

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年4月6日 (06.04.2006)

PCT

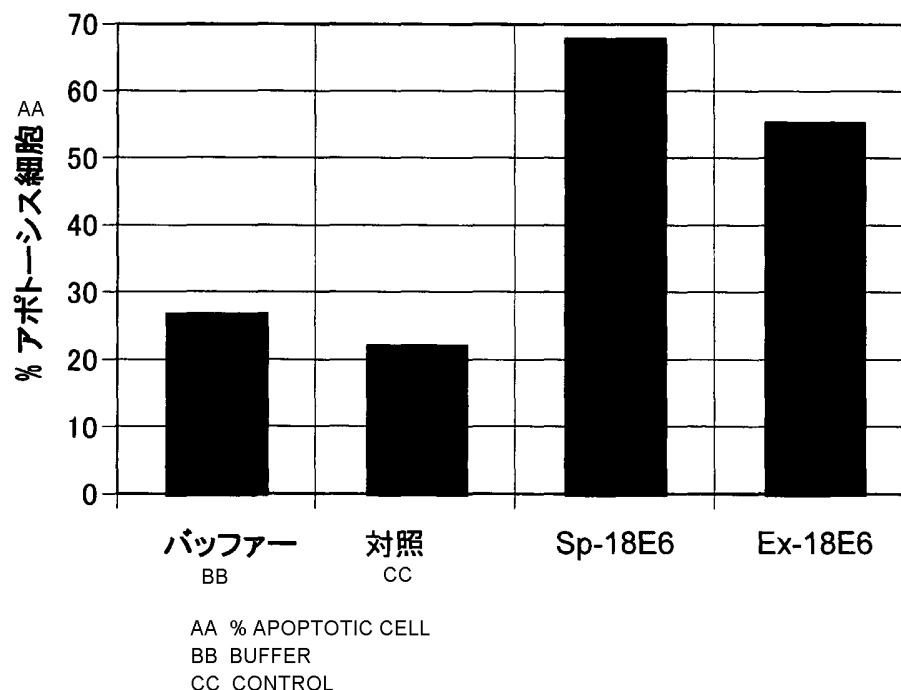
(10) 国際公開番号
WO 2006/035974 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/018244
- (22) 国際出願日: 2005年9月27日 (27.09.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2004-279994 2004年9月27日 (27.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 Okayama (JP). 国立大学法人東京医科歯科大学 (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉野内 光夫 (YOSHINOUCHI, Mitsuo) [JP/JP]; 〒7000804 岡山県岡山市中井町一丁目5番41号 Okayama (JP). 大和建嗣 (YAMATO, Kenji) [JP/JP]; 〒1660001 東京都杉並区阿佐谷北3-43-8 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

/ 続葉有 /

(54) Title: OLIGORIBONUCLEOTIDE

(54) 発明の名称: オリゴリボヌクレオチド



(57) Abstract: An siRNA sequence of highest efficacy against HPV E6/E7 as a target is determined. There is provided an oligoribonucleotide with specified base sequence. Further, there are provided an antiviral agent and therapeutic agent for cervical cancer comprising the oligoribonucleotide.

/ 続葉有 /

WO 2006/035974 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: HPV E6/E7を標的とした最も効果の優れたsiRNA配列を決定する。特定の塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及びこれを含む抗ウイルス剤及び子宮頸癌治療剤を提供する。

明 細 書

オリゴリボヌクレオチド

技術分野

本発明は、ヒトパピローマウイルス（以下、HPV という）18 型陽性子宮頸癌に対する遺伝子標的治療のために使用できる特定のオリゴリボヌクレオチド、およびこれを含む HPV に対する抗ウイルス剤並びに子宮頸癌治療剤に関する。

背景技術

近年の分子生物学の進歩と共に、主に米国ではいくつかの標的に対する癌の遺伝子治療の臨床応用が試みられているが、残念ながら現在まで満足な効果が得られていない。より効率的なベクターの開発と共に、正常細胞と癌細胞の本質的な差異を標的としたこれまで以上に効果的かつ危険性の少ない方法の確立が待ち望まれている。

このような状況の中、アンチセンス法といわれる相補的 DNA を用いて遺伝子発現を抑制する治療法が開発され、欧米において実際の治療に用いられている。しかしこの治療では遺伝子発現抑制の効率が悪いため、満足のいく治療効果が得られていないのが実情である。

近年、遺伝子発現を特異的に阻害する新たな方法として RNA 干渉（以下、RNAi という）が発見された。この方法は、標的遺伝子に相補的な RNA 2 重短鎖（small interfering RNA、以下 siRNA という）の導入により標的遺伝子の発現をきわめて効果的に阻害する画期的な方法であり、機能ジェノミクスの分野に変革をもたらすことが期待されている。また、2001 年には哺乳動物培養細胞での遺伝子発現抑制の成功が初めて報告され、以後、数多くの遺伝子発現の抑制に成功した研究結果が次々と報告されている。

このようなことから、siRNA は新しい遺伝子発現のノックダウン方法として大きな期待が寄せられている。子宮頸癌は婦人科領域の主要な悪性腫瘍の一つで、その主な原因は、HPV、特に 16 型（HPV16）および 18 型（HPV18）であり、これら

のウイルスの E6 および E7 癌遺伝子の発現は、細胞癌化と癌化形質の維持に不可欠であることが証明されている。頸癌では大部分の癌細胞に HPV ゲノムの組み込みがみられ、上記 E6 および E7 遺伝子はそれぞれ癌抑制遺伝子産物 P53、Rb タンパクと結合し、これらを不活性化することから、頸癌の発生と増殖に深いかかわりをもっていることが知られている。

現在までに siRNA を用いて HPV16 型陽性子宮頸癌細胞株の増殖抑制を行った報告は 2 編ある (非特許文献 1 及び 2)。非特許文献 1 の報告では、HPV E6 上の siRNA より E7 上の siRNA の方がより増殖抑制効果が著明であるとしている。しかしながら、本発明者は、先に報告した非特許文献 2 において、HPV E6 上の siRNA を用いて十分な抑制効果が得られることを確認した。これらの結果からは、どのような配列を標的とした場合に最も効果的な抑制効果が得られるかは明らかでなかった。

非特許文献 1 ジアン (M. Jiang) 及びミルナー (J. Milner), 「siRNA、RNA インターフェアレンスのプライマーで処置した HPV 陽性ヒト子宮頸癌細胞におけるウイルス遺伝子発現の選択的サイレンシング (Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference.)」 オンコジーン (Oncogene) 2002 年, 第 21 巻, p. 6041-6048

非特許文献 2 吉野内 (M. Yoshinouchi) ら, 「E6 siRNA によるヒトパピローマウイルス (HPV) 16-陽性子宮頸癌細胞の *in vitro* 及び *in vivo* 増殖の抑制 (*In vitro and in vivo growth suppression of human papilloma virus (HPV) 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA*)」 モレキュラー・セラピー (Molecular Therapy) 2003 年, 第 8 巻, 第 5 号, p. 762-768

発明の開示

HPV 陽性子宮頸癌の約三分の二は HPV16 型と 18 型であるので、これら 2 タイプの E6 癌遺伝子に対する siRNA 療法が確立できれば、多くの子宮頸癌患者にとって有効かつ侵襲の少ない治療法となる。ところが HPV18 型については、十分な増殖抑制を示す標的配列が未だ明らかにされていない。

siRNA の効果は標的とする部位によって大きく異なることが知られており、ま

たその効果を予測することは非常に難しいとされている。

本発明者は、HPV E6/E7 を標的とした siRNA のデザインは無数に可能であり、その中で最も効果の優れた配列を決定することがきわめて重要であることに鑑み、HPV18 型を標的とした siRNA の作用機序を種々検討し、HPV18 型陽性子宮頸癌の効果的治療に最適な siRNA の配列を明らかにして、かかる子宮頸癌の効果的治療薬を開発、提供せんとするものである。

本発明者は、子宮頸癌に対して蓄積してきたこれまでの研究成果を踏まえ、HPV18-E6 を標的とした siRNA を第一エクソン上、スプライシングドナーサイト上から作製してその生物学的効果を比較解析し、増殖抑制効果のよりすぐれた標的配列を決定し、本発明を完成した。

従って本発明は以下の (1) ~ (9) を提供する。

(1) 配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、ヒトパピローマウイルス 18 型の E6 遺伝子の発現を抑制し得る、塩基長 19 塩基のオリゴリボヌクレオチド、またはこれを含む塩基長 21 ~ 23 塩基のオリゴリボヌクレオチド。

catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa cttacagagg tatttgaatt
tgcatttaaa gattt (配列番号 1)

(2) 配列番号 2 または 4 で示される塩基配列において、ウラシルがチミンで置換された配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、ヒトパピローマウイルス 18 型の E6 遺伝子の発現を抑制し得る、塩基長 21 ~ 23 塩基のオリゴリボヌクレオチド。

(3) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 5 で示される塩基配列の 5' 側の 19 塩基からなるオリゴリボヌクレオチドと 90% 以上の配列同一性を有し、ヒトパピローマウイルス 18 型の E6 遺伝子の発現を抑制し得る、塩基長 21 ~ 23 塩基のオリゴリボヌクレオチド。

(4) 配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 5 で示される塩基配列からなるオリゴリボヌクレオチド。

(5) 二本鎖である、上記 (1) ~ (4) のいずれか記載のオリゴリボヌクレオチド。

(6) 配列番号 2 で示される塩基配列のうち 5' 側の 19 塩基を DNA に変換した塩基配列を含む発現ベクター。

(7) 配列番号 3 で示される塩基配列のうち 5' 側の 19 塩基を DNA に変換した塩基配列を含む発現ベクター。

(8) 上記 (1) ~ (4) のいずれか記載のオリゴヌクレオチド、または上記 (6) 若しくは (7) 記載の発現ベクターを含有する抗ウイルス剤。

(9) 上記 (1) ~ (4) のいずれか記載のオリゴヌクレオチド、または上記 (6) 若しくは (7) 記載の発現ベクターを含有する子宮頸癌治療剤。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2004-279994 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明で用いた 3×FLAG-18E6 発現ベクターの構造を示す。

図 2 は、本発明の siRNA によるヒトパピローマウイルス (HPV) 18 型 E6 遺伝子発現に対する抑制効果を示す。

図 3 は、HeLa 細胞及び SW756 細胞における lamin A/C 発現の siRNA による抑制を示す。

図 4 は、HeLa 細胞における E6 及び E7 mRNA の発現に対する本発明の siRNA の抑制効果を示す。

図 5 は、HeLa 細胞及び SW756 細胞における p53 及び E7 蛋白質発現に対する siRNA の効果を示す。

図 6 は、HeLa 細胞及び SW756 細胞の単層増殖及び足場非依存性増殖の siRNA による抑制効果を示す。

図 7 は、siRNA による HeLa 細胞のアポトーシス誘導をフローサイトメトリーを用いて確認した結果を示す。

図 8 は、siRNA による HeLa 細胞のアポトーシス誘導をグラフで示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、HPV 18 型の E6 遺伝子の塩基配列に基づき、その発現を抑制し得る

効果的な siRNA を得るべく多数の siRNA 候補を作製し、その効果を検討した。HPV 18 型のゲノム配列情報に関しては、GenBank 等のデータベースに例えば登録番号 X04354、Y18491 として登録されており、これらの情報に基づいて siRNA 候補を作製することができる。

その結果、配列番号 1 :

catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa cttacagagg tatttgaatt
tgcatttaaa gattt で示される塩基配列を認識する siRNA が、HPV 18 型の E6 遺伝子の発現を効果的に抑制することを見出し、本発明を完成するに到った。

本発明は、配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ヒトパピローマウイルス 18 型の E6 遺伝子の発現を抑制し得る塩基長 19 塩基のオリゴリボヌクレオチド、またはこれを含む塩基長 21~23 塩基のオリゴリボヌクレオチドを提供する。

本明細書において、ストリンジェントな条件としては、限定するものではないが、例えば SSC/5×デンハルト溶液/1.0%SDS 中で 68℃におけるハイブリダイゼーション、及び 0.2×SSC/0.1%SDS 中で 42℃における洗浄または 0.1×SSC/0.1%SDS 中で 68℃における洗浄が含まれる。これらの条件に関しては、例えば Sambrook らの「分子クローニング：実験室マニュアル」(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, US, 1989) 及び Ausubel ら編「分子生物学の現行プロトコル」(Current Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995) を参照のこと。

本発明のオリゴリボヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 2 または 3 で示される塩基配列において、ウラシルがチミンで置換された配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ヒトパピローマウイルス 18 型の E6 遺伝子の発現を抑制し得る、塩基長 21~23 塩基のオリゴリボヌクレオチドが挙げられる。

また、本発明のオリゴリボヌクレオチドとして、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 5 で示される塩基配列の 5' 側の 19 塩基からなるオリゴリボヌクレオチドと 90%以上の配列同一性を有する塩基配列を含む 21~23 塩基のオリゴリボヌクレオチドであって、ヒトパピローマウイルス 18 型の E6 遺伝子

の発現を抑制し得るものが挙げられる。

本発明のオリゴリボヌクレオチドとして特に好ましいものとしては、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 5 で示される塩基配列からなるオリゴリボヌクレオチドが挙げられる。

5' -gagguauuugaauuugcautt-3' (配列番号 2)

5' -augcaaaaucaaaauaccuctt-3' (配列番号 3)

5' -ccuguguauauugcaagactt-3' (配列番号 4)

5' -gucuugcaauauacacaggtt-3' (配列番号 5)

配列番号 2～5 において、3' 末端の 2 塩基のみがチミンとなるように設計されている。3' 末端をウラシルではなくチミンにすることで、siRNA が安定化するものと考えられる。尚、塩基がチミンの場合には、糖はリボースではなくデオキシリボースである。

上記オリゴリボヌクレオチドは、HPV 18 の E6 遺伝子及び E7 遺伝子の発現を効果的に抑制することができる。これらオリゴリボヌクレオチドは、一本鎖で用いることもできるが、好ましくは二本鎖である。この場合、配列番号 2 で示されるオリゴリボヌクレオチドと配列番号 3 で示されるオリゴリボヌクレオチド、配列番号 4 で示されるオリゴリボヌクレオチドと配列番号 5 で示されるオリゴリボヌクレオチドがそれぞれハイブリダイズして、3' 末端の 2 個のチミン塩基が突出した（オーバーハング）二本鎖を形成し、これが本明細書において記載する siRNA として作用する。以下、本明細書において、配列番号 2 で示されるオリゴリボヌクレオチドと配列番号 3 で示されるオリゴリボヌクレオチドが二本鎖を形成したオリゴリボヌクレオチドを Sp-18E6、配列番号 4 で示されるオリゴリボヌクレオチドと配列番号 5 で示されるオリゴリボヌクレオチドを Ex-18E6 とそれぞれ記載する。

本発明のオリゴリボヌクレオチドによる HPV18 型 E6 遺伝子及び E7 遺伝子の発現抑制は、mRNA の分解、発現抑制、これらによる蛋白質の発現抑制として観察することができる。尚、本明細書において、発現の「抑制」とは、発現レベルをオリゴリボヌクレオチド不在下における対照となる発現と比較して、50%以下に低下させることをいう。

しかしながら、HPV 関連癌細胞株においては、E6 及び E7 蛋白質の発現レベルが低く、特に E6 蛋白質の発現を検出する方法や抗体が存在しない。本発明者等は、siRNA の抑制効果を高感度かつ簡便に検出するために、3 ×FLAG タグ付き E6 及び E7 発現プラスミドを開発した。その構成を図 1 に示す (E6 の場合)。このプラスミドを COS-1 培養細胞に導入し、24 時間の培養後に COS-1 細胞の蛋白質を抽出し、FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット法を行うことによって、E6 及び E7 蛋白質の発現を測定することができる。このプラスミドを、評価すべき siRNA と共に COS-1 培養細胞に導入すれば、E6 及び E7 蛋白質の発現の抑制率を測定することができる。この方法を用いることによって、合成二本鎖 siRNA だけでなく、より導入効率の低い siRNA 発現プラスミド、shRNA 発現プラスミドの RNAi 活性についても容易に測定できる。

上記の方法によって蛋白質発現に対する抑制効果が確認されれば、RNAi 活性を有する siRNA を HeLa 細胞に導入して、RT-PCR により E6 及び E7 をコードする RNA レベルにおける発現抑制を評価すれば良い。

本発明において用いられる HPV18 型陽性子宮頸癌の最適 siRNA は上記配列番号 2 で示されるオリゴボヌクレオチドと配列番号 3 で示されるオリゴボヌクレオチドが二本鎖を形成したオリゴボヌクレオチド (Sp-18E6) である。これは、E6 遺伝子におけるスプライシングドナーサイトを含む配列であることを特徴とする。かかる siRNA は培養法、人工的な合成法や遺伝子操作法などいずれの方法により調達されるものであっても良い。

E6・E7 遺伝子からは E6/E7 mRNA およびスプライシングを受けた E6*/E7 mRNA が転写される。Ex-18E6, Sp-18E6 はともに E6 mRNA の発現をほぼ完全に抑制したが、E7 mRNA の発現は Ex-18E6 でより完全に抑制された。このことは、E7 蛋白質の発現レベルでも同様であり、その結果として Rb 蛋白質総量の増加と非リン酸化型 Rb 蛋白質の増加を惹起した。一方、Sp-18E6 は P53 をより強力に増加させた。生物学的効果としての足場依存性および非依存性増殖の抑制効果は圧倒的に Sp-18E6 の方が優れており、Sp-18E6 はより強力にアポトーシスを誘導した。

本発明の siRNA は、E6 蛋白質を発現する細胞中に単独で用いることができる。あるいはまた、発現ベクター中に組み込むことも可能である。本発明のために好

適に使用できる発現ベクターとして、配列番号 2 で示される塩基配列のうち 5' 側の 19 塩基を DNA に変換した塩基配列を含む発現ベクター、及び配列番号 3 で示される塩基配列のうち 5' 側の 19 塩基を DNA に変換した塩基配列を含む発現ベクターが挙げられる。また、二本鎖を形成するそれぞれのオリゴヌクレオチドが共に転写されるように、例えば配列番号 2 で示される塩基配列及び配列番号 3 で示される塩基配列、あるいは配列番号 4 で示される塩基配列及び配列番号 5 で示される塩基配列を共に含む発現ベクターを構築することも好ましい。ベクターとしては、siRNA の発現のために用いられることが知られているベクターであればいずれを使用することもできる。

本発明はまた、上記の本発明のオリゴヌクレオチド、または上記の本発明の発現ベクターを含有する抗ウイルス剤を提供する。

本発明は更に、上記の本発明のオリゴヌクレオチド、または上記の本発明の発現ベクターを含有する子宮頸癌治療剤を提供する。

本発明における抗ウイルス剤及び子宮頸癌治療剤は、本発明のオリゴヌクレオチド、または本発明の発現ベクターを有効量含有する他、必要に応じて緩衝剤、賦形剤、担体等の通常用いられる成分を適宜含有し得る。投与量は、患者の年齢、体重、癌の進行度、症状等に応じて適宜決定されるものであり、特に限定されるものではないが、通常、1 ng~100mg/日の範囲であれば良い。投与方法は、当分野において通常用いられる投与経路のいずれであっても良く、経口投与、静脈内注射等の注射を含む非経口投与のいずれであっても良い。

siRNA は、あたらしい遺伝子発現のノックダウン方法として注目を集めているが、アンチセンスオリゴ DNA やリボザイムに比較して低濃度でしかも、長期間配列特異的に細胞内遺伝子発現を抑制し、将来の癌治療薬として大きな期待がよせられている。子宮頸癌の発癌には HPV が大きく関与しており、これらのウイルスの E6 および E7 癌遺伝子の発現を抑制することが子宮頸癌の治療に結びつくことには疑いの余地がない。外因性ウイルスである HPV を標的にした siRNA はその配列特異性から HPV 陽性細胞以外には作用しないため、副作用のない理想的な遺伝子標的治療であるといえる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によ

り限定されるものではない。

実施例 1

以下の 2 種類の siRNA (配列番号 2 / 3 の二本鎖からなる Sp-18E6 及び配列番号 4 / 5 の二本鎖からなる Ex-18E6) を RNA-DNA ハイブリッドとして合成し、HPLC (Japan BioServices Co. Ltd, Saitama, Japan; Dharmacon Research, Inc., Lafayette, CO) によって精製した。

Sp-18E6 5' -gagguaauuugaauuugcautt-3' (配列番号 2)

5' -augcaaaaucaaaauaccuctt-3' (配列番号 3)

Ex-18E6 5' -ccuguguauauugcaagactt-3' (配列番号 4)

5' -gucuugcaauauacacaggtt-3' (配列番号 5)

対照となる二本鎖 RNA としては、以下の非特異的二本鎖 XII (31%GC 含量、Dharmacon Research, Inc.) を用いた。

5' -guauauaagcaagcauuacuu-3' (配列番号 6)

5' -guaaugcuugcuuauauacuu-3' (配列番号 7)

それぞれ 20 μ M のセンス及びアンチセンス鎖を、100mM の酢酸カリウム、30mM の HEPES-KOH、pH7.4、2mM の酢酸マグネシウム中で 90°C、1 分間加熱後、37°C で 1 時間処理して重合させて使用した。

COS-1 細胞を 24 穴プレートあたり 8 万まき、24 時間後に 500ng の 3 $\times$ FLAG/18E6 発現ベクター (図 1) と 20pmole の siRNA を遺伝子導入した。導入には Lipofectamine2000 (LifeTechnologies) を用い、添付文書の方法に準じた。導入 48 時間後に PBS で洗浄した後、100 μ l の SDS-ゲルローディングバッファーに直接溶解して 95°C で 5 分間処理し、ウェスタンブロットを行った。抗体は抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2) Sigma (SaintLouis, MZ) を用いた。蛋白量をモニターするため、抗- α ビメンチン抗体 (Oncogene, Boston, MA) でも反応させた。尚、HPV18 ゲノムは京都大学ウイルス研究所の酒井博幸先生から御供与頂き、このゲノムを鋳型とした PCR によって E6 及び E7 コード領域を増幅してプラスミドにクローニングし、塩基配列を決定した後に pcDNA3-3 $\times$ FLAG にサブクローニングした。E6 領域内にスプライシングドナーサイトとレシピエントサイトがあるため、pcDNA3-3 $\times$ FLAG-18E6 を発現させることによって 3 $\times$ FLAG-E6 及び 3 $\times$ FLAG-E6* の

双方が発現する。

その結果、図2に示すように、Sp-18E6はE6の発現をほぼ完全に抑制したが、E6*の発現には影響しなかった。これに対して、Ex-18E6はE6/E6*の両者の発現を中程度に抑制した。

実施例2

HPV18型陽性子宮頸癌細胞株HeLa及びSW756においてsiRNA投与によってRNAiを惹起し得ることを確認するため、laminA/Cの抑制実験を行った。

HeLaおよびSW756細胞は、10%FBS含有DMEM培地、5%CO₂、37℃にて培養した。用いたlaminA/c siRNAの配列は

センス鎖 5'-cuggacuuccagaagaacatt-3' (配列番号8)

アンチセンス鎖 5'-uguucuucuggaaguccagtt-3' (配列番号9)

HeLaおよびSW756細胞を24穴プレートあたりそれぞれ 5×10^4 個、及び 7×10^4 個ずつまき、24時間後にlaminA/C siRNAを投与し、さらに導入48時間後にPBSで洗浄した後、100 μ lのSDS-ゲルローディングバッファーに直接溶解し、95℃で5分間処理後、ウェスタンブロットを行った。抗体は抗-lamin A/C抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)を用いた。

siRNAの導入は次のように行った。3 μ lのオリゴフェクタミン (Life Technology)を12 μ lのOPTI-MEM I培地 (Life Technology)と混合した。一方、3 μ lのsiRNA (20 μ M)を50 μ lのOPTI-MEM I培地と混合し、室温で5分静置した。両者を混合し、20分間室温静置後、32 μ lのOPTI MEM I培地を加えた計100 μ lを500 μ lの培地に加えた。siRNAの最終濃度は100nMである。血清非存在下の導入は500 μ lの血清不含培地で行い、siRNA投与4時間後に血清60 μ lを加えた。

その結果、図3に示すように、いずれの細胞でもlaminA/Cは効率的に抑制され、特に血清存在下でのsiRNA投与がより効率的であった。

実施例3

HeLa細胞に実施例1で用いた2種のsiRNA (Sp-18E6及びEx-18E6)を投与し、E6/E7 mRNAの変化をそれぞれRT-PCRで確認した。鋳型cDNAの25倍希釈、5倍希釈、希釈なしで増幅を行った。

siRNA導入72時間後にRNAを抽出した。RNAの抽出はRNeasy Kit (Qiagen GmbH,

Hilden, Germany), RNase-Free DNase Set (Qiagen)で行った。500ng の RNA から Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI)を用いて cDNA に逆転写し、1:5 および 1:25 に希釈して PCR を行った。PCR プライマーは HPV 18 E6、E7、 β -アクチンを増幅するよう設定し、ExTaq ポリメラーゼ (Takara, Kyoto, JAPAN) を用いて増幅した。

その結果、図 4 に示すように、Ex-18E6/Sp-18E6 はいずれも E6 mRNA の発現を強力に抑制した。一方、E7 mRNA の発現は Sp-18E6 では中等度に、Ex-18E6 ではほぼ完全に抑制された。

実施例 4

HeLa 及び SW756 細胞に 60pmole の Sp-18E6 または Ex-18E6 siRNA を投与し、72 時間後の p53/Rb/E7 蛋白レベルへの影響を検討した。siRNA 投与、ウェスタンブロットについては実施例 2 と同様に行った。用いた抗体は抗 p53 抗体 (Bp53-12)、抗 HPV18-E7 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Incorporation (Santa Cruz, CA)、及び抗- α ビメンチン抗体 (Oncogene, Boston, MA) である。

その結果、図 5 に示すように、Sp-18E6 及び Ex-18E6 はいずれも p53 蛋白質を増加させ、その効果は Sp-18E6 においてより強力であった。また、E7 蛋白質の発現は、Sp-18E6 は中等度に、Ex-18E6 はほぼ完全に抑制した。

実施例 5

2 種の siRNA を HeLa 及び SW756 細胞に投与し、その増殖抑制効果を確認した。

単層増殖の検討は WST-8 (Cell Counting Kit 8, Dojin Laboratories, Kumamoto, Japan)で行った。

「コロニー形成能 (足場非依存性増殖)」の検討は次のように行った。siRNA 導入後 24 時間で細胞を回収し、10%FCS、0.8ml の 0.5% agar noble (Difco) 10%FCS 含有 DMEM 培地に 1.2ml の 0.3% agar noble 10%FCS 含有 DMEM 培地を重層し、500 細胞/ml (HeLa)、2000 細胞/ml (SW756) でまいた。寒天培地上に 1ml の増殖培地をおき、3 日毎に交換した。10~20 日後に 50 細胞以上のコロニーをカウントした。実験はすべてトリPLICATEで 3 回行った。

結果を図 6 に示すように、いずれの siRNA も単層培養での増殖を効率的に抑制したが、その効果は Sp-18E6 において著明であった (図 6 の上部のグラフ)。また、

足場非依存性増殖の抑制を軟寒天培地でのコロニー形成能で確認すると、Sp-18E6 は単層培養の場合と同様に足場非依存性増殖をほぼ完全に抑制した(図 6 の下部のグラフ)。

実施例 6

本発明の siRNA による HeLa 細胞の増殖抑制はアポトーシス誘導によることを確認するために、アネキシン V 陽性細胞をフローサイトメトリーで同定した。アネキシン V 陽性細胞の同定は、siRNA 投与 72 時間後に、Annexin V-FITC アポトーシス検出キット (Oncogene) を用い、添付の説明書に記載された方法で行った。

その結果、図 7 及び 8 に示すように、Sp-18E6 及び Ex-18E6 は共にアポトーシスを誘導し、Sp-18E6 は Ex-18E6 より効果的にアポトーシスを誘導していることが確認された。

産業上の利用可能性

siRNA による子宮頸癌に対する遺伝子標的治療剤あるいは HPV に対する抗ウイルス剤の開発においては、我々のデザインした配列を用いるのがもっとも有効であり、本発明によって、子宮頸癌が siRNA 遺伝子標的治療法の最初の成功例になるものと期待される。

RNAi は細胞自体が持つ自己防衛システムともいふべき現象であり、その効果はアンチセンス DNA による遺伝子発現抑制の数十倍効率的で、かつ遺伝子配列特異性がきわめて高いことが特徴である。このことは、RNAi を遺伝子治療に応用した場合副作用の危険性が低いことを意味している。さらに、21-23 塩基の合成 RNA 2 重短鎖のみの投与で遺伝子発現を抑制できることから、プラスミドやウイルスゲノムの人体への効果を考慮する必要がないという大きな利点がある。本発明は、siRNA により癌遺伝子の発現を特異的かつ効果的に抑制することができ、新たな遺伝子治療の戦略として期待が大きい。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ヒトパピローマウイルス18型のE6遺伝子の発現を抑制し得る塩基長19塩基のオリゴリボヌクレオチド、またはこれを含む塩基長21～23塩基のオリゴリボヌクレオチド。

catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa cttacagagg tatttgaatt
tgcatttaaa gattt (配列番号1)

2. 配列番号2または4で示される塩基配列において、ウラシルがチミンで置換された配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ヒトパピローマウイルス18型のE6遺伝子の発現を抑制し得る、塩基長21～23塩基のオリゴリボヌクレオチド。

3. 配列番号2、配列番号3、配列番号4または配列番号5で示される塩基配列の5'側の19塩基からなるオリゴリボヌクレオチドと90%以上の配列同一性を有する塩基配列を含む21～23塩基のオリゴリボヌクレオチドであって、ヒトパピローマウイルス18型のE6遺伝子の発現を抑制し得るオリゴリボヌクレオチド。

4. 配列番号2、配列番号3、配列番号4または配列番号5で示される塩基配列からなるオリゴリボヌクレオチド。

5. 二本鎖である、請求項1～4のいずれか1項記載のオリゴリボヌクレオチド。

6. 配列番号2で示される塩基配列のうち5'側の19塩基をDNAに変換した塩基配列を含む発現ベクター。

7. 配列番号3で示される塩基配列のうち5'側の19塩基をDNAに変換した塩基配列を含む発現ベクター。

8. 請求項1～4のいずれか1項記載のオリゴリボヌクレオチド、または請求項6若しくは7記載の発現ベクターを含有する抗ウイルス剤。

9. 請求項1～4のいずれか1項記載のオリゴリボヌクレオチド、または請求項6若しくは7記載の発現ベクターを含有する子宮頸癌治療剤。

図 1

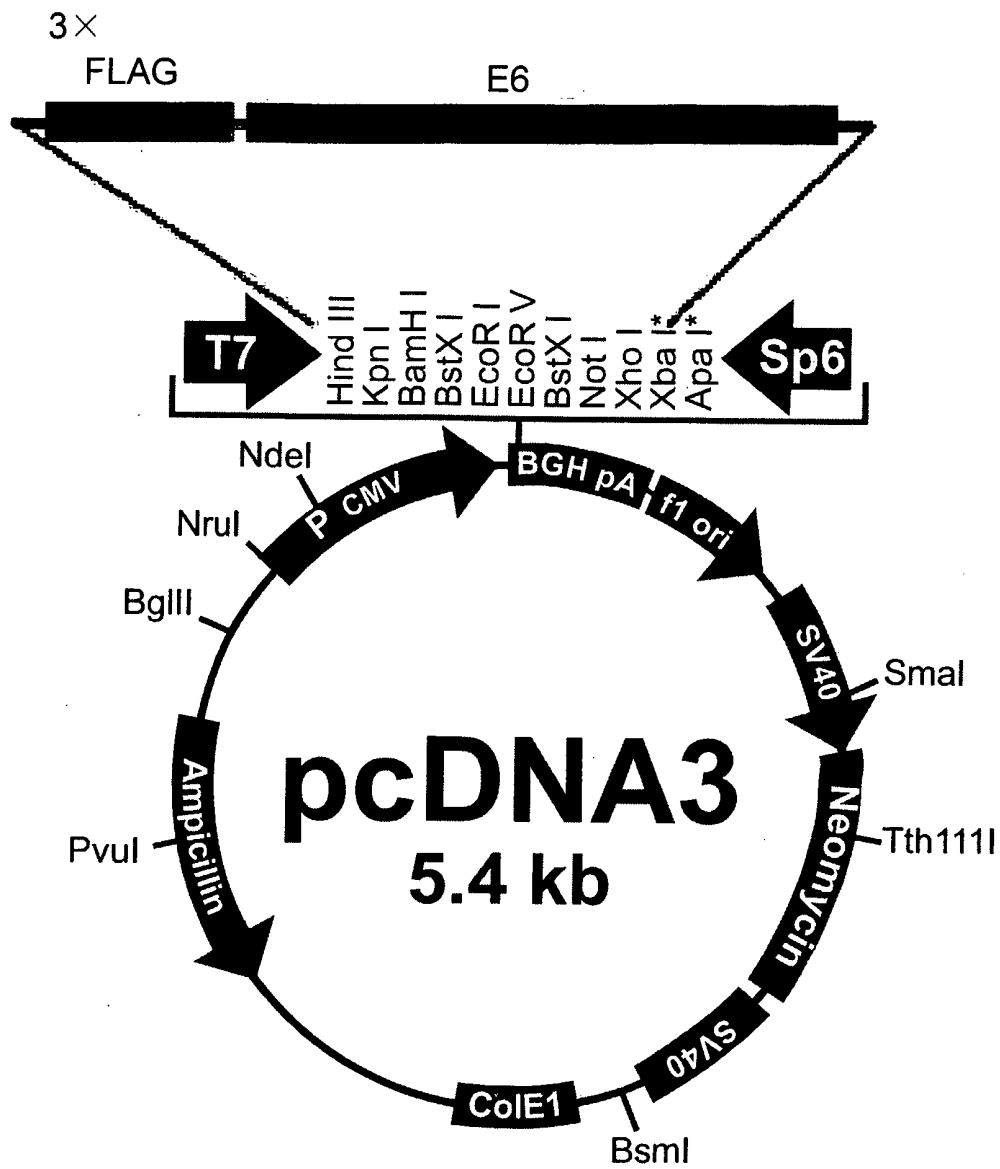
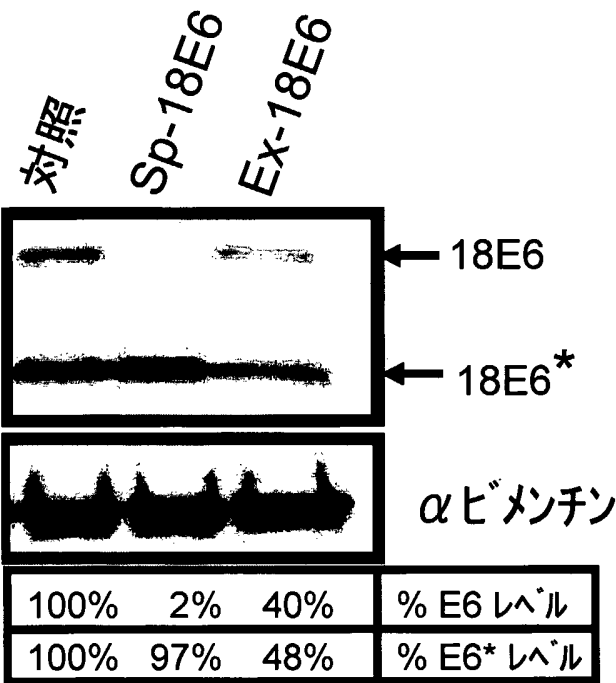
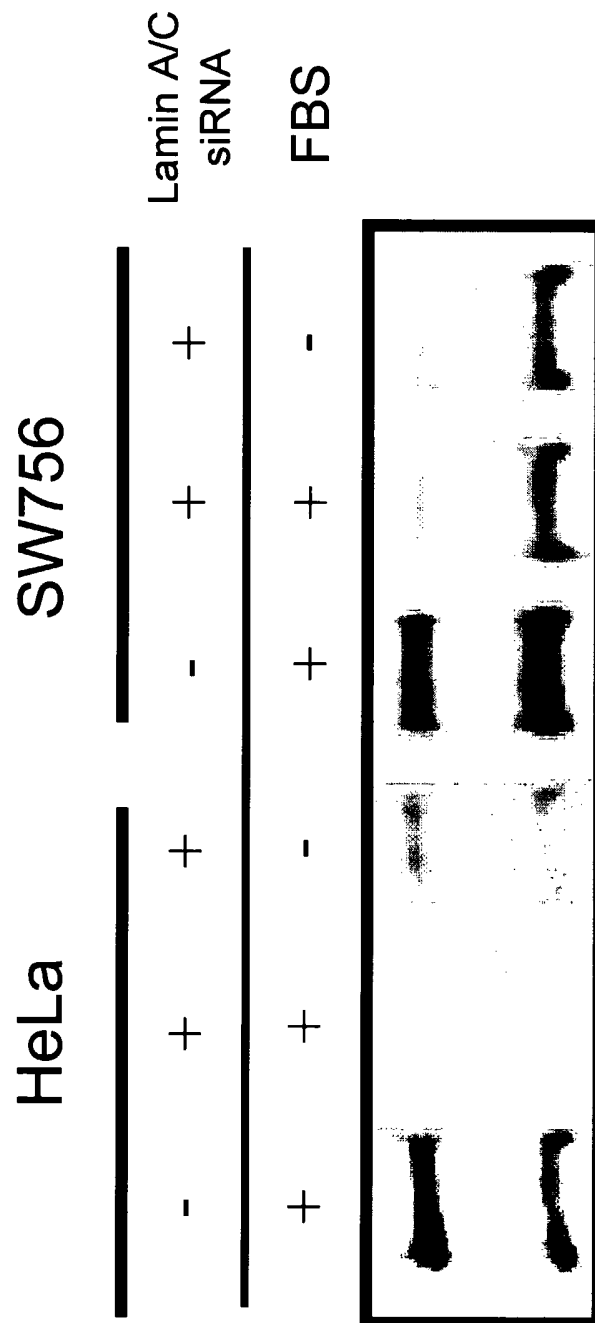


図 2



3



✶

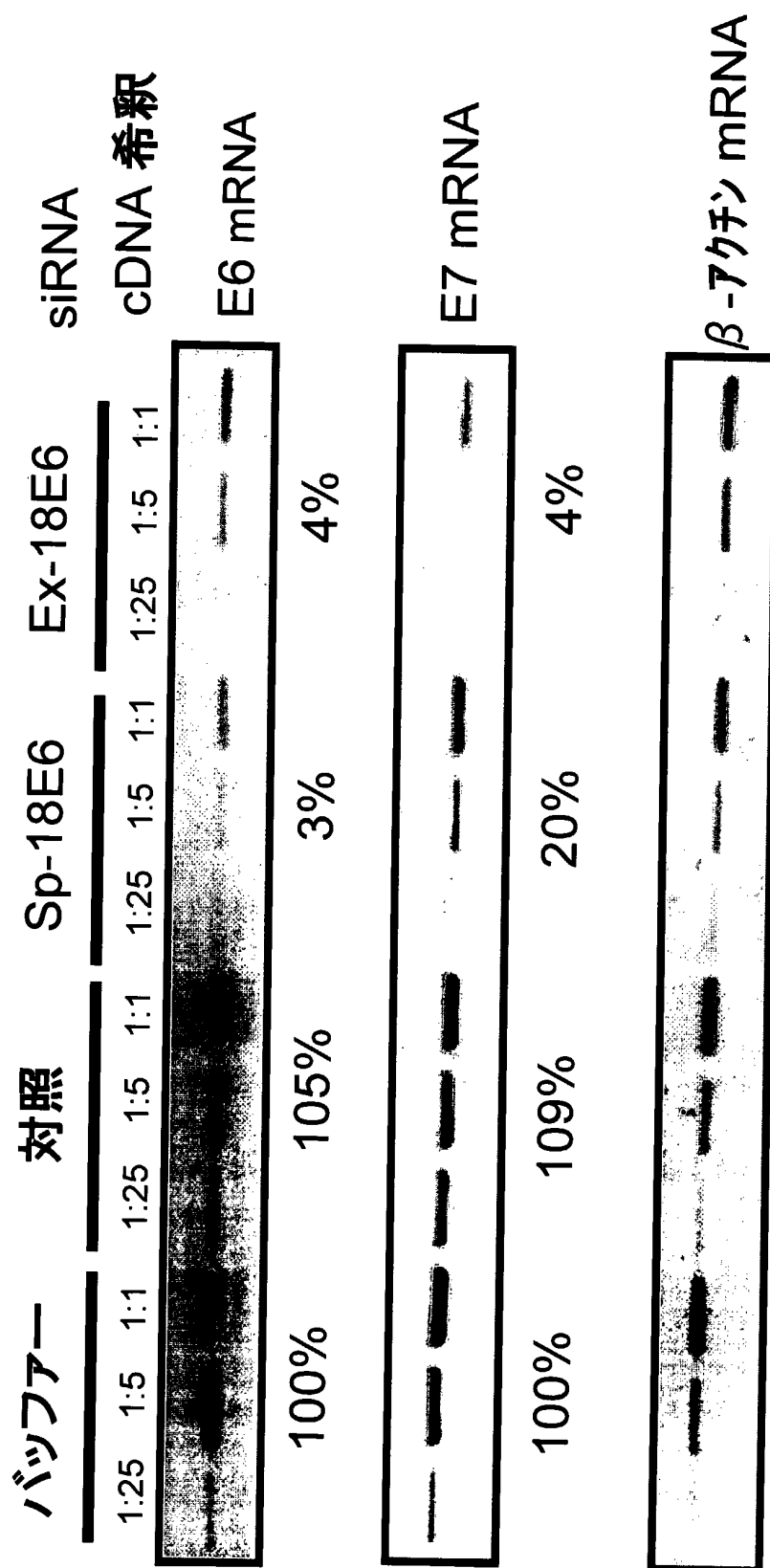


図 5

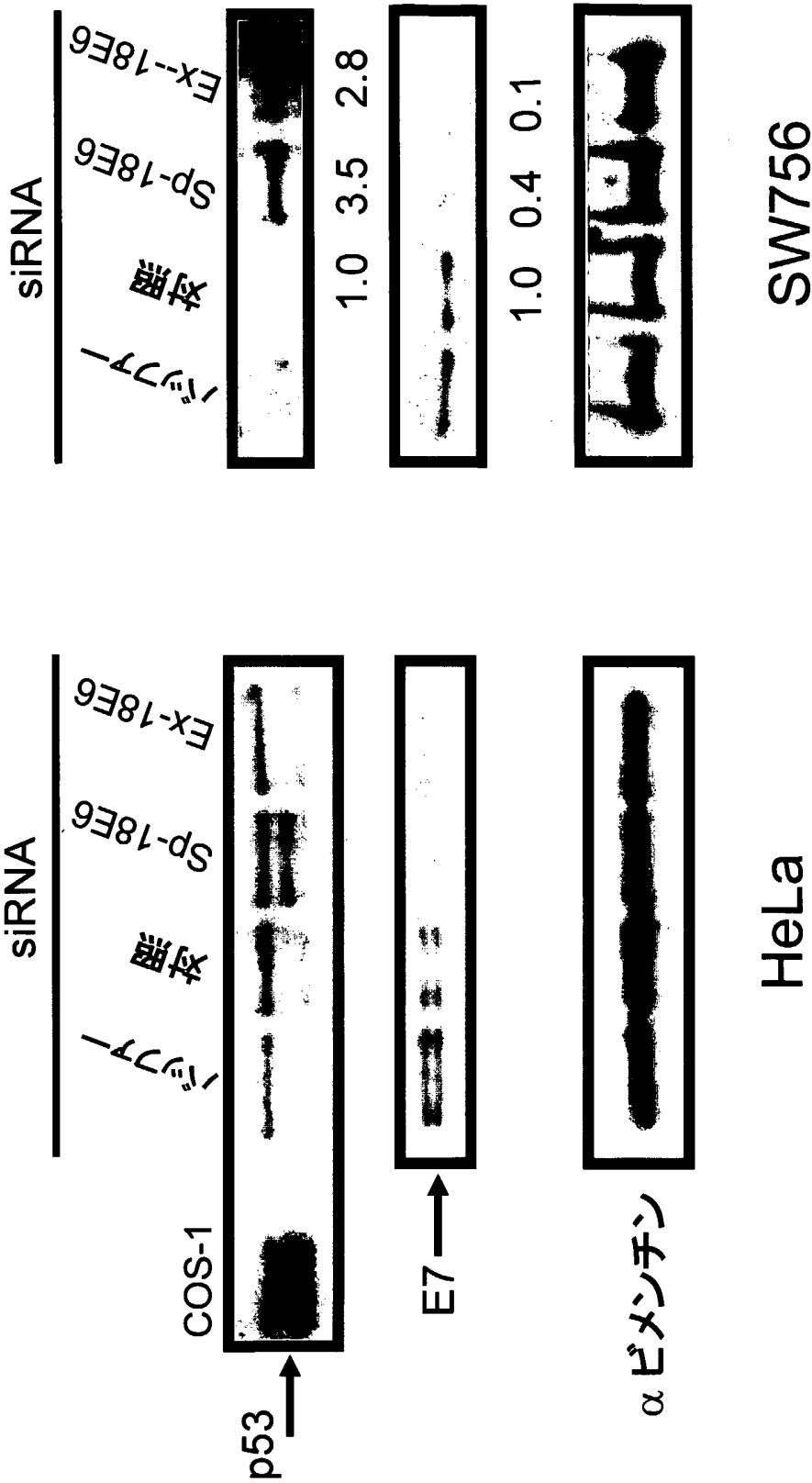


図6

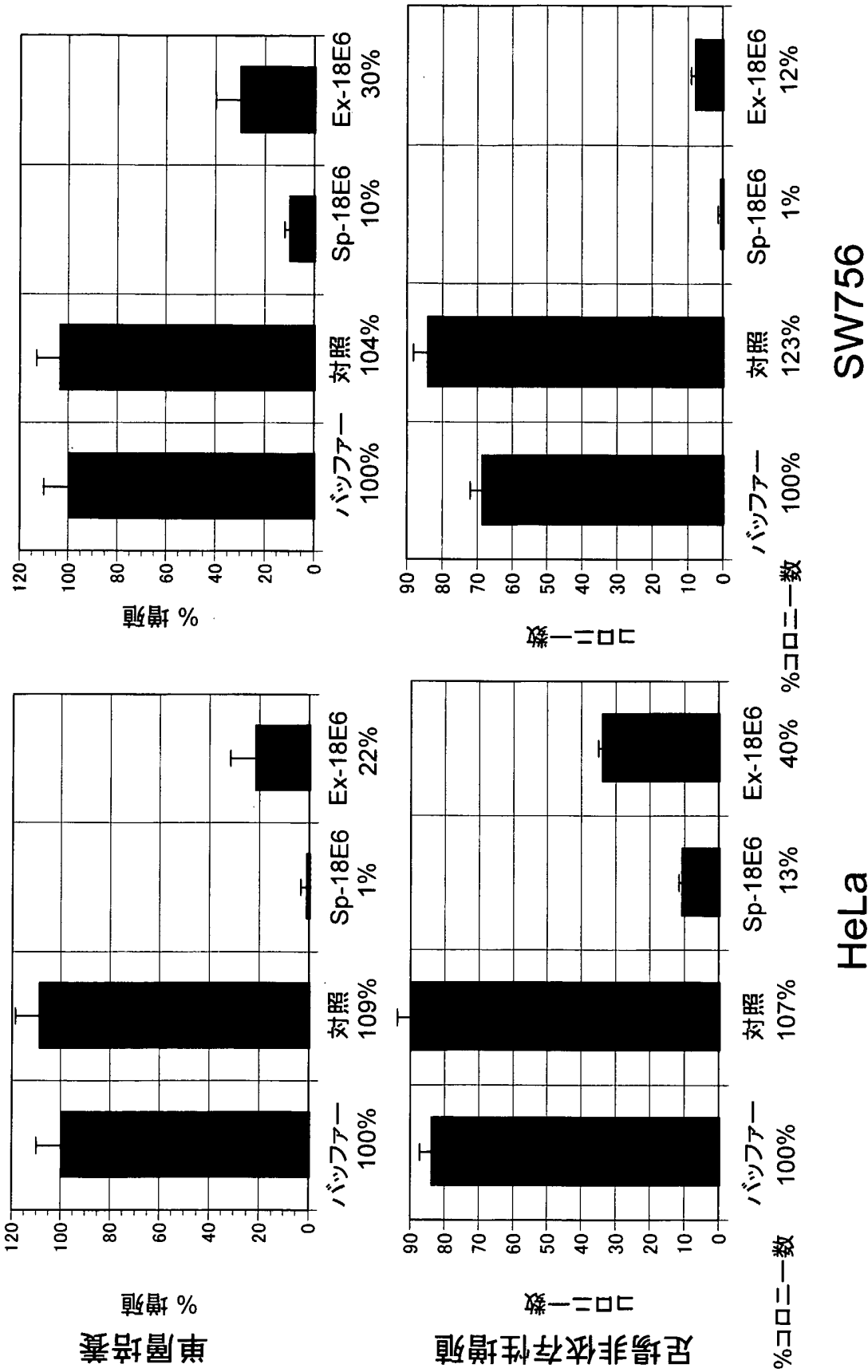


図 7

アネキシン V 陽性細胞比率

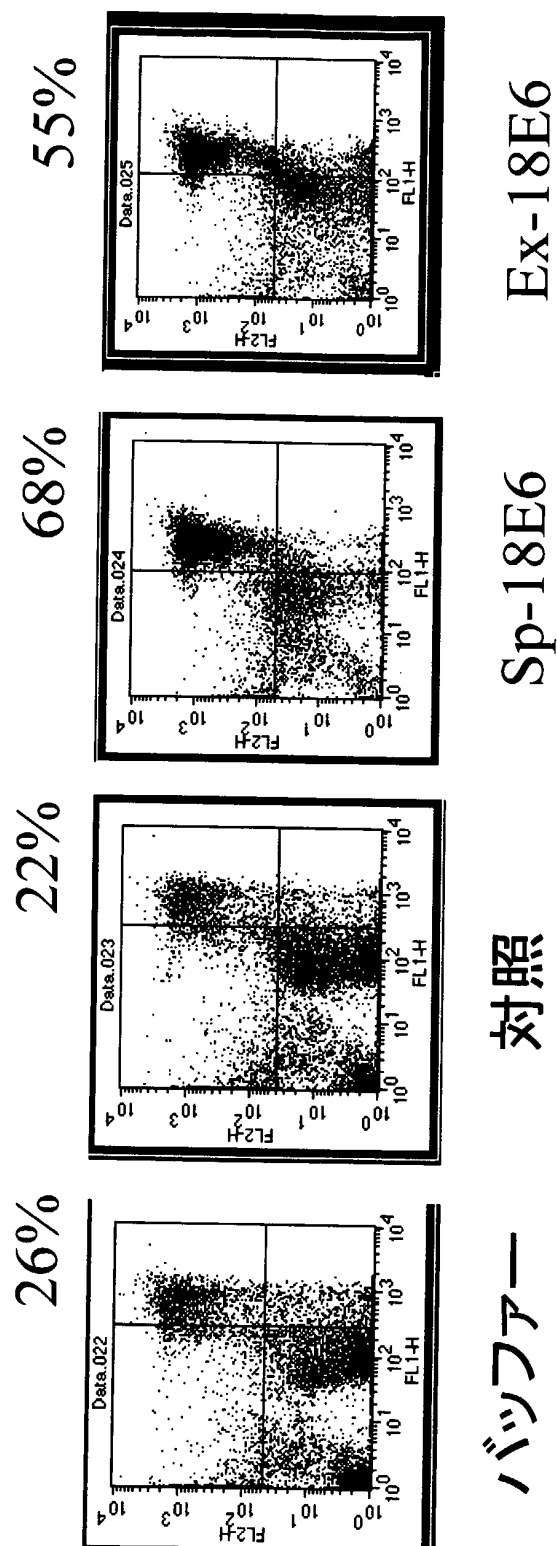
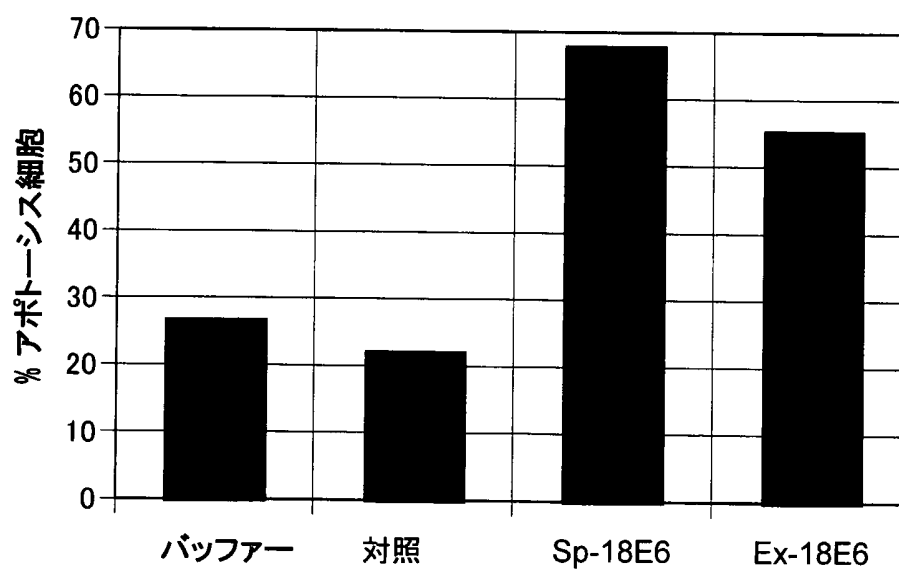


図 8



SEQUENCE LISTING

<110> National University Corporation Okayama University
Tokyo Medical and Dental University

<120> an oligoribonucleotide

<130> PH-2568-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2004-279994

<151> 2004-09-27

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 75

<212> DNA

<213> Human Papilloma Virus

<400> 1

catagaaata acctgtgtat attgcaagac agtattggaa cttacagagg tatttgaatt 60
tgcatttaaa gattt 75

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA/DNA

<400> 2

gagguauuug aaauugcaut t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA/DNA

<400> 3

augcaaaauuc aaauaccuct t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA/DNA

<400> 4

ccuguguaua uugcaagact t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA/DNA

<400> 5

gucuugcaau auacacaggt t

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA

<400> 6

guauauaagc aagcauuacu u

21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA

<400> 7

guaaugcuug cuuauauacu u

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA/DNA

<400> 8

cuggacuucc agaagaacat t

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic RNA/DNA

<400> 9

uguucuucug gaaguccagt t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00 (2006.01), **A61K31/7088** (2006.01), **A61K48/00** (2006.01), **A61P15/00** (2006.01), **A61P31/12** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00 (2006.01), **A61K31/7088** (2006.01), **A61K48/00** (2006.01), **A61P15/00** (2006.01), **A61P31/12** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01)

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

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

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1439227 A1 (Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts), 21 July, 2004 (21.07.04), Par. Nos. [0008] to [0044]; examples 1, 2, 4, 5; Figs. 1, 2, 4, 5; Sequence No.1-3 & WO 2004/63374 A1	1-9
P, X	YAMATO, K. et al., Induction of cell death in human apillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA., Cancer Gene Ther. (advance online publication 02 September, 2005 (02.09.05)), (abstract) PubMed[online]; National Center for Biotechnology Information [retrieved on 2005.12.13] PMID: 16138119	1-9

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 December, 2005 (15.12.05)

Date of mailing of the international search report
27 December, 2005 (27.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018244

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KOIVUSALO, R. et al., Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs., Mol.Pharmacol. (2005 Aug), Vol.68, No.2, pages 372 to 382	1-9
A	HALL, A.H.S. and ALEXANDER, K.A. RNA Interference of Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Induces Senescence in HeLa Cells., J.Virol. (2003), Vol.77, No.10, pages 6066 to 6069	1-9
A	YOSHINOUCI, M. et al., In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA, Mol.Ther. (2003), Vol.8, No.5, pages 762 to 768	1-9
A	JIANG, M. and MILNER, J., Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference., Oncogene (2002), Vol.21, No.39, pages 6041 to 6048	1-9
A	WO 2003/008573 A2 (MILNER, Anne, Josephine), 30 January, 2003 (30.01.03), & US 2004/0235171 A1 & JP 2004-535813 A	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00 (2006.01), A61K31/7088 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P15/00 (2006.01), A61P31/12 (2006.01), A61P35/00 (2006.01)											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00 (2006.01), A61K31/7088 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P15/00 (2006.01), A61P31/12 (2006.01), A61P35/00 (2006.01)											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005年										
国際調査で使用する電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus(STN), REGISTRY(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	EP 1439227 A1 (Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts) 2004.07.21, [0008]-[0044], Example 1, 2, 4, 5, Figure 1, 2, 4, 5, Sequence No.1-3 & WO 2004/63374 A1	1-9									
PX	YAMATO, K. et al., Induction of cell death in human apillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA., Cancer Gene Ther. (advance online publication 2005.09.02), (abstract) PubMed [online] ; National Center for Biotechnology Information [retrieved on 2005.12.13] PMID: 16138119	1-9									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 15.12.2005		国際調査報告の発送日 27.12.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3335								

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	KOIVUSALO, R. et al., Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs., Mol. Pharmacol. (2005 Aug), Vol. 68, No. 2, p. 372-382	1 - 9
A	HALL, A. H. S. and ALEXANDER, K. A. RNA Interference of Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Induces Senescence in HeLa Cells., J. Virol. (2003), Vol. 77, No. 10, p. 6066-6069	1 - 9
A	YOSHINOCHI, M. et al., In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA., Mol. Ther. (2003), Vol. 8, No. 5, p. 762-768	1 - 9
A	JIANG, M. and MILNER, J., Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference., Oncogene (2002), Vol. 21, No. 39, p. 6041-6048	1 - 9
A	WO 2003/008573 A2 (MILNER, Anne, Josephine) 2003.01.30 & US 2004/0235171 A1 & JP 2004-535813 A	1 - 9