

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6286050号
(P6286050)

(45) 発行日 平成30年2月28日 (2018. 2. 28)

(24) 登録日 平成30年2月9日 (2018. 2. 9)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/113	(2010. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A G
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	F
C 1 2 Q	1/68	(2018. 01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 K	31/7105	(2006. 01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	48/00	(2006. 01)	A 6 1 K	48/00	

請求項の数 13 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-538498 (P2016-538498)	(73) 特許権者	516170897
(86) (22) 出願日	平成26年12月9日 (2014. 12. 9)		ジャンスー マイクロメッドマーク バイ オテック カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2017-501696 (P2017-501696A)		J I A N G S U M I C R O M E D M A R K B I O T E C H C O . , L T D .
(43) 公表日	平成29年1月19日 (2017. 1. 19)		中華人民共和国 ジャンスー 22530 0、タイツォウ、ヤオチェン アヴェニュー
(86) 国際出願番号	PCT/CN2014/093384		ー ナンバー 1、ルーム 208
(87) 国際公開番号	W02015/085904		Room 208, No. 1 Yaoc heng Avenue, Taizho u, Jiangsu 225300 C hina
(87) 国際公開日	平成27年6月18日 (2015. 6. 18)	(74) 代理人	100102842
審査請求日	平成28年6月22日 (2016. 6. 22)		弁理士 葛和 清司
(31) 優先権主張番号	201310664639.5		
(32) 優先日	平成25年12月9日 (2013. 12. 9)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリインフルエンザウイルスのmiRNAとその同定、検出および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたmiRNAであって、

(i) 配列が配列番号1、2または3で示されるmiRNA、あるいは

(ii) 長さが20~22 ntで、かつ配列番号4で示されるコア配列を有するmiRNA、ある
いは(iii) (i) または (ii) における前記miRNAのヌクレオチド配列に相補的なmiRNA、
から選ばれるmiRNA。

【請求項 2】

miRNAは、トリインフルエンザウイルス由来のものである請求項 1 に記載のmiRNA。 10

【請求項 3】

miRNAは、トリインフルエンザウイルスH5N1由来のものである請求項 2 に記載のmiRNA。

【請求項 4】

単離された前駆体miRNAまたは人工的に構築された前駆体miRNAであって、動物細胞内
において切断され、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のmiRNAとして発現される、前駆体m
iRNA。

【請求項 5】

単離されたポリヌクレオチドであって、動物細胞によって前駆体miRNAに転写され、前
記の前駆体miRNAがヒト細胞内において切断され、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のm
iRNAとして発現される、ポリヌクレオチド。 20

【請求項6】

ポリヌクレオチドは、式Iで表される構造を有し、

Seqフォワード-X-Seqリバース 式I

(式Iにおいて、

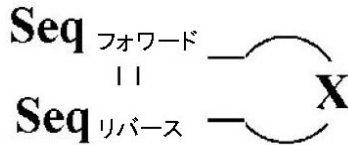
Seqフォワードは、動物細胞において前記のmiRNAとして発現されるヌクレオチド配列である。

Seqリバースは、Seqフォワードに基本的にまたは完全に相補的なヌクレオチド配列である。

Xは、SeqフォワードとSeqリバースの間にあるスペーサー配列で、かつ前記ペーサー配列はSeqフォワードおよびSeqリバースに相補的なものではない。) 10

かつ式Iで表される構造は、ヒト細胞に導入された後、式IIで表される二次構造になる、

【数1】



式II

(式IIにおいて、Seqフォワード、SeqリバースおよびXの定義は前記通りである。 20

|| は、SeqフォワードとSeqリバースの間に形成された相補的塩基の対合関係を表す。

)

請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

請求項1または2に記載のmiRNA、あるいは請求項5または6に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項8】

(a) トリインフルエンザを検出する試薬、検出チップまたはキットの製造、(b) PCBP2の発現または活性を調節する調節剤の製造、(c) サイトカインの発現を調節する試薬の製造における請求項1~3のいずれか一項に記載のmiRNAの使用。 30

【請求項9】

固相担体と、

前記固相担体に規則正しく固定化された、特異的に請求項1~3のいずれか一項に記載のmiRNAを捕獲するオリゴヌクレオチドプローブと、

を含む核酸チップ。

【請求項10】

請求項9に記載の核酸チップまたは請求項1~3のいずれか一項に記載のmiRNAを含むキット。

【請求項11】

阻害剤の、(a) トリインフルエンザを治療する薬物、(b) トリインフルエンザの症状を緩和する薬物、(c) 宿主動物におけるトリインフルエンザウイルスの数を減少する薬物、(d) トリインフルエンザの死亡率を低下させる薬物、(e) 過剰な免疫を減少する薬物の製造における使用であって、前記阻害剤は、配列番号1-3に示される配列を有するmiRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドである、 40

前記使用。

【請求項12】

薬学的に許容される担体と、miRNAを特異的に抑制または遮断する阻害剤とを含む薬物組成物であって、前記阻害剤は、配列番号1-3に示される配列を有するmiRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドである、

前記薬物組成物。

【請求項13】

トリインフルエンザの治療に用いられる候補薬物を選別する方法であって、

(a) テスト群とコントロール群を提供し、前記テスト群では、候補物質をテスト群の細胞または動物に施用し、かつ使用後の前記テスト群におけるmiR-HA-3pの発現レベルを測定し、一方、前記のコントロール群では、テスト群と同様の条件を使用するが、候補物質をコントロール群の細胞または動物に施用しない工程と、

(b) テスト群のmiR-HA-3pとコントロール群のmiR-HA-3pの発現レベルを比較する工程と、

ここで、テスト群のmiR-HA-3pの発現レベルがコントロール群のmiR-HA-3pの発現レベルよりも顕著に低い場合、当該候補物質はトリインフルエンザの治療に用いられる候補薬物であることを示し、miR-HA-3pは、配列番号1-3に示される配列を有する、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物および医学の分野に関し、より具体的に、トリインフルエンザウイルスのmiRNAとその同定、検出および使用に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザウイルス粒子は、2種類の表面糖タンパク質によって被覆され、1種類はフィトヘマグルチニン(すなわちH)で、もう1種類はノイラミニダーゼ(すなわちN)で、またHは15の亜型に、Nは9の亜型に分かれる。

人類のインフルエンザウイルスはいずれもトリのインフルエンザを引き起こせるが、すべてのトリインフルエンザウイルスが人類のインフルエンザを引き起こせるわけではなく、トリインフルエンザウイルスの中では、H5、H7、H9はヒトに伝染することができ、中でも、H5は高病原性で、H5N1はトリインフルエンザウイルスの一つの亜型である。H5N1は衛生部の新伝染病防治法に規定される報告すべき法定伝染病で、ヒト感染高病原性トリインフルエンザとも呼ばれる。トリインフルエンザは、その病原性によって高病原性と低病原性に分かれる。H5N1は高病原性トリインフルエンザウイルスである。

【0003】

1997年に、H5N1ウイルスは初めて中国香港の一名の3歳児のインフルエンザ死亡例の標本から単離して同定された。2012年まで、ほとんどの人類感染例は直接トリからで、数例しか感染者からと確認されず、一般的に、H5N1ウイルスはまだヒト-ヒト間の持続的な拡散連鎖ができていない。トリインフルエンザの重症患者は、ほとんどH5N1亜型ウイルスに感染したものである。患者は、突然に発症し、早期所見は普通型のインフルエンザと類似である。主に発熱し、体温は大体39 以上で続き、発熱の過程は1~7日、通常3~4日で、鼻水、鼻づまり、咳、喉の痛み、頭痛、筋肉痛や体調不良が伴うことがある。一部の患者は、吐き気、腹痛、下痢、水様便などの消化管の症状が出ることもある。重症の患者は、病状が迅速に発展し、肺炎、急性呼吸窮迫症候群、肺出血、胸水、汎血球減少、腎不全、敗血症、ショックなどの様々な合併症が現れることがある。白血球の総数は、通常、高くないか、または低下する。重症の患者は、大体、白血球の総数およびリンパ球が減少し、かつ血小板が低下する。

【0004】

H5N1亜型トリインフルエンザウイルスは、現在発見されたトリインフルエンザウイルスの中で、最も感染性が強く、致死率が高く、流行範囲が広い一種で、当該ウイルスはすでに世界中の多くの国で流行している。

現在、当該疾患にはまだ効率的で特異的な治療方法がなく、ワクチンの接種はいま比較的有効な予防措置と重要なポイントである。そのため、安全で、効率的で、低価格の新型ワクチンの開発はいまトリインフルエンザの予防対策の注目点の一つで、ワクチンの開発は既に大量の研究成果があげられた。しかし、ウイルスの変異速度が早く、変異種の種

10

20

30

40

50

類が多く、現在のワクチンの開発速度は有効にウイルスの変異種に対抗することが保証できないため、H5N1の侵入過程のさらなる研究および新たな治療方法の開発がもっと切望されている。

【0005】

マイクロリボ核酸は、英語でmicroRNAで、miRNAと略され、長さが約19~23のヌクレオチドの小さいノンコーディング一本鎖リボ核酸分子で、進化上では高度に保存的で、生物の細胞に幅広く存在する。マイクロリボ核酸は、標的mRNAの3'末端の非翻訳配列を識別し、それと不完全に対合することで、標的mRNAの翻訳を抑制する。その配列、構造、存在度および発現様態の多様性のため、マイクロリボ核酸は伝令RNAの強力な調節因子になり、かつ遺伝子発現の調節の分野で想像を超える重要な作用を果たす。

10

【0006】

マイクロリボ核酸は、動物の多くの正常の生理活動と密接に関係し、生物の個体発育、組織分化、アポトーシスおよびエネルギー代謝などの生命活動の至るところに関与する。同時に、マイクロリボ核酸は、多くの疾患の発生と発展にも密接に関係し、ある疾患が発生すると、一部のマイクロリボ核酸の発現量が上がり、一部が下がる。

関連研究では、既に、ウイルスまたは微生物は、宿主細胞に感染した後、特異的なmiRNAをコードし、特異的なmiRNAが宿主の免疫関連mRNAに作用し、宿主のサイトカイン系を調節し、そして宿主の免疫調節に影響することがわかった。

このように、より有効にトリインフルエンザを予防・治療するために、本分野ではトリインフルエンザの検出および治療に用いられる関連の試薬および方法の開発が切望されている。

20

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的は、トリインフルエンザの検出および治療に有効に用いられる関連の試薬および方法を提供することである。

【0008】

本発明の第一では、単離されたmiRNAであって、

(i) 配列が配列番号1、2または3で示されるmiRNA、或いは

(ii) 長さが20~26 ntで、かつ配列番号4で示されるコア配列を有するmiRNA、あるいは

30

(iii) (i) または (ii) における前記miRNAのヌクレオチド配列に相補的なmiRNA、から選ばれるmiRNAを提供する。

もう一つの好適な例において、前記の相補的なものは、基本的に相補的なもの(相補的ではない塩基が3個、好ましくは3個、より好ましくは1個のもの)と完全に相補的なものを含む。

【0009】

もう一つの好適な例において、前記のmiRNAは、トリインフルエンザウイルス由来のものである。

もう一つの好適な例において、前記のmiRNAは、トリインフルエンザウイルスH5N1由来のものである。

40

もう一つの好適な例において、前記のmiRNAは、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物の血液、体液、または組織のサンプルから単離されたものである。

もう一つの好適な例において、前記の血液は、血漿および/または血清である。

もう一つの好適な例において、前記のヒト以外の哺乳動物は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジなどである。

もう一つの好適な例において、前記のmiRNAは、ヒトから単離されたものである。

【0010】

本発明の第二では、単離された前駆体miRNAまたは人工的に構築された前駆体miRNAであって、動物細胞内において切断され、本発明の第一に記載のmiRNAとして発現される、前駆体miRNAを提供する。

50

もう一つの好適な例において、前記の動物細胞は、ヒトの細胞を含む。

【0011】

本発明の第三では、単離されたポリヌクレオチドであって、動物細胞によって前駆体miRNAに転写され、前記の前駆体miRNAがヒト細胞内において切断され、本発明の第一に記載のmiRNAとして発現される、ポリヌクレオチドを提供する。

もう一つの好適な例において、前記のヌクレオチドは、式Iで表される構造を有し、

Seqフォワード-X-Seqリバース 式I

(式Iにおいて、

Seqフォワードは、動物細胞において前記のmiRNAとして発現されるヌクレオチド配列である。

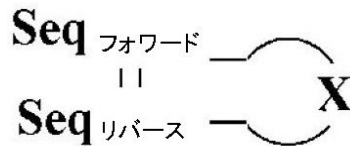
Seqリバースは、Seqフォワードに基本的にまたは完全に相補的なヌクレオチド配列である。

Xは、SeqフォワードとSeqリバースの間にあるスペーサー配列で、かつ前記ペーサー配列はSeqフォワードおよびSeqリバースに相補的なものではない。)

【0012】

かつ式Iで表される構造は、ヒト細胞に導入された後、式IIで表される二次構造になる。

【数1】



式 II

(式IIにおいて、Seqフォワード、SeqリバースおよびXの定義は前記通りである。

|| は、SeqフォワードとSeqリバースの間に形成された相補的塩基の対合関係を表す。

)

本発明の第四では、本発明の第一に記載のmiRNA、または本発明の第二に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0013】

本発明の第五では、(a) トリインフルエンザを検出する試薬、検出チップまたはキットの製造、(b) PCBP2の発現または活性を調節する調節剤の製造、(c) サイトカインの発現を調節する試薬の製造に用いられる、本発明の第一に記載のmiRNAの使用を提供する。

もう一つの好適な例において、前記のPCBP2の発現または活性を調節する調節剤は、PCBP2の発現または活性を下方調節する阻害剤である。

もう一つの好適な例において、前記サイトカインは、TNF、IFN-、IL-6、IL-1、またはこれらの組み合わせを含む。

【0014】

本発明の第六では、

固相担体と、

前記固相担体に規則正しく固定化された、特異的に本発明の第一に記載のmiRNAを捕獲するオリゴヌクレオチドプローブと、

を含む核酸チップ(たとえばmiRNAチップ)を提供する。

本発明の第七では、トリインフルエンザを検出するキットの製造に用いられる、本発明の第六に記載の核酸チップの使用を提供する。

本発明の第八では、本発明の第七に記載の核酸チップまたは本発明の第一に記載のmiRNAを含むキットを提供する。

【0015】

本発明の第九では、本発明の第一に記載のmiRNAを特異的に抑制または遮断する阻害剤

10

20

30

40

50

を提供する。

もう一つの好適な例において、前記の阻害剤は、miRNAスポンジ (sponge)、miRNAの配列に相補的なアンチセンス核酸、小分子化合物である。

もう一つの好適な例において、前記の阻害剤は、(i)または(ii)に記載のmiRNAのヌクレオチド配列に相補的な核酸(たとえばRNA、DNAまたは類似体)である。

【0016】

本発明の第十では、本発明の第九に記載のmiRNAの阻害剤の使用であって、(a)トリインフルエンザを治療する薬物、(b)トリインフルエンザの症状を緩和する薬物、(c)宿主動物におけるトリインフルエンザウイルスの数を減少する薬物、(d)トリインフルエンザの死亡率を低下させる薬物、(e)過剰な免疫を減少する薬物の製造に用いられる使用を提供する。

10

本発明の第十一では、薬学的に許容される担体と、本発明の第一に記載のmiRNAを特異的に抑制または遮断する阻害剤とを含む薬物組成物を提供する。

もう一つの好適な例において、前記のmiRNAの阻害剤は、miRNAスポンジ (sponge)、miRNAの配列に相補的なアンチセンス核酸を含む。

【0017】

本発明の第十二では、トリインフルエンザの治療に用いられる候補薬物を選別する方法であって、

(a)テスト群とコントロール群を提供し、前記テスト群では、候補物質をテスト群の細胞または動物に施用し、かつ使用後の前記テスト群におけるmiR-HA-3pの発現レベルを測定し、一方、前記のコントロール群では、テスト群と同様の条件を使用するが、候補物質をコントロール群の細胞または動物に施用しない工程と、

20

(b)テスト群のmiR-HA-3pとコントロール群のmiR-HA-3pの発現レベルを比較する工程と、

を含み

ここで、テスト群のmiR-HA-3pの発現レベルがコントロール群のmiR-HA-3pの発現レベルよりも顕著に低い場合、当該候補物質はトリインフルエンザの治療に用いられる候補薬物であることを示す、

方法を提供する。

【0018】

もう一つの好適な例において、前記のmiR-HA-3pの配列は、配列番号1~3で示されるようなものである。

30

もう一つの好適な例において、前記の動物はマウスを含み、前記の細胞は体外で培養された細胞を含む。

本発明の第十三では、PCBP2の発現または活性を下方調節する調節剤あるいは薬物組成物の製造に用いられる、miR-HA-3pの使用を提供する。

もう一つの好適な例において、前記のmiR-HA-3pの配列は、配列番号1~3で示されるようなものである。

【0019】

もちろん、本発明の範囲内において、本発明の上記の各技術特徴および下記(例えば実施例)の具体的に記述された各技術特徴は互いに組合せ、新しい、または好適な技術方案を構成できることが理解される。紙数に限りがあるため、ここで逐一説明しない。

40

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、トリインフルエンザH5N1が宿主細胞に感染した後、特殊な小分子のmiR-HA-3pを放出することを示す。

【図2】図2は、miR-HA-3pの標的遺伝子PCBP2に対する抑制作用を示す。

【図3】図3は、H5N1野生型および突然変異株に感染されたマクロファージにおいて、miR-HA-3pのサイトカインの分泌に対する影響を示す。

【図4】図4は、miR-HA-3p阻害剤で処理した後のPCBP2の発現状況を示す。

50

【図5】図5は、H5N1またはH5N1突然変異株に感染されたマクロファージの異なる処理条件におけるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β またはIL-6のmRNAの発現レベルを示す。

【図6】図6は、マウスモデルにおいて、miR-HA-3pとH5N1の感染程度が正相関することを示す。

【図7】図7は、異なる処理条件における4日後のマウス肺部のPCBP2タンパク質のレベルを示す。

【図8】図8は、組織病理学的方法による多群実験のマウス肺組織の研究結果を示す。

【0021】

各図において、「Mut」は突然変異を、「control」はコントロールを、「Marker」は分子量標準を、「Mock」はブランクコントロールを表す。

10

【0022】

具体的な実施形態

本発明者は、長期間にわたって幅広く研究したところ、体内の病原体（感染微生物、寄生微生物、共生微生物などを含み、たとえばウイルス、細菌、古細菌、クラミジア、原生動物）がmiRNAを含む非コードRNA（non-coding RNA、ncRNA）を放出し、これらの特定のncRNAは体内の病原体のバイオマーカーとし、有効に体内の病原体の検出と治療に使用することで、微生物感染症の診断と治療を顕著に改善できることを初めて意外に見出した。これに基づき、本発明を完成させた。

【0023】

具体的に、本発明者は、トリインフルエンザの動物の標本のmicroRNAの発現レベルを検出することで、初めて、一種類の特異的なmicroRNA、すなわちmiR-HA-3pを選別できた。miR-HA-3pはmicroRNAマーカーとして、トリインフルエンザウイルスおよびトリインフルエンザを非常に有効に検出することができることが検証された。また、miR-HA-3pの機能と抑制することによって、有効にトリインフルエンザの症状を緩和し、かつトリインフルエンザを治療することができる。本発明で初めて開示されたmicroRNAに基づき、検出試薬および治療試薬ならびに相応のキットを開発し、トリインフルエンザ（たとえばH5N1）の検出および治療に使用することができる。

20

【0024】

実験によって、H5N1が宿主細胞に感染した後、特殊な小分子物質のmiR-HA-3pを放出し、それが宿主の体内循環に入り、かつmiR-HA-3pの発現量とウイルスの感染程度が正相関することが実証された。本発明では、さらに、miR-HA-3pの標的遺伝子がPCBP2で、miR-HA-3pがPCBP2のmRNAに作用することによってPCBP2タンパク質の発現を下方調節し、MAVが仲介する抗ウイルス過程の強化につながり、よってH5N1の侵入過程において過剰な免疫応答またはサイトカインストームを引き起こすことが見出された。本発明では、ヒトマクロファージモデルおよびマウスモデルを構築することによって、miR-HA-3pを遮断すると、宿主の炎症反応を緩和し、マウスの生存率を上げることができると実証された。

30

【0025】

本発明では、miR-HA-3pに特異的な作動剤および阻害剤を構築することによって、miR-HA-3pの発現レベルを調節する目的を実現することで、H5N1ウイルスによる多くの免疫反応および組織学的病変を緩和・治療することができる。このような治療法は、特異性が高く、効率的で、副作用が小さく、コストが低く、かつ人類のH5N1ウイルスおよびその変異種への対抗に新しい考え方を与えた。

40

【0026】

用語

ここで用いられるように、用語「本発明のmiRNA」、「トリインフルエンザH5N1の特異的miRNA」は、入れ替えて使用することができ、miR-HA-3pを指し、miR-HA-3p-1、miR-HA-3p-2、miR-HA-3p-3およびそのコア配列（配列番号4）を有する類似のmiRNAを含む。

ここで用いられるように、用語「阻害剤」、「拮抗剤」および「遮断剤」は、意味が同様で、入れ替えて使用することができる。

ここで用いられるように、用語「miR-HA-3p遮断剤」、「本発明の遮断剤」、「本発明

50

の阻害剤」とは、miR-HA-3pの機能を抑制または遮断する物質を指し、たとえばアンチセンス配列や核酸スポンジなどが挙げられる。これらの阻害剤は、miR-HA-3pとPCBP2のmRNAの結合を抑制し、そしてmiR-HA-3pの標的遺伝子PCBP2の発現に対する下方調節を抑制することができる。

【0027】

ここで用いられるように、用語「Agomir」とは、miRNA作動剤を指す。Agomirは、microRNAの成熟配列に基づいて設計し、特殊な標識および化学修飾を行った二本鎖の小さいRNA分子で、内在性成熟miRNA配列をシミュレートするためのものである。通常、agomirは、一本の標的miRNAの成熟配列に一致する配列と、もう一本のmiRNAの成熟配列に相補的な配列を含む。特異的なmicroRNAのagomirは、相応のmicroRNAを発現する細胞に導入され、miRNAの作用をシミュレートするか、あるいはmiRNA結合サイトを構築したデュアルルシフェラーゼレポーターシステムと組み合わせ、miRNAと標的遺伝子の間の調節関係を検証することができる。

10

【0028】

ここで用いられるように、用語「Antagomir」とは、miRNA遮断剤を指す。Antagomirは、microRNAの成熟配列に基づいて設計し、特殊な標識および化学修飾を行った一本鎖の小さいRNAで、特異的に内在性microRNAを抑制するための効率的な遮断剤である。

Agomirおよびantagomirは、提供された短鎖RNAの配列に基づき、通常の方法で設計・合成することができる。

ここで用いられるように、用語「Ago2」とは、argonaute RISC catalytic component 2を指す。Ago2は、RISC複合体を構成する主要成分で、干渉性短鎖RNAが仲介する遺伝子サイレンシング (short-interfering-RNA-mediated gene silencing) に関与する。

20

【0029】

miRNAおよびその前駆体

本発明は、トリインフルエンザウイルス由来の新しい種類のmiRNAを提供する。ここで用いられるように、前記の「miRNA」とは、RNA分子で、miRNA前駆体を形成できる転写物から加工して得られる。成熟のmiRNAは、通常、18~26個のヌクレオチド (nt) を有する (特に約19~22 nt) が、ほかの数のヌクレオチドを有するmiRNA分子もある。miRNAは、通常、ノーザンブロッティングによって検出することができる。

ここで用いられるように、「単離された」とは、物質がその本来の環境から単離されたこと (天然の物質の場合、本来の環境は天然の環境である) を指す。たとえば、活細胞内の天然の状態におけるポリヌクレオチドとポリペプチドは単離・精製されていないが、同様のポリヌクレオチドまたはポリペプチドが天然の状態から存在するほかの物質とわかれると、単離・精製されたものになる。

30

【0030】

miRNAは、前駆体miRNA (Precursor miRNA、Pre-miRNA) から加工して得られ、前記の前駆体miRNAはフォルディングして安定したステム・ループ (ヘアピン) 構造になり、前記のステム・ループ構造の長さは、通常、50~100 bpの間である。前記の前駆体miRNAは、フォルディングして安定したステム・ループ構造になり、ステム・ループ構造のステム部の両側は基本的に相補的な二本の配列を含む。前記の前駆体miRNAは、天然のもので人工合成されたものでもよい。

40

【0031】

前記前駆体miRNAは、切断されてmiRNAになり、前記のmiRNAはコード遺伝子のmRNAの少なくとも一部の配列に基本的に相補的である。ここで用いられるように、「基本的に相補的」とは、ヌクレオチドの配列が十分に相補的であることを指し、予想可能な様態で相互作用し、たとえば二次構造 (たとえばステム・ループ構造) を形成することができる。通常、二本の「基本的に相補的」なヌクレオチド配列は、両者の間に少なくとも70%のヌクレオチドが相補的で、好ましくは少なくとも80%のヌクレオチドが相補的で、より好ましくは少なくとも90%のヌクレオチドが相補的で、さらに少なくとも95%のヌクレオチドが相補的で、たとえば98%、99%または100%である。一般的に、二本の十分に相補的な分

50

子の中に多くとも40個のマッチしないヌクレオチドを有し、好ましくは多くとも30個のマッチしないヌクレオチドを有し、より好ましくは多くとも20個のマッチしないヌクレオチドを有し、さらに好ましくは多くとも10個のマッチしないヌクレオチドを有し、たとえば1、2、3、4、5、8個のマッチしないヌクレオチドを有する。

【0032】

ここで用いられるように、「ステム・ループ」構造は、「ヘアピン」構造とも呼ばれ、ヌクレオチド分子で、二本鎖領域（ステム部）を含む二次構造が形成し、前記の二本鎖領域は当該ヌクレオチド分子の2つの領域（同一の分子にある）から形成し、2つの領域はそれぞれ二本鎖部分の両側にある。また、少なくとも一つの「ループ」構造を含み、相補的ではないヌクレオチド分子、すなわち一本鎖領域を含む。当該ヌクレオチド分子の2つの領域が不完全相補でも、ヌクレオチドの二本鎖部分も二本鎖の状態を保つことができる。たとえば、挿入、欠失、置換などによって一つの小さい領域が相補的ではなくなり、あるいはその小さい領域自身がステム・ループ構造またはほかの様態の二次構造になるが、その2つの領域は基本的に相補的で、かつ予想可能な様態で相互作用し、ステム・ループ構造の二本鎖領域を形成する。ステム・ループ構造は、当業者に熟知のもので、通常、一次構造のヌクレオチド配列の核酸を得ると、当業者は当該核酸がステム・ループ構造になれるかわかる。

【0033】

本発明に係るmiRNAは、配列番号1~3で示される配列または配列番号4で示されるコア配列を有する。miRNAの安定性またはほかの性質を上げるために、前記のmiRNAの少なくとも一方の末端に少なくとも一つの保護性塩基、たとえば「TT」などを付加することができる。

【0034】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明によって提供されるmiRNA配列に基づき、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドは体内で対応のmiRNAの発現を下方調節する。ここで用いられるように、「アンチセンスオリゴヌクレオチド（antisense-oligonucleotides、AS-OnまたはASO）」は、「アンチセンスヌクレオチド」とも呼ばれ、長さが約18~26 nt（特に約19~22 nt）のDNA分子またはRNA分子またはその類似体を指す。

【0035】

本発明において、前記の「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、さらに、たとえばロックド核酸または核酸鎖骨格修飾技術などの手段によって修飾されたアンチセンスヌクレオチドも含み、前記の修飾はアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性をほとんど変えず、好ましくは、前記修飾はアンチセンスオリゴヌクレオチドの安定性、活性または治療効果を向上させる。ロックド核酸（locked nucleic acid、LNA）とは、通常、メチレンブリッジによってリボースの2'-酸素原子と4'-炭素原子を連結する修飾技術である。LNAは、miRNAの血清半減期を延し、標的に対する親和性を向上させ、標的外れの範囲と程度を減少する。核酸鎖骨格に基づいた修飾技術によって発展したアンチセンス薬物は、可溶性、抗リボヌクレアーゼ分解などの面で大幅に改善され、かつ大量の合成も容易である。オリゴヌクレオチドの骨格修飾方法は様々で、たとえばデオキシヌクレオチド鎖に対して硫黄化修飾を行って硫黄化デオキシヌクレオチド鎖にするという硫黄化法を含む。

【0036】

当該方法は、DNA骨格におけるりん酸結合の酸素原子を硫黄原子で置換し、リボヌクレアーゼによる分解に耐えることができる。もちろん、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドのほとんどまたは全部の活性を保つ修飾はいずれも本発明に含まれる。

本発明の好適な様態として、アンチセンスオリゴヌクレオチドに対してロックド核酸修飾を行い、好ましくはさらに硫黄化修飾を行う。

本発明に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドを動物（たとえばトリインフルエンザ患者）の体内に導入すると、関連miRNAの発現を顕著に下方調節する。

【0037】

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチド構築物

本発明によって提供されるmiRNA配列に基づき、導入された後加工されて相応のmRNAの発現に影響するmiRNAになるようなポリヌクレオチド構築物を設計することができ、すなわち、前記ポリヌクレオチド構築物は体内で相応のmiRNAの量を上方調節することができる。そのため、本発明は、単離されたポリヌクレオチド（構築物）であって、ヒト細胞によって前駆体miRNAに転写され、前記の前駆体miRNAがヒト細胞内によって切断され、かつ前記のmiRNAとして発現される、ポリヌクレオチドを提供する。

【0038】

本発明の一つの好適な様態として、前記ポリヌクレオチド構築物は、式Iで表される構造を有し、

Seqフォワード-X-Seqリバーズ 式I

（式Iにおいて、

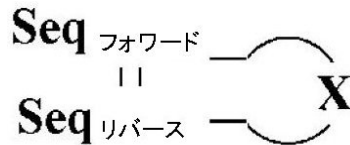
Seqフォワードは、細胞において前記のmiRNAとして発現されるヌクレオチド配列で、Seqリバーズは、Seqフォワードに基本的に相補的なヌクレオチド配列である。あるいは、Seqリバーズは、細胞において前記のmiRNAとして発現されるヌクレオチド配列で、Seqフォワードは、Seqフォワードに基本的に相補的なヌクレオチド配列である。

Xは、SeqフォワードとSeqリバーズの間にあるスペーサー配列で、かつ前記ペーサー配列はSeqフォワードおよびSeqリバーズに相補的なものではない。）

【0039】

式Iで表される構造は、細胞に導入された後、式IIで表される二次構造になる。

【数2】



式II

（式IIにおいて、Seqフォワード、SeqリバーズおよびXの定義は前記通りである。

|| は、SeqフォワードとSeqリバーズの間形成された相補的塩基の対合関係を表す。

）

通常、前記のポリヌクレオチド構築物は、発現ベクターにある。そのため、本発明は、さらに、前記のmiRNA、または前記ポリヌクレオチド構築物を含むベクターを含む。前記の発現ベクターは、通常、さらにプロモーター、複製起点および/またはマーカー遺伝子などを含む。当業者に熟知の方法は、本発明に必要な発現ベクターの構築に使用することができる。これらの方法は、体外組換えDNA技術、DNA合成技術、体内組換え技術などを含む。

前記の発現ベクターは、好ましくは1つまたは2つ以上の選択性マーカー遺伝子を含み、形質転換された宿主細胞を選択するための形質、たとえばカナマイシン、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、アンピシリン耐性を提供する。

【0040】

検出試薬、検出チップおよび検出キット

また、本発明は、トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出するキットであって、本発明の検出試薬、または検出チップを含むキットを提供する。前記のキットは、本発明のトリインフルエンザの特異的なmiRNAの発現プロファイルの検出、あるいはトリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザの検出に使用することができ、好ましくは、前記のキットは、さらに、RNAサンプルを標識するための標識物、および前記標識物に相応する基質を含む。

また、前記のキットは、さらに、RNAの抽出、PCR、ハイブリダイゼーション、呈色などに必要な様々な試薬を含んでもよく、抽出液、増幅液、ハイブリダイゼーション液、酵素、コントロール液、呈色液、洗浄液、抗体などを含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

また、前記のキットは、さらに、使用説明書および/またはチップ画像分析ソフトを含んでもよい。

【0041】

チップ

microRNAの発現プロファイルチップは、通常、百、千またはそれ以上のプローブを含み、複数種類のmicroRNAに関し、二本鎖の相同対合の原理で標本に含まれる各種のmicroRNAの含有量を検出する。そのため、一回で標本におけるmicroRNAの転写レベルを測定することができる。

本発明に係るmiRNA配列では、相応のmiRNAチップを製造し、さらにその発現プロファイルおよびmiRNAの調節方式を研究することができる。

10

一方、本発明は、さらに、miRNAの発現プロファイルを分析するためのチップであって、トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザの検出に使用できるチップを提供する。

【0042】

本発明に係るmiRNAチップは、固相担体と、前記固相担体に規則正しく固定化されたオリゴヌクレオチドプローブとを含み、前記のオリゴヌクレオチドプローブは配列番号1~4で示される配列に対する核酸配列を含む。

具体的に、本発明に係るmiRNAに基づき、適切なプローブを設計し、固相担体に固定化し、「オリゴヌクレオチドアレイ」を形成することができる。前記の「オリゴヌクレオチドアレイ」とは、アドレス指定可能な位置（すなわち区別可能なアクセスできるアドレスを特徴とする位置）を有するアレイで、各アドレス指定可能な位置はいずれもそれに連結する特徴的なオリゴヌクレオチドを1つ含む。必要により、オリゴヌクレオチドアレイをいくつかのサブアレイに分けてもよい。

20

【0043】

前記固相担体は、遺伝子チップの分野における様々な汎用の材料、たとえばナイロン膜、活性基（たとえばアルデヒド基、アミノ基など）で修飾されたガラスシートまたはシリコンシート、未修飾のガラスシート、プラスチックシートなどを使用してもよいが、これらに限定されない。

前記のmiRNAチップの製造は、本分野で既知のバイオチップの通常の製造方法を使用してもよい。たとえば、固相担体を修飾されたガラスシートまたはシリコンシートとする場合、プローブの5'末端にアミノ基で修飾されたポリdT鎖が含まれ、オリゴヌクレオチドプローブを溶液とした後、スポットターでそれを修飾されたガラスシートまたはシリコンシートにスポットし、所定の配列またはアレイに並べた後、一晩置いて固定化させることで、本発明のmiRNAチップが得られる。

30

【0044】

本発明に係るRNAとmiRNAチップの間の固相ハイブリダイゼーションは、本分野の典型的な方法で行われ、当業者は経験によって緩衝液、プローブおよび標本の濃度、予備ハイブリダイゼーション温度、ハイブリダイゼーション温度および時間などに関する最適な条件を容易に決定することができる。あるいは、「モレキュラー・クローニング：研究室マニュアル」における記載を参照してもよい。

40

その後、標識シグナルのmiRNAチップにおける位置、強度などの情報から測定したい情報を獲得する。増幅産物を蛍光基で標識する場合、直接蛍光検出装置（たとえば共焦点レーザー走査装置Scanarray 3000など）で測定したい情報を獲得してもよい。

【0045】

薬物組成物

また、本発明は、薬学的に許容される担体あるいは有効量の本発明のmiRNA（たとえばmiR-HA-3p）の阻害剤、遮断剤または拮抗剤を含む薬物組成物を提供する。

ここで用いられるように、用語「有効量」または「有効投与量」とは、ヒト及び/又は動物に機能や活性があり、且つヒト及び/又は動物にとって受けられる量である。

ここで用いられるように、「薬学的に許容される」成分は、ヒト及び/又は動物（たと

50

えば哺乳動物や鳥類)に適用する場合、過度の不良な副反応(例えば毒性、刺激とアレルギー反応)がない、すなわち、合理的なベネフィット/リスク比を持つ物質である。用語「薬学的に許容される担体」とは、治療剤の給与のための担体で、各種の賦形剤と希釈剤を含む。

【0046】

本発明は、安全有効量の本発明の活性成分と、薬学的に許容される担体とを含む。このような担体は、食塩水、緩衝液、ブドウ糖、水、グリセリン、エタノール、及びその組合せを含むが、これらに限定されない。通常、薬物製剤は投与形態に応じ、本発明の薬物組成物の剤形は、注射剤、経口投与製剤(錠剤、カプセル、経口投与液)、経皮剤、徐放剤である。例えば生理食塩水或いはグルコースおよび他の助剤を含む水溶液を使用し通常の方法で製造することができる。前記の薬物組成物は、無菌条件で製造することが好ましい。

10

【0047】

本発明に係る活性成分の有効量は、投与の形態と治療しようとする疾患の重篤度などによって変更することができる。好適な有効量の選択は、当業者がいろいろな要素によって決めることができる(例えば臨床試験による)。前記の要素は、前記活性成分の薬物動態学のパラメーター、例えば生物学的利用率、代謝、半減期など、患者の治療しようとする疾患の重篤度、患者の体重、患者の免疫状況、投与の経路などを含むが、これらに限定されない。通常、本発明の活性成分は、毎日0.00001 mg ~ 50 mg/kg動物体重(好ましくは0.0001 mg ~ 10 mg/kg動物体重)の投与量で投与する場合、満足できる効果が得られる。例えば、治療状況の切望によって、毎日数回に分けた投与量、又は比率的に減少する投与量で投与することができる。

20

【0048】

本発明に係る薬学的に許容される担体は、水、塩水、リポソーム、脂質、タンパク質、タンパク質-抗体複合体、ペプチド系物質、セルロース、ナノゲル、またはこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。担体の選択は投与形態に応じ、これらはすべて当業者に熟知のことである。

また、本発明は、トリインフルエンザを治療し、トリインフルエンザの症状を緩和し、宿主動物におけるトリインフルエンザウイルスの数を減少し、トリインフルエンザの死亡率を低下させる薬物の製造、過剰な免疫の減少などに用いられる、前記薬物組成物の使用を提供する。

30

【0049】

本発明の主な利点は以下の通りである。

(a) 本発明は、一種類のトリインフルエンザH5N1ウイルスの特異的なmicroRNA、すなわちmiR-HA-3pを提供する。

(b) 本発明のmiRNAは、トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出するマーカーとして、非常に有効にトリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出することができる。

(c) 本発明のmiRNAは、トリインフルエンザを治療する標的として、本発明のmiRNAに対する阻害剤(または遮断剤)を使用することによって、H5N1ウイルスによる疾患の標的治療を行うこともできる。

40

【0050】

以下、具体的な実施例によって、さらに本発明を説明する。これらの実施例は本発明を説明するために用いられるものだけで、本発明の範囲の制限にはならないと理解されるものである。下述実施例で具体的な条件が示されていない実験方法は、通常、例えばSambrookら、「モレキュラー・クローニング：研究室マニュアル」(ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社、1989)に記載の条件などの通常の場合に、或いは、メーカーのお勧めの条件に従う。特に説明しない限り、百分率および部は重量百分率および重量部である。

【0051】

50

実施例1. H5N1によってコードされるmiRNAの選別および検出

まず、コンピューターモデル構築によって、H5N1によってコードされるmiRを選別した。リアルタイム定量PCRによって選別されたmiRのH5N1に感染された数種類の細胞における発現レベルを検出した。RNAプロット法によってmiR-HA-3pの発現レベルを検証した。

【0052】

1.1 実験方法：

1) . コンピューターモデル構築ソフトによって、構造と類似度に基づき、未知のmiRNA前駆体と既知のmiRNA前駆体を比較する方法で、H5N1インフルエンザウイルスの4種類の亜型(H1N1、H3N2、H5N1およびH9N2)に対して上記比較を行い、18個の候補のH5N1によってコードされる特殊なmiRNA前駆体を得て相応のmiRNAを予測した。18個の候補のmiRNAに対してリアルタイム定量PCRを行うことによってH5N1感染細胞に予測したmiRNAが含まれるか検出し、使用されたRNAサンプルはH5N1に感染されたHEK293A、HEK293T、A549およびMDCK細胞から抽出されたものである。miRNAの発現量の検出は、U6を内部参照遺伝子とした。

10

【0053】

2) . 選別された発現量に顕著な変化があるmiRNAであるmiR-HA-3pに対し、リアルタイム定量PCR法によってそれぞれH5N1の重度感染期および回復期における患者の血清における発現レベルを測定した。

3) . RNAプロット法によって再び標的miRNAのH5N1感染細胞における発現量を検出した。

4) . RNAプロット法によってmiR-HA-3pが特定のH5N1インフルエンザウイルスだけに存在するものではないことが証明され、本発明者はH5N1に感染されたA549細胞の小さいRNA断片(<200 nt)を抽出し、これらの断片でmiR-HA-3pに相応するプローブとハイブリダイゼーションした。

20

【0054】

1.2 実験結果：

具体的な結果は図1に示す。

1) . 図1Aは、予測されたH5N1のmiRNA前駆体のステム・ループ構造の二次構造を示す。予測はMfoldで行われ、予測された成熟miRNAの5'末端と3'末端はそれぞれ赤と青で示した。図1Aの結果から、3つの予測された前駆体のうち、一つはHA断片によってコードされ、ほかの二つはPA断片によってコードされることがわかる。各候補miRNAはいずれも特異的な安定したヘアピン構造にフォルディングすることができる。

30

【0055】

図1Bは、18種類の候補miRNAのH5N1ウイルスが4種類の細胞に侵入した後の発現レベルを示し、図1Bから、miR-HA-3pとmiR-PA1-3pの2種類のmiRNAが感染24時間後の細胞に安定して検出され、ほかの16種類のmiRNAの発現量が低かったことがわかる。

ここで、miR-HA-3pは、以下の3種類の具体的な配列がある。

miR-HA-3p-1: AGGACUAAUUUGGAGCUAUAGCA (配列番号1)

miR-HA-3p-2: GGACUAAUUUGGAGCUAUAGCAG (配列番号2)

miR-HA-3p-3: GAGGACUAAUUUGGAGCUAUAGC (配列番号3)

上記3種類のmiRNAのコア配列は、GGACUAAUUUGGAGCUAUAGC(配列番号4)である。

40

【0056】

図1Cは、ウイルス感染後の異なる時点におけるmiR-HA-3pとmiR-PA1-3pの発現レベルの測定結果を示し、図1Cから、miR-HA-3pとmiR-PA1-3pの2種類のmiRNAのH5N1に感染されたA549細胞における異なる時点での発現量は感染の過程で次第に増加し、かつmiR-HA-3pの発現量は感染後の各時点でいずれもmiR-PA1-3pの発現量よりも高かったことがわかる。

【0057】

2) . 図1Dは、回復期の患者の血清におけるmiR-HA-3pの絶対値を示し、図1Dから、重度感染期(acute)の患者の血清におけるmiR-HA-3pの発現量が高かったが、ウイルス感染が減退した後、miR-HA-3pはほとんど検出されなかったことがわかる。

3) . 図1Eは、RNAプロット法によって分析されたA549細胞を複合感染して24時間後のmi

50

R-HA-3pとmiR-PA1-3pの発現レベルを示し、一番左はマーカーである。図1Eから～80-nt miR-HA-3p前駆体miRNAと22-nt成熟miR-HA-3pはH5N1に感染されたA549細胞に迅速に検出することができたことがわかる。～100-nt前駆体miR-PA1-3p RNAも検出できたが、成熟のmiR-PA1-3pが検出されなかった。RNAプロット法の結果はリアルタイム定量PCRの結果と一致する。

【0058】

4) . 図1Fは、RNAプロット法によってそれぞれ測定された2種類の菌種がA549細胞に感染した後のmiR-HA-3pの発現レベルを示す。図1Fの結果から、2種類のH5N1 IAV単離株は宿主に感染した後いずれもmiR-HA-3pを生成したことがわかる。

上記多群実験の結果によって、H5N1が宿主細胞に感染した後、特殊な小分子のmiR-HA-3pを放出し、それが宿主の体内循環に入り、かつmiR-HA-3pの発現量とウイルスの感染程度が正相関することが証明された。

【0059】

実施例2. miR-HA-3p標的サイトの予測および検証

本実施例において、miR-HA-3pの標的サイトを予測・検証した。マウスとヒトのPCBP2突然変異株を構築し、ルシフェラーゼ活性を検出することによってPCBP2とmiR-HA-3p量の関係を検出した。ウェスタンブロッティングによって標的遺伝子に相応するタンパク質の発現量とmiR-HA-3p量の関係を検出した。

【0060】

2.1 実験方法：

1) . コンピューターモデル構築方法によってmiR-HA-3pの標的サイトを予測した。

2) . miR-HA-3pがPCBP2の発現を調節するか検出するため、それぞれマウスとヒトのPCBP2突然変異株を構築した後、agomir-HA-3p(miR-HA-3p作動剤)とagomir-HA-3p(M)(突然変異のmiR-HA-3p作動剤)でそれぞれPCBP2野生型と突然変異株を処理した。ルシフェラーゼ活性を検出することによってPCBP2とmiR-HA-3p量の関係を検出した。ウェスタンブロッティングによって標的遺伝子に相応するタンパク質の発現量とmiR-HA-3p量の関係を検出した。

【0061】

3) . PCBP2タンパク質の発現量の下方調節がmiR-HA-3pによるものであることを確認するため、ウェスタンブロッティングによってmiR-HA-3pを含有するA549細胞におけるPCBP2タンパク質の含有量を検出した。コントロールとして、PCBP2遺伝子を沈黙させることができるRNAi系を構築した。

4) . miR-HA-3pがPCBP2を標的とする直接の証拠を得るため、本発明者はさらにRNAがタンパク質と結合する免疫沈殿実験を行うことによってPCBP2のmRNAとAgo2の複合体を検出し、当該複合体はRNAが誘導する沈黙複合体で、miR-16をコントロールとした。

【0062】

2.2 実験結果：

具体的な結果は図2に示す。

1) . 図2Aは、miR-HA-3pとヒトおよびマウスのPCBP2のmRNAの3'末端の結合サイトを示し、図2Aから、予測によってPCBP2のmRNAがmiR-HA-3pの一つの潜在的な標的サイトであることが見出されたことがわかる。

2) . 図2BはヒトPCBP2遺伝子の野生型と突然変異型でトランスフェクトされたHEK293T細胞がそれぞれagomir、agomir-HA-3p、agomir-HA-3p(M)で処理された後のルシフェラーゼ活性を示す。図2Bから、ヒトモデルにおいてagomir-HA-3pが野生型PCBP2の発現量を顕著に下方調節することができたが、agomir-HA-3p(M)は上記作用がなかったことがわかる。

【0063】

図2CはマウスPCBP2遺伝子の野生型と突然変異型で感染されたHEK293T細胞がそれぞれagomir、agomir-HA-3p、agomir-HA-3p(M)で処理された後のルシフェラーゼ活性を示す。図2Cから、マウスモデルにおいてagomir-HA-3pが野生型PCBP2の発現量を顕著に下方調節したが、agomir-HA-3p(M)は上記作用がなかったことがわかる。

3) . 図2Dはagomir、agomir-HA-3p、agomir-HA-3p(M)で処理されたA549細胞のPCBP2タンパク質レベルのウェスタンブロッティング分析の結果を示す。図2Dの結果から、A549細胞がagomir-HA-3pにトランスフェクトされた後、PCBP2の発現が顕著に抑制されたが、agomir-HA-3p(M)でトランスフェクトされた細胞のPCBP2の発現に顕著な変化がなかったことがわかる。

図2Eはagomir、agomir-HA-3p、agomir-HA-3p(M)でA549細胞を処理した後のPCBP2のmRNAの発現レベルを示す。

【 0 0 6 4 】

4) . 図2Fはagomir、agomir-HA-3p、agomir-HA-3p(M)でA549細胞を処理した後の免疫沈殿反応で得られたPCBP2のmRNAのリアルタイム定量PCRの測定結果を示す。コントロールの結果は、agomirでA549細胞を処理した後IgGで免疫沈殿を行った結果である。図2Fの結果から、agomir-HA-3pでトランスフェクトしたA549細胞は、miR-HA-3pが過剰発現がされた時、PCBP2のmRNAとAgo2の複合体が20倍近く増加したことがわかり、miR-HA-3pとPCBP2のmRNAはRNAが誘導した沈黙複合体で反応し、かつPCBP2タンパク質の転写後のレベルを調節することが示された。予想と一致したのは、agomir-HA-3pを除いた実験群では、PCBP2のmRNAとAgo2の複合体の増加が現れなかったことである。

【 0 0 6 5 】

以上の結果から、miR-HA-3pが直接PCBP2のmRNAの3'末端に作用したことがわかり、miR-HA-3pが翻訳を抑制する面で作用を發揮することが示された。PCBP2は、核タンパク質Eファミリーに属し、MAVが仲介する抗ウイルス作用に關与する。H5N1は、PCBP2を沈黙させてMAVが仲介する抗ウイルス過程を増強することで、H5N1の侵入過程で過剰な免疫応答またはサイトカインストームを引き起こす。

【 0 0 6 6 】

実施例3. マクロファージモデルによるmiR-HA-3pのH5N1感染過程におけるサイトカインの分泌に対する調節の実証

miR-HA-3pのサイトカインに対する影響を検証するため、本実施例において、ヒトマクロファージを体外モデルとして以下のような実験を行った。

【 0 0 6 7 】

3.1. 実験方法 :

1) . agomir、agomir-HA-3pおよびagomir-HA-3p(M)でそれぞれ分化したマクロファージを処理し、トランスフェクションの24時間後リアルタイム定量PCR法によって細胞内のmiR-HA-3pのレベルを検出した。

2) . ウイルス感染過程におけるmiR-HA-3pの標的タンパク質の発現量に対する影響を検出するため、本発明者は逆遺伝学を利用して一つのH5N1ウイルス突然変異株を構築した。突然変異株の体外での複製効果を検出するため、本発明者は野生型と突然変異株の2種類のウイルスでマクロファージに対して複合感染を行った。48時間後、ウイルス力価測定実験によってウイルスの力価を検出した。

【 0 0 6 8 】

3) . 野生型H5N1と突然変異株H5N1でマクロファージを感染させた後の細胞内のmiR-HA-3pの発現レベルを検出した。

4) . ウイルス感染前に、本発明者はそれぞれantagomir-HA-3p(miR-HA-3p遮断剤)とantagomir(miR遮断剤)でマクロファージを処理した。その後、ウイルス感染から24、48時間後の各処理群のPCBP2の発現レベルを検出した。

5) . 感染後いくつかの時点で各処理群におけるTNF- α 、IL-6およびほかのサイトカイン、たとえばIFN- γ 、IL-1 β の転写レベルを検出した。

6) . 感染後いくつかの時点で各処理群のマクロファージの培養物の上清液におけるTNF- α 、IFN- γ およびIL-6の含有量を検出した。

【 0 0 6 9 】

3.2 実験結果 :

具体的な結果は図3、図4、図5に示す。

1) . 図4Aはagomir-HA-3p突然変異配列とH5N1突然変異株の突然変異点の原理の概略図を示す。

図4Bは、エレクトロポレーションから24時間後のagomir、agomir-HA-3pまたはagomir-HA-3p(M)で処理されたマクロファージにおけるmiR-HA-3pの発現レベルを示す。図4Bの結果から、トランスフェクションから24時間後、agomir-HA-3p処理群のmiR-HA-3p含有量が顕著に上がり、agomirまたはagomir-HA-3p(M)処理群の細胞内のmiR-HA-3pのレベルが安定したことがわかる。

【 0 0 7 0 】

図4Cは、エレクトロポレーションから48時間後のagomir、agomir-HA-3pまたはagomir-HA-3p(M)で処理されたマクロファージにおけるPCBP2タンパク質のレベルを示す。図4Cから、PCBP2タンパク質の発現量は、agomir-HA-3p処理群がagomirまたはagomir-HA-3p(M)処理群よりも顕著に低い。

図4Dは、エレクトロポレーションから48時間後のagomir、agomir-HA-3pまたはagomir-HA-3p(M)で処理されたマクロファージにおけるPCBP2のmRNAの発現レベルを示す。図4Dの結果から、3つの処理群のPCBP2のmRNAレベルはいずれも顕著な変化がなかったことがわかる。

【 0 0 7 1 】

2) . 図4EはH5N1(野生型)またはH5N1突然変異株に感染されたマクロファージの感染から48時間後の力価を示す。結果から、野生型H5N1と突然変異株H5N1の力価は大きな差異がなかったことがわかる。

3) . 図3AはH5N1と突然変異株に感染されたマクロファージの感染後異なる時点におけるmiR-HA-3pの発現レベルを示す。図3Aの結果から、野生型H5N1ウイルスに感染されたマクロファージの24時間後のmiR-HA-3pの発現レベルが比較的が高く、突然変異株に感染されたマクロファージにおけるmiR-HA-3pは基本的にかわらないことがわかる。

【 0 0 7 2 】

4) . 図3Bはまずantagomirまたはantagomir-HA-3pで処理した後、H5N1に感染されたマクロファージの感染後異なる時点のPCBP2タンパク質のレベルの分析結果を示す。図3Bから、ウイルス感染から24時間と48時間後、antagomir-HA-3p処理群のPCBP2タンパク質のレベルがantagomir処理群よりも顕著に高かったことがわかる。

図3CはTCID50法によって測定されたH5N1に感染された細胞の感染後異なる時点における力価を示す。

5) . 図3D~Fは異なる処理群でそれぞれH5N1またはH5N1突然変異株を処理した後、細胞上清液におけるTNF- α 、IFN- γ およびIL6のレベルを示す。図3D~Fから、antagomir-HA-3p処理群では、サイトカインの濃度がantagomir処理群よりも低かったことがわかる。実際に、antagomir-HA-3p処理群のマクロファージ培養物の上清液におけるTNF- α 、IFN- γ およびIL-6の含有量は突然変異株に感染されたマクロファージの相応のサイトカインの含有量に相当する。

【 0 0 7 3 】

6) . 図5は、H5N1またはH5N1突然変異株に感染されたマクロファージの異なる処理条件におけるTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β またはIL-6のmRNAの発現レベルを示す。図5の結果から、antagomir-HA-3p処理群のTNF- α の転写レベルが下がり、antagomir-HA-3p処理群では、感染から24時間後、IL-6のmRNAのマクロファージにおける含有量はantagomir処理群の60%程度であったことがわかる。ほかのサイトカイン、たとえばIFN- γ 、IL-1 β においても、類似の現象が検出された。

【 0 0 7 4 】

以上の実験結果から、普通のインフルエンザ患者と比べ、H5N1ウイルスに感染された患者の血清におけるサイトカインとケモカインのレベルが顕著に高かったことがわかる。本実験では、H5N1ウイルスが生成するmiR-HA-3pは感染過程でRIG-Iシグナル系に対して調節作用があり、サイトカインの生成を促進することが実証された。PCBP2がRIG-Iシグナル系で重要な調節作用があるため、miR-HA-3pはPCBP2に作用することによって機能を発揮する

。

【 0 0 7 5 】

実施例4. マウスモデルによるmiR-HA-3pとH5N1の感染程度の正相関の実証

本実施例において、構築したマウスモデルでmiR-HA-3pの体内H5N1感染によるサイトカインの調節異常における作用を検出した。主にリアルタイム定量PCR法、組織学的検出法、ELISAおよびウイルス力価測定法を使用し、方法は以下の通りである。

【 0 0 7 6 】

4.1 実験方法：

1) . 雌BALB/cマウスの鼻内にそれぞれ致死投与量のH5N1(野生型)とH5N1突然変異株を接種した後、その体重、致死率、ウイルスの複製状況およびサイトカイン重合体を検出した。ウイルス侵入から8時間後、H5N1とH5N1突然変異株を接種した2群のマウスは、各群はまた2つのグループに分け、5日連続でそれぞれmiR-HA-3p遮断剤とmiR遮断剤を注射した。

10

【 0 0 7 7 】

2) . さらに各処理群のマウスの肺ホモジネートの力価を測定した。実験群は合計7群で、6つの処理群はH5N1、H5N1(MUT)、H5N1+control antagomir、H5N1(MUT) +control antagomir、H5N1+ antagomir-HA-3p、H5N1(MUT) + antagomir-HA-3pで、コントロール群はPBS処理群である。

3) . 7つの実験群のマウスに対して組織学的検査を行った。

4) . ウイルスの感染過程で生成するサイトカインがmiR-HA-3pと関係するか確認するため、感染後いくつかの時点で7つの実験群に対してTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β およびIL-6の4種類のサイトカインの濃度を測定した。

20

【 0 0 7 8 】

4.2 実験結果：

実験方法1における具体的な結果は図6に示す。

図6 (A、B) はH5N1または突然変異株を接種したマウスの異なる処理条件における死亡率を示す。図6 (C、D) はH5N1または突然変異株を接種したマウスの異なる処理条件における体重減少程度を示す。

図6 (E~H) はELISAによって測定されたH5N1または突然変異株を接種したマウスの異なる処理条件における肺部の4種類のサイトカイン (TNF- α (E)、IFN- γ (F)、IL-1 β (G) およびIL-6 (H)) のレベルを示す。

30

【 0 0 7 9 】

具体的な結果と分析は以下の通りである。

1) . 図6Aは、接種から7日後、H5N1処理群ではマウスの死亡率が100%であったことを示し、図6Cは、H5N1処理群ではマウスは20%以上の体重減少があったことを示す。(H5N1+control antagomir)処理群では、マウスの死亡率と体重減少がH5N1処理群に相当したが、(H5N1+ antagomir-HA-3p)処理群では、マウスは7日後ある程度の体重減少があったが、死亡率が10%程度だけであった。図6Aと図6Cは、H5N1(MUT)処理群では、マウスの生存時間がH5N1処理群よりも長く、体重減少速度が遅かったことを示す。図6Bは、H5N1(MUT)処理群では、マウスはmir-HA-3p作動剤の注射を継続した後、生存率が顕著に低下したことを示し、図6Dは、H5N1(MUT)処理群では、マウスはmir-HA-3p作動剤の注射を継続した後、体重減少速度が早くなったことを示し、予想と一致したのは、図6Bでは、H5N1(MUT)処理群のマウスはmiR作動剤の注射を継続した後、生存率と体重はいずれも顕著な変化がなかったことである。

40

【 0 0 8 0 】

2) . 図6E~Hから、H5N1処理群では、4種類のサイトカインの濃度がいずれも突然変異株処理群および(miR-HA-3p遮断剤+H5N1)処理群よりも高かったことがわかる。これは、前記のマクロファージモデルにおけるサイトカインの検出結果と一致する。

3) . 図7は、異なる処理条件における4日後のマウス肺部のPCBP2タンパク質のレベルを示す。図7の結果から、4日後、H5N1処理群では、マウスの肺部のPCBP2タンパク質の含有量が(H5N1+miR-HA-3p遮断剤)処理群およびH5N1(MUT)よりも低かったことがわかる。

50

4) . 図8は、組織病理学的方法による多群実験のマウス肺部組織の研究結果を示す。図8の検出結果から、miR-HA-3pを遮断すると、マウスの肺部の炎症損傷を緩和することができたことがわかる。H5N1処理群では、マウスは重度の気管支上皮細胞の壊死があり、かつ炎症反応が伴った。一方、(mir-HA-3p遮断剤+H5N1)処理群およびH5N1(MUT)処理群では、マウスは感染から4日後炎症反応が適度であった。

以上の実験結果から、mir-HA-3p遮断剤でmir-HA-3pと標的mRNAの結合を遮断することによって、H5N1感染マウスの死亡率を低下させ、かつ感染マウスの体重減少速度を緩和することができることが示された。この結論は、H5N1(MUT)処理群でも実証された。

【0081】

結論：

本発明の実験結果によって、H5N1が宿主細胞に感染した後、特殊な小分子物質のmiR-HA-3pを放出し、それが宿主の体内循環に入り、かつmiR-HA-3pの発現量とウイルスの感染程度が正相関することが実証された。

また、miR-HA-3pの標的遺伝子がPCBP2で、miR-HA-3pがPCBP2のmRNAに作用することによってPCBP2タンパク質の発現を下方調節し、MAVが仲介する抗ウイルス過程の強化につながり、よってH5N1の侵入過程において過剰な免疫応答またはサイトカインストームを引き起こすことが見出された。

miR-HA-3pを遮断すると、miR-HA-3pの発現レベルを調節する目的を実現することで、H5N1ウイルスによる多くの免疫反応および組織学的病変を緩和・治療することができ、現在のH5N1の研究に基づいて新しい科学と技術の突破を完成し、H5N1の理論研究を新たな高さに上げた。

【0082】

本発明では、創造的にmicroRNA療法をH5N1の治療に導入し、一連のオリジナルな試験方法、たとえばmicroRNAの予測と同定、マクロファージ試験、マウスモデル試験などによってH5N1の特異的なmiRNAの存在を実証し、このような療法は、特異性が高く、効率的で、副作用が小さく、コストが低く、本発明は方法上の創新によって応用の将来性が十分にある。

上記に基づき、本発明はさらにこのような特異的なmiRNA前駆体が数株のH5N1ウイルス単離株に存在することを実証し、これはH5N1ウイルスの変異種にもこのようなmiRNAが安定して存在することを示し、既存のワクチンはH5N1を予防する目的だけが果たせるが、H5N1ウイルスの変異が早く、ワクチンの開発速度は間に合わない。本発明では、miR-HA-3p遮断剤を利用してH5N1ウイルスによる疾患の標的治療を行う方法は、創造的な方法で、人類のH5N1ウイルスおよびその突然変異株への対抗に新しい考え方、新しい方法を提供した。

【0083】

実施例5 トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザのmiRNAの応用

本発明に係るmiRNAの使用は、(a)トリインフルエンザを検出する試薬、検出チップまたはキットの製造、(b)PCBP2の発現または活性を調節する調節剤の製造、(c)サイトカインの発現を調節する試薬の製造に用いられる。

ここで、トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出する核酸チップは、固相担体と、前記固相担体に規則正しく固定化された、特異的に本発明に係るmiRNAを捕獲するオリゴヌクレオチドプローブとを含む。

【0084】

本発明の前記トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出する核酸チップは、ハイスループットで血清における安定して変化するmiRNAプローブを選別すると同時に、血清におけるmiRNAの全体的な変化によって疾患を予測・診断することができる。発明者は、まずシーケンシングの方法または定量PCR方法によって血清におけるコピー数が1個以上のmiRNAを確定した後、これらのmiRNAの逆相補的プローブを合成し、さらにこれらのプローブをチップスポットターSmartArray™で75×25 mmで、化学修飾されたスライドガラスにスポットした。チップにスポットしたサンプルは、さらに、内部標準とする

10

20

30

40

50

U6、tRNA、人工的に製造された塩基長さが30個の外部標準、陽性コントロールHexなどを含む。全アレイは4つのサブアレイに分かれ、各サブアレイは23行、21列で、点間隔が185 μm で、点の直径が約130 μm で、各プローブは3回繰り返した。

【0085】

チップの操作手順は以下の通りである。(1) 血清/血漿における全RNAを抽出し、ホルムアルデヒド変性ゲルの電気泳動で全RNAの質量を検出した。(2) miRNAの単離：50-100 μg 全RNAを取ってAmbion's miRNA Isolation Kit (Cat #. 1560) でmiRNAを単離させた。(3) miRNAサンプルの蛍光標識：T4 RNAリガーゼ標識法で蛍光標識を行った後、さらに無水エタノールで沈殿させ、吹いて乾燥させてからチップハイブリダイゼーションに使用した。(4) ハイブリダイゼーションと洗浄：RNAを16 μL のハイブリダイゼーション液(15%ホルムアミド、0.2% SDS、3 \times SSC、50 \times Denhardt's solution)に溶解させ、42 $^{\circ}\text{C}$ で一晩ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションが終わった後、まず42 $^{\circ}\text{C}$ くらいで0.2% SDS、2 \times SSCを含有する液の中で4分間洗浄し、さらに0.2 \times SSC液の中で室温で4分間洗浄し、スライドガラスを振って乾燥した後、スキャンに使用した。(5) チップスキャン：チップをLuxScan 10K/A二チャンネルレーザースキャナーでスキャンした。(6) データの採取および分析：LuxScan3.0画像分析ソフトでチップの画像を分析し、画像の信号をデジタル信号に変換し、最後にSAMで分析して発現変動遺伝子を選択した。

【0086】

定量PCR技術とバイオチップ技術で二重検証されたトリインフルエンザウイルス感染と正常の生理状態における発現変動の大きな血清/血漿miRNAプローブ、たとえばmiR-HA-3pは、バイオチップの製造に用いられ、方法は上記と同様である。このチップは、従来のチップと比べ、製作プロセスと操作手順は大きく変わらないが、このチップはプローブライブラリーが簡略化されるため、チップの製作コストと生産時間が大幅に減少し、製造が容易である。同時に、チップの特異性と実用性も増加する。このチップを実践に投入すると、ほかの組織がなくても、患者の血清/血漿だけあれば、疾患を早期に発見することができ、診断と治療の指導に役立つ。

さらに、本発明に係る核酸チップの使用は、トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出するキットの製造に用いられる。トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザを検出するキットは、本発明に係る核酸チップまたは本発明に係るmiRNAを含む。

トリインフルエンザウイルス感染の診断、治療効果の評価、および薬物の活性成分の選別、薬物の効果の評価に用いられるmiRNAキットの製作プロセスと操作手順は、定量および半定量的PCR技術とバイオチップ技術に基づくものである。

【0087】

まず、シーケンシングの方法またはPCR法によって正常の血清/血漿にコピー数が1個以上のmiRNAを確定した。そして、定量PCR技術とバイオチップ技術で疾患と正常の生理状態における発現量および差異の大きな血清/血漿miRNA、たとえばmiR-HA-3pを選別し、トリインフルエンザウイルス感染の有無の予測および病変の程度の診断の指標とした。最後に、相応の血清/血漿miRNAの数を選別したが、これはチップのプローブライブラリーに基づいて最適な簡略化である。このキットは、血清/血漿miRNAプライマー、Taq酵素、dNTPなどの試薬を含む。このキットの価値は、ほかの組織のサンプルが不要で、必要なのは血清/血漿だけで、最も簡略化したプローブライブラリーでmiRNAの変化傾向を検出し、さらに当該変化傾向からトリインフルエンザ感染の発生の可能性を予測し、またはトリインフルエンザ感染の病理的段階を診断することにある。そのため、このキットを実践に投入すると、トリインフルエンザウイルスまたはトリインフルエンザの早期発見の可能性が増加し、診断と治療の指導に役立つ。

各文献がそれぞれ単独に引用されるように、本発明に係るすべての文献は本出願で参考として引用する。また、本発明の上記の内容を読み終わった後、この分野の技術者が本発明を各種の変動や修正をすることができるが、それらの等価の様態のものは本発明の請求の範囲に含まれることが理解されるはずである。

【 図 1 】

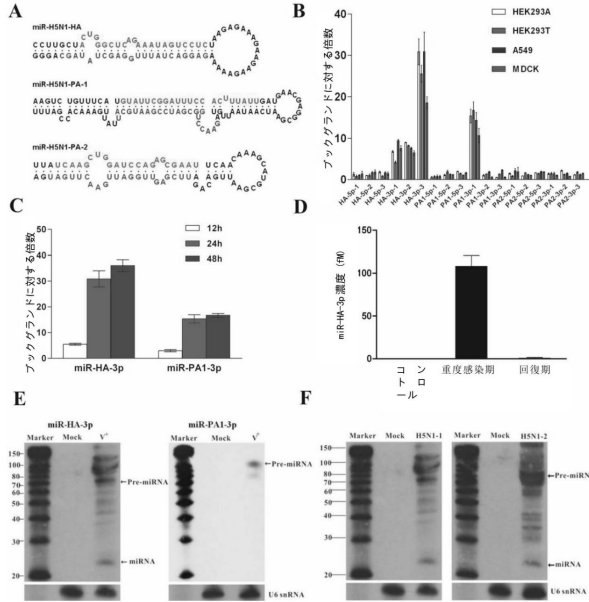


図 1

【 図 2 】

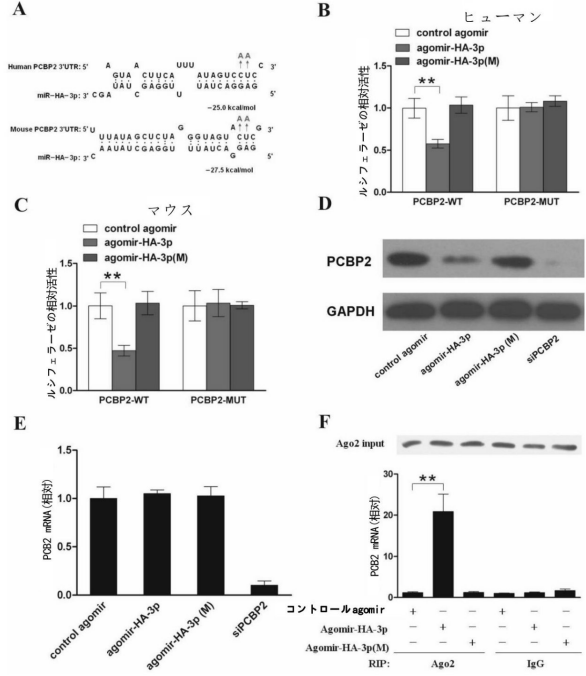


図 2

【 図 3 】

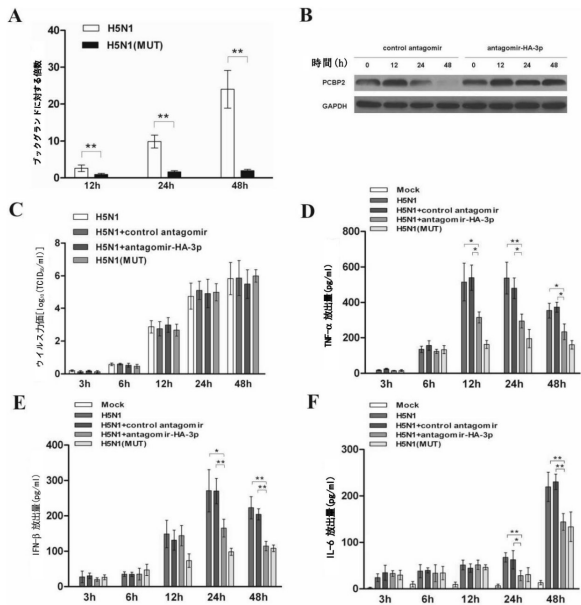


図 3

【 図 4 】

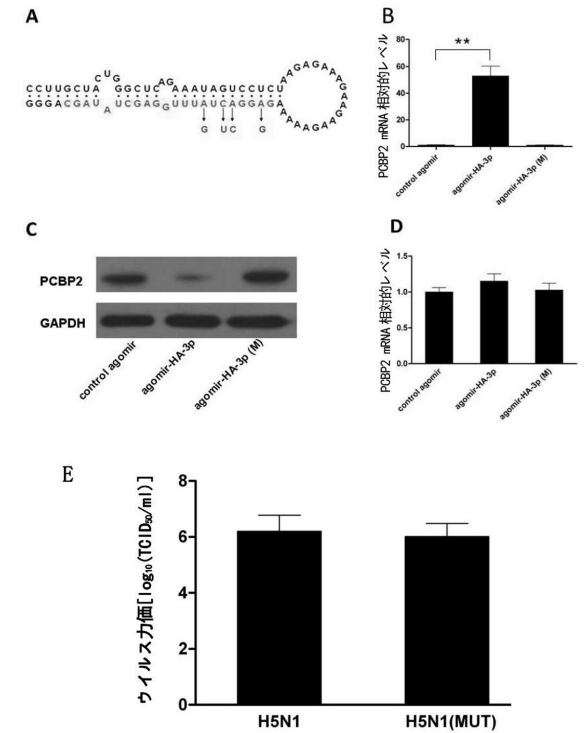


図 4

【 図 5 】

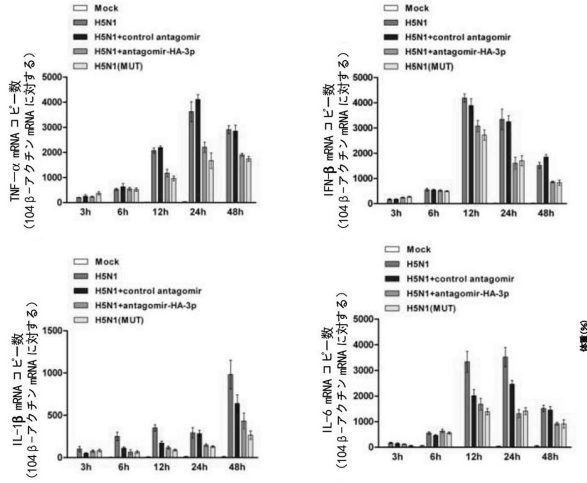


図 5

【 図 6 】

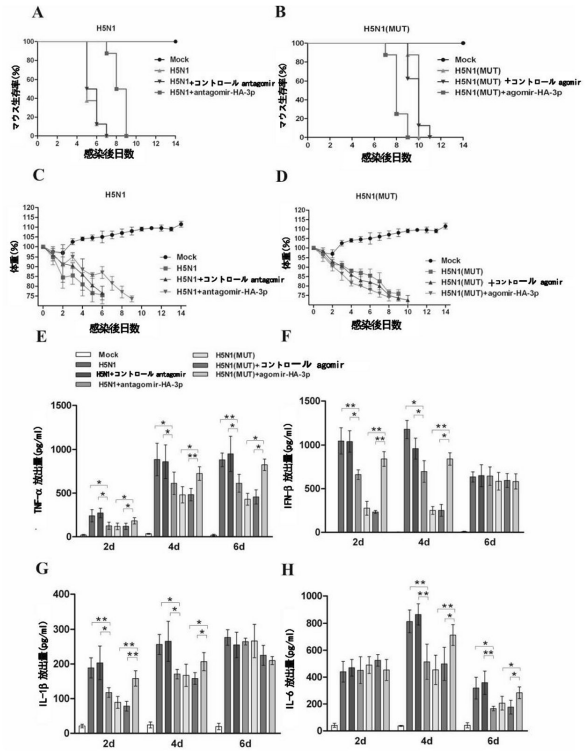


図 6

【 図 7 】

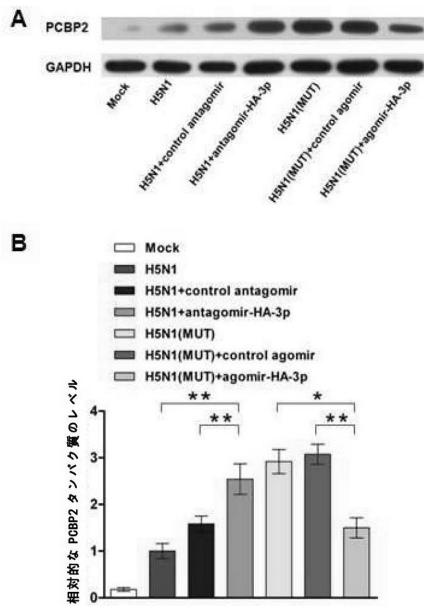


図 7

【 図 8 】

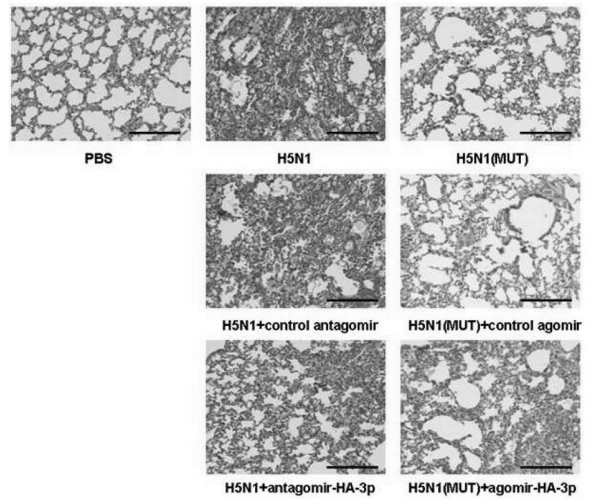


図 8

【配列表】

0006286050000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/569	L

- (72)発明者 ツァン, チェンユウ
中華人民共和国 北京 100006、ドンチェン ディストリクト、ワンフージン アヴェニュー
- ナンバー 138、スン ドン アン プラザ、ビルディング ティー2、ルーム 901
- (72)発明者 ツェン, ケー
中華人民共和国 北京 100006、ドンチェン ディストリクト、ワンフージン アヴェニュー
- ナンバー 138、スン ドン アン プラザ、ビルディング ティー2、ルーム 901
- (72)発明者 ワン, ジン
中華人民共和国 北京 100006、ドンチェン ディストリクト、ワンフージン アヴェニュー
- ナンバー 138、スン ドン アン プラザ、ビルディング ティー2、ルーム 901
- (72)発明者 リー, シーハン
中華人民共和国 北京 100006、ドンチェン ディストリクト、ワンフージン アヴェニュー
- ナンバー 138、スン ドン アン プラザ、ビルディング ティー2、ルーム 901

審査官 厚田 一拓

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0016414 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/REGISTRY
(STN)