(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2016-530232
(P2016-530232A)
(43)公表日　平成28年9月29日(2016.9.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	ZNA	2G045
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00		4B063
A61K 31/7105	(2006.01)	A61K	31/7105		4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4C086
A61P 35/02	(2006.01)	A61P	35/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 41 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-523848 (P2016-523848)
(86)(22)出願日　平成26年6月24日 (2014.6.24)
(85)翻訳文提出日　平成28年1月29日 (2016.1.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/043824
(87)国際公開番号　WO2014/209970
(87)国際公開日　平成26年12月31日 (2014.12.31)
(31)優先権主張番号　61/838,847
(32)優先日　平成25年6月24日 (2013.6.24)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/870,997
(32)優先日　平成25年8月28日 (2013.8.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　515255755
ミルナ　セラピューティクス，インク．
アメリカ合衆国　７８７４４　テキサス州　オースティン　スイート　１００　ウッドワード・ストリート　２１５０
(74)代理人　100082072
弁理士　清原　義博
(72)発明者　ベイダー，アンドレアス
アメリカ合衆国　７８７０１　テキサス州　オースティン　ナンバー２００６　ニュエセス・ストリート　３６０
(72)発明者　ザオ，ジェーン
アメリカ合衆国　７８７４８　テキサス州　オースティン　ボルトン・ストリート　２６２５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＭｉＲ－３４活性のバイオマーカー

(57)【要約】
本発明は、ｍｉＲ－３４がｐ５３に依存しないという発見の一部分に基づく。ｍｉＲ－３４がＴＰ５３に依存しない腫瘍抑制経路において機能することが発見されている。具体的には、ｍｉＲ－３４によって誘導される癌細胞の成長の阻害は、ｐ５３が正常な及びｐ５３欠乏の細胞において同様であることがわかった。したがって、ｍｉＲ－３４は、ｐ５３から離れた腫瘍抑制の間においてより中心的な役割を有する。ｐ５３がない場合には、ｍｉＲ－３４は特定の他のｍｉＲＮＡとは異なり、限定されないが、ｐ２１$^{ＷＡＦ１／ＣＩＰ１}$（ＣＤＫＮ１Ａ）、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２を含む、ｐ５３によって調節されることが知られている遺伝子の上方制御並びにＨＤＡＣ１の下方制御を引き起こすために十分である。したがって、これらのバイオマーカーはｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーとして使用され得る。本発明は、さらに、これらのバイオマーカーの幾つかがｍｉＲ－３４活性への治療反応のために不可欠であり、それゆえにｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーであるという発見に基づく。

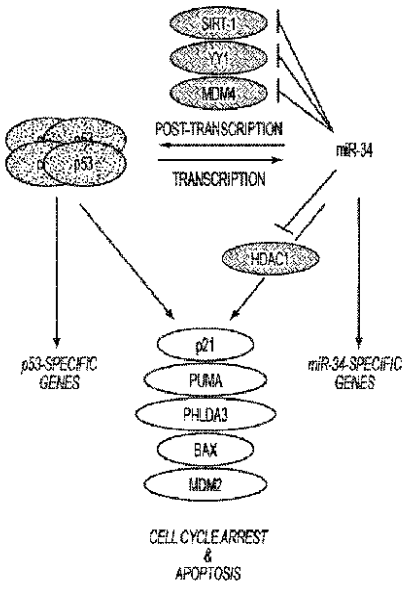


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌を有する被検体を処置する方法であって、前記方法は：
（ａ）ｍｉＲ－３４活性の少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在又は不在について被検体をスクリーニングする工程；
（ｂ）ｍｉＲ－３４活性のための必須のバイオマーカーが存在すると決定される場合に、被検体にｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；及び
（ｃ）ｍｉＲ－３４活性のための必須のバイオマーカーが存在しない場合、被検体に代替療法を施す工程、
を含み、それによって被検体を処置する、方法。
【請求項２】
被検体が、肺癌、膵癌、肝臓の癌、肝細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、前立腺癌、脳腫瘍、胃癌、膀胱癌、食道癌又は結腸癌を有することを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
少なくとも１つの必須のバイオマーカーが、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２及びＨＤＡＣ１からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
少なくとも１つの必須のバイオマーカーが、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を含むことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
被検体をスクリーニングするための単独の必須のバイオマーカーが、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$であることを特徴とする、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
ｍｉＲ－３４が、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－３４ｂ、ｍｉＲ－３４ｃ、ｍｉＲ－４４９ａ、ｍｉＲ－４４９ｂ、又はｍｉＲ－４４９ｃであることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
代替療法が、中断された治療であることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
ｍｉＲ－３４治療薬が、ｍｉＲ－３４を含み、さらに随意にｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２の少なくとも１つを含むことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
代替療法が、非ｍｉＲ－３４マイクロＲＮＡ治療であることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
代替療法が、化学療法、放射線療法及び手術から選択され、されに随意にｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２の少なくとも１つを含むことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
被験体が、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性癌細胞を有すると決定されたことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
被験体が、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性癌細胞及びｐ５３欠乏癌細胞を有すると決定されたことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
被験体が、機能的なｐ５３タンパク質を欠失している癌細胞を有すると決定されたことを特徴とする、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】

被験体が、野性型又はヘテロ接合性のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$遺伝子を有する癌細胞を有すると決定されたことを特徴とする、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
被験体が、ｐ５３欠乏癌細胞を有すると決定され、被験体が、ｐ２１$^{ＷＡＦ１／ＣＩＰ１}$の有無についてスクリーニングされ、ｐ２１$^{ＷＡＦ１／ＣＩＰ１}$が存在すると決定される場合、ｍｉＲ－３４治療薬が被験体に投与され、ｐ２１$^{ＷＡＦ１／ＣＩＰ１}$が存在しないと決定される場合、ｍｉＲ－３４治療薬が中断されることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
ｍｉＲ－３４治療薬で処置されている被検体の癌治療に対する反応を決定する方法であって、前記方法は：
（ａ）被検体のｍｉＲ－３４活性の少なくとも１つのバイオマーカーの第１のレベルを測定する工程；
（ｂ）被検体にｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；
（ｃ）被検体のバイオマーカーの第２のレベルを測定する工程；
（ｄ）第１のレベルと比較して第２のレベルがｍｉＲ－３４治療の効果を示す場合、被検体にさらにｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；及び
（ｅ）第１のレベルと比較して第２のレベルがｍｉＲ－３４治療の不十分な効果を示す場合、被検体に代替療法を施す工程、
を含み、それによって癌治療への被検体の反応を決定する、方法。
【請求項１７】
被検体が、肺癌、膵癌、肝臓の癌、肝細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頚部癌、前立腺癌、脳腫瘍、胃癌、膀胱癌、食道癌又は結腸癌を有することを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
第１のレベルから第２のレベルの１０％の差異が、ｍｉＲ－３４治療薬の効果を示すことを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
（ｂ）及び（ｄ）のｍｉＲ－３４治療薬が同じであることを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項２０】
代替療法が、非マイクロＲＮＡ治療であることを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項２１】
非マイクロＲＮＡ治療が、中断された治療、化学療法、放射線療法又は手術であることを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項２２】
代替療法が、非ｍｉＲ－３４マイクロＲＮＡ治療であることを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項２３】
代替療法が、ｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２の少なくとも１つを含むことを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項２４】
少なくとも１つのバイオマーカーが、ｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーであることを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項２５】
少なくとも１つの必須のバイオマーカーがｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２からなる群から選択され、第２のレベルが第１のレベルより高い場合に効果が示されることを特徴とする、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】

少なくとも１つの必須のバイオマーカーがＨＤＡＣ１であり、第２のレベルが第１のレベルより低い場合に効果が示されることを特徴とする、請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
少なくとも１つの必須のバイオマーカーがｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$であり、代替療法が中断された治療であることを特徴とする、請求項２５に記載の方法。
【請求項２８】
被検体の癌細胞を処置する方法であって、前記方法は：ｐ５３欠乏及びｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性の癌細胞を有する被検体を選択する工程、及びｍｉＲ－３４治療薬で被検体を処置する工程を含む、方法。
【請求項２９】
被検体が、肺癌、膵癌、肝臓の癌、肝細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、前立腺癌、脳腫瘍、胃癌、膀胱癌、食道癌又は結腸癌を有することを特徴とする、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
被検体が、膀胱癌、食道癌、乳癌又は胃癌を有することを特徴とする、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
被検体が、白血病、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）、リンパ腫、ホジキンリンパ腫（４つのすべてのサブタイプ）、濾胞性リンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（すべてのサブタイプ）、骨髄腫、多発性骨髄腫、又は骨髄異形成症候群を有することを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３２】
必須のバイオマーカーが、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ又はタンパク質であることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３３】
ＤＮＡが、発現抑制されず、いずれかの不活性化する変異がない遺伝子であることを特徴とする、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
（ｉ）少なくとも１つの必須のバイオマーカーがｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２からなる群から選択され、（ｉｉ）少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在が参照レベル以上の発現レベル又は活性レベルを含むことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３５】
（ｉ）少なくとも１つの必須のバイオマーカーがＨＤＡＣ１であり；（ｉｉ）少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在が参照レベル以下の発現レベル又は活性レベルを含むことを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
＜関連出願への相互参照＞
本出願は、２０１３年６月２４日に出願された米国仮特許出願第６１／８３８，８４７号及び２０１３年８月２８日に出願された米国仮特許出願第６１／８７０，９９７号への優先権の利益を主張し、その内容はそれら全体の参照によって本明細書中に組み込まれる。
【０００２】
＜米国政府の権利＞
本発明は、アメリカ国立衛生研究所認可番号１Ｒ４３ＣＡ１３４０７１及び１Ｒ４３ＣＡ１３７９３９の下での研究の実施から作成された。米国政府は本発明の権利を有し得る。

【０００３】
＜配列表＞
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂ経由でＡＳＣＩＩフォーマットにて提出された配列リストを含み、その全体の参照によって本明細書中に組み込まれる。６月２３日に作成された前記ＡＳＣＩＩのコピーは「１１２１７２－２４２　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｌｉｓｔｉｎｇ　ＴＥＸＴ」と命名され、３０，３６０バイトである。
【０００４】
本発明は、一般に癌治療に関し、より具体的には、疾患の処置、診断、予後、及び／又は疾患の進行の評価における、ｍｉＲ－３４のようなマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子を含む方法と組成物に関する。
【背景技術】
【０００５】
マイクロＲＮＡ－３４（ｍｉＲ－３４）は、多くの固形及び血液癌のタイプの機能喪失を示す有力な腫瘍抑制因子である（非特許文献１－３）。それは、おそらく、増殖、老化、アポトーシス及び転移を制御する多くの腫瘍遺伝子を抑制することにより広範囲の癌細胞を阻害する（非特許文献４－５）。ｍｉＲ－３４は、さらに、癌幹細胞の成長を妨げることができ（非特許文献６－７）、これはｍｉＲ－３４治療の発達のための強い論理的根拠を提供する。ｍｉＲ－３４の治療への応用のための証拠は、合成ｍｉＲ－３４模倣物を詰めたナノ粒子の全身送達に反応して強固な腫瘍阻害を示した、肺、肝臓、前立腺、及びリンパ腫のネズミ科の腫瘍モデル中で生み出された（非特許文献５、７－１０）。ｍｉＲ－３４に基づく治療は、現在、第Ｉ相の臨床試験中である。
【０００６】
ｍｉＲ－３４の役割への多くの見識が、腫瘍抑制因子ＴＰ５３（ｐ５３）が３つのｍｉＲ－３４ファミリーであるｍｉＲ－３４ａ／ｂ／ｃのすべての発現を転写的に誘導することを実証する最近の報告により加えられた（非特許文献１１－１５）。ＴＰ５３は、さらに、ｍｉＲ－２１５、ｍｉＲ－１９２及びｍｉＲ－１９４の内在性のレベルを高め、それらはすべて、培養中の癌細胞の増殖を阻害する能力を有する（非特許文献１６－１８）。ｍｉＲ－２１５とｍｉＲ－１９２は異なるゲノムの遺伝子座にコードされているが、それらは同一のシード配列（ｓｅｅｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ）（配列相同性が全体の９０．５％）を共有しており、それゆえにｍｉＲ－２１５／１９２とまとめて呼ばれることがある。幾つかのｍｉＲＮＡについて、ｍｉＲ－２１５／１９２は、プロテアソーム分解によってＴＰ５３の安定性を負に制御するユビキチンリガーゼであるＭＤＭ２（ＨＤＭ２とも呼ばれる）を抑制することによりＴＰ５３の活性を刺激するため、ＴＰ５３とｍｉＲＮＡ間の正の制御は、相互的である（非特許文献１８－２０）。ｍｉＲ－２１５／１９２と同様に、ＴＰ５３を不活性化するＮＡＤに依存する脱アセチル化酵素であるＳＩＲＴ１（ｓｉｌｅｎｔ　ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒ　１）、ＴＰ５３のトランス活性化を負に制御するＭＤＭ２様のタンパク質をコードするＭＤＭ４、及びＴＰ５３のＤＮＡ結合部位の一部に結合する転写因子をコードするＹＹ１を抑制することによってＴＰ５３への正のフィードバックループにおいてｍｉＲ－３４ａは機能する（非特許文献２１－２２）。それゆえに、ＴＰ５３がｍｉＲ－３４によって誘導される表現型の機能の必要条件であり得る。
【０００７】
癌におけるＴＰ５３の高い変異率を考慮すると、この必要条件が無傷の（ｉｎｔａｃｔ）ＴＰ５３を有する患者へのｍｉＲ－３４に基づく治療の適用を実質的に制限するだろう。利用可能なデータは、ＴＰ５３がｍｉＲ－２１５／１９２の阻害活性を増強するという見方を支持するが（非特許文献１８）、ｍｉＲ－３４によって誘導される腫瘍の抑制におけるＴＰ５３の必要性は議論されており、ＴＰ５３の実際の寄与は不明である。
【０００８】
したがって、著しい進歩が様々な癌の診断と処置におけるマイクロＲＮＡの使用において作られているが、特定のマイクロＲＮＡ治療は、ある部分母集団において有効でない、

又は効果が少ないことがある。ある部分母集団において、たとえば、ＴＰ５３欠乏細胞又は癌のタイプにおいて、よりよい解決方法が必要である。患者が特定の治療に反応し得るかどうかを予測するため、又は患者が特定の治療に反応しているかどうかを迅速に決定するための能力は、よりよい結果を提供するが、癌の処置に関する時間と費用を減少し得る。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｌｏｄｙｇｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ ７（１６）：２５９１－６００（２００８）

【非特許文献２】Ｇａｌｌａｒｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ ３０（１１）：１９０３－９（２００９）

【非特許文献３】Ｃｈｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎｅｓｉｓ ３１：７４５－７５０（２０１０）

【非特許文献４】Ｈｅｒｍｅｋｉｎｇ，Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｆｆｅｒ １７（２）：１９３－９（２０１０）

【非特許文献５】Ｂａｄｅｒ，Ｆｒｏｎｔ Ｇｅｎｅｔ ３（１２０）（２０１２）

【非特許文献６】Ｊｉ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，４（８）：ｅ６８１６（２００９）

【非特許文献７】Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ １７（２）：２１１－５（２０１１）

【非特許文献８】Ｔｒａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １９（６）：１１１６－２２（２０１１）

【非特許文献９】Ｗｉｇｇｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７０（１４）：５９２３－３０（２０１０）

【非特許文献１０】Ｃｒａｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｌｅｕｋｅｍｉａ（２０１２）

【非特許文献１１】Ｂｏｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ，１７（１５）：１２９８－３０７（２００７）

【非特許文献１２】Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ ２６（５）：７４５－５２（２００７）

【非特許文献１３】Ｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４４７（７１４８）：１１３０－４（２００７）

【非特許文献１４】Ｒａｖｅｒ－Ｓｈａｐｉｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ ２６（５）：７３１－４３（２００７）

【非特許文献１５】Ｔａｒａｓｏｖ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ ６（１３）：１５８６－９３（２００７）

【非特許文献１６】Ｂｒａｕｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６８（２４）：１００９４－１０４（２００８）

【非特許文献１７】Ｇｅｏｒｇｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６８（２４）：１０１０５－１２（２００８）

【非特許文献１８】Ｐｉｃｈｉｏｒｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ １８（４）：３６７－８１（２０１１）

【非特許文献１９】Ｍｏｍａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６９（７）：１２３７－４５（１９９２）

【非特許文献２０】Ｏｌｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５８（６８３１）：８０－３（１９９２）

【非特許文献２１】Ｙａｍａｋｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０５（３６）：１３４２１－６（２００８）

【非特許文献２２】Ｍａｎｄｋｅ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７（８）：ｅ４２０３４（２０１２）

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
本発明は、ｍｉＲ－３４の機能がｐ５３に依存しないという発見の少なくとも一部分に基づく。ｍｉＲ－３４がＴＰ５３に依存しない腫瘍抑制経路において機能することが発見されている。具体的には、ｍｉＲ－３４によって誘導される癌細胞の成長の阻害は、ｐ５３が正常な及びｐ５３欠乏細胞において同様であることがわかった。したがって、ｍｉＲ－３４は、ｐ５３から離れた腫瘍抑制の間においてより中心的な役割を有する。ｐ５３がない場合には、ｍｉＲ－３４は特定の他のｍｉＲＮＡとは異なり、限定されないが、ｐ２１$^{ＷＡＦ１／ＣＩＰ１}$（ＣＤＫＮ１Ａ）、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２を含む、ｐ５３によって調節されることが知られている遺伝子の上方制御並びにＨＤＡＣ１の下方制御を引き起こすために十分である。したがって、本発明は、これらのバイオマーカーがｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーとして使用され得ることを提供する。様々な実施形態において、必須のバイオマーカーはＤＮＡ、ｍＲＮＡ又はタンパク質（あるいはその組み合わせ）である。必須のバイオマーカーがＤＮＡである場合、それは、発現抑制されず、いずれかの不活性化する変異がない遺伝子のＤＮＡであり得る。さらに、本発明は、これらのバイオマーカーの幾つかがｍｉＲ－３４活性への治療反応のために不可欠であり、それゆえにｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーであるという発見に基づく。
【００１１】
＜処置の方法＞
幾つかの実施形態において、癌を有する被検体を処置する方法が提供される。処置の２つの一般的な方法が提供される。方法の第１のセットは、ｍｉＲ－３４治療が被検体の適切な処置の方法であるかどうかを決定するために、ｍｉＲ－３４活性の１つ以上の必須のバイオマーカーを使用するスクリーニングの工程を含む。方法の第２のセットは、ｍｉＲ－３４治療薬による被検体の処置に対する反応を決定するために、被検体のｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーの相対的なレベルを測定する工程を含む。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
幾つかの実施形態において、第１のセットは、癌を有する被検体を処置する方法を提供し、前記方法は：
（ａ）ｍｉＲ－３４活性の少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在又は不在について被検体をスクリーニングする工程；
（ｂ）ｍｉＲ－３４活性のための必須のバイオマーカーが存在すると決定される場合に、被検体にｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；及び
（ｃ）ｍｉＲ－３４活性のための必須のバイオマーカーが存在しない場合、被検体に代替療法を施す工程、
を含み、それによって被検体を処置する。少なくとも１つの必須のバイオマーカーは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２及びＨＤＡＣ１からなる群から選択され得る。幾つかの態様において、少なくとも１つの必須のバイオマーカーはｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を含み、また、幾つかの態様において、被検体がスクリーニングされる単独の必須のバイオマーカーはｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$である。例えば、少なくとも１つの必須のバイオマーカーは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２からなる群から選択され得、少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在は、参照レベル以上の発現レベル又は活性レベルを含む。別の例において、少なくとも１つの必須のバイオマーカーはＨＤＡＣ１であり、少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在は、参照レベル以下の発現レベル又は活性レベルを含む。
【００１３】
幾つかの実施形態において、第２のセットは、ｍｉＲ－３４治療薬で処置されている被

検体の癌治療に対する反応を決定する方法を提供し、前記方法は：
（ａ）被検体のｍｉＲ－３４活性の少なくとも１つのバイオマーカーの第１のレベルを測定する工程；
（ｂ）被検体にｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；
（ｃ）被検体のバイオマーカーの第２のレベルを測定する工程；
（ｄ）第１のレベルと比較して第２のレベルがｍｉＲ－３４治療の効果を示す場合、被検体にさらにｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；及び
（ｅ）第１のレベルと比較して第２のレベルがｍｉＲ－３４治療の不十分な効果を示す場合、被検体に代替療法を施す工程、
を含み、それによって癌治療への被検体の反応を決定し、適切な処置を提供する。バイオマーカーは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ｐ５３、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２及びＨＤＡＣ１からなる群から選択され得る。幾つかの態様において、工程（ｂ）及び（ｄ）のｍｉＲ－３４治療薬は同じものである。

【００１４】

被検体は肺癌、膵癌、肝臓の癌、肝細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、前立腺癌、脳腫瘍、胃癌、膀胱癌、食道癌又は結腸癌を有し得る。幾つかの態様において、被検体はｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性癌細胞を有すると決定された。例えば、被検体はｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性癌細胞及びｐ５３欠乏癌細胞を有すると決定され得る。例えば、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$野性型（＋／＋）又はヘテロ接合性の（＋／－）遺伝子及びホモ接合性に不活化された（－／－）ｐ５３遺伝子を有する癌細胞を有すると決定され得る。別の例において、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$野性型（＋／＋）又はヘテロ接合性の（＋／－）遺伝子を有し、機能的なｐ５３タンパク質を欠失している癌細胞を有すると決定され得る。別の例において、被検体は、機能的なｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質及び機能的でないｐ５３タンパク質を有するか又はｐ５３タンパク質を欠失していると決定され得る。被検体は、血液系腫瘍、例えば、白血病（急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）又はその他の白血病）；リンパ腫（ホジキンリンパ腫（４つのすべてのサブタイプ）、濾胞性リンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫又は非ホジキンリンパ腫（すべてのサブタイプ））；骨髄腫（例えば多発性骨髄腫）；あるいは骨髄異形成症候群を有し得る。

【００１５】

ｍｉＲ－３４治療薬は、ｍｉＲ－３４を含み得、さらに随意にｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２の少なくとも１つを含み得る。ｍｉＲ－３４は、ｍｉＲ－３４ａ、ｂ又はｃ、あるいはｍｉＲ－４４９ａ、ｂ、又はｃであり得る。細胞増殖のレベルは、ｍｉＲ－３４治療薬の投与後に減少し得る。腫瘍のサイズ又は進行は、ｍｉＲ－３４治療薬の投与後に減少あるいは遅くなり得る。

【００１６】

幾つかの態様において、代替療法は、非ｍｉＲ－３４マイクロＲＮＡ治療又は非マイクロＲＮＡ治療になり得る。例えば、代替療法は、中断された治療、化学療法、放射線療法、手術、緩和療法、ｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２から選択され得る。代替療法は、非ｍｉＲ－３４マイクロＲＮＡ治療及び非マイクロＲＮＡ治療の任意の組み合わせになり得る。例えば、代替療法は、ｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２の少なくとも１つを含み得る。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】ＴＰ５３及びｍｉＲ－３４の一般的で異なる腫瘍抑制経路を示す。

【図２Ａ】同質遺伝子的な癌細胞株中のＴＰ５３遺伝子の誘導後の内在性のｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡのレベルを示す。ＴＰ５３のｍＲＮＡレベルは、ＴＰ５３$^{＋／－}$細胞（ＳＷ４８、ＨＣＴ１１６、ＲＫＯ）又はＴＰ５３$^{－／－}$細胞（ＭＣＦ１０Ａ；発現＝１）のもの

に基準化されている。ＤＬＤ－１細胞からのデータはＤＬＤ－１$^{-/SIL}$細胞に基準化されている。他のすべてのデータは、ＴＰ５３欠乏細胞（－／－；相対的な発現＝１）の発現レベルに基準化されている。平均と標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す；＊参照細胞がないため、データは基準化されたＰＣＲのしきい値に基準化されている。

【図２Ｂ】同質遺伝子的な癌細胞株中のＴＰ５３遺伝子の誘導後の内在性のｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡのレベルを示す。ＴＰ５３のｍＲＮＡレベルは、ＴＰ５３$^{+/-}$細胞（ＳＷ４８、ＨＣＴ１１６、ＲＫＯ）又はＴＰ５３$^{-/-}$細胞（ＭＣＦ１０Ａ；発現＝１）のものに基準化されている。ＤＬＤ－１細胞からのデータはＤＬＤ－１$^{-/SIL}$細胞に基準化されている。他のすべてのデータは、ＴＰ５３欠乏細胞（－／－；相対的な発現＝１）の発現レベルに基準化されている。平均と標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す；＊参照細胞がないため、データは基準化されたＰＣＲのしきい値に基準化されている。

【図２Ｃ】同質遺伝子的な癌細胞株中のＴＰ５３遺伝子の誘導後の内在性のｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡのレベルを示す。ＴＰ５３のｍＲＮＡレベルは、ＴＰ５３$^{+/-}$細胞（ＳＷ４８、ＨＣＴ１１６、ＲＫＯ）又はＴＰ５３$^{-/-}$細胞（ＭＣＦ１０Ａ；発現＝１）のものに基準化されている。ＤＬＤ－１細胞からのデータはＤＬＤ－１$^{-/SIL}$細胞に基準化されている。他のすべてのデータは、ＴＰ５３欠乏細胞（－／－；相対的な発現＝１）の発現レベルに基準化されている。平均と標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す；＊参照細胞がないため、データは基準化されたＰＣＲのしきい値に基準化されている。

【図２Ｄ】同質遺伝子的な癌細胞株中のＴＰ５３遺伝子の誘導後の内在性のｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡのレベルを示す。ＴＰ５３のｍＲＮＡレベルは、ＴＰ５３$^{+/-}$細胞（ＳＷ４８、ＨＣＴ１１６、ＲＫＯ）又はＴＰ５３$^{-/-}$細胞（ＭＣＦ１０Ａ；発現＝１）のものに基準化されている。ＤＬＤ－１細胞からのデータはＤＬＤ－１$^{-/SIL}$細胞に基準化されている。他のすべてのデータは、ＴＰ５３欠乏細胞（－／－；相対的な発現＝１）の発現レベルに基準化されている。平均と標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す；＊参照細胞がないため、データは基準化されたＰＣＲのしきい値に基準化されている。

【図２Ｅ】同質遺伝子的な癌細胞株中のＴＰ５３遺伝子の誘導後の内在性のｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡのレベルを示す。ＴＰ５３のｍＲＮＡレベルは、ＴＰ５３$^{+/-}$細胞（ＳＷ４８、ＨＣＴ１１６、ＲＫＯ）又はＴＰ５３$^{-/-}$細胞（ＭＣＦ１０Ａ；発現＝１）のものに基準化されている。ＤＬＤ－１細胞からのデータはＤＬＤ－１$^{-/SIL}$細胞に基準化されている。他のすべてのデータは、ＴＰ５３欠乏細胞（－／－；相対的な発現＝１）の発現レベルに基準化されている。平均と標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す；＊参照細胞がないため、データは基準化されたＰＣＲのしきい値に基準化されている。

【図３】Ａ－Ｄは、同質遺伝子的な癌細胞株中のｍｉＲ－３４ａによる癌細胞の増殖の阻害を示す。データは疑似的に遺伝子導入された細胞に基準化されている。平均、標準偏差及び非線形回帰曲線（ｎｏｎ－ｌｉｎｅａｒ　ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ）が示されている。

【図４】Ａ－Ｄは、同質遺伝子的な癌細胞株中のｍｉＲ－３４ｃによる癌細胞の増殖の阻害を示す。データは疑似的に遺伝子導入された細胞に基準化されている。平均、標準偏差及び非線形回帰曲線が示されている。

【図５】Ａ－Ｄは、同質遺伝子的な癌細胞株中のｍｉＲ－２１５による癌細胞の増殖の阻害を示す。データは疑似的に遺伝子導入された細胞に基準化されている。平均、標準偏差及び非線形回帰曲線が示されている。

【図６】Ａ－Ｄは、同質遺伝子的な癌細胞株中のｍｉＲ－１９２による癌細胞の増殖の阻害を示す。データは疑似的に遺伝子導入された細胞に基準化されている。平均、標準偏差及び非線形回帰曲線が示されている。

【図７Ａ】同質遺伝子的なＲＫＯ細胞中のｍｉＲ－３４ａによる癌細胞の増殖の阻害を示

す。細胞の増殖はａｌａｍａｒＢｌｕｅ（登録商標）によって決定された。平均及び標準偏差が示されている。
【図７Ｂ】同質遺伝子的なＲＫＯ細胞中のｍｉＲ－３４ｃによる癌細胞の増殖の阻害を示す。細胞の増殖はａｌａｍａｒＢｌｕｅ（登録商標）によって決定された。平均及び標準偏差が示されている。
【図８Ａ】ｍｉＲ－３４ａ又はｍｉＲ－２１５のいずれかで遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞中のｍｉＲ－３４ａ／ＴＰ５３系で機能する標的遺伝子の内在性の発現レベルを示す。ＳＩＲＴ１、ＭＤＭ４、ＢＣＬ２、ＭＥＴ及びｐ５３のレベルを示す。値は疑似的に遺伝子導入された細胞のものに基準化されている（＝１）。重複実験の平均及び標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す。
【図８Ｂ】ｍｉＲ－３４ａ又はｍｉＲ－２１５のいずれかで遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞中のｍｉＲ－３４ａ／ＴＰ５３の系で機能する標的遺伝子の内在性の発現レベルを示す。ＰＵＭＡ、ｐ２１及びＭＤＭ２のレベルを示す。値は疑似的に遺伝子導入された細胞のものに基準化されている（＝１）。重複実験の平均及び標準偏差が示されている。ｎは検知していないことを示す。
【図９Ａ】ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された同質遺伝子的な細胞株中のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２のｍＲＮＡの内在性のレベルを示す。すべての値は疑似的に遺伝子導入された細胞のものに基準化されている（＝１）。平均が示されている。
【図９Ｂ】ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された同質遺伝子的な細胞株中のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２のｍＲＮＡの内在性のレベルを示す。すべての値は疑似的に遺伝子導入された細胞のものに基準化されている（＝１）。平均が示されている。
【図１０】ＨＤＡＣ１の転写物の３’ＵＴＲ中のｍｉＲ－３４ａ結合部位を示す。野性型（ｗｔ）及び変異型（ｍｕｔ）のＨＤＡＣ１の３’ＵＴＲ配列とのｍｉＲ－３４ａの塩基対形成が示される。小文字はｍｉＲ－３４ａ残基；大文字はｍＲＮＡ残基；強調された塩基はおそらく塩基対形成に関与する；太字はｍｉＲＮＡのシード配列；下線は変異した残基を示す。
【図１１】図１１はｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞中のＨＤＡＣ１のｍＲＮＡレベルを示す。値は疑似的に遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。
【図１２Ａ】ｍｉＲ－３４ａ又はｍｉＲ－２１５で遺伝子導入されたＳＷ４８結腸直腸癌細胞及びＨ１２９９肺癌細胞中のＨＤＡＣ１の３’ＵＴＲと融合したルシフェラーゼ転写物の発現を示す。相対的な光の単位はｍｉＲ－２１５で遺伝子導入された細胞のものに基準化された（１００％）。Ｐ値は両側スチューデントｔ検定から得た。ｎ．ｓ．は統計的に有意でないことを示す。
【図１２Ｂ】それぞれの正常隣接組織に基準化されたＮＳＣＬＣ患者の１４の腫瘍１セット中でのＨＤＡＣ１のｍＲＮＡ及びｍｉＲ－３４のレベル間の関連を示す。内在性の発現レベルはｑＲＴ－ＰＣＲによって決定された。相関係数はピアソン法によって作成され；Ｐ値はＦ検定（Ｇｒａｐｈｐａｄ）によって計算された。
【図１３】同質遺伝子的なＴＰ５３陰性ＳＷ４８細胞中でのバイオマーカータンパク質の発現におけるｍｉＲＮＡ及びｓｉＲＮＡでの遺伝子導入の効果を示す。
【図１４】同質遺伝子的なＴＰ５３陰性ＲＫＯ細胞中でのバイオマーカータンパク質の発現におけるｍｉＲＮＡ及びｓｉＲＮＡでの遺伝子導入の効果を示す。
【図１５】同質遺伝子的なＴＰ５３陽性ＲＫＯ細胞中でのバイオマーカータンパク質の発現におけるｍｉＲＮＡ及びｓｉＲＮＡでの遺伝子導入の効果を示す。
【図１６Ａ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。

【図１６Ｂ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。
【図１６Ｃ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。
【図１６Ｄ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。
【図１６Ｅ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。
【図１６Ｆ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。
【図１６Ｇ】ｓｉＲＮＡで一時的に遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における様々なｍＲＮＡの内在性のｍＲＮＡ発現レベルを示す。発現レベルは、負の対照のｓｉＲＮＡ（ｓｉ－ＮＣ）で遺伝子導入された細胞のものに基準化されている。３重の試験の平均及び標準偏差が示される。
【図１７】ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡで遺伝子導入された同質遺伝子的なＳＷ４８細胞の細胞増殖を示す。値は擬似的な遺伝子導入に基準化されている（＝１００％）。平均及び標準偏差が示される。Ｐ値は両側スチューデントｔ検定から得た。点線は、ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された細胞の細胞増殖のレベルを提供する。
【図１８Ａ】同質遺伝子的なＳＷ４８細胞株中での増殖におけるトリコスタチンＡの効果を示す。値は未処置細胞（ＮＴ）に基準化されている。
【図１８Ｂ】トリコスタチンＡで処置した細胞からのＲＮＡサンプルを使用して$p21^{CIP1/WAF1}$のｍＲＮＡレベルを測定するｑＲＴ－ＰＣＲ解析を示す。値は未処置細胞（ＮＴ）に基準化されている。
【図１９】ｍｉＲ－３４ａの濃度の増加を備える遺伝子導入された同質遺伝子的なＲＫＯ細胞におけるｐ２１のｍＲＮＡ発現レベル及び増殖速度の非線形回帰分析を示す。すべての値は擬似的に遺伝子導入された細胞のものに基準化されている（＝１）。平均が示される。標準偏差は含まれているが、グラフ中で可視化するには小さすぎる。
【図２０】ｍｉＲＮＡの模倣物及びｓｉＲＮＡが、同質遺伝子的なＲＫＯ細胞に一時的に遺伝子導入された後、ウエスタン解析によって測定されたバイオマーカータンパク質の発現を示す。
【図２１】ｍｉＲＮＡの模倣物及びｓｉＲＮＡでの一時的な遺伝子導入後に同質遺伝子的なＲＫＯ細胞における細胞増殖を示す。増殖データはａｌａｍａｒＢｌｕｅ（登録商標）によって評価された。値は負の対照で遺伝子導入された細胞に基準化されている（１００％）。平均及び標準偏差が示される。Ｐ値は両側スチューデントｔ検定から得た。
【図２２】ｍｉＲＮＡの模倣物及びｓｉＲＮＡでの一時的な遺伝子導入後に同質遺伝子的なＳＷ４８細胞における細胞増殖を示す。増殖データはａｌａｍａｒＢｌｕｅ（登録商標）によって評価され、負の対照で遺伝子導入された細胞に基準化されている（１００％）。平均及び標準偏差が示される。Ｐ値は両側スチューデントｔ検定から得た。
【図２３】ｍｉＲＮＡの模倣物及びｓｉＲＮＡでの一時的な遺伝子導入後に同質遺伝子的なＨｅｐ３Ｂ肝細胞癌細胞における細胞増殖を示す。増殖データはａｌａｍａｒＢｌｕｅ

（登録商標）によって評価され、負の対照で遺伝子導入された細胞に基準化されている（ｍｉＮＣ＋ｓｉＮＣ；１００％）。平均及び標準偏差が示される。ＥＧ５（Ｋｉｆ１１）に対してｓｉＲＮＡは癌細胞の成長の阻害の正の対照として役立った。

【図２４Ａ】ｍｉＲ－３４ａに基づく治療で処置されたマウスモデルの肝臓癌における$p21^{CIP1/WAF1}$の上方制御を示す。肝臓中で同所的に（ｏｒｔｈｏｔｏｐｉｃａｌｌｙ）育てられたヒトＨｅｐ３Ｂ腫瘍を有するマウスは、静脈内尾静脈注射（ｉｎｔｒａｖｅｎｏｕｓ ｔａｉｌ ｖｅｉｎ ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ）によってｍｉＲ－３４ａに基づく治療の１回量を与えられた（ｎ＝３）。対照として、腫瘍を有するマウスは、空のリポソーム（ｎ＝２）又は負の対照のｍｉＲＮＡ（ｍｉＲ－ＮＣ２；ｎ＝２）を詰められたリポソームのいずれかを注入された。２４時間後、腫瘍組織は集められ、タンパク質溶解物はウエスタン解析によって調査された。アクチンの発現はローディング対照（ｌｏａｄｉｎｇ ｃｏｎｔｒｏｌ）として役立った。

【図２４Ｂ】培養されたＨｅｐ３Ｂ肝臓癌細胞中での$p21^{CIP1/WAF1}$の上方制御を示す。細胞は、ｍｉＲ－３４ａ又はｍｉＲ－ＮＣ２のいずれかで一時的に遺伝子導入された。タンパク質溶解物はウエスタン解析によって$p21^{CIP1/WAF1}$の発現のために調査された。アクチンはローディング対照として使用された。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

本発明は、ｍｉＲ－３４の機能がｐ５３に依存しないという発見の少なくとも一部分に基づく。ｍｉＲ－３４がＴＰ５３に依存しない腫瘍抑制経路において機能することが発見されている。具体的には、ｍｉＲ－３４によって誘導される癌細胞の成長の阻害は、ｐ５３が正常な及びｐ５３欠乏細胞において同様であることがわかった。したがって、ｍｉＲ－３４は、ｐ５３から離れた腫瘍抑制の間においてより中心的な役割を有する。ｐ５３がない場合には、ｍｉＲ－３４は特定の他のｍｉＲＮＡとは異なり、限定されないが、$p21^{WAF1/CIP1}$（ＣＤＫＮ１Ａ）、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２を含む、ｐ５３によって調節されることが知られている遺伝子の上方制御並びにＨＤＡＣ１の下方制御を引き起こすために十分である。したがって、これらのバイオマーカーは、ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーとして使用され得る。さらに、本発明は、これらのバイオマーカーの幾つかがｍｉＲ－３４活性への治療反応のために不可欠であり、それゆえにｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーであるという発見に基づく。$p21^{CIP1/WAF1}$がｍｉＲ－３４の下流の重要なエフェクター分子であることがさらにわかった。$p21^{CIP1/WAF1}$とは対照的に、ｐ５３は、ｐ５３に依存しない腫瘍抑制因子として機能するためにｍｉＲ－３４によってバイパスされ得る。図１は、ｍｉＲ－３４及びｐ５３の一般的で異なる抑制経路を例証する。

【００１９】

ｍｉＲ－３４の置換は、癌を処置するための有望なアプローチとして現れた。ｍｉＲ－３４はｐ５３によって転写的に誘導される。しかしながら、ｍｉＲ－３４は、ｍｉＲ－３４の表現型に必要であると疑われた正のフィードバックループのｐ５３をさらに活性化する。ｐ５３及びｍｉＲ－３４の間の機能的な関係と、ｍｉＲ－２１５／１９２を含む他のｐ５３によって制御されるｍｉＲＮＡのそれは、それらの内在性のｐ５３の状態に関してのみ異なる同質遺伝子的な癌細胞株の集団を使用して決定された。ｍｉＲ－３４によって誘導される癌細胞の成長の阻害は、ｐ５３が正常な及びｐ５３欠乏細胞と同様である。ｍｉＲ－３４とは対照的に、ｍｉＲ－２１５／１９２はｐ５３を通して機能する。ｐ５３がない場合には、ｍｉＲ－２１５／１９２ではなくｍｉＲ－３４が、細胞周期依存性キナーゼ阻害物質$p21^{CIP1/WAF1}$（ＣＤＫＮ１Ａ）の上方制御を誘導するのに十分である。そのため、ｐ５３の他の下流の標的とは異なり、ｍｉＲ－３４は、ｐ５３が正常な及びｐ５３欠乏細胞と同様の活性を示すので、ｍｉＲ－３４はそれらのｐ５３の状態に関係なく患者の治療において有効になり得る。ｍｉＲ－３４のｐ５３に依存しない機能は、さらに重要な治療の意味合いを有し、患者が特定の治療にどれくらいよく反応しているかを決定することと同様に、患者が特定の治療に反応する可能性が最も高いことを予測する

ことを支援し得る。

【００２０】

ヒストンデアセチラーゼ１（ＨＤＡＣ１）は、ｍｉＲ－３４の直接的な標的として同定され、ＨＤＡＣ１の抑制は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の誘導をもたらし、ｍｉＲ－３４の細胞の表現型を模倣する。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の枯渇は、特にｍｉＲ－３４が癌細胞の増殖を阻害する能力を妨げる。データは、ｍｉＲ－３４が以前にｐ５３のために用意された腫瘍抑制因子の経路を制御し、それらのｐ５３の状態に関係なく癌患者に魅力的な治療の戦略を提供することを示唆する。

【００２１】

確立されたパラダイムは、ｍｉＲ－３４を、細胞周期の進行及びアポトーシスに関連する遺伝子を抑制することにより、ＴＰ５３の下流で機能する細胞のエフェクター分子としてみなしている。しかしながら、我々のデータは、ｍｉＲ－３４がｐ５３に依存せずｐ５３と平行して、より中心的な役割を有することを示唆する。この命題の支持は本明細書中で提供される。異なるｍｉＲ－３４経路の存在は、ｍｉＲ－３４がない場合での無傷なｐ５３の反応を示すｍｉＲ－３４ノックアウトマウスによってもたらされた観察（Ｃｏｎｃｅｐｃｉｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｇｅｎｅｔ ８（７）：ｅ１００２７９７（２０１２））と同様に、ｍｉＲ－３４ａ遺伝子のＴＰ５３に依存しない転写制御によってさらに実証される（Ｃｈｒｉｓｔｏｆｆｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｆｆｅｒ １７（２）：２３６－４５（２００９））。ｍｉＲ－３４及びｐ５３は、重複する機能を備えた２つの経路の界面を作り、転写によるｐ５３、並びにＳＩＲＴ１、ＹＹ１及びＭＤＭ４の転写後抑制によるｍｉＲ－３４のように、相互に互いに活性化してもよい。

【００２２】

ｐ５３欠乏細胞において、ｍｉＲ－３４によって誘導されるｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現は、ＨＤＡＣ１抑制の間接的な効果である。ＨＤＡＣ１は以前にｐ２１遺伝子（ＣＤＫＮ１Ａ）の制御に関連付けられた。証拠の支持は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$及び、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現がＨＤＡＣ阻害剤のトリコスタチンＡ（ＴＳＡ）での処置の後に誘導されるｐ５３変異ヒト骨肉腫細胞の高められたレベルを示すＨＤＡＣ１欠乏胚性幹細胞に由来する（Ｓｏｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ（１９９７）；Ｌａｇｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｍｂｏ Ｊ ２１（１１）：２６７２－８１（２００２））。これらの研究において、ＣＤＫＮ１Ａプロモーター中の２つのＳｐ１結合部位がＴＳＡに反応する要素として同定され、これはＴＰ５３がない場合において、Ｓｐ１がＣＤＫＮ１Ａ遺伝子の活性化を制御する転写因子であることを示唆する。我々のデータは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$がｍｉＲ－３４ａの機能のための機能的な必要条件であることを示す。しかしながら、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の枯渇の効果は細胞株間で変化する。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の枯渇は、ＲＫＯ細胞のｍｉＲ－３４ａの抗増殖活性を完全に無効にし、ＳＷ４８細胞中においては単にそれを弱めた。同様に、ｍｉＲ－３４ａの阻害活性は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を欠くＴＰ５３陰性Ｈｅｐ３Ｂ肝細胞癌細胞中で完全には減少しなかったが、著しく減少した（データは示していない）。対照的に、従来の研究は、ＨＣＴ１１６$^{ｐ２１－／－}$細胞中のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$に依存するｍｉＲ－３４ａの表現型を明らかにしなかった（非特許文献１３）。したがって、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の枯渇の効果は、細胞株を横断して変化するように見える。ｍｉＲ－３４の表現型は、癌の変化にさらされる他の分子のイベントによってさらに制御され得る。ＣＤＫＮ１Ａの欠失はマウスにおける自発的な腫瘍形成をもたらし得るが、ヒトの癌における体細胞の機能喪失の変異はまれである（Ｌａｇｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｍｂｏ Ｊ ２１（１１）：２６７２－８１（２００２））。しかしながら、発現の減少が、結腸直腸、頚部、食道及び肺癌において認められ、これらの幾つかにおいて、これはＣＤＫＮ１Ａプロモーターの高メチル化による（Ｄｏｔｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｅｒｓｐｅｃｔ Ｂｉｏｌ ２（９）：ａ００４８８７（２０１０）；Ｔｏｌｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ９

（４）：２７３－８５（２００６））。したがって、ｍｉＲ－３４の模倣物は、ｍｉＲ－３４治療に対する反応の「予測的な」マーカー、つまりｍｉＲ－３４活性に必須のマーカーとして考慮されなければならないＣＤＫＮ１Ａの発現抑制又は減少を伴う癌においてそれほど活性がないことがあり得る。

【００２３】

ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$のｍｉＲ－３４特異的な誘導は、ｐ５３が正常な及びｐ５３欠乏細胞を阻害するその不変の能力についての説明を提供する。これは、ｐ５３がない場合においてｐ２１$^{ＷＡＦ１／ＣＩＰ１}$を誘導することができないｍｉＲ－２１５／１９２とは対照的であり、従って、ＴＰ５３$^{－／－}$細胞における阻害活性を減少させる。ｍｉＲ－２１５／１９２で生成されたデータは、ｍｉＲ－２１５／１９２が、ＭＤＭ２の抑制によって、ＴＰ５３への正のフィードバックループ中で機能するという以前に記載されたモデルに適合した（非特許文献１８）。興味深いことに、ＳＩＲＴ１、ＹＹ１又はＭＤＭ４によるｍｉＲ－３４からＴＰ５３への報告された正のフィードバックは、これらのタンパク質がｍｉＲ－３４ａによって発現され、下方制御されたという事実にもかかわらず、抗増殖のｍｉＲ－３４の表現型に寄与するようには見えない。これらの遺伝子産物に対するｓｉＲＮＡの適度な効果を考慮すると、それらは、即時の抗増殖ｍｉＲ－３４反応に関与しないかもしれないが、後の時点で追加効果を明らかにすることがある。

【００２４】

癌細胞の増殖のｍｉＲ－３４ａによって誘導される阻害はｐ５３に依存せず、これはｍｉＲ－３４治療がｐ５３の状態に関係なく癌患者に有効であることを示唆する。ＨＤＡＣ１を抑制し、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を誘導するｍｉＲ－３４の能力は、中心的な腫瘍抑制因子としてのその立場を著しく強くし、他の重要な発癌経路においてその機能を補完する。

【００２５】

＜スクリーニング及び処置の方法＞

従って、本発明は癌を有する被検体を処置するための方法及び組成物を提供する。本発明は、さらに、治療反応を評価する又は予測することを含む、ｍｉＲ－３４治療薬で処置される又は処置されている被検体の癌治療に対する反応を決定するための方法を提供する。

【００２６】

本発明は、さらに、ｍｉＲ－３４活性のための予測的なバイオマーカーとしてのｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２又はＨＤＡＣ１を、単独、あるいは組み合わせた使用を提供する。本発明は、さらに、ｍｉＲ－３４治療薬を投与することを含む癌治療に対する反応を決定するためのバイオマーカーとしてのｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２又はＨＤＡＣ１を単独、あるいは組み合わせた使用を提供する。使用において、ｍｉＲ－３４はｍｉＲ－３４ａ、ｂ又はｃ、あるいはｍｉＲ－４４９ａ、ｂ、又はｃであり得る。

【００２７】

幾つかの実施形態において、癌を有する被検体を処置する方法は、ｍｉＲ－３４活性に必須の少なくとも１つのバイオマーカーの存在又は不在についての被検体のスクリーニングを含む。幾つかの実施形態において、前記方法は：

（ａ）ｍｉＲ－３４活性の少なくとも１つの必須のバイオマーカーの存在又は不在について被検体をスクリーニングする工程；

（ｂ）ｍｉＲ－３４活性のための必須のバイオマーカーが存在すると決定される場合に、被検体にｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；及び

（ｃ）ｍｉＲ－３４活性のための必須のバイオマーカーが存在しない場合、被検体に代替療法を施す工程、

を含み、それによって被検体を処置する。

【００２８】

幾つかの実施形態において、必須のバイオマーカーは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、Ｐ

ＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２又はＨＤＡＣ１であり得る。例えば、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の存在又は不在についてスクリーニングされ得、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$が存在すると決定された場合、ｍｉＲ－３４治療薬が被検体に投与され得る。幾つかの実施形態において、細胞増殖のレベルは、ｍｉＲ－３４治療薬の投与後に減少する。幾つかの実施形態において、被検体はｐ２１陽性癌細胞を有することが決定された。例えば、被検体はｐ２１陽性及びｐ５３欠乏癌細胞を有することが決定された。例えば、被検体はｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$野性型（＋／＋）又はヘテロ接合性の（＋／－）遺伝子及びホモ接合性に不活化された（－／－）ｐ５３遺伝子を有する癌細胞を有することが決定され得る。別の例において、被検体はｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$野性型（＋／＋）又はヘテロ接合性の（＋／－）遺伝子を有し、機能的なｐ５３タンパク質を欠失している癌細胞を有することが決定され得る。別の例において、被検体は機能的なｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質及び機能的でないｐ５３タンパク質を有するか又はｐ５３タンパク質を欠失していると決定され得る。ｐ２１陽性及びｐ５３欠乏であり得る癌の例は、ｐ２１陽性／ｐ５３陰性の癌並びに、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、前立腺癌、膀胱癌（Ｋｏｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｊｐｎ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ９１（４）：４１６－２３（２０００））、食道癌（Ｎａｋａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｓ Ｅｓｏｐｈａｇｕｓ １７（４）：３１５－２１（２００４））；乳癌（Ｔｈｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ Ｔｒｅａｔ ６１（１）：３３－４３（２０００））及び胃癌（Ｘｉａｎｇｍｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１４８（２）：１８１－８（２０００））を含む、様々なタイプの癌を含む。

【００２９】

幾つかの実施形態において、ｍｉＲ－３４治療薬で処置されている被検体の癌治療に対する反応を決定する方法は：

（ａ）被検体のｍｉＲ－３４活性の少なくとも１つのバイオマーカーの第１のレベルを測定する工程；

（ｂ）被検体にｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；

（ｃ）被検体のバイオマーカーの第２のレベルを測定する工程；

（ｄ）第１のレベルと比較して第２のレベルがｍｉＲ－３４治療の効果を示す場合、被検体にさらにｍｉＲ－３４治療薬を投与する工程；及び

（ｅ）第１のレベルと比較して第２のレベルがｍｉＲ－３４治療の不十分な効果を示す場合、被検体に代替療法を施す工程、

を含み、それによって癌治療に対する被検体の反応を決定し、被検体を処置する。

【００３０】

工程（ｂ）及び（ｄ）において投与されたｍｉＲ－３４治療薬は、同じもの又は異なるものであり得る。代替療法は、（ｉ）非ｍｉＲ－３４マイクロＲＮＡ治療、（ｉｉ）非マイクロＲＮＡ治療又は（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）の任意の組み合わせであり得る。例えば、代替療法は、ｍｉＲ－２１５又はｍｉＲ－１９２の少なくとも１つを含み得る。幾つかの実施形態において、反応を決定することは、別の処置と比較して、処置の時間が長くかかる又は短くて済むということを決定することであり得る。

【００３１】

＜ｍｉＲ－３４治療薬＞

マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）は、多数の遺伝子産物及び細胞経路を制御することによって翻訳後に遺伝子発現を調節し、細胞運命を決定する小さな非翻訳領域の自然に生じるＲＮＡ分子である。

【００３２】

ｍｉＲ－３４が、癌治療及び他の疾患と障害の治療のための介入点を示す多数の細胞活性の制御に関与することは以前に実証された（米国特許第７，８８８，０１０号及び８，１７３，６１１号、これらは参照によって本明細書中に組込まれる）。ｍｉＲ－３４は、さらに、多くの重要な腫瘍遺伝子の発現を制御するその能力によって腫瘍抑制因子として機能する（米国特許出願公開第２００９／０２２７５３３号、これは参照によって本明細

書中に組込まれる）。ｍｉＲ－３４によって直接的又は間接的に制御される癌関連遺伝子は、アンジオジェニン、オーロラキナーゼＢ、ＢＣＬ１０、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＢＵＢ１、サイクリンＡ２、サイクリンＤ１、サイクリンＤ３、ＣＤＫ－４、ＣＤＫインヒビター２Ｃ、ＦＡＳ、フォークヘッドボックスＭ１、ＨＤＡＣ－１、ｃ－Ｊｕｎ、ＭＣＡＭ、Ｍｃｌ－１、ｃ－ｍｅｔ、Ｍｙｂ　Ｌ２、ＮＦ１、ＮＦ２、ＰＩ３－キナーゼ、ポロ様キナーゼ１、Ｒ－ＲＡＳ、ＳＭＡＤ３、ＴＧＦベータ受容体、ＴＰＤ５２腫瘍タンパク質Ｄ５２、及びＷｎｔ－７ｂである。したがって、ｍｉＲ－３４は、細胞の増殖及び生存の決定的な制御因子であるタンパク質の活性を管理する。これらの標的は、ヒト癌において頻繁に制御を解除される。

【００３３】

マイクロＲＮＡ－３４置換療法は、癌を処置するための有望なアプローチとして現れ、現在第Ｉ相の臨床試験中である。ｍｉＲ－３４は、ｐ５３によって転写的に誘導される。ｍｉＲ－３４は、さらに、先行文献がｍｉＲ－３４の表現型に必要とされ得ることを示唆した正のフィードバックループ中のｐ５３を活性化する。しかしながら、ＴＰ５３遺伝子の変異は、すべての癌の約半分で生じる、ヒト癌で見られる最も一般的な遺伝子変化である。

【００３４】

ｍｉＲ－３４治療は、ｍｉＲ－３４治療薬を含む治療である。ｍｉＲ－３４治療は、ｍｉＲ－３４治療薬を含む併用治療を含み得る。例えば、ｍｉＲ－３４治療は、ｍｉＲ－３４治療薬を含み得、さらに、ｍｉＲ－２１５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）又はｍｉＲ－１９２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）等の別のマイクロＲＮＡ治療法を含み得る。別の例において、ｍｉＲ－３４治療は、ｍｉＲ－３４治療薬を含み得、さらに、化学療法、放射線療法又は手術等の非マイクロＲＮＡ治療を含み得る。

【００３５】

ｍｉＲ－３４治療薬は、被検体のｍｉＲ－３４の量を増加させる薬剤である。幾つかの実施形態において、ｍｉＲ－３４治療薬は、ヒトｍｉＲ－３４及びそのアナログを含む。ｍｉＲ－３４は、限定されないが、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－３４ｂ、ｍｉＲ－３４ｃ、ｍｉＲ－４４９ａ、ｍｉＲ－４４９ｂ、ｍｉＲ－４４９ｃ、修飾されたｍｉＲ－３４核酸及びそのいずれかの組み合せを含み得る。オリゴヌクレオチドのように、ｍｉＲ－３４治療薬は、二本鎖又は一本鎖であり得る。幾つかの実施形態において、ｍｉＲ－３４は、ｍｉＲ－３４ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ｍｉＲ－３４ｂ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）又はｍｉＲ－３４ｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）のシード配列を含む（表１）。幾つかの実施形態において、ｍｉＲ－３４は、ｍｉＲ－４４９ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、ｍｉＲ－４４９ｂ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）又はｍｉＲ－４４９ｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）のシード配列を含む（表１）。これらのマイクロＲＮＡは当該技術分野で周知であり、当業者は、それらが慣習的に自然に発生する配列（本明細書中に提供される）及び化学的に修飾されたもの並びにその相同配列も含むことを理解するだろう。一般的に、使用されるｍｉＲＮＡは、２つの異なる鎖あるいはヘアピン構造のいずれかを有する、１７－２５ヌクレオチド長の二本鎖ＲＮＡ分子である。二本鎖の内の１つはガイド鎖（ｇｕｉｄｅ　ｓｔｒａｎｄ）と呼ばれ、対応する与えられたｍｉＲＮＡのシード配列と同一又は実質的に相補的な配列を含む。本明細書中で使用される「実質的に相補的な」とは、最も多くて１つ又は２つのミスマッチ及び／あるいは欠失が認められることを意味する。幾つかの実施形態において、ガイド鎖は、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％又は１００％、シード配列と相同な配列を含む。幾つかの実施形態において、他方の鎖（「パッセンジャー鎖」（ｐａｓｓｅｎｇｅｒ　ｓｔｒａｎｄ））は、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％、本明細書中に提供されるそれぞれの完全長の配列の補体（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）と同一の配列を含む。様々なｍｉＲ－３４治療薬は、例えば、参照によって本明細書に組込まれる米国特許第８，１７３，６１１号、米国特許出願公開第２００９／０２２７５３３号及び２０１２／０２８８９３３号に記載されているもののように使用さ

れ得る。

【００３６】

【表１】

表１：miR-34ファミリー領域。配列の下線部はシード領域を示す。

SEQ ID 番号	名称	配列
SEQ ID NO:3	hsa-miR-34a	U**GGCAGUGU**CUUAGCUGGUUGUU
SEQ ID NO:4	hsa-miR-34b	UA**GGCAGUGU**CAUUAGCUGAUUG
SEQ ID NO:5	hsa-miR-34c	A**GGCAGUGU**AGUUAGCUGAUUGC
SEQ ID NO:6	hsa-miR-449a	U**GGCAGUGU**AUUGUUAGCUGGU
SEQ ID NO:7	hsa-miR-449b	A**GGCAGUGU**AUUGUUAGCUGGC
SEQ ID NO:8	hsa-miR-449c	UA**GGCAGUGU**AUUGCUAGCGGCUGU
SEQ ID NO:23	コンセンサス	***GGCAGUGU***UUAGCUG*UUG*

【００３７】

典型的に、ｍｉＲ－３４は、例えば米国特許第７，８５８，１１７号及び７，３７１，４０４号；米国特許出願公開第２００９／０３０６１９４号及び２０１１／０００９６４１号に記載されているもののようなリポソームにおいて処方される。発現ベクター、脂質又は様々なリガンド抱合体、ポリマーに基づくナノ粒子などを含む、他の送達技術が利用可能である。

【００３８】

ｍｉＲ－３４治療薬は、さらに化学的に修飾され得る；例えば、修飾されたｍｉＲ－３４は、パッセンジャー鎖上の５’キャップ（例えば、NH_2－（CH_2）$_6$－Ｏ－）及び／又は同じ鎖の１番目と２番目のヌクレオチドにミスマッチを有し得る。他の可能な化学修飾は、骨格修飾（例えば、ホスホロチオエート、モルフォリノ）、リボース修飾（例えば、２’－ＯＭｅ、２’－Ｍｅ、２’－Ｆ、２’－４’－固定／架橋糖（例えば、ＬＮＡ、ＥＮＡ、ＵＮＡ））と同様に核酸塩基修飾（例えば、Ｐｅａｃｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１．Ｊ　Ａｍ　Ｃｈｅｍ　Ｓｏｃ．，１３３（２４）：９２００-９２０３を参照）を含み得る。ある実施形態において、ｍｉＲ－３４は、米国特許第７，９６０，３５９号及び米国特許出願公開第２０１２／０２７６６２７号並びに２０１２／０２８８９３３号に記載されているような修飾を有する。

【００３９】

ｍｉＲ－３４治療薬は、様々な方法で、例えば、局所的に、経腸的に又は非経口的に投与され得る。具体的には、非経口的送達は静脈内又は皮下投与を含み得る。例えば、ｍｉＲ－３４は、例えば、必要であれば２、４、６又は８週以上の間、１週間当たり１、２、３又はそれ以上の用量で、１用量当たり０．０１－３．０、０．０２５－１．０又は０．２５－０．５ｍｇ／ｋｇで、１用量当たり約０．００１－１０．０ｍｇ／ｋｇの間の範囲の用量でのスローボーラス（ｓｌｏｗ－ｂｏｌｕｓ）注射として非経口的に投与され得る。

【００４０】

＜被検体／癌＞

本発明の方法において、被検体は動物、例えば、ヒト等の哺乳動物であり得る。幾つかの実施形態において、被検体は、癌を有する、癌の疑いのある又は癌になりやすいヒトであり得る。癌になりやすい被検体は、歴史的な（例えば、前癌）、環境上の（喫煙、過度の直射日光暴露、ある化学製品への暴露）又は遺伝上の（例えば、リンチ症候群）指標を有し得る。典型的な癌は、限定されないが、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、例えば

、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌）、膵癌、肝臓の癌、肝細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、前立腺癌、脳腫瘍、胃癌、膀胱癌、食道癌又は結腸癌を含む。幾つかの実施形態において、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性の癌細胞を有し得る。幾つかの実施形態において、被検体は、ｐ５３欠乏癌細胞を有し得る。ある例において、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性及びｐ５３欠乏の両方である癌細胞を有することがわかった。例えば、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$野性型（＋／＋）又はヘテロ接合性の（＋／－）遺伝子及びホモ接合性に不活化された（－／－）ｐ５３遺伝子を有する癌細胞を有すると決定され得る。別の例において、被検体は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$野性型（＋／＋）又はヘテロ接合性の（＋／－）遺伝子を有し、機能的なｐ５３タンパク質を欠失している癌細胞を有すると決定され得る。別の例において、被検体は、機能的なｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質及び機能的でないｐ５３タンパク質を有するか又はｐ５３タンパク質を欠失していると決定され得る。幾つかの実施形態において、被検体は、非ｍｉＲ－３４ｍｉＲＮＡ治療又は非ｍｉＲＮＡ治療等の先の第一選択療法に失敗しているかもしれない。例えば、被検体は、第一選択治療への１つ以上の顕著な副作用を経験したことがあり得る、又は第一選択治療は、被検体の癌細胞を処置しなかったかもしれない。例えば、ｍｉＲ－１９２又はｍｉＲ－２１５等の第一選択ｍｉＲＮＡ治療の投与は、被検体の癌細胞の増殖を止めない。幾つかの実施形態において、被検体は、原発性又は転移癌、あるいは第１、ＩＩ、ＩＩＩ又はＩＶ期の癌であり得る。

【００４１】

＜バイオマーカー＞

ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーは、ｍｉＲ－３４活性のための代理（ｐｒｏｘｙ）であり、例えば、その発現又は活性が、ｍｉＲ－３４が機能的に活性であることを示す分子である。例えば、ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーは、ＨＤＡＣ１、ｍｉＲ－３４と相互作用する分子、又はｍｉＲ－３４によって誘導される分子等のｍｉＲ－３４の直接的な標的であり得る。図１は、その一部がｐ５３と共通しており、その一部が別であるｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーであるｍｉＲ－３４の標的を示す。さらに以下に議論されるように、これらのバイオマーカーの発現レベル又は活性は、アッセイを使用して測定され得る。幾つかの態様において、ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーは、ｍｉＲ－３４活性の予測マーカーとして、つまり、被検体がｍｉＲ－３４治療薬にどのように反応するかを予測するために使用され得る。幾つかの態様において、ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーの発現レベル又は活性レベルの変化は、被検体がｍｉＲ－３４治療にどれくらいよく反応しているかを決定するために使用され得る。ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーは、限定されないが、以下に詳細に記載された、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$（ＣＤＫＮ１Ａ）（ＯＭＩＭ＃１１６８９９）（ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ：９）、ｐ５３（ＯＭＩＭ＃１９１１７０）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）、ＰＵＭＡ（ＯＭＩＭ＃６０５８５４）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、ＢＡＸ（ＯＭＩＭ＃６０００４０）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）、ＮＯＸＡ（ＯＭＩＭ＃６０４９５９）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３）、ＰＨＬＤＡ３（ＯＭＩＭ＃６０７０５４）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４）、ＭＤＭ２（ＯＭＩＭ＃１６４７８５）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５）、及びＨＤＡＣ１（ＯＭＩＭ＃６０１２４１）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６）を含む。これらのバイオマーカーの例及びそれらの配列表は、米国特許出願公開第２００８／０２７４９５６号、２０１０／０２９２０８５号、２００９／０２９８０５４号及び国際公開公報第２０００／０７５１８４号において議論されており、これらのすべては参照によって本明細書中に組み込まれる。

【００４２】

ｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーは、それが存在しない場合に、被検体をｍｉＲ－３４治療に反応しなくするバイオマーカー、つまりｍｉＲ－３４に反応のバイオマーカーである。例えば、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$（ＣＤＫＮ１Ａ）等のｍｉＲ－３４活性の幾つかのバイオマーカーは、ｍｉＲ－３４活性の必須バイオマーカーである一方で、例えば、ｐ５３等のｍｉＲ－３４活性の他のバイオマーカーはｍｉＲ－３４活性に必要ではない。例えば、ｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーは、ｍｉＲ－３４が被検体に活性であ

ることを示し得るが、それにもかかわらず、ｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーが存在しない場合、それらは被検体の治療の利益にならないことがある。ｍｉＲ－３４活性の必須のバイオマーカーは、限定されないが、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$（ＣＤＫＮ１Ａ）、ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２及びＨＤＡＣ１を含み得る。発現レベル又は活性レベルが参照レベル以上の場合、バイオマーカーは存在すると決定され、そうでなければ、バイオマーカーはないと決定される。参照レベルは、細胞のタイプ又は被検体に依存して変わり得る。例えば、参照レベルは、特定のアッセイによって検知できる最低レベルであり得る。例えば、参照レベルは、被検体のバイオマーカーのための発現又は活性の標準範囲と同等、あるいはその範囲内であり得る。例えば、バイオマーカーは、発現レベル又は活性レベルが参照レベルの、１％、２％、３％、４％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％あるいは９０％以内にある場合に存在すると決定され得る。

【００４３】

バイオマーカーは、第１のレベルのバイオマーカーの発現又は活性及び第２のレベルのバイオマーカーの発現又は活性の間に相対的な変化がある場合、ｍｉＲ－３４治療薬の有効性を示し得る。少なくとも３％、４％、５％、１０％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、９０％、９５％、９９％又は１００％の第１のレベル及び第２のレベルの間の相対的な変化は、ｍｉＲ－３４治療薬の有効性を示し得る。バイオマーカーに依存して、第２のレベルは、有効性を示す第１のレベルより高く又はより低くなり得る。例えば、第２のレベルは、ｐ２１等の、ｍｉＲ－３４治療薬に応じて上昇すると予想されるｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーのための第１のレベルより少なくとも５０％大きくなり得る。他の例において、第２のレベルは、ＨＤＡＣ１等の、ｍｉＲ－３４治療薬に応じて低下すると予想されるｍｉＲ－３４活性のバイオマーカーのための第１のレベルより少なくとも５０％小さくなり得る。

【００４４】

＜ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$＞

ヒトｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$は、サイクリン依存キナーゼ（ＣＤＫ）阻害剤をコードする遺伝子のＣＤＫＮ１Ａ上の染色体６ｐ２１．２に局在化されている。タンパク質ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$は、１９９２年に最初に述べられた（Ｘｉｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　７１：５０５－５１４（１９９２））。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$は、有力な腫瘍抑制因子であり、そのほかの点では、ｐ５３によって転写的に制御されることが知られており、ｐ５３の反応のために必要である。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の主要な機能は、サイクリン依存キナーゼ（ＣＤＫ）を阻害することによる細胞周期の停止及び増殖性細胞核抗原（ＰＣＮＡ）に結合することによるＤＮＡ合成の阻害を含む（Ａｂｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｃａｎｃｅｒ　９（６）：４００－１４（２００９））。しかしながら、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$は、さらに、ＷＮＴ４、ＳＴＡＴ３、ＭＹＣ及びＴＥＲＴによって制御されるものを含む、他の発癌経路を阻害し得る（Ａｂｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｃａｎｃｅｒ　９（６）：４００－１４（２００９））。

【００４５】

ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$は、サイクリン／ＣＤＫ複合体の活性の制御に関連するＣＫＩのＣｉｐ／Ｋｉｐファミリー（ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$、ｐ２７^{ＫＩＰ１}及びｐ５７^{ＫＩＰ２}）に属し、ＣＤＫの阻害を通してサイクリンが触媒する細胞周期の進行のプロセスを負に制御することを示した（米国特許出願公開第２００５／０４３２６２号）。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の変質は、細胞増殖の制御に悪影響を及ぼし、癌へのなりやすさを増加させ得る。そのようなｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の多形性は様々なヒトの癌で観察された。

【００４６】

ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性癌細胞は、機能的なｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の検出できる発現レベル又は活性レベルを有する癌細胞である。例えば、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$陽性癌細胞は、野性型のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$活性又は発現レベルを有する癌細胞

であり得る。例えば、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の活性レベルは、細胞増殖を測定すること又はｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$に向けられたｓｉＲＮＡを使用することによって検出され得る。

【００４７】

＜ｐ５３＞

上で議論されるように、腫瘍抑制因子ＴＰ５３（ｐ５３）は、３つのｍｉＲ－３４ファミリーすべての発現を転写的に誘導するが、癌において高い変異率を有している。ｐ５３が正常な癌細胞はｐ５３野性型の発現及び活性を有している。ｐ５３欠失癌細胞は、ｐ５３が正常な細胞より低い発現レベル及び／又は活性レベルを有する。ヘテロ接合性又はホモ接合性のＴＰ５３の変異を有する癌細胞はｐ５３欠失癌細胞である。例えば、ドミナントネガティブ変異を有する細胞はｐ５３欠失癌細胞である。幾つかの実施形態において、ｐ５３欠失癌細胞は少しも内在性のｐ５３を有しない。幾つかの実施形態において、ｐ５３欠失癌細胞は機能的なｐ５３を有しない。肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、例えば、腺癌、扁平上皮癌及び大細胞癌）、膵癌、肝臓の癌、肝細胞癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、前立腺、脳、胃、膀胱、食道、又は、結腸癌細胞はｐ５３欠失癌細胞であり得る。ｐ５３タンパク質あるいはｍＲＮＡの発現又は活性のレベルは、アッセイによって測定され得る。例えば、発現レベルは機能的なｐ５３タンパク質のレベルであり得る。例えば、ゲノムのテストはドミナントネガティブ変異を測定し得る。

【００４８】

＜他のバイオマーカー＞

ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３、ＭＤＭ２及びＨＤＡＣ１は、ｍｉＲ－３４活性の他の典型的なバイオマーカーである。ＰＵＭＡ、ＢＡＸ、ＮＯＸＡ、ＰＨＬＤＡ３及びＭＤＭ２はｍｉＲ－３４によって上方制御される。既知の薬物標的であるＨＤＡＣ１は、ｍｉＲ－３４ａで形質転換された細胞中で下方制御され、転写制御に関連付けられる。ＨＤＡＣ１の転写物は、その３’－非翻訳領域（ＵＴＲ）に、ｍｉＲ－３４に直接的に標的にされるｍｉＲ－３４結合部位を有しており、ＨＤＡＣ１を抑制する。

【００４９】

＜アッセイ＞

様々なアッセイが、本発明の方法を実施する際のパラメータを測定するために使用され得る。幾つかの実施形態において、アッセイは、直接的に又は間接的に遺伝子、ｍＲＮＡ及びタンパク質の発現あるいは活性を測定することができる。幾つかの実施形態において、活性アッセイは間接的に遺伝子、ｍＲＮＡあるいはタンパク質の発現レベルを測定するために使用され得る。通常のアッセイは、限定されないが、増殖反応アッセイ、定量的逆転写酵素ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ＥＬＩＳＡおよびウエスタン解析を含む。幾つかの実施形態において、アッセイは、被検体からの血液又は組織サンプル等の、例えば、腫瘍生検サンプルのような生体試料を使用して実施され得る。幾つかの実施形態において、他のパラメータは、処置に対する反応の指標として測定され得る。例えば、腫瘍サイズ、アポトーシスの割合、細胞増殖、脱毛等が測定され得る。

【００５０】

＜代替癌治療＞

本発明の方法は、非ｍｉＲ－３４　マイクロＲＮＡ治療又は非マイクロＲＮＡ治療等のｍｉＲ－３４治療薬以外の癌治療を使用できる。これらの治療は、ｍｉＲ－３４治療としてｍｉＲ－３４治療薬と共に使用され得、あるいは、それらは代替療法として使用され得る。ｍｉＲ－３４治療薬を除外する癌治療は、代替療法として本明細書中で参照されるだろう。例えば、代替療法は「第一選択」療法として、つまり、ｍｉＲ－３４治療薬を投与する前に使用され得る。幾つかの実施形態において、代替療法はマイクロＲＮＡ治療である。例えば、代替療法は、ｍｉＲ－２１５治療薬、ｍｉＲ－１９２治療薬、又はｍｉＲ－３４を除くマイクロＲＮＡ治療薬の組み合わせ等のマイクロＲＮＡであり得る。幾つかの実施形態において、代替療法は非マイクロＲＮＡ治療である。非マイクロＲＮＡ治療は、

限定されないが、中断された治療、化学療法、放射線、手術、緩和療法、標的治療等（例えば、ＥＧＦＲ－ＴＫＩ（例えばエルロチニブ、ゲフィチニブ等）、ベバシズマブ、クリゾチニブ）を含む。

【００５１】

＜概論＞

本発明の方法において、「投与」はいかなる特定の送達システムにも限定されず、限定されずに、非経口（皮下、静脈内、髄内、関節内、筋肉内又は腹腔内を含む）、直腸、局所的、経皮的又は経口（例えば、カプセル剤、懸濁剤又は錠剤）を含み得る。個体への投与は、単回投与、あるいは繰り返し投与並びに、様々な生理学的に許容可能な塩形態のうちのいずれか、並びに／又は許容可能な医薬品の担体並びに／又は医薬組成物の一部としての添加剤で生じ得る。生理学的に許容可能な塩の形態及び標準的な医薬製剤技術、用量並びに賦形剤は、当業者に周知である（例えば、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ’Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（ＰＤＲ（登録商標））２００５，５９ｔｈ ｅｄ．，Ｍｅｄｉｃａｌ Ｅｃｏｎｏｍｉｃｓ Ｃｏｍｐａｎｙ，２００４；ａｎｄ Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，ｅｄｓ．Ｇｅｎｎａｄｏ ｅｔ ａｌ．，２１ｓｔ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５を参照）。

【００５２】

さらに、１匹の動物において達成される有効な用量は、ヒトを含む別の動物に使用するために、当技術分野において既知の換算係数を使用して外挿され得る（例えば、Ｆｒｅｉｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５０（４）：２１９－２４４（１９６６）；表２の等価表面積投与量係数を参照されたい）。

【００５３】

【表２】

表２：等価表面積投与量係数

From: / To:	マウス (20 g)	ラット (150 g)	サル (3.5 kg)	イヌ (8 kg)	ヒト (60 kg)
マウス	1	0.5	0.25	0.17	0.08
ラット	2	1	0.5	0.25	0.14
サル	4	2	1	0.6	0.33
イヌ	6	4	1.7	1	0.5
ヒト	12	7	3	2	1

【００５４】

以下の実施例は、本発明の実例となる実施形態を提供する。当業者は、本発明の精神又は範囲を変更せずに実施され得る多数の修飾と変化を認識するだろう。そのような修飾及び変化は本発明の範囲内に含まれる。実施例は本発明をいかなる方法にも限定するものではない。

【実施例】

【００５５】

＜実施例１－材料及び方法＞

細胞培養、オリゴ（ｏｌｉｇｏｓ）及び増殖アッセイ。ＭＣＦ１０Ａ乳癌及びＳＷ４８由来の同質遺伝子的な癌細胞、ＨＣＴ１１６、ＤＬＤ－１並びにＲＫＯ結腸直腸癌細胞株を、Ｈｏｒｉｚｏｎ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｔｄ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）から得た。表３を参照されたい。合成ｍｉＲＮＡ模倣物及びｓｉＲＮＡは、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ａｍｂｉｏｎ、Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）から購入した。ＴＰ５３経路の刺激のために、細胞は、２８時間、１０μＭのエトポシドで前処置され、ＲＮＡは、ｑＲＴ－ＰＣＲ分析のために回収された。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００

（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）又はＲＮＡｉＭＡＸ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用する最適な形質転換の条件を、増殖に必要な紡錘体のタンパク質であるＥＧ５に対するｓｉＲＮＡを使用して細胞株ごとに決定した。リバーストランスフェクションを２重又は３重で実施した。簡単に、ＲＮＡｓｅを含まない水のオリゴ溶液５μｌを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）２０００（ＳＷ４８、ＭＣＦ１０Ａ、ＤＬＤ－１、ＨＣＴ１１６）あるいはＲＮＡｉＭＡＸ（ＲＫＯ）を含む、ウェル当たり２０μｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭ（登録商標）に添加した。混合物を、脂質ＲＮＡ複合体を形成するために室温で２０分間インキュベートした。その後、培地中で懸濁された細胞の７５μｌを、各細胞株の成長速度に依存して、ウェル当たり６，０００－１０，０００細胞の終濃度に達するように添加した。約１８時間後、上澄みを除去し、新鮮な培地と取り替えた。細胞増殖を、トランスフェクション後３－４日、ａｌａｍａｒＢｌｕｅ（登録商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を使用して決定した。ａｌａｍａｒＢｌｕｅ（登録商標）の基質は、生細胞の数に比例する、生細胞の蛍光産物に代謝的に変換される。非線形回帰及びＥＣ５０の値を、Ｇｒａｐｈｐａｄ（Ｐｒｉｓｍ）ソフトウェアを使用して計算した。すべてのＥＣ５０の値は、回帰曲線の９５％信頼区間内（Ｐ＜０．０５）にあった。本明細書中で使用されるＥＣ５０の値は最大半量のｍｉＲＮＡ活性として定義された。

【００５６】

【表３】

表３：同質遺伝子的な癌細胞株のＴＰ５３遺伝子型

細胞株	TP53 遺伝子型	アレル１	アレル２	その他の変異*
SW48 +/+ S W48 +/- SW 48 -/-	+/+ +/- -/-	WT WT 不活化	WT 不活化 不活化	CTNNB1, EGFR, FBXW7
HCT116 +/+ H CT116 +/- HC T116 -/-	+/+ +/- -/-	WT WT 不活化	WT 不活化 不活化	CTNNB1, CDKN2A, KRAS , MLH1, PIK3CA
RKO +/+ RKO +/- R KO -/-	+/+ +/- -/-	WT WT 不活化	WT 不活化 不活化	BRAF, NF1, PIK3CA
DLD-1 par DLD-1 +/- D LD-1 -/-	S241F/SIL +/SIL -/SIL	S241F WT 不活化	無変化 無変化 無変化	記載されていない
MCF10A +/+ MCF10A -/-	+/+ -/-	WT 不活化	WT 不活化	記載されていない

*Ｃａｔａｌｏｇｕｅ ｏｆ Ｓｏｍａｔｉｃ Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ（ＣＯＳＭＩＣ，ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ）のデータベースにより報告されているようなもの

【００５７】

定量的逆転写酵素ＰＣＲ。培養した同質遺伝子的な癌細胞株のＲＮＡの合計を、メーカーの指示書に従って、ｍｉｒＶＡＮＡ（商標）ＰＡＲＩＳ（商標）ＲＮＡ ｉｓｏｌａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ａｍｂｉｏｎ）を使用して単離した。ｍｉＲＮＡのｑＲＴ－ＰＣＲ検出のために、ＲＮＡと、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ａ、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１５、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９２、ｈｓａ－ｍｉＲ－１９４、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ｂ、及びｈｓａ－ｍｉＲ－３４ｃ（アッセイＩＤ ０００４２６、０００５１８、０００４９１、０００４９２、０

０２１０２、０００４２８；ＴａｑＭａｎ（登録商標）ｍｉＲＮＡ Ａｓｓａｙ，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）の各々のｍｉＲＮＡ特異的ＲＴプライマーの合計１０ｎｇを２分間、７０℃で熱変性させ、ＭＭＬＶ逆転写酵素（ｃａｔ．ｎｏ．２８０２５－０２１，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して逆転写した。ｍｉＲＮＡの発現レベルを、Ｐｌｕｔｉｎｕｍ Ｔａｑ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｒｅａｇｅｎｔｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及びＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ７９００ ＳＤＳ ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用するＰＣＲによって決定した。ＰＣＲ反応を、１分間で９５℃にサンプルを熱することにより実施し、続けて、複数のサイクルの間、５秒間９５℃及び３０秒間６０℃でサンプルをインキュベートした。ハウスキーピングｍｉＲＮＡのｍｉＲ－１９１及びｍｉＲ－１０３（アッセイＩＤ ００２２９９及び０００４３９）を、ウェルからウェルのＲＮＡの入力分散を調節するための内部基準として増幅させた。生のＣｔ値はハウスキーピングｍｉＲＮＡｓのＣＴの幾何平均に基準化され、未処置のｍｉＲ－ＮＣ又は擬似的に遺伝子導入された細胞との相対的な倍差（ｆｏｌｄ－ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅｓ）として表した。

【００５８】

ヒトｍＲＮＡの検出のために、ｒａｎｄｏｍ ｄｅｃａｍｅｒｓ（ＡＭ５７２２Ｇ、Ａｍｂｉｏｎ）を備えた合計１０ナノグラムのＲＮＡを使用してｃＤＮＡを作成した。遺伝子特異的な増幅を、多数のＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して実行した。ハウスキーピングＧＡＰＤＨとシクロフィリンＡ（Ｔａｑｍａｎ（登録商標）；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のｍＲＮＡレベルをローディング対照として使用した。上記のように、生のＣｔをハウスキーピングｍＲＮＡのそれに基準化し分析した。

【００５９】

部位特異的な突然変異誘発。ヒトＨＤＡＣ１の３’ＵＴＲ全体に融合されたルシフェラーゼレポーターをコードするヒトＨＤＡＣ１の３’－ＵＴＲレンチレポータールシフェラーゼベクター（ｐＬｅｎｔｉ－ＵＴＲ－Ｌｕｃ ＨＤＡＣ１，ＨＤＡＣ１ ｗｔ）を、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，Ｉｎｃから購入した。突然変異誘発の２ラウンドを、ＨＤＡＣ１’３－ＵＴＲのｍｉＲ－３４結合部位（ＨＤＡＣ１ ｍｕｔ）に６つの点突然変異を誘導するために実施した。部位特異的な突然変異のために、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ ＸＬ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）をメーカーの指示書に従って使用した。第１のラウンドでは、次のプライマーを使用した：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１７（ＣＣＴＣＡＡＧＴＧＡ ＧＣＣＡＡＧＡＡＡＣ ＡＡＴＡＡＣＴＧＣＣ ＣＴＣＴＧＴＣＴＧＴＣ）及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１８（ＧＡＣＡＧＡＣＡＧＡ ＧＧＧＣＡＧＴＴＡＴ ＴＧＴＴＴＣＴＴＧＧ ＣＴＣＡＣＴＴＧＡＧＧ）。陽性クローンを配列決定（ＵＴ Ａｕｓｔｉｎ）により確認し、次のプライマーを使用して、突然変異誘発の第２のラウンドのための鋳型として使用した：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９（ＧＧＣＣＴＣＡＡＧ ＴＧＡＧＣＣＡＡＡＡ ＡＴＡＡＡＴＡＡＣＴ ＧＣＣＣＴＣＴＧＴＣ ＴＧＴＣ）及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０（ＧＡＣＡＧＡＣＡＧＡ ＧＧＧＣＡＧＴＴＡＴ ＴＴＡＴＴＴＴＴＧＧ ＣＴＣＡＣＴＴＧＡＧ ＧＣＣ）。遺伝子導入で使用されるすべてのベクターを、配列決定によって確認した。

【００６０】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ。ＳＷ４８$^{-/-}$及びＨ１２９９細胞を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用して９６ウェルプレート中で、それぞれ１ｎＭ又は１０ｎＭのｍｉＲ－３４ａで逆転写した。対照として、細胞を同じ濃度のｍｉＲ－ＮＣで遺伝子導入した。翌日、細胞を、各々１００ｎｇのＨＤＡＣ１ｗｔ又はＨＤＡＣ１ｍｕｔルシフェラーゼプラスミドで先に遺伝子導入した。４８時間後、細胞溶解物を調製し、ＰｉｅｒｅｃｅのＢＣＡシステム（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して定量した。発光を、ＰＯＬＡＲＳｔａｒ ＯＰＴＩＭＡプレート・リーダ（ＢＭＧ Ｌａｂｔｅｃｈ）及びＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｓ

ｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して決定した。発光を総タンパク質入力で基準化した。

【００６１】

ウエスタン解析。２００，０００個のＳＷ４８及びＲＫＯ細胞を、６ウェルプレート中に播種し、２．５μｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００又はＲＮＡｉＭａｘを使用して６ウェルプレート中においてｍｉＲＮＡの模倣物及びｓｉＲＮＡで逆転写した。３日後、ＲＩＰＡバッファー（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）中で細胞溶解物を収集し、タンパク質濃度をＴｈｅｒｍｏ　ＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃのＢＣＡアッセイキットを使用して測定した。総細胞溶解物の２．５μｇを、それぞれ１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにロードし、その後、ＰＶＤＦ膜に移した。膜を、ｐ２１、ＨＤＡＣ１、ｃ－ＭＥＴ及びアクチン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）用の特定の一時抗体で、４℃で一晩ブロットした。膜を、Ｔｗｅｅｎ（商標）－２０を０．２％含む１×リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中で洗浄し、室温で１時間、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体でインキュベートした。Ｔｗｅｅｎ（商標）－２０を０．２％含む１×ＰＢＳで洗浄後、膜をＥＣＬ検出試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）でインキュベートし、タンパク質のバンドをＡＦＰ　Ｘ－ｒａｙ　ｆｉｌｍ　ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ（ＡＦＰ　Ｉｍａｇｅ　Ｃｏｒｐ．）を使用して可視化した。

【００６２】

ヒト組織サンプル。ＮＳＣＬＣ腫瘍サンプル及び対応する正常隣接組織（ＮＡＴ）はＰｒｏｔｅｏＧｅｎｅｘとＮａｔｉｏｎａｌ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈａｎｇｅから購入した。ＨＤＡＣ１　ｍＲＮＡ及びｍｉＲ－３４ａのレベルを、ｑＲＴ－ＰＣＲにより決定し、各腫瘍及びＮＡＴペア間の相対的な発現として示した。直線回帰を、ＧｒａｐｈＰａｄを使用して計算した。

【００６３】

統計解析。統計解析を、Ｅｘｃｅｌ及びＧｒａｐｈｐａｄ（Ｐｒｉｓｍ）ソフトウェアを使用して行った。平均及び標準偏差を二重又は三重の実験から計算した。Ｐ値を、図の説明文中で示されるように、両側スチューデントｔ検定又はＦ検定によって得た。

【００６４】

＜実施例２－ｍｉＲ－３４による癌細胞の増殖の阻害はＴＰ５３に依存しない＞

本研究で使用された同質遺伝子的な細胞は、ＭＣＦ１０Ａ乳癌並びに結腸直腸癌細胞株ＳＷ４８、ＨＣＴ１１６、ＲＫＯ及びＤＬＤ－１に由来する（表３を参照のこと）。これらの細胞では、ＴＰ５３は、野性型（＋／＋）ヘテロ接合型（＋／－）又はホモ接合性不活性化型（－／－）のいずれかである（Ｓｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０６（１０）：３９６４－９（２００９））。親ＤＬＤ－１細胞（ＤＬＤ－１^{ｐａｒ}）は、１つの対立遺伝子が変異されており、他方が局所的に（ｅｐｉｔｏｐｉｃａｌｌｙ）発現抑制されたＳ２４１Ｆ／ＳＩＬ　ＴＰ５３の遺伝子型のため、機能的なＴＰ５３タンパク質を発現しない。したがって、点突然変異が部位特異的な突然変異誘発によって修正されているＤＬＤ－１$^{＋／ＳＩＬ}$細胞（＋／－）は、無傷なＴＰ５３を備えたＤＬＤ－１の参照株として役立つ（Ｓｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０６（１０）：３９６４－９（２００９））。各非同質遺伝子的な細胞株は、他の癌抑制遺伝子及びｍｉＲＮＡの阻害作用に影響を与え得る癌遺伝子における変異を示す（表３を参照のこと）。

【００６５】

同質遺伝子的な細胞株におけるＴＰ５３の連続的な不活性化を確認するために、ＴＰ５３の反応を、２８時間、ＤＮＡ損傷試薬のエトポシドに細胞を暴露することにより誘導し、すべてのＲＮＡを回収した。定量的逆転写酵素ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）解析は、それらの遺伝子型に従って、ＴＰ５３のｍＲＮＡ及びＴＰ５３に調節される標的遺伝子における対立遺伝子に依存する増加を示した（図２Ａ－２Ｅ）。ＴＰ５３のｍＲＮＡはＴＰ５３$^{－／－}$細胞中で検出できなかった。ＴＰ５３に調節される遺伝子の増加したｍＲＮＡレベルは、公表されたデータ（Ｂｒａｄｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１４５（４）：５７１

－８３（２０１１））に類似しており、おそらくこれらの遺伝子の細胞タイプ特異的な調節のために細胞株間で異なっている。同様に、ＴＰ５３に調節されるｍｉＲＮＡ、ｍｉＲ－３４ａ／ｂ／ｃ、ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９４及びｍｉＲ－２１５の誘導は、細胞株に依存し（すべての細胞株だがＤＬＤ－１$^{+}$／$^{-}$は、ｍｉＲ－３４ｂ／ｃの発現を欠失していた）、ｍｉＲ－２１５はＳＷ４８及びＤＬＤ－１細胞において単独で検出された。

【００６６】

同質遺伝子的な細胞を、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－３４ｃ、ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９４及びｍｉＲ－２１５の模倣物で遺伝子導入した。用量反応曲線を作成し、ＥＣ５０の値を計算するために、段階希釈でｍｉＲＮＡを使用した。負の対照として、疑似的に遺伝子導入された細胞及び組み替えられた（ｓｃｒａｍｂｌｅｄ）配列を運ぶｍｉＲＮＡで遺伝子導入された細胞を使用した（ｍｉＲ－ＮＣ）。インキュベーションの３－４日後、細胞増殖を、ａｌａｍａｒＢｌｕｅ（商標登録）を使用して評価した。図３に示されるように、ｍｉＲＮＡの模倣物は、対照と比較して４０－８０％まで細胞増殖を阻害した。ＴＰ５３は、癌細胞を阻害するｍｉＲ－２１５及びｍｉＲ－１９２の能力を増強し、ＴＰ５３$^{+}$／$^{+}$細胞と比較して２８－３５倍低いＥＣ５０の値を備えたＭＣＦ１０Ａ及びＳＷ４８細胞で最も大きかった（表４を参照のこと）。対照的に、ｍｉＲ－３４ａ及びｍｉＲ－３４ｃの阻害活性は、ＴＰ５３陽性及びＴＰ５３陰性細胞と同じであった（図３Ａ－６Ｄ、表４を参照のこと）。ＲＫＯ細胞は、ＴＰ５３がない状態でより大きな阻害を示し、さらに、ＴＰ５３がｍｉＲ－３４によって誘導される表現型に必須ではないことを実証した（図７Ａ－７Ｂ）。興味深いことに、無傷のＴＰ５３が存在する状態において、ｍｉＲ－２１５／１９２の最大の阻害活性はｍｉＲ－３４ａ／ｃの最大活性よりも大きく、これは、ｍｉＲ－２１５／１９２がＴＰ５３の正のフィードバックループ中で機能し、ＴＰ５３によって排他的に制御される補助的な経路を利用することを示唆している。

【００６７】

【表４】

表４：同質遺伝子的な癌細胞のｍｉＲＮＡのＥＣ５０*値

miRNA	SW48 p53 -/-	SW48 p53 +/+	$EC50^{TP53wt}$: $EC50^{TP53-/-}$ ‡
miR-34a	0.59	0.62	1.0
miR-34c	0.38	0.40	0.9
miR-215	40.21	1.50	26.9
miR-192	21.56	0.76	28.3
	MCF10A p53 -/-	**MCF10A p53 +/+**	**$EC50^{TP53wt}$: $EC50^{TP53-/-}$ ‡**
miR-34a	0.11	0.04	2.7
miR-34c	0.10	0.04	2.9
miR-215	5.42	0.17	31.8
miR-192	6.79	0.19	35.3
	DLD-1 p53 -/-	**DLD-1 p53 +/-**	**$EC50^{TP53wt}$: $EC50^{TP53-/-}$ ‡**
miR-34a	0.39	0.39	1.0
miR-34c	1.34	0.38	3.6
miR-215	0.69	0.26	2.7
miR-192	0.63	0.22	2.9
	HCT116 p53 -/-	**HCT116 p53 +/+**	**$EC50^{TP53wt}$: $EC50^{TP53-/-}$ ‡**
miR-34a	1.03	1.02	1.0
miR-34c	0.86	0.83	1.0
miR-215	1.07	0.31	3.5
miR-192	1.10	0.50	2.2

*ＥＣ５０値はＰｒｉｓｍソフトウェアで生成され、近似曲線（Ｐ〈０．０５）の９５％の信頼区間内にあった。値はｎＭで示される。
‡比率は、ＴＰ５３陽性とＴＰ５３陰性の細胞中のＥＣ５０値の倍差（ｆｏｌｄ－ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅｓ）を示す。

【００６８】
＜実施例３－ｍｉＲ－２１５ではなくｍｉＲ－３４ａが、ＴＰ５３がない状態でのＴＰ５３に調節される遺伝子を誘導する＞
ＴＰ５３陽性及びＴＰ５３欠乏細胞中のｍｉＲ－３４に誘導される表現型を理解するために、ＴＰ５３／ｍｉＲ－３４系に関連する遺伝子の発現レベルを決定した。ＴＰ５３に依存しない効果の考えられる１つの説明は、これらの細胞が内在性のＳＩＲＴ１又はＭＤＭ４を発現しないということである。しかしながら、ｑＲＴ－ＰＣＲによって確認されるように、$TP53^{+/+}$及び$TP53^{-/-}$細胞の両方は、検出できるＳＩＲＴ１及びＭＤＭ４のｍＲＮＡのレベルを保持し、これは、ＴＰ５３非依存型の表現型がこれらの遺伝子産物の欠失によらないことを示唆する（図８）。むしろ、両方のｍＲＮＡは、このｍｉＲＮＡによってＳＩＲＴ１及びＭＤＭ４が直接的に標的とされることを示す実験データに従って、ｍｉＲ－３４で遺伝子導入された細胞の中で減少した（非特許文献２１－２２）。同様に、ｍｉＲ－３４ａの標的のＭＥＴ及びｍｉＲ－２１５の標的のＢＣＬ２は、それぞれのｍｉＲＮＡによって遺伝子導入された細胞の中で特異的に下方制御された（図８）。ＴＰ５３のｍＲＮＡのレベルは、その定義された遺伝子型と一致して、$SW48^{-/-}$細胞において検出できなかった。$SW48^{+/+}$細胞において、ＴＰ５３のｍＲＮＡレベルは一定で、これらのｍｉＲＮＡによるＴＰ５３への正のフィードバックループがＴＰ５３の新規合成を必要としないが翻訳後に生じるという仮説に一致している。これは、ｍｉＲ－２１５がＴＰ５３陽性細胞中の$p21^{CIP1/WAF1}$（ｐ２１、ＣＤＫＮ１Ａ）の発現を誘導することを示す観察によってさらに実証されるが、ＴＰ５３欠乏細胞中ではそうではない。意外なことに、ｍｉＲ－３４ａは、$TP53^{+/+}$細胞だけでなくＴＰ５

３欠失細胞のｐ２１、ＰＵＭＡ及びＭＤＭ２を誘導することができた（図８）。この現象がＳＷ４８に特異的ではないことを保証するために、我々は、ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された他のすべての同質遺伝子的な癌細胞をテストし、ＴＰ５３によって転写的に制御される他の遺伝子にまで分析を拡張した。これらは、ＡＫＴ／ＰＫＢの負の制御因子として機能するＰＨドメインのみのタンパク質である腫瘍抑制因子のＰＨＬＤＡ３と同様に、アポトーシス促進性のタンパク質ＢＡＸ及びＮＯＸＡを含む（Ｋａｗａｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１３６：５３５－５０（２００９））。ＳＷ４８細胞からのデータに一致して、ｍｉＲ－３４ａは、機能的なＴＰ５３が存在する状態だけでなく、存在しない状態においても、６つの転写物の蓄積を誘導した（図９Ａ及び９Ｂ）。

【００６９】

＜実施例４－ＨＤＡＣ１はｍｉＲ－３４ａの直接的な標的である＞

ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$のＴＰ５３に依存しない上方制御のもっともらしい説明は、他のＴＰ５３ファミリーである、ＴＰ６３及びＴＰ７３の潜在的な関与である。両タンパク質は、ＴＰ５３とは異なる役割を果たす；しかしながら、それらは、さらに、ＴＰ５３のそれと重複する遺伝子のセットを制御する。ＴＰ６３及びＴＰ７３の内在性のｍＲＮＡレベルを、ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入されたＴＰ５３野生型及びＴＰ５３欠失細胞中で測定した。しかしながら、どの細胞も、これらの遺伝子産物の関与がありそうもないことを示唆する、検出できるレベルのＴＰ６３又はＴＰ７３を示さなかった（データは示していない）。

【００７０】

次に、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現を制御できるＴＰ５３及び核制御因子に依存しない制御機構を分析した。興味のある候補の１つはＨＤＡＣ１であり、なぜならば、その３’ＵＴＲに推定上のｍｉＲ－３４ａ結合部位を有しており（図１０）、ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された細胞中で下方制御され（図１１）、ＴＰ５３が存在しない状態でのｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の転写制御に関係づけられるためである（Ｌａｇｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ　２３（８）：２６６９－７９（２００３））。ＨＤＡＣ１がｍｉＲ－３４ａによって直接的に抑制されるかどうかを証明するために、ｍｉＲ－３４ａを、ＨＤＡＣ１　３’ＵＴＲ全体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１）に融合するルシフェラーゼレポーターを抑制することができるかどうかを決定するために調べた。このレポーターは、内在性のｍｉＲ－３４ａを欠く２つの細胞株中で一時的に発現された。その後、細胞は、ｍｉＲ－３４ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）又はｍｉＲ－２１５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）で遺伝子導入され、後者は、ＨＤＡＣ１の抑制は予測されず、負の対照として使用された。図１２Ａ中で示されるように、ｍｉＲ－３４ａの遺伝子導入は、制御に関連する両細胞株において５０％まで発光を減少させた。この抑制は、ｍｉＲ－３４ａ結合部位（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２）の変異で完全に消され（図１２Ａ）、これは、ＨＤＡＣ１　３’ＵＴＲがこの部位でｍｉＲ－３４ａに直接的に標的にされていることを示唆する。ＨＤＡＣ１のｍｉＲ－３４ａに依存する抑制がヒト腫瘍標本に反映されるかどうかをさらに評価するために、ｍｉＲ－３４ａの発現レベルを減少させた文献（非特許文献９）において以前使用された１４の非小細胞肺癌サンプルのコホートを調べた。腫瘍ＨＤＡＣ１のｍＲＮＡ及びｍｉＲ－３４ａのレベルを、ｑＲＴ－ＰＣＲによって決定し、それぞれの正常隣接組織のレベルに基準化した。ピアソン法による分析は、ＨＤＡＣ１のｍＲＮＡ及びｍｉＲ－３４ａのレベル間の統計的に有意な逆相関を示し（図１２Ｂ）、これは、ヒト腫瘍中のＨＤＡＣ１の制御において、ｍｉＲ－３４ａの役割を支援する。

【００７１】

＜実施例５－ＨＤＡＣ１の阻害はｍｉＲ－３４ａの表現型を模倣する＞

以前の結果は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$遺伝子の制御にＨＤＡＣ１を関連付けた。例えば、ＨＤＡＣ１欠乏胚性幹細胞は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の高められたレベルを示し、ＨＤＡＣ阻害剤のトリコスタチンＡ（ＴＳＡ）を使用するＨＤＡＣ１の阻害は、ＴＰ５３がない場合でのｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現を誘導し得る（Ｓｏｗａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７；　Ｌａｇｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００２）。ＨＤＡＣ１の枯渇におけ

るｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$のＴＰ５３に依存しない誘導を確認するために、我々は、ＨＤＡＣ１にｓｉＲＮＡでＴＰ５３陰性細胞を遺伝子導入し、ウエスタンブロットによって細胞溶解物を評価した。結果をｍｉＲ－３４ａ又はｍｉＲ－２１５で遺伝子導入された細胞と比較した。２つの細胞株をテストし、負の対照として擬似的な及びｍｉＲ－ＮＣで処理された細胞を含めた。予想通りに、ｍｉＲ－３４ａで遺伝子導入された細胞中で、Ｍｅｔは単独で下方制御され、ＨＤＡＣ１タンパク質は、ｍｉＲ－３４ａ及びＨＤＡＣ１のｓｉＲＮＡの両方によって減少した（図１３－１４）。注目すべきことに、両方のオリゴヌクレオチドは、これらの細胞のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質の発現の著しい増大を誘導した。この観察は、ＴＰ５３欠乏細胞のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を誘導しなかったｍｉＲ－２１５と著しく対照的であった。しかしながら、ＴＰ５３陽性細胞へのｍｉＲ－２１５の遺伝子導入は、ｍｉＲ－２１５からＴＰ５３までの正のフィードバックループの結果として、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$のｍｉＲ－２１５に依存する誘導はＴＰ５３によって触媒されるという仮説（Ｐｉｃｃｈｉｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ １８（４）：３６７－８１（２０１１））と一致して、ＴＰ５３陽性細胞のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質の増加をもたらした（図１５）。

【００７２】

ＨＤＡＣ１の阻害がｍｉＲ－３４ａの表現型を模倣できるかどうかを調査するために、我々は、ＴＰ５３陽性及びＴＰ５３欠乏のＳＷ４８細胞の両方のＨＤＡＣ１に対するｓｉＲＮＡの増殖効果を測定した。さらに、細胞を、ＴＰ５３の機能に拮抗できる遺伝子産物に対して向けられた一連の他のｓｉＲＮＡで遺伝子導入した。これらの遺伝子は、確認された又は予測されたｍｉＲ－３４ａの標的のどちらかであり、ｍｉＲ－３４ａに遺伝子導入された細胞の中で抑制された少数の他のものと同様に、ＹＹ１、ＭＤＭ４及びＳＩＲＴ１を含む（データは示していない）。ｓｉＲＮＡの一時的な遺伝子導入は、ｑＲＴ－ＰＣＲによって確認されるような標的ｍＲＮＡの８０％を越えるノックダウンをもたらした（図１６Ａ－１６Ｇ）。さらに対照として、細胞を、ｍｉＲ－３４ａ及びｍｉＲ－２１５で遺伝子導入した。我々は、両細胞株で同じである癌細胞の阻害のレベルをもたらすｓｉＲＮＡを同定しようとした。予想通りに、ｍｉＲ－３４ａは等しくＳＷ４８$^{＋／＋}$及びＳＷ４８$^{－／－}$細胞を阻害し、ｍｉＲ－２１５の活性はＴＰ５３に依存した（図１７）。ほとんどのｓｉＲＮＡは、ＳＩＲＴ１及びＹＹ１に対するｓｉＲＮＡを含む一方の細胞タイプ中の細胞増殖を減少しなかった。ＭＤＭ４のノックダウンは、ＳＷ４８$^{＋／＋}$細胞の増殖を阻害できたが、ＳＷ４８$^{－／－}$細胞において効果を有しなかった。これはｍｉＲ－２１５の表現型を暗示し、ＤＮＡ制御よりむしろＴＰ５３のトランス活性化を調整する際のＭＤＭ４の役割を確認する（Ｔｏｌｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，２００６）。対照的に、ＨＤＡＣ１のノックダウンは、ｍｉＲ－３４ａと同様に癌細胞の成長を阻害し、それは同質遺伝子的な両細胞株において同じであった。同様の結果を、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を通してｍｉＲ－３４ａの反応を触媒する際のＨＤＡＣ１のための役割をさらに実証する、トリコスタチンＡで処置された細胞から得た（図１８Ａ－１８Ｂ）。

【００７３】

＜実施例６－ｐ２１の枯渇は癌細胞の増殖のｍｉＲ－３４ａによって誘導される阻害を妨げる＞

様々な細胞株において作成された用量反応データは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現が癌細胞の増殖のｍｉＲ－３４ａによって誘導される阻害において重要なイベントであることを示唆する。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現レベルはＴＰ５３陽性及びＴＰ５３陰性の細胞を阻害するｍｉＲ－３４ａの能力と著しく関連する。例えば、ｍｉＲ－３４ａの阻害活性は、ＭＣＦ１０Ａ及びＳＷ４８細胞において同じであり、ＴＰ５３$^{－／－}$及びＴＰ５３$^{＋／＋}$細胞の両方におけるｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の同じ発現レベルと関連していた（図３）。ＨＣＴ１１６細胞は、より高いｍｉＲ－３４ａの濃度（３０ｎＭ、図３）でのＴＰ５３$^{＋／＋}$細胞中のｍｉＲ－３４ａの阻害活性をわずかに増加させたものと一致して、ＴＰ５３$^{＋／＋}$細胞と比較してＴＰ５３$^{－／－}$においてより高いｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$のｍＲＮＡのレベルを示した。ＲＫＯ細胞において、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$

のレベルは、ＴＰ５３$^{-/-}$細胞においてより高く、ＲＫＯ$^{-/-}$対ＲＫＯ$^{+/+}$細胞における増殖の大きな阻害を反映した（図７Ａ－７Ｂ）。さらに、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の誘導は、低いｍｉＲ－３４ａの濃度で明白であり、細胞増殖の阻害と逆に関連していた（図１９）。

【００７４】

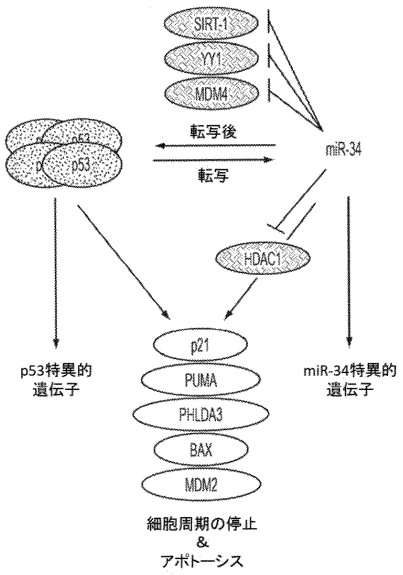
ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現がｍｉＲ－３４ａによって誘導される表現型に必要とされるかどうかについて取り組むために、我々は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$に対して向けられたｍｉＲ－３４ａ及びｓｉＲＮＡで共遺伝子導入する細胞による干渉アッセイを実施した。対照として、細胞を、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－２１５又はｍｉＲ－ＮＣで遺伝子導入した。それぞれのｍｉＲＮＡを、遺伝子導入されたＲＮＡの総量がｍｉＲ－３４ａ／ｓｉ－ｐ２１の組み合わせの１つと等しくなるように、負の対照のオリゴで補った。標的とされた遺伝子の下方制御は、ウエスタン解析によって証明された（図２０）。ｍｉＲ－３４ａだけが、ＲＫＯ細胞の増殖を２０－３０％まで減少させた（図２１）。対照的に、ｍｉＲ－３４ａ／ｓｉ－ｐ２１の組み合わせは癌細胞の増殖に効果がなく、これは、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現が実際にｍｉＲ－３４の腫瘍抑制因子の反応を触媒するために必要な因子であることを示唆する。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$に依存する表現型は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を欠く同質遺伝子的なＳＷ４８癌細胞（図２２）及びＴＰ５３陰性のＨｅｐ３Ｂ肝細胞癌細胞（図２３）において再現できた。

【００７５】

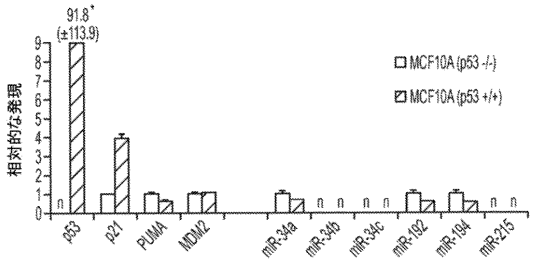
＜実施例７－インビボでのｍｉＲ－３４ａの模倣物の全身送達は、腫瘍のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の発現を誘導する＞

ｍｉＲ－３４ａが癌を有する動物のｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の上方制御を誘導するかどうかについて取り組むために、Ｈｅｐ３Ｂ肝細胞癌細胞を、ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの肝臓の外側左葉へ外科的に移植した。Ｈｅｐ３Ｂ癌細胞は機能的なＴＰ５３を欠いている。約５週間後、検出できる大きな腫瘍をマウスが発達させた時、マウスの体重１ｋｇ当たり１ｍｇの濃度でｍｉＲ－３４ａの模倣物の１用量を、静脈内尾静脈注射によって投与した。ｍｉＲ－３４ａの模倣物は、ｍｉＲ－３４ａの模倣物を含むリポソーム製剤である。１ｍｇ／ｋｇの用量は、２０μｇのｍｉＲ－３４ａと等しい。２４時間後、マウスを屠殺し、タンパク質溶解物の調製に使用する腫瘍組織を収集した。ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質の発現を決定するために、ウエスタン解析によって溶解物を調査した。図２４Ａに示されるように、３匹のＭＲＸ３４処置マウスのうちの２匹が高レベルでｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を発現した。対照的に、対照の腫瘍のどれもが、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$タンパク質の高められた発現を示さなかった。同様に、ｍｉＲ－３４ａで一時的に遺伝子導入されたＨｅｐ３Ｂ細胞は、ｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$の上方制御を示した。図２４Ｂを参照されたい。データは、ｍｉＲ－３４ａに基づく治療が機能的なＴＰ５３を欠く腫瘍においてｐ２１$^{ＣＩＰ１／ＷＡＦ１}$を誘導できることを示唆する。

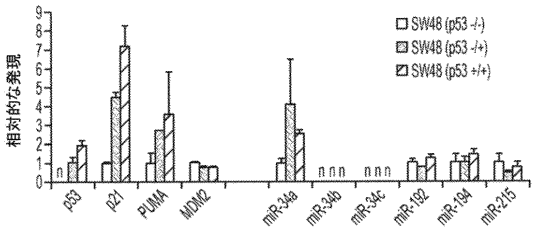
【図１】



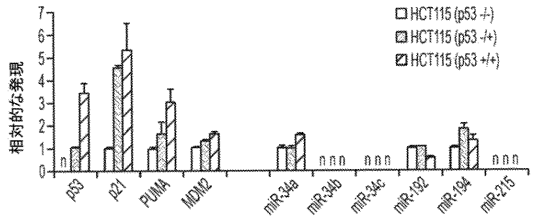
【図２Ａ】



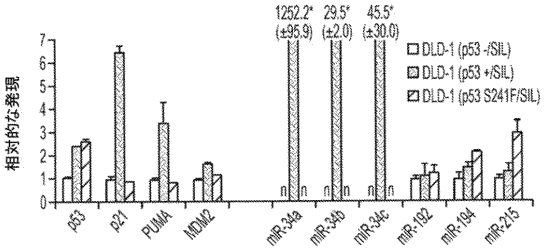
【図２Ｂ】



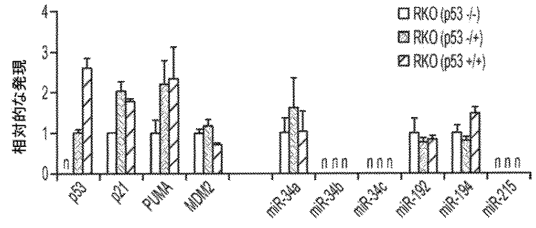
【図２Ｃ】



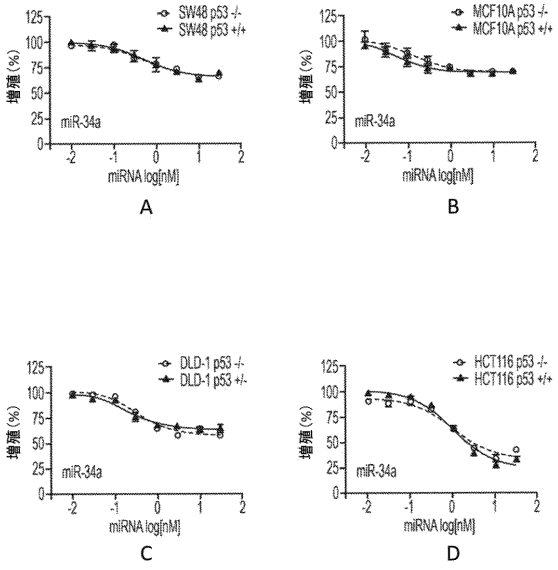
【図２Ｄ】



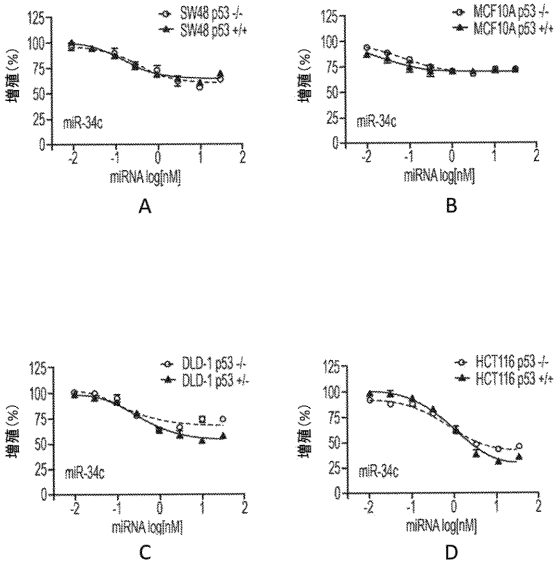
【図２Ｅ】



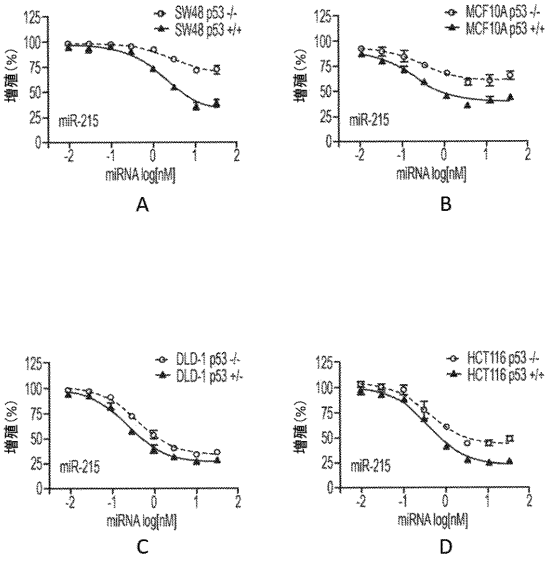
【図３】



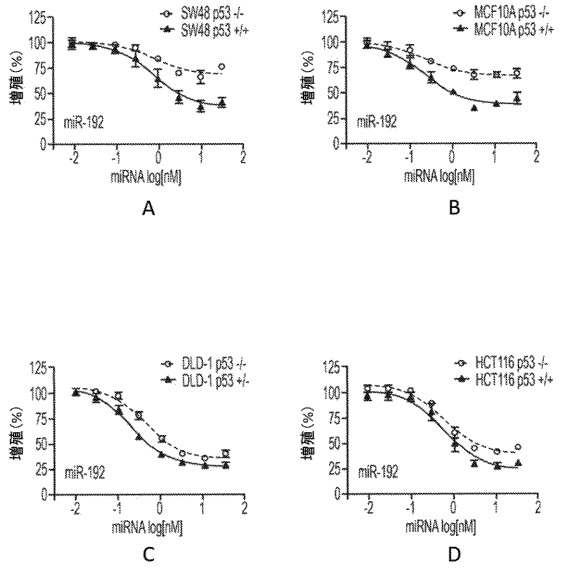
【図４】



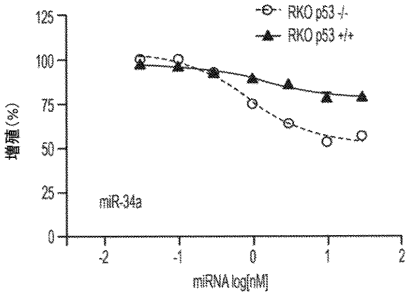
【図５】



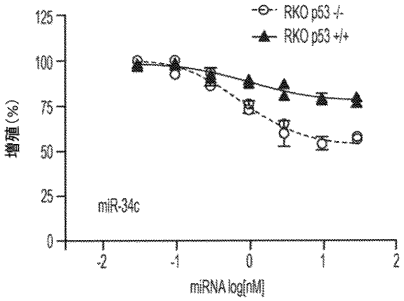
【図６】



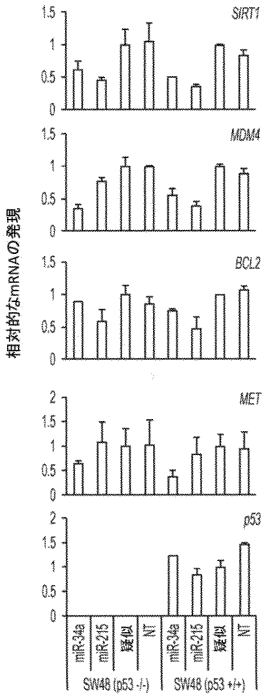
【図７Ａ】



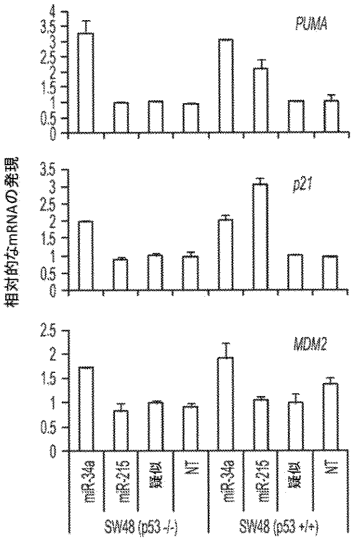
【図７Ｂ】



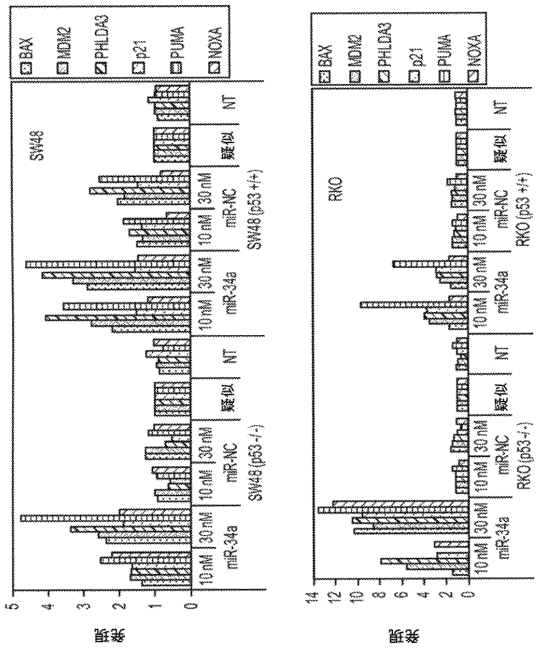
【図８Ａ】



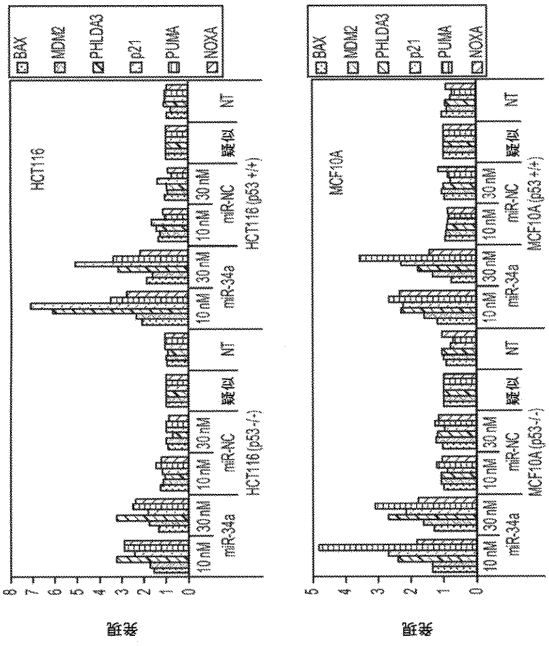
【図８Ｂ】



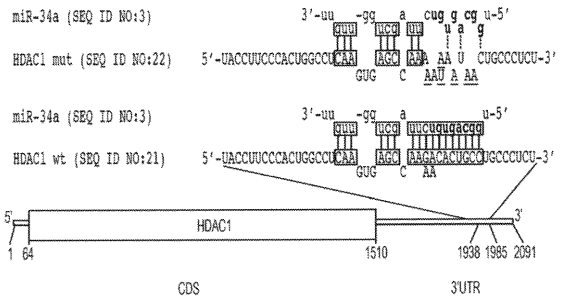
【図９Ａ】



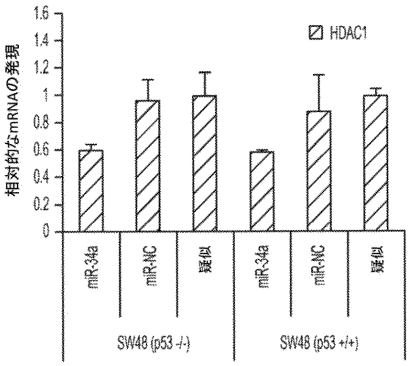
【図９Ｂ】



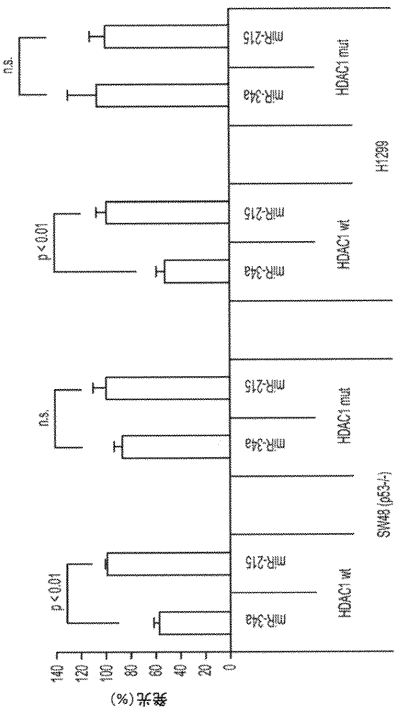
【図１０】



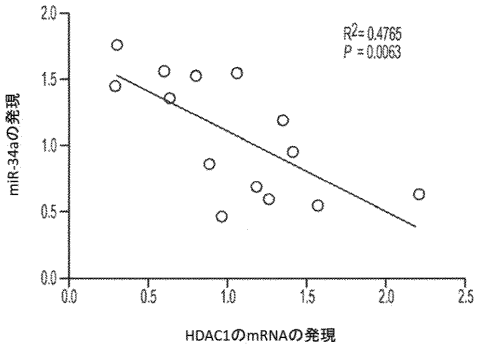
【図１１】



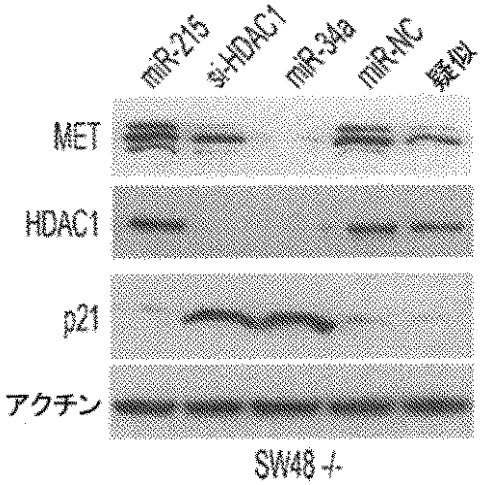
【図１２Ａ】



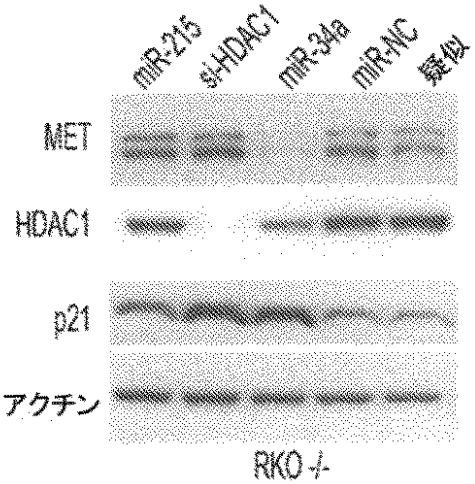
【図１２Ｂ】



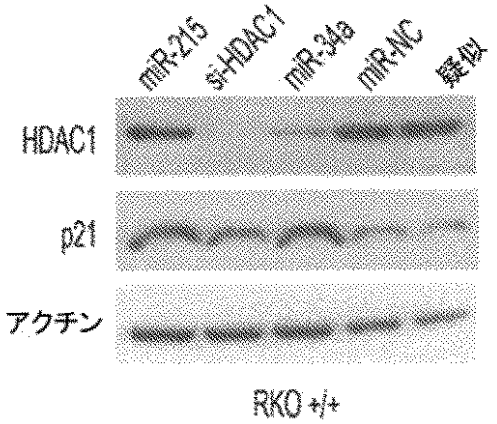
【図１３】



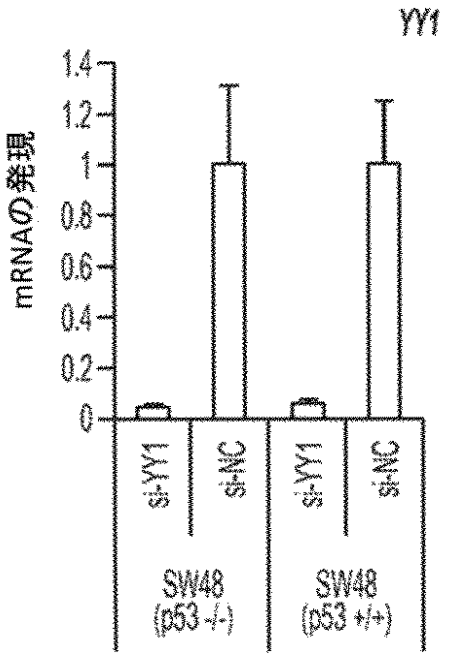
【図１４】



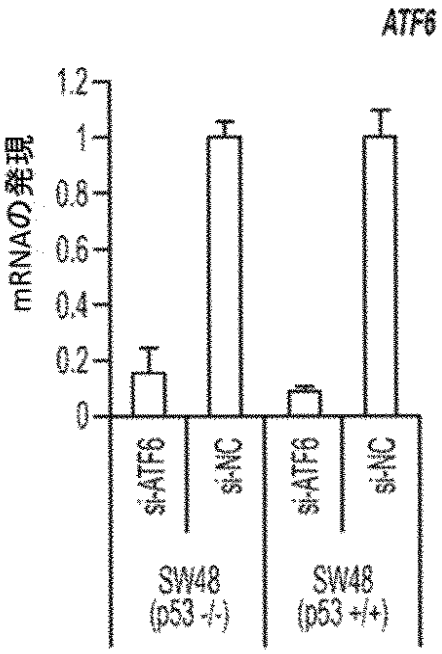
【図１５】



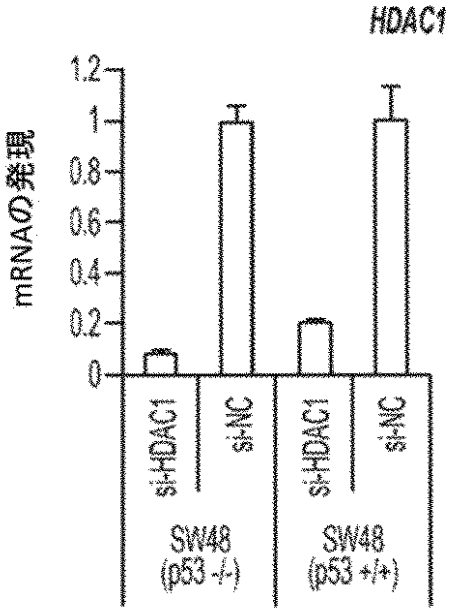
【図１６Ａ】



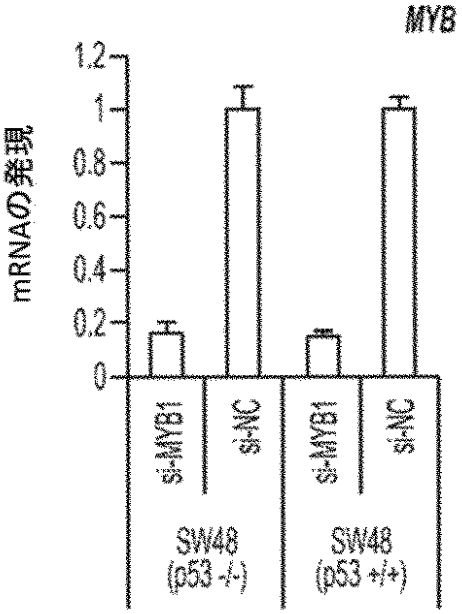
【図１６Ｂ】



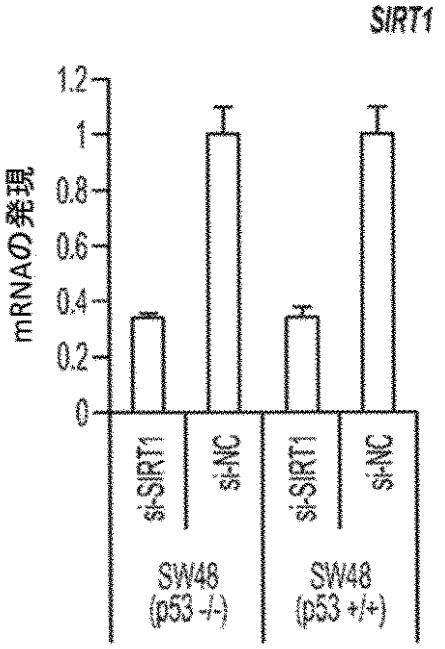
【図１６Ｃ】



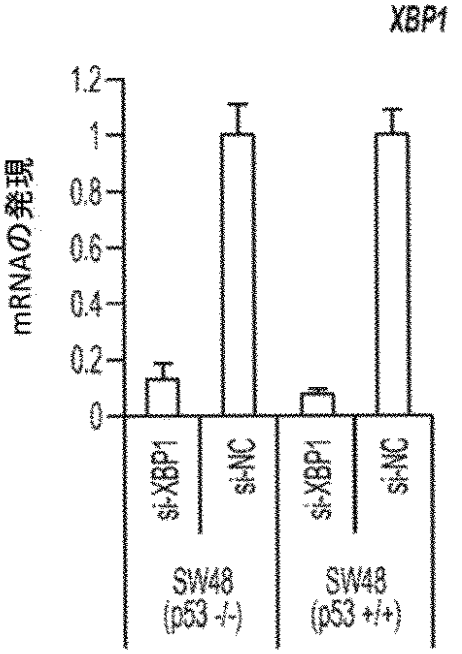
【図１６Ｄ】



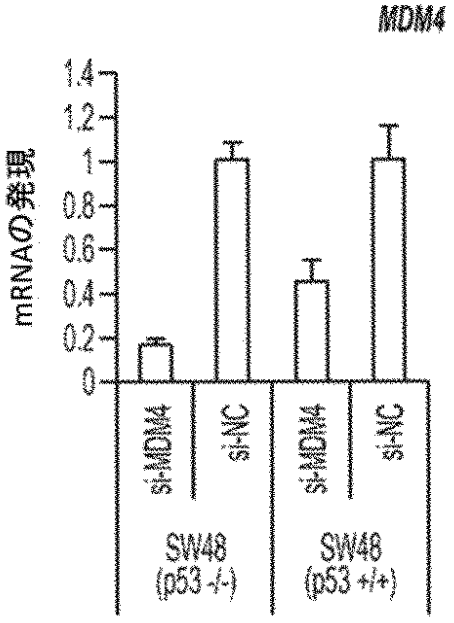
【図１６Ｅ】



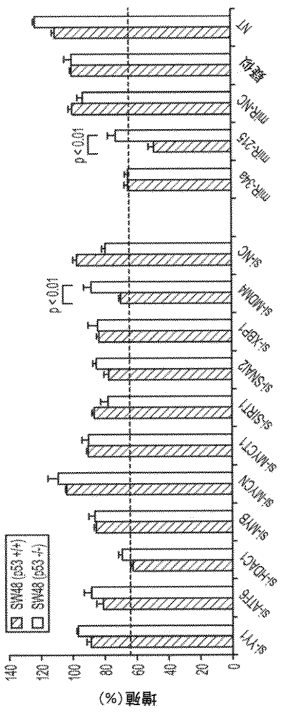
【図１６Ｆ】



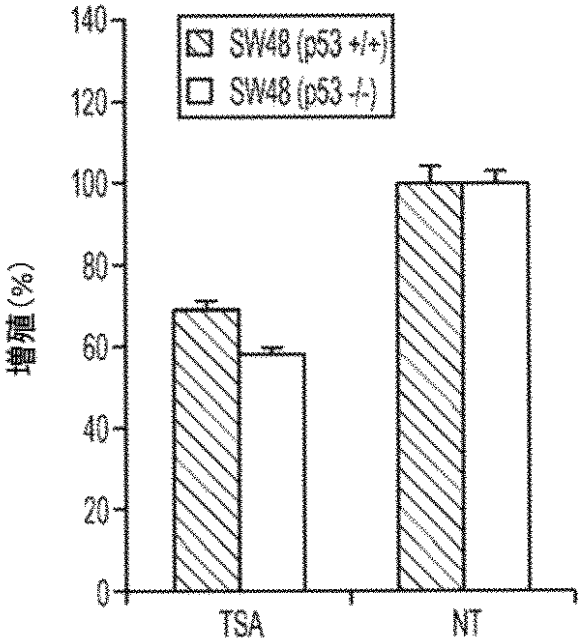
【図１６Ｇ】



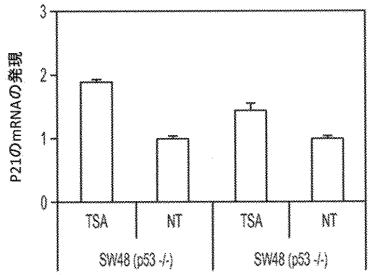
【図１７】



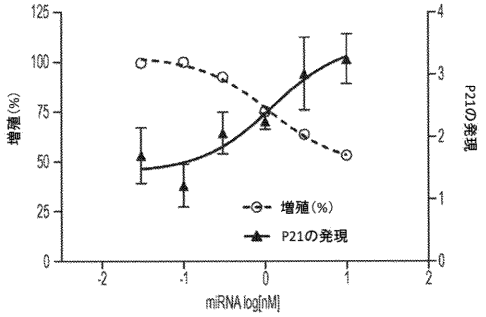
【図１８Ａ】



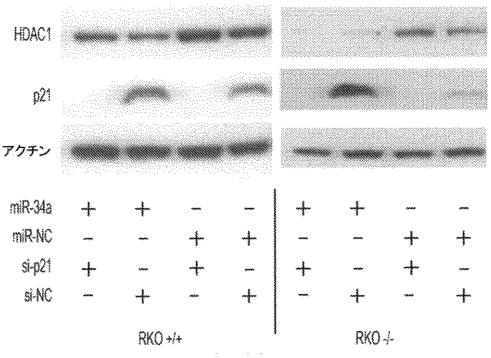
【図１８Ｂ】



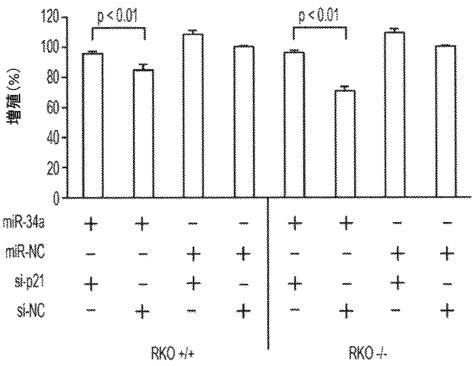
【図１９】



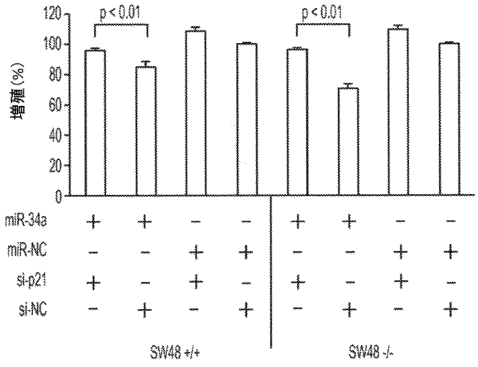
【図２０】



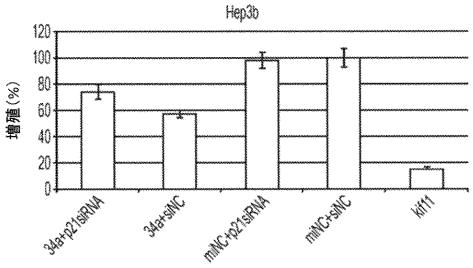
【図２１】



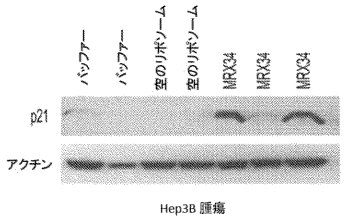
【図２２】



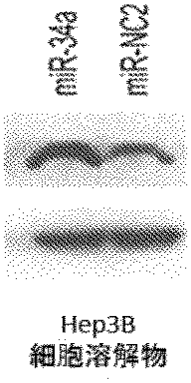
【図２３】



【図２４Ａ】



【図２４Ｂ】



【配列表】

2016530232000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/043824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

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)
C12Q

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, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/154333 A2 (ASURAGEN INC [US]; BADER ANDREAS G [US]; PATRAWALA LUBNA [US]; BYROM M) 18 December 2008 (2008-12-18)	1,2, 6-10, 16-24
Y	paragraph [0035]; claim 53	3-5, 11-15, 25-35

Y	JANE ZHAO ET AL: "TP53-independent Function of miR-34a via HDAC1 and p21CIP1/WAF1", MOLECULAR THERAPY, vol. 21, no. 9, 18 June 2013 (2013-06-18), pages 1678-1686, XP055140959, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2013.148 the whole document	3-5, 11-15, 25-35

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
19 September 2014	06/10/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Santagati, Fabio

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/043824

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. KALLER ET AL: "Genome-wide Characterization of miR-34a Induced Changes in Protein and mRNA Expression by a Combined Pulsed SILAC and Microarray Analysis", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 10, no. 8, 12 May 2011 (2011-05-12), XP055141241, ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M111.010462 page 10, right-hand column; figure 7 -----	3,26,35
A	N R CHRISTOFFERSEN ET AL: "p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC", CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 17, no. 2, 21 August 2009 (2009-08-21), pages 236-245, XP055141311, ISSN: 1350-9047, DOI: 10.1038/cdd.2009.109 cited in the application the whole document -----	1-35

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/043824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008154333 A2	18-12-2008	AU 2008261951 A1	18-12-2008
		CA 2689974 A1	18-12-2008
		CN 101801419 A	11-08-2010
		EP 2167138 A2	31-03-2010
		JP 2010529966 A	02-09-2010
		US 2009227533 A1	10-09-2009
		WO 2008154333 A2	18-12-2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	105	
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/50	P	
G01N	*33/68*	*(2006.01)*	G01N	33/68		
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	
			C12Q	1/68	Z	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,RO,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,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,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,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,UA,UG,US

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA13 DA14 DA36
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR62 QS25
QS34 QS36 QX02
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC412
4C086 AA01 AA10 EA16 MA01 MA04 NA14 NA20 ZB26 ZB27 ZC41

【要約の続き】
【選択図】 図１