバーは、S E Mを示し、（*）は、スチューデントのT検定によるp値 <0.05 を示す。
10

【0023】

【図10A】図10Aは、UM - S C C - 46異種移植片腫瘍を移植し、MWFスケジュールで $60\text{ }\mu\text{g}$ のコントロールm i R - S c Lまたはm i R - 30a - S c Lの4用量をi . v . 注射したマウスにおけるm i R - 30a - 5 p標的m R N Aの定量的リアルタイムP C Rを示すグラフである。データは、3匹の動物の平均を表し、エラーバーは、S E Mを示し、（*）は、スチューデントのT検定によるp値 <0.05 を表す。
20

【0024】

【図10B】図10Bは、コントロールm i R - s c Lまたはm i R - 30a - s c L処置後の異種移植片腫瘍から採取した凍結切片におけるE G F RおよびM E Tの免疫蛍光染色を示す一連のデジタル画像である。スケールバー、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 。図10Cは、UM - S C C - 46細胞（左側）およびUM - S C C - 47細胞（右側）における6個の独立した $40\times$ 視野から定量した平均蛍光強度を示す1対のグラフである。エラーバーは、 \pm S E Mを表し、（*）は、スチューデントのt検定によるp <0.05 を示す。
30

【図10C】図10Bは、コントロールm i R - s c Lまたはm i R - 30a - s c L処置後の異種移植片腫瘍から採取した凍結切片におけるE G F RおよびM E Tの免疫蛍光染色を示す一連のデジタル画像である。スケールバー、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 。図10Cは、UM - S C C - 46細胞（左側）およびUM - S C C - 47細胞（右側）における6個の独立した $40\times$ 視野から定量した平均蛍光強度を示す1対のグラフである。エラーバーは、 \pm S E Mを表し、（*）は、スチューデントのt検定によるp <0.05 を示す。
30

【0025】

【図10D】図10Dは、Ingenuity Pathway Analysisによって、m i R 30標的化分子を、増殖および移動に関連して報告された相互作用および機能と関連付ける経路模式図である。赤色で示される分子は、m i R - 30a発現に対して逆関係を有するm i R - 30a - 5 p標的遺伝子である。青色で示される分子は、赤色の分子と関連付けられる結合またはシグナル伝達相互作用を示す分子である。
40

【0026】

【図10E】図10Eは、免疫組織化学によって、K i - 67に関して染色したUM - S C C - 46異種移植片腫瘍の代表的デジタル画像および定量である。値は、6個の独立した $20\times$ 視野から定量した平均強度を表し、エラーバーは、 \pm S E Mを表し、（*）は、スチューデントのt検定によるp <0.05 を示す。図10Fは、m i R - 30標的遺伝子であるE G F RまたはM E Tに関して免疫蛍光によって染色したUM - S C C - 47異種移植片腫瘍の代表的画像を示す。

【図10F】図10Eは、免疫組織化学によって、K i - 67に関して染色したUM - S C C - 46異種移植片腫瘍の代表的デジタル画像および定量である。値は、6個の独立し
50

た $20 \times$ 視野から定量した平均強度を表し、エラーバーは、 $\pm SEM$ を表し、(*)は、スチュードントのt検定による $p < 0.05$ を示す。図10Fは、miR-30標的遺伝子であるEGFRまたはMETに関して免疫蛍光によって染色したUM-SCC-47異種移植片腫瘍の代表的画像を示す。

【0027】

【図11A-B】図11A～11Fは、miR-30ファミリーメンバーのコピー数多型(CNV)、メチル化、および発現と、HNSCCの臨床上の特徴との関連を示す一連のパネルである。図11Aおよび図11Bは、MIR30A/C2遺伝子(図11A)およびMIR30E/C1遺伝子(図11B)と重なり合う染色体位置上のホモ接合性およびヘテロ接合性の欠失の頻度を示すInteractive Genome Viewer(IGV, Broad Institute)プロットである。青色は、コピー数の低下を表し、赤色は、コピー数の増加を表す。サンプルを、CNVの値に基づいて処理した。図11Cおよび図11Dは、カラムで示しかつmiR30AプロモーターのDNAメチル化(図11C)またはmiR30EのCNV(図11D)によってソートしたTCGA由来のHNSCCサンプル($n = 260$)を示す。臨床上の特徴(着色したバー、上4列)および遺伝的特徴(ヒートマップ、下3列)を、応じて類別した。miR-30e-5pのCNVおよび発現(図11E)とmiR-30a-5pのメチル化および低発現(図11F)との間には、有意な相関が観察された。miR-30a-5pの低発現は、口腔に発生する腫瘍と有意に相関し、miR-30e-5pの低発現は、喉頭に発生するHPV陰性腫瘍と有意に相関した。

【図11C-D】図11A～11Fは、miR-30ファミリーメンバーのコピー数多型(CNV)、メチル化、および発現と、HNSCCの臨床上の特徴との関連を示す一連のパネルである。図11Aおよび図11Bは、MIR30A/C2遺伝子(図11A)およびMIR30E/C1遺伝子(図11B)と重なり合う染色体位置上のホモ接合性およびヘテロ接合性の欠失の頻度を示すInteractive Genome Viewer(IGV, Broad Institute)プロットである。青色は、コピー数の低下を表し、赤色は、コピー数の増加を表す。サンプルを、CNVの値に基づいて処理した。図11Cおよび図11Dは、カラムで示しかつmiR30AプロモーターのDNAメチル化(図11C)またはmiR30EのCNV(図11D)によってソートしたTCGA由来のHNSCCサンプル($n = 260$)を示す。臨床上の特徴(着色したバー、上4列)および遺伝的特徴(ヒートマップ、下3列)を、応じて類別した。miR-30e-5pのCNVおよび発現(図11E)とmiR-30a-5pのメチル化および低発現(図11F)との間には、有意な相関が観察された。miR-30a-5pの低発現は、口腔に発生する腫瘍と有意に相関し、miR-30e-5pの低発現は、喉頭に発生するHPV陰性腫瘍と有意に相関した。

【図11E-F】図11A～11Fは、miR-30ファミリーメンバーのコピー数多型(CNV)、メチル化、および発現と、HNSCCの臨床上の特徴との関連を示す一連のパネルである。図11Aおよび図11Bは、MIR30A/C2遺伝子(図11A)およびMIR30E/C1遺伝子(図11B)と重なり合う染色体位置上のホモ接合性およびヘテロ接合性の欠失の頻度を示すInteractive Genome Viewer(IGV, Broad Institute)プロットである。青色は、コピー数の低下を表し、赤色は、コピー数の増加を表す。サンプルを、CNVの値に基づいて処理した。図11Cおよび図11Dは、カラムで示しかつmiR30AプロモーターのDNAメチル化(図11C)またはmiR30EのCNV(図11D)によってソートしたTCGA由来のHNSCCサンプル($n = 260$)を示す。臨床上の特徴(着色したバー、上4列)および遺伝的特徴(ヒートマップ、下3列)を、応じて類別した。miR-30e-5pのCNVおよび発現(図11E)とmiR-30a-5pのメチル化および低発現(図11F)との間には、有意な相関が観察された。miR-30a-5pの低発現は、口腔に発生する腫瘍と有意に相関し、miR-30e-5pの低発現は、喉頭に発生するHPV陰性腫瘍と有意に相関した。

10

20

30

40

50

【0028】

【図11G-H】図11Gおよび11Hは、発現の中央値によって高いおよび低いに分離したmiR-30a-5p（図11G）およびmiR-30e-5p（図11H）の生存分析を示すグラフの対である。カプラン-マイヤープロットおよびログランク検定のp値は、疾患特異的生存を比較する。

【0029】

【図12A】図12Aおよび図12Bは、低い全生存（図12A、左側）と相關したmiR-30eの低い発現、低い全生存と相關したMIR30E遺伝子座のCNV喪失（図12A、中央）を示す一連のカプラン-マイヤー生存プロットであり、そして中咽頭に発生する低レベルまたは高レベルのmiR-30e-5pを発現する腫瘍に関する生存分析は、生存の差異を明らかにし、それによって、miR-30e-5pの高発現から、より良好な予後が推定された（図12A、右側）。そしてmiR-26a-5p（図12B、上側）およびmiR-26b-5p（図12B、下側）の低発現は、低い全生存と相關した。

【図12B】図12Aおよび図12Bは、低い全生存（図12A、左側）と相關したmiR-30eの低い発現、低い全生存と相關したMIR30E遺伝子座のCNV喪失（図12A、中央）を示す一連のカプラン-マイヤー生存プロットであり、そして中咽頭に発生する低レベルまたは高レベルのmiR-30e-5pを発現する腫瘍に関する生存分析は、生存の差異を明らかにし、それによって、miR-30e-5pの高発現から、より良好な予後が推定された（図12A、右側）。そしてmiR-26a-5p（図12B、上側）およびmiR-26b-5p（図12B、下側）の低発現は、低い全生存と相關した。

【0030】

【図13】図13は、miR-30aでトランスフェクトし、XTTアッセイによって測定した非HNSCCがん細胞株の細胞生存性を示すグラフである。データは、6回の反復の平均を表し、エラーバーは、SEMを示す。*, p < 0.05。

【0031】

【図14】図14A～14Bは、UMSCC-46異種移植片モデルに対する改変miR-30aオリゴヌクレオチドの効果を示す一連のパネルである。図14Aは、コントロールマウス、放射線療法（RT）で処置したマウス、miR-30a-sc1で処置したマウス、ならびにmiR-30a-006-sc1および放射線療法（M006-sc1+RT）で処置したマウスにおける腫瘍成長を示す。図14Bは、コントロール、放射線療法（RT）、M-miR-006（M-006）、M-006+放射線、およびシスプラチン処置したマウスにおけるカプラン-マイヤー生存プロットである。

【0032】

【図15】図15は、示した細胞株の細胞密度に対するmiR組み合わせ処置の効果を示すグラフである。上記細胞を、miR-30a-014（G11+P12鎖（stand））、miR-145、miR-26a、およびmiR-375の組み合わせでトランスフェクトした。データは、6回の反復の平均を表し、エラーバーは、SDを表す。

【0033】

【図16A】図16A～16Dは、UM-SCC108細胞（図16A）、UM-SCC-22B細胞（図16B）、UM-SCC-47細胞（図16C）およびUM-SCC-1G細胞（図16D）の細胞密度に対する個々のmiRNAまたはmiRNAの対の効果を示すグラフである。NT、トランスフェクトされない；NC、陰性コントロール；145、miR-145-5p；375、miR-375；m16、M-miR30a-016；26a、miR-26a-5p；30a、miR-30a-5p。

【図16B】図16A～16Dは、UM-SCC108細胞（図16A）、UM-SCC-22B細胞（図16B）、UM-SCC-47細胞（図16C）およびUM-SCC-1G細胞（図16D）の細胞密度に対する個々のmiRNAまたはmiRNAの対の効果を示すグラフである。NT、トランスフェクトされない；NC、陰性コントロール；

10

20

30

40

50

145、miR - 145 - 5p ; 375、miR - 375 ; m16、M - miR30a - 016 ; 26a、miR - 26a - 5p ; 30a、miR - 30a - 5p。

【図16C】図16A～16Dは、UM - SCC108細胞(図16A)、UM - SCC - 22B細胞(図16B)、UM - SCC - 47細胞(図16C)およびUM - SCC - 1G細胞(図16D)の細胞密度に対する個々のmiRNAまたはmiRNAの対の効果を示すグラフである。NT、トランスフェクトされない；NC、陰性コントロール；

145、miR - 145 - 5p ; 375、miR - 375 ; m16、M - miR30a - 016 ; 26a、miR - 26a - 5p ; 30a、miR - 30a - 5p。

【図16D】図16A～16Dは、UM - SCC108細胞(図16A)、UM - SCC - 22B細胞(図16B)、UM - SCC - 47細胞(図16C)およびUM - SCC - 1G細胞(図16D)の細胞密度に対する個々のmiRNAまたはmiRNAの対の効果を示すグラフである。NT、トランスフェクトされない；NC、陰性コントロール；

145、miR - 145 - 5p ; 375、miR - 375 ; m16、M - miR30a - 016 ; 26a、miR - 26a - 5p ; 30a、miR - 30a - 5p。

【0034】

【図17】図17Aおよび図17Bは、miR - 27 - 5p二重鎖またはmiR - 26b - 1 - 5p二重鎖でトランスフェクトしたUM - SCC - 1細胞(図17A)またはUM - SCC - 46細胞(図17B)における細胞生存性を示すグラフである。データは、6回の反復の平均を表す。エラーバーは、SEMを示す。*スチュードントのT検定によってp < 0.05。

【0035】

【図18】図18は、48時間の過程にわたって血清中のmiR - 30aおよび改変ミミック(M - 006、M - 018、およびM - 019)の安定性を示す一連のデジタル画像である。

【0036】

【図19】図19は、UM - SCC - 46細胞の細胞密度に対するmiRNA対の効果を示すグラフである。NT、トランスフェクトされない；NC、陰性コントロール；miRNA対は、表19および表22に示されるとおりである。エラーバーは、SDを表す。

【発明を実施するための形態】

【0037】

配列表

本明細書で列挙されるかまたは添付の配列表中の任意の核酸配列およびアミノ酸配列は、特許法施行規則§1.822に定義されるように、ヌクレオチド塩基およびアミノ酸に関する標準文字略語を使用して示される。少なくともいくらかの場合には、各核酸配列の一方の鎖のみが示されるが、相補鎖は、示された鎖への任意の言及によって包含されると理解される。

【0038】

配列番号1～36は、例示的な成熟miRNAのヌクレオチド配列である。

【0039】

配列番号37～53は、改変miR - 30aガイド鎖ヌクレオチド配列である。

【0040】

配列番号54～61は、改変miR - 30aパッセンジャー鎖ヌクレオチド配列である。

【0041】

配列番号62および配列番号63は、それぞれ、改変miR - 375ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【0042】

配列番号64および配列番号65は、それぞれ、改変miR - 26a - 5pガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

配列番号 6 6 および配列番号 6 7 は、それぞれ、改変 m i R - 1 4 5 - 5 p ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 6 8 は、上皮成長因子レセプター (E G F R) 3' 非翻訳領域 (U T R) ヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 6 9 は、インスリン成長因子 - 1 レセプター (I G F R 1) 3' U T R ヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 7 0 は、M E T 3' U T R ヌクレオチド配列である。 10

【 0 0 4 7 】

配列番号 7 1 は、インスリンレセプター基質 1 (I R S - 1) 3' U T R ヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号 7 2 は、例示的な m i R - 3 0 a パッセンジャー鎖 ヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 9 】

配列番号 7 3 ~ 9 2 は、さらなる例示的な改変 m i R - 3 0 a ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【 0 0 5 0 】

配列番号 9 3 ~ 1 0 4 は、さらなる例示的な改変 m i R - 3 7 5 ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。 20

【 0 0 5 1 】

配列番号 1 0 5 ~ 1 1 5 は、さらなる例示的な改変 m i R - 2 6 ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【 0 0 5 2 】

配列番号 1 1 6 ~ 1 2 5 は、さらなる例示的な改変 m i R - 1 4 5 - 5 p ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 1 2 6 ~ 1 3 5 は、さらなる例示的な改変 m i R - 1 0 1 ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。 30

【 0 0 5 4 】

配列番号 1 3 6 ~ 1 4 6 は、さらなる例示的な改変 m i R - 2 9 ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【 0 0 5 5 】

配列番号 1 4 7 ~ 1 5 8 は、さらなる例示的な改変 m i R - 2 7 ガイド鎖およびパッセンジャー鎖である。

【 0 0 5 6 】**詳細な説明**

ゲノムワイド発現プロファイリング研究は、原発性腫瘍および細胞株において m R N A および m i R 発現の広い脱制御および不均一性 (heterogeneity) を示した。これは、数百もの候補の中から、悪性表現型および治療抵抗性において決定的に重要な m i R および m R N A を同定するにあたって複雑性および難題を強調する。しかし、The Cancer Genome Atlas (T C G A) からの頭頸部および全がん分析の近年の発表 (Cancer Genome Atlas Network Nature 5 1 7 : 5 7 6 - 5 8 2 , 2 0 1 5 ; H o a d l e y ら , C e l l 1 5 8 : 9 2 9 - 9 4 4 , 2 0 1 4) まで、複数のプラットフォームからの包括的データは、最も顕著に変化した m i R 、逆に発現される m R N A 、およびそれらの発現を駆動するゲノム変化の寄与を比較し同定するために、このような大きなデータセットから利用可能ではなかった。 40

【 0 0 5 7 】

あるいは、m i Rライブリーアーを使用する機能的スクリーニングは、H N S C Cにおける悪性表現型の異なる特徴に寄与するm i Rを同定した(L i n d e n b e r g h - v a n d e r P l a sら, C l i n . C a n c e r R e s . 1 9 : 5 6 4 7 - 5 6 5 7 , 2 0 1 3)。しかし、優先順位の決定は困難であり、腫瘍の発現プロファイリングまたはインビトロスクリーニングによって同定された多くの候補m i Rはしばしば、インビオで治療活性に翻訳されない。今までのところ、遺伝的および後生的な変化によって駆動される腫瘍抑制性m i Rは、ゲノムおよび機能の統合分析を通じてほとんど同定されていない。多様なm R N Aプログラムを制御することが示され、H N S C Cの悪性表現型、臨床上の特徴、または治療抵抗性に関与したm i Rはさらに少なかった。

【0058】

本明細書で開示されるのは、がん(例えば、1種またはこれより多くのm i R N Aの発現が変化するがん)を処置または阻害するために利用され得る、および/または被験体においてがんの診断のために利用され得るm i Rである。がんにおいて潜在的に制御性の、生物学的な、および/または治療的に重要なm i Rを同定するために、本発明者らは、構造および機能的ゲノム分析を組み合わせた統合アプローチを使用した。本発明者らは、T C G Aからのm i Rの発現および逆に相關したm R N Aの分析、ならびにH N S C C腫瘍の検証データセットと、インビトロでの抗増殖m i Rに関する機能的スクリーニングとを比較した。279個のH N S C C腫瘍標本に由来するT C G Aからのデータおよび781個のm i Rライブリーアーの機能的スクリーニングの統合は、9種の過小発現されたおよび阻害性のm i Rを明らかにし、そのうちの4種は、m i R - 3 0 - 5 p ファミリーのメンバーであった。特に、本発明者らは、減少したm i R - 3 0 a 発現が、成長因子レセプターのプログラムの過剰発現、シグナル伝達、ならびにH N S C Cの生物学および臨床上の特徴に関わる転移性m R N Aに逆に関連することを決定した。本明細書で開示されるように、腫瘍抑制におけるm i R - 3 0 - 5 p の役割は、成長因子レセプターチロシンキナーゼ、シグナル伝達、および転移に集中するいくつかの古典的がん遺伝子の制御において確認された。最後に、本明細書で開示されるのは、H N S C Cの異種移植片腫瘍モデルにおいて送達される場合に、腫瘍成長を遅らせ得る合成m i R - 3 0 a - 5 p ミミック製剤である。

【0059】

I . 略語

C N V	コピー数多型
H N S C C	頭頸部扁平上皮癌
m i R N A または m i R	マイクロR N A
R P M	1 0 0 万個の塩基対あたりのリード数
R S E M	期待値最大化法によるR N A - S e q
S C C	扁平上皮癌
T C G A	がんゲノムアトラス(The C a n c e r G e n o m e A t l a s)
X T T	3' - [1 - (フェニルアミノカルボニル) - 3 , 4 - テトラゾリウム] - ピス(4 - メトキシ - 6 - ニトロ)ベンゼンスルホン酸ナトリウム水和物

【0060】

II . 用語

別段注記されなければ、技術用語は、従来からの使用法に従って使用される。分子生物学における一般的用語の定義は、以下において見出され得る: B e n j a m i n L e w i n , G e n e s V I I , 出版: O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , 2 0 0 0 (I S B N 0 1 9 8 7 9 2 7 6 X) ; K e n d r e w ら(編), T h e E n c y c l o p e d i a o f M o l e c u l a r B i o l o g y , 出版: B l a c k w e l l P u b l i s h e r s , 1 9 9 4 (I S B N 0 6 3 2 0 2 1 8 2 9) ; および R o b e r t A . M e y e r s (編), M o l e c u l a r B i o l o g y a n d B i o t e c h n o l o g y : a C o m p r e h e n s i

10

20

30

40

50

ve Desk Reference, 出版: Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); ならびに他の類似の参考文献。

【0061】

本明細書で使用される場合、単数形の用語「1つの、ある(a)」「1つの、ある(an)」、および「上記、この、その(the)」は、状況が明らかにそうでないことを示さない限り、複数形への言及を含む。同様に、語句「もしくは、または、あるいは(or)」は、状況が明らかにそうでないことを示さない限り、「および(and)」を含むように意図される。また、本明細書で使用される場合、用語「含む、包含する(comprise)」は、「含む、包含する(include)」を意味する。よって、「AまたはBを含む(comprising A or B)」は、A、B、またはAおよびBを含むことを意味する。全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量値は、核酸またはポリペプチドに関して与えられる場合、近似値であり、そして説明のために提供されることは、さらに理解されるべきである。本明細書で記載されたものに類似または等価な方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は、以下で記載される。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体において参考として援用される。矛盾する場合、用語の説明を含め、本明細書が優先する。材料、方法および例は、例証に過ぎず、限定であることを意図しない。

10

【0062】

20

本開示の種々の実施形態の検討を促すために、以下の具体的用語の説明が提供される：

【0063】

変化した発現： miR核酸の発現における変化とは、生物学的サンプルにおいて検出可能な、例えば、コントロールに対するmiR核酸のレベルにおける変化(change)または差異(例えば、増加または減少)に言及する。発現における「変化(alteration)」は、発現における増加(アップレギュレーション)または発現における減少(ダウンレギュレーション)を含む。いくつかの例では、その差異は、コントロールまたは参照値(例えば、健康なコントロール被験体または健康なコントロール被験体の集団に由来するサンプルにおけるマイクロRNA発現の量)に対応する。

30

【0064】

がん： 分化の喪失、増加した成長速度、周りの組織への侵入、および転移能力があることを伴う、特徴的な退形成を受けた悪性新生物(例えば、腫瘍)。転移性のがんは、その転移性のがんが由来する元の(原発の)がんの元の部位以外の身体中の1またはこれより多くの部位にあるがんである。いくつかの例では、がんは、同じ組織タイプの正常または健康な組織と比較して、新生物において1またはこれより多くのmiRNAの発現が変化した(例えば、増加または減少した)状態である。例示的ながんとしては、扁平上皮癌(例えば、HNSCC)が挙げられるが、これに限定されない。

【0065】

コントロール： 「コントロール」とは、試験サンプル(例えば、健康な被験体(または健康な被験体の集団)から得られるサンプル)との比較のために使用されるサンプルまたは標準に言及する。いくつかの実施形態において、コントロールは、健康な被験体(または健康な被験体の集団)または同じ被験体に由来しかつがんと同じ組織学的タイプの非悪性組織(本明細書で「正常」コントロールともいわれる)から得られるサンプルである。いくつかの実施形態において、コントロールは、ヒストリカルコントロールまたは標準値(例えば、ベースラインまたは正常値(例えば、健康な被験体におけるベースラインまたは正常値)を表す以前に試験されたコントロールサンプルまたはサンプル群)である。いくつかの例では、コントロールは、複数のサンプルから得られる平均値(または値の平均範囲)を表す標準値(例えば、正常被験体に由来する1種またはこれより多くのmiR核酸の発現の平均値または値の範囲)である。

40

【0066】

50

有効量： 所望の応答（例えば、ある状態または疾患と関連する 1 またはこれより多くの徴候または症状を低減または阻害する）を生じるために十分である薬剤（例えば、1 種またはこれより多くの miRNA）の量。いくつかの例では、「有効量」は、腫瘍の 1 またはこれより多くの徴候または症状を処置または阻害する量である。いくつかの例では、「有効量」は、その薬剤単独でまたは 1 種もしくはこれより多くのさらなる治療とともに、所望の応答（例えば、被験体における腫瘍サイズ、被験体における腫瘍の数、被験体における腫瘍転移のサイズもしくは数の減少、および / または被験体の生存（例えば、無病生存、無転移生存、または全生存）の増加）を誘導する治療上有効な量である。

【0067】

単離された： 「単離された」生物学的構成要素（例えば、核酸分子、タンパク質、または細胞）は、他の生物学的構成要素（例えば、他の染色体および染色体外 DNA および RNA、タンパク質および細胞などの、上記構成要素が天然に存在する、生物の細胞もしくは組織において、またはその生物自体において）から離して実質的に分離または精製されている。「単離され」ている核酸分子およびタンパク質は、標準的な精製法によって精製されたものを含む。その用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸分子（マイクロ RNA を含む）およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸分子およびタンパク質を包含する。

【0068】

マイクロ RNA (miRNA)： 遺伝子発現を制御する 1 本鎖の小さな非コード RNA 分子。miRNA は一般に、約 16 ~ 27 ヌクレオチドの長さである。miRNA は、代表的には、標的 mRNA の切断を促進することによって、または細胞転写物の翻訳をブロックすることによって、遺伝子発現をモジュレートする（例えば、翻訳を増加または減少させる）。miRNA は、pri-miRNA として公知の一次転写物から前駆体（pre）-miRNA といわれる短いステム - ループ構造へと、最終的には、機能的な成熟 miRNA へとプロセシングされる。成熟 miRNA 分子は、1 種またはこれより多くのメッセンジャー RNA 分子に対して部分的に相補的であり、それらの主な機能は、遺伝子発現をダウンレギュレートすることである。本明細書で利用される場合「miR 核酸」または「miRNA 核酸」とは、pri-miRNA、pre-miRNA、miRNA 二重鎖、または成熟 miRNA のうちのいずれかに言及する。

【0069】

miRNA 配列は、公的に入手可能である。例えば、miRBase (mirbase.org) は、註釈付きの miRNA 配列の検索可能なデータベースを含む。miRNA 配列はまた、当業者に公知の他のデータベース（National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov) が挙げられる）を通じて入手可能である。当業者はまた、公的なデータベースおよびアルゴリズムを利用して、例えば、MicroCosm Targets (ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/)、TargetScan (targetscan.org)、および PicTar (pictar.mdc-berlin.de) において、特定の miRNA の標的を同定し得る。ある生物（例えば、マウス）に由来する miRNA 配列に基づいて、当業者は、その利用可能なデータベースを利用して、別の生物（例えば、ヒト）に由来する相当する miRNA を決定し得る。

【0070】

miRNA ミミックまたはミメティック： miRNA ミメティックは、天然または野生型の miRNA と同じ配列を有するが、改変された骨格、改変された塩基、および / または 5' もしくは 3' 末端改変を有する miRNA を含む。いくつかの例では、miRNA ミメティックは、分解またはヌクレアーゼ活性に対して感受性が低い可能性がある。miRNA ミミックは、少なくとも 1 つの配列改変を有し、かつ天然または野生型の miRNA と 75 % またはこれより高い配列同一性を有し、そしてまた、野生型または天然の miRNA と類似の親和性で同じ mRNA (複数可) に結合する miRNA である。開示

10

20

30

40

50

されるm i R N Aはまた、m i R N Aミメティックおよびm i R N Aミミックの両方、例えば、野生型m i R N Aに対して少なくとも1個の配列改変（例えば、75%またはこれより高い配列同一性）を有し、そしてまた、改変された骨格、塩基、および／または末端改変を有するm i R N Aであり得る。

【0071】

サンプル（または生物学的サンプル）：D N A、R N A（m R N Aを含む）、タンパク質、またはこれらの組み合わせを含む、いくつかの例では、被験体から得られる標本。例としては、末梢血、尿、唾液、組織生検、細針吸引物、手術標本、および剖検材料が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、サンプルは、腫瘍サンプル（例えば、新鮮な、凍結の、または固定された腫瘍サンプル）を含む。

10

【0072】

被験体：ヒトおよび非ヒト哺乳動物（例えば、実験用のまたは獣医学的な被験体）を含むカテゴリーの、生きている多細胞の脊椎動物の生物。

【0073】

ベクター：そのベクターが宿主細胞の中で複製および／または組み込む能力を妨害することなく、外来核酸の挿入を可能にする核酸分子。ベクターは、宿主細胞において複製することを可能にする核酸配列（例えば、複製起点）を含み得る。ベクターはまた、1種もしくはこれより多くの選択マーカー遺伝子および／または他の遺伝的エレメントを含み得る。発現ベクターは、挿入される核酸（複数可）の転写および翻訳を可能にするために必要な制御配列を含むベクターである。本明細書中のいくつかの実施形態において、そのベクターは、プラスミドベクターである。他の実施形態において、そのベクターは、ウイルスベクターである。

20

【0074】

I I I . m i R N A

本明細書で開示されるのは、がん（扁平上皮腫瘍（s q u a m o u s c e l l t u m o r）が挙げられるが、これらに限定されない）において差次的に制御されるm i R N Aである。これらのm i R N Aは、腫瘍を処置するための方法において利用され得、診断方法においても使用され得る。組成物および処置方法においても利用され得る改変m i R N Aがまた、開示される。

30

【0075】

m i R N Aは、遺伝子発現を制御する小さな非コードR N A分子である。成熟m i R N Aは一般に、約17～25ヌクレオチドの長さである。m i R N Aは、代表的には、標的m R N Aの切断を促進するか、または細胞転写物の翻訳をブロックすることによって、遺伝子発現をモジュレートする（例えば、翻訳を増加または減少させる）。m i R N Aは、「p r i - m i R N A」として公知の一次転写物から「前駆体（p r e）- m i R N A」といわれる短いステム・ループ構造へとプロセシングされる。そのp r e - m i R N Aは、m i R N A二重鎖へと、そして最終的には、機能的な成熟1本鎖m i R N Aへとプロセシングされる。m i R N A二重鎖をプロセシングする間に、一方の鎖（「パッセンジャー」鎖といわれる）は分解される一方で、他方の鎖（「ガイド」鎖）は、成熟m i R N A分子である。成熟m i R N A分子は、1種またはこれより多くのメッセンジャーR N A分子に対して部分的に相補的であり、それらの主な機能は、遺伝子発現をダウンレギュレートすることである。本明細書で開示される場合、m i R N A核酸は、前駆体m i R N A、ならびにプロセシングされたおよび成熟m i R N A核酸を含む。例えば、m i R N A核酸は、p r i - m i R N A、p r e - m i R N A、m i R N A二重鎖、または成熟m i R N A核酸であり得る。

40

【0076】

m i R N A配列は、公的に入手可能である。当業者は、m i R N A前駆体、ならびにプロセシングされたまたは成熟m i R N Aを、例えば、公的に利用可能なデータベースを利用して同定し得る。例えば、m i R Base（m i r b a s e . o r g）は、註冊付きのm i R N A配列の検索可能なデータベースを含む。m i R N A配列はまた、当業者に公知

50

の他のデータベース(National Center for Biotechnology Information(ncbi.nlm.nih.gov)が挙げられる)を通じて入手可能である。当業者はまた、公的なデータベースおよびアルゴリズムを利用して、例えば、MicroCosm Targets(ebi.ac.uk/enrichment-srv/microcosm/htdocs/targets/)、Target Scan(targetscan.org)、およびPicTar(pictar.mdc-berlin.de)において、特定のmiRNAの標的を同定し得る。ある生物(例えば、マウス)に由来するmiRNA配列に基づいて、当業者は、その利用可能なデータベースを利用して、別の生物(例えば、ヒト)に由来する相当するmiRNAを決定し得る。

10

【0077】

いくつかの例では、マイクロRNAは、標的mRNAまたは非コードRNAの切断または不安定化を活性化することによって機能し、これは、RT-PCR、インサイチュハイブリダイゼーション、FRET、ノーザンプロット、または配列決定によって検出され得る。マイクロRNAはまた、標的mRNAをタンパク質へと翻訳することを阻害することによっても機能し得、これは、ウェスタンプロット、免疫プロッティング、蛍光偏光アッセイ、酵素活性アッセイ、FRET、免疫蛍光、免疫組織化学、ELISA、または質量分析によって検出され得る。標的化mRNAまたは非コードRNAの発現における得られた変化は、多くのがん関連表現型(細胞成長、細胞死に対する抵抗、炎症促進性プロセス、増加した移動および侵入、血管新生、免疫破壊の回避、複製の不死性、低下したゲノム安定性、細胞エネルギー特性(cellular energetics)の脱制御、ならびに/または腫瘍成長および進行をもたらす後生的プロセスの脱制御が挙げられる)の抑制を生じ得る。

20

【0078】

いくつかの例では、本明細書で開示される組成物および方法において有用なmiRNA核酸は、表1に列挙される成熟miRNAを含む。他の例では、そのmiRNA核酸は、このような改変miRNAが、非改変miRNAの1またはこれより多くの機能を保持する限りにおいて、表1に列挙されるものと少なくとも75%配列同一性を有するもの(例えば、miRNAミック)を含む。例えば、miRNA核酸は、表1に列挙されるmiRNAのうちの1つの核酸配列と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の核酸配列を含むか、またはこれらからなる。開示される組成物および方法において有用なさらなるmiRNA核酸は、このような改変miRNAが非改変miRNAの1またはこれより多くの機能を保持する限りにおいて、表18、表20、表21、および表23に示される改変miRNA(ガイド鎖および/またはパッセンジャー鎖を含む)、または表18、表20、表21、および表23に示されるものと少なくとも75%の配列同一性(例えば、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性)を有するmiRNA(例えば、miRNAミメティックおよび/またはミック)を含む。いくつかの例では、表1、表18、表20、表21、または表23に示されるものと少なくとも75%配列同一性を有するmiRNAは、少なくとも1個の(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはこれより多くの)天然に存在しないヌクレオチドを含む。

30

40

【表1-1】

表1. 腫瘍において差次的に発現される例示的な成熟ヒトmiRNA

ヒト miRNA	配列	配列番号
hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	1
hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	2
hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	3
hsa-miR-30d-5p	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	4
hsa-miR-30e-5p	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG	5

【表1-2】

10

ヒト miRNA	配列	配列番号
hsa-miR-30a-3p	CUUCAGUCGGAUGUUUGCGAGC	6
hsa-miR-30b-3p	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	7
hsa-miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC	8
hsa-miR-30c-2-3p	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU	9
hsa-miR-30d-3p	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCGUC	10
hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC	11
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAUCCAGGAUAGGCU	12
hsa-miR-26a-1-3p	CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG	13
hsa-miR-26a-2-3p	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	14
hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAUUCAGGAUAGGU	15
hsa-miR-26b-3p	CCUGUUUCUCCAUUACUUGGCUC	16
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	17
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUUCCCAGGAUCCCCU	18
hsa-miR-145-3p	GGAUUCCUGGAAAACUGUUCU	19
hsa-miR-338-5p	AACAAUAUCCUGGUGCUGAGUG	20
hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	21
hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	22
hsa-miR-205-3p	GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC	23
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	24
hsa-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	25
hsa-miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	26
hsa-miR-29a-5p	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	27
hsa-miR-29b-1-5p	GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUAGA	28
hsa-miR-29b-2-5p	CUGGUUUCACAUGGUGGUUAG	29
hsa-miR-29c-5p	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC	30
hsa-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	31
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	32
hsa-miR-27b-5p	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	33
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	34
hsa-miR-101-5p	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU	35
hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGAUACUGAA	36

20

30

【0079】

40

さらなる例では、m i R N A 核酸は、m i R N A 核酸が特定のm i R N A の機能（例えば、m i R N A 標的配列へのハイブリダイゼーションまたはm i R N A 二重鎖の形成）を保持する限りにおいて、本明細書で開示されるm i R N A 核酸（例えば、配列番号1～67または配列番号72または配列番号73～158）のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列より僅かに長いかまたは短いm i R N A 核酸を含む。例えば、m i R N A 核酸は、本明細書に記載されるm i R N A のヌクレオチド配列の5'末端または3'末端での数個のヌクレオチドの欠失または付加（例えば、5'末端または3'末端からの1個、2個、3個、4個もしくはこれより多くのヌクレオチドの付加もしくは欠失、またはこれらの組み合わせ（例えば、一方の末端からの欠失および他方の末端への付加））を含み得る。特定の例では、本明細書で記載される改変m i R N A は、3'末端での1個またはこれより

50

多くのヌクレオチドの付加（例えば、m i R N A パッセンジャー鎖の 3' 末端での 1 個またはこれより多くのヌクレオチド（例えば、1 個、2 個、3 個、もしくはこれより多くのヌクレオチド）の付加）を含む。

【0080】

また、m i R N A 配列に対するバリエーション（例えば、配列番号 1 ~ 6 7 または配列番号 7 2 または配列番号 7 3 ~ 1 5 8 のうちのいずれかに示される配列のバリエーション）を含む m i R N A は、このような改変 m i R N A が非改変 m i R N A の 1 またはこれより多くの機能を保持する限りにおいて、本開示によって提供される。いくつかの例では、改変は、ガイド鎖 - パッセンジャー鎖二重鎖の増加した安定性を提供する。いくつかの例では、改変は、m i R N A において 1 個またはこれより多くのヌクレオチド（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、またはこれより多くのヌクレオチド）の置換を含む。特定の例では、改変は、m i R - 3 0 パッセンジャー鎖（例えば、m i R - 3 0 a - 5 p ）の 1 位、6 位、および 2 0 位のうちの 1 個またはこれより多くの置換を含む。10

【0081】

m i R N A ミメティック（例えば、1 個もしくはこれより多くの改変されたヌクレオチドまたは核酸アナログを含む m i R N A 核酸）がまた、提供される。いくつかの実施形態において、単離された m i R N A は、例えば、ヌクレアーゼ抵抗性を増大させる、半減期を強化する、および / または効力を改善するための、少なくとも 1 個の核酸塩基改変を含む。マイクロ R N A への適用に適した核酸塩基改変は、当該分野で周知である（例えば、米国特許出願公開番号 2 0 1 0 / 0 2 9 8 4 0 7 ; 同 2 0 0 7 / 0 2 1 3 2 9 2 ; 同 2 0 0 6 / 0 2 8 7 2 6 0 ; 同 2 0 0 6 / 0 0 3 5 2 5 4 ; 同 2 0 0 6 / 0 0 0 8 8 2 2 ; および同 2 0 0 5 / 0 2 8 8 2 4 4 を参照のこと）。20

【0082】

いくつかの例では（例えば、標的核酸分子に対するヌクレアーゼ抵抗性および / または結合親和性を増加させるために）、本開示の m i R N A は、2' - O - メチル、2' - フッ素、2' - O - メトキシエチル、2' - O - アミノプロピル、2' - アミノ糖改変および / またはホスホロチオエート結合を含む。ロックド核酸（locked nucleic acid）（L N A）、エチレン核酸（E N A）（例えば、2' - 4' - エチレン架橋核酸）およびある種の核酸塩基改変を含めることはまた、標的にに対する結合親和性を増加させ得る。オリゴヌクレオチド骨格の中にピラノース糖を含めることはまた、エンドヌクレアーゼ的な（endonucleolytic）切断を減少させ得る。さらなる改変としては、モルホリノ、ペプチド核酸（P N A）、アンロック核酸（unlocked nucleic acid）（U N A）、- L - L N A、4' - C - ヒドロキシメチル - D N A、2' - N - アダマンチルメチルカルボニル - 2' - アミノ - L N A、2' - N - ピレン - 1 - イルメチル - 2' - アミノ - L N A、E 2' - アミノエチル、2' - グアニジノエチル、2' - シアノエチル、2' - アミノプロピル、オキセタン - L N A、2' , 4' - 炭素環式 - L N A - ロックド核酸、2' , 4' - 炭素環式 - E N A - ロックド核酸、2' - デオキシ - 2' - N , 4' - C - エチレン - L N A、アルトリトリール核酸、ヘキシトリール核酸、2' - アミノエトキシメチル、および 2' - アミノプロポキシメチルが挙げられる。30

【0083】

さらなる m i R N A ミメティックとしては、改変された骨格または非天然のヌクレオシド間結合を有する m i R N A が挙げられる。改変された骨格を有するオリゴマーは、骨格の中にリン原子を保持するものおよび骨格の中にリン原子を有しないものを含む。それらのヌクレオシド間骨格の中にリン原子を有しない改変されたオリゴヌクレオチドは、一般に、当該分野で核酸塩基オリゴマーといわれる。改変されたオリゴヌクレオチド骨格を有する核酸塩基オリゴマーは、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキル - ホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホネート（3' - アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート（thionophosphoramidate）、チオノアルキルホスホネート（thionoaliphatic phosphate）40

10

20

30

40

50

l k y l p h o s p h o n a t e) 、チオノアルキルホスホトリエステル (t h i o n o a l k y l p h o s p h o t r i e s t e r) 、およびボラノホスフェート (b o r a n o p h o s p h a t e) が挙げられる) を含む。種々の塩、混合塩および遊離酸形態がまた、含まれる。

【 0 0 8 4 】

中にリン原子を含まない改変されたオリゴヌクレオチド骨格を有する m i R N A は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または 1 種もしくはこれより多くの短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式のヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらは、モルホリノ結合（部分的にヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに N 、 O 、 S および C H₂ 構成要素の部分が混合している他のものを有するものを含む。

10

【 0 0 8 5 】

他の例では、改変 m i R N A (例えば、 m i R N A ミメティック) は、 1 個またはこれより多くの置換された糖部分を含む。このような改変としては、 2' - O - メチル、 2' - メトキシエトキシ、 2' - ジメチルアミノオキシエトキシ、 2' - アミノプロポキシ、および 2' - フルオロ改変が挙げられる。改変はまた、オリゴヌクレオチドまたは他の核酸塩基オリゴマー上の他の位置、特に、 3' 末端ヌクレオチド上の糖の 3' 位においてなされ得る。核酸塩基オリゴマーはまた、糖ミメティック (例えば、ペントフラノシリル糖の代わりにシクロブチル部分) を有し得る。

20

【 0 0 8 6 】

さらなる例において、改変 m i R N A (例えば、 m i R N A ミメティック) は、 5' 末端または 3' 末端において改変を含む。このような改変としては、 m i R N A の 5' 末端において一級アミノ基 (例えば、炭素スペーサー、 例えば、アミノ - C 3 、アミノ - C 6 、またはアミノ - C 1 2 とともに) が挙げられる。さらなる末端改変としては、 U N A 、メチルホスホネート、ホスフィトレー (p h o s p h i t h o r a t e) 、逆塩基 (i n v e r t e d b a s e) 、または N - メチル - G キャップが挙げられる。

30

【 0 0 8 7 】

他の実施形態において、 m i R N A は、 2 種またはこれより多くの改変 (例えば、塩基置換、ヌクレオシド間結合での改変、改変された糖、または 5' 末端および / もしくは 3' 末端での改変から選択される 2 種またはこれより多くの改変) を含む。二重鎖 m i R N A 分子に関しては、その改変 (複数可) は、ガイド鎖、パッセンジャー鎖、または両方に存在し得る。

【 0 0 8 8 】

いくつかの例では、本明細書で開示される改変 (例えば、ミミックまたはミメティック) m i R N A 核酸としては、 5' 末端アミノ改変 (例えば、 5' - アミノ C 6 改変 (例えば、 5' - アミノ C 6 改変パッセンジャー鎖) が挙げられる。他の例では、改変 (例えば、ミミックまたはミメティック) m i R N A 核酸は、 2' 改変 (例えば、 2' - O - M e) を有する 1 個またはこれより多くのヌクレオチド (例えば、 1 個、 2 個、 3 個、 4 個、 5 個、 6 個、 7 個、 8 個、またはこれより多くのヌクレオチド) を含む。その 2' 改変ヌクレオシドは、 m i R N A に対して内部にあってもよいし (いずれの改変も、 5' 末端ヌクレオチド上にも 3' 末端ヌクレオチド上にもない) 、 5' 末端および / または 3' 末端のヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの例では、 m i R N A ガイド鎖は、 2' 改変を有する 1 個またはこれより多くのヌクレオチド (例えば、 3 ~ 1 0 個、 4 ~ 9 個、または 5 ~ 8 個のヌクレオチド) を含む。具体例において、ガイド鎖は、 1 個またはこれより多くの内部ヌクレオチド上に 2' 改変を含み、いくつかの例では、 5' または 3' 末端ヌクレオチド上に含まない。他の例では、 m i R N A パッセンジャー鎖は、 2' 改変を有

40

50

する1個またはこれより多くのスクレオチド（例えば、3～10個、4～8個、または5～7個のスクレオチド）を含む。具体例において、パッセンジャー鎖は、5'または3'末端スクレオチド上に2'改变を含むが、1個またはこれより多くの内部スクレオチドの2'改变をも含み得る。特定の非限定的例では、改变m i R N Aは、以下の表18、表20、表21、および表23に示されるものを含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、開示されるm i R N A核酸または改变（例えば、ミメティックまたはミミック）m i R N A核酸は、検出可能な標識と会合される。いくつかの例では、m i R N A核酸は、蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、クマリン、C y 3、C y 5、C y 7、またはA l e x a F l u o r（登録商標）染料）、八プテン（例えば、ジゴキシゲニンまたはM y c）、または放射活性標識に結合体化される。他の実施形態において、上記m i R N A核酸は、ペプチドまたはタンパク質と例えば、標的化された送達を促進するために）会合される（例えば、t a t、M A C V G P 1、葉酸レセプター、またはペネトラチン）。当業者は、特定の状況に依存して、さらなる検出可能な標識またはペプチドを選択し得る。10

【0090】

I V . がんを処置または阻害するための方法および組成物

腫瘍において差次的に発現されるm i R N Aが本明細書で開示される。これらm i R N Aは、被験体においてがんを処置または阻害する方法において利用され得る。従って、本明細書で開示されるのは、有効量の1種またはこれより多くのm i R N Aを被験体に投与することを包含する、該被験体においてがんを処置または阻害するための方法である。特定の例では、上記方法は、がんを有する被験体に、腫瘍においてダウンレギュレートされる1種またはこれより多くのm i R N Aを、腫瘍（例えば、扁平上皮癌）を有する被験体に投与することを包含する。20

【0091】

いくつかの実施形態において、上記方法は、腫瘍を有する被験体に、有効量の少なくとも1種の単離されたm i R - 3 0核酸（例えば、m i R - 3 0 a - 5 p、m i R - 3 0 b - 5 p、m i R - 3 0 c - 5 p、m i R - 3 0 d - 5 p、またはm i R - 3 0 e - 5 p核酸）またはそのミミックもしくはミメティック、あるいは上記m i R - 3 0核酸またはそのミミックもしくはミメティックをコードするベクターを投与することを包含する。m i R - 3 0核酸の具体的な非限定的例としては、本明細書で開示される配列番号1～11および配列番号66が挙げられる。さらなる例では、上記方法は、腫瘍を有する被験体に、有効量のバリアントまたは改变（例えば、ミミックまたはミメティック）m i R - 3 0核酸を投与することを包含する。改变m i R - 3 0核酸は、例えば、配列番号37～61および配列番号73～92から選択されるm i R - 3 0二重鎖（ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む）として投与され得る。特定の非限定的な例において、改变m i R - 3 0核酸としては、配列番号41および配列番号55を含むm i R - 3 0二重鎖、配列番号42および配列番号56を含むm i R - 3 0二重鎖、配列番号42および配列番号57を含むm i R - 3 0二重鎖、配列番号50および配列番号61を含むm i R - 3 0二重鎖、配列番号73および配列番号61を含むm i R - 3 0二重鎖、または配列番号74および配列番号61を含むm i R N A二重鎖が挙げられる。改变m i R - 3 0二重鎖のさらなる例としては、以下の表19および表22中のものが挙げられる。3040

【0092】

さらなる実施形態において、上記方法は、腫瘍を有する被験体に、有効量の、単離されたm i R - 3 0（例えば、m i R - 3 0 a - 5 p、m i R - 3 0 b - 5 p、m i R - 3 0 c - 5 p、m i R - 3 0 d - 5 p、および／もしくはm i R - 3 0 e - 5 p）、m i R - 2 6 a - 5 p、m i R - 2 6 b - 5 p、m i R - 3 7 5、m i R - 1 4 5 - 5 p、m i R - 3 3 8 - 3 p、m i R - 2 7、m i R - 2 9、もしくはm i R - 1 0 1核酸、これらのうちのいずれかのミミックもしくはミメティック、またはこれらのうちの2種もしくはこれより多くの組み合わせ（1種もしくはこれより多くの二重鎖m i R核酸または上記m i

10

20

30

40

50

R核酸(複数可)をコードするベクターを含む)のうちの1またはこれより多くを投与することを包含する。改変miR核酸は、例えば、配列番号62~67および配列番号93~158から選択される、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含むmiR二重鎖として投与され得る。

【0093】

特定の例では、上記方法は、腫瘍を有する被験体に、有効量の、miR-30、miR-145、miR-26a、およびmiR-375核酸の組み合わせを投与することを包含する。具体的な非限定的例において、上記方法は、上記被験体に、miR-30a-014(配列番号41および配列番号55)、miR-145、miR-26a、およびmiR-375の組み合わせを投与することを包含する。さらなる例において、上記方法は、表1、表3、表4、表5、表18、表20、表21、および表23のうちのいずれか1つ(例えば、2~10、4~20、6~30、10~50、またはこれより多くの)からの少なくとも2種(例えば、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、またはこれより多くの)miRNAを投与することを包含する。上記miRNAは、1本鎖miR核酸、二重鎖miR核酸(例えば、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖の二重鎖)、またはmiR核酸を含むベクターとして投与され得る。

10

【0094】

他の例では、上記方法は、腫瘍を有する被験体に、有効量の、2種またはこれより多くのmiR-30、miR-145、miR-375、およびmiR-26a核酸を投与することを包含する。いくつかの例では、上記方法は、上記被験体に、miR-30核酸(例えば、miR-30a-5p核酸または改変miR-30a核酸(例えば、表18、表19、および表21中のもの))およびmiR-145核酸を投与することを包含する。他の例では、上記方法は、上記被験体に、miR-145核酸およびmiR-375核酸を投与することを包含する。さらなる例において、上記方法は、上記被験体に、miR-30核酸(例えば、miR-30a-5p核酸または改変miR-30a核酸(例えば、表18および表19中のもの))およびmiR-375核酸を投与することを包含する。いくつかの例では、上記方法は、上記被験体に、miR-145核酸およびmiR-26a核酸を投与することを包含する。さらなる例では、上記方法は、上記被験体に、miR-26a核酸およびmiR-375核酸を投与することを包含する。他の例では、上記方法は、上記被験体に、miR-30核酸(例えば、miR-30a-5p核酸または改変miR-30a核酸(例えば、表18および表19中のもの))およびmiR-26a核酸を投与することを包含する。

20

【0095】

開示される方法は、被験体においてがんを処置または阻害するために使用され得る。例示的ながんとしては、以下が挙げられる：急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、副腎皮質癌におけるがん(Cancer in Adrenocortical carcinoma)、AIDS関連がん(例えば、カポジ肉腫、AIDS関連リンパ腫、中枢神経系原発リンパ腫)、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨がん(例えば、ユーリング肉腫ファミリー腫瘍、骨肉腫および悪性線維性組織球腫)、脳腫瘍(例えば、星状細胞腫、脳幹グリオーマ(Brain Stem, Glioma)、中枢神経系非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、中枢神経系胎児性腫瘍、中枢神経系胚細胞腫瘍、頭蓋咽頭腫、上衣腫)、乳がん、気管支腫瘍、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、心(心臓)腫瘍、中枢神経系(例えば、非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、胎児性腫瘍、胚細胞腫瘍、リンパ腫、原発性)、子宮頸がん、胆管癌、脊索腫、慢性リンパ球性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓増殖性腫瘍、結腸がん、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、非浸潤性乳管癌(DCIS)、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、鼻腔神経芽細胞腫、ユーリング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、眼のがん(例えば、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫)、卵管がん、胆囊がん、胃がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化

30

40

50

管間質腫瘍（G I S T）、胚細胞腫瘍（例えば、頭蓋外、性腺外、卵巣、精巣）、妊娠性絨毛性疾患、グリオーマ、ヘアリーセル白血病、頭頸部がん、心臓がん、肝細胞がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、膵島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍、カポジ肉腫、腎臓（例えば、腎細胞、ウィルムス腫瘍）、ランゲルハンス細胞組織球症、喉頭がん、ヘアリーセル白血病、口唇口腔がん、肝臓がん、肺がん（例えば、非小細胞、小細胞）、リンパ腫（例えば、A I D S 関連、バーキット、皮膚T細胞、ホジキン、非ホジキン、中枢神経系原発）、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、メルケル細胞癌、中皮腫、原発不明転移性扁平上皮性頸部がん、N U T 遺伝子が関与する正中腺癌、口腔がん、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性腫瘍、骨髄性白血病、多発性骨髄腫、骨髄増殖性腫瘍、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺がん、口腔がん、口腔咽頭がん、卵巣がん（例えば、上皮、胚細胞腫瘍、低悪性度腫瘍）、膵がん、膵神経内分泌腫瘍（膵島細胞腫瘍）、乳頭腫症、傍神経節腫、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、形質細胞腫瘍／多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、中枢神経系（C N S）原発リンパ腫、原発性腹膜がん、前立腺癌、直腸がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫（例えば、ユーイング肉腫、カポジ、骨肉腫、横紋筋肉腫、軟部組織肉腫、子宮肉腫、血管腫瘍）、セザリー症候群、皮膚がん（例えば、黒色腫、メルケル細胞癌、非黒色腫）、小腸がん、扁平上皮癌、胃がん、T細胞リンパ腫、皮膚、精巣がん、咽喉がん、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、原発不明癌、稀な小児期のがん（U n u s u a l C a n c e r s o f C h i l d h o o d）、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膀胱がん、血管腫瘍、外陰がん、またはウィルムス腫瘍。

【0096】

いくつかの非限定的な実施形態において、上記方法は、扁平上皮癌（S C C）（例えば、頭頸部扁平上皮癌、肺扁平上皮癌、または子宮頸部扁平上皮癌）を処置または阻害することを包含する。S C Cは、多くの異なる器官（皮膚、口唇、口腔、食道、膀胱、前立腺、肺、腎、および子宮頸部が挙げられる）において起こり得る癌タイプのがんである。それは、扁平上皮（扁平上皮細胞分化を示す上皮）の悪性腫瘍である。いくつかの例では、上記腫瘍は、H N S C C（例えば、口腔扁平上皮癌（例えば、口唇、舌、硬口蓋、口腔底、または頬粘膜の腫瘍）、口腔咽頭扁平上皮癌（例えば、軟口蓋、舌の基部、または扁桃領域の腫瘍）、下咽頭扁平上皮癌（例えば、梨状窩、咽頭後壁、または輪状後部領域の腫瘍）、鼻咽頭扁平上皮癌（例えば、上顎洞の腫瘍）、または喉頭扁平上皮癌である。他の例では、上記腫瘍は、肺S C Cまたは子宮頸部S C Cである。さらなる例において、上記腫瘍は、甲状腺の扁平上皮癌、食道S C C、皮膚の扁平上皮癌、乳房の扁平上皮癌、または膀胱の扁平上皮癌である。

【0097】

さらなる非限定的な実施形態において、上記方法は、子宮頸部の腺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、乳房腺癌、または膵臓癌を処置または阻害することを包含する。

【0098】

いくつかの実施形態において、被験体は、有効量の、本明細書で開示される1種もしくはこれより多くのm i R N Aまたは改変m i R N Aを含む組成物を投与される。本明細書で開示されるm i R N Aのうちの1種もしくはこれより多く（例えば、2種、3種、4種、5種、またはもしくはこれより多くのm i R N A）を含む薬学的組成物は、選択される特定の投与様式に依存して、適切な固体または液体のキャリアとともに製剤化され得る。本開示において有用な薬学的に受容可能なキャリアおよび賦形剤は、従来どおりである。例えば、R e m i n g t o n : T h e S c i e n c e a n d P r a c t i c e o f P h a r m a c y , T h e U n i v e r s i t y o f t h e S c i e n c e s i n P h i l a d e l p h i a , E d i t o r , L i p p i n c o t t , W i l l i a m s , & W i l k i n s , P h i l a d e l p h i a , P A , 第21版（2005）を参照のこと。例えば、非経口製剤は、通常は、薬学的および薬理学的に受容可能な流体ビヒクル（例えば、水、生理食塩水、他の平衡塩類溶液、水性デ

10

20

30

40

50

キストロース、グリセロールなど)である注射用流体を含む。固体組成物(例えば、粉剤・散剤(powder)、丸剤、錠剤、またはカプセル剤形態)に関しては、従来の非毒性固体キャリアとしては、例えば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与されるべき薬学的組成物は、少量の非毒性補助物質(例えば、潤滑剤または乳化剤、保存剤、pH緩衝化剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート)を含み得る。含まれ得る賦形剤は、例えば、他のタンパク質(例えば、ヒト血清アルブミンまたは血漿調製物)である。

【0099】

当業者は、例えば、処置されている腫瘍のタイプ、疾患進行の程度、被験体の年齢、健康状態および性別、被験体のサイズ(例えば、体重および/または身長)、および投与経路などの因子を考慮して、被験体に投与されるべき有効量の開示されるm i R核酸(またはm i R核酸の組み合わせ)を容易に決定し得る。例えば、有効量は、処置されるべき被験体のおよその体重に基づき得る。このような有効量は、任意の適切な経路によって投与され得る。いくつかの例では、被験体に投与されるべき有効量のm i R核酸(またはm i R核酸の組み合わせ)は、体重の約5 μg / kg ~ 約100 mg / kg、例えば、約100 μg / kg ~ 約10 mg / kg、約1 mg / kg ~ 約25 mg / kg、約20 mg / kg ~ 約40 mg / kg、約30 mg / kg ~ 約50 mg / kg、または約40 mg / kg ~ 約100 mg / kgの範囲に及ぶ。1つの非限定的な例において、投与される量は、約5 mg / kgのm i R核酸(またはm i R核酸の組み合わせ)である。

【0100】

いくつかの実施形態において、上記組成物は、例えば、特定の用量の個々の投与に適した単位投与形態で投与される。いくつかの例では、単位投与量は、約1 mg ~ 約5 gの1種またはこれより多くのm i R核酸分子(例えば、約5 mg ~ 約50 mg、約10 mg ~ 約200 mg、約100 mg ~ 約2.5 g、約250 mg ~ 約1 g、または約500 mg ~ 約5 g)を含む。いくつかの例では、単位投与量は、約1 mg、5 mg、10 mg、25 mg、50 mg、100 mg、250 mg、500 mg、750 mg、1 g、1.5 g、2 g、2.5 g、3 g、4 g、または5 gの1種またはこれより多くのm i R核酸を含む。

【0101】

当業者はまた、被験体への開示されるm i R核酸(またはm i R核酸の組み合わせ)の投与のための適切な投与レジメンを容易に決定し得る。例えば、上記m i R核酸(複数可)は、被験体へと1回(例えば、1回の注射または蓄積物(deposition)として)または反復用量で投与され得る。いくつかの例では、m i R核酸(またはm i R核酸の組み合わせ)は、所望の治療転帰(例えば、腫瘍の1もしくはこれより多くの徵候または症状の低減)を達成するために、必要な場合に長期間にわたって毎日1回もしくは2回、1週間に2回、1週間に3回、毎週、2週間に1回、または毎月投与される。他の例では、上記m i R核酸(複数可)は、連続様式で(例えば、ポンプ、埋没物、または連続放出性剤を使用して)投与される。

【0102】

治療剤は、当該分野で公知の任意の適切な手段を使用して、処置の必要性のある被験体に投与され得る。投与の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 腸管内、皮内、筋肉内、腹腔内、非経口、静脈内、皮下、腔、直腸、鼻内、吸入、経口、または遺伝子銃によって。鼻内投与とは、片方または両方の鼻腔を介して鼻または鼻経路へと組成物を送達することをいい、噴霧機構または飛沫機構によるか、または核酸のエアロゾル化を介する送達を含み得る。吸入器による組成物の投与は、鼻または口腔を通って、噴霧機構または飛沫機構による送達を介するものであり得る。送達は、挿管法を介して呼吸系のうちのいずれかの領域へと直接であり得る。非経口投与は一般に、注射によって達成される。注射剤は、従来の形態において、液体溶液もしくは懸濁物、注射前の溶液もしくは液体中の懸濁物に適した固体形態、またはエマルジョンとしてのいずれかで調製され

10

20

30

40

50

得る。注射用液剤および懸濁剤は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製され得る。投与は、全身または局所であり得る。特定の非限定的例において、投与は、静脈内である。他の例では、投与は、皮下、筋肉内、または腹腔内である。当業者は、治療剤（複数可）、処置されている状態、被験体の健康状態および処置歴、ならびに他の関連する臨床因子に依存して、適切な投与経路を選択し得る。

【0103】

治療剤は、任意の適切な様式において、好ましくは、薬学的に受容可能なキャリアとともに投与され得る。薬学的に受容可能なキャリアは、投与されている特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって、一部決定される。よって、本開示の薬学的組成物の広く種々の適切な製剤が存在する。

10

【0104】

非経口投与のための調製物は、滅菌した水性または非水性の液剤、懸濁剤、およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物性油（例えば、オリーブ油）、および注射用有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）である。水性キャリアとしては、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョンもしくは懸濁液（塩類および緩衝媒体が挙げられる）が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸添加リングル、または不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養素補充物（nutrient replenisher）、電解質補充物（例えば、リングルデキストロースに基づくもの）などが挙げられる。保存剤および他の添加剤もまた、存在し得る（例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどのような）。

20

【0105】

局所投与のための製剤としては、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、スプレー剤、液体および粉剤・散剤が挙げられ得る。従来の薬学的キャリア、水性基剤、粉末基剤または油性基剤、濃化剤などは、必要であり得るか、または望ましい場合がある。

【0106】

経口投与のための組成物としては、粉剤・散剤または粒剤、水または非水性媒体中の懸濁剤または液剤、カプセル剤、サシェ、錠剤が挙げられる。濃化剤、矯味矯臭剤、希釈剤、乳化剤、分散補助物質または結合剤は、望ましい場合がある。

30

【0107】

組成物のうちのいくつかは、潜在的に、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアノ酸、硫酸、およびリン酸）、および有機酸（例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ビルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸）との反応によって、または無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム）、および有機塩基（例えば、モノアルキル、ジアルキル、トリアルキルおよびアリールアミンならびに置換エタノールアミン）との反応によって形成される薬学的に受容可能な酸付加塩または塩基付加塩として投与され得る。

40

【0108】

いくつかの実施形態において、リポソームは、開示されるm i R核酸またはm i R核酸の組み合わせを被験体に送達するために使用される。リポソームはまた、遺伝子生成物の血中半減期を増加させ得る。本明細書で開示される組成物および方法における使用に適切なリポソームは、標準的な小胞形成脂質から形成され得、これは一般に、中性または負に荷電したリン脂質およびステロール（例えば、コレステロール）を含む。脂質の選択は一般に、いくつかの因子（例えば、所望のリポソームサイズおよび血流中のリポソームの半減期）を考慮することによってガイドされる。特定の例において、リポソームは、1種またはこれより多くの開示されるm i R核酸およびカチオン性脂質（例えば、ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェート（D O T A P）およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（D O P E））で形成される。

50

【0109】

種々の方法が、リポソームを調製するために当該分野で公知である（例えば、Szokala, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467, 1980；ならびに米国特許第4,235,871号；同第4,501,728号；同第4,837,028号；および同第5,019,369号を参照のこと）。いくつかの実施形態において、ポリマーは、miR核酸を被験体に送達するために使用され得る。治療用RNA分子を送達するために使用され得るカチオン性脂質およびポリマーは、記載されている（例えば、Zhangら, J Control Release. 123(1): 1-10, 2007；Vorhiesら, Methods Mol. Biol. 480: 11-29, 2009；および米国特許出願公開番号2009/0306194を参照のこと）。いくつかの例では、リポソームはさらに、腫瘍への複合体の標的化を増加させる分子（例えば、トランスフェリンレセプターに結合する分子（例えば、抗トランスフェリンレセプター抗体またはそのフラグメント））を含む。一例において、リポソームは、抗トランスフェリンレセプター一本鎖抗体フラグメントを含む（例えば、Piroliolら, Hum. Gene Ther. 17: 117-124, 2006；Piroliolら, Cancer Res. 67: 2938-2943, 2007を参照のこと）。さらなる標的化分子としては、葉酸レセプター、EGFR、MET、ROR1、GLUT1、カドヘリン、CD44、PSMA、およびMAGEが挙げられる。ポリペプチドキャリアはまた、miR核酸を被験体に投与するために使用され得る（例えば、Rahbekら, J. Gene Med. 10: 81-93, 2008を参照のこと）。当業者は、さらなる標的化分子またはポリペプチドキャリアを同定し得る。

【0110】

いくつかの実施形態において、上記方法は、開示されるmiRNA核酸またはそのミミックもしくはミメティック（例えば、配列番号1～67および配列番号72、配列番号73～158、またはそのミミックおよび／もしくはミメティックのうちのいずれか）のうちの1種またはこれより多くをコードするベクターを投与することを包含する。開示される方法における使用のためのベクターは、非ウイルス（例えば、プラスミド）またはウイルス（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス）起源のものであり得る。適切なベクター（例えば、遺伝子治療ベクター）は、当該分野で周知である。

【0111】

いくつかの例では、上記miRNA核酸は、任意の適切なプロモーターを使用して組換え環状または線状DNAプラスミドから発現される。プラスミドからRNAを発現するために適切なプロモーターとしては、例えば、U6またはH1 RNA pol I I I プロモーター配列、サイトメガロウイルスプロモーター、SV40プロモーター、またはメタロチオネインプロモーターが挙げられる。他の適切なプロモーターの選択は、当該分野の技術範囲内である。組換えプラスミドはまた、miR遺伝子生成物の発現のために誘導性または制御性のプロモーターを含み得る。

【0112】

1つの非限定的な実施形態において、miRNA核酸は、RNA前駆体分子としてプラスミドから発現され、その前駆体分子は、標的細胞内で機能的または成熟miRNAへとプロセシングされる。miRNAを発現するために適したプラスミドの選択、核酸配列をプラスミドへと挿入して遺伝子生成物を発現するための方法、およびその組換えプラスミドを目的の細胞へと送達するための方法は、当該分野の技術範囲内である（例えば、Zengら, Mol. Cell 9: 1327-1333, 2002；Tuschl, Nat. Biotechnol., 20: 446-448, 2002；Brummelkarnpら, Science 296: 550-553, 2002；Miyagishiら, Nat. Biotechnol. 20: 497-500, 2002；Paddisonら, Genes Dev. 16: 948-958, 2002；

10

20

30

40

50

2002; Leeら, Nat. Biotechnol. 20:500-505
 , 2002; および Paulら, Nat. Biotechnol. 20:505-508, 2002を参照のこと)。

【0113】

本開示はまた、被験体を、m i R N A 核酸のうちの 1 種またはこれより多くの組み合わせを用い、がんの処置において有用な 1 種またはこれより多くの他の薬剤と組み合わせて処置するための方法を包含する。例えば、本開示の化合物は、有効用量の、1 種またはこれより多くの腫瘍治療（手術、化学療法剤、放射線、遺伝子治療、ホルモン療法、免疫療法、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド治療が挙げられるが、これらに限定されない）と組み合わせて投与され得る。熟練した臨床医は、処置されている腫瘍のタイプ、被験体の臨床歴、全体的な状態、および他の因子に基づいて、適切な治療の組み合わせを選択し得る。用語「組み合わせての投与」または「共投与」とは、活性薬剤または治療の同時および逐次的な投与の両方に言及する。

【0114】

化学療法剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アルキル化剤（例えば、ナイトロジエンマスター（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミド、およびメルファラン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ホテムスチン、ロムスチン、およびストレプトゾシン）、白金化合物（例えば、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、および B B R 3 4 6 4）、ブルファン、ダカルバジン、メクロレタミン、プロカルバジン、テモゾロミド、チオテバ、およびウラムスチン；代謝拮抗物質（例えば、葉酸（例えば、メトトレキサート、ペメトレキセド、およびラルチトレキセド）、プリン（例えば、クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、およびチオグアニン）、ピリミジン（例えば、カペシタビン）、シタラビン、フルオロウラシル、およびゲムシタビン）；植物アルカロイド（例えば、ポドフィルム（例えば、エトポシド、およびテニポシド）、タキサン（例えば、ドセタキセルおよびパクリタキセル）、ビンカ（例えば、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルビン））；細胞傷害性 / 抗腫瘍抗生物質（例えば、アントラサイクリンファミリーメンバー（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、およびバルルビシン）、ブレオマイシン、ヒドロキシウレア、およびマイトイマイシン）；トポイソメラーゼインティビター（例えば、トポテカンおよびイリノテカン）；モノクローナル抗体（例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、パニツムマブ、およびトラスツズマブ）；光増感剤（例えば、アミノレブリン酸、アミノレブリン酸メチル、ポルフィルマーナトリウム、およびベルテポルフィン）；ならびに他の薬剤（例えば、アリトレチノイン、アルトレタミン、アムサクリン、アナグレリド、三酸化ヒ素、アスピラギナーゼ、ベキサロテン、ボルテゾミブ、セレコキシブ、デニロイキンジフチトクス、エルロチニブ、エストラムスチン、ゲフィチニブ、ヒドロキシカルバミド、イマチニブ、ペントスタチン、マソプロコール、ミトタン、ペグアスパラガーゼ、およびトレチノイン）。

【0115】

特定の例において、被験体が H N S C C を有する場合、化学療法剤としては、シスプラチニン、カルボプラチニン、セツキシマブ、ベバシズマブ、エルロチニブ、ブレオマイシン、パクリタキセル / カルボプラチニンまたはこれらのうちの 2 種もしくはこれより多くの組み合わせが挙げられる。別の例において、被験体が肺 S C C を有する場合、化学療法剤としては、単独で、またはエトポシド、ゲムシタビン、パクリタキセル、ビノレルビン、トポテカン、もしくはイリノテカンとの組み合わせにおいて、シスプラチニンまたはカルボプラチニンが挙げられる。当業者は、がんのタイプ、がんのステージ、がんの分子プロファイル、ならびに被験体の健康状態および処置歴のような因子に基づいて、適切なさらなる処置（例えば、化学療法）を選択し得る。

【0116】

V . 腫瘍を診断するための方法

10

20

30

40

50

本明細書で開示されるのは、被験体における腫瘍を診断するための方法である。いくつかの例では、上記方法は、例えば、コントロールと比較して、被験体に由来するサンプル中の1種またはこれより多くのm i R N Aの量の変化（例えば、増加または減少）を検出することによって、被験体における腫瘍を同定することを包含する。いくつかの例では、上記方法は、腫瘍を有すると診断された被験体に処置を投与することをさらに包含する。一例において、上記被験体は、1種またはこれより多くのm i R N Aの減少した量（例えば、コントロールと比較した場合）を発現する腫瘍を有すると診断され、有効量の、低下した発現を有する上記1種またはこれより多くのm i R N Aを含む組成物が上記被験体に投与される。

【0117】

本明細書で記載される方法において使用されるサンプル（例えば、組織または他の生物学的サンプル）は、当該分野で公知の任意の方法を使用して調製され得る。サンプルとしては、被験体から得られるか、排出されるか、または分泌される任意の固体もしくは流体サンプルが挙げられる。例えば、サンプルは、例えば、血液、血漿、血清、尿、胆汁、腹水、唾液、脳脊髄液、房水もしくは硝子体液、または任意の身体分泌物、漏出物、滲出物（例えば、膿瘍または感染もしくは炎症の任意の他の部位から得られる流体）から得られる生物学的流体、あるいは関節（例えば、正常な関節または疾患に罹患した関節）から得られる流体であり得る。サンプルはまた、任意の器官もしくは組織（生検または剖検の標本（例えば、腫瘍生検）を含む）から得られるサンプルであり得るか、または細胞（初代細胞もしくは培養細胞に拘わらず）または任意の細胞、組織もしくは器官によって馴化した培地を含み得る。特定の実施形態において、上記サンプルは、腫瘍サンプルまたは血液サンプルを含む。上記サンプルは、慣用的スクリーニングのために被験体から、または障害（例えば、腫瘍）を有すると疑われる被験体から得られ得る。

【0118】

いくつかの実施形態において、上記方法は、m i R - 3 0（例えば、m i R - 3 0 a - 5 p、m i R - 3 0 b - 5 p、m i R - 3 0 c - 5 p、m i R - 3 0 d - 5 p、またはm i R - 3 0 e - 5 p）、m i R - 2 6 a - 5 p、m i R - 2 6 b - 5 p、m i R - 1 4 5 - 5 p、m i R - 3 3 8 - 3 p、m i R - 3 7 5、m i R - 2 7、m i R - 2 9、またはm i R - 1 0 1のうちの1種またはこれより多くの量を、被験体に由来するサンプル（例えば、その被験体に由来する腫瘍サンプル）中で検出することを包含する。他の実施形態において、上記方法は、表1、表3、表4、表5、表18、および表20（下記）に列挙される1つまたはこれより多くのm i R N Aの量を検出することを包含する。特定の例では、上記方法は、上記m i R の成熟形態、または上記m i R の前駆体形態（例えば、p r i - m i R N Aまたはp r e - m i R N A）のいずれかの発現を検出することを包含する。代表的には、m i R 検出法は、配列特異的検出（例えば、R T - P C R またはマイクロアレイ分析による）を包含する。m i R 特異的プライマーおよびプローブは、当該分野で公知の（例えば、ワールドワイドウェブでm i r b a s e . o r g において入手可能な）前駆体および成熟m i R 核酸配列を使用して設計され得る。

【0119】

上記方法のうちのいくつかの実施形態において、1種またはこれより多くのm i R 核酸の発現の変化（例えば、発現における統計的に有意な増加または減少）は、被験体に由来するサンプル中で、少なくとも2倍（例えば、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍（約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約30倍、および約100倍が挙げられる））である。いくつかの例では、検出される変化は、コントロール（例えば、参照値または健康なコントロール被験体）と比較した場合の発現における増加または減少である。いくつかの例では、その検出される増加または減少は、コントロールまたは標準と比較して、少なくとも2倍の増加または減少である。差次的な発現の決定のために、サンプルに対して比較するためのコントロールまたは標準は、健康な被験体（または健康な被験体の集団）から得られるサンプルまたはヒストリカルコントロールまたは標準値（例えば、以前に試験されたコントロールサン

10

20

30

40

50

フルまたはベースラインもしくは正常値（例えば、健康な被験体におけるベースラインもしくは正常値）を表すサンプル群）を含む。いくつかの例では、コントロールは、複数のサンプルから得られた平均値（または平均的な値の範囲）（例えば、正常な被験体からの1種またはこれより多くのm i R核酸の発現の平均値または平均的な値の範囲）を表す標準値である。

【0120】

いくつかの実施形態において、上記方法はさらに、腫瘍と診断された被験体にとって適切な治療を提供することを包含する。いくつかの例では、上記治療は、1種またはこれより多くのm i R N A核酸の発現を阻害する薬剤（例えば、コントロールと比較して被験体に由来するサンプル中でアップレギュレートされると同定されるm i R核酸を阻害する薬剤）を投与することを包含する。他の例では、上記治療は、1種またはこれより多くのm i R核酸（例えば、コントロールと比較して被験体に由来するサンプル中でダウンレギュレートされると同定される1種またはこれより多くのm i R核酸）（例えば、I V節に記載されるとおり）を投与することを包含する、薬剤を投与することを包含する。

10

【0121】

以下の実施例は、ある特定の特徴および／または実施形態を例証するために提供される。これらの実施例は、本開示を、記載される特定の特徴または実施形態に限定すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【0122】

20

実施例1

材料および方法

H N S C C患者サンプル：新鮮な凍結H N S C C組織および粘膜サンプルを、I R B承認プロトコルの一部としてU n i v e r s i t y o f M i c h i g a n M e d i c a l C e n t e rから集めた。そのH N S C C患者の臨床的特徴づけを、表2にまとめた。その集めた組織を急速凍結し、O C T凍結媒体（F i s h e r）にマウントし、7マイクロメートル切片に切り出し、H & E標準法によって染色した。その染色したスライドを、S C A N S C O P E画像獲得デバイス（A p e r i o）を使用してスキャンし、I M A G E S C O P Eソフトウェア（A p e r i o）で調べて、腫瘍または粘膜扁平上皮の存在を担保した。その染色したスライドを使用して、組織ブロックを大きく切り出して（m a c r o d i s s e c t）、各サンプルにおいて所望の扁平上皮腫瘍または上皮細胞の最低70%を達成した。

30

【表2】

表2. ヒトHNSCC標本に特徴的な腫瘍、処置、および転帰

標本	性別	年齢	原発部位	ステージ/TNM	分化	喫煙/パック	アルコール/禁酒
2900	M	57	舌側縁部	T2N0M0	中程度	NA	NA
3100	M	75	舌前部	T1N0M0	低	MD	MD
3300	F	60	舌側縁部	T3N1M0	中程度	NA	NA
4300	F	47	舌側縁部	T3N0M0	高	Y/14	NA
4500	F	25	舌前部	T4N2cM0	中程度	NA	NA
8200	M	72	扁桃	T4N0M0	高	Y/150	Y
8400	M	44	舌側縁部	T2N0M0	高	Y/20	Y/Y
8500	F	40	舌側縁部	T2N0M0	高	NA	NA
8800	M	47	口腔底	T4N2bM0	中程度	Y/45	Y
4400	F	41	口腔底	T1N0M0	高	Y/60	Y/Y
7300	M	55	口腔底	T4N2cM0	高	Y/30	Y
7500	F	71	硬口蓋	T4N0M0	中程度	NA	NA
7800	M	55	舌側縁部	T4N2bM0	低	Y/60	Y/Y
8300	F	50	舌側縁部	T2N0M0	高	Y/28	NA

口腔からのHNSCC腫瘍標本を、University of Michiganから得、UMSCと明示した。原発部位、原発腫瘍の出所;TNM、腫瘍ーリンパ節ー転移(ステージ分類システム)。Y:はい;NA:該当なし。

10

20

【0123】

H N S C C サンプルからのマイクロRNA単離、ライプラリー調製および配列決定：大きなRNAおよび小さなRNAを、改訂された製造業者のプロトコルに従って、*miRNA™ miRNA isolation Kit (Life Technologies)*を使用して精製した。15～20mgの凍結組織を、1mLのTRIZOL (Invitrogen) 中でTissueLyser II組織粉碎機 (Qiagen) を使用してホモジナイズした。ホモジナイズした後、標準的なフェノール-クロロホルム法を使用して抽出を行った。その抽出した水相に、10% 添加剤(v/v)を添加し、次いで、大きなRNAおよび小さなRNAを分画するための標準的な製造業者のプロトコルを行った。RNA濃度を、NANODROP分光計 (Thermo Scientific) を使用して決定し、全RNA完全性を、RNA 6000 Nanoキット (Agilent Technologies) を使用してBioanalyzer 2100機器で検証した。小さなRNAを富化したサンプル中にマイクロRNAが十分存在していることを、small RNAキット (Agilent Technologies) を使用してBioanalyzerによって検証した。

30

【0124】

小さなRNAの配列決定ライプラリーを、*SOLID™ Total RNA - Seq Kit (Life Technologies)*を使用して製造業者のプロトコルによって構築した。簡潔には、1μgの富化した小さなRNA(<200塩基)を、配列決定アダプターへとライゲーションするために使用した。cDNAライプラリーを、逆転写し、次いで、変性尿素10% PAGE上での分離によってサイズ選択した。18～38ヌクレオチドの挿入サイズに相当するバンドを切り出した。次いで、そのライプラリーを、インゲルPCR (gel PCR) によって増幅およびバーコード付加 (barcode) した。ライプラリーサイズを、DNA 1000キットを使用してBioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) で検証した。cDNAライプラリー濃度を、SOLID™ライプラリータクマニ定量キットによるRT-PCRによって決定した。8種のcDNAライプラリーの等量(equal parts)を、一緒にマルチプレックス化し、0.6pmolのマルチプレックス化したプールを、SOLID™ EZ Bead™システムとE20試薬とを使用するエマルジョンPCRのために使用した。乳化、増幅、およびビーズ富化を、製造業者のプロトコルに従つ

40

50

て行った。各プールの富化したビーズを、 SOLiD™ pre-deposition plus kit を使用して製造業者のプロトコルに従って 3' 標識した。4 × 10⁸ 個のビーズを、 6 レーンフローチップの 1 レーンあたりに置き、次いで、そのフローチップの配列決定を、 SOLiD™ 5500 システム次世代配列決定機と SOLiD™ Small RNA SP Kit (Life Technologies) とで行った。

【0125】

マイクロ RNA マッピング、発現プロファイリング定量、および示差的存在量分析 (Differential Abundance Analysis) : 配列決定リードを、 LifeScope™ 2 (Life Technologies) 中の miRNA モジュールを使用してヒト参照ゲノム Hg 19 にマッピングした。下流のステップを主に、 miRDeep 2 ソフトウェアパッケージ (Friedlaenderら, Nature Biotechnology 26: 407 - 415, 2008) を使用して行った。簡潔には、 sam 形式でのマッピング結果を、 miRDeep 2 で使用される arf 形式に変換し、翻って、 miRDeep 2 . pl スクリプトを使用して、デフォルト設定を使用して配列決定結果における公知のおよび新規の miRNA 全てを同定した。最後に、その同定した miRNA 全てを、これらに割り当てられたリード数に基づいて定量し、そのサンプルにおける 100 万あたりの総カウントを使用して正規化した。

【0126】

リードカウントインプットマトリクスおよび FDR 閾値 0.05 での SAMseq's (samr v2.0, R 3.0.2) 2 クラスの対応のない分析 (two-class unpaired analyses) を使用して、差次的に発現される miRNA を同定した。各実行から、ファイルの対：遺伝子「アップ」、および「ダウン」を生成し、次いで、そのフィルタリングした結果を中央値ベースの倍数変化によってランク付けした。

【0127】

miRNA 階層的クラスター分析 : マイクロ RNA 発現の階層的クラスター分析を、ノートブックから Partek Genomics Suite 6.6 を使用して行った。RPM (100 万あたりのリード数) で正規化したマイクロ RNA 発現を、正常サンプルおよび腫瘍サンプルの両方にわたって分散によってランク付けし、上位 50% の最も多いバリエントマイクロ RNA を選択して、低い発現物を除去した。腫瘍標本と粘膜標本との間で差次的に発現されたマイクロ RNA を比較し、両側スチューデントの T 検定の後に p 値 < 0.05 によってフィルタリングした。発現データを、平均発現に合わせて調整し、次いで、ピアソンの相違度アルゴリズム (Pearson's dissimilarity algorithm) と完全連結法とを使用して階層的クラスター化を行った。

【0128】

HNSCC TCGA データにおける miRNA - mRNA 対を同定する統合分析 : 279 個の腫瘍標本に関する miRNA および mRNA 存在量を、レベル 3 のデータ (ワールドワイドウェブで t c g a - d a t a . n c i . n i h . g o v / d o c s / p u b l i c a t i o n s / h n s c _ 2 0 1 4 において入手可能) から抽出した。 5 p 鎮および 3 p 鎮の miRNA リードカウントを、 miRBase 註釈付き miRNA に整列させた RPM に対して正規化した。 miRNA を、サンプル間にわたる RPM 分散によってランク付けし、少なくとも 50% RPM の最小発現を伴う最も可変性の 50% を、統合分析のために使用した。遺伝子発現を、 RNA - Seq データから RSEM v1.1.1 32 で計算し、最小の非ゼロ RSEM 値 (0.0033) でゼロを置き換えた。遺伝子のうちの最も相違する 50% を、統合分析のために使用した。 miRNA および mRNA 発現データの両方を、 log₂ 変換した。

【0129】

マルチステップアプローチを、 miRNA - mRNA 標的の関係性を同定するために適用した。線形回帰を使用して、入手可能な推定ツールとともに、 miRNA 標的データベ

10

20

30

40

50

ースからm i R N A およびm R N A 発現のペアワイズ負相関を同定した。グローバルm i R N A - m R N A 相互作用の高い信頼性のデータセットを生成した。

【0130】

コピー数多型 (C N V) データ分析： 279個の腫瘍標本のコピー数データを、レベル3データから抽出した。各遺伝子と関連するC N V数を、相当するゲノム位置におけるセグメント化G I S T I C 5値として定義した。I n t e g r a t i v e G e n o m i c s V i e w e r (I G V) を使用して、コピー数データを可視化した。線形回帰を適用して、m i R N A 発現とC N Vとの間の相関関係を評価した。

【0131】

T C G A D N A メチル化データ分析： D N A メチル化データ分析のために、本発明者らは、T C G A (T h e C a n c e r G e n o m e A t l a s , N a t u r e 517 : 576 - 582 , 2015) からの 279 個の腫瘍標本に関するレベル3 D N A メチル化データを使用した。そのデータを、I l l u m i n a ヒトメチル化 450 k アレイからの 値 () として表した。m i R - 30 ファミリーからのm i R N A のプロモーター領域におけるC p G プローブは、P R O M i R N A (ワールドワイドウェブでp r o m i r n a . m o l g e n . m p g . d e l において入手可能 ; M a r s i c o ら , G e n o m e B i o l . 14 : R 84 , 2013) から転写開始部位 (T S S) の座標を使用して見出した。そのプロモーター領域を、T S S から ± 1500 b p として特定した。あらゆるC p G プローブに関して、本発明者らは、非メチル化サンプル (< 0 . 1) とメチル化サンプル (> 0 . 3) との間のm i R N A 存在量の差異を、t 検定を使用して概算した。t 検定からB H 較正P値 (F D R) を使用して、閾値として 0 . 05 を使用して非メチル化群とメチル化群との間で有意に差次的に発現されるC p G プローブを見出した。次いで、メチル化 値を、m i R あたりの有意なプローブにわたって平均し、その対応するm i R 発現と、スピアマンの相関検定を使用して相関させた。

【0132】

生存分析： R 生存統計パッケージ、バージョン 2 . 37 - 2 (ワールドワイドウェブでC R A N . R - p r o j e c t . o r g / p a c k a g e = s u r v i v a l において入手可能) を使用して、全生存時間を分析し、カプラン - マイヤープロットを生成し、ログランク検定 p 値を計算した。被験体を、低m i R N A 発現 (< 中央値) および高m i R N A 発現 (中央値) として、カットオフとしての各m i R N A の中央値発現を使用して二分した。全生存時間をC N V によって比較するために、被験体を、彼らのG I S T I C コピー数値が - 0 . 1 未満である場合に、M I R 3 0 E / A 欠失を有すると分類し、そうでなければ、彼らが欠失を有しないと考えた。

【0133】

m i R - 30 遺伝子変化および発現と、T C G A データベースからのH N S C C のステージ、部位、喫煙およびH P V 状態との関連： フィッシャーの正確度検定を使用して、m i R - 30 a 発現 / メチル化と臨床的特徴との間、またはm i R - 30 e 発現 / コピー数喪失と臨床的特徴との間の関連を評価した。統計分析を、R バージョン 3 . 2 . 2 を使用して行った。有意性を、 $p < 0 . 05$ として定義した。腫瘍部位を、その腫瘍サンプルが以下の解剖学的細区画のうちのいずれに由来する場合に、口腔と分類した： 頬粘膜、口腔底、硬口蓋、口唇、口腔、口腔舌、および歯槽突起；腫瘍部位を、その腫瘍サンプルが扁桃、舌の基部または中咽頭に由来する場合に中咽頭として分類した。

【0134】

m i R - 30 a 発現と推定標的遺伝子との逆相関： 線形回帰分析を、以前に記載されるように (C a n c e r G e n o m e A t l a s , N a t u r e 517 : 576 - 582 , 2015) 行って、m i R - 30 a - 5 p の発現とその推定標的遺伝子との間の逆の関連性を、H N S C C T C G A データベースを使用して評価した。線形回帰からのP値により、逆の関連性の統計的有意性を評価する。

【0135】

H N S C C 細胞株： 10 個のH N S C C 細胞株のパネルを、U n i v e r s i t y 50

of Michigan 扁平上皮癌 (UM - SCC) シリーズから得た (Brennerら, Head Neck 32 : 417 - 426, 2010)。これらの UM - SCC 細胞株の起源を、Brennerらに記載されるように、9 個のマーカーでの遺伝子型決定によって確認した。株の保存された凍結ストックを、培養の 3 ヶ月以内に使用した。UM - SCC 細胞株を、10% ウシ胎仔血清、ペニシリンおよびストレプトマイシン (100 µg / mL)、MEM 非必須アミノ酸、およびピルビン酸ナトリウム (1 mM) を補充した最小必須培地で培養した。口腔歯肉粘膜に由来するヒト初代口腔ケラチノサイト (HOK) を、Lonza から購入し、コントロール細胞株として使用した。その細胞を、5 繼代未満にわたって、栄養補助剤入り無血清口腔ケラチノサイト培地 (Science Cell) の中で培養した。

10

【0136】

インビトロマイクロ RNA ミミック生存性スクリーニング：細胞を、非必須アミノ酸およびピルビン酸ナトリウムを補充した 10% 熱不活化ウシ胎仔血清 (FBS) を含む MEM 中で維持した。トランスフェクションを、384 ウェルプレート (Corning 3570) 中で行った。細胞生存性を、CELLTITER - GLO リミネッセント細胞生存性アッセイ (Promega) を使用して測定した。トランスフェクションのために、LIPOFECTAMINE RNAiMAX 試薬 (0.1 µL) を含む 20 µL の無血清培地を、miRNA ミミック (0.8 pmol) を含むウェルに添加した。脂質および miRNA ミミックを、MEM、20% FBS 中の 1500 個の細胞を添加する前に 45 分間周囲温度で複合体化させて、MEM、10% FBS 中の 20 nM miRNA ミミックを含む最終トランスフェクション混合物を得た。

20

【0137】

スクリーニング作戦を、Sanger miRBase 13.0 に基づいてかつ約 800 ミミックからなる miRNA ミミックライブラリー (Qiagen) に対して行った。生存性 (CellTiter Glo, Promega) を、PerkinElmer Envision 2104 Multilabel プレートリーダーでトランスフェクションの 72 時間後にアッセイした。Ambion SILENCER Select 隣性コントロール #2 を、正規化のために全てのスクリーニングプレートに組み込んだ (16 ウェル / プレート；各プレートでの隣性コントロール値の中央値を使用して、サンプルウェルを正規化した)。Qiagen's All Stars Cell Death コントロールを、陽性のトランスフェクションコントロールとして組み込んだ (16 ウェル / プレート)。全てのスクリーニングプレートは、0.6 より大きいアッセイ z' - factor を示した。隣性コントロールで正規化した生存性データを、絶対偏差の中央値 (MAD) を使用してロバスト Z スコアへと変換した (Chungら, J. Biomol. Screen 13 : 149 - 158, 2008)。

30

【0138】

mRNA 標的に対する RT - PCR 検証： 2×10^5 UM - SCC - 46 細胞を、6 ウェルプレートの各ウェルに入れた。15 nM の mirVana マイクロ RNA ミミックまたはインヒビター (Life Technologies) を、3.75 µL の LIPOFECTAMINE RNAiMAX (Life Technologies) を使用して標準的な製造業者のプロトコルによって 48 ~ 72 時間、逆トランスフェクトした。次いで、細胞を、通常媒体および PBS で洗浄し、0.5 mL TRIZOL 試薬の中に集めた。全 RNA を、mirVana miRNA 単離キット (Ambion) を使用して精製した。2 µg の全 RNA を、high capacity cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems) を使用して製造業者の指示に従って逆転写した。mRNA 発現レベルを、リアルタイム PCR によって、TAQMAN 遺伝子発現アッセイ (Applied Biosystems) を使用して評価し、40 ng の cDNA を各反応において使用した。反応を、ABI 7900 HT リアルタイム PCR 機器で実行した。発現レベルを、内因性負荷コントロールとしての 18S RNA に対して正規化した。

40

50

【0139】

ウェスタンブロッティング： U M - S C C - 4 6 細胞を、上記に記載されるようにトランスフェクトし、次いで、 $100\mu\text{L}$ のSDS溶解緩衝液(1% SDS、50 mM Tris pH 8.0、10 mM EDTA、Protease inhibitor (Roche)、およびHalt Phosphatase Inhibitor (Thermo Scientific))へと溶解した。サンプルを、プローブソニケーターを使用して5秒間×4回(各々氷上で)超音波処理した。溶解物を、 $14,000\times g$ において10分間、4で遠心分離することによって清澄にした。タンパク質濃度を、BCA Protein Assay (Thermo Scientific)を使用して決定した。 $25\mu\text{g}$ の全タンパク質を、4~12%勾配Bis-Trisゲル(Invitrogen)でSDS-PAGEに供した。タンパク質を、 $0.45\mu\text{m}$ PVDF IMMobilon-FL膜(Millipore)に、XCELL転写システム(Invitrogen)を使用して転写した。プローブするために使用した一次抗体を、以下に列挙する。適切なIRDye蛍光標識二次抗体を、1:5000の希釈率においてODYSSEY(登録商標) Quantitative Fluorescent image rで、標準的な製造業者のプロトコル(LI-COR)を使用して検出のために使用した。バンドを、Odyssey画像化ソフトウェアバージョン3.0.30を使用して定量した。

【0140】

一次抗体：EGFR 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #4405)、FRZD2 1:500希釈(Abcam, #52565)、IRS1 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #3407)、ITGA6 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #3750)、IGF1R 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #3018)、MET 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #8198)、Pan-AKT 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #2920)、pi-AKT Ser473 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #4060)、Src 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #2110)、pi-Src Tyr416 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #2101)、Stat3 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #9139)、pi-Stat3 Ser727 1:1000希釈(Cell Signaling Technology, #9134)。

【0141】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ：Renillaルシフェラーゼの後ろにクローニングした、EGFR、IGF1R、MET、およびIRS1の野生型または変異体3'UTRをコードするベクターを、Switchgear Genomicsから購入した。細胞を、白色底の96ウェルプレートにおいて 1×10^4 /ウェルで播種した。翌日に、 100ng のベクターおよび 15nM のマイクロRNAミミックを、 $0.2\mu\text{L}$ のDharmaFECT™ Duoトランスフェクション試薬(Thermo Scientific)を使用して共トランスフェクトした。細胞を、48時間インキュベートした。細胞数の正規化のために、 $100\mu\text{L}$ のCELLTITER-FLUOR細胞生存性アッセイ試薬(Promega)を各ウェルに添加し、細胞を30分間、37でインキュベートした。蛍光を、 505nm において細胞生存性を評価するために読み取った。ルシフェラーゼ活性を、Renilla-Glo(登録商標) Luciferase Assay System(Promega)を使用して製造業者の指示に従って検出した。相対的ルシフェラーゼ活性を、各ウェルの蛍光生存性読み取りに対して正規化した。全ての測定値は、各実験条件において6つの複製の平均を表す。

【0142】

10

20

30

40

50

X T T 増殖アッセイ： 細胞を、96 ウェルプレートにおいて 2×10^3 細胞 / ウェルで播種し、15 nM オリゴヌクレオチドで 48 時間、上記に記載されるように 0.15 μ L の RNA i MAX とともに逆トランスフェクトした。トランスフェクションの後に、200 μ L のコントロールまたは 2 μ M シスプラチンを含む培地を、細胞上に 3 時間置いた。細胞を、温かい培地で洗浄し、次いで、新鮮な培地を添加した。細胞増殖を、示された日数で、3' - [1 - (フェニルアミノカルボニル) - 3, 4 - テトラゾリウム] - ビス (4 - メトキシ - 6 - ニトロ) ベンゼンスルホン酸ナトリウム水和物 (X T T) Cell Proliferation Kit (Roche Diagnostics) を用いて製造業者の指示に従ってアッセイした。X T T アッセイ試薬を、アッセイ前に 4 時間添加した。各時点で、吸光度を 450 nm および 655 nm で読み取り、吸光度を計算した。全ての時点は、各実験条件における 6 回の反復の平均を表す。

10

【0143】

移動アッセイ： 細胞を、6 ウェルプレートにおいて 4×10^5 細胞 / ウェルで播種し、15 μ M オリゴヌクレオチドで 48 時間、上記で記載されるように逆トランスフェクトした。トランスフェクションの後に、培地を交換し、p1000 ピペットチップを用いて各ウェルの横方向および縦方向に、細胞がないスクラッチを作製した。各スクラッチにおいて 4 つの印を付けた位置を、 $100 \times$ 倍率で種々の時点で画像化した。そのスクラッチの領域を、Image J ソフトウェアを使用して決定し (Schneiderら, Nat. Methods 9 : 971 - 675, 2012)、その空の領域への経時的な移動のパーセントを、計算した。

20

【0144】

MATRIGEL 侵入アッセイ： 細胞を、6 ウェルプレートに播種し、15 nM オリゴヌクレオチドで 48 時間、上記のように RNA i MAX とともに逆トランスフェクトした。トランスフェクションの後に、細胞をトリプシン処理し、添加物なしの DMEM 中に懸濁した。BioCoatTM Growth Factor Reduced Invasion Chambers を、製造業者の指示 (BD Biosciences) に従って調製した。 5×10^4 細胞を、各チャンバの上側に置いた。チャンバの底側を、DMEM 中の化学誘因物質として 100 ng / mL rEGF (Millipore) を含むウェルの中に置いた。チャンバを 24 時間、37°においてインキュベートした。侵入していない細胞を、侵入膜の上側をこすり取ることによって除去し、侵入している細胞を、メタノール中の 0.05% クリスタルバイオレット溶液で 1 分間染色した (Sigma)。侵入膜をスライドカラスにマウントし、侵入している細胞を $100 \times$ 倍率でカウントした。

30

【0145】

コロニー形成アッセイ： 細胞を、6 ウェルプレートに播種し、15 nM オリゴヌクレオチドで 48 時間、上記のように RNA i MAX とともに逆トランスフェクトした。トランスフェクションの後に、細胞をトリプシン処理し、種々の密度で 6 ウェルプレートに再プレートした。細胞を、11 日間インキュベートし、次いで、0.1% クリスタルバイオレット / メタノール溶液で染色した。>50 細胞を有するコロニーを 3 連のウェルにおいてカウントし、生存する細胞の割合を計算した。

40

【0146】

抗トランスフェリンレセプター 1 本鎖抗体フラグメントを有する mi R 30a ナノ粒子の開発： ナノ粒子インビオ送達を試験する蛍光 siRNA は、TriLink Biotechnologies によって合成され、リボソームへのオリゴヌクレオチドの製剤化を、以前に記載されるように行った (Piroli oら, Hum. Gene Ther. 17 : 117 - 124, 2006; Piroli oら, Cancer Res. 67 : 2938 - 2943, 2007; Yula, Nucleic Acids Res. 32 : e48, 2004)。簡潔には、1 : 1 モル比の、各 1 本鎖アンチセンスおよびコグネットセンスオリゴヌクレオチドをアニールした。カチオン性リポソーム (ジオレオイルトリメチルアンモニウムホスフェート (DOTAP) およびジオ

50

レオイルホスファチジルエタノールアミン(D O P E)、A v a n t i P o l a r L i p i d s , A l a b a s t e r , A L)を、1 : 1モル比においてエタノール注射法によって調製した(X u ら , N o l . M e d . 7 : 7 2 3 - 7 3 4 , 2 0 0 1)。抗トランスフェリンレセプター1本鎖抗体フラグメント(T f R s c F v)を、1 : 3 0 (w / w)という以前に確立した比においてリポソームと混合した(Y u ら , N u c l e i c A c i d s R e s . 3 2 : e 4 8 , 2 0 0 4)。そのm i R N A 分子をその後、1 μg s i R N A 対 7 n m o l リポソームの比の混合物へと添加し、続いて、M a l v e r n Z e t a s i z e r 3 0 0 0 H S (M a l v e r n , W o r c e s t e r s h i r e , U K)での動的光散乱によって最終のイムノリポソーム製剤のナノサイズ粒子分布のサイズ分けおよび確認を行った。m i R - 3 0 a ミミックオリゴヌクレオチドとガイド鎖配列 5 ' - U G U A A A C A U C C U C G A C U G G A A G C U - 3 ' (配列番号 1)およびパッセンジャー鎖配列 5 ' - A G C U U C C A G U C G G A U G U U U A C A C G - 3 ' (配列番号 7 2)は、T r i l i n k B i o t e c h n o l o g i e s によって合成された。アニーリング後に、上記ミミックを上記のように製剤化した。複合体化したm i R 3 0 a ミミックを、m i R - 3 0 a - s c L と称する。

10

【 0 1 4 7 】

インビボ腫瘍標的化および成長アッセイ： 全ての動物実験を、N I D C D の動物実験委員会が承認したプロトコルの下で行い、全米研究評議会の実験動物の管理と使用に関する指針(1 9 9 6)に従った。6 ~ 8週齢の無胸腺n u / n u 雌性マウス(F r e d e r i c k C a n c e r R e s e a r c h a n d D e v e l o p m e n t C e n t e r , N C I から得た)の右脚に、1 0 0 μL の 3 0 % T y p e 3 B M E C u l t r e x (T r e v i g e n) / M E M 培地中の $2 \times 1 0^6$ U M - S C C - 4 6 細胞を皮下(s . c .)注射した。腫瘍が一旦約 1 0 0 mm³ に達した後(注射のおよそ 1 週間後)、マウスを処置(各々 n = 4 ~ 5 マウス)；コントロールおよびm i R - 3 0 a - s c L のために 4 群に無作為化した。3 m g / k g m i R - 3 0 a - s c L の 9 用量を、月曜日、水曜日、および金曜日(M W F)に 3 週間にわたって、合計 9 用量、尾静脈注射によって投与した。腫瘍サイズを、外部キャリパーで M W F に測定し、容積を式 V = 1 / 2 L * W² で計算した。腫瘍成長を、平均容積と平均の標準誤差として報告する。カプラン - マイヤー生存分析を、G r a p h P a d P R I S M ソフトウェア(v 6 . 0 5)で行った。生存統計をログランク(マンテル - コックス)検定を使用して行い、ハザード比を、ログランク検定を介して計算した。

20

【 0 1 4 8 】

免疫蛍光： 新鮮な腫瘍を、O C T の中に包埋し、次いで、ドライアイス上で急速凍結した。腫瘍組織を、5 μm 切片へと切り出した。切片を、7 分間、- 2 0 において氷冷メタノール(E M D M i l l i p o r e C o r p o r a t i o n , B i l l i e r i c a , M A) 中で固定した。次いで、サンプルを 3 回 P B S で洗浄した。切片を、室温において 1 時間、ブロッキング溶液 1 (1 × P B S 中に 3 % B S A + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0) とともに加湿チャンバ中でインキュベートし、続いて、ブロッキング溶液 2 (1 × P B S 中に 1 0 % N G S) とともに 1 時間インキュベートすることによって、ブロッキングした。次いで、切片を、希釈溶液(1 × P B S 中に 1 % B S A + 0 . 1 % T w e e n 2 0) 中で希釈した一次抗体とともに一晩 4 において加湿チャンバ中でインキュベートした。細胞を 1 × P B S で 5 回洗浄した後、そのスライドを、D A P I (V e c t o r L a b o r a t o r i e s I n c , B u r l i n g a m e , C A) を有する V e c t a s h i e l d 封入剤で暗所中マウントした。サンプルを、L S M 7 8 0 共焦点顕微鏡(C a r l Z e i s s M i c r o i m a g i n g , T h o r n w o o d , N Y) で分析した。共焦点データを、Z e n 2 0 1 2 S P 1 (ブラックエディション) ソフトウェアを使用して分析し、色の強度の程度を、Z e n 2 0 1 2 (ブルーエディション) ソフトウェアを使用して確かめた。

30

【 0 1 4 9 】

40

50

実施例 2

H N S C C 組織におけるm i R - 3 0 ファミリーメンバーの減少した発現

H N S C C 組織において差次的に発現されるm i R N A (m i R s) を調べるために、2 7 9 の H N S C C と T C G A (C a n c e r G e n o m e A t l a s 2 0 1 5) によって公開された 1 6 の粘膜扁平上皮コントロール標本のm i R 配列決定データを、分析した。腫瘍標本と粘膜標本との間の差次的発現分析を介して、1 2 9 のm i R (7 7 の増加したm i R および 5 3 の減少したm i R を含む (F D R < 0 . 2 ; 表 3 、図 1 ; 図 2 A および 2 B)) を同定した。これらの観察を、口腔由来の 1 3 の H N S C C 標本および University of Michigan からの 9 個のマッチした粘膜サンプルの独立したパネルのm i R 配列決定および発現分析によって検証した (表 4) 。両方のデータセットにおいて有意に変化しあつ検証されたm i R のペアワイズ比較は、m i R - 3 0 ファミリーのいくつかのメンバーおよび以前の研究において同定されたいつかのm i R の減少した発現を明らかにした (図 2 C および 図 2 D ; 表 3 および 表 4) 。顕著なことは、m i R - 3 0 - 5 p ファミリーメンバーは、両方のコホートにおいて標本のうちの > 7 0 % にわたって少なくとも 2 倍の発現の減少を示した。

10

20

30

【表 3 - 1】

表3. HNSCC(TCGAセット)において差次的に発現されたmiRNA

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
増加した発現					
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	12	1799.9	2.848	0
hsa-miR-196b-5p	MIMAT0001080	101	1719.9	6.054	0
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	126	1714.45	5.598	0
hsa-miR-106b-3p	MIMAT0004672	150	1699.15	2.131	0
hsa-let-7d-3p	MIMAT0004484	142	1658.35	1.833	0
hsa-miR-151a-5p	MIMAT0004697	123	1634.75	2.301	0
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	124	1620.05	2.205	0
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	103	1554.25	2.837	0
hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	43	1513.55	1.724	0
hsa-miR-1307-3p	MIMAT0005951	132	1488.5	1.985	0
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	83	1418.85	1.965	0
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	79	1402.75	1.853	0
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	4	1402.05	1.483	0

【表3-2】

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
hsa-miR-2355-5p	MIMAT0016895	133	1388.9	2.368	0
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	110	1374.6	3.458	0
hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261	45	1361.35	2.469	0
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	16	1347.85	1.547	0
hsa-miR-99b-3p	MIMAT0004678	151	1333.4	1.798	0
hsa-miR-181a-5p	MIMAT0000256	42	1325.4	1.582	0
hsa-miR-182-5p	MIMAT0000259	44	1308.85	2.178	0
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	24	1282.15	2.317	0
hsa-miR-589-5p	MIMAT0004799	128	1276.8	1.686	0
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	117	1236.75	1.574	0
hsa-miR-103a-3p	MIMAT0000101	30	1230.4	1.437	0
hsa-miR-92b-3p	MIMAT0003218	112	1223.3	2.018	0
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	109	1221.2	1.906	0
hsa-miR-944	MIMAT0004987	131	1211.9	1.928	0
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	33	1171.35	1.551	0
hsa-miR-542-3p	MIMAT0003389	115	1155.65	1.97	0
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	23	1132.25	1.612	0
hsa-miR-423-3p	MIMAT0001340	102	1129.25	1.848	0
hsa-miR-708-5p	MIMAT0004926	130	1119.8	1.866	0
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	57	1097.6	1.473	0
hsa-miR-148b-3p	MIMAT0000759	99	1097.4	1.442	0
hsa-miR-484	MIMAT0002174	107	1084.6	1.556	0
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	97	1063.8	1.875	0
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	56	1049.75	1.504	0
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	53	1038	2.3	0
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	8	1025.6	1.404	0
hsa-miR-210-3p	MIMAT0000267	49	1022.25	2.406	0
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	51	1021.1	1.716	0
hsa-miR-151a-3p	MIMAT0000757	98	1020.25	1.43	0
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	145	1015.45	1.452	0
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	86	993	1.334	0
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	9	991.5	1.816	0
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	5	983.4	1.6	0
hsa-miR-193a-5p	MIMAT0004614	121	929.5	1.591	0
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	7	929	1.501	0
hsa-miR-708-3p	MIMAT0004927	154	915.35	1.55	0
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	63	898.15	1.336	0
hsa-miR-181a-3p	MIMAT0000270	136	878.8	1.372	0
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	70	859.15	1.539	0
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	71	810.95	2.349	0
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	89	778.8	1.323	0
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	113	738.3	1.38	0
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	48	721.95	1.562	0
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	146	708.95	1.506	0.113

10

20

30

40

【表3-3】

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	92	695.85	1.406	0.212
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	52	690	1.721	0.212
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	11	687.7	1.623	0.212
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	116	678.25	1.683	0.212
hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	84	667.55	1.401	0.212
hsa-miR-625-3p	MIMAT0004808	153	655.6	1.371	0.212
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	85	631.85	1.358	0.311
hsa-miR-192-5p	MIMAT0000222	32	629.6	1.233	0.311
hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494	143	615.1	1.748	0.406
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	80	613.95	1.177	0.406
hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	14	578.15	1.224	0.602
hsa-miR-200c-5p	MIMAT0004657	149	536.1	1.448	0.787
hsa-miR-98-5p	MIMAT0000096	25	525.65	1.1	0.787
hsa-miR-629-5p	MIMAT0004810	129	505.75	1.178	0.974
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	15	482.85	1.075	1.311
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	76	477.95	1.237	1.311
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	50	477	1.227	1.311
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	66	430.8	1.419	1.838
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	20	402.7	1.09	2.323
hsa-miR-22-3p	MIMAT0000077	13	391.85	1.163	2.479
減少した発現					
hsa-miR-101-3p	MIMAT0000099	28	-1893.1	0.269	0
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	27	-1867.35	0.259	0
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	137	-1849.95	0.417	0
hsa-miR-375	MIMAT0000728	93	-1819.6	0.029	0
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	26	-1811.3	0.207	0
hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	3	-1629.3	0.286	0
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	22	-1600.15	0.391	0
hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	90	-1598	0.522	0
hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419	59	-1545.15	0.414	0
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	46	-1544.4	0.398	0
hsa-miR-378a-5p	MIMAT0000731	139	-1537.6	0.396	0
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	61	-1530.95	0.467	0
hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	100	-1482.1	0.397	0
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	21	-1469.7	0.474	0
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	87	-1439.25	0.286	0
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	135	-1417.6	0.332	0
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	17	-1361.5	0.595	0
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	119	-1347.05	0.579	0
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	94	-1330.5	0.489	0
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	40	-1282	0.485	0
hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	58	-1268.4	0.656	0
hsa-miR-203a-3p	MIMAT0000264	47	-1176.7	0.409	0
hsa-miR-381-3p	MIMAT0000736	96	-1054.75	0.376	0

10

20

30

40

【表3 - 4】

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	108	-983.9	0.474	0
hsa-miR-379-5p	MIMAT0000733	95	-980.65	0.527	0
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	138	-881.8	0.687	0
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	18	-879.55	0.691	0
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	35	-874.45	0.712	0
hsa-miR-199b-3p	MIMAT0004563	118	-869.1	0.71	0
hsa-miR-582-3p	MIMAT0004797	127	-720.2	0.693	0.964
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	105	-692.2	0.458	1.299
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	73	-639.75	0.709	2.003
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	67	-633.15	0.651	2.003
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	34	-611.7	0.695	2.633
hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100	29	-580.2	0.837	2.633
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	39	-569.5	0.596	2.758
hsa-miR-206	MIMAT0000462	82	-535.9	0.05	2.88
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	68	-535.8	0.793	2.88
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	41	-508.05	0.787	3.023
hsa-miR-127-5p	MIMAT0004604	120	-497.3	0.875	3.023
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	74	-483.45	0.779	3.137
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	38	-475.45	0.846	3.274
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	36	-466.6	0.899	3.274
hsa-miR-144-5p	MIMAT0004600	148	-412.75	0.565	3.864
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	60	-404.5	0.895	3.992
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	54	-390.75	0.933	4.118
hsa-miR-17-3p	MIMAT0000071	134	-349.75	0.852	4.713
hsa-miR-374a-3p	MIMAT0004688	152	-314.95	0.808	5.143
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	111	-276.15	0.894	5.982
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	77	-271.75	0.823	5.982
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	78	-195	0.779	7.762
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	2	-184.35	0.97	8.004
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	1	-174.75	0.898	8.242

【0 1 5 0】

【表4 - 1】

表4. HNSCC(UMSCセット)において差次的に発現されたmiRNAの検証

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
増加した発現					
hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852	1414	54.65	3.3E+09	0
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	1416	54.55	1.5E+09	0
hsa-miR-517b-3p	MIMAT0002857	1415	52.95	3.3E+09	0
hsa-miR-132-5p	MIMAT0004594	167	49.8	3.551	0
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	1467	46.5	4.807	0
hsa-miR-223-5p	MIMAT0004570	365	45.5	10.963	0
hsa-miR-29b-1-5p	MIMAT0004514	415	45.35	4.115	0
hsa-miR-2355-5p	MIMAT0016895	373	42.1	2.314	4.332
hsa-miR-196a-5p	MIMAT0000226	292	41.3	11.348	4.332
hsa-miR-196b-5p	MIMAT0001080	294	41.15	14.732	4.332

10

20

30

40

50

【表4-2】

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
hsa-miR-181a-3p	MIMAT0000270	241	40.4	4.319	5.56
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	242	39.3	4.229	5.56
hsa-miR-941	MIMAT0004984	1722	39.15	4.512	5.56
hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	1382	39.05	18.902	5.56
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	166	38.4	1.889	6.749
hsa-miR-520f-3p	MIMAT0002830	1445	36.75	2.5E+08	6.749
hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	1701	36.5	11.27	6.749
hsa-miR-519d-3p	MIMAT0002853	1434	35.95	3.7E+08	7.95
hsa-miR-515-3p	MIMAT0002827	1407	35.8	2.6E+08	7.95
hsa-miR-519e-3p	MIMAT0002829	1435	35.15	1.5E+08	7.95
hsa-miR-520g-3p	MIMAT0002858	1446	35.1	3.1E+08	7.95
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	1447	35	4.2E+08	7.95
hsa-miR-301b-3p	MIMAT0004958	421	34.95	2.786	7.95
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	825	34.75	3.119	7.95
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	332	34.55	8.413	7.95
hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	1068	34.5	2.6	7.95
hsa-miR-542-3p	MIMAT0003389	1466	34.15	2.303	8.87
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	254	33.75	2.669	9.747
hsa-miR-187-3p	MIMAT0000262	258	33.05	4.158	11.136
hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	400	32.15	2.285	11.764
hsa-miR-450b-5p	MIMAT0004909	1024	32.05	2E+08	11.764
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	16	32	3.185	11.764
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	1067	31.45	3.077	13.442
hsa-miR-1256	MIMAT0005907	92	31.1	2.352	15.247
hsa-miR-518d-5p	MIMAT0005456	1423	29.65	1.3E+08	20.059
hsa-miR-34c-5p	MIMAT0000686	614	29.6	2.194	20.059
hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	203	29.3	3.4E+08	20.059
hsa-miR-214-5p	MIMAT0004564	347	29.15	2.011	20.059
hsa-miR-29a-5p	MIMAT0004503	413	29.15	1.772	20.059
減少した発現					
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	19	-53.5	0.548	0
hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	1730	-52.65	0.408	0
hsa-miR-375	MIMAT0000728	741	-51.5	0.036	0
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	319	-50.5	0.103	0
hsa-miR-92b-3p	MIMAT0003218	1710	-48.4	0.352	0
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	824	-47.25	0.553	0
hsa-miR-1247-5p	MIMAT0005899	82	-46.75	0.092	0
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	187	-46.15	0.344	0
hsa-miR-99a-3p	MIMAT0004511	1731	-45.75	0.267	0
hsa-miR-125b-2-3p	MIMAT0004603	99	-45.65	0.302	0
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	445	-44.15	0.318	0
hsa-miR-193a-3p	MIMAT0000459	284	-42.75	0.321	0
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	657	-42.4	0.393	0
hsa-miR-378b	MIMAT0014999	750	-40.9	0.307	0

10

20

30

40

【表4-3】

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	585	-40.35	0.42	0
hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	595	-40.1	0.276	0
hsa-miR-497-5p	MIMAT0002820	1368	-39.95	0.319	0
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	1707	-39.8	0.639	0
hsa-miR-378e	MIMAT0018927	753	-39.65	0.347	0
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	438	-39.4	0.452	0
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	391	-38.85	0.435	0
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	290	-38.7	0.429	0
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	442	-37.9	0.386	0
hsa-miR-210-3p	MIMAT0000267	334	-37.3	0.477	2.822
hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	447	-37.15	0.434	2.822
hsa-miR-423-3p	MIMAT0001340	823	-37.05	0.513	2.822
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	440	-36.8	0.488	2.822
hsa-miR-136-3p	MIMAT0004606	181	-35.4	0.319	2.822
hsa-miR-200b-5p	MIMAT0004571	313	-35.4	0.548	2.822
hsa-miR-24-1-5p	MIMAT0000079	381	-35.4	0.641	2.822
hsa-miR-378d	MIMAT0018926	752	-35.1	0.365	2.822
hsa-miR-378g	MIMAT0018937	755	-34.95	0.364	2.822
hsa-miR-887-3p	MIMAT0004951	1692	-34.85	0.249	2.822
hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	320	-34.5	0.405	2.822
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	1691	-34.4	0	2.822
hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	335	-34	0.074	2.822
hsa-miR-378f	MIMAT0018932	754	-33.95	0.361	2.822
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	362	-33.8	0.596	2.822
hsa-miR-23c	MIMAT0018000	379	-33.65	0.598	2.822
hsa-miR-378c	MIMAT0016847	751	-33.45	0.516	2.822
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	742	-32.85	0.483	4.58
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	591	-32.75	0.218	4.58
hsa-miR-378i	MIMAT0019074	757	-32.5	0.558	4.58
hsa-miR-378a-3p	MIMAT0000732	748	-32.45	0.477	4.58
hsa-miR-378h	MIMAT0018984	756	-32.45	0.296	4.58
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	97	-32.4	0.624	4.58
hsa-miR-381-3p	MIMAT0000736	762	-32.35	0.129	4.58
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	380	-32.3	0.856	4.58
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	1351	-32.1	0.172	4.58
hsa-miR-664a-3p	MIMAT0005949	1647	-32.1	0.34	4.58
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	1461	-32	0.37	4.58
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	439	-31.65	0.429	4.58
hsa-miR-95-3p	MIMAT0000094	1726	-31.5	0.444	5.174
hsa-miR-337-5p	MIMAT0004695	594	-30.9	0.251	5.478
hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	627	-29.85	0.601	7.87
hsa-miR-874-3p	MIMAT0004911	1683	-29.85	0.397	7.87
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	310	-29.55	0.326	8.977
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	198	-29.25	0.65	9.861

【表4-4】

miRNA	MIMAT ID	Geneind	スコア	倍数変化	q 値
hsa-miR-4284	MIMAT0016915	862	-28.7	0.281	10.464
hsa-miR-377-5p	MIMAT0004689	747	-28.65	0.133	10.464
hsa-miR-30e-3p	MIMAT0000693	448	-28.55	0.585	10.464
hsa-miR-33b-5p	MIMAT0003301	601	-28.2	0.313	10.746
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	1666	-28.2	0.396	10.746
hsa-miR-186-5p	MIMAT0000456	256	-27.35	0.516	13.582
hsa-miR-499a-5p	MIMAT0002870	1372	-27	0	14.255
hsa-miR-141-3p	MIMAT0000432	190	-26.75	0.471	14.255
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	394	-26.7	0.667	14.255
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	244	-26.45	0.399	14.255
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	173	-26.35	0.106	14.255
hsa-miR-203a-3p	MIMAT0000264	318	-26.3	0.51	14.255
hsa-miR-136-5p	MIMAT0000448	180	-26.25	0.628	14.968
hsa-miR-376c-3p	MIMAT0000720	745	-25.95	0.294	14.968
hsa-miR-3622a-5p	MIMAT0018003	647	-25.9	0	14.968
hsa-miR-154-5p	MIMAT0000452	226	-25.85	0.397	14.968
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	172	-25.75	0.099	14.968
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	1543	-25.7	0.434	14.968
hsa-mir-1280	MIMAT0005946	132	-25.65	0.425	14.968
hsa-miR-149-5p	MIMAT0000450	214	-25.65	0.473	14.968
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	346	-25.6	0.492	14.968
hsa-miR-1291	MIMAT0005881	146	-25.3	0	16.057
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	101	-25.2	0.627	16.057
hsa-miR-484	MIMAT0002174	1348	-25.15	0.525	16.057
hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	375	-24.9	0.79	16.057
hsa-miR-99b-5p	MIMAT0000689	1732	-24.9	0.676	16.057
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	304	-24.7	0.562	16.435
hsa-miR-1271-5p	MIMAT0005796	118	-24.45	0.624	16.686
hsa-miR-1268a	MIMAT0005922	111	-24.3	0	16.933
hsa-miR-186-3p	MIMAT0004612	257	-24.1	0.396	17.415
hsa-miR-3615	MIMAT0017994	635	-24.1	0.37	17.415
hsa-miR-422a	MIMAT0001339	822	-23.7	0	18.026
hsa-miR-1249-3p	MIMAT0005901	84	-23.4	0.287	18.627

【0151】

実施例3

m i R - 3 0 ファミリーメンバーは、H N S C C 増殖を阻害する

【0152】

独立した機能的ゲノミクススクリーニングを、781のm i R のライブラリーをヒトH N S C C 株 U M - S C C - 1へとトランスクレクトした後に行って、増殖を阻害した候補m i R を同定した(表5)。疾患生物学に対する関連性を有するm i R に関するスクリーニングヒットを豊富にするために、高い抗増殖活性(M A Dスコア < - 1)を示したm i R を、T C G A およびU M S C 両方の検証データベースにおける配列プロファイリングによって低下した発現をも示したm i R に対してフィルタリングした(図3Aおよび3B)。腫瘍標本において減少した発現を有する9個のm i R を同定した。これは、機能的ゲノムスクリーニングの間に再発現された場合に、有意な阻害活性を示した(図3C)。顕著なことには、m i R - 3 0 - 5 p ファミリーのいくつかのメンバーは、m i R のこの高度

10

20

30

40

50

に選択されたクラスの中で再び存在し、これは、H N S C C における m i R - 3 0 - 5 p ファミリーメンバーの生物学的および機能的重要性を裏付ける。これらの中で、m i R - 3 0 a - 5 p および m i R - 3 0 e - 5 p は、粘膜サンプルの中で最も高度に発現され、腫瘍標本にわたって減少していた（図 3 D）。

【表 5 - 1】

表5. HNSCC増殖を阻害する候補miRNA

遺伝子	シグナル	MAD スコア	MIMAT ID
hsa-miR-29b-1-5p	4.187766	-2.2489101	MIMAT0004514
hsa-miR-593-5p	8.12201	-2.0705311	MIMAT0003261
hsa-miR-603	9.64568	-2.0014477	MIMAT0003271
hsa-miR-137	10.4889	-1.9632159	MIMAT0000429
hsa-miR-217	10.51062	-1.9622312	MIMAT0000274
hsa-miR-570-3p	10.55155	-1.9603754	MIMAT0003235
hsa-miR-27b-5p	13.10053	-1.8448044	MIMAT0004588
hsa-miR-216b-5p	13.18732	-1.8408692	MIMAT0004959
hsa-miR-589-5p	14.47781	-1.7823586	MIMAT0004799
hsa-miR-9-5p	14.53328	-1.7798433	MIMAT0000441
hsa-miR-145-5p	15.30917	-1.7446645	MIMAT0000437
hsa-miR-96-5p	15.68504	-1.7276227	MIMAT0000095
hsa-miR-657	15.87208	-1.7191421	MIMAT0003335
hsa-miR-608	17.80167	-1.6316544	MIMAT0003276
hsa-miR-619-3p	18.3711	-1.6058364	MIMAT0003288
hsa-miR-548o-3p	18.76871	-1.5878087	MIMAT0005919
hsa-miR-26a-5p	18.84667	-1.584274	MIMAT0000082
hsa-miR-633	19.39796	-1.5592783	MIMAT0003303
hsa-miR-542-5p	19.68481	-1.5462724	MIMAT0003340
hsa-miR-330-3p	20.29708	-1.5185119	MIMAT0000751
hsa-miR-1272	20.4797	-1.5102322	MIMAT0005925
hsa-miR-136-5p	20.69347	-1.5005399	MIMAT0000448
hsa-miR-1236-3p	20.87731	-1.4922045	MIMAT0005591
hsa-miR-375	21.15436	-1.4796432	MIMAT0000728
hsa-miR-875-5p	21.1604	-1.4793693	MIMAT0004922
hsa-miR-802	21.51106	-1.4634702	MIMAT0004185
hsa-miR-1270	21.73955	-1.4531104	MIMAT0005924
hsa-miR-491-5p	21.80712	-1.4500466	MIMAT0002807
hsa-miR-548d-3p	21.98693	-1.441894	MIMAT0003323
hsa-miR-1201	22.4862	-1.4192573	dead
hsa-miR-1826	22.56671	-1.4156069	dead
hsa-miR-888-5p	22.91194	-1.3999539	MIMAT0004916
hsa-miR-513a-3p	23.13434	-1.3898705	MIMAT0004777
hsa-miR-612	23.63225	-1.367295	MIMAT0003280
hsa-miR-30c-5p	23.73198	-1.3627735	MIMAT0000244
hsa-miR-1299	23.87786	-1.356159	MIMAT0005887
hsa-miR-1975	24.18666	-1.3421584	dead
hsa-miR-24-1-5p	24.37669	-1.3335424	MIMAT0000079
hsa-miR-340-5p	24.59735	-1.3235374	MIMAT0004692
hsa-miR-138-2-3p	24.66306	-1.320558	MIMAT0004596

【表5-2】

遺伝子	シグナル	MAD スコア	MIMAT ID
hsa-miR-541-5p	24.8673	-1.3112979	MIMAT0004919
hsa-miR-142-3p	25.09606	-1.300926	MIMAT0000434
hsa-miR-544a	25.14354	-1.2987732	MIMAT0003164
hsa-miR-567	25.30231	-1.2915744	MIMAT0003231
hsa-miR-146a-5p	25.30952	-1.2912476	MIMAT0000449
hsa-miR-630	25.58343	-1.2788285	MIMAT0003299
hsa-miR-18a-5p	25.87251	-1.2657217	MIMAT0000072
hsa-miR-616-3p	25.9572	-1.2618816	MIMAT0004805
hsa-miR-215-5p	26.08764	-1.2559675	MIMAT0000272
hsa-miR-578	26.42948	-1.2404685	MIMAT0003243
hsa-miR-30b-5p	26.86759	-1.2206044	MIMAT0000420
hsa-miR-186-5p	27.10501	-1.2098401	MIMAT0000456
hsa-miR-590-5p	27.12312	-1.2090186	MIMAT0003258
hsa-miR-518c-5p	27.12724	-1.2088321	MIMAT0002847
hsa-miR-7-5p	27.31268	-1.200424	MIMAT0000252
hsa-miR-342-3p	27.32802	-1.1997288	MIMAT0000753
hsa-miR-30a-5p	27.47793	-1.1929316	MIMAT0000087
hsa-miR-30e-5p	27.52222	-1.1909236	MIMAT0000692
hsa-miR-153-3p	27.61561	-1.1866895	MIMAT0000439
hsa-miR-139-5p	27.66021	-1.1846672	MIMAT0000250
hsa-miR-421	27.67275	-1.1840984	MIMAT0003339
hsa-miR-522-3p	27.88499	-1.1744755	MIMAT0002868
hsa-miR-580-3p	27.89437	-1.1740503	MIMAT0003245
hsa-miR-642a-5p	28.16026	-1.1619948	MIMAT0003312
hsa-miR-200c-3p	28.36733	-1.152606	MIMAT0000617
hsa-miR-503-5p	28.56057	-1.1438447	MIMAT0002874
hsa-miR-17-5p	28.65503	-1.139562	MIMAT0000070
hsa-miR-125b-2-3p	28.79045	-1.1334221	MIMAT0004603
hsa-miR-20a-5p	28.9898	-1.1243834	MIMAT0000075
hsa-miR-205-5p	29.07725	-1.1204183	MIMAT0000266
hsa-miR-618	29.10751	-1.1190463	MIMAT0003287
hsa-miR-30e-3p	29.33285	-1.1088292	MIMAT0000692
hsa-miR-124-5p	29.93332	-1.0816041	MIMAT0004591
hsa-miR-29a-5p	30.21309	-1.0689194	MIMAT0004503
hsa-miR-129-2-3p	30.31542	-1.0642796	MIMAT0004605
hsa-miR-599	30.36961	-1.0618225	MIMAT0003267
hsa-miR-191-5p	30.40741	-1.0601087	MIMAT0000440
hsa-miR-548b-5p	30.48026	-1.0568057	MIMAT0004798
hsa-miR-1244	30.49915	-1.0559492	MIMAT0005896
hsa-miR-452-5p	30.56421	-1.0529995	MIMAT0001635
hsa-miR-664a-3p	30.57374	-1.0525673	MIMAT0005949
hsa-miR-1184	30.70965	-1.0464051	MIMAT0005829
hsa-miR-586	30.75168	-1.0444994	MIMAT0003252
hsa-miR-573	30.87112	-1.0390839	MIMAT0003238

10

20

30

40

【表5-3】

遺伝子	シグナル	MADスコア	MIMAT ID
hsa-miR-885-5p	30.99188	-1.0336087	MIMAT0004947
hsa-miR-548h-5p	31.03215	-1.031783	MIMAT0005928
hsa-miR-542-3p	31.06854	-1.0301329	MIMAT0003389
hsa-miR-338-3p	31.07923	-1.0296484	MIMAT0000763
hsa-miR-200b-3p	31.15171	-1.0263622	MIMAT0000318
hsa-miR-651-5p	31.20514	-1.0239397	MIMAT0003321
hsa-miR-155-5p	31.22419	-1.0230761	MIMAT0000646
hsa-miR-526b-5p	31.3515	-1.0173037	MIMAT0002835
hsa-miR-1178-3p	31.37379	-1.0162931	MIMAT0005823
hsa-miR-449b-5p	31.38433	-1.015815	MIMAT0003327
hsa-miR-216a-5p	31.44441	-1.0130911	MIMAT0000273
hsa-miR-224-5p	31.57519	-1.0071617	MIMAT0000281
hsa-miR-19b-3p	31.59959	-1.0060554	MIMAT0000074
hsa-miR-506-3p	31.61057	-1.0055571	MIMAT0002878
hsa-miR-30d-5p	31.62978	-1.0046861	MIMAT0000245
hsa-miR-26b-5p	31.69762	-1.0016106	MIMAT0000083

10

20

【0153】

実施例4

m i R N A の逆に発現された標的および成長促進シグナル伝達および転移性m R N A の相関

【0154】

H N S C C においていくつかのm i R N A によって制御される標的m R N A のネットワークおよび根底にあるそれらの潜在的機能を同定するために、m i R - 3 0 a - 5 p 、 m i R - 3 0 b - 5 p 、 m i R - 3 0 d - 5 p 、 m i R - 3 0 e - 5 p 、 m i R - 2 6 a - 5 p 、 m i R - 2 6 b - 5 p 、 m i R - 1 4 5 - 5 p 、 m i R - 2 0 5 - 5 p 、 および m i R - 3 7 5 の低下した発現を、各々、がんにおいて潜在的に生物学的に重要なm R N A との逆相関に関して分析した。線形回帰分析を、各m i R N A と、 T C G A データセットにおける2 7 9 個のH N S C C 腫瘍標本に対して行ったR N A - s e q から得たゲノムワイドm R N A 発現レベルとの間で行った。その結果を、表6～14に示す。

30

【0155】

例として、9 1 個のm R N A は、F D R 0 . 0 5 を使用してm i R - 3 0 a に対して逆に発現されるとして検出され、かつまたI n g e n u i t y P a t h w a y A n a l y s i s (I P A) マイクロR N A 標的フィルタに基づいて3' U T R におけるm i R - 3 0 a - 5 p の推定または検証された結合部位を含んでいた(表6)。m i R - 3 0 a - 5 p といくつかの代表的な標的遺伝子の有意な反相関を、図4に示す。m i R - 3 0 a - 5 p 発現は、H N S C C において過剰発現されることが以前に示されたいくつかのがん遺伝子(E G F R 、 M E T 、 I T G A 6 および S E R P I N E 1 が挙げられる)に対する逆関係を示した(図4)(V a n W a e s ら, C a n c e r R e s . 5 5 : 5 4 3 4 - 5 4 4 4 , 1 9 9 5 ; V a n W a e s ら, I n t . J . R a d i o t . O n c o l . B i o l . P h y s . 7 7 : 4 4 7 - 4 5 4 , 2 0 1 0 ; F r e u d l s p e r g e r ら, E x p e r t O p i n . T h e r . T a r g e t s 1 5 : 6 3 - 7 4 , 2 0 1 1)。

40

【表6-1】

表6. 逆に発現され、かつmiR-30a-5pへの推定または検証された結合部位を含むmRNA

供給源	信頼性	記号	t統計量	p値	q値
TarBase,TargetScan Human	実験的に観察、高い（推定）	NT5E	-2.67544	0.00785943	0.042443335
TarBase,TargetScan Human	実験的に観察、高い（推定）	SLC7A11	-7.34317	1.8519E-12	2.47526E-10

【表6-2】

供給源	信頼性	記号	t統計量	p値	q値
TarBase	実験的に観察	WNT5A	-3.21244	0.00145446	0.011477956
TarBase	実験的に観察	MET	-4.49672	9.7643E-06	0.000186635
miRecords	実験的に観察	STX1A	-5.73134	2.3616E-08	1.04475E-06
TargetScan Human	高い(推定)	ADAM12	-5.8907	1.0009E-08	4.93575E-07
TargetScan Human	高い(推定)	ADAMTS14	-4.448	1.2095E-05	0.000223621
TargetScan Human	高い(推定)	ADAMTS6	-3.11958	0.00198133	0.014647111
TargetScan Human	高い(推定)	AFAP1L2	-3.57478	0.00040639	0.004129055
TargetScan Human	高い(推定)	BCL11B	-7.45518	9.0434E-13	1.30665E-10
TargetScan Human	高い(推定)	BNC1	-10.1613	3.9863E-21	3.3215E-18
TargetScan Human	高い(推定)	CALB2	-2.60695	0.00957701	0.049262735
TargetScan Human	高い(推定)	CAMK2N2	-4.33529	1.9703E-05	0.000337565
TargetScan Human	高い(推定)	CBX2	-7.41229	1.1909E-12	1.66992E-10
TargetScan Human	中程度(推定)	CCNA1	-3.39196	0.00078393	0.007013279
TargetScan Human	高い(推定)	CCNE2	-3.58521	0.00039112	0.004002625
TargetScan Human	中程度(推定)	CD80	-3.23442	0.00135044	0.010822133
TargetScan Human	高い(推定)	CDCA7	-2.94594	0.00346369	0.022650361
TargetScan Human	中程度(推定)	CDHR1	-3.55523	0.00043656	0.004375406
TargetScan Human	高い(推定)	CELSR3	-4.19807	3.5211E-05	0.000549357
TargetScan Human	中程度(推定)	CERS3	-6.93548	2.3632E-11	2.38628E-09
TargetScan Human	高い(推定)	CHST1	-3.42212	0.00070477	0.006439431
TargetScan Human	高い(推定)	CHST2	-6.88903	3.1387E-11	3.07078E-09
TargetScan Human	高い(推定)	CNGB3	-4.62375	5.5397E-06	0.000115408
TargetScan Human	高い(推定)	COL13A1	-6.52577	2.7564E-10	2.0983E-08
TargetScan Human	高い(推定)	CTHRC1	-3.81302	0.00016563	0.001984823
TargetScan Human	高い(推定)	DDIT4	-3.52927	0.00047985	0.004724036
TargetScan Human	中程度(推定)	DSP	-5.75525	2.0785E-08	9.34316E-07
TargetScan	高い(推定)	E2F7	-5.78932	1.7316E-08	7.96717E-07

10

20

30

40

【表6-3】

供給源	信頼性	記号	t統計量	p値	q値
Human					
TargetScan Human	高い（推定）	EFNA3	-4.17635	3.8546E-05	0.000592557
TargetScan Human	中程度（推定）	EGFR	-2.69295	0.00746753	0.040839291
TargetScan Human	高い（推定）	EPB41L4B	-3.15221	0.00177887	0.013456245
TargetScan Human	高い（推定）	FAM43A	-4.71164	3.7153E-06	8.21663E-05
TargetScan Human	高い（推定）	FAP	-4.57488	6.8998E-06	0.000139116
TargetScan Human	高い（推定）	FOXD1	-5.39201	1.3836E-07	4.85439E-06
TargetScan Human	高い（推定）	FZD2	-5.21242	3.41E-07	1.05844E-05
TargetScan Human	高い（推定）	GJA1	-6.45364	4.2012E-10	3.04202E-08
TargetScan Human	高い（推定）	GLDC	-2.71789	0.00693956	0.038631316
TargetScan Human	中程度（推定）	GNRHR	-4.11924	4.8817E-05	0.000721673
TargetScan Human	高い（推定）	GRHL1	-2.67624	0.00784124	0.042369061
TargetScan Human	高い（推定）	HEPHL1	-5.0097	9.1733E-07	2.48043E-05
TargetScan Human	高い（推定）	HOXA11	-5.77494	1.8706E-08	8.52358E-07
TargetScan Human	高い（推定）	HTRA3	-2.92943	0.00364778	0.023577439
TargetScan Human	高い（推定）	IGF1R	-3.52927	0.00021693	0.000384284
TargetScan Human	高い（推定）	IL1A	-6.20891	1.7114E-09	1.04732E-07
TargetScan Human	高い（推定）	IL28RA	-4.58937	6.4663E-06	0.000131627
TargetScan Human	高い（推定）	IRS1	-2.61196	0.00944086	0.048733913
TargetScan Human	高い（推定）	IRX4	-4.38851	1.5668E-05	0.000278244
TargetScan Human	高い（推定）	ITGA5	-5.94408	7.4786E-09	3.82354E-07
TargetScan Human	高い（推定）	ITGA6	-6.76279	6.7415E-11	6.04954E-09
TargetScan Human	高い（推定）	KIAA1804	-3.06917	0.00233624	0.016671132
TargetScan Human	高い（推定）	KIF3C	-4.79377	2.5442E-06	5.94757E-05
TargetScan Human	高い（推定）	LHX1	-7.00892	1.5048E-11	1.59942E-09
TargetScan Human	高い（推定）	LOX	-3.09258	0.00216471	0.015701083
TargetScan Human	高い（推定）	LRRC3	-4.33577	1.9662E-05	0.000336972
TargetScan	高い（推定）	MAF	-3.14025	0.00185073	0.013882679

10

20

30

40

【表6-4】

供給源	信頼性	記号	t統計量	p値	q値
Human					
TargetScan Human	高い(推定)	MFHAS1	-4.75352	3.065E-06	6.97331E-05
TargetScan Human	高い(推定)	MYBL2	-7.83707	7.4462E-14	1.39556E-11
TargetScan Human	高い(推定)	MYH10	-3.74269	0.00021693	0.002477083
TargetScan Human	中程度(推定)	MYO1H	-2.68	0.00775571	0.042020701
TargetScan Human	高い(推定)	NEFL	-5.76182	2.0067E-08	9.0609E-07
TargetScan Human	高い(推定)	NID1	-4.56143	7.3271E-06	0.000146362
TargetScan Human	高い(推定)	NOD2	-5.23065	3.115E-07	9.79208E-06
TargetScan Human	高い(推定)	NREP	-3.09434	0.00215234	0.015631917
TargetScan Human	高い(推定)	NTM	-3.79283	0.00017904	0.002115612
TargetScan Human	高い(推定)	ONECUT2	-2.66567	0.0080862	0.043367382
TargetScan Human	高い(推定)	OVOL1	-3.56263	0.0004249	0.00428063
TargetScan Human	高い(推定)	PAG1	-3.29063	0.00111491	0.009292512
TargetScan Human	高い(推定)	PCDH17	-2.62238	0.00916308	0.047653736
TargetScan Human	高い(推定)	PDGFRB	-3.1546	0.00176483	0.013372471
TargetScan Human	中程度(推定)	PHLDB2	-7.25139	3.3136E-12	4.15821E-10
TargetScan Human	中程度(推定)	PNPLA1	-6.83038	4.4825E-11	4.20919E-09
TargetScan Human	高い(推定)	PPFIA1	-3.44793	0.000643	0.005981654
TargetScan Human	高い(推定)	PPP1R14C	-5.52887	6.8493E-08	2.63407E-06
TargetScan Human	高い(推定)	PPP4R4	-2.9497	0.00342301	0.022444469
TargetScan Human	高い(推定)	RAB38	-5.19914	3.6418E-07	1.11991E-05
TargetScan Human	高い(推定)	RHEBL1	-2.87936	0.00426207	0.026591947
TargetScan Human	高い(推定)	RTN4R	-5.76779	1.9436E-08	8.81367E-07
TargetScan Human	高い(推定)	SCN8A	-3.00949	0.00283162	0.019369396
TargetScan Human	高い(推定)	SERPINE1	-6.14674	2.4297E-09	1.4251E-07
TargetScan Human	高い(推定)	SLC44A5	-4.0284	7.0695E-05	0.000981803
TargetScan Human	中程度(推定)	SLCO6A1	-4.63823	5.189E-06	0.000109185
TargetScan	高い(推定)	SNX10	-6.11018	2.9822E-09	1.70412E-07

10

20

30

40

【表6-5】

供給源	信頼性	記号	t統計量	p値	q値
Human					
TargetScan Human	高い(推定)	SOCS1	-2.84294	0.00476672	0.028990247
TargetScan Human	中程度(推定)	STAT1	-2.94123	0.0035153	0.022913435
TargetScan Human	高い(推定)	THBS2	-3.48948	0.00055409	0.00530563
TargetScan Human	高い(推定)	TMC7	-4.4635	1.1301E-05	0.000211182
TargetScan Human	中程度(推定)	TNFSF9	-4.07698	5.8042E-05	0.000833474
TargetScan Human	高い(推定)	TRIM9	-2.6338	0.00886708	0.046491218
TargetScan Human	高い(推定)	TRPA1	-5.02466	8.5363E-07	2.33216E-05
TargetScan Human	高い(推定)	WNT7B	-8.91065	4.4225E-17	1.68683E-14

【0156】

【表7 - 1】

表7. 逆に発現されかつmiR-30b-5p(MIMAT0000420)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
ABCA12	-0.003	-3.7	0.00024	0.0029
ABCA6	-0.0024	-3.2	0.0014	0.012
ADAM12	-0.0041	-4.6	7.70E-06	0.00019
ADAM19	-0.0016	-2.6	0.0095	0.048
ADAMTS14	-0.0026	-4	6.90E-05	0.0011
ADAMTS3	-0.0034	-4.1	4.80E-05	0.00083
ADAMTS5	-0.003	-4.3	2.50E-05	0.00049
ADAMTS9	-0.0018	-2.8	0.0058	0.033
ADRA2A	-0.0031	-2.7	0.0079	0.042
AFAP1L2	-0.0018	-3.6	0.00039	0.0043
AGAP2	-0.0014	-2.8	0.0049	0.03
AJAP1	-0.0042	-3.3	0.0012	0.01
ANGPT2	-0.0022	-4.1	5.70E-05	0.00094
ANTXR1	-0.0018	-3.7	0.00028	0.0033
APOL6	-0.0018	-3.3	0.0011	0.0095
ARHGAP29	-0.0016	-2.9	0.004	0.026
ARHGAP42	-0.0017	-3.2	0.0014	0.011
ARNTL2	-0.0018	-4.4	1.30E-05	0.00029
ARRDC4	-0.002	-3.9	0.00012	0.0017
ARSE	-0.0043	-4	8.30E-05	0.0013
ATP8B2	-0.0016	-3.2	0.0018	0.014
BCHE	-0.0039	-2.9	0.0047	0.029
BDKRB2	-0.0022	-4.8	3.40E-06	9.80E-05
BICD1	-0.0018	-4	8.10E-05	0.0012
BMP2	-0.0021	-3.2	0.0014	0.012
BNC1	-0.0021	-4.1	4.80E-05	0.00083

10

20

30

【表 7 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
BNC2	-0.0022	-2.9	0.0041	0.026
BST1	-0.0014	-2.6	0.0092	0.047
CACNA1C	-0.003	-4.8	2.40E-06	7.50E-05
CALB2	-0.0049	-4.6	7.90E-06	0.00019
CALCR	-0.0042	-2.6	0.0098	0.049
CALD1	-0.0026	-5.6	5.10E-08	3.10E-06
CAMK2N1	-0.0019	-3.1	0.0023	0.017
CCNA1	-0.0048	-3.1	0.0021	0.016
CCRN4L	-0.0023	-4.9	1.90E-06	6.00E-05
CD248	-0.0018	-2.7	0.0078	0.042
CD84	-0.0023	-2.7	0.0083	0.044
CDH11	-0.0033	-3.9	0.00014	0.0019
CDH13	-0.0021	-3.5	0.00046	0.0049
CDK6	-0.0021	-4.5	1.10E-05	0.00026
CHN1	-0.0023	-4.2	4.50E-05	0.00078
CHST2	-0.0026	-3.4	0.00078	0.0073
CLCA2	-0.0034	-4.9	2.00E-06	6.50E-05
CLEC5A	-0.0019	-3.5	5.00E-04	0.0052
CLSTN2	-0.0041	-3.9	0.00011	0.0016
CNRIP1	-0.0019	-3.8	0.00022	0.0027
CNTN1	-0.0035	-2.9	0.0038	0.024
COL12A1	-0.004	-5.3	2.70E-07	1.30E-05
COL13A1	-0.002	-3.6	0.00042	0.0045
COL14A1	-0.0021	-3	0.0033	0.022
COL5A2	-0.0043	-5.2	3.40E-07	1.50E-05
COL8A1	-0.0039	-3.9	0.00014	0.0019
CPN2	-0.0088	-4.8	3.00E-06	8.80E-05
CSGALNACT1	-0.0021	-4.4	1.70E-05	0.00035
CTGF	-0.0022	-3.4	0.00093	0.0084
CTHRC1	-0.0029	-3.4	0.00087	0.0079
CTSK	-0.0037	-5.1	5.40E-07	2.20E-05
CYP8B1	-0.0044	-2.9	0.0046	0.028
DACT1	-0.003	-3.4	0.00092	0.0083
DAPP1	-0.0014	-2.7	0.0067	0.037
DCBLD1	-0.0025	-5	9.60E-07	3.50E-05
DDX60	-0.0028	-4.3	2.90E-05	0.00056
DENND2A	-0.0016	-2.9	0.0047	0.029
DENND2C	-0.0015	-2.9	0.0036	0.023
DGKI	-0.0032	-3.2	0.0016	0.013
DIO2	-0.0023	-3	0.0027	0.019
DLEU7	-0.0027	-3	0.0026	0.018
DLX1	-0.004	-3.2	0.0016	0.013
DNASE2B	-0.0065	-3	0.0034	0.023
DOCK10	-0.0016	-2.7	0.0077	0.041

10

20

30

40

【表7-3】

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
DSC1	-0.0088	-5.7	2.50E-08	1.70E-06
DSC3	-0.0011	-2.7	0.0067	0.037
DSEL	-0.003	-4.7	5.00E-06	0.00013
DSP	-0.0015	-2.7	0.0073	0.04
ECM2	-0.0025	-4.1	4.90E-05	0.00084
EDIL3	-0.0042	-5.1	7.80E-07	3.00E-05
EDNRA	-0.0032	-5.6	4.70E-08	2.90E-06
EDNRB	-0.0017	-2.9	0.0036	0.024
EFCAB4B	-0.0019	-2.9	0.0036	0.023
ELFN2	-0.0038	-2.8	0.0047	0.029
EML1	-0.0026	-4.6	8.10E-06	2.00E-04
EML5	-0.0018	-2.7	0.0079	0.042
ENPEP	-0.0019	-3	0.0031	0.021
ENPP1	-0.0021	-2.8	0.0058	0.034
EPHA3	-0.0028	-3.2	0.0016	0.013
FAM124A	-0.0016	-2.8	0.0058	0.034
FAM155A	-0.0026	-3	0.0031	0.021
FAM20A	-0.0019	-2.8	0.0054	0.032
FAM26E	-0.0036	-5.5	7.80E-08	4.40E-06
FAM43A	-0.002	-4.1	5.50E-05	0.00092
FAP	-0.0042	-4.9	1.60E-06	5.30E-05
FBLN7	-0.0019	-3.3	0.0011	0.0096
FBXO39	-0.0023	-3.1	0.0025	0.018
FGD5	-0.0015	-2.9	0.0043	0.027
FGF5	-0.0064	-3.4	0.00072	0.0069
FIGN	-0.0033	-3.2	0.0014	0.011
FLVCR2	-0.0027	-5	9.70E-07	3.50E-05
FMN1	-0.0026	-3.3	0.0012	0.01
FRMD5	-0.0038	-3	0.0031	0.021
GALNT13	-0.0038	-2.7	0.0074	0.04
GALNT6	-0.0042	-5.6	5.60E-08	3.40E-06
GBP1	-0.0024	-3.2	0.0014	0.011
GCOM1	-0.0029	-3	0.0025	0.018
GFPT2	-0.0022	-3.2	0.0017	0.013
GJA1	-0.0032	-5.3	2.20E-07	1.10E-05
GOLGA6L1	-0.0061	-3	0.0031	0.021
GOLGA7B	-0.0037	-3.9	0.00011	0.0016
GPM6B	-0.0017	-3.3	0.00093	0.0084
GPR124	-0.0021	-3.7	0.00023	0.0029
GPR157	-0.0017	-3.2	0.0017	0.013
GPRIN3	-0.0021	-3.1	0.0019	0.015
GUCY1A2	-0.0029	-4	7.10E-05	0.0011
GUCY1A3	-0.0024	-3.7	0.00031	0.0036
GXYLT2	-0.002	-2.6	0.0091	0.047

【表 7 - 4】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
HAPLN1	-0.0032	-3.1	0.0024	0.017
HAS2	-0.0035	-4.3	2.70E-05	0.00053
HECW1	-0.0034	-3.5	0.00046	0.0049
HEPHL1	-0.0063	-4.5	1.00E-05	0.00024
HGF	-0.0043	-4	7.30E-05	0.0012
HHIPL1	-0.003	-4.6	6.70E-06	0.00017
HMCN1	-0.0043	-5.2	4.90E-07	2.00E-05
HOXA1	-0.0023	-3.4	9.00E-04	0.0082
HS3ST3A1	-0.0026	-3.5	0.00056	0.0057
HS3ST3B1	-0.0021	-3	0.0034	0.022
HTRA3	-0.0031	-3.8	0.00017	0.0022
IFIT1	-0.0036	-3.9	0.00014	0.002
IL1A	-0.0032	-3.2	0.0017	0.013
INHBA	-0.0041	-3.9	0.00013	0.0019
IRS1	-0.0021	-4	7.20E-05	0.0011
ITGA1	-0.0025	-4.2	3.60E-05	0.00065
ITGA5	-0.0024	-3.8	0.00018	0.0023
ITGA6	-0.0021	-3.7	0.00028	0.0033
ITGA8	-0.0038	-3.6	0.00041	0.0045
ITGA9	-0.0018	-2.7	0.0066	0.037
JAM2	-0.0022	-3.5	0.00063	0.0063
KCND2	-0.003	-3	0.0034	0.023
KCNJ15	-0.0028	-4.3	2.10E-05	0.00042
KIAA1024	-0.0015	-2.8	0.0055	0.032
KIAA1644	-0.0034	-4	9.80E-05	0.0015
KLF7	-0.0027	-5.6	5.70E-08	3.40E-06
KLHL4	-0.0036	-2.6	0.0087	0.045
KRT82	-0.0051	-2.7	0.0068	0.038
KRTAP1-5	-0.0054	-2.8	0.0057	0.033
LAMA1	-0.0042	-3.4	0.00078	0.0073
LAMA4	-0.003	-5.1	7.00E-07	2.70E-05
LAMC3	-0.0038	-4.9	1.80E-06	6.00E-05
LHX1	-0.0095	-4.1	5.50E-05	0.00092
LHX8	-0.0041	-2.9	0.0045	0.028
LHX9	-0.0059	-2.8	0.0057	0.033
LILRB2	-0.0022	-3	0.0032	0.021
LIPC	-0.0028	-3.1	0.0019	0.015
LOX	-0.0023	-3.5	0.00055	0.0056
LPAR3	-0.002	-3.3	0.00096	0.0086
LPPR4	-0.0018	-2.9	0.0043	0.027
LPPR5	-0.0078	-4	8.30E-05	0.0013
LRCH2	-0.0026	-3.4	0.00078	0.0073
LRRC15	-0.006	-5.2	4.50E-07	1.90E-05
LRRC17	-0.0033	-3.1	0.0022	0.016

10

20

30

40

【表7-5】

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
LSAMP	-0.0028	-2.9	0.004	0.026
LTBP2	-0.0021	-3.8	0.00019	0.0024
MAF	-0.0014	-2.8	0.0048	0.029
MAN1A1	-0.0019	-3.5	5.00E-04	0.0052
MAP2	-0.004	-4.8	2.70E-06	8.00E-05
ME1	-0.0017	-2.7	0.0073	0.04
MFAP3L	-0.0024	-3.5	0.00047	0.005
MICAL2	-0.0022	-3.9	1.00E-04	0.0015
MME	-0.0045	-5.2	4.90E-07	2.00E-05
MMP16	-0.0055	-5.2	3.40E-07	1.50E-05
MOCS1	-0.0015	-3	0.0029	0.02
MPZL3	-0.0025	-4.8	2.30E-06	7.30E-05
MS4A7	-0.0024	-3.6	0.00044	0.0047
MXRA5	-0.0033	-4.6	6.20E-06	0.00016
MYH10	-0.0025	-4.7	4.20E-06	0.00012
NAV3	-0.0042	-5.3	2.10E-07	1.00E-05
NEGR1	-0.0036	-3.8	2.00E-04	0.0026
NFASC	-0.0017	-3.1	0.0025	0.018
NHSL2	-0.0024	-2.7	0.0082	0.043
NID1	-0.0032	-4.9	1.70E-06	5.50E-05
NID2	-0.0033	-4.5	9.40E-06	0.00022
NIPAL1	-0.0025	-4.1	6.30E-05	0.001
NIPAL4	-0.0044	-4.3	2.10E-05	0.00043
NLRP3	-0.0017	-2.7	0.0083	0.044
NOD2	-0.0027	-5.2	4.40E-07	1.80E-05
NRG1	-0.0025	-3.2	0.0014	0.011
NT5E	-0.0033	-4.1	5.80E-05	0.00096
NTM	-0.0034	-4.9	2.10E-06	6.70E-05
NTNG1	-0.0051	-2.9	0.0039	0.025
OLFML2A	-0.0015	-2.9	0.004	0.026
PAG1	-0.0021	-4	8.40E-05	0.0013
PAQR5	-0.0036	-4.4	1.60E-05	0.00034
PCDH10	-0.0071	-3.9	0.00013	0.0018
PCDH17	-0.0025	-3.7	0.00023	0.0028
PDE3A	-0.0035	-4.5	1.10E-05	0.00025
PDE7B	-0.0022	-4	7.50E-05	0.0012
PDGFC	-0.0025	-4.5	9.10E-06	0.00022
PDGFRB	-0.0028	-4.2	3.60E-05	0.00065
PHLDB2	-0.0018	-3.2	0.0016	0.013
PI15	-0.0023	-2.9	0.0043	0.027
PLA2G4D	-0.0034	-2.7	0.0072	0.04
PLXDC1	-0.0018	-3.2	0.0015	0.012
PLXDC2	-0.0025	-4.5	1.20E-05	0.00027
PLXNC1	-0.0028	-3.7	0.00024	0.003

10

20

30

40

【表 7 - 6】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
PNPLA1	-0.0065	-5.5	8.70E-08	4.90E-06
PPFIA2	-0.0049	-3.4	0.00076	0.0072
PPP1R14C	-0.0014	-2.9	0.0035	0.023
PRDM1	-0.0021	-4.9	2.00E-06	6.40E-05
PRDM5	-0.0023	-4	9.20E-05	0.0014
PREX2	-0.0022	-2.6	0.0098	0.049
PRICKLE1	-0.0027	-4.4	1.30E-05	3.00E-04
PRRG1	-0.0018	-3.8	0.00019	0.0024
PRRX1	-0.002	-2.9	0.0037	0.024
PTGDR	-0.0031	-4.1	6.30E-05	0.001
PTGER2	-0.0021	-2.9	0.0044	0.027
PTGER3	-0.0038	-4.4	1.40E-05	0.00031
PTGS1	-0.0021	-2.9	0.0043	0.027
PTPRB	-0.0016	-3.2	0.0014	0.012
PTPRD	-0.0058	-5.3	3.20E-07	1.40E-05
RAB27B	-0.0019	-3.5	5.00E-04	0.0052
RAB38	-0.0027	-4	9.40E-05	0.0014
RAB3B	-0.0057	-4.1	4.80E-05	0.00083
RAI14	-0.0013	-2.7	0.0076	0.041
RASGRF2	-0.0027	-4.1	6.00E-05	0.00099
RECK	-0.0022	-3.9	0.00014	0.0019
RFTN2	-0.0016	-2.9	0.0046	0.028
RSAD2	-0.0035	-3.8	0.00019	0.0024
RUNX1T1	-0.0036	-3.6	0.00044	0.0047
S100A7A	-0.0065	-3.6	0.00032	0.0037
SAMHD1	-0.0022	-3.8	0.00019	0.0024
SDC2	-0.0023	-3.5	0.00062	0.0062
SDK2	-0.0026	-2.9	0.0038	0.024
SEC14L2	-0.0021	-3.6	0.00039	0.0043
SERPINE1	-0.0032	-3.7	0.00032	0.0037
SERPING1	-0.0024	-4.1	6.20E-05	0.001
SGIP1	-0.0033	-4.7	5.30E-06	0.00014
SH3TC2	-0.002	-2.8	0.0052	0.031
SHROOM4	-0.0017	-3	0.0034	0.022
SLC10A6	-0.0034	-3.9	0.00012	0.0017
SLC16A10	-0.0018	-2.8	0.0054	0.032
SLC22A15	-0.0014	-2.8	0.0048	0.029
SLC24A2	-0.008	-4.7	4.60E-06	0.00013
SLC28A3	-0.0043	-5	8.70E-07	3.20E-05
SLC2A9	-0.0022	-4.7	4.30E-06	0.00012
SLC38A4	-0.0031	-3.9	0.00012	0.0017
SLC39A8	-0.0016	-3.6	0.00043	0.0046
SLC41A2	-0.003	-5.3	2.30E-07	1.10E-05
SLC44A5	-0.0026	-2.6	0.0097	0.049

10

20

30

40

【表7-7】

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
SLC7A11	-0.0027	-2.9	0.0044	0.027
SNAI1	-0.0014	-2.8	0.0058	0.034
SNX10	-0.0021	-3.9	0.00011	0.0015
SPTLC3	-0.0061	-6.1	3.40E-09	3.30E-07
STC1	-0.002	-3	0.0025	0.018
SULF2	-0.0026	-4.4	1.40E-05	0.00031
TCHHL1	-0.0077	-3.4	0.00082	0.0076
TGFA	-0.0023	-5.2	4.30E-07	1.80E-05
TGM5	-0.0047	-4.3	2.50E-05	0.00049
THBS2	-0.0041	-5.2	4.10E-07	1.80E-05
TIMP2	-0.0035	-6	8.00E-09	6.70E-07
TIMP3	-0.0029	-4	7.80E-05	0.0012
TLL1	-0.0027	-2.8	0.0058	0.034
TLN2	-0.0015	-2.8	0.0051	0.03
TLR8	-0.0031	-3.6	0.00035	0.004
TM4SF18	-0.0019	-3.9	0.00014	0.0019
TM6SF2	-0.004	-3.2	0.0017	0.014
TMEM154	-0.0023	-4.2	4.50E-05	0.00079
TMEM26	-0.0025	-3.7	0.00028	0.0033
TMEM79	-0.0021	-3.4	7.00E-04	0.0067
TMEM86A	-0.0031	-5.5	9.80E-08	5.40E-06
TNFSF13B	-0.0019	-2.7	0.0073	0.04
TREML2	-0.0038	-4.3	2.80E-05	0.00053
TRPA1	-0.0047	-4.4	1.40E-05	0.00032
TRPC6	-0.0019	-3.5	0.00059	0.0059
TRPS1	-0.0024	-4.8	3.40E-06	9.80E-05
TSHZ2	-0.0018	-2.8	0.0048	0.029
TSPAN11	-0.003	-4.1	5.90E-05	0.00097
TSPAN2	-0.0034	-4.1	5.80E-05	0.00095
UNC5C	-0.0041	-3.1	0.0022	0.016
UNC80	-0.0048	-2.8	0.005	0.03
USP2	-0.0025	-2.8	0.0047	0.029
VCAN	-0.0038	-4.4	1.90E-05	4.00E-04
VGLL3	-0.0036	-4.9	1.40E-06	4.80E-05
VIM	-0.0018	-3.7	0.00031	0.0036
WIPF1	-0.0014	-2.6	0.0092	0.047
WISP1	-0.0032	-3.8	2.00E-04	0.0026
WNT5A	-0.0034	-5.6	4.40E-08	2.80E-06
XYLT1	-0.0018	-2.7	0.0071	0.039
ZCCHC24	-0.0017	-3.7	0.00023	0.0028
ZDHHC21	-0.0015	-2.7	0.0076	0.041
ZNF208	-0.0035	-2.7	0.0084	0.044
ZNF365	-0.0052	-6.1	3.00E-09	3.00E-07
ZNF521	-0.0028	-4.2	4.30E-05	0.00076

10

20

30

40

【表7-8】

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
ZNF681	-0.003	-2.9	0.0039	0.025

【0 1 5 7】

【表8-1】

表8. 逆に発現されかつmiR-30d-5p(MIMAT0000245)への推定
または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
ABCC2	-0.00014	-3.3	0.0011	0.0095
ACTBL2	-0.00024	-2.9	0.0043	0.027
ADAM12	-0.00015	-3.2	0.0014	0.012
ADAMTS14	-0.00014	-4.2	4.10E-05	0.00073
AFAP1L2	-0.00012	-4.6	7.00E-06	0.00018
AJAP1	-0.00019	-2.8	0.005	0.03
ARNTL2	-8.20E-05	-4	9.00E-05	0.0014
ARRDC4	-7.50E-05	-2.7	0.0067	0.037
BDKRB2	-0.00011	-4.5	9.50E-06	0.00023
BNC1	-0.00014	-5.2	4.60E-07	1.90E-05
C6orf141	-0.00023	-5	1.20E-06	4.20E-05
CALD1	-1.00E-04	-4.2	3.10E-05	0.00059
CAMK2A	-0.00028	-4.6	5.30E-06	0.00014
CAMK2N1	-0.00011	-3.6	0.00044	0.0047
CCNA1	-0.00033	-4.2	3.30E-05	0.00062
CCRN4L	-0.00011	-4.5	8.60E-06	0.00021
CDH13	-0.00011	-3.7	0.00023	0.0029
CDK6	-0.00011	-4.6	6.60E-06	0.00017
CHST2	-0.00013	-3.2	0.0014	0.012
CLCA2	-0.00015	-4.1	5.50E-05	0.00092
CLCF1	-8.70E-05	-2.9	0.0039	0.025
COL12A1	-0.00017	-4.2	3.30E-05	0.00062
COL13A1	-8.80E-05	-3	0.0032	0.022
COL5A2	-0.00017	-4	9.80E-05	0.0015
CTHRC1	-0.00013	-2.8	0.0051	0.031
DACT1	-0.00013	-2.8	0.0063	0.035
DCBLD1	-0.00016	-6.5	3.80E-10	5.20E-08
DDX60	-0.00012	-3.3	0.001	0.0089
DLX1	-0.00021	-3.3	0.001	0.0092
DNAH17	-2.00E-04	-3.4	0.00081	0.0075
DNMT3B	-1.00E-04	-3.7	0.00025	0.003
DSC1	-0.00029	-3.5	0.00049	0.0052
EDNRA	-9.10E-05	-3	0.0031	0.021
EML1	-8.60E-05	-2.9	0.0042	0.026
EPHB2	-1.00E-04	-2.6	0.0088	0.046
F3	-0.00012	-2.8	0.006	0.034
FAM26E	-0.00011	-3	0.0026	0.018
FAP	-0.00019	-4.2	4.00E-05	0.00072
FOXD1	-1.00E-04	-2.9	0.004	0.025
FOXL2	-0.00021	-2.9	0.0035	0.023

10

20

30

40

【表 8 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
FZD2	-7.90E-05	-3	0.0026	0.018
GALNT6	-0.00023	-5.8	2.20E-08	1.60E-06
GBP1	-0.00013	-3.4	0.00073	0.007
GJA1	-0.00016	-5.1	6.20E-07	2.50E-05
GOLGA7B	-0.00024	-4.9	1.60E-06	5.40E-05
GPR39	-0.00015	-3	0.003	0.021
HAS2	-0.00013	-3.1	0.002	0.015
HECW1	-0.00013	-2.7	0.0082	0.043
HEPHL1	-0.00026	-3.6	0.00042	0.0046
HOXA1	-0.00014	-3.9	0.00011	0.0015
HSPB3	-3.00E-04	-3.2	0.0017	0.013
HTRA3	-0.00016	-3.8	0.00018	0.0024
IFFO2	-7.80E-05	-2.7	0.0082	0.043
IFT1	-0.00018	-3.7	3.00E-04	0.0035
IL1A	-0.00019	-3.7	0.00024	0.003
INHBA	-0.00023	-4.2	4.00E-05	0.00071
IRS1	-9.10E-05	-3.3	0.00094	0.0084
ITGA5	-0.00016	-5	8.60E-07	3.20E-05
ITGA6	-1.00E-04	-3.5	0.00056	0.0057
KCNJ15	-0.00012	-3.5	0.00057	0.0057
KIAA1644	-0.00015	-3.4	0.00066	0.0064
KLF7	-0.00011	-4.3	2.20E-05	0.00045
KRT82	-0.00034	-3.5	0.00048	0.0051
LAMA1	-0.00019	-3	0.0032	0.022
LETM2	-1.00E-04	-3.4	0.00089	0.0081
LHX1	-0.00061	-5.2	4.70E-07	2.00E-05
LPCAT1	-9.50E-05	-4	6.80E-05	0.0011
LRRC17	-0.00015	-2.7	0.008	0.042
MAF	-8.20E-05	-3.2	0.0016	0.013
MELK	-6.40E-05	-2.9	0.0036	0.024
MICAL2	-1.00E-04	-3.6	0.00037	0.0041
MME	-0.00015	-3.3	0.0011	0.0097
MYH10	-1.00E-04	-3.7	0.00025	0.003
NAV3	-2.00E-04	-4.7	4.00E-06	0.00011
NEXN	-0.00015	-3.7	0.00029	0.0034
NIPAL4	-2.00E-04	-3.7	0.00023	0.0029
NNMT	-0.00012	-3.4	0.00088	0.008
NOD2	-1.00E-04	-3.7	0.00027	0.0032
NRG1	-0.00015	-3.8	2.00E-04	0.0026
NT5E	-0.00017	-4	8.60E-05	0.0013
PAQR5	-0.00015	-3.5	5.00E-04	0.0052
PDGFC	-0.00013	-4.4	1.40E-05	0.00031
PHLDB2	-1.00E-04	-3.6	0.00033	0.0037
PNPLA1	-2.00E-04	-3.2	0.0017	0.013

10

20

30

40

【表 8 - 3】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
PPP1R14C	-0.00014	-6.3	1.50E-09	1.60E-07
PSMB9	-8.70E-05	-2.8	0.0056	0.032
PTGS1	-0.00011	-3	0.0028	0.02
PTPRD	-0.00019	-3.3	0.001	0.0091
RAB38	-0.00016	-4.6	7.60E-06	0.00019
RSAD2	-0.00014	-2.8	0.0051	0.03
S100A7A	-0.00026	-2.8	0.0057	0.033
SEC14L2	-0.00013	-4.4	1.60E-05	0.00035
SERPINA3	-0.00024	-3.8	0.00018	0.0023
SERPINE1	-0.00021	-4.7	5.00E-06	0.00014
SERPING1	-9.30E-05	-3	0.0034	0.023
SLC24A2	-0.00034	-3.7	0.00022	0.0027
SLC2A9	-8.60E-05	-3.4	0.00077	0.0072
SLC7A5	-8.00E-05	-2.8	0.0056	0.033
SNX10	-1.00E-04	-3.6	0.00039	0.0043
SPTLC3	-0.00017	-3.2	0.0018	0.014
SULF2	-0.00013	-4.3	2.50E-05	0.00049
SYNC	-0.00011	-3.2	0.0014	0.011
TGFA	-1.00E-04	-4.3	2.60E-05	0.00051
THBS2	-0.00013	-3	0.0028	0.019
TIMP3	-0.00012	-3.1	0.0021	0.016
TLL1	-0.00013	-2.7	0.0081	0.043
TLN2	-7.40E-05	-2.8	0.0061	0.035
TMEM86A	-8.60E-05	-2.9	0.0045	0.028
TNFSF9	-0.00012	-4	8.30E-05	0.0013
TRPA1	-0.00015	-2.7	0.0082	0.043
USP2	-0.00013	-2.8	0.0048	0.029
ZNF365	-0.00015	-3.2	0.0017	0.013

10

20

30

【0 1 5 8】

【表9-1】

表9. 逆に発現されかつmiR-30e-5p(MIMAT0000692)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
42433	-2.00E-04	-3.8	0.00017	0.0022
ABCA12	-0.00011	-3.3	0.0011	0.0093
ABCC11	-0.00013	-4.5	9.80E-06	0.00023
ABCC2	-0.00011	-3.4	0.00086	0.0079
ACTBL2	-0.00018	-2.8	0.0056	0.033
ACTC1	-0.00032	-3	0.0029	0.02
ADAM12	-0.00023	-6.4	5.60E-10	7.20E-08
ADAMTS14	-0.00014	-5.4	1.80E-07	9.00E-06
ADAMTS5	-8.70E-05	-3	0.0033	0.022
ADRA1D	-0.00011	-2.8	0.0055	0.032
ANGPT2	-0.00012	-5.8	1.80E-08	1.30E-06
ANTXR2	-6.60E-05	-2.7	0.0078	0.042
ARRDC4	-7.10E-05	-3.2	0.0013	0.011

【表 9 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
BAG2	-9.10E-05	-3.8	0.00015	0.002
BICD1	-9.00E-05	-4.8	2.90E-06	8.50E-05
BMP2	-9.50E-05	-3.6	0.00045	0.0048
BNC1	-9.70E-05	-4.6	8.20E-06	2.00E-04
BVES	-0.00012	-3.9	0.00014	0.002
C1QL1	-0.00015	-4	7.60E-05	0.0012
C3orf72	-0.00036	-5	1.20E-06	4.20E-05
C6orf141	-0.00013	-3.3	0.0011	0.0093
CALD1	-0.00012	-6.4	9.60E-10	1.10E-07
CAMK2A	-0.00017	-3.5	0.00064	0.0063
CCNA1	-0.00029	-4.7	4.30E-06	0.00012
CCRN4L	-9.40E-05	-4.9	1.90E-06	6.20E-05
CD248	-0.00012	-4.7	4.60E-06	0.00013
CDH11	-0.00014	-3.9	0.00011	0.0016
CDH13	-1.00E-04	-4.3	2.50E-05	0.00049
CDK6	-9.20E-05	-4.6	5.40E-06	0.00014
CHN1	-6.50E-05	-2.8	0.0056	0.033
CHST2	-0.00017	-5.5	1.00E-07	5.60E-06
CLCF1	-6.40E-05	-2.7	0.0081	0.043
CLSTN2	-0.00012	-2.8	0.0058	0.033
COL12A1	-0.00022	-7.4	2.00E-12	5.90E-10
COL13A1	-0.00013	-5.9	1.20E-08	9.10E-07
COL5A2	-0.00022	-6.6	1.90E-10	2.80E-08
COL8A1	-0.00016	-3.9	0.00011	0.0015
CSMD3	-0.00031	-3.2	0.0016	0.013
CTHRC1	-0.00018	-5.1	6.60E-07	2.60E-05
CTSK	-9.10E-05	-3	0.003	0.021
DACT1	-0.00017	-4.7	3.80E-06	0.00011
DCBLD1	-0.00013	-6.8	9.60E-11	1.60E-08
DCLK3	-8.70E-05	-3.2	0.0017	0.013
DDIT4	-8.20E-05	-3.6	0.00043	0.0046
DDX60	-8.70E-05	-3.1	0.002	0.015
DLX1	-0.00035	-7.3	4.80E-12	1.20E-09
DNAH17	-0.00014	-3	0.0032	0.022
DNMT3B	-0.00011	-4.8	2.30E-06	7.10E-05
DSC1	-0.00022	-3.3	0.0011	0.0098
DSG2	-5.90E-05	-3	0.0031	0.021
EBF2	-0.00014	-2.7	0.0081	0.043
EDIL3	-0.00011	-3.1	0.002	0.015
EDNRA	-9.80E-05	-4	7.20E-05	0.0011
EGFR	-6.10E-05	-2.6	0.0088	0.045
EIF5A2	-7.80E-05	-3.7	0.00024	0.0029
ELAVL2	-0.00015	-2.6	0.0092	0.047
EML1	-9.70E-05	-4.1	4.90E-05	0.00084

10

20

30

40

【表9-3】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
ENPEP	-0.00015	-6	7.40E-09	6.30E-07
EPB41L4B	-7.00E-05	-3.4	0.00093	0.0084
EPHB2	-0.00011	-3.6	0.00038	0.0042
FADS1	-8.30E-05	-3.3	0.0011	0.0094
FAM26E	-0.00014	-5	8.50E-07	3.20E-05
FAP	-0.00023	-6.9	3.80E-11	7.20E-09
FGF5	-0.00044	-5.9	1.40E-08	1.10E-06
FOXD1	-1.00E-04	-3.6	0.00036	0.004
FOXL2	-0.00028	-5.1	6.30E-07	2.50E-05
FSD1L	-5.50E-05	-2.9	0.0036	0.023
FST	-0.00017	-5.8	1.60E-08	1.20E-06
FZD2	-0.00012	-6.3	1.00E-09	1.20E-07
GALNT6	-0.00018	-5.9	1.30E-08	1.00E-06
GFPT2	-8.80E-05	-3.1	0.0025	0.018
GJA1	-0.00015	-6.2	2.70E-09	2.70E-07
GOLGA7B	-0.00021	-5.4	1.20E-07	6.40E-06
GUCY1A2	-0.00014	-4.8	2.90E-06	8.80E-05
GXYLT2	-9.00E-05	-2.8	0.0059	0.034
HAPLN1	-0.00024	-5.6	4.80E-08	3.00E-06
HAS2	-0.00011	-3.1	0.0022	0.016
HDAC9	-7.50E-05	-2.7	0.0079	0.042
HECW1	-2.00E-04	-5	9.50E-07	3.50E-05
HEPHL1	-0.00016	-2.6	0.0097	0.049
HEYL	-0.00012	-5.1	6.80E-07	2.70E-05
HHIPL1	-9.10E-05	-3.3	0.001	0.009
HOXA1	-0.00011	-3.8	0.00021	0.0027
HOXA11	-0.00017	-2.7	0.0066	0.037
HOXD11	-0.00035	-6.5	5.30E-10	6.80E-08
HOXD8	-9.50E-05	-4.8	2.20E-06	6.80E-05
HSPB3	-0.00039	-5.5	1.20E-07	6.20E-06
HTRA3	-2.00E-04	-6.2	2.80E-09	2.80E-07
IFIT1	-0.00013	-3.3	0.00099	0.0088
IFIT1B	-0.00025	-3.1	0.0018	0.014
IL1A	-0.00012	-2.9	0.0044	0.027
INHBA	-0.00034	-8.5	2.10E-15	1.50E-12
IRS1	-7.50E-05	-3.5	0.00061	0.0061
IRX4	-0.00017	-3.4	0.00088	0.008
ITGA1	-1.00E-04	-4.1	6.50E-05	0.001
ITGA5	-2.00E-04	-8.5	1.70E-15	1.30E-12
ITGA6	-0.00011	-5	8.50E-07	3.20E-05
KCND2	-0.00016	-3.7	0.00026	0.0032
KCNJ15	-9.80E-05	-3.6	0.00046	0.0048
KIAA1644	-0.00013	-3.7	0.00026	0.0031
KIF3C	-0.00012	-6.4	8.20E-10	1.00E-07

10

20

30

40

【表9-4】

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
KLF14	-0.00016	-2.7	0.0083	0.044
KLF7	-0.00011	-5.6	5.70E-08	3.40E-06
KRT82	-0.00022	-2.8	0.0054	0.032
LAMA1	-0.00027	-5.4	1.30E-07	6.60E-06
LAMA4	-0.00011	-4.5	9.20E-06	0.00022
LAMC3	-9.70E-05	-2.9	0.0036	0.024
LETM2	-6.40E-05	-2.6	0.0095	0.048
LHX1	-0.00045	-4.7	4.40E-06	0.00012
LHX5	-0.00032	-4	7.10E-05	0.0011
LOX	-8.40E-05	-3	0.0028	0.019
LPAR3	-7.70E-05	-3.1	0.0021	0.016
LPCAT1	-9.00E-05	-4.9	1.90E-06	6.10E-05
LPPR5	-0.00025	-3.1	0.0025	0.018
LRRC15	-0.00017	-3.4	0.00067	0.0065
LRRC17	-0.00014	-3.2	0.0016	0.013
LRRC3	-6.40E-05	-2.8	0.005	0.03
LTBP2	-8.90E-05	-3.9	0.00011	0.0016
MAP2	-0.00011	-3	0.0027	0.019
MFAP3L	-7.80E-05	-2.7	0.0067	0.037
MICAL2	-0.00013	-6	7.90E-09	6.70E-07
MME	-0.00019	-5.2	3.50E-07	1.50E-05
MMP16	-0.00025	-5.7	2.80E-08	1.90E-06
MURC	-0.00017	-3.6	0.00034	0.0039
MXRA5	-9.70E-05	-3.3	0.0013	0.011
MYH10	-0.00013	-6	6.50E-09	5.60E-07
NAV3	-0.00017	-5	8.40E-07	3.10E-05
NCAM1	-0.00014	-2.9	0.0035	0.023
NEXN	-0.00014	-4.4	1.70E-05	0.00037
NID1	-0.00017	-6.6	2.80E-10	4.00E-08
NID2	-0.00016	-5.4	1.40E-07	7.30E-06
NIPAL4	-0.00014	-3.3	0.00096	0.0086
NNMT	-9.60E-05	-3.5	0.00057	0.0058
NRG1	-0.00012	-3.8	0.00021	0.0027
NT5E	-0.00018	-5.4	1.40E-07	7.10E-06
NTM	-0.00016	-5.7	4.00E-08	2.50E-06
NUAK1	-9.60E-05	-4.1	6.50E-05	0.0011
OLFML2A	-6.00E-05	-2.8	0.0052	0.031
PAQR5	-0.00011	-3.2	0.0016	0.013
PARVB	-7.80E-05	-4.1	5.20E-05	0.00088
PCDH17	-8.90E-05	-3.1	0.0018	0.014
PDE3A	-8.90E-05	-2.7	0.008	0.042
PDGFC	-1.00E-04	-4.3	2.60E-05	5.00E-04
PDGFRB	-0.00012	-4.4	1.60E-05	0.00035
PDZK1	-0.00011	-2.7	0.0084	0.044

10

20

30

40

【表9-5】

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
PFN2	-9.10E-05	-3	0.0029	0.02
PHLDB2	-0.00015	-7.1	1.30E-11	3.00E-09
PI15	-0.00013	-4.2	3.30E-05	0.00062
PLEKHG4B	-0.00011	-2.7	0.0082	0.043
PNPLA1	-2.00E-04	-4.1	5.40E-05	9.00E-04
PPP1R14C	-1.00E-04	-5.4	1.30E-07	6.80E-06
PRICKLE1	-7.20E-05	-2.8	0.0054	0.032
PRRG1	-5.30E-05	-2.7	0.0085	0.045
PTPRD	-0.00013	-2.8	0.0051	0.031
RAB38	-8.80E-05	-3.1	0.0022	0.016
RAB3B	-0.00016	-2.7	0.0065	0.036
RAI14	-6.40E-05	-3.1	0.0018	0.014
RASD2	-0.00011	-3.1	0.0022	0.016
RASL11B	-9.70E-05	-3	0.003	0.02
RHOBTB1	-8.30E-05	-3.9	1.00E-04	0.0015
RSAD2	-0.00013	-3.2	0.0013	0.011
RTN4R	-6.80E-05	-3.5	0.00053	0.0054
S100A7A	-2.00E-04	-2.7	0.0066	0.037
SAMD4A	-6.90E-05	-3.2	0.0015	0.012
SDC2	-9.50E-05	-3.5	0.00065	0.0064
SDK2	-0.00012	-3.3	0.0012	0.01
SEC14L2	-9.90E-05	-4.1	5.00E-05	0.00085
SERPINE1	-0.00027	-8.4	3.40E-15	2.30E-12
SGCD	-0.00013	-3.2	0.0017	0.013
SGIP1	-0.00014	-4.9	1.60E-06	5.30E-05
SLC16A10	-8.70E-05	-3.4	0.00087	0.008
SLC24A2	-0.00049	-7.3	2.90E-12	8.10E-10
SLC2A9	-7.30E-05	-3.6	0.00037	0.0041
SLC35F3	-0.00017	-3.3	0.0011	0.0097
SLC38A4	-9.30E-05	-2.8	0.0062	0.035
SLC7A5	-9.40E-05	-4.2	4.20E-05	0.00074
SNAI1	-6.10E-05	-2.8	0.0048	0.029
SNX10	-9.60E-05	-4.4	1.90E-05	4.00E-04
SOX11	-0.00036	-6.4	7.50E-10	9.30E-08
SPSB4	-0.00014	-2.9	0.0039	0.025
STAC	-0.00014	-3.6	0.00036	0.004
STC1	-0.00011	-4.2	3.30E-05	0.00061
SULF2	-1.00E-04	-4.2	3.50E-05	0.00064
SYNC	-0.00011	-4.1	6.10E-05	0.001
TCHHL1	-0.00028	-3	0.0031	0.021
TGFA	-7.10E-05	-3.8	0.00018	0.0023
THBS2	-2.00E-04	-6.4	9.00E-10	1.10E-07
TIMP2	-8.20E-05	-3.3	0.0013	0.011
TIMP3	-0.00013	-4.4	1.30E-05	3.00E-04

10

20

30

40

【表9-6】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
TLL1	-0.00012	-3	0.0035	0.023
TLN2	-8.30E-05	-3.9	0.00011	0.0016
TM6SF2	-0.00026	-5	9.00E-07	3.30E-05
TMC7	-8.40E-05	-3.8	2.00E-04	0.0025
TMEM26	-8.00E-05	-2.8	0.0056	0.033
TMEM86A	-7.90E-05	-3.3	0.0011	0.0095
TNFSF9	-7.90E-05	-3.2	0.0017	0.013
TRIB3	-1.00E-04	-5.4	1.20E-07	6.50E-06
TRIM9	-0.00013	-3.7	0.00031	0.0036
USP2	-0.00012	-3.5	6.00E-04	0.006
VCAN	-0.00016	-4.5	1.10E-05	0.00026
WISP1	-0.00011	-3.2	0.0017	0.013
WNT7B	-6.10E-05	-3.3	0.0011	0.0096

【0 1 5 9】

【表10-1】

表10. 逆に発現されかつmiR-26a-5p(MIMAT0000082)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
ABCC11	-0.00033	-4.4	1.50E-05	0.00033
ABCC2	-0.00028	-3.3	0.00098	0.0088
ACVR1C	-0.00023	-4	8.10E-05	0.0012
ADAM12	-0.00034	-3.5	0.00051	0.0053
ADM	-3.00E-04	-5.3	3.10E-07	1.40E-05
ANO1	-0.00035	-3.7	0.00023	0.0028
ARRDC4	-0.00022	-3.9	0.00013	0.0018
ARSJ	-0.00018	-3	0.0026	0.018
BEND6	-2.00E-04	-3.1	0.0021	0.015
BICD1	-0.00017	-3.5	0.00057	0.0058
C19orf77	-0.00043	-2.9	0.0035	0.023
C3orf72	-0.00079	-4.2	3.00E-05	0.00057
CCRN4L	-0.00021	-4.3	2.60E-05	0.00051
CDK6	-0.00021	-4.1	6.40E-05	0.001
CHST2	-0.00034	-4.2	3.90E-05	0.00069
COL11A1	-0.00057	-3.3	0.00094	0.0085
COL12A1	-0.00035	-4.3	2.60E-05	0.00051
COL4A2	-0.00024	-3.7	0.00028	0.0033
COL5A1	-0.00032	-3.6	4.00E-04	0.0043
CT62	-0.00065	-3	0.0031	0.021
CYP27B1	-0.00022	-2.7	0.0066	0.037
DCBLD1	-0.00022	-4.1	6.00E-05	0.00099
DDIT4	-3.00E-04	-5.1	5.30E-07	2.20E-05
DNAH17	-0.00037	-3	0.003	0.021
DNAJB5	-2.00E-04	-3.8	0.00015	0.002
DNMT3B	-0.00027	-4.7	4.10E-06	0.00012
DSC3	-0.00015	-3.4	0.00093	0.0084
DSG2	-0.00017	-3.3	0.0012	0.01

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
EIF5A2	-0.00015	-2.7	0.0078	0.042
ENPEP	-0.00021	-3.2	0.0015	0.012
EREG	-4.00E-04	-2.6	0.0093	0.048
F2RL1	-0.00023	-3.3	0.0012	0.0099
FADS1	-0.00017	-2.6	0.0098	0.049
FAM83B	-0.00014	-2.7	0.008	0.042
FAM89A	-0.00025	-4.9	1.50E-06	4.90E-05
FAT1	-0.00019	-3.1	0.0019	0.015
FERMT1	-2.00E-04	-4	8.10E-05	0.0012
FHL2	-0.00015	-2.8	0.0049	0.03
FN1	-3.00E-04	-2.8	0.0061	0.035
FOXD1	-0.00023	-3.1	0.0022	0.016
GOLGA7B	-3.00E-04	-2.9	0.0038	0.024
GPSM1	-0.00019	-3.6	4.00E-04	0.0044
HAPLN1	-0.00032	-2.9	0.0043	0.027
HAS3	-0.00019	-2.6	0.0088	0.045
HES2	-0.00029	-4.8	2.90E-06	8.60E-05
HHLA1	-0.00058	-2.9	0.0037	0.024
HIST1H3H	-0.00019	-2.9	0.0043	0.027
HMGA2	-0.00055	-4.6	5.60E-06	0.00015
HNF4A	-0.00065	-3	0.0026	0.018
HOXC9	-0.00043	-3.2	0.0014	0.011
HOXD13	-0.00057	-2.6	0.0095	0.048
HOXD8	-0.00018	-3.6	0.00034	0.0039
HOXD9	-0.00017	-3.4	0.00079	0.0074
HSD17B6	-0.00021	-4.3	2.20E-05	0.00045
HSPA12A	-0.00021	-2.9	0.0039	0.025
HTR2C	-0.0011	-3.9	0.00014	0.002
HTR7	-0.00038	-3.8	0.00015	0.002
INHBA	-0.00056	-5.1	8.20E-07	3.10E-05
ITGA3	-0.00021	-3.2	0.0015	0.012
ITGA5	-0.00033	-5.2	4.50E-07	1.90E-05
ITGA6	-0.00027	-4.5	8.70E-06	0.00021
KANK4	-0.00053	-3.9	0.00012	0.0017
KCNJ15	-0.00025	-3.6	0.00046	0.0048
KIF26B	-0.00023	-3.1	0.002	0.015
KIF3C	-0.00024	-4.6	7.10E-06	0.00018
KIRREL	-0.00018	-2.8	0.0052	0.031
KLF7	-0.00027	-5.1	5.50E-07	2.20E-05
LAMA1	-0.00058	-4.5	1.20E-05	0.00028
LHFPL5	-0.00052	-2.7	0.0073	0.04
LHX1	-7.00E-04	-2.8	0.0061	0.035
LHX9	-0.00085	-3.8	0.00016	0.0022
LMX1B	-0.00046	-3	0.0034	0.022

10

20

30

40

【表 10 - 3】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
LOXL2	-0.00035	-4.6	6.70E-06	0.00017
LPAR3	-2.00E-04	-3.2	0.0017	0.013
LRP12	-0.00015	-2.9	0.0041	0.026
MAGEA9B	-0.00089	-2.8	0.0058	0.034
MEIS3	-0.00021	-2.9	0.0036	0.024
MET	-0.00019	-4	9.80E-05	0.0015
MFSD2A	-0.00016	-3.4	0.00088	0.0081
MME	-0.00029	-3	0.0033	0.022
MSX2	-0.00032	-4.1	4.80E-05	0.00082
MYH10	-0.00024	-4.2	3.80E-05	0.00068
NAGS	-0.00017	-3.3	0.0011	0.0095
NDRG1	-3.00E-04	-5.2	5.10E-07	2.10E-05
NID1	-0.00022	-3	0.0029	0.02
NKPD1	-0.00026	-3.1	0.0019	0.014
NOX5	-0.00036	-3.2	0.0013	0.011
OTUB2	-0.00017	-3.2	0.0018	0.014
PCSK9	-0.00031	-3.6	0.00042	0.0046
PHLDA1	-0.00014	-2.7	0.0079	0.042
PHLDB2	-0.00035	-6.3	1.40E-09	1.60E-07
PNPLA3	-0.00037	-3.8	0.00019	0.0025
POPDC3	-0.00044	-3	0.0031	0.021
PTPRH	-0.00036	-3.8	0.00017	0.0023
PYGL	-0.00034	-5.6	7.10E-08	4.10E-06
RBM44	-0.00032	-3.5	0.00049	0.0051
RGS20	-3.00E-04	-3.4	7.00E-04	0.0068
RNASE7	-0.00034	-2.6	0.0094	0.048
SERPINA10	-0.00058	-2.8	0.0054	0.032
SH2D5	-0.00048	-4.3	2.50E-05	0.00049
SHANK2	-0.00033	-2.8	0.0049	0.03
SLC22A1	-0.00032	-2.7	0.0071	0.039
SLC2A9	-0.00022	-4.3	2.60E-05	0.00051
SLC6A7	-0.00048	-2.9	0.0044	0.027
SOX11	-0.00072	-4.8	2.50E-06	7.60E-05
STON2	-0.00023	-5.1	7.50E-07	2.90E-05
TFAP2E	-0.00029	-3.9	0.00014	0.002
TMC7	-0.00024	-4.3	2.40E-05	0.00048
TNS4	-0.00026	-4	9.40E-05	0.0014
TRIP13	-0.00012	-2.7	0.0077	0.041
TRPC4	-0.00024	-2.7	0.0078	0.042
TRPV3	-0.00041	-4.1	4.80E-05	0.00082
ZIC5	-0.00057	-3.2	0.0017	0.013

【0160】

【表 11 - 1】

表11. 逆に発現されかつmiR-26b-5p(MIMAT0000083)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
ADAM12	-0.0015	-3.7	0.00023	0.0028
ADAMTS5	-0.00088	-2.8	0.0048	0.029
ALX4	-0.0025	-3	0.0031	0.021
APCDD1	-0.00068	-2.7	0.0069	0.038
ARSJ	-0.00072	-3	0.0028	0.019
ASPN	-0.0012	-2.7	0.0076	0.041
AVPR1A	-0.00094	-2.7	0.0068	0.038
BCAT1	-0.00093	-2.7	0.0067	0.037
BEND6	-0.00069	-2.6	0.0091	0.047
BICD1	-0.00057	-2.8	0.0051	0.031
C14orf37	-0.00072	-2.7	0.0074	0.04
C3orf72	-0.0021	-2.7	0.0076	0.041
CACNA1C	-0.00081	-2.9	0.0036	0.024
CALCRL	-0.00058	-2.7	0.0084	0.044
CCRN4L	-0.00057	-2.8	0.0062	0.035
CDH11	-0.001	-2.7	0.0066	0.037
CLSTN2	-0.0016	-3.6	0.00034	0.0039
CNTNAP2	-0.0025	-3.8	0.00018	0.0023
COL10A1	-0.0019	-3.1	0.0022	0.016
COL11A1	-0.0024	-3.5	0.00055	0.0056
COL12A1	-0.0012	-3.7	0.00026	0.0031
COL1A2	-0.0013	-3.3	0.0011	0.0092
COL5A1	-0.0012	-3.1	0.002	0.015
CRISPLD2	-0.00084	-3.2	0.0014	0.011
DCBLD1	-0.00064	-2.9	0.0044	0.027
DCLK1	-0.0012	-2.6	0.0089	0.046
DNAH17	-0.0013	-2.6	0.009	0.046
EFCAB4B	-0.00086	-3.2	0.0017	0.013
EML5	-0.00084	-3	0.0032	0.022
ENPEP	-0.00084	-3.1	0.002	0.015
ENTPD3	-0.00081	-2.9	0.0037	0.024
F2RL1	-0.00082	-2.9	0.0047	0.029
FAM169A	-0.00068	-3	0.0032	0.021
FAM198B	-0.00083	-3	0.0028	0.019
FAM26E	-0.001	-3.4	0.00076	0.0072
FMN1	-0.00092	-2.7	0.0079	0.042
FN1	-0.0013	-3.1	0.0023	0.017
FNDC1	-0.0014	-3.1	0.0025	0.018
FOXD1	-0.00099	-3.3	0.0011	0.0093
GPC4	-0.001	-2.7	0.0079	0.042
GPC6	-0.0012	-2.8	0.0049	0.03
GPX8	-0.00068	-3.3	0.0012	0.01

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
GREB1	-0.00076	-2.9	0.0043	0.027
GUCY1A2	-0.00085	-2.7	0.0067	0.037
HOXA13	-0.0036	-4.3	2.80E-05	0.00054
HOXD8	-0.00069	-3.3	0.00099	0.0088
HS3ST3A1	-0.00085	-2.7	0.0084	0.044
HSD17B6	-0.00064	-3.2	0.0016	0.012
HTR7	-0.0011	-2.8	0.0053	0.031
INPP4B	-0.00094	-3.3	0.00097	0.0087
ITGA5	-0.00079	-2.9	0.0037	0.024
ITGA6	-0.00064	-2.6	0.0087	0.045
KCND2	-0.0014	-3.2	0.0013	0.011
KCNJ15	-0.00093	-3.2	0.0013	0.011
KIF26B	-0.0012	-3.9	0.00011	0.0016
KIRREL	-0.00072	-2.8	0.0061	0.035
KLK2	-0.0026	-2.7	0.0068	0.038
LAMA1	-0.0017	-3.1	0.0019	0.014
LHX9	-0.0024	-2.6	0.0094	0.048
LINGO1	-0.00075	-2.7	0.0074	0.04
LMX1B	-0.0019	-3	0.0033	0.022
LOX	-0.00093	-3.2	0.0014	0.012
LOXL2	-0.00094	-3	0.0033	0.022
LPAR3	-0.00074	-2.9	0.0046	0.028
LRP12	-0.00056	-2.6	0.0086	0.045
LUM	-0.00089	-2.6	0.0087	0.045
MFAP3L	-9.00E-04	-3.1	0.0024	0.018
MFAP5	-0.0017	-3.5	0.00047	0.005
MME	-0.0016	-4	7.30E-05	0.0011
MMP16	-0.0018	-3.9	0.00012	0.0017
MSX2	-0.0011	-3.5	0.00059	0.0059
MYH10	-0.00086	-3.7	0.00026	0.0032
NDRG1	-0.00069	-2.8	0.0056	0.033
NID1	-0.0013	-4.6	5.30E-06	0.00014
OTUB2	-0.00063	-2.9	0.0041	0.026
PCDHB16	-0.001	-3.5	0.00049	0.0051
PDE3A	-0.001	-2.9	0.0036	0.023
PGM2L1	-0.00068	-2.8	0.0062	0.035
PHLDB2	-0.00075	-3.1	0.0018	0.014
PLOD2	-0.00075	-3.5	0.00052	0.0054
PRDM5	-0.00069	-2.7	0.0076	0.041
PRKG1	-0.00099	-3	0.0026	0.019
PRSS35	-0.0019	-2.8	0.0056	0.033
PTPRD	-0.0017	-3.5	0.00046	0.0049
RBMS3	-0.00088	-3	0.0029	0.02
RNF128	-0.0012	-2.7	0.0078	0.042

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
RNF152	-0.00066	-2.8	0.0062	0.035
SALL1	-0.0017	-2.6	0.0097	0.049
SEMA6D	-0.0011	-2.9	0.0037	0.024
SESN3	-0.001	-4	8.90E-05	0.0014
SFRP4	-0.0017	-2.7	0.0075	0.04
SHANK2	-0.0016	-3.4	0.00068	0.0066
SLC2A9	-0.00062	-2.9	0.0035	0.023
SNX10	-0.00066	-2.8	0.0052	0.031
SOX11	-0.0017	-2.7	0.0081	0.043
SPOCK1	-0.0013	-3.1	0.0021	0.015
ST6GALNAC5	-0.0013	-3.4	0.00078	0.0073
STON2	-0.00052	-2.8	0.0059	0.034
SULF1	-0.001	-2.9	0.0047	0.029
SYT13	-0.0033	-3.8	2.00E-04	0.0026
SYT14	-0.0025	-3.2	0.0016	0.013
TET1	-0.00077	-2.7	0.0084	0.044
TRPC4	-0.0011	-2.9	0.0046	0.028
TRPS1	-0.00063	-2.8	0.0055	0.032
VCAN	-0.0011	-3	0.0031	0.021
VEPH1	-0.0021	-3.9	0.00013	0.0018
VGLL3	-9.00E-04	-2.8	0.0062	0.035
WNT2	-0.0015	-2.8	0.0056	0.033
WNT5A	-0.00078	-2.9	0.0042	0.026
WT1	-0.0029	-3	0.003	0.02
ZFHX4	-0.0014	-4	9.50E-05	0.0014
ZNF469	-0.0011	-3	0.0032	0.021
ZNF704	-0.00093	-2.9	0.0035	0.023

10

20

30

【0 1 6 1】

【表12-1】

表12. 逆に発現されかつmiR-145-5p(MIMAT0000437)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
APOL1	-0.00077	-3.3	0.001	0.0091
CCNA2	-0.00037	-3.2	0.0013	0.011
CMPK2	-0.00078	-3.2	0.0018	0.014
DDX60	-0.00066	-3	0.0031	0.021
DEPDC1B	-0.00039	-3	0.0027	0.019
ELOVL7	-7.00E-04	-4	9.20E-05	0.0014
EPHA4	-0.00049	-2.7	0.007	0.039
ESCO2	-0.00036	-2.6	0.0088	0.046
FAM169A	-0.00046	-2.6	0.0089	0.046
GCNT4	-0.00054	-2.9	0.004	0.026
GPR150	-0.0017	-2.8	0.0048	0.029
HOXA1	-0.00064	-2.8	0.0057	0.033
HS6ST2	-0.0012	-3	0.0033	0.022
IFI44L	-0.00094	-3	0.0029	0.02

【表 1 2 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
KIAA0895	-0.00043	-2.7	0.0065	0.037
PBK	-0.00036	-2.7	0.0083	0.044
PHEX	-7.00E-04	-2.9	0.0042	0.027
PRF1	-0.00066	-2.7	0.007	0.038
RAB27B	-5.00E-04	-2.8	0.0057	0.033
SGPP2	-0.00058	-2.8	0.0059	0.034
SH2D4A	-0.00043	-2.6	0.0091	0.047
SPC24	-4.00E-04	-2.6	0.0087	0.045
TLX2	-0.0019	-2.8	0.005	0.03
ZIC2	-0.0013	-4	8.70E-05	0.0013
ZIC5	-0.0018	-3.3	0.001	0.0089
PLEKHH1	-0.00085	-5.2	4.40E-07	1.90E-05
GDPD4	-0.0027	-4.6	8.10E-06	2.00E-04
CAGE1	-0.0013	-4	7.40E-05	0.0012
C14orf73	-0.0016	-4	8.50E-05	0.0013
C9orf84	-0.00078	-3.8	0.00017	0.0023
C15orf42	-0.00054	-3.7	0.00023	0.0029
SEC16B	-0.00074	-3.6	0.00034	0.0039
SATL1	-0.00061	-3.6	0.00036	0.004
WARS	-0.00081	-3.6	4.00E-04	0.0044
POLQ	-0.00049	-3.6	0.00041	0.0044
CSAG3	-0.0027	-3.6	4.00E-04	0.0044
OR2A1	-0.001	-3.6	0.00044	0.0047
ZBP1	-0.0012	-3.5	0.00051	0.0053
KIAA0101	-0.00045	-3.5	0.00051	0.0053
NCRNA00114	-0.0017	-3.5	0.00057	0.0058
NEIL3	-0.00054	-3.5	0.00059	0.0059
CDCA2	-0.00045	-3.5	0.00064	0.0063
HIST1H2AJ	-0.0016	-3.4	0.00069	0.0066
C16orf75	-5.00E-04	-3.4	0.00072	0.0069
SLC44A5	-0.0011	-3.4	0.00092	0.0083
CASP5	-0.0013	-3.3	0.00097	0.0087
HERC5	-0.00073	-3.3	0.001	0.0089
ACE2	-0.00087	-3.3	0.001	0.0091
TTK	-0.00036	-3.3	0.0011	0.0093
RRM2	-0.00039	-3.3	0.0011	0.0098

10

20

30

40

【0 1 6 2】

【表13-1】

表13. 逆に発現されかつmiR-205-5p(MIMAT0000266)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	β	t統計量	p値	FDR
BAI3	-9.90E-05	-4	8.20E-05	0.0013
42430	-5.30E-05	-6.1	4.10E-09	3.80E-07
A2M	-6.90E-05	-9.2	1.10E-17	1.50E-14
AASS	-2.40E-05	-3	0.0027	0.019
ABCA6	-9.40E-05	-8.8	1.90E-16	1.90E-13

【表 1 3 - 2】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
ABCC12	-0.00012	-3.8	0.00016	0.0021
ABCD2	-9.50E-05	-5.3	2.30E-07	1.10E-05
ACACB	-5.40E-05	-5.8	2.30E-08	1.60E-06
ACSL5	-4.60E-05	-4.5	1.00E-05	0.00024
ACTC1	-0.00012	-2.9	0.0041	0.026
ADAM28	-5.20E-05	-3.7	0.00022	0.0028
ADAMTS16	-0.00012	-4.8	3.30E-06	9.70E-05
ADAMTS18	-0.00014	-6.4	8.40E-10	1.00E-07
ADAMTS4	-4.80E-05	-4.8	3.10E-06	9.20E-05
ADAMTS5	-8.20E-05	-7.9	7.20E-14	3.30E-11
ADAMTS9	-7.20E-05	-7.8	1.30E-13	5.70E-11
ADAMTSL1	-0.00011	-8.8	2.30E-16	2.20E-13
ADAMTSL2	-2.60E-05	-3.2	0.0013	0.011
ADCY2	-0.00011	-5.4	1.50E-07	7.50E-06
ADCYAP1	-9.20E-05	-4.7	3.50E-06	1.00E-04
ADCYAP1R1	-0.00011	-3.6	0.00046	0.0048
ADD2	-0.00011	-4.5	1.10E-05	0.00025
ADH1B	-0.00018	-4.8	2.30E-06	7.20E-05
ADORA3	-6.40E-05	-6.1	3.90E-09	3.70E-07
ADRA1B	-6.40E-05	-3.1	0.0019	0.014
AFF3	-8.80E-05	-5.5	1.00E-07	5.60E-06
AGTR1	-0.00019	-7.9	8.50E-14	3.80E-11
AKAP2	-7.00E-05	-6.8	9.10E-11	1.50E-08
AKAP7	-4.40E-05	-5.8	1.90E-08	1.40E-06
AKT3	-4.10E-05	-4.9	1.70E-06	5.70E-05
ALCAM	-2.70E-05	-2.7	0.0065	0.036
ALDH3B1	-4.50E-05	-6	5.20E-09	4.70E-07
ALPK3	-6.60E-05	-6.2	2.10E-09	2.20E-07
ALX4	-8.70E-05	-2.8	0.006	0.034
AMOT	-7.60E-05	-4.8	2.70E-06	8.20E-05
ANGPTL7	-0.00017	-5	1.30E-06	4.40E-05
ANK2	-0.00011	-8.7	3.60E-16	3.30E-13
ANTXR1	-4.00E-05	-5.2	3.40E-07	1.50E-05
APBA1	-2.50E-05	-3.2	0.0015	0.012
APLNR	-7.80E-05	-7.2	8.00E-12	1.90E-09
APOC4	-8.90E-05	-3	0.003	0.02
APOL6	-4.60E-05	-5.6	5.10E-08	3.10E-06
AQP1	-5.70E-05	-7.7	3.00E-13	1.10E-10
AQP9	-6.20E-05	-4	8.50E-05	0.0013
AR	-0.00012	-5.9	1.40E-08	1.10E-06
ARHGAP15	-5.50E-05	-5.7	2.90E-08	2.00E-06
ARHGAP24	-3.80E-05	-4.2	3.90E-05	7.00E-04
ARHGAP26	-2.70E-05	-3.2	0.0018	0.014
ARHGAP31	-4.90E-05	-6.5	3.20E-10	4.50E-08

10

20

30

40

【表 1 3 - 3】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
ARHGAP42	-3.30E-05	-3.9	0.00012	0.0017
ASPA	-0.00012	-5	1.00E-06	3.60E-05
ASTN1	-8.80E-05	-2.8	0.0053	0.031
ATP10A	-8.80E-05	-9.6	6.90E-19	1.30E-15
ATP6V0A4	-0.00011	-4.3	2.00E-05	0.00042
ATP8A1	-6.00E-05	-5.7	3.30E-08	2.20E-06
ATRNL1	-7.90E-05	-3.2	0.0014	0.011
AVPR1A	-5.00E-05	-4	7.50E-05	0.0012
AXIN2	-5.90E-05	-6.7	1.20E-10	1.90E-08
B3GALT5	-0.00012	-3.2	0.0014	0.011
B4GALT6	-3.70E-05	-4.1	6.00E-05	0.00099
BACH2	-3.60E-05	-3.6	0.00039	0.0043
BCAS1	-4.30E-05	-2.6	0.0097	0.049
BCL2	-4.50E-05	-4.5	8.60E-06	0.00021
BEND4	-0.00013	-4	9.20E-05	0.0014
BEST3	-9.70E-05	-2.9	0.0038	0.025
BHLHE41	-3.50E-05	-3.3	0.00098	0.0088
BICC1	-8.80E-05	-6.9	3.80E-11	7.40E-09
BICD1	-2.10E-05	-2.8	0.0053	0.031
BMF	-2.10E-05	-2.7	0.0073	0.04
BMP3	-0.00011	-2.9	0.0041	0.026
BMP6	-5.50E-05	-6.3	1.50E-09	1.60E-07
BMP8A	-3.10E-05	-2.7	0.0064	0.036
BMPER	-5.50E-05	-3.4	0.00073	0.007
BNC2	-9.10E-05	-8.2	8.90E-15	5.30E-12
BPI	-0.00012	-3.8	2.00E-04	0.0025
BST1	-7.00E-05	-9.2	1.60E-17	2.10E-14
BTLA	-7.20E-05	-4.5	9.00E-06	0.00022
BTN3A2	-3.00E-05	-3.5	0.00047	0.0049
C10orf10	-3.50E-05	-3.8	0.00017	0.0022
C10orf128	-8.30E-05	-6.1	4.90E-09	4.50E-07
C10orf131	-7.40E-05	-2.6	0.0089	0.046
C10orf71	-0.00015	-3.3	0.0013	0.011
C11orf21	-7.70E-05	-4.1	5.40E-05	9.00E-04
C12orf68	-4.30E-05	-4	8.00E-05	0.0012
C15orf52	-2.90E-05	-2.9	0.0044	0.027
C17orf72	-4.10E-05	-4.7	4.60E-06	0.00013
C17orf82	-6.20E-05	-3.3	0.0011	0.0093
C1QTNF3	-4.20E-05	-2.9	0.0035	0.023
C22orf34	-0.00012	-3.9	0.00013	0.0018
C3orf36	-4.70E-05	-3.9	0.00015	0.002
C4orf40	-9.20E-05	-3.3	0.001	0.0089
C6	-0.00022	-6.2	2.70E-09	2.70E-07
C7	-0.00016	-5.4	1.50E-07	7.60E-06

10

20

30

40

【表 1 3 - 4】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
CA13	-3.50E-05	-3.5	0.00061	0.0061
CA3	-0.00012	-4.3	2.70E-05	0.00052
CA8	-0.00013	-5.4	1.40E-07	7.10E-06
CABP4	-7.10E-05	-3.8	0.00019	0.0024
CACNA2D2	-4.40E-05	-4.4	1.90E-05	0.00039
CADM1	-6.80E-05	-6.1	3.30E-09	3.20E-07
CADPS2	-6.50E-05	-7.3	4.40E-12	1.20E-09
CALCRL	-4.70E-05	-6.2	2.50E-09	2.50E-07
CALN1	-1.00E-04	-3.1	0.0024	0.017
CAMK2A	-7.90E-05	-4.3	2.70E-05	0.00052
CAMK4	-6.00E-05	-4.4	1.50E-05	0.00032
CCDC141	-9.40E-05	-6.1	4.10E-09	3.90E-07
CCDC144A	-6.20E-05	-2.7	0.0085	0.045
CCDC152	-5.50E-05	-4.5	1.20E-05	0.00028
CCDC68	-7.20E-05	-3.9	1.00E-04	0.0015
CCDC80	-7.00E-05	-7.4	1.60E-12	4.90E-10
CCDC85A	-9.80E-05	-6.9	5.10E-11	9.40E-09
CCL13	-7.20E-05	-5	8.40E-07	3.20E-05
CCL21	-6.20E-05	-3.3	0.00098	0.0087
CCL22	-2.90E-05	-2.7	0.0076	0.041
CCR5	-6.40E-05	-5.4	1.20E-07	6.50E-06
CCR7	-4.30E-05	-3.3	0.0011	0.0098
CCR8	-4.60E-05	-2.7	0.0085	0.044
CD163L1	-6.30E-05	-5.9	1.30E-08	1.00E-06
CD180	-6.50E-05	-5.6	4.60E-08	2.90E-06
CD1D	-5.30E-05	-5.6	5.40E-08	3.30E-06
CD226	-6.90E-05	-4.7	4.90E-06	0.00013
CD28	-6.60E-05	-5.1	5.20E-07	2.10E-05
CD300E	-8.30E-05	-3.1	0.0025	0.018
CD4	-5.90E-05	-6.3	1.50E-09	1.70E-07
CD84	-8.70E-05	-6.8	8.00E-11	1.40E-08
CD93	-5.90E-05	-7.9	6.20E-14	2.90E-11
CDH11	-7.90E-05	-6	5.60E-09	5.00E-07
CDK14	-3.70E-05	-3.4	0.00077	0.0072
CECR1	-6.80E-05	-6.1	4.10E-09	3.80E-07
CERKL	-6.50E-05	-6.3	1.50E-09	1.70E-07
CES1	-9.70E-05	-3.9	0.00012	0.0017
CFL2	-3.20E-05	-4.6	5.80E-06	0.00015
CHN1	-4.70E-05	-5.4	1.30E-07	6.70E-06
CHRDL1	-0.00017	-6.2	2.00E-09	2.10E-07
CHRFAM7A	-4.30E-05	-3.3	0.00099	0.0088
CHRNA7	-8.00E-05	-3.6	0.00039	0.0043
CHRNB2	-6.10E-05	-2.8	0.005	0.03
CHST11	-2.60E-05	-2.8	0.0051	0.03

10

20

30

40

【表 1 3 - 5】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
CHST6	-6.40E-05	-4.8	2.60E-06	7.90E-05
CIITA	-5.40E-05	-4.5	9.50E-06	0.00023
CLDN11	-8.70E-05	-7.7	3.10E-13	1.20E-10
CLEC10A	-6.90E-05	-5.1	7.80E-07	3.00E-05
CLIC5	-9.30E-05	-7	1.70E-11	3.60E-09
CMKLR1	-7.80E-05	-7.7	3.60E-13	1.30E-10
CMTM7	-4.10E-05	-4.8	2.30E-06	7.10E-05
CMYA5	-8.20E-05	-4.3	2.50E-05	0.00049
CNR1	-0.00011	-4.8	2.40E-06	7.40E-05
CNTNAP2	-8.70E-05	-3.6	0.00036	0.0041
COL14A1	-8.50E-05	-8.3	5.20E-15	3.40E-12
COL1A1	-7.20E-05	-4.7	4.40E-06	0.00012
CPE	-2.80E-05	-2.8	0.0055	0.032
CPEB1	-9.80E-05	-4.8	2.50E-06	7.70E-05
CREB5	-3.20E-05	-3.1	0.0022	0.016
CRISPLD2	-5.20E-05	-5.7	4.00E-08	2.60E-06
CRMP1	-3.80E-05	-3.5	0.00064	0.0063
CSF1	-3.80E-05	-5	1.30E-06	4.40E-05
CSMD2	-6.30E-05	-3.9	0.00011	0.0016
CTLA4	-3.60E-05	-2.6	0.0087	0.045
CTSO	-4.90E-05	-6.8	5.70E-11	1.00E-08
CXCL11	-8.90E-05	-4	9.90E-05	0.0015
CXCR5	-5.80E-05	-3.2	0.0018	0.014
CXorf21	-6.60E-05	-5.5	8.40E-08	4.80E-06
CXXC4	-9.50E-05	-3.2	0.0015	0.012
CYBB	-8.00E-05	-7	2.40E-11	4.90E-09
CYP19A1	-7.10E-05	-5.4	1.30E-07	6.70E-06
CYP21A2	-5.50E-05	-2.9	0.0046	0.028
CYP2A7	-8.30E-05	-2.9	0.0047	0.029
CYP4V2	-4.60E-05	-5.7	3.20E-08	2.10E-06
CYSLTR2	-9.20E-05	-6.1	5.00E-09	4.50E-07
CYTH4	-4.90E-05	-5.2	4.30E-07	1.80E-05
DAAM2	-7.20E-05	-7.4	1.50E-12	4.60E-10
DAB1	-0.00012	-4.2	3.60E-05	0.00065
DACH1	-8.90E-05	-6.7	1.20E-10	1.90E-08
DAGLA	-3.90E-05	-4.2	3.50E-05	0.00064
DBX2	-0.00014	-3.8	0.00019	0.0024
DCHS1	-5.60E-05	-5.9	1.10E-08	8.90E-07
DCHS2	-6.70E-05	-3.6	0.00036	0.004
DCLK3	-3.00E-05	-2.8	0.0048	0.029
DCN	-7.80E-05	-7.9	8.70E-14	3.90E-11
DDAH1	-5.10E-05	-5.6	5.10E-08	3.10E-06
DDN	-4.50E-05	-2.7	0.0067	0.037
DDR2	-8.20E-05	-7.1	1.30E-11	2.80E-09

10

20

30

40

【表 1 3 - 6】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
DGKG	-5.20E-05	-3.8	0.00017	0.0023
DGKI	-8.30E-05	-5.5	1.10E-07	6.00E-06
DIO2	-7.10E-05	-6.2	1.80E-09	1.90E-07
DLC1	-4.60E-05	-5.5	8.30E-08	4.70E-06
DLG2	-7.70E-05	-3.4	0.00092	0.0083
DMD	-3.80E-05	-3.4	0.00081	0.0075
DNAH9	-5.70E-05	-3.1	0.002	0.015
DNM3	-4.10E-05	-4.6	6.30E-06	0.00016
DOCK3	-4.10E-05	-3.8	0.00016	0.0022
DOK6	-7.10E-05	-5.6	4.70E-08	2.90E-06
DPP4	-3.40E-05	-2.8	0.0057	0.033
DPYSL3	-7.00E-05	-7	2.60E-11	5.30E-09
DUSP27	-0.00014	-3.3	0.0011	0.0093
DUSP4	-3.70E-05	-4	9.30E-05	0.0014
EBF1	-6.20E-05	-7.4	1.50E-12	4.70E-10
ECM2	-7.00E-05	-7.8	1.80E-13	7.20E-11
EDA2R	-0.00011	-11	8.70E-24	4.10E-20
EDIL3	-7.50E-05	-5.8	1.60E-08	1.20E-06
EDN3	-0.00019	-5.2	3.80E-07	1.70E-05
ELAVL4	-7.70E-05	-3.2	0.0014	0.011
ELFN2	-5.80E-05	-2.7	0.0079	0.042
ELOVL6	-3.30E-05	-3.7	3.00E-04	0.0035
ELTD1	-5.90E-05	-8.9	1.10E-16	1.10E-13
EMR2	-3.10E-05	-3.6	0.00035	0.004
EMX2	-6.20E-05	-3.3	0.0012	0.01
ENPP4	-9.40E-05	-8.2	9.20E-15	5.50E-12
ENPP5	-9.20E-05	-4	8.40E-05	0.0013
EPHA3	-8.70E-05	-6.5	3.90E-10	5.30E-08
EPHA7	-0.00014	-4.5	1.20E-05	0.00027
EPHX4	-7.50E-05	-4.4	1.50E-05	0.00032
EPS8	-6.90E-05	-6.8	6.00E-11	1.10E-08
ERBB4	-0.00016	-4.8	3.10E-06	9.20E-05
ERC2	-5.00E-05	-3.4	0.00071	0.0068
ERMN	-7.10E-05	-5	1.00E-06	3.70E-05
ESRRG	-0.00012	-4.2	4.40E-05	0.00077
ETV1	-6.50E-05	-6.2	2.80E-09	2.80E-07
ETV5	-4.30E-05	-4.9	1.50E-06	5.20E-05
ETV7	-2.80E-05	-2.7	0.0083	0.044
F2RL2	-6.40E-05	-4.6	6.10E-06	0.00016
FABP4	-9.80E-05	-3.9	0.00014	0.0019
FAM124A	-6.00E-05	-6.9	3.50E-11	6.80E-09
FAM124B	-7.60E-05	-7.5	1.00E-12	3.20E-10
FAM131B	-5.10E-05	-5.6	4.80E-08	3.00E-06
FAM134B	-5.60E-05	-5.3	2.80E-07	1.30E-05

10

20

30

40

【表 13 - 7】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
FAM155A	-9.20E-05	-7	1.90E-11	4.10E-09
FAM169A	-2.60E-05	-3.1	0.0021	0.016
FAM174B	-4.80E-05	-6.5	3.80E-10	5.20E-08
FAM179A	-3.80E-05	-3.3	0.0012	0.01
FAM180A	-5.10E-05	-3.7	0.00029	0.0034
FAM19A5	-6.40E-05	-5	8.40E-07	3.10E-05
FAM26E	-6.80E-05	-6.6	1.80E-10	2.80E-08
FAM49A	-5.60E-05	-7	1.70E-11	3.70E-09
FAM78A	-4.90E-05	-6	5.40E-09	4.90E-07
FAR2	-4.40E-05	-5.6	4.80E-08	3.00E-06
FBN1	-8.50E-05	-7.1	1.50E-11	3.30E-09
FERMT2	-7.20E-05	-8.6	9.80E-16	7.80E-13
FETUB	-9.80E-05	-2.7	0.0067	0.037
FGF1	-4.50E-05	-4.4	1.30E-05	3.00E-04
FGF10	-0.00016	-5.2	4.90E-07	2.00E-05
FGF14	-0.00012	-8.4	3.90E-15	2.60E-12
FGF2	-6.70E-05	-5.7	2.90E-08	2.00E-06
FGF7	-9.30E-05	-8.7	4.20E-16	3.80E-13
FGFR1	-6.00E-05	-6.7	1.20E-10	2.00E-08
FHL5	-8.70E-05	-5.4	1.30E-07	6.80E-06
FMN1	-4.80E-05	-3.9	0.00014	0.002
FMO2	-9.40E-05	-4.6	6.80E-06	0.00017
FNDC5	-5.30E-05	-3.4	0.00092	0.0083
FOXF1	-5.60E-05	-5.9	1.20E-08	9.40E-07
FOXI2	-9.30E-05	-2.8	0.0052	0.031
FPR1	-6.20E-05	-6.2	1.90E-09	2.00E-07
FREM2	-1.00E-04	-3	0.0032	0.022
FRY	-7.00E-05	-6.9	3.20E-11	6.30E-09
FSD2	-0.00012	-3.5	0.00048	0.005
FSTL1	-6.20E-05	-7.1	1.00E-11	2.40E-09
FXYD2	-7.60E-05	-4.7	4.80E-06	0.00013
FXYD6	-8.00E-05	-6.7	1.00E-10	1.70E-08
FZD3	-4.90E-05	-5.5	1.10E-07	5.90E-06
FZD8	-2.50E-05	-2.7	0.0077	0.041
GAB3	-4.90E-05	-5.6	5.00E-08	3.10E-06
GABRA4	-1.00E-04	-2.9	0.0035	0.023
GADD45G	-3.30E-05	-3.7	0.00025	0.003
GALNT13	-6.30E-05	-2.8	0.0048	0.029
GALNT5	-5.20E-05	-3.4	9.00E-04	0.0082
GCNT4	-3.90E-05	-4.4	1.70E-05	0.00036
GDF10	-0.00017	-7.3	4.80E-12	1.20E-09
GDPD1	-2.20E-05	-2.6	0.0095	0.048
GDPD5	-2.40E-05	-3	0.0033	0.022
GFRA1	-7.80E-05	-5	1.00E-06	3.70E-05

10

20

30

40

【表 13 - 8】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
GFRA2	-6.30E-05	-5.6	6.40E-08	3.80E-06
GJA5	-6.00E-05	-6.2	2.20E-09	2.30E-07
GLDN	-5.10E-05	-4.8	2.30E-06	7.20E-05
GLIS3	-6.20E-05	-6	7.40E-09	6.30E-07
GLRB	-8.60E-05	-5	9.90E-07	3.60E-05
GNE	-2.30E-05	-2.8	0.0054	0.032
GNG2	-3.90E-05	-4.7	3.70E-06	0.00011
GNG7	-3.50E-05	-3.6	0.00032	0.0037
GOLM1	-4.80E-05	-6.2	2.00E-09	2.10E-07
GPC6	-0.00011	-7.6	5.40E-13	1.90E-10
GPM6A	-8.30E-05	-3	0.0034	0.022
GPR183	-5.70E-05	-6.2	2.60E-09	2.60E-07
GPR31	-9.40E-05	-3	0.0033	0.022
GPR4	-3.40E-05	-4.7	4.70E-06	0.00013
GPR88	-0.00015	-5.1	6.20E-07	2.50E-05
GPX8	-3.60E-05	-4.8	2.90E-06	8.60E-05
GRAMD1B	-4.30E-05	-3.8	0.00019	0.0025
GRAP2	-5.10E-05	-4.4	1.40E-05	0.00031
GRB14	-6.60E-05	-3.2	0.0017	0.013
GREB1	-3.50E-05	-3.6	0.00037	0.0041
GREM2	-0.00012	-5.6	4.50E-08	2.80E-06
GRIA1	-0.00012	-3.7	3.00E-04	0.0035
GRID1	-4.60E-05	-4.5	8.80E-06	0.00021
GSG1L	-9.10E-05	-3	0.0031	0.021
GSR	-2.60E-05	-2.9	0.004	0.026
GUCA1A	-6.50E-05	-3.5	0.00055	0.0056
GUCY1A2	-4.80E-05	-4.3	2.60E-05	0.00051
HCN1	-9.90E-05	-3.2	0.0013	0.011
HDX	-8.00E-05	-6.3	1.30E-09	1.50E-07
HEYL	-4.10E-05	-4.4	1.80E-05	0.00038
HFE2	-0.00017	-3.6	4.00E-04	0.0043
HHIPL1	-5.30E-05	-5.2	4.30E-07	1.80E-05
HIST2H2BE	-2.20E-05	-2.6	0.0095	0.048
HLA-DPB1	-6.10E-05	-6.3	1.60E-09	1.80E-07
HLA-DQB1	-6.00E-05	-5.1	8.20E-07	3.10E-05
HS6ST3	-9.80E-05	-3	0.0032	0.021
HSD11B1	-9.10E-05	-6.5	3.70E-10	5.00E-08
HSPA12B	-6.10E-05	-8.4	2.70E-15	1.90E-12
HTR1F	-9.90E-05	-4.1	5.30E-05	9.00E-04
HUNK	-3.30E-05	-2.8	0.0051	0.031
ICA1L	-3.60E-05	-4.6	6.20E-06	0.00016
ICAM2	-3.90E-05	-5.4	1.90E-07	9.40E-06
IFI44L	-4.70E-05	-3.1	0.0021	0.016
IGFBPL1	-9.00E-05	-2.7	0.0071	0.039

10

20

30

40

【表 1 3 - 9】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
IGLON5	-3.50E-05	-3.2	0.0017	0.013
IKZF1	-5.70E-05	-5	1.10E-06	3.90E-05
IKZF3	-6.70E-05	-3.5	0.00049	0.0051
IL15	-2.60E-05	-3.1	0.0025	0.018
IL16	-4.40E-05	-5.1	5.40E-07	2.20E-05
IL17D	-6.70E-05	-3.8	0.00018	0.0023
IL18BP	-2.70E-05	-3.2	0.0016	0.013
IL21R	-4.70E-05	-4	8.00E-05	0.0012
IL5RA	-1.00E-04	-3.2	0.0016	0.013
IL6ST	-3.40E-05	-4.3	2.90E-05	0.00055
IMPG2	-4.50E-05	-2.7	0.0069	0.038
IPCEF1	-4.40E-05	-4.2	3.40E-05	0.00063
IRAK3	-3.60E-05	-3.6	0.00036	0.0041
IRF1	-2.40E-05	-3	0.0033	0.022
ITGA11	-8.60E-05	-5.8	2.00E-08	1.50E-06
ITGA8	-7.80E-05	-4.7	5.20E-06	0.00014
ITGB1BP2	-5.90E-05	-4.1	6.20E-05	0.001
ITGB3	-6.20E-05	-5.8	1.50E-08	1.20E-06
JPH4	-7.10E-05	-6.8	6.50E-11	1.20E-08
KAL1	-4.30E-05	-3.7	0.00026	0.0031
KAT2B	-3.00E-05	-4	9.10E-05	0.0014
KBTBD11	-3.80E-05	-3.9	0.00015	0.002
KCNAB1	-2.40E-05	-3.3	0.0011	0.0094
KCNB1	-0.00018	-6.1	4.90E-09	4.40E-07
KCNC1	-8.70E-05	-3.3	0.0011	0.0095
KCND1	-2.70E-05	-3	0.0031	0.021
KCND2	-0.00011	-7.5	9.00E-13	2.90E-10
KCNE4	-5.60E-05	-5.3	2.20E-07	1.00E-05
KCNH1	-6.50E-05	-3.1	0.0019	0.014
KCNJ16	-0.00013	-3.5	0.00047	0.0049
KCNJ5	-3.40E-05	-2.7	0.0079	0.042
KCNJ6	-9.20E-05	-3.2	0.0016	0.013
KCNJ8	-5.50E-05	-5.9	1.00E-08	8.40E-07
KCNK3	-9.70E-05	-5.6	5.20E-08	3.20E-06
KCNMB1	-3.70E-05	-5.1	5.70E-07	2.30E-05
KCNMB4	-4.20E-05	-3.5	0.00046	0.0049
KCNN3	-4.50E-05	-4.3	2.40E-05	0.00048
KCNQ1	-3.10E-05	-3.8	0.00016	0.0021
KCNQ3	-7.10E-05	-3.9	1.00E-04	0.0015
KCNT1	-0.00013	-4.1	6.10E-05	0.001
KCNT2	-0.00013	-7.8	1.60E-13	6.70E-11
KDELR3	-2.80E-05	-3.2	0.0016	0.012
KDR	-4.70E-05	-5.9	1.20E-08	9.50E-07
KIAA1024	-3.30E-05	-3.8	0.00021	0.0026

10

20

30

40

【表 13 - 10】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
KIAA1199	-4.70E-05	-4.7	5.20E-06	0.00014
KIAA1324L	-5.00E-05	-5.5	1.10E-07	6.10E-06
KIAA1462	-6.50E-05	-7.5	8.80E-13	2.90E-10
KIF26B	-3.80E-05	-3.5	0.00058	0.0058
KIF5C	-5.30E-05	-5.5	1.10E-07	5.90E-06
KIF6	-7.10E-05	-3.6	0.00044	0.0047
KIT	-7.30E-05	-6.6	2.20E-10	3.20E-08
KLF12	-2.80E-05	-3.2	0.0015	0.012
KLF2	-3.20E-05	-4.2	4.10E-05	0.00072
KLF9	-4.20E-05	-6.1	4.30E-09	4.00E-07
KLHDC8A	-9.40E-05	-6	5.90E-09	5.20E-07
KLHL14	-1.00E-04	-3.9	0.00014	0.0019
KLHL6	-4.30E-05	-4.4	1.60E-05	0.00035
KLRB1	-5.70E-05	-4	8.80E-05	0.0013
KLRG1	-7.30E-05	-6.3	1.40E-09	1.60E-07
KLRK1	-7.40E-05	-5.3	2.50E-07	1.20E-05
KMO	-3.60E-05	-3.4	0.00089	0.0081
KRBA2	-3.00E-05	-2.9	0.0035	0.023
KSR2	-8.30E-05	-3.7	0.00022	0.0027
LAMA4	-5.80E-05	-6.3	1.40E-09	1.60E-07
LARGE	-2.50E-05	-2.9	0.0037	0.024
LAYN	-3.10E-05	-3.3	0.001	0.0091
LCA5	-2.00E-05	-2.8	0.0064	0.036
LCN6	-0.00014	-4.5	1.20E-05	0.00027
LCP2	-5.10E-05	-5.7	3.00E-08	2.00E-06
LEF1	-5.10E-05	-5.8	2.30E-08	1.60E-06
LGI2	-5.80E-05	-4.2	3.70E-05	0.00068
LIFR	-3.20E-05	-2.8	0.005	0.03
LILRA1	-9.30E-05	-4.1	4.90E-05	0.00084
LILRB1	-6.30E-05	-5.7	2.90E-08	2.00E-06
LILRB2	-6.70E-05	-6	7.10E-09	6.10E-07
LIMCH1	-3.60E-05	-3.3	0.0012	0.01
LIMD2	-2.10E-05	-2.7	0.0074	0.04
LIMS2	-4.70E-05	-6.5	4.00E-10	5.40E-08
LIN7A	-7.30E-05	-4.1	6.10E-05	0.001
LMO3	-0.00014	-5	1.30E-06	4.40E-05
LMO7	-3.90E-05	-4.3	2.60E-05	0.00051
LMOD3	-0.00011	-3.2	0.0018	0.014
LMX1A	-0.00016	-5	9.30E-07	3.40E-05
LONRF2	-0.00012	-4.6	7.20E-06	0.00018
LONRF3	-8.90E-05	-5.9	1.10E-08	8.80E-07
LOX	-3.80E-05	-3.5	0.00046	0.0049
LPAR1	-5.50E-05	-6.9	3.10E-11	6.10E-09
LPPR4	-4.90E-05	-5.1	8.20E-07	3.10E-05

【表 13 - 11】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
LRRC2	-0.00013	-5.6	5.90E-08	3.50E-06
LRRC4C	-0.00016	-6.4	6.10E-10	7.80E-08
LRRK2	-7.30E-05	-6.3	1.00E-09	1.20E-07
LRRN2	-8.20E-05	-5.9	9.20E-09	7.50E-07
LRRTM2	-6.40E-05	-4.3	2.50E-05	0.00049
LSAMP	-1.00E-04	-7.3	2.90E-12	8.10E-10
LTA	-5.00E-05	-3.5	0.00056	0.0057
LUZP2	-0.00013	-4.7	3.60E-06	1.00E-04
LYZ	-9.00E-05	-6.3	1.40E-09	1.60E-07
MAGI2	-2.80E-05	-3.3	0.0013	0.011
MAML3	-3.80E-05	-4.6	6.40E-06	0.00016
MAN1A1	-4.10E-05	-4.8	3.10E-06	9.20E-05
MAP2K6	-3.40E-05	-3.4	0.00074	0.007
MAP6	-5.20E-05	-3.9	0.00012	0.0017
MAP9	-5.80E-05	-4.6	5.90E-06	0.00015
MAPK4	-9.10E-05	-3.4	0.00088	0.008
MAT1A	-5.80E-05	-2.8	0.0052	0.031
MCOLN2	-2.80E-05	-3	0.0033	0.022
MDGA1	-3.00E-05	-2.6	0.0089	0.046
MEF2C	-7.40E-05	-6.5	4.00E-10	5.40E-08
MERTK	-6.40E-05	-6.3	1.20E-09	1.40E-07
MFNG	-3.80E-05	-4.7	3.90E-06	0.00011
MGAT4A	-6.40E-05	-8.1	1.70E-14	9.40E-12
MMP16	-9.10E-05	-5.5	9.50E-08	5.30E-06
MNDA	-5.70E-05	-5.5	7.20E-08	4.20E-06
MPP2	-4.20E-05	-3.7	0.00026	0.0031
MRGPRF	-5.50E-05	-6.2	2.30E-09	2.40E-07
MRO	-0.00013	-8.7	3.40E-16	3.00E-13
MURC	-7.30E-05	-4	7.50E-05	0.0012
MYEF2	-7.80E-05	-6	5.10E-09	4.60E-07
MYO1F	-5.30E-05	-6.1	4.70E-09	4.30E-07
MYOCD	-6.80E-05	-2.9	0.0045	0.028
MYOZ3	-7.10E-05	-3.7	0.00025	0.003
MYPN	-0.00013	-3.7	0.00029	0.0034
MYRIP	-9.00E-05	-4.8	2.80E-06	8.50E-05
NAP1L6	-1.00E-04	-3.1	0.0021	0.016
NAT8L	-8.50E-05	-5	9.70E-07	3.50E-05
NCAM1	-9.00E-05	-5.2	4.10E-07	1.80E-05
NCAM2	-0.00013	-6.1	4.10E-09	3.80E-07
NEGR1	-0.00011	-7.9	8.50E-14	3.80E-11
NEK10	-5.70E-05	-3	0.0034	0.023
NEXN	-7.30E-05	-6.2	1.70E-09	1.90E-07
NHSL2	-8.60E-05	-6.5	5.40E-10	6.90E-08
NID2	-6.10E-05	-5.3	2.10E-07	1.00E-05

10

20

30

40

【表 13 - 12】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
NIPSNAP3B	-3.10E-05	-3.6	0.00034	0.0038
NKX3-2	-7.00E-05	-3.5	0.00065	0.0064
NLGN4X	-5.20E-05	-3.1	0.002	0.015
NLRC3	-4.10E-05	-4.4	1.90E-05	0.00039
NOS1	-9.60E-05	-3.6	0.00043	0.0046
NOTCH4	-3.70E-05	-5.1	7.10E-07	2.80E-05
NPAS3	-8.10E-05	-5	1.00E-06	3.70E-05
NPHP1	-2.70E-05	-3.3	0.001	0.0092
NPTXR	-4.50E-05	-3.2	0.0014	0.011
NR3C2	-5.60E-05	-3.8	0.00015	0.0021
NR5A2	-5.00E-05	-6.6	3.10E-10	4.40E-08
NRG2	-0.00011	-5.1	5.90E-07	2.40E-05
NRIP2	-2.60E-05	-3.2	0.0015	0.012
NRXN3	-8.30E-05	-4.3	2.70E-05	0.00052
NT5C1A	-1.00E-04	-3.1	0.0025	0.018
NT5E	-3.60E-05	-2.7	0.0067	0.037
NTNG1	-0.00012	-4.4	1.50E-05	0.00033
NXPH3	-7.80E-05	-7.9	9.50E-14	4.20E-11
OGN	-0.00021	-8.4	4.00E-15	2.60E-12
ORAI2	-2.60E-05	-3.5	0.00057	0.0057
OTOF	-6.40E-05	-4.1	5.30E-05	9.00E-04
OTX2	-0.00011	-3	0.0028	0.019
P2RX7	-3.50E-05	-3	0.003	0.02
P2RY14	-5.20E-05	-5.1	5.40E-07	2.20E-05
PAC SIN1	-8.00E-05	-5	9.60E-07	3.50E-05
PAK3	-0.00017	-6.2	2.40E-09	2.50E-07
PALM2	-6.00E-05	-6.2	2.00E-09	2.10E-07
PALM2-AKAP2	-5.20E-05	-6.5	4.80E-10	6.30E-08
PAQR8	-5.40E-05	-6.4	9.20E-10	1.10E-07
PARD3B	-5.10E-05	-4.6	7.50E-06	0.00019
PAX7	-0.00014	-3.4	0.00076	0.0072
PBX1	-3.50E-05	-2.7	0.0064	0.036
PCDH10	-9.10E-05	-3.1	0.0021	0.015
PCDH19	-9.50E-05	-4.1	6.00E-05	0.00099
PCDH20	-0.00011	-3.5	0.00052	0.0053
PCDHB16	-3.60E-05	-3.4	9.00E-04	0.0082
PCDHB5	-6.50E-05	-4.7	3.70E-06	0.00011
PCSK1	-4.30E-05	-3.2	0.0016	0.013
PCSK2	-0.00011	-3.1	0.0024	0.018
PCYT1B	-7.30E-05	-3.2	0.0014	0.012
PDE11A	-0.00014	-4.5	9.30E-06	0.00022
PDE1C	-9.50E-05	-5.5	1.00E-07	5.60E-06
PDE3A	-7.20E-05	-5.9	1.10E-08	8.70E-07
PDE3B	-4.50E-05	-3.9	0.00012	0.0017

10

20

30

40

【表 13 - 13】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
PDE5A	-3.10E-05	-3.7	0.00024	0.0029
PDE8B	-3.00E-05	-3.6	4.00E-04	0.0044
PDK4	-1.00E-04	-7.2	5.00E-12	1.30E-09
PDLIM3	-8.60E-05	-5.3	2.00E-07	9.60E-06
PEG10	-6.60E-05	-3.2	0.0015	0.012
PEG3	-1.00E-04	-6.2	2.40E-09	2.40E-07
PELI2	-4.80E-05	-4.4	1.90E-05	4.00E-04
PGM2L1	-3.00E-05	-3.4	0.00091	0.0083
PGPEP1	-3.10E-05	-3.9	1.00E-04	0.0015
PHACTR1	-4.80E-05	-5.2	4.40E-07	1.90E-05
PI15	-3.40E-05	-2.7	0.0072	0.039
PI16	-0.00017	-7	2.30E-11	4.70E-09
PIPOX	-5.50E-05	-4.7	4.70E-06	0.00013
PKD2L1	-9.10E-05	-4.1	6.60E-05	0.0011
PKHD1	-0.00011	-3.6	0.00038	0.0042
PKIA	-4.50E-05	-3.3	0.0011	0.0095
PLA2G16	-6.70E-05	-6.8	8.90E-11	1.50E-08
PLA2G2D	-0.00012	-4.4	1.30E-05	0.00029
PLA2G7	-6.40E-05	-5.5	7.90E-08	4.50E-06
PLCB1	-4.70E-05	-5.1	6.80E-07	2.70E-05
PLCL1	-3.90E-05	-4.9	2.00E-06	6.30E-05
PLCXD3	-0.00011	-3.6	0.00043	0.0046
PLEK	-5.10E-05	-4.6	6.10E-06	0.00016
PLEKHG1	-4.80E-05	-6	5.60E-09	5.00E-07
PLEKHH2	-3.00E-05	-3	0.0033	0.022
PLN	-0.00012	-6.9	3.50E-11	6.70E-09
PLP1	-7.90E-05	-2.8	0.0052	0.031
PLSCR4	-2.90E-05	-3.8	0.00016	0.0021
PLXDC2	-4.80E-05	-5.5	9.60E-08	5.30E-06
PLXNA4	-6.00E-05	-5	1.00E-06	3.80E-05
PLXNC1	-8.00E-05	-7.1	1.60E-11	3.60E-09
PNMA2	-8.80E-05	-6.9	3.50E-11	6.80E-09
PODXL	-3.70E-05	-5.1	7.30E-07	2.80E-05
POU6F1	-3.90E-05	-5.3	2.30E-07	1.10E-05
PPAPDC1A	-1.00E-04	-5	1.30E-06	4.50E-05
PPM1H	-5.90E-05	-4.6	6.50E-06	0.00017
PPM1L	-5.20E-05	-4.7	4.20E-06	0.00012
PPP1R3A	-0.00016	-3.5	0.00058	0.0059
PRDM16	-8.60E-05	-6.8	5.80E-11	1.00E-08
PREX2	-0.00011	-8.8	2.20E-16	2.10E-13
PRKAG3	-0.00011	-2.9	0.004	0.025
PRLR	-6.50E-05	-3.6	0.00036	0.004
PRND	-0.00014	-6.2	2.30E-09	2.40E-07
PROX1	-6.70E-05	-4.8	3.30E-06	9.70E-05

10

20

30

40

【表 13 - 14】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
PRR15	-4.70E-05	-2.6	0.0088	0.046
PRR16	-5.70E-05	-5.4	1.20E-07	6.40E-06
PRRG3	-0.00013	-3.8	0.00016	0.0021
PRRX1	-6.40E-05	-6.1	4.00E-09	3.80E-07
PRUNE2	-9.60E-05	-5.8	2.10E-08	1.50E-06
PSD	-3.60E-05	-4.5	1.20E-05	0.00027
PSD3	-2.10E-05	-2.6	0.0097	0.049
PTCHD1	-0.00014	-4.5	8.90E-06	0.00021
PTGER3	-7.60E-05	-5.7	3.90E-08	2.50E-06
PTGFR	-8.70E-05	-6.4	7.90E-10	9.60E-08
PTGIR	-3.70E-05	-4.4	1.90E-05	4.00E-04
PTPLAD2	-2.40E-05	-2.8	0.0064	0.036
PTPN7	-3.50E-05	-3.2	0.0015	0.012
PTPRB	-6.30E-05	-8.7	3.60E-16	3.30E-13
PTPRC	-6.60E-05	-5.7	4.10E-08	2.60E-06
PTPRD	-0.00014	-8.3	7.00E-15	4.30E-12
PTPRG	-2.60E-05	-3.4	0.00078	0.0074
PTPRJ	-4.20E-05	-5.3	2.70E-07	1.20E-05
PTPRM	-4.70E-05	-6.2	2.50E-09	2.60E-07
PTPRT	-0.00013	-4.1	6.50E-05	0.0011
PTX3	-1.00E-04	-5.2	3.90E-07	1.70E-05
PURG	-0.00011	-4.4	1.60E-05	0.00034
PVRL3	-4.40E-05	-3.5	0.00051	0.0053
PYGO1	-1.00E-04	-6	5.60E-09	5.00E-07
RAB15	-3.70E-05	-4.9	2.00E-06	6.30E-05
RAB19	-0.00013	-5.6	6.40E-08	3.80E-06
RAB3B	-8.00E-05	-3.6	4.00E-04	0.0044
RAB3C	-0.00012	-4	6.80E-05	0.0011
RAB6B	-3.90E-05	-3	0.0034	0.023
RAB9B	-0.00012	-5.5	9.80E-08	5.40E-06
RARRES3	-5.10E-05	-4.6	5.90E-06	0.00015
RASGRF2	-7.60E-05	-7.8	2.00E-13	8.20E-11
RASGRP1	-3.50E-05	-3	0.0027	0.019
RASL10B	-5.00E-05	-4.2	4.50E-05	0.00078
RASSF2	-5.90E-05	-6.7	1.20E-10	2.00E-08
RASSF4	-5.70E-05	-6.9	4.50E-11	8.50E-09
RASSF8	-3.50E-05	-4.3	2.10E-05	0.00043
RBMS3	-8.30E-05	-8.6	6.30E-16	5.30E-13
RBPM2	-5.90E-05	-6.4	6.50E-10	8.20E-08
RCAN2	-6.80E-05	-7.4	2.20E-12	6.40E-10
REEP2	-4.30E-05	-4.2	4.20E-05	0.00075
RELN	-0.00012	-5.8	1.60E-08	1.20E-06
RGAG4	-5.80E-05	-5.8	1.90E-08	1.40E-06
RGS18	-6.70E-05	-6.6	3.10E-10	4.30E-08

10

20

30

40

【表 13 - 15】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
RGS5	-4.80E-05	-4.5	1.00E-05	0.00024
RGS8	-8.10E-05	-3.4	0.00089	0.0081
RHOH	-4.30E-05	-4.1	5.90E-05	0.00098
RHOU	-3.00E-05	-3.6	0.00033	0.0038
RIMKLA	-7.40E-05	-3.3	0.0012	0.01
RIMS4	-0.00018	-6.9	4.70E-11	8.80E-09
RLN2	-7.50E-05	-2.7	0.0073	0.04
RNF150	-0.00011	-7.1	1.10E-11	2.60E-09
RNF152	-2.60E-05	-2.9	0.0035	0.023
RNF157	-6.10E-05	-6.8	5.50E-11	1.00E-08
RNF180	-8.00E-05	-7.2	7.70E-12	1.90E-09
ROR2	-6.00E-05	-4.7	4.10E-06	0.00012
RORA	-3.00E-05	-3.6	0.00042	0.0045
RPS6KA6	-0.00016	-4.7	4.90E-06	0.00013
RRAGD	-3.50E-05	-3.4	0.00067	0.0065
RSPO3	-0.00015	-11	5.90E-23	2.40E-19
RUNX1T1	-1.00E-04	-6.9	5.00E-11	9.20E-09
RUNX2	-3.10E-05	-4.4	1.90E-05	4.00E-04
S1PR1	-6.10E-05	-8.6	9.60E-16	7.70E-13
S1PR3	-6.80E-05	-8.3	4.90E-15	3.20E-12
SALL1	-7.70E-05	-3.1	0.0019	0.015
SALL2	-6.30E-05	-5.2	3.40E-07	1.50E-05
SAMD4A	-3.10E-05	-3.7	0.00023	0.0028
SAMD5	-6.40E-05	-4.5	1.20E-05	0.00028
SARDH	-4.20E-05	-4	7.40E-05	0.0012
SARM1	-6.00E-05	-6.8	9.50E-11	1.60E-08
SCAMP5	-2.70E-05	-3	0.0031	0.021
SCIN	-6.60E-05	-4.6	5.60E-06	0.00015
SCML4	-9.20E-05	-4.8	2.40E-06	7.40E-05
SCN3A	-0.00011	-6.8	7.90E-11	1.40E-08
SCN7A	-8.80E-05	-2.9	0.0047	0.029
SCN9A	-9.20E-05	-4.8	2.60E-06	7.80E-05
SCUBE1	-6.80E-05	-4.8	3.20E-06	9.40E-05
SELE	-9.40E-05	-5.7	3.90E-08	2.50E-06
SELP	-9.20E-05	-5.5	1.00E-07	5.70E-06
SELPLG	-4.40E-05	-5.3	3.00E-07	1.40E-05
SEMA3A	-5.90E-05	-4.4	1.60E-05	0.00034
SEMA3E	-0.00013	-3.6	0.00034	0.0039
SEMA7A	-2.60E-05	-3.5	0.00064	0.0063
SERPINA1	-5.90E-05	-5.6	5.20E-08	3.20E-06
SERPINA5	-0.00012	-5.7	4.20E-08	2.70E-06
SERPING1	-6.20E-05	-6.8	7.10E-11	1.20E-08
SFMBT2	-5.50E-05	-5.5	9.10E-08	5.10E-06
SGCD	-0.00011	-7.7	3.30E-13	1.20E-10

10

20

30

40

【表 13 - 16】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
SGIP1	-5.00E-05	-4.5	1.10E-05	0.00025
SH2D1A	-8.70E-05	-5.8	1.80E-08	1.30E-06
SHE	-5.50E-05	-5.7	4.20E-08	2.60E-06
SHISA6	-0.00012	-3.4	0.00082	0.0076
SIDT1	-7.70E-05	-6	7.80E-09	6.60E-07
SIGLEC14	-9.00E-05	-4.2	4.40E-05	0.00078
SIGLEC8	-9.70E-05	-5.4	1.80E-07	9.00E-06
SIGLEC9	-6.50E-05	-7.5	1.10E-12	3.60E-10
SIM1	-0.00011	-3	0.0027	0.019
SLA	-5.40E-05	-5.7	2.90E-08	2.00E-06
SLAMF1	-4.70E-05	-3.9	0.00012	0.0017
SLC11A1	-4.60E-05	-4.5	9.00E-06	0.00022
SLC12A3	-8.00E-05	-3.3	0.00095	0.0085
SLC16A10	-5.90E-05	-6.2	1.90E-09	2.00E-07
SLC1A2	-4.10E-05	-2.8	0.0056	0.033
SLC22A16	-6.40E-05	-2.7	0.0069	0.038
SLC24A2	-9.80E-05	-3.5	0.00051	0.0053
SLC2A5	-6.50E-05	-6.9	5.00E-11	9.20E-09
SLC39A14	-2.80E-05	-3.9	0.00013	0.0018
SLC46A2	-7.20E-05	-4.2	3.40E-05	0.00063
SLC4A4	-9.60E-05	-5	1.10E-06	3.80E-05
SLC6A1	-6.80E-05	-4.2	3.40E-05	0.00063
SLC6A20	-9.20E-05	-3.9	0.00011	0.0016
SLC6A4	-7.40E-05	-2.6	0.0094	0.048
SLC7A2	-4.20E-05	-2.9	0.004	0.025
SLC7A3	-0.00011	-3.8	0.00018	0.0023
SLC7A7	-6.70E-05	-7	1.80E-11	3.90E-09
SLC8A1	-5.90E-05	-6.8	5.40E-11	9.90E-09
SLC8A3	-0.00011	-5.3	3.20E-07	1.40E-05
SLC9A7	-3.90E-05	-4.4	1.30E-05	0.00029
SLC9A9	-3.20E-05	-3.2	0.0015	0.012
SLCO5A1	-5.40E-05	-4.6	6.80E-06	0.00017
SLFN12L	-3.30E-05	-3.4	0.00085	0.0078
SLIT2	-7.50E-05	-5.7	3.00E-08	2.00E-06
SLIT3	-7.20E-05	-6.2	2.50E-09	2.60E-07
SLTRK4	-0.00016	-6.5	4.30E-10	5.70E-08
SMOC1	-5.30E-05	-3.3	0.00096	0.0086
SMTNL1	-8.00E-05	-3.6	0.00037	0.0042
SMTNL2	-0.00014	-7.3	4.40E-12	1.10E-09
SNAP25	-6.70E-05	-4.8	3.20E-06	9.40E-05
SNED1	-8.70E-05	-8.6	5.70E-16	4.90E-13
SNX32	-7.10E-05	-3.1	0.0022	0.016
SORBS1	-7.20E-05	-7.3	2.80E-12	7.90E-10
SOX17	-6.00E-05	-7.5	1.10E-12	3.50E-10

10

20

30

40

【表 13 - 17】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
SOX5	-0.00011	-7	2.10E-11	4.40E-09
SP6	-3.00E-05	-3.7	0.00026	0.0032
SPARC	-5.90E-05	-5.4	1.20E-07	6.30E-06
SPATA13	-6.60E-05	-6.4	8.60E-10	1.00E-07
SPN	-5.20E-05	-4.8	3.30E-06	9.60E-05
SPOCK2	-4.60E-05	-4.4	1.80E-05	0.00038
SRPX2	-5.50E-05	-7	2.30E-11	4.70E-09
SSC5D	-7.10E-05	-6.2	2.70E-09	2.70E-07
ST18	-9.10E-05	-3.8	0.00018	0.0023
ST3GAL1	-2.80E-05	-3.5	0.00062	0.0062
ST3GAL6	-2.20E-05	-3	0.003	0.021
ST6GAL1	-5.60E-05	-5	1.20E-06	4.20E-05
ST6GAL2	-0.00014	-6.3	1.30E-09	1.50E-07
ST6GALNAC3	-6.40E-05	-8.6	1.00E-15	8.00E-13
ST6GALNAC5	-8.00E-05	-6.1	3.30E-09	3.20E-07
ST8SIA4	-5.00E-05	-6.3	1.30E-09	1.50E-07
STARD13	-3.70E-05	-4.8	3.10E-06	9.10E-05
STAT1	-3.20E-05	-3.6	0.00042	0.0045
STC1	-4.40E-05	-4.3	2.10E-05	0.00043
STEAP2	-5.00E-05	-5.6	5.00E-08	3.10E-06
SUCNR1	-5.20E-05	-3.3	0.001	0.0091
SULF1	-8.90E-05	-7.3	4.20E-12	1.10E-09
SV2B	-7.10E-05	-3.6	0.00033	0.0037
SVIP	-6.00E-05	-5.1	7.20E-07	2.80E-05
SYNPO2	-7.50E-05	-4.5	1.00E-05	0.00024
SYP	-4.50E-05	-4.7	3.90E-06	0.00011
SYPL2	-7.40E-05	-4.2	3.30E-05	0.00061
SYT13	-1.00E-04	-3.1	0.002	0.015
SYT9	-9.40E-05	-2.9	0.0039	0.025
SYTL4	-4.90E-05	-5.9	1.30E-08	1.00E-06
TBX15	-6.50E-05	-4.8	2.20E-06	6.90E-05
TBX21	-5.70E-05	-4.5	1.00E-05	0.00024
TCN2	-5.90E-05	-6.7	1.60E-10	2.50E-08
TDGF1	-0.00012	-3.9	0.00013	0.0019
TET1	-3.70E-05	-3.5	0.00054	0.0055
THBS1	-4.70E-05	-4.1	5.00E-05	0.00085
THSD7A	-0.00011	-8.6	1.10E-15	8.50E-13
TIMD4	-0.00019	-6.4	5.80E-10	7.40E-08
TIMP2	-7.30E-05	-8.3	5.60E-15	3.50E-12
TLR4	-8.60E-05	-9.5	1.80E-18	2.90E-15
TLR8	-8.70E-05	-6.8	9.20E-11	1.60E-08
TM4SF18	-4.50E-05	-6	7.70E-09	6.50E-07
TMEM156	-3.70E-05	-3.2	0.0018	0.014
TMEM170B	-7.00E-05	-8.3	5.70E-15	3.60E-12

10

20

30

40

【表 13 - 18】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
TMEM182	-2.60E-05	-3.5	0.00064	0.0063
TMEM231	-3.90E-05	-4.3	2.90E-05	0.00056
TMEM26	-6.20E-05	-5.9	1.50E-08	1.10E-06
TMEM47	-6.10E-05	-6.8	8.50E-11	1.50E-08
TMEM86A	-2.60E-05	-2.8	0.0055	0.032
TMEM98	-4.10E-05	-4.9	1.70E-06	5.50E-05
TMTC1	-8.40E-05	-6.6	2.60E-10	3.70E-08
TNFSF11	-4.60E-05	-3.3	0.0011	0.0098
TNFSF15	-4.90E-05	-3.6	0.00045	0.0048
TNFSF4	-5.50E-05	-4.8	3.00E-06	9.00E-05
TNFSF8	-8.50E-05	-5.5	9.90E-08	5.40E-06
TNIK	-5.80E-05	-5.2	3.20E-07	1.40E-05
TNNI1	-7.10E-05	-3.5	0.00061	0.0061
TNR	-0.00012	-4.1	5.50E-05	0.00092
TNS3	-3.80E-05	-4.9	1.40E-06	4.90E-05
TOX	-4.70E-05	-4.2	4.00E-05	0.00071
TRAT1	-0.00011	-4.9	2.00E-06	6.30E-05
TREM2	-4.20E-05	-3.8	0.00015	0.0021
TREML2	-4.20E-05	-2.9	0.004	0.025
TRHDE	-0.00013	-3.9	0.00011	0.0016
TRIM2	-3.40E-05	-3.1	0.002	0.015
TRIM58	-8.40E-05	-3.3	0.001	0.009
TRPC6	-3.00E-05	-3.5	0.00061	0.0061
TRPM8	-9.60E-05	-3.6	0.00041	0.0045
TRPS1	-2.30E-05	-2.8	0.0052	0.031
TSPAN11	-5.10E-05	-4.4	1.80E-05	0.00038
TSPAN18	-6.80E-05	-5.6	4.80E-08	3.00E-06
TSPAN5	-2.40E-05	-3	0.0031	0.021
TSPAN7	-6.90E-05	-4.6	6.50E-06	0.00017
TTC28	-4.00E-05	-4.4	1.80E-05	0.00037
TTLL7	-3.10E-05	-2.7	0.0077	0.041
TTYH2	-2.50E-05	-3.1	0.0021	0.015
TUB	-6.30E-05	-5.2	3.50E-07	1.50E-05
TWIST2	-4.40E-05	-4.4	1.90E-05	0.00039
TYRP1	-9.10E-05	-3.1	0.0024	0.017
UBE2QL1	-3.70E-05	-2.9	0.0041	0.026
UBXN10	-7.60E-05	-5.2	3.30E-07	1.50E-05
UGT2B4	-8.00E-05	-3	0.0032	0.021
UNC5C	-9.40E-05	-4.5	1.20E-05	0.00027
USP13	-3.90E-05	-5	1.30E-06	4.60E-05
VASH1	-5.10E-05	-7	2.10E-11	4.40E-09
VASH2	-5.10E-05	-4.3	2.20E-05	0.00044
VAT1L	-1.00E-04	-5.5	8.60E-08	4.80E-06
VENTX	-7.30E-05	-5.4	1.20E-07	6.60E-06

10

20

30

40

【表 13 - 19】

遺伝子	β	t 統計量	p 値	FDR
VGLL2	-0.00012	-2.9	0.0039	0.025
VGLL3	-7.00E-05	-6.2	2.00E-09	2.10E-07
VSIG10	-2.30E-05	-3	0.003	0.021
VWC2	-9.00E-05	-2.6	0.0098	0.049
WFIKKN2	-9.70E-05	-3	0.0034	0.022
WISP2	-0.00015	-8.6	1.00E-15	8.10E-13
WNT2	-9.20E-05	-4.8	2.90E-06	8.50E-05
WNT5A	-4.30E-05	-4.4	1.60E-05	0.00035
WNT5B	-3.50E-05	-3	0.003	0.02
XCR1	-9.00E-05	-3.8	0.00015	0.0021
XIRP1	-8.70E-05	-3.6	0.00043	0.0046
ZBTB10	-5.30E-05	-5.1	8.20E-07	3.10E-05
ZBTB16	-0.00012	-4.6	8.00E-06	2.00E-04
ZBTB20	-3.30E-05	-3.8	0.00016	0.0022
ZC4H2	-4.80E-05	-4.8	3.20E-06	9.40E-05
ZDHHC15	-0.00013	-6.6	2.80E-10	4.00E-08
ZEB1	-6.90E-05	-8.8	1.50E-16	1.50E-13
ZEB2	-6.80E-05	-8.4	3.80E-15	2.50E-12
ZFP82	-4.50E-05	-4.2	3.20E-05	6.00E-04
ZIK1	-3.20E-05	-3.7	0.00025	0.003
ZNF154	-5.00E-05	-5.7	3.00E-08	2.00E-06
ZNF208	-0.00013	-6.6	3.10E-10	4.30E-08
ZNF215	-7.00E-05	-4.5	8.50E-06	0.00021
ZNF280B	-7.30E-05	-3.9	0.00012	0.0017
ZNF287	-2.80E-05	-3	0.003	0.021
ZNF347	-4.10E-05	-3.4	0.00066	0.0065
ZNF366	-5.90E-05	-4.4	1.30E-05	3.00E-04
ZNF429	-3.70E-05	-2.9	0.0038	0.025
ZNF442	-2.60E-05	-3	0.0026	0.018
ZNF618	-3.30E-05	-3.9	0.00012	0.0017
ZNF701	-3.60E-05	-4	7.60E-05	0.0012
ZNF781	-5.80E-05	-3.1	0.0024	0.017
ZNF788	-3.60E-05	-3	0.0026	0.018
ZNF793	-4.90E-05	-2.7	0.0068	0.038
ZNF843	-2.40E-05	-3.3	0.0013	0.011
ZNF844	-5.60E-05	-4.1	5.30E-05	0.00089
ZSCAN1	-8.90E-05	-3.1	0.002	0.015

10

20

30

40

【0163】

【表14-1】

表14. 逆に発現されかつmiR-375(MIMAT0000728)への推定または検証された結合部位を含むmRNA

遺伝子	t統計量	p値	p補正
ACVR1C	-4.70738	3.79E-06	8.36E-05
ADAMDEC1	-2.85571	0.004584	0.028127
ADAMTS2	-8.00448	2.43E-14	5.11E-12
ADAMTS4	-5.61352	4.40E-08	1.79E-06

【表 1 4 - 2】

遺伝子	t 統計量	p 値	p 補正
ADAMTS5	-4.36029	1.77E-05	0.000308
AFAP1L1	-5.85642	1.21E-08	5.81E-07
AFAP1L2	-3.94692	9.80E-05	0.001288
AK5	-3.22616	0.001389	0.011065
APBA2	-5.98525	5.96E-09	3.14E-07
ATP1B4	-2.80475	0.005354	0.0317
BAG2	-6.31936	9.12E-10	6.02E-08
BCAT1	-4.44925	1.20E-05	0.000223
BVES	-2.70341	0.007242	0.039902
C10orf55	-7.35354	1.73E-12	2.33E-10
C15orf54	-3.29027	0.001116	0.009302
C1orf180	-2.80204	0.005398	0.0319
C1S	-6.47289	3.76E-10	2.76E-08
C2orf48	-3.79852	0.000175	0.002078
C6orf141	-3.84998	0.000143	0.001764
C9orf84	-4.58988	6.45E-06	0.000131
CALB1	-3.21159	0.001459	0.011504
CCDC102B	-5.32761	1.92E-07	6.44E-06
CD84	-2.61675	0.009312	0.048237
CDH6	-3.95802	9.38E-05	0.001241
CDK14	-4.82222	2.23E-06	5.31E-05
CDK5R1	-2.75412	0.006233	0.035597
CDK6	-3.82156	0.00016	0.001932
CDYL2	-4.19285	3.60E-05	0.000559
CENPA	-7.27305	2.89E-12	3.68E-10
CENPF	-5.77959	1.82E-08	8.34E-07
CFHR3	-2.90338	0.003957	0.025106
CHST11	-7.11164	7.96E-12	9.07E-10
CLEC2B	-4.19326	3.59E-05	0.000559
CLEC5A	-2.80953	0.005277	0.031352
CNGB1	-5.47185	9.20E-08	3.40E-06
COL16A1	-6.91676	2.65E-11	2.64E-09
COL27A1	-7.59153	3.74E-13	5.94E-11
COL5A1	-10.2428	2.13E-21	1.85E-18
COL5A2	-10.2511	2.00E-21	1.75E-18
COL5A3	-7.81021	8.90E-14	1.64E-11
CRISPLD2	-4.86085	1.86E-06	4.55E-05
CSAG1	-4.01632	7.42E-05	0.001022
CYSLTR2	-2.62634	0.00906	0.047249
DAB2	-3.593	0.00038	0.003911
DCLK3	-4.99615	9.79E-07	2.62E-05
DDX60L	-4.29871	2.30E-05	0.000385
DFNA5	-6.82695	4.58E-11	4.29E-09
DGKI	-3.21627	0.001436	0.01136

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

遺伝子	t 統計量	p 値	p 補正
DKK3	-3.72321	0.000234	0.002631
DMBX1	-3.69276	0.000262	0.00289
DRP2	-3.04627	0.002516	0.017666
DUSP6	-3.0615	0.002395	0.016999
E2F7	-6.80262	5.30E-11	4.88E-09
ECM2	-3.70034	0.000255	0.002824
EIF5A2	-7.56276	4.51E-13	7.02E-11
EME1	-7.30865	2.31E-12	3.01E-10
ENPEP	-7.33148	1.99E-12	2.64E-10
ERCC6L	-5.24049	2.97E-07	9.39E-06
EXO1	-6.73046	8.19E-11	7.18E-09
FAM111B	-3.21279	0.001453	0.011467
FAM198B	-4.22428	3.16E-05	0.000501
FBLN7	-5.13553	4.98E-07	1.47E-05
FBN2	-5.49402	8.20E-08	3.08E-06
FCGR2A	-5.69769	2.82E-08	1.22E-06
FCGR3A	-5.97743	6.23E-09	3.26E-07
FERMT2	-2.76737	0.005991	0.034542
FJX1	-5.16984	4.21E-07	1.27E-05
FLRT2	-5.50011	7.95E-08	3.00E-06
FN1	-9.32549	2.16E-18	1.08E-15
FOXD1	-6.88267	3.26E-11	3.18E-09
FOXR2	-2.61614	0.009328	0.0483
FPR2	-3.97456	8.78E-05	0.001175
FSTL1	-4.56735	7.14E-06	0.000143
GAD1	-2.75515	0.006213	0.035514
GATA6	-2.95962	0.003318	0.021907
GDF6	-3.57806	0.000402	0.004089
GINS4	-4.29356	2.35E-05	0.000392
GLIPR1	-5.15516	4.52E-07	1.35E-05
GLIS3	-2.88323	0.004211	0.026349
GNGT2	-2.98368	0.003074	0.02065
GOLGA8F	-2.73345	0.006628	0.037306
GOLGA8G	-3.33689	0.00095	0.008182
GPR116	-3.23522	0.001347	0.010799
GPR137C	-3.77558	0.000191	0.002234
GPR153	-2.70662	0.007174	0.039617
GPR39	-3.10237	0.002096	0.015314
GRM5	-2.83551	0.004876	0.029502
GRM8	-3.15477	0.001764	0.013367
GUCY1A2	-6.22001	1.61E-09	9.91E-08
GXYLT2	-4.60002	6.16E-06	0.000126
HAPLN1	-5.46562	9.50E-08	3.50E-06
HAS2	-4.90104	1.54E-06	3.87E-05

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

遺伝子	t 統計量	p 値	p 補正
HELLS	-3.47233	0.000589	0.005576
HHIPL1	-5.11384	5.54E-07	1.61E-05
HIST1H2AG	-5.61991	4.26E-08	1.74E-06
HIST1H2BD	-3.40446	0.00075	0.00677
HIST1H2BO	-5.44492	1.06E-07	3.84E-06
HIST1H3B	-2.8217	0.005085	0.030472
HIST1H4E	-3.13256	0.001898	0.014162
HMX1	-3.92309	0.000108	0.001392
HOXA10	-6.33104	8.53E-10	5.68E-08
HOXB9	-4.93878	1.29E-06	3.32E-05
HOXC10	-6.03467	4.54E-09	2.47E-07
HOXC11	-7.25611	3.22E-12	4.05E-10
HOXC4	-6.45736	4.11E-10	2.98E-08
HOXD1	-4.49567	9.81E-06	0.000187
HOXD11	-7.56657	4.40E-13	6.87E-11
HOXD12	-3.76912	0.000196	0.002281
HSPA12A	-3.75646	0.000206	0.002373
HSPA2	-2.90069	0.00399	0.02527
IFI44L	-3.82079	0.000161	0.001936
IFIT2	-5.41764	1.21E-07	4.33E-06
IFNK	-2.63939	0.008725	0.04593
IGF2BP2	-4.72804	3.45E-06	7.71E-05
IGSF6	-3.83708	0.000151	0.001838
INHBA	-8.99561	2.40E-17	9.68E-15
ISL2	-2.64672	0.008543	0.045202
ITGA1	-7.22186	3.99E-12	4.90E-10
ITGA3	-4.64266	5.09E-06	0.000107
ITGB6	-3.35809	0.000883	0.007714
KANK4	-3.77904	0.000189	0.00221
KCNJ6	-3.19048	0.001566	0.012169
KCNMB3	-2.69746	0.007369	0.040435
KIAA1644	-4.81971	2.26E-06	5.37E-05
KIF4A	-7.37437	1.52E-12	2.07E-10
KIF4B	-6.56762	2.16E-10	1.69E-08
KLF7	-5.6146	4.38E-08	1.79E-06
KLHL6	-3.22736	0.001383	0.011029
KRT82	-3.0844	0.002223	0.016034
LAMP3	-3.2309	0.001367	0.010926
LHX9	-3.03305	0.002626	0.01826
LILRB4	-4.07083	5.95E-05	0.000851
LOX	-6.21364	1.67E-09	1.02E-07
LPAR4	-2.83169	0.004933	0.029767
LPPR5	-4.05481	6.35E-05	0.000898
LRP8	-2.72484	0.006799	0.038033

10

20

30

40

【表 1 4 - 5】

遺伝子	t 統計量	p 値	p 補正
LTBP2	-5.09681	6.02E-07	1.73E-05
MAF	-3.81931	0.000162	0.001946
MATN3	-7.12045	7.54E-12	8.64E-10
MCTP1	-3.91447	0.000111	0.001432
MELK	-7.44867	9.43E-13	1.36E-10
MEST	-3.1584	0.001743	0.01324
MFRP	-5.76589	1.96E-08	8.89E-07
MKI67	-5.92945	8.10E-09	4.10E-07
MS4A14	-4.53705	8.17E-06	0.00016
MS4A7	-3.29782	0.001088	0.009112
MYL9	-3.42878	0.000688	0.006319
NAV3	-2.68239	0.007702	0.041798
NCAM1	-2.70794	0.007146	0.0395
NETO1	-3.66353	0.000292	0.003161
NEXN	-3.58178	0.000396	0.004044
NFE2L3	-3.94766	9.77E-05	0.001284
NLRP10	-2.86328	0.004479	0.027629
NOX5	-2.86268	0.004487	0.027669
NT5E	-4.87679	1.73E-06	4.27E-05
NTM	-5.75521	2.08E-08	9.34E-07
NTNG2	-3.39489	0.000776	0.006955
NXPH4	-3.73884	0.00022	0.002507
OLFML2A	-4.36198	1.76E-05	0.000306
OLR1	-4.27104	2.59E-05	0.000425
OPN1SW	-3.45766	0.000621	0.005817
PAG1	-3.60653	0.000362	0.003756
PALM2	-2.6554	0.008331	0.044352
PAPLN	-4.68802	4.14E-06	9.01E-05
PAPSS2	-3.26239	0.001228	0.010035
PCDH7	-3.59138	0.000382	0.00393
PDE3A	-2.95598	0.003356	0.022103
PDGFC	-2.97263	0.003184	0.021221
PDPN	-7.85634	6.55E-14	1.24E-11
PGM2L1	-2.79247	0.005556	0.032613
PIF1	-6.4856	3.49E-10	2.58E-08
PIPOX	-2.66955	0.007996	0.042999
PLEKHG4B	-2.97115	0.003199	0.021299
PPEF1	-9.09764	1.15E-17	4.96E-15
PRKG1	-2.84047	0.004803	0.029159
PRNT	-3.87715	0.000129	0.001617
PSMB9	-4.71989	3.58E-06	7.96E-05
PSTPIP1	-3.69793	0.000257	0.002845
RASSF4	-3.99371	8.13E-05	0.001103
RASSF8	-3.45857	0.000619	0.005802

10

20

30

40

【表 1 4 - 6】

遺伝子	t 統計量	p 値	p 補正
RGS4	-6.88112	3.29E-11	3.20E-09
RRM2	-6.24961	1.36E-09	8.55E-08
RSAD2	-5.2935	2.28E-07	7.47E-06
S1PR5	-5.42557	1.17E-07	4.18E-06
SCARB1	-2.753	0.006253	0.035687
SCUBE3	-2.78515	0.00568	0.033164
SDK2	-3.22341	0.001402	0.011147
SEC16B	-3.16386	0.001711	0.013052
SEMA5B	-4.28609	2.43E-05	0.000403
SFRP4	-3.75325	0.000208	0.002397
SGCD	-2.89289	0.004087	0.025746
SGIP1	-6.2358	1.47E-09	9.16E-08
SH2D7	-3.07003	0.00233	0.016635
SHOX2	-8.26163	4.23E-15	1.06E-12
SIGLEC15	-5.56541	5.66E-08	2.23E-06
SKA3	-5.776	1.86E-08	8.48E-07
SLA	-2.83748	0.004847	0.029366
SLC16A1	-6.34778	7.75E-10	5.21E-08
SLC5A12	-2.75131	0.006285	0.035824
SLC8A1	-3.23799	0.001334	0.010719
SLFN11	-3.45125	0.000635	0.005925
SP110	-3.72725	0.00023	0.002598
SPOCK1	-3.93298	0.000104	0.001348
ST3GAL5	-4.39456	1.53E-05	0.000272
ST8SIA2	-5.50708	7.67E-08	2.91E-06
STAMBPL1	-2.89838	0.004018	0.025409
STARD13	-4.93888	1.29E-06	3.32E-05
STON1	-4.12629	4.74E-05	0.000704
STON2	-5.23961	2.98E-07	9.43E-06
SUCNR1	-3.03569	0.002603	0.01814
SULF1	-6.35395	7.48E-10	5.05E-08
SULF2	-6.02724	4.73E-09	2.56E-07
TBX18	-2.61611	0.009329	0.048302
TFRC	-2.73493	0.006598	0.037182
THBS2	-5.721	2.50E-08	1.10E-06
TLL1	-3.01924	0.002745	0.018902
TMED7-TICAM2	-4.38401	1.60E-05	0.000283
TMEM229B	-3.04848	0.002498	0.017568
TMEM26	-7.48025	7.70E-13	1.13E-10
TNC	-4.77772	2.74E-06	6.34E-05
TNFRSF9	-5.19521	3.71E-07	1.14E-05
TNS3	-4.86153	1.85E-06	4.54E-05
TOX2	-6.5378	2.57E-10	1.97E-08
TPM1	-4.57777	6.81E-06	0.000138

10

20

30

40

【表14-7】

遺伝子	t統計量	p値	p補正
TRPC4	-5.32987	1.90E-07	6.38E-06
TSHZ3	-5.25058	2.82E-07	8.99E-06
TTC7B	-4.11374	4.99E-05	0.000735
TYMS	-5.38473	1.44E-07	5.01E-06
XAF1	-5.34345	1.77E-07	6.01E-06
XRCC2	-5.27422	2.51E-07	8.12E-06
ZIC1	-2.82865	0.004979	0.029979
ZIC5	-6.58899	1.90E-10	1.51E-08
ZPLD1	-5.35131	1.70E-07	5.80E-06

【0164】

IPAによる逆に発現された標的遺伝子の機能的経路分析は、上位のがん疾患機能のうちの2つ（細胞増殖（21個のmRNA、 $p = 8.95 \times 10^{-10}$ ）および転移（23個のmRNA、 $p = 9.54 \times 10^{-12}$ ）を含む）を同定した（表15）。これらのネットワークは、がん成長（EGFR、MET、IGF1R、PDGFRB、IRS1、SOC1、CCNA1）、接着、移動および侵入（MET、ITGA6、NT5E、SERPINE1）、ならびに分化（WNT7B/5A、FZD2、CELSR3、CTHRC1）に決定的に関わる分子の多様なレパートリーを有する。上記遺伝子のうちの大部分は、mIRC-30の新規な標的であり、機能的特徴づけによっては以前に検証されていない。

【表15-1】

表15. がん増殖および転移において同定されたmiR-30a-5p発現に対して逆関係を有するmRNA

ID	データセットにおける遺伝子	推定(発現の方向に基づく)	傾き	知見
増殖				
IRS1	IRS1	影響を受ける	-2.612	影響を及ぼす影響する (1)
NT5E	NT5E	減少	-2.675	増加する (3)
EGFR	EGFR	減少	-2.693	増加する (33)
GLDC	GLDC	減少	-2.718	増加する (2)
SOCS1	SOCS1	増加	-2.843	減少する (3)
STAT1	STAT1	増加	-2.941	減少する (5)
LOX	LOX	減少	-3.093	増加する (3)
PDGFRB	PDGFRB	減少	-3.155	増加する (2)
WNT5A	WNT5A	減少	-3.212	増加する (7)
CD80	CD80	増加	-3.234	減少する (1)
CCNA1	CCNA1	減少	-3.392	増加する (5)
THBS2	THBS2	増加	-3.489	減少する (2)
IGF1R	IGF1R	減少	-3.529	増加する (6)
AFAP1L2	AFAP1L2	影響を受ける	-3.575	影響する (1)
CTHRC1	CTHRC1	減少	-3.813	増加する (1)
MET	MET	減少	-4.497	増加する (17)
FAP	FAP	減少	-4.575	増加する (1)
SERPINE1	SERPINE1	影響を受ける	-6.147	影響する (5)
IL1A	IL1A	増加	-6.209	減少する (10)
GJA1	GJA1	増加	-6.454	減少する (2)
MYBL2	MYBL2	減少	-7.837	増加する (1)
転移				
IRS1	IRS1	影響を受ける	-2.612	影響する (1)

10

20

30

【表15-2】

ID	データセットにおける遺伝子	推定(発現の方向に基づく)	傾き	知見
TRIM9	TRIM9	影響を受ける	-2.634	影響する(1)
NT5E	NT5E	減少	-2.675	増加する(7)
EGFR	EGFR	減少	-2.693	増加する(92)
SOCS1	SOCS1	増加	-2.843	減少する(1)
STAT1	STAT1	影響を受ける	-2.941	影響する(1)
LOX	LOX	減少	-3.093	増加する(1)
EPB41L4B	EPB41L4B	影響を受ける	-3.152	影響する(2)
PDGFRB	PDGFRB	影響を受ける	-3.155	影響する(37)
WNT5A	WNT5A	増加	-3.212	減少する(7)
CD80	CD80	増加	-3.234	減少する(1)
CCNA1	CCNA1	減少	-3.392	増加する(5)
IGF1R	IGF1R	減少	-3.529	増加する(1)
CTHRC1	CTHRC1	減少	-3.813	増加する(1)
GNRHR	GNRHR	影響を受ける	-4.119	影響する(15)
MET	MET	減少	-4.497	増加する(22)
ITGA5	ITGA5	影響を受ける	-5.944	影響する(8)
SERPINE1	SERPINE1	増加	-6.147	減少する(7)
IL1A	IL1A	減少	-6.209	増加する(1)
GJA1	GJA1	増加	-6.454	減少する(1)
ITGA6	ITGA6	影響を受ける	-6.763	影響する(2)
SLC7A11	SLC7A11	影響を受ける	-7.343	影響する(1)
MYBL2	MYBL2	影響を受ける	-7.837	影響する(1)

10

20

30

【0165】

逆に発現されたmRNAの制御を検証するために、HN S C C 株 U M - S C C - 4 6 (これは、相対的に低下したm i R - 3 0 a - 5 p を発現する)において潜在的に標的化されるmRNAに対する、m i R - 3 0 a - 5 p (これは、U M - S C C - 4 6においてm i R - 3 0 e - 5 p より高度に発現される(図7C))または抗m i R 3 0 a の異所性発現の効果を調べた。m i R - 3 0 a - 5 p の発現後に、mRNA発現の低下が、qRT-PCRによって11の選択されたmRNAに関して観察された一方で、抗m i R 3 0 a の発現は、これらの標的遺伝子発現を抑制しなかったか、または増加させた(図5)。バイオインフォマティクス分析および実験データの両方が、HN S C C の病理に関わるいくつかの標的遺伝子に対するm i R 3 0 a の抑制機能の仮説を裏付ける。

【0166】

実施例5

標的遺伝子発現のm i R - 3 0 a - 5 p 直接的制御の機能的検証

m i R - 3 0 - 5 p ファミリーメンバーによる選択された標的遺伝子の直接的制御をさらに検証するために、EGFR、MET、IGF1R および IRS-1 の 3' UTR を含むルシフェラーゼ構築物(これは、m i R - 3 0 a - 5 p に対する標的結合部位を含む)を利用した(図6A)。m i R - 3 0 a - 5 p のシード配列に相補的な結合部位に欠失を有するベクターも、構築した(図6A)。m i R - 3 0 a - 5 p (しかし抗m i R 3 0 a ではない)は、レポーター活性を抑制し、これは、m i R - 3 0 部位欠失によって排除された(図6B)。成長シグナル伝達(EGFR、MET、IGF1R、IRS1)、接着(ITGA6)および分化(FZD2)に関わるいくつかの分子の発現に対する効果をまた、ウェスタンプロットによって確認した(図6Cおよび6E)。これら成長因子レセプターは、いくつかの発がんシグナル伝達経路を刺激するので、PI3K/mTOR-AKT (Freudlspergerら, Expert Opin. Ther. T

40

50

targets 15:63-74, 2011)、SRC (Egloffら, Seminars in Oncology. 35:286-297, 2008)、およびSTAT3シグナル伝達 (Malai, Oral Oncology. 51:565-569, 2015)へのシグナルリン酸化に対するmiR30a-5pの機能的効果を調べた。miR-30a-5pは、これらのシグナル伝達分子の下流のリン酸化を減少させた(図6D)。これらのデータは、HNSCCの悪性表現型において過剰発現され、これに関わる生物学的標的に対してmiR-30a-5pの直接的な制御効果を示す。

【0167】

実施例6

miR-30aは、HNSCC細胞による細胞増殖、運動性および侵入性を阻害する複数のmiR-30a標的は、細胞成長をモジュレートし得るので、hsa-miR-30a-5pの抗増殖効果を、11種のHNSCC細胞株のパネルにおいて確認した。4種の細胞株(UM-SCC-11A、11B、46、47)は、コントロールと比較した場合、<50%の有意に減少した細胞密度を示し(図7A)、このことは、これらの細胞株におけるmiR-30a-5pの低い発現と一致した(図7B)。しかし、成長阻害はHOK細胞において観察されなかった。UM-SCC-1およびUM-SCC-46細胞におけるmiR-30a-5pおよびmiR-30e-5p発現の基底レベルを、qRT-PCRによって測定した(図7C)。増殖を、XTTアッセイによってUM-SCC-1またはUM-SCC-46細胞においても測定した。類似の増殖阻害が、ファミリーメンバー間で観察された(図7D)。

10

20

30

【0168】

miR-30a-5pはまた、UM-SCC-46細胞において>50%コロニー形成を抑制した(図7Eおよび図7H)。成長シグナル伝達は、治療抵抗性を媒介し得るので、miR-30a-5pがシスプラチニ(HNSCCを処置するために使用される最も一般的な化学療法薬)の効果を増大させ得るかどうかを調べた。シスプラチニに対する感受性は、miR-30a-5pの異所性発現によって増強された(図7Fおよび図7I)。miR-30aの抗増殖効果におけるEGFRの重要性を試験するために、EGFRコード配列を、UM-SCC-46においてその制御性3'UTRなしで過剰発現するUM-SCC-46の安定な細胞株を作製した。この細胞株は、増殖に対するmiR-30a-5pの効果において有意な低下を示した(図7G)。

30

【0169】

HNSCCにおけるmiR-30-5pファミリー標的のうちのいくつかは、EGFR (Freudlspergerら, Expert Opin. Ther. Targets. 15:63-74, 2011)、MET (Dongら, Cancer Research. 61:5911-5918, 2001)、ITGA6 (Careyら, J. Cell Biochem. Suppl. 17F:223-232, 1993)、およびSerpine1 (Karbienierら, RNA Biol. 8:850-860, 2011)を含め、細胞運動性および侵入性にも関わっていた。hsa-miR-30a-5pの異所性発現は、2種のHNSCC細胞株の移動アッセイにおいて細胞運動性を有意に遅らせ(図8Aおよび図8B)、Matrige被覆トランスウェル移動アッセイにおいてEGF刺激性侵入性を有意に低下させた(図8Cおよび図8D)。まとめると、miR-30a-5pの増加した発現は、HNSCCにおいて細胞増殖、コロニー形成、移動、および侵入性を有意に阻害し、ならびに化学療法感受性(chemosensitivity)を有意に増強した。

40

【0170】

実施例7

miR-30aミックは、ヒトHNSCC異種移植片の腫瘍成長を抑制するmiR-30a-5pミックを、送達のために、腫瘍細胞上に過剰発現されたトランスフェリンレセプターを標的とする、1本鎖抗体フラグメント(TfrscFv)を有するカチオン性リポソームナノ送達システム(scl)へと製剤化した(Piroloら

50

, Cancer Res. 68 : 1247 - 1250, 2008; Pirrolli ら, Hum. Gene Ther. 17 : 117 - 124, 2006)。F I T C 結合体化コントロールオリゴヌクレオチドを含む s c L キャリアは、肺または肝臓と比較した場合に、H N S C C 異種移植片において優先的な取り込みを受けるか、または腎臓を介して排出される(図 9 A)。改変 m i R - 3 0 a - 5 p ミミックと複合体化したナノリポソーム粒子(m i R - 3 0 a - s c L)またはコントロール m i R (6 0 μ g または約 3 mg / kg)を、月曜日、水曜日、および金曜日(M W F)に3週間にわたって静脈内(I V)に9用量で与え、U M - S C C - 4 6 異種移植片腫瘍を担持するマウスにおいて試験した。有意な腫瘍成長遅延および生存の長期化が、m i R - 3 0 a - s c L 処置で観察された(図 9 B ~ D)。m i R - 3 0 a - s c L での処置は、体重の有意な低下を引き起こさず、その処置が十分に許容されたことが示唆された(図 9 C)。インビオでの腫瘍成長に対する類似の阻害効果は、第2のH N S C C 異種移植片モデル、U M - S C C 4 7(これは、H P V 陽性である)において観察された(図 9 E)。

【0171】

6種のm i R - 3 0 a - 5 p 標的遺伝子の定量的R T - P C Rを行ったところ、実質的に減少した遺伝子発現が、m i R - 3 0 a - s c L ナノ粒子の4用量による処置後に観察された(図 1 0 A および図 1 0 F)。免疫蛍光染色によるE G F R およびM E T の減少した発現はまた、インビオでの処置後の異種移植片腫瘍から採取した凍結切片において観察された(図 1 0 B および図 1 0 C)。m i R - 3 0 a - 5 p のいくつかの標的遺伝子をインビトロおよびインビオ両方での確認により、I n g e n u i t y P a t h w a y A n a l y s i s によって推定されるとおりの増殖および移動に関して報告された相互作用および機能を結びつける経路ダイヤグラムが構築された(図 1 0 D)。m i R - 3 0 a - 5 p ファミリーの抗増殖効果を確認したところ、k i - 6 7 染色の減少もまた観察された(図 1 0 E)。

【0172】

実施例 8

H N S C C の臨床上の特徴と関連するm i R - 3 0 ファミリーメンバーの遺伝的变化 m i R - 3 0 ファミリーメンバーの発現の喪失がH N S C C の病因において重要である場合、そこには、ゲノムレベルでの欠失または後生的なサイレンシングに対する選択圧があり得る。この疑問に対処するために、H N S C C T C G A データセットからのm i R - 3 0 ファミリーメンバーのコピー数多型を分析した(図 1 1 A および図 1 1 B)。M I R 3 0 A およびM I R 3 0 C 2 遺伝子は、染色体 6 上で一緒にクラスター化され、M I R 3 0 E およびM I R 3 0 C 1 遺伝子は、染色体 1 上で一緒にクラスター化され、ここでこれらの遺伝子座においてそれぞれ 1 9 . 7 % および 1 4 . 7 % が、少なくともヘテロ接合性喪失を示す。統合分析は、m i R - 3 0 a (p = 0 . 1 5、図 1 1 A および図 1 1 C) およびm i R - 3 0 e (p = 0 . 0 0 0 6、図 1 1 B および図 1 1 D) に関して、ヘテロ接合性コピー数喪失と発現の減少との傾向または有意な相関を裏付けた。本発明者らはさらに、観察されるm i R - 3 0 a / e のより広く減少した発現が、推定プロモーターのメチル化と関連するかどうかを分析し、平均D N A メチル化を、M I R 3 0 A / C 2 プロモーターおよびコード領域とともに比較した(表 1 6)。M I R 3 0 A プロモーターのD N A メチル化の増加と、腫瘍標本のサブセットにおけるより低下した発現との間に、相関が観察された(p = 0 . 0 0 0 5 7、図 1 1 C および図 1 1 F)。

【0173】

口腔腫瘍(n = 8 7)の高いパーセンテージは、低下したm i R - 3 0 a - 5 p 発現を示し、スピアマンの相関検定によって、M I R 3 0 A プロモーターにおけるC P Z G 部位のM I R 3 0 A 過剰メチル化と有意に相關した(p 値 6 . 1 5 E - 0 7、図 1 1 C および図 1 1 F ; 表 1 7)。m i R - 3 0 e - 5 p の低下した発現は、H P V 陰性状態と相關した。さらに、喉頭部位において起こる腫瘍は、低下したm i R - 3 0 e - 5 p 発現およびM I R 3 0 E コピー数欠失と有意に相關した(図 1 1 E および表 1 7)。

10

20

30

40

【表16-1】

表16. mir-30ファミリーの発現とメチル化との相関

プローブ	遺伝子	非メチル化群における平均発現	メチル化群における平均発現	t統計量	p値	補正後のp値	非メチル化群における平均メチル化	メチル化群における平均メチル化	スピアマン相関係数
cg20815778	hsa-mir-30a MIMAT0000087	4.634	5.119	-0.227	8.34E-01	8.52E-01	0.086	0.441	-0.064
cg10039188	hsa-mir-30a	6.584	3.957	3.84	1.61E-04	1.23E-03	0.031	0.459	-0.225
cg25210451	hsa-mir-30a	6.567	3.892	3.938	1.11E-04	1.09E-03	0.04	0.499	-0.184
cg15045441	hsa-mir-30a	6.814	4.003	3.79	2.01E-04	1.23E-03	0.052	0.435	-0.225
cg26162616	hsa-mir-30a	6.931	3.977	3.824	1.79E-04	1.23E-03	0.04	0.421	-0.23
cg23281154	hsa-mir-30a	6.685	4.174	3.361	1.02E-03	3.85E-03	0.033	0.382	-0.24
cg22300282	hsa-mir-30a	8.386	3.984	2.256	2.87E-02	5.86E-02	0.077	0.518	-0.199
cg11574469	hsa-mir-30a	8.278	4.066	2.359	2.20E-02	5.10E-02	0.078	0.428	-0.244
cg25141674	hsa-mir-30a	7.363	4.151	2.842	5.35E-03	1.62E-02	0.063	0.495	-0.23
cg24772267	hsa-mir-30a	6.694	4.29	2.359	1.98E-02	4.84E-02	0.077	0.472	-0.122
cg00920327	hsa-mir-30a	7.006	4.052	3.642	3.52E-04	1.92E-03	0.058	0.465	-0.247
cg03318695	hsa-mir-30a	7.396	4.395	1.562	1.25E-01	1.92E-01	0.075	0.487	-0.221
cg20815778	hsa-mir-30a MIMAT0000088	1.936	1.845	0.081	9.40E-01	9.40E-01	0.086	0.441	-0.073
cg10039188	hsa-mir-30a	2.331	1.351	4.494	1.19E-05	1.46E-04	0.031	0.459	-0.196
cg25210451	hsa-mir-30a	2.303	1.3	4.876	2.52E-06	8.69E-05	0.04	0.499	-0.181
cg15045441	hsa-mir-30a	2.44	1.361	4.62	7.85E-06	1.28E-04	0.052	0.435	-0.216
cg26162616	hsa-mir-30a	2.451	1.336	4.778	3.55E-06	8.69E-05	0.04	0.421	-0.232
cg23281154	hsa-mir-30a	2.386	1.481	3.61	5.22E-04	2.32E-03	0.033	0.382	-0.243
cg22300282	hsa-mir-30a	2.752	1.385	3.396	1.24E-03	4.35E-03	0.077	0.518	-0.222
cg11574469	hsa-mir-30a	2.69	1.43	3.335	1.38E-03	4.50E-03	0.078	0.428	-0.218
cg25141674	hsa-mir-30a	2.602	1.479	3.423	8.09E-04	3.30E-03	0.063	0.495	-0.243
cg24772267	hsa-mir-30a	2.37	1.637	2.132	3.70E-02	7.26E-02	0.077	0.472	-0.138
cg00920327	hsa-mir-30a	2.445	1.454	3.589	4.74E-04	2.32E-03	0.058	0.465	-0.219
cg03318695	hsa-mir-30a	2.521	1.585	2.307	2.41E-02	5.14E-02	0.075	0.487	-0.222
cg22904815	hsa-mir-30b MIMAT0000420	0.266	0.174	2.449	2.29E-02	5.10E-02	0.078	0.326	-0.151
cg10039188	hsa-mir-30c-2	0.316	0.26	1.875	6.36E-02	1.20E-01	0.031	0.459	-0.132
cg25210451	hsa-mir-30c-2	0.316	0.26	1.814	7.29E-02	1.31E-01	0.04	0.499	-0.034
cg15045441	hsa-mir-30c-2	0.321	0.271	1.451	1.51E-01	2.18E-01	0.052	0.435	-0.095
cg26162616	hsa-mir-30c-2	0.323	0.27	1.69	9.38E-02	1.48E-01	0.04	0.421	-0.072
cg23281154	hsa-mir-30c-2	0.316	0.259	1.438	1.58E-01	2.21E-01	0.033	0.382	-0.109
cg22300282	hsa-mir-30c-2	0.272	0.256	0.438	6.62E-01	7.05E-01	0.077	0.518	-0.025
cg11574469	hsa-mir-30c-2	0.325	0.257	1.726	8.78E-02	1.43E-01	0.078	0.428	-0.099
cg25141674	hsa-mir-30c-2	0.306	0.262	1.368	1.74E-01	2.36E-01	0.063	0.495	-0.084
cg24772267	hsa-mir-30c-2	0.286	0.255	0.801	4.27E-01	4.98E-01	0.077	0.472	-0.016
cg00920327	hsa-mir-30c-2	0.327	0.246	2.55	1.23E-02	3.36E-02	0.058	0.465	-0.101
cg03318695	hsa-mir-30c-2	0.317	0.279	0.871	3.87E-01	4.74E-01	0.075	0.487	-0.077
cg22904815	hsa-mir-30d MIMAT0000245	5.321	4.432	1.504	1.48E-01	2.18E-01	0.078	0.326	-0.137
cg16167741	hsa-mir-30e MIMAT0000692	4.234	4.02	0.571	5.69E-01	6.19E-01	0.07	0.549	0.03

10

20

30

40

【表16-2】

プローブ	遺伝子	非メチル化群における平均発現	メチル化群における平均発現	t統計量	p値	補正後のp値	非メチル化群における平均メチル化	メチル化群における平均メチル化	スピアマン相関係数
cg26783428	hsa-mir-30e	5.041	4.302	0.634	5.68E-01	6.19E-01	0.089	0.519	0.016
cg27386837	hsa-mir-30e	4.655	3.407	2.447	1.69E-02	4.36E-02	0.086	0.46	-0.151
cg13735974	hsa-mir-30e	4.383	3.508	1.82	7.74E-02	1.31E-01	0.085	0.502	-0.149
cg10336144	hsa-mir-30e	4.597	3.372	2.827	5.61E-03	1.62E-02	0.082	0.489	-0.117
cg14796708	hsa-mir-30e	3.92	3.828	0.213	8.32E-01	8.52E-01	0.082	0.429	0.018
	hsa-mir-30e								
cg16167741	MIMAT0000693	5.153	4.779	0.987	3.25E-01	4.09E-01	0.07	0.549	-0.072
cg26783428	hsa-mir-30e	6.638	5.117	0.957	4.07E-01	4.86E-01	0.089	0.519	-0.034
cg27386837	hsa-mir-30e	5.98	4.76	1.794	7.75E-02	1.31E-01	0.086	0.46	-0.184
cg13735974	hsa-mir-30e	5.932	4.931	1.244	2.22E-01	2.94E-01	0.085	0.502	-0.157
cg10336144	hsa-mir-30e	5.534	4.884	1.131	2.63E-01	3.40E-01	0.082	0.489	-0.189
cg14796708	hsa-mir-30e	4.657	5.054	-0.77	4.43E-01	5.05E-01	0.082	0.429	0.027

【0174】

【表17】

表17. miR30A／Eのコピー数多型、メチル化、および発現と、TCGAデータセットからのHNSCCにおける臨床上の特徴との関連

臨床上の特徴	miR30 变化		P 値
	miR30A メチル化		
腫瘍部位	過剰	過小	
口腔	58	115	6.15E-07*
非口腔	9	97	
HPV 状態			
HPV(+)	3	26	0.0686
HPV(-)	52	163	
腫瘍部位	miR30A 発現		
低	高		
口腔	87	68	0.00822*
非口腔	35	54	
HPV 状態			
HPV(+)	11	18	0.117
HPV(-)	111	104	
腫瘍部位	miR30E コピー数多型		
欠失	非欠失		
喉頭	18	46	0.00184*
非喉頭	20	160	
HPV 状態			
HPV(+)	0	29	0.00527*
HPV(-)	38	177	
腫瘍部位	miR30E 発現		
低	高		
喉頭	28	36	0.154
非喉頭	94	86	
HPV 状態			
HPV(+)	5	24	0.000121*
HPV(-)	117	98	

【0175】

H P V + および口腔咽頭がんの予後は、H P V - および喉頭H N S C C よりよいので、m i R - 3 0 a / e 発現と予後における差異との関連を、調べた。m i R - 3 0 e のより低い発現は、より低い全生存と有意に相関し（図12A、左パネル）、H P V - 腫瘍との関連と一致した。低下した生存に向かう傾向はまた、M I R 3 0 E 遺伝子座のコピー数喪失を示した患者のサブセットにおいて観察された。これは、腫瘍のサブセットにおいて減少したm i R 3 0 e 発現へのゲノムコピー変化の寄与を裏付ける（図12A、中央パネル）。驚くべきことに、腫瘍亜部位に関する生存分析は、m i R - 3 0 e - 5 p の低発現が、口腔咽頭癌（図12A、右パネル）（口腔咽頭癌は、大部分はH P V + であり、これに関してより悪い予後および治療標的と関連するゲノム変化が十分に規定されていない）における最悪の予後と関連することを明らかにした。このデータセットは、低m i R - 3 0 a - 5 p 発現と、不十分な疾患特異的生存（p 値 0 . 0 2 4 、図11G）との間の強い相関およびm i R - 3 0 e - 5 p に関して類似の傾向（p 値 0 . 1 1 3 、図11H）を

10

20

30

40

50

示した。これらのデータは、低下したm i R - 3 0 a / e 発現が、H N S C C における遺伝的变化または後生的な変化、H N S C C 腫瘍亜部位、H P V 状態、および臨床的に関連する予後と関連することを示唆する。さらに、m i R - 2 6 a - 5 p およびm i R - 2 6 b - 5 p の低い発現は、低い全生存と相關した（図 1 2 B）。

【 0 1 7 6 】

実施例 9

がん細胞株におけるm i R - 3 0 a の抗増殖活性

がんのさらなるタイプの増殖に対するm i R - 3 0 a の効果を、M E 1 8 0 （子宮頸部扁平上皮癌）、H e L a （子宮頸部腺癌）、H C T 1 1 6 （結腸直腸癌）、D U - 1 4 5 （前立腺癌）、P C 3 （前立腺癌）、M D A - M B - 2 3 1 （乳房腺癌）、およびP a n c 1 （膵臓癌）細胞株に対して試験した。細胞を、9 6 ウェルプレートにおいて $2 \times 1 0^{3}$ 細胞 / ウェルで播種し、1 5 n M m i R - 3 0 a 二重鎖で4 8 時間、0 . 1 5 μ l のR N A i M A Xとともに逆トランスフェクトした。トランスクレオチドの後に、培地を交換し、細胞を5 日間インキュベートした。インキュベーションの後に、細胞生存性を、X T T アッセイによって測定した。m i R - 3 0 a は、全ての試験した細胞株において細胞生存性を減少させた（図 1 3）。

【 0 1 7 7 】

実施例 1 0

改変m i R - 3 0 a m i R N A

いくつかの改変された前駆体h s a - m i R - 3 0 a ミミックおよび / またはミメティックの設計および合成を行った。例示的な改変m i R - 3 0 a 核酸を、表 1 8 に示す。

【 0 1 7 8 】

パッセンジャー鎖の塩基1、6、および2 0 を変異させて、得られる二重鎖の安定性を増加させた。R I S C によるガイド鎖に対する鎖選択を偏らせるために、2 塩基のオーバーハングを、パッセンジャー鎖の3' 末端に配置した。鎖選択をさらに偏らせるために、パッセンジャー鎖の5' 末端における5' アミノC 6 改変もまた、試験した。オリゴヌクレオチドにおける個々の核酸の2' 位の改変が相補鎖に対する親和性を改善し得、そしてヌクレアーゼに対する抵抗性をも付与し得ることは、公知である。しかし、これらの改変がマイクロR N A 機能に対してどんな効果を有するかは、未知である。これを試験するために、パッセンジャー鎖の末端において3 塩基の2' 改変を含むオリゴヌクレオチド（パッセンジャー鎖7）を合成した。7 位と1 8 位との間の連續する塩基もまた、別個のオリゴヌクレオチドにおいて改変した（ガイド鎖1 ~ 5）。それらの鎖をハイブリダイズさせて、5 p 鎖の成熟を偏らせ得るm i R - 3 0 a の6 種の異なる二重鎖ミミックを作製した。

【 0 1 7 9 】

活性に対する鎖の長さの効果もまた、試験した。ガイド鎖1 1 （これは、2 塩基短いが、ガイド鎖5 と同じ塩基の2' 改変を有する）およびパッセンジャー鎖1 2 （これも、パッセンジャー鎖6 より2 塩基短いが、オリゴヌクレオチドの3' 末端および5' 末端において3 塩基の2' 改変をなお含む）を合成した。全ての鎖を組み合わせて、6 種の新しいミミックを作製した（0 1 0 ~ 0 1 5）。

10

20

30

40

【表18】

表18. 改変miR-30構築物

オリゴ	配列(5'-3')*	配列番号
ガイド鎖 1 (G1)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCU	37
ガイド鎖 2 (G2)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCU	38
ガイド鎖 3 (G3)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCU	39
ガイド鎖 4 (G4)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCU	40
ガイド鎖 5 (G5)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCU	41
ガイド鎖 11 (G11)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	42
ガイド鎖 13 (G13)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAApS	43
ガイド鎖 15 (G15)	UGUAAACAUCCUCGACUGGApS	44
ガイド鎖 16 (G16)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAd-mpG	45
ガイド鎖 17 (G17)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAd-mpAd-mpG	46
ガイド鎖 18 (G18)	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	47
ガイド鎖 19 (G19)	UGUAAACAUCCUCGACUGGApS	48
ガイド鎖 20 (G20)	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	49
ガイド鎖 21 (G21)	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	50
ガイド鎖 22 (G22)	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	51
ガイド鎖 23 (G23)	UGUAAACAUCCUACACUCUCApS	52
ガイド鎖 24 (G24)	U <u>G</u> UAAACAUCCUACACUCUCApS	53
パッセンジャー鎖 6 (P6)	アミノ C6-AGCUUCCAGUCGGAUGUUUACACG	54
パッセンジャー鎖 7 (P7)	アミノ C6- <u>AG</u> CUUCCAGUCGGAUGUUUACACG	55
パッセンジャー鎖 12 (P12)	アミノ C6-C <u>U</u> UCCAGUCGGAUGUUUACACG	56
パッセンジャー鎖 14 (P14)	アミノ C6-U <u>CC</u> AGUCGGAUGUUUACA	57
パッセンジャー鎖 25 (P25)	アミノ C6-UCCAfGUfCGfGAfUGfUUfUAfCA	58
パッセンジャー鎖 26 (P26)	アミノ C6-UCCAfGUf <u>CG</u> fGAfUGfUUfUAfCpsA	59
パッセンジャー鎖 27 (P27)	アミノ C6-UCCAfGUfCGfGAfUGfUUfUAfCd-mpA	60
パッセンジャー鎖 28 (P28)	アミノ C6-U <u>G</u> A <u>G</u> AGUAGGAUGUUUACA	61

* 下線を付した残基は、2'OMe改変を有する； ps-ホスホロチオエート； mp-メチルホスホネート； d-2' デオキシ； f-2' フルオロ；変異した塩基は、太字および斜体で示す。

【0180】

30

細胞生存性を、改変miR-30aミミックでトランスフェクトしたUMSCC-46細胞において評価した。UMSCC-46細胞を、96ウェルプレートにおいて2×10³細胞 / ウェルで播種し、15nM二重鎖で48時間、0.15μLのRNAiMAXとともに逆トランスフェクトした。トランスフェクションの後に、培地を交換し、細胞を5日間インキュベートした。インキュベーションの後に、細胞生存性をXTTアッセイによって測定した。データは、6回の反復の平均を表す。M-miR30a-006(G5+P7)、M-miR30a-014(G11+P12)、およびM-miR-30a-016(G11+P14)は、細胞生存性に対して最大の効果を有した(表19)。

【表19】

表19. UMSCC-46細胞生存性に対する改変miR-30aミックの効果

ミック名	鎖	% 生存性 コントロール (15 nM)	SEM
非改変 miR30a		0.7545821	0.114837
M-miR30a-001	G3 + P6	0.634257	0.138051
M-miR30a-002	G3 + P7	0.680829	0.164553
M-miR30a-003	G4 + P6	0.773038	0.113855
M-miR30a-004	G4 + P7	0.690925	0.066221
M-miR30a-005	G5 + P6	0.681762	0.152425
M-miR30a-006	G5 + P7	0.331135	0.046659
M-miR30a-007	G3 + P10	na	na
M-miR30a-008	G4 + P10	na	na
M-miR30a-009	G5 + P10	na	na
M-miR30a-010	G3 + P12	0.363122	0.048457
M-miR30a-011	G4 + P12	0.49771	0.035976
M-miR30a-012	G5 + P12	0.385692	0.030329
M-miR30a-013	G11 + P7	0.433616	0.038817
M-miR30a-014	G11 + P12	0.255287	0.043365
M-miR30a-015	G11 + P6	0.424858	0.032783
M-miR30a-016	G11 + P14	0.256281	0.028257

10

20

【0181】

M - m i R 3 0 a - 0 0 6 オリゴヌクレオチドもまた、 U M S C C - 4 6 異種移植片腫瘍のマウスモデルにおいて試験した。 U M S C C - 4 6 異種移植片腫瘍約 1 0 0 m m³ を有するマウスに、 6 0 μ g (約 3 m g / k g) の複合体化 m i R - 3 0 a ミミックまたはコントロールビヒクルの 9 用量を、 M W F で 3 週間にわたって I V 注射した。マウスを、 2 4 日目に 1 0 × 2 G y の割合の放射線療法で毎日 (合計 2 0 G y) 処置した (図 1 4 A ~ 1 4 B) 。

【0182】

実施例 1 1

細胞増殖に対する組み合わせ m i R N A 処置の効果

30

細胞生存性を、 4 種の m i R N A - M - m i R 3 0 a - 0 1 4 、 m i R - 1 4 5 - 5 p 、 m i R - 2 6 a - 5 p 、および m i R - 3 7 5 の混合物で、 7 . 5 n M または 1 5 n M の全二重鎖 (それぞれ、 各二重鎖が 1 . 8 7 5 n M または 3 . 7 5 n M) でトランスフェクトした 9 種の H N S C C 腫瘍細胞株において評価した。他の実験では、 7 . 5 n M または 1 5 n M の全二重鎖において m i R N A の対で細胞をトランスフェクトした。細胞を、 9 6 ウェルプレートにおいて 1 . 5 ~ 2 × 1 0³ 細胞 / ウェルで播種し、 混合物で 4 8 時間、 0 . 1 5 μ L の R N A i M A X とともに逆トランスフェクトした。一晩のトランスフェクションの後に、 培地を交換し、 細胞を 4 ~ 5 日間インキュベートした。インキュベーション後、 細胞生存性を、 実施例 1 に記載されるように X T T アッセイによって測定した。

40

【0183】

その 4 種の m i R N A 混合物は、 全細胞株において (図 1 5) 、特に、 1 5 n M 濃度において細胞密度を減少させた。同様に、 2 種の m i R N A 組み合わせもまた、 細胞密度を減少させた (図 1 6 A ~ 1 6 D) 。

【0184】

実施例 1 2

細胞生存性に対するさらなる m i R N A の効果

細胞生存性を、 m i R 2 7 - 5 p または m i R - 2 b - 1 - 5 p 二重鎖でトランスフェクトした U M - S C C - 1 細胞または U M - S C C - 4 6 細胞において評価した。 9 6 ウェルプレートにおいて、 U M - S C C - 1 細胞を 1 . 5 × 1 0³ 細胞 / ウェルで播種し、

50

U M - S C C - 4 6 細胞を 2×10^3 細胞 / ウェルで播種し、7 . 5 nM または 15 nM の二重鎖で 48 時間、0 . 15 μ L の R N A i M A X とともに逆トランスフェクトした。トランスフェクションの後に、培地を交換し、細胞を 5 日間インキュベートした。細胞生存性を X T T アッセイによって測定した。

【 0 1 8 5 】

m i R - 2 7 b - 5 p および m i R - 2 9 - b - 1 - 5 p はともに、U M - S C C - 1 細胞および U M - S C C - 4 6 細胞の両方において細胞密度を減少させた（図 1 7 A および 図 1 7 B）。

【 0 1 8 6 】

実施例 1 3

改变 m i R N A

いくつかの m i R ミミックおよび / またはミメティックの設計を行った。例示的な m i R ミミックおよび / またはミメティックを表 2 0 に示す。

【 表 2 0 】

表20. 改変miR

オリゴ	配列 (5'-3')	配列番号
hsa-miR-375 ミミック/ミメティック		
ガイド鎖 (G29)	UUU GUU CGU UCG GCU CGC GUG A	62
パッセンジャー鎖 (P30)	アミノ C6- A C GCG AGC CGA ACG AAC AAA	63
miR-26a-5p ミミック/ミメティック		
ガイド鎖 31 (G31)	UUC AAG UAA UCC AGG AUA GGC U	64
パッセンジャー鎖 (P32)	アミノ C6- CCU AUC CCU GGA UUA CUU GAA	65
miR-145-5p ミミック/ミメティック		
ガイド鎖 (G33)	GUC CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU	66
パッセンジャー鎖 (P34)	アミノ C6- GGA UUC CUG GAA AUA CUG GAC	67

下線を付した残基は、2'OMe改変を有する；変異した塩基は、太字および斜体で示される。

【 0 1 8 7 】

実施例 1 4

頭頸部扁平上皮癌の処置

この実施例は、被験体において H N S C C を処置または阻害するために使用され得る方法を記載する。しかし、当業者は、本明細書中の教示に基づいて、これらの具体的な方法から外れた方法がまた、H N S C C を成功裡に処置するために使用され得ることを理解する。当業者はまた、これらの方針がまた、被験体において他のがんを処置または阻害するために使用され得ることを認識する。

【 0 1 8 8 】

一例において、H N S C C (または別のタイプの腫瘍) を有する被験体を選択する。いくつかの例では、上記被験体は、H N S C C 腫瘍を有する。他の例では、上記被験体は、1種またはこれより多くの m i R N A (例えば、m i R - 3 0 a ファミリーメンバー、m i R - 2 6 ファミリーメンバー、m i R - 1 4 5 - 5 p、m i R - 3 3 8 - 3 p、および m i R - 3 7 5 のうちの 1 種またはこれより多く) の減少した発現を有すると決定された H N S C C 腫瘍を有する。他の例では、上記被験体は、1種またはこれより多くの m i R N A (例えば、M I R 3 0 遺伝子、M I R 2 6 遺伝子、M I R 1 4 5 遺伝子、M I R 3 3 8 遺伝子、および M I R 3 7 5 遺伝子のうちの 1 種またはこれより多く) をコードする D N A において欠失を有する腫瘍を有する。他の例では、上記被験体は、プロモーターの、または 1 種またはこれより多くの m i R N A (例えば、M I R 3 0 遺伝子、M I R 2 6 遺伝子、M I R 1 4 5 遺伝子、M I R 3 3 8 遺伝子、および M I R 3 7 5 遺伝子のうちの 1 種またはこれより多く) をコードする D N A において増加したメチル化を有する腫瘍を有する。

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

被験体選択の後に、有効量のm i R N A 核酸（例えば、m i R - 3 0 a - 5 p またはそのミミックもしくはミメティック）またはm i R N A 核酸の混合物（例えば、m i R - 3 0 a、m i R - 1 4 5、m i R - 2 6 a、およびm i R - 3 7 5 またはこれらのうちの1種もしくはこれより多くのミミックまたはミメティックの混合物）を、上記被験体に投与する。上記被験体に投与される組成物の量は、処置されている被験体、腫瘍の重篤度（例えば、T N Mステージ）、および組成物の投与様式に依存する。理想的には、有効量のm i R N A（複数可）は、被験体において実質的な細胞傷害性効果を引き起こすことなく被験体においてH N S C C の1またはこれより多くの徵候および症状を減少させるために十分な量である。

【0190】

10

いくつかの例では、腫瘍の数および／もしくはサイズ、転移の数および／もしくはサイズの減少、疾患進行の低減（もしくは停止）、生存（例えば、無病生存、無増悪生存、および／もしくは無転移生存）の増加、またはこれらのうちの2種もしくはこれより多くの組み合わせは、その処置の有効性を示す。

【0191】

実施例 1 5

さらなるm i R - 3 0 ミミックの設計および試験

さらなる改変m i R - 3 0 - 5 p ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を設計した。これを表21に示す。

【表21】

20

表21. 改変m i R - 3 0 - 5 p miRNA

オリゴ	配列(5'→3')	配列番号
ガイド鎖 35 (G35)	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	50
ガイド鎖 36 (G36)	UfGUfAAfAcfAUfCCfUAfCAfCUfCUfCAFpsGpsCf	73
ガイド鎖 37 (G37)	UGIUAAsAfCAUfCCfUAfCAfCAfCUfCUfCAFpsGpsCf	74
パッセンジャー鎖 28 (P28)	アミノ C6-UGAGAGUAGGAUGUUUACA	61

f、2' -フルオロ、下線、2' -OME、ps、ホスホロチオエート。変異した塩基は、太字および斜体で示される。

【0192】

30

細胞生存性を、実施例11に記載されるように、改変m i R - 3 0 a ミミックでトランスフェクトしたU M - S C C - 4 6 細胞において評価した。データは、6回の反復の平均を表す（表22）。血清中の上記ミミックの安定性を試験した（図18）。M - m i R 3 0 - 0 1 8 およびM - m i R 3 0 - 0 1 9 に組み込まれた化学的改変は、ヒト血清中で> 5 0 × の増加した安定性とともに、ヌクレアーゼに対する長期の抵抗性を付与した（図18）。細胞生存性を、実施例11に記載されるように、その示されたm i R N A 二重鎖（7 . 5 n M または1 5 n M の全二重鎖）でトランスフェクトしたU M - S C C - 4 6 細胞において評価した（図19）。M - m i R 3 0 - 0 1 8 およびM - m i R 3 0 - 0 1 9 は、生物学的なマイクロR N A を超えて大いに改善されるM - 0 0 6 に等しいがん細胞の増殖を阻害する効力をなお維持した（図19および表22）。

【表22】

40

表22. UMSCC-46細胞生存性に対する改変m i R - 3 0 a ミミックの効果

ミミック名称	鎖	% 生存性 コントロール (15 nM)	SEM
M-miR30-017	G35+P28	0.281711	0.038428
M-miR30-018	G36+P28	0.363828	0.024757
M-miR30-019	G37+P28	0.457675	0.100329

【0193】

実施例 1 6

さらなるm i R ミミック

50

【0194】

さらなるm i Rミミックおよび／またはミメティックの設計を行った。例示的なm i Rミミックおよび／またはミメティックを表23に示す。

【表23-1】

表23. 改変miR

オリゴ	配列(5'-3')	配列番号
miR-30 ミミック		
ガイド鎖 39 (G39)	UfGUf AAA CAUf CCfU CfGAf CUfG GfApsAfpsG	75
ガイド鎖 40 (G40)	UfGUf AAA CAUf CCfU CGA CUG GApsAfpsG	76
ガイド鎖 41 (G41)	UfGUf AAAf CAUf CCfU CfGAf CUfG GfApsAfpsG	77
ガイド鎖 42 (G42)	UfGUf AAfA CfAUf CCfU CfGAf CUfG GfApsAfpsG	78
ガイド鎖 43 (G43)	UfGUf AAfAf CAUf CCfU CfGAf CUfG GfApsAfpsG	79
ガイド鎖 44 (G44)	UfGUf AAfA CfAUf CCfU CGA CUG GfApsAfpsG	80
ガイド鎖 45 (G45)	UfGUf AAA CAUf CCfU CGA CUG GfApsAfpsG	81
ガイド鎖 46 (G46)	UfGUf AAfA CfAUf CCfU CGA CUG GApsApsG	82
ガイド鎖 47 (G47)	UfGUf AAA CAU CCU CGA CUG GapsApsG	83
ガイド鎖 48 (G48)	UfGUf AAA CAU CCU CGA CUG GApsAfpsG	84
ガイド鎖 49 (G49)	UfGUf AAA CAU CCU CGA CUG GApsApsGf	85
ガイド鎖 50 (G50)	UfGU AAA CAU CCU CGA CUG GApsApsGf	86
ガイド鎖 51 (G51)	UfGU AAA CAU CCU CGA CUG GApsAfpsG	87
ガイド鎖 52 (G52)	UfGU AAA CAU CCU CGA CUG GApsApsGf	88
ガイド鎖 53 (G53)	UfGU AAA CAU CfCU CGA CUG GApsApsGf	89
ガイド鎖 54 (G54)	UfGU AAA CAUf CCU CGA CUG GApsApsGf	90
ガイド鎖 55 (G55)	UfGUf AAA CAU CCfU CfGAf CUfG GfApsAfpsG	91
パッセンジャー鎖 56 (P56)	アミノ C6-UCCAfGUfCGfGAUGUfUUfACA	92
miR-375 ミミック		
ガイド鎖 57 (G57)	UfUUf GUU CGU UCG GCU CGC GUpsGfps A	93
ガイド鎖 58 (G58)	UfUU GUU CGU UCG GCU CGC GUpsGfps A	94
ガイド鎖 59 (G59)	UfUUf GUU CGU UCG GCU CGC GfUpsGfps A	95
ガイド鎖 60 (G60)	UfUUf GUfU CGU UCG GCU CGC GfUpsGfps A	96
ガイド鎖 61 (G61)	UfUUf GUfU CGU UCG GCU CGfC GfUpsGfps A	97
ガイド鎖 62 (G62)	UfUUf GUfU CfGU UCG GCU CGfC GfUpsGfps A	98
ガイド鎖 63 (G63)	UfUUf GUU CGU UCG GCU CGfC GfUpsGfps A	99
ガイド鎖 64 (G64)	UUU GUU CGU UCG GCU CGfC GfUpsGfps A	100
ガイド鎖 65 (G65)	UUU GUU CGU UCG GCU CGfC GfUpsGfps A	101
ガイド鎖 66 (G66)	UfUUf GUfU CfGUf UCfG GfCUf CGfC GfUpsGfps A	102
ガイド鎖 67 (G67)	UfUUf GUU CGU UCfG GfCUf CGfC GfUpsGfps A	103
パッセンジャー鎖 68 (P68)	アミノ C6-AC GfGf AfGfGf CGA ACfG AfACf AAA	104
miR-26 ミミック		
ガイド鎖 69 (G69)	UfUCf AAG UAA UCC AGG AUA GGpsCfps U	105
ガイド鎖 70 (G70)	UfUC AAG UAA UCC AGG AUA GGpsCfps U	106
ガイド鎖 71 (G71)	UfUCf AAG UAA UCC AGG AUA GfGpsCfps U	107
ガイド鎖 72 (G72)	UfUCf AAG UAA UCC AGG AUA GfGpsCfps U	108
ガイド鎖 73 (G73)	UfUCf AAfG UAA UCC AGG AUA GfGpsCfps U	109
ガイド鎖 74 (G74)	UfUCf AAfG UAA UCC AGG AUAf GfGpsCfps U	110
ガイド鎖 75 (G75)	UfUCf AAfG UfAA UCC AGG AUAf GfGpsCfps U	111
ガイド鎖 76 (G76)	UfUCf AAfG UfAA UCC AGG AUAf GfGpsCfps U	112
ガイド鎖 77 (G77)	UfUCf AAfG UfAA UCC AGG AUAf GfGpsCfps U	113

10

20

30

40

【表23-2】

オリゴ	配列(5'-3')	配列番号
ガイド鎖 78 (G78)	UfUCf AAfG UfAAf UCfC AfGGf AUfA GfGpsCfps U	114
パッセンジャー鎖 79 (P79)	アミノ C6-CCU AfUCf CCfU GGA UUfA CfUUf GAA	115
miR-145-5p ミミック		
ガイド鎖 80 (G80)	GfUC CAG UUU UCC CAG GAA UCCps CfpsU	116
ガイド鎖 81 (G81)	GfUCf CAG UUU UCC CAG GAA UCCps CfpsU	117
ガイド鎖 82 (G82)	GfUCf CAG UUU UCC CAG GAA UCfCps CfpsU	118
ガイド鎖 83 (G83)	GfUCf CAfG UUU UCC CAG GAA UCfCps CfpsU	119
ガイド鎖 84 (G84)	GfUCf CAfG UUU UCC CAG GAAf UCfCps CfpsU	120
ガイド鎖 85 (G85)	GfUCf CAfG UfUU UCC CAG GAAf UCfCps CfpsU	121
ガイド鎖 86 (G86)	GfUCf CAfG UfUU UCC CAG GfAAf UCfCps CfpsU	122
ガイド鎖 87 (G87)	GfUCf CAfG UfUUf UCfC CfAGf GfAAf UCfCps CfpsU	123
ガイド鎖 88 (G88)	GfUCf CAfG UfUUf UCfC CfAGf GafA UfCCfps CpsUf	124
パッセンジャー鎖 89 (P89)	アミノ C6-GGA UfUCf CUfG GAA AUfA CfUGf GAC	125
miR-101 ミミック		
ガイド鎖 89 (G89)	UAC AGU ACU GUG AUA ACU GAA	126
ガイド鎖 90 (G90)	UfAC AGU ACU GUG AUA ACU GpsAfpsA	127
ガイド鎖 91 (G91)	UfACf AGU ACU GUG AUA ACU GpsAfpsA	128
ガイド鎖 92 (G92)	UfACf AGU ACU GUG AUA ACUf GpsAfpsA	129
ガイド鎖 93 (G93)	UfACf AGfU ACU GUG AUA ACUf GpsAfpsA	130
ガイド鎖 94 (G94)	UfACf AGfU ACU GUG AUA AfCUf GpsAfpsA	131
ガイド鎖 95 (G95)	UfACf AGfU AfCU GUG AUA AfCUf GpsAfpsA	132
ガイド鎖 96 (G96)	UfACf AGfU AfCUf GUfG AfUfAf ACfU GfpsApsAf	133
パッセンジャー鎖 97 (P97)	アミノ C6-CAG UUA UCA CAG UAC UGU A	134
パッセンジャー鎖 98 (P98)	アミノ C6-CAG UfUfAf UCfA CAG UA/C UfGU A	135
miR-29 ミミック		
ガイド鎖 99 (G99)	GCU GGU UUC AUA UGG UGG UUU AGA	136
ガイド鎖 100 (G100)	GfCU GGU UUC AUA UGG UGG UUU ApsGfpsA	137
ガイド鎖 101 (G101)	GfCUf GGU UUC AUA UGG UGG UUU ApsGfpsA	138
ガイド鎖 102 (G102)	GfCUf GGfU UUC AUA UGG UGG UUUf ApsGfpsA	139
ガイド鎖 103 (G103)	GfCUf GGfU UUC AUA UGG UGG UUUf ApsGfpsA	140
ガイド鎖 104 (G104)	GfCUf GGfU UUC AUA UGG UGG UfUUf ApsGfpsA	141
ガイド鎖 105 (G105)	GfCUf GGfU UfUC AUA UGG UGG UfUUf ApsGfpsA	142
ガイド鎖 106 (G106)	GfCUf GGfU UfUC AUA UGG UGfG UfUUf ApsGfpsA	143
ガイド鎖 107 (G107)	GfCUf GGfU UfUC AUA UGG UGfG UfUUf ApsGfpsA	144
ガイド鎖 107 (G107)	GfCUf GGfU UfUCf AfUA UfGGf UGfG UfUUf ApsGfpsA	145
パッセンジャー鎖 108 (P108)	アミノ C6-UAA ACC ACC AUA UGA AAC CAG C	146
miR-27 ミミック		
ガイド鎖 109 (G109)	AGA GCU UAG CUG AUU GGU GAA C	147
ガイド鎖 110 (G110)	AfGA GCU UAG CUG AUU GGU GApssAfps C	148
ガイド鎖 111 (G111)	AfGAf GCU UAG CUG AUU GGU GApssAfps C	149
ガイド鎖 112 (G112)	AfGAf GCU UAG CUG AUU GGU GfApssAfps C	150
ガイド鎖 112 (G112)	AfGAf GGfU UAG CUG AUU GGU GfApssAfps C	151
ガイド鎖 113 (G113)	AfGAf GGfU UAG CUG AUU GGfU GfApssAfps C	152
ガイド鎖 114 (G114)	AfGAf GGfU UfAG CUG AUU GGfU GfApssAfps C	153
ガイド鎖 115 (G115)	AfGAf GGfU UfAG CUG AUU GGfU GfApssAfps C	154
ガイド鎖 116 (G116)	AfGAf GGfU UfAGf CUfG AfUUf GGfU GfApssAfps C	155
パッセンジャー鎖 117 (P117)	アミノ C6-GUU CAC CAA UCA GCU AAG CUC U	156
パッセンジャー鎖 118 (P118)	アミノ C6-GUU CfACf CAfA UCA GfCUf AAfG CfUC U	157
パッセンジャー鎖 119 (P119)	アミノ C6-UAA AfCCf ACfC AUA UfGAf AAfC CfAG C	158

f、2' -フルオロ、下線、2' -OME、ps、ホスホロチオエート。変異した塩基は、太字および斜体で示される。

【0195】

本開示の原理が適用され得る多くの考えられる実施形態に鑑みて、例証された実施形態

10

20

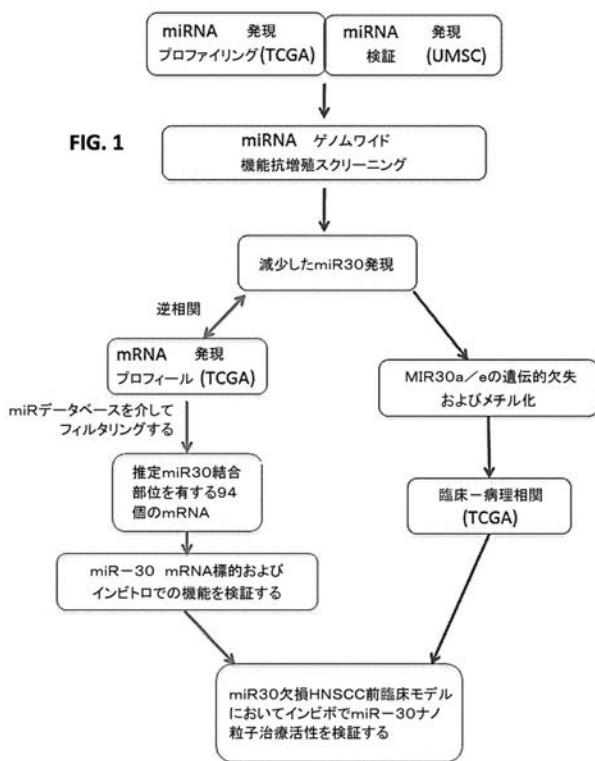
30

40

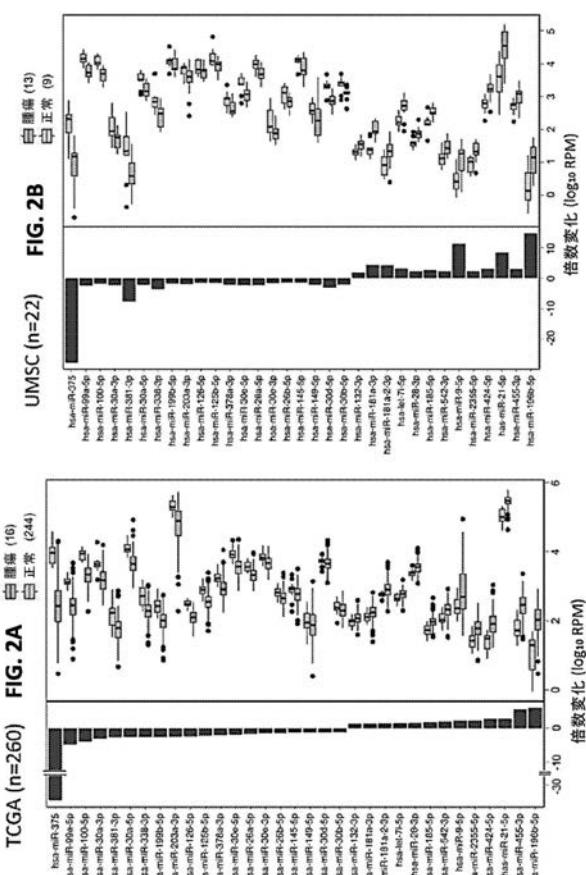
50

が例に過ぎず、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではないことは、認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の請求項によって定義される。本発明者らは、従って、これらの請求項の範囲および趣旨の範囲内に入る全てを本発明者らの発明として特許請求する。

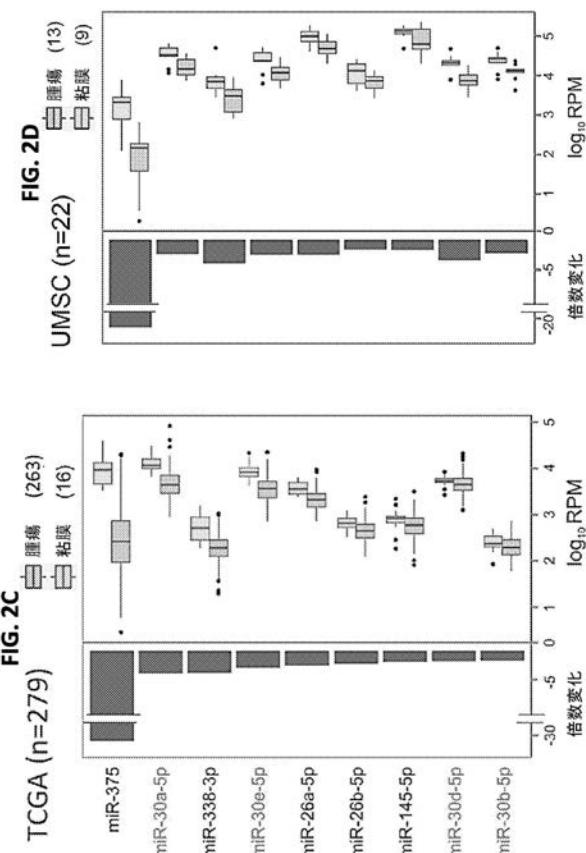
【図1】



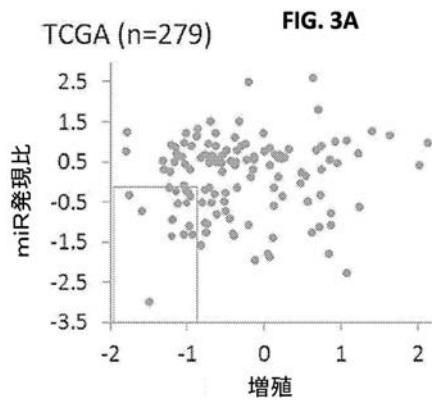
【図2 A - B】



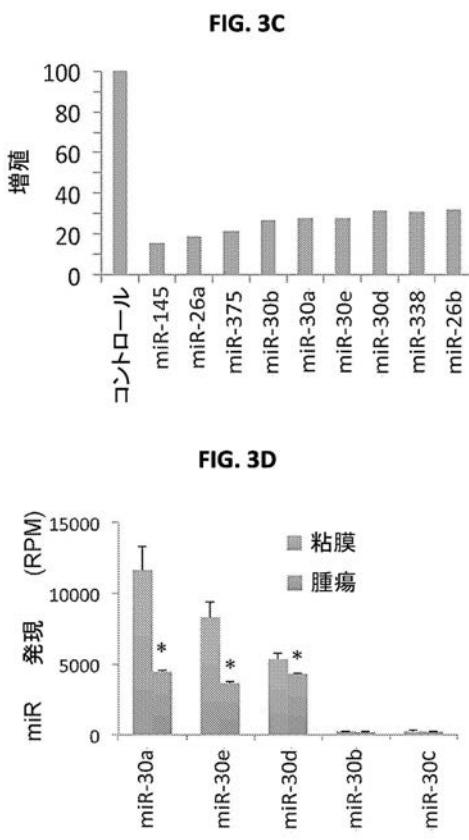
【図 2 C - D】



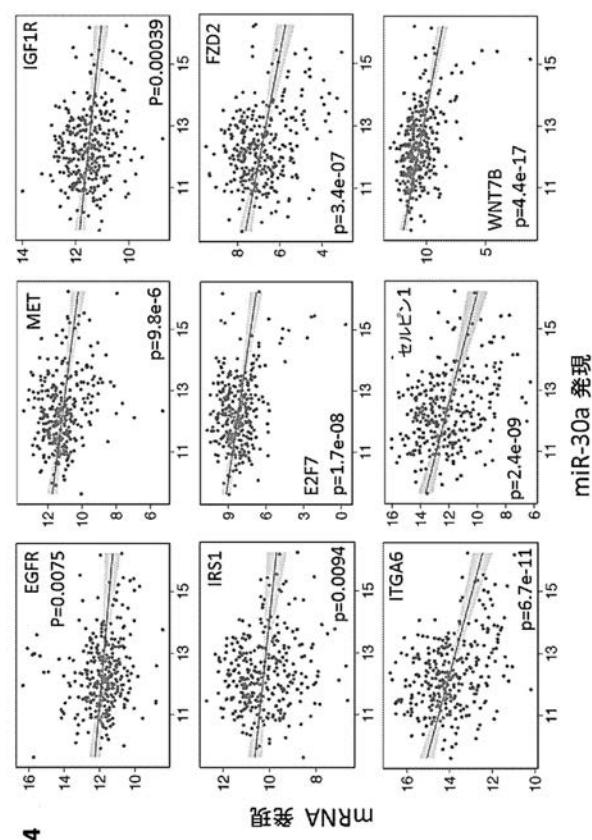
【図 3 A - B】



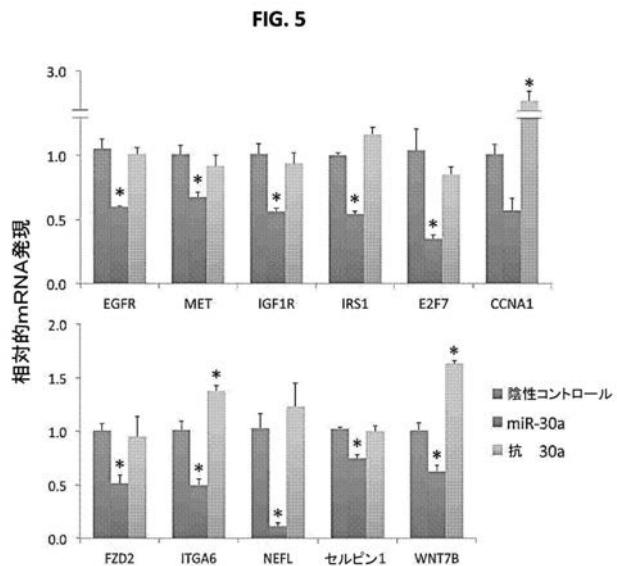
【図 3 C - D】



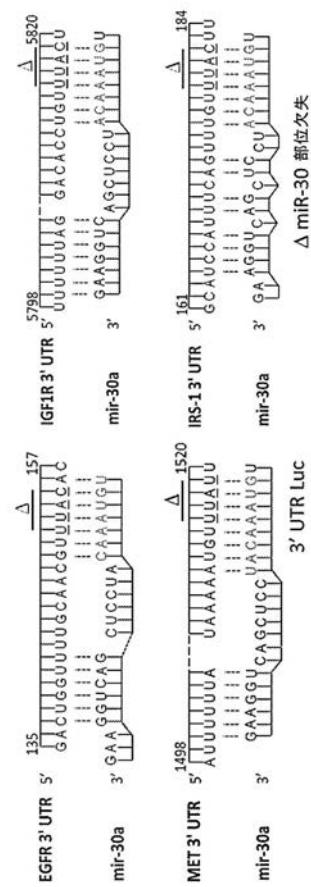
【図 4】



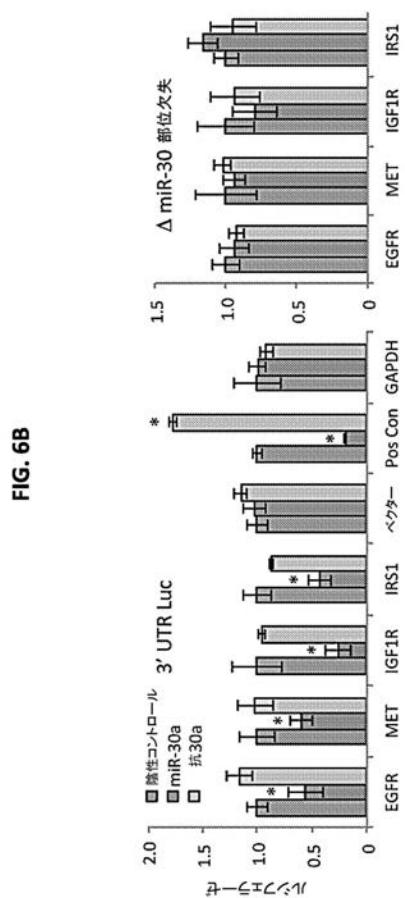
【図5】



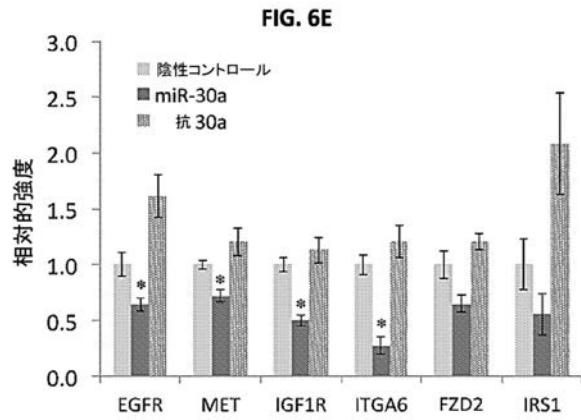
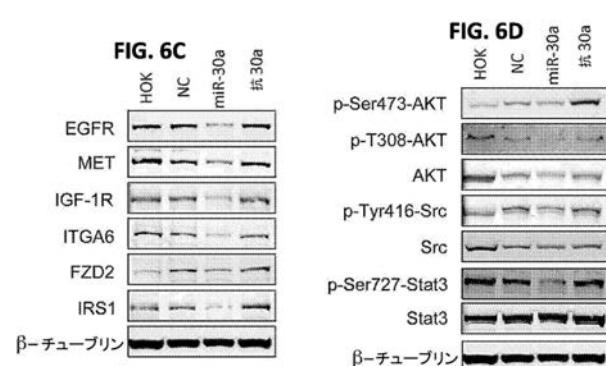
【図6A】



【図6B】



【図6C - E】



【図 7 A - B】

FIG. 7A

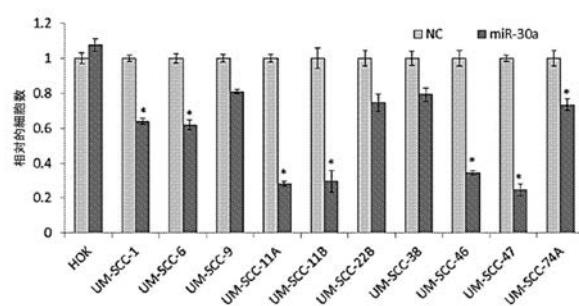
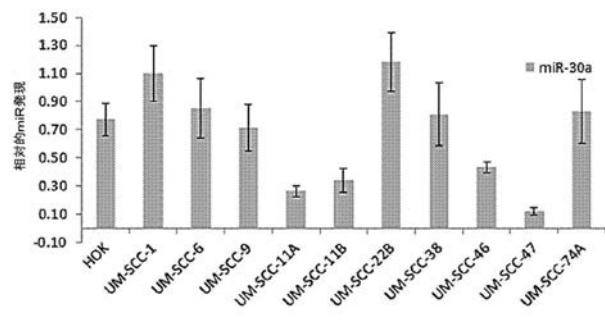


FIG. 7B



【図 7 C - D】

FIG. 7C

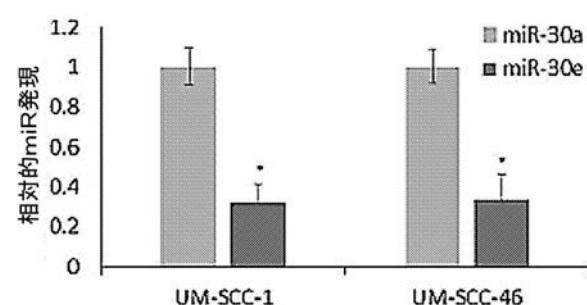
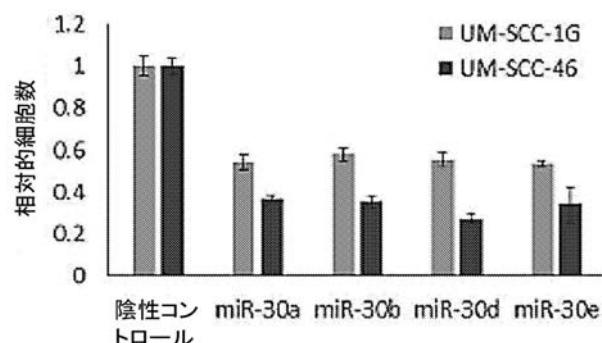


FIG. 7D



【図 7 E - G】

FIG. 7E

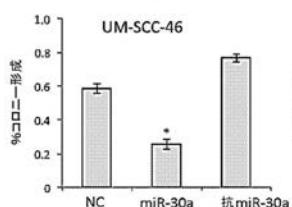
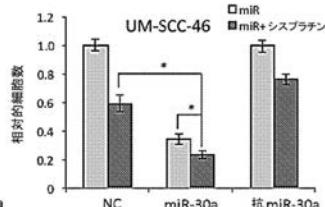


FIG. 7F



【図 7 H - I】

FIG. 7H

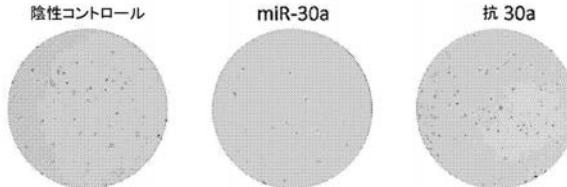


FIG. 7G

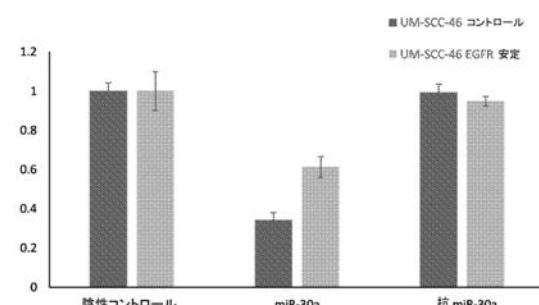
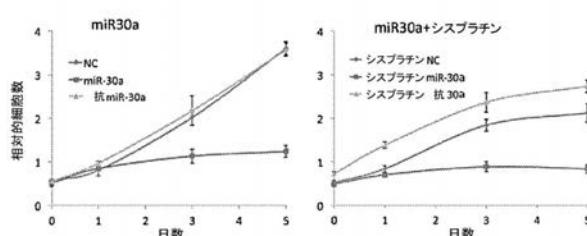
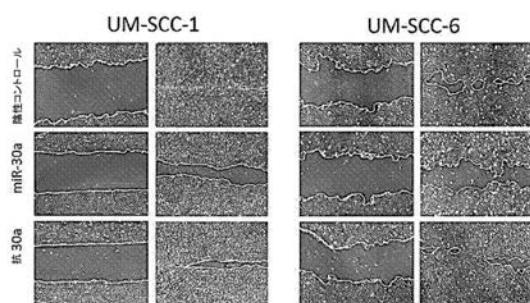


FIG. 7I



【図 8 A - B】

FIG. 8A



【図 8 C - D】

FIG. 8C

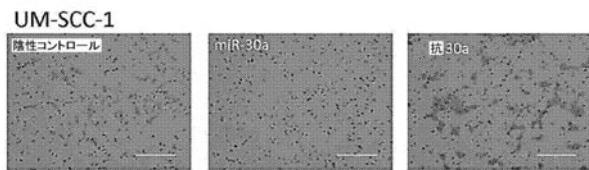


FIG. 8B

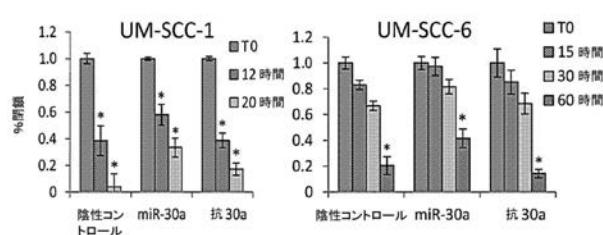
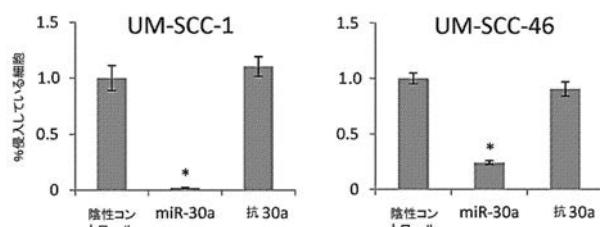


FIG. 8D



【図 9 A - B】

FIG. 9A

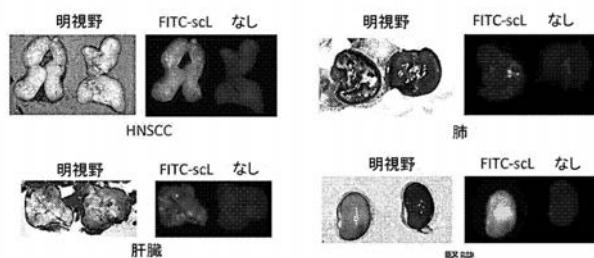
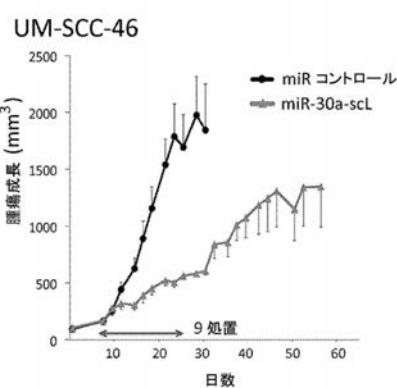


FIG. 9B



【図 9 C - E】

FIG. 9C

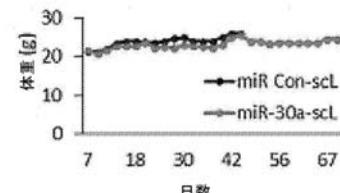
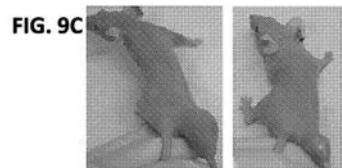


FIG. 9E

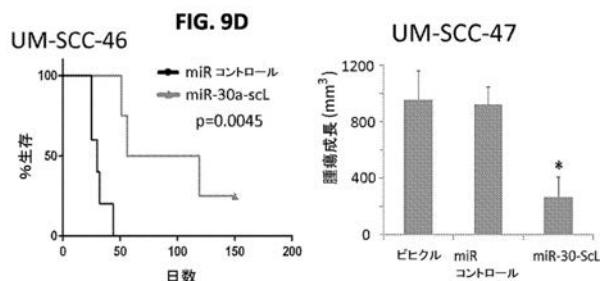
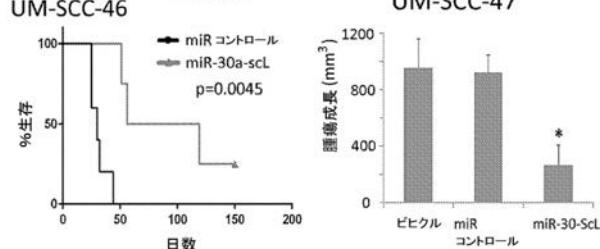


FIG. 9D

FIG. 9E

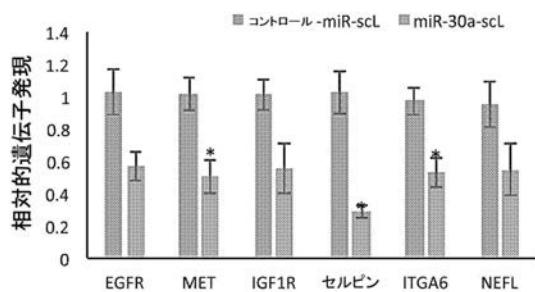
UM-SCC-46

UM-SCC-47



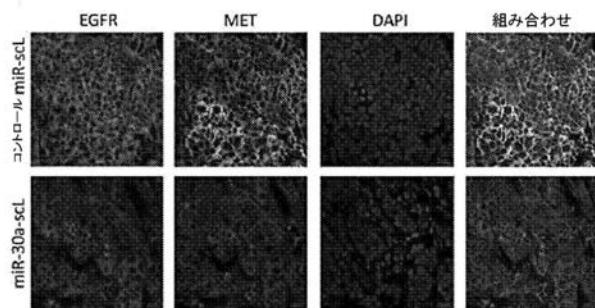
【図 10 A】

FIG. 10A



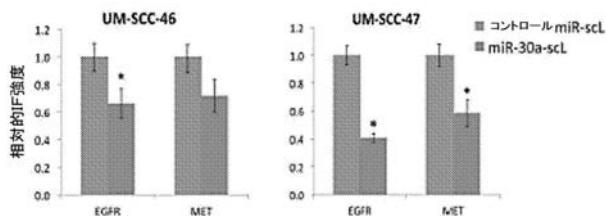
【図 10 B】

FIG. 10B



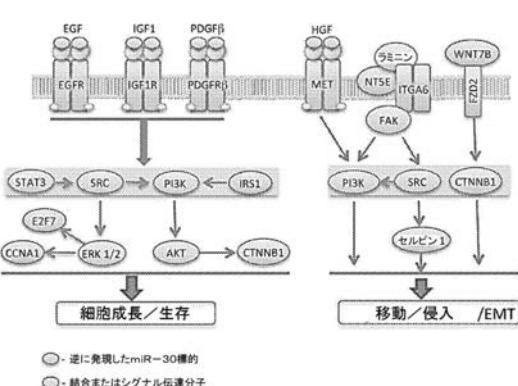
【図 10 C】

FIG. 10C



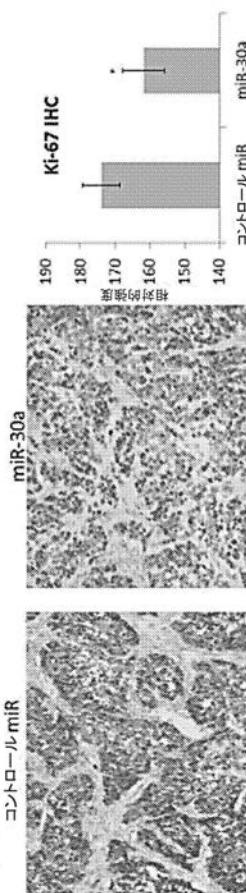
【図 10 D】

FIG. 10D



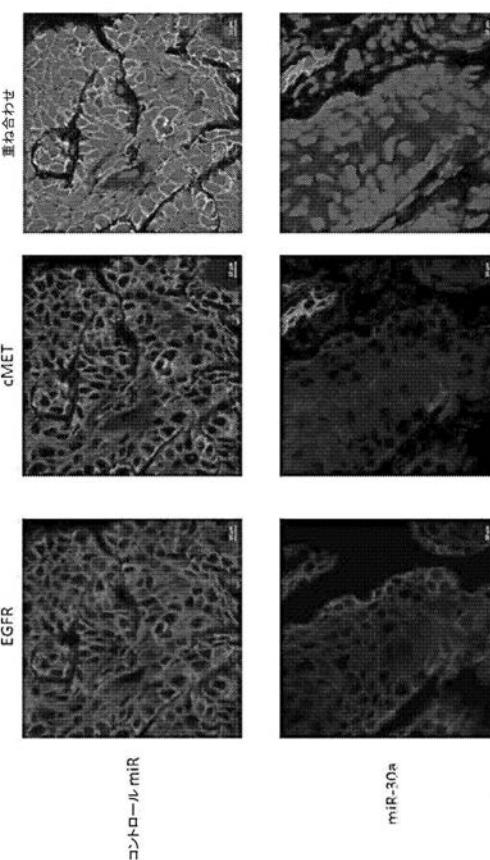
【図 10 E】

FIG. 10E



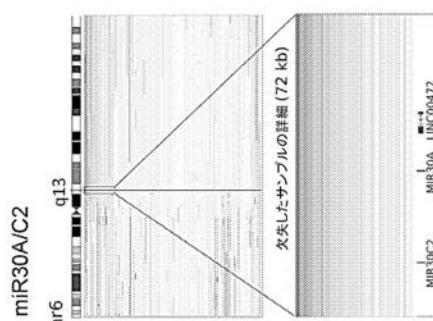
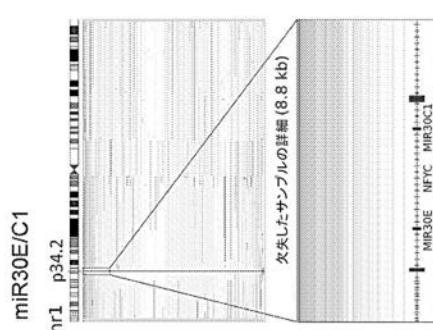
【図 10 F】

FIG. 10F



【図 1 1 A - B】

FIG. 11B



【図 1 1 C - D】

FIG. 11D

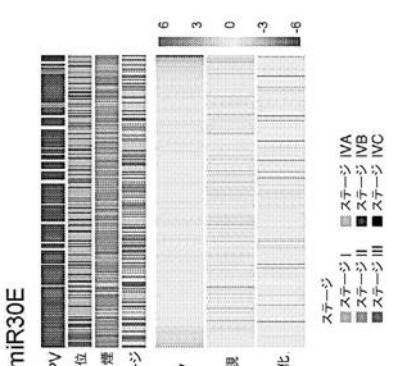
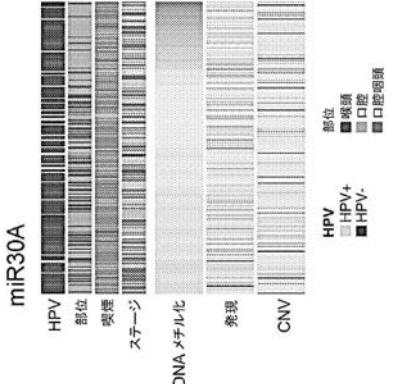


FIG. 11C



【図 1 1 E - F】

FIG. 11E

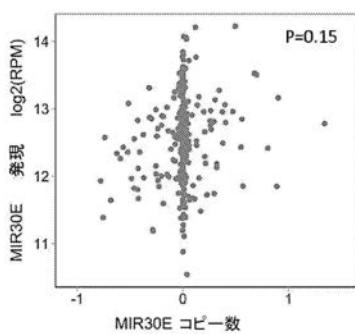
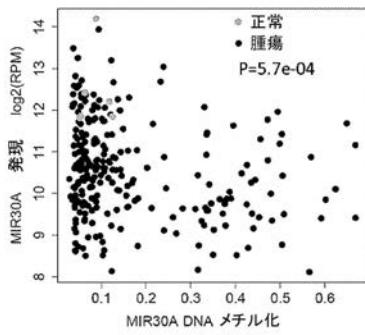


FIG. 11F



【図 1 1 G - H】

FIG. 11G

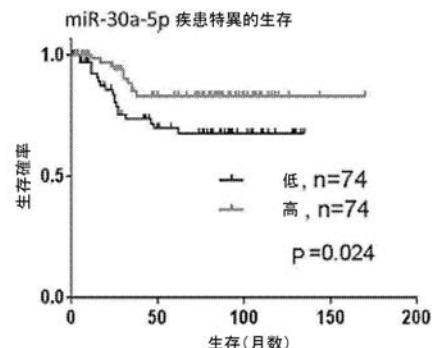
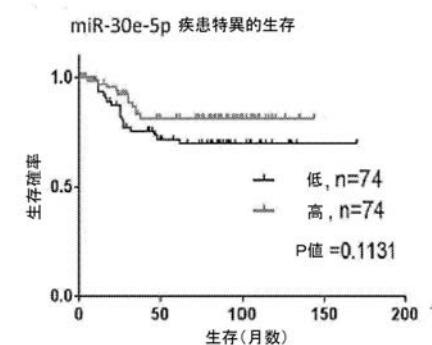


FIG. 11H



【図 1 2 A】

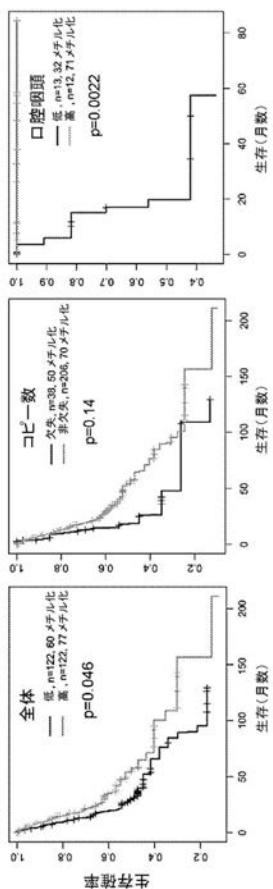


FIG. 12A

【図 1 2 B】

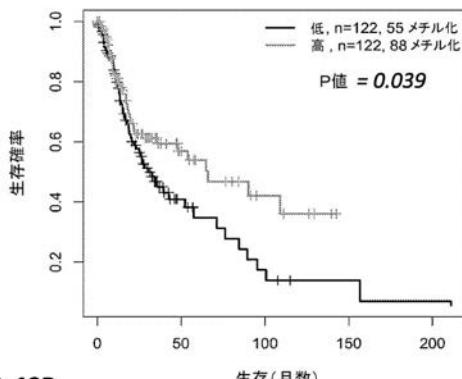


FIG. 12B

【図 1 3】

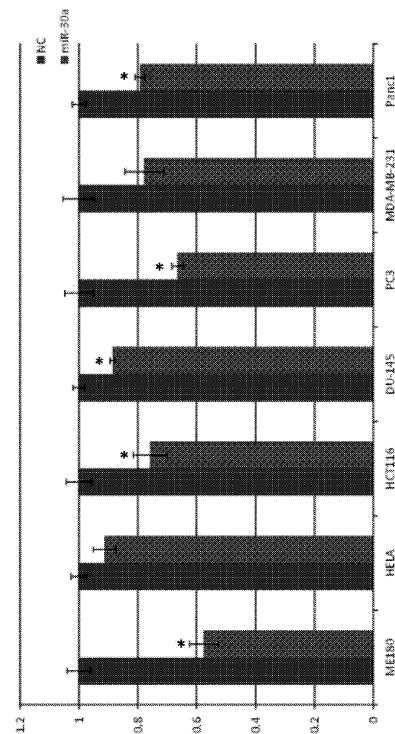


FIG. 13

【図 1 4】

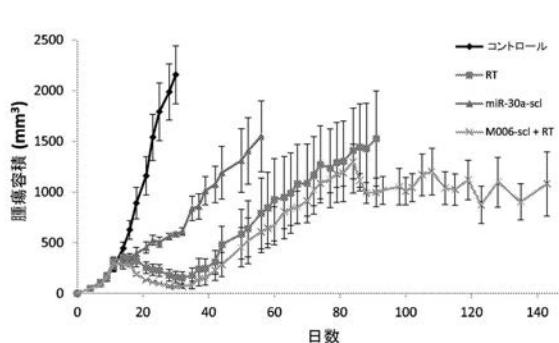
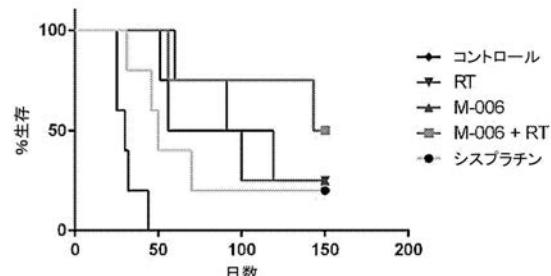
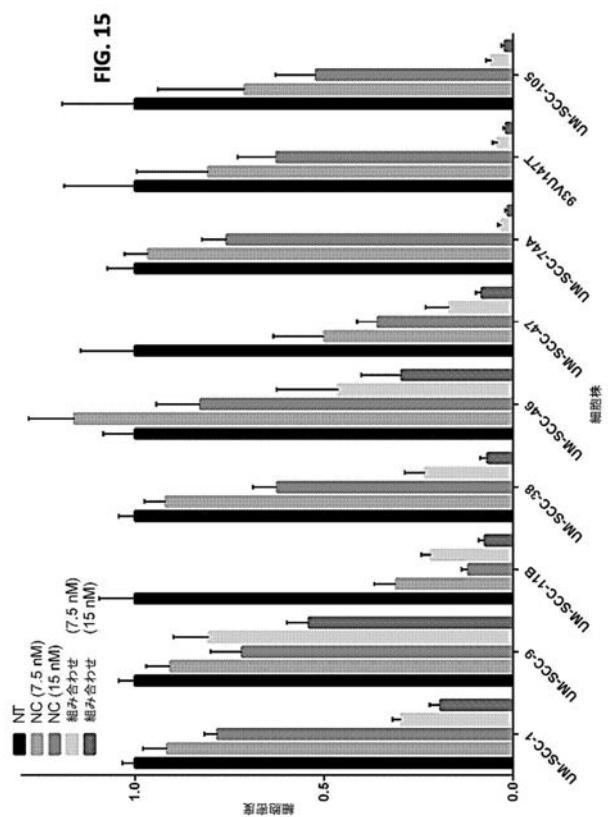


FIG. 14A

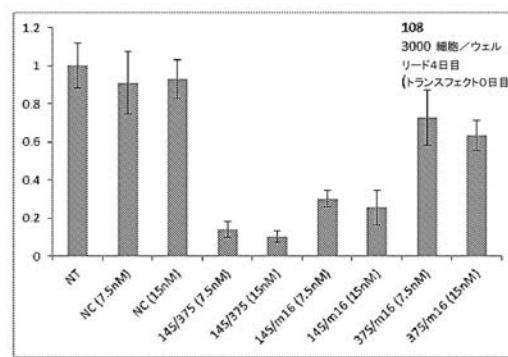
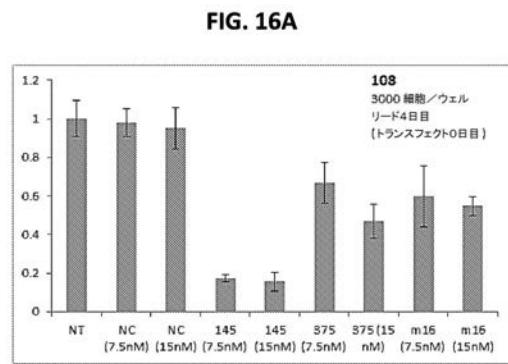
FIG. 14B



【図 15】

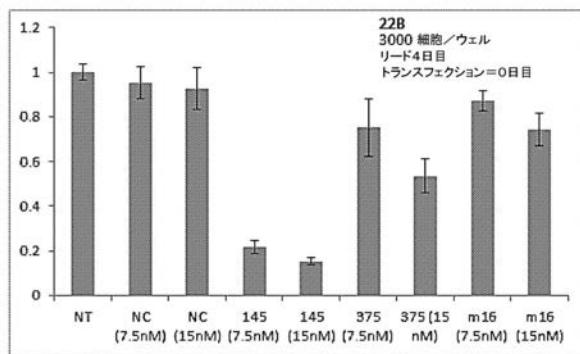


【図 16 A】



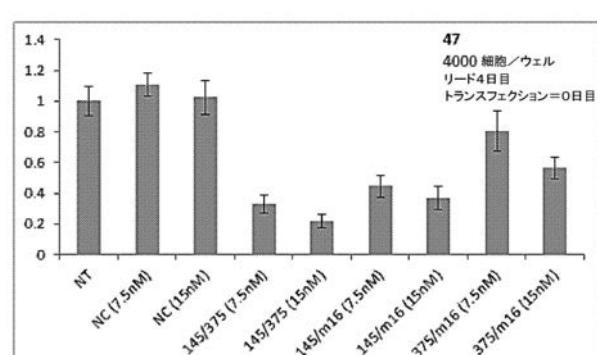
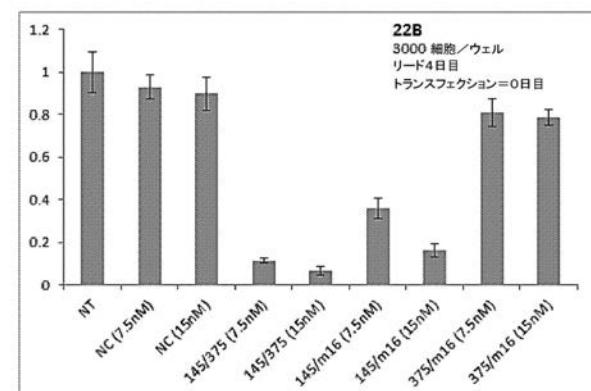
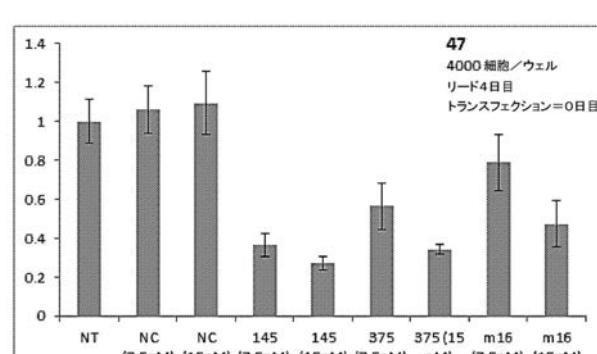
【図 16 B】

FIG. 16B



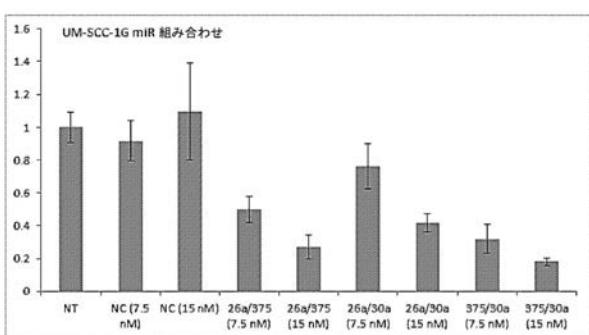
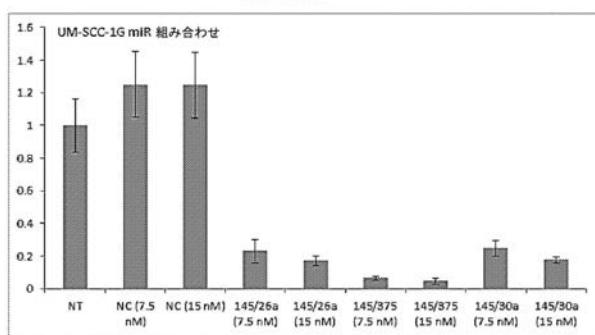
【図 16 C】

FIG. 16C



【図 16D】

FIG. 16D



【図 17】

FIG. 17A

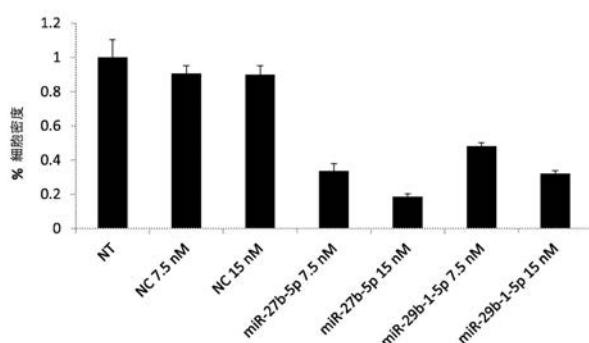
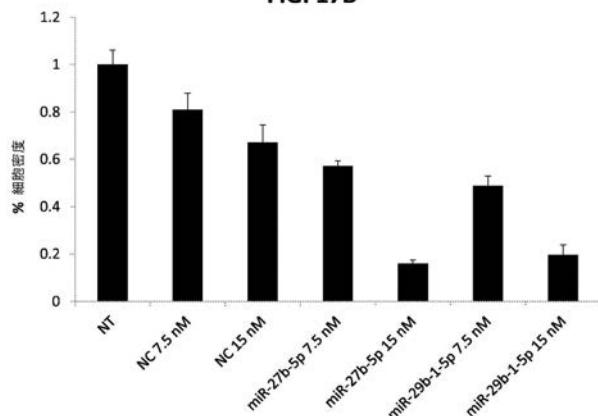
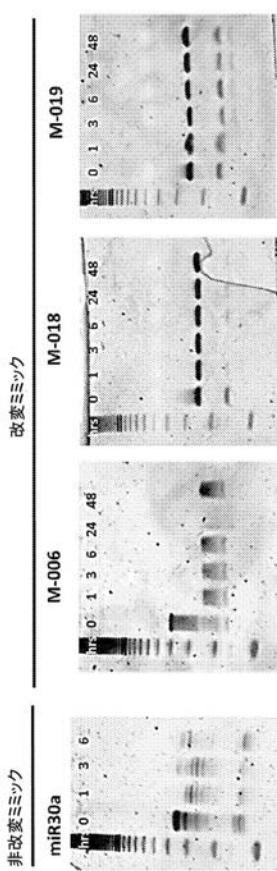


FIG. 17B



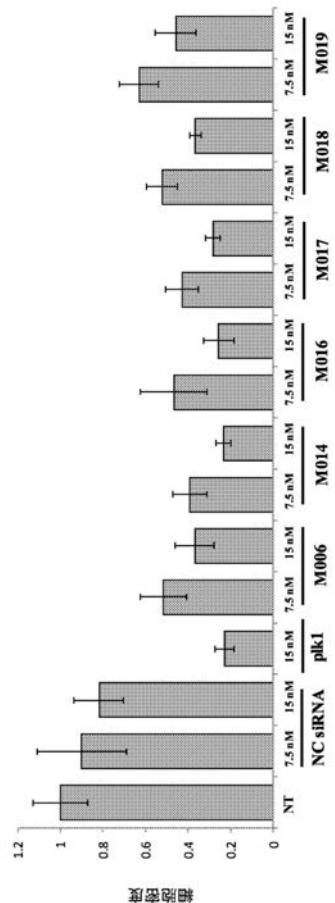
【図 18】

FIG. 18



【図 19】

FIG. 19



【配列表】

2019512489000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/021178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/7088
ADD. A61P35/00

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)
C12N A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/313932 A1 (CARRASCO RUBEN [US] ET AL) 5 November 2015 (2015-11-05) claim 1; examples 6-9 Invention 1 ----- -/-	1-4, 7-17, 19-23, 25-35

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

Date of mailing of the international search report

6 September 2017

14/09/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Piret, Bernard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/021178
--

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

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

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
2-4, 7, 17, 22, 23, 32(completely); 1, 5, 6, 8-16, 19-21, 25-31
33-35(partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIAN-JUN ZHAO ET AL: "miR-30-5p Functions as a Tumor Suppressor and Novel Therapeutic Tool by Targeting the Oncogenic Wnt/[beta]-Catenin/BCL9 Pathway", CANCER RESEARCH, vol. 74, no. 6, 5 March 2014 (2014-03-05), pages 1801-1813, XP055366078, US ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3311-T the whole document Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
X	N ZHANG ET AL: "MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin", ONCOGENE, vol. 33, no. 24, 15 July 2013 (2013-07-15) , pages 3119-3128, XP055366986, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2013.286 the whole document Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
X	XIAO-HUI LING ET AL: "MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer", MOLECULAR BIOLOGY REPORTS, vol. 41, no. 5, 23 January 2014 (2014-01-23), pages 2779-2788, XP055367002, NL ISSN: 0301-4851, DOI: 10.1007/s11033-014-3132-7 page 2784 Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
X	C-J KAO ET AL: "miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT", ONCOGENE, vol. 33, no. 19, 3 June 2013 (2013-06-03) , pages 2495-2503, XP055366667, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2013.200 page 2498 Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. BARANISKIN ET AL: "MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL", CARCINOGENESIS., vol. 33, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 732-739, XP055366675, GB ISSN: 0143-3334, DOI: 10.1093/carcin/bgs020 the whole document Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
X	QIAN ZHANG ET AL: "Role of MicroRNA 30a Targeting Insulin Receptor Substrate 2 in Colorectal Tumorigenesis", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY., vol. 35, no. 6, 15 March 2015 (2015-03-15) , pages 988-1000, XP055366971, US ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.01242-14 page 991 - page 995 Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
X	QIAN ZHANG ET AL: "Role of microRNA-30c Targeting ADAM19 in Colorectal Cancer", PLOS ONE, vol. 10, no. 3, 23 March 2015 (2015-03-23) , page e0120698, XP055367010, DOI: 10.1371/journal.pone.0120698 the whole document Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
X	MASAYUKI KANO ET AL: "miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 127, no. 12, 15 December 2010 (2010-12-15), pages 2804-2814, XP055007032, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.25284 A for Invention 1; X for invention 3 the whole document -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
A	MAAROUF A SAAD ET AL: "Alcohol-dysregulated miR-30a and miR-934 in head and neck squamous cell carcinoma", MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 14, no. 1, 15 October 2015 (2015-10-15), page 181, XP021230607, ISSN: 1476-4598, DOI: 10.1186/S12943-015-0452-8 Invention 1 -----	1-4, 7-17, 19-23, 25-35
3	-----	-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANAIK KOTA ET AL: "Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model", CELL, vol. 137, no. 6, 11 June 2009 (2009-06-11), pages 1005-1017, XP055004118, DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.021 page 1010 - page 1012 Invention 2 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	WO 2010/065630 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; NATIONWIDE CHILDRENS HOSPITAL [US]; MENDELL J) 10 June 2010 (2010-06-10) page 61 Invention 2 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	QING-GUANG LIU: "The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review)", ONCOLOGY LETTERS, 5 September 2011 (2011-09-05), XP055326925, GR ISSN: 1792-1074, DOI: 10.3892/o1.2011.413 the whole document Invention 2 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	BATCHU RAMESH B ET AL: "Enhanced phosphorylation of p53 by microRNA-26a leading to growth inhibition of pancreatic cancer", SURGERY, vol. 158, no. 4, 2015, pages 981-987, XP029264700, ISSN: 0039-6060, DOI: 10.1016/J.SURG.2015.05.019 the whole document Invention 2 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	ICHIRO FUKUMOTO ET AL: "Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma", JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 61, no. 2, 22 October 2015 (2015-10-22), pages 109-118, XP055396510, GB; JP ISSN: 1434-5161, DOI: 10.1038/jhg.2015.120 the whole document Invention 2 ----- -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
3		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C.-C. YU ET AL: "miR145 Targets the SOX9/ADAM17 Axis to Inhibit Tumor-Initiating Cells and IL-6-Mediated Paracrine Effects in Head and Neck Cancer", CANCER RESEARCH, vol. 73, no. 11, 1 June 2013 (2013-06-01), pages 3425-3440, XP055396755, & 103RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; CHICAGO, IL, USA; MARCH 31 -APRIL 04, 2012 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3840 page 3437 Invention 3 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	US 2013/115299 A1 (CHIOW SHIH-HWA [TW] ET AL) 9 May 2013 (2013-05-09) the whole document Invention 3 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	OMER FARUK KARATAS ET AL: "Role of miR-145 in human laryngeal squamous cell carcinoma : Functional analysis of miR-145 in laryngeal cancer", HEAD AND NECK., vol. 38, no. 2, 16 June 2015 (2015-06-16), pages 260-266, XP055396749, US ISSN: 1043-3074, DOI: 10.1002/hed.23890 page 263 - page 264 Invention 3 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	ZHANG YU ET AL: "Progress in microRNA delivery", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 172, no. 3, 2013, pages 962-974, XP028797338, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2013.09.015 table 2 Invention 3 ----- -/-	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
3		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YI-PING YANG ET AL: "Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 33, no. 5, 26 October 2011 (2011-10-26), pages 1462-1476, XP028339100, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.10.071 [retrieved on 2011-10-31] page 1470 - page 1473</p> <p>Invention 3</p> <p>-----</p>	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	<p>SEOK-JUN KIM ET AL: "Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 155, no. 3, 15 June 2011 (2011-06-15) , pages 427-434, XP028317072, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2011.06.026 [retrieved on 2011-06-24] page 429 - page 431</p> <p>Invention 3</p> <p>-----</p>	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	<p>HOU YANMEI ET AL: "MicroRNA-145 as ideal biomarker for the diagnosis of various carcinomas", TUMOR BIOLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 36, no. 4, 5 December 2014 (2014-12-05), pages 2641-2649, XP036218262, ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1007/S13277-014-2886-9 [retrieved on 2014-12-05] the whole document</p> <p>Invention 3</p> <p>-----</p>	30,31
X	<p>X-X HE ET AL: "MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo", ONCOGENE, vol. 31, no. 28, 7 November 2011 (2011-11-07), pages 3357-3369, XP055396546, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2011.500 page 3360 - page 3361</p> <p>Invention 4</p> <p>-----</p>	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/021178

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUN-WEI YAN ET AL: "The emerging role of miR-375 in cancer", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 135, no. 5, 13 November 2013 (2013-11-13), pages 1011-1018, XP055397085, US ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.28563 the whole document Invention 4 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	NIJIRO NOHATA ET AL: "Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)", JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 56, no. 8, 14 July 2011 (2011-07-14), pages 595-601, XP055023789, ISSN: 1434-5161, DOI: 10.1038/jhg.2011.66 page 597 Invention 4 -----	1,5-17, 19-23, 25-31, 33-35
X	US 2011/143950 A1 (ZAMA TAKERU [JP] ET AL) 16 June 2011 (2011-06-16) the whole document Invention 4 -----	30,31, 33-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/021178

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2015313932	A1	05-11-2015	NONE			
WO 2010065630	A2	10-06-2010	US WO	2011301226 A1 2010065630 A2	08-12-2011 10-06-2010	
US 2013115299	A1	09-05-2013	TW US	201330854 A 2013115299 A1	01-08-2013 09-05-2013	
US 2011143950	A1	16-06-2011	JP US WO	2010094122 A 2011143950 A1 2009150839 A1	30-04-2010 16-06-2011 17-12-2009	

International Application No. PCT/US2017/021178

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2-4, 32(completely); 1, 7-17, 19-23, 25-31, 33-35(partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-30 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these.

2. claims: 1, 5-17, 19-23, 25-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-26 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

3. claims: 1, 5-17, 19-23, 25-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-145 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

4. claims: 1, 5, 6, 8-16, 19-23, 25-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-338 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

5. claims: 1, 8-16, 19-21, 25-30, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-205 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

6. claims: 1, 5-17, 19-23, 25-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-375 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

International Application No. PCT/US2017/021178

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 1, 5-16, 18-21, 24-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-29 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

8. claims: 1, 5-16, 18-21, 24-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-27 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

9. claims: 1, 5-16, 18-21, 24-31, 33-35(all partially)

Method of treating a subject with cancer, comprising administering a miR-101 nucleic acid or mimic and/or mimetic thereof; methods and compositions derived from these; insofar as this subject-matter is not already encompassed by other inventions.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/69	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 9/51	
C 1 2 Q 1/6811 (2018.01)	C 1 2 N 15/113 1 1 0	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6811	
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 0 7 K 16/28	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6886	
	G 0 1 N 33/50 P	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許序注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(74)代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(72)発明者	サレー， アンソニー ディー。 アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, ボルティモア ロード 22
(72)発明者	ヴァン ウイズ， カーター アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, センター ドライブ 10, シー アールシー 4-2732, エヌアイディーシーディー
(72)発明者	チェン， ジョン アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, センター ドライブ 10, ルー ム 5ディー55, エヌアイディーシーディー
(72)発明者	チェン， フイ アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, センター ドライブ 10, ルー ム 5ディー55, エヌアイディーシーディー

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 BA13 BA14 BB22 BB24 CA25 CB01
CB02 CB03 CB07 CB26 DA13 DA14 DA36 FA16 FA19 FB01
FB02 FB03 FB08 FB12 GB02 GC15 JA01
4B063 QA19 QQ02 QQ52 QR35 QR36 QR40 QR55 QR62 QS25 QS34

4C076 AA01 AA06 AA09 AA11 AA17 AA19 AA22 AA29 AA30 AA31
AA36 AA53 AA65 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21
BB22 BB25 BB29 BB30 BB31 BB32 CC27 EE41 FF02 FF04
FF05 FF12 FF13 FF16 FF39 FF43 FF52 FF57 FF61
4C084 AA19 MA02 MA05 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31
MA37 MA38 MA41 MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63
MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC411 ZC412 ZC751 ZC752
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23
MA24 MA28 MA31 MA35 MA37 MA38 MA41 MA43 MA52 MA55
MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZC41
ZC75
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74