

(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2014-509852

(P2014-509852A)

(43) 公表日 平成26年4月24日 (2014. 4. 24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-557819 (P2013-557819)	(71) 出願人	513225693
(86) (22) 出願日	平成24年3月7日 (2012. 3. 7)		ジ・オハイオ・ステート・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月6日 (2013. 11. 6)		アメリカ合衆国オハイオ州43201, コ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/028016		ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
(87) 国際公開番号	W02012/122239		524
(87) 国際公開日	平成24年9月13日 (2012. 9. 13)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	61/449, 854		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年3月7日 (2011. 3. 7)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373
			弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100117813
			弁理士 深澤 憲広
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マイクロRNA-155 (miR-155) により誘導される変異誘発活性は炎症および癌を結び付ける

(57) 【要約】

内因性のmiR-155のレベルを低減することにより、それを必要とする対象において細胞の自然突然変異率を低減する方法を記述する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

マイクロRNA-155 (miR-155) オリゴヌクレオチドを標的細胞に投与することを含む、標的細胞においてWEE1キナーゼの発現レベルを調節するための方法。

**【請求項 2】**

miR-155オリゴヌクレオチドを対象中の標的細胞に投与し；そして該標的細胞の変異を測定することを含む、対象中の標的細胞の変異を調節する方法であって、該標的細胞が癌細胞または前癌細胞である、前記方法。

**【請求項 3】**

内因性のmiR-155のレベルを低減することを含む、細胞の自然突然変異率を低減することを必要とする対象において、細胞の自然突然変異率を低減する方法。

10

**【請求項 4】**

内因性のmiR-155のレベルを低減することを含む、炎症関連癌細胞の自然突然変異率を低減することを必要とする対象において、炎症関連癌細胞の自然突然変異率を低減する方法。

**【請求項 5】**

癌細胞または癌細胞集団において細胞増殖を遅くする、または阻害する方法であって、該細胞または細胞集団を成熟したマイクロRNA-155と少なくとも90%同一である配列に相補的であるmiR-155オリゴヌクレオチドを含むmiR-155アンチセンス化合物と接触させ、それにより該細胞または細胞集団の変異を遅くする、または阻害することを含む、前記方法。

20

**【請求項 6】**

miR-155癌を有する、または有することが疑われる対象を同定し；そして標的細胞にmiR-155オリゴヌクレオチドを投与することを含む、miR-155と関係する癌を処置または予防する方法。

**【請求項 7】**

miR-155と関係する癌を有する、または有することが疑われる対象を同定し、そして該対象に成熟したマイクロRNA-155と少なくとも90%同一である配列に相補的であるmiR-155オリゴヌクレオチドを含むmiR-155アンチセンス化合物を投与することを含む、miR-155と関係する癌を処置または予防する方法。

**【請求項 8】**

標的細胞において1個以上の遺伝子の発現を調節する方法であって、該標的細胞をmiR-155オリゴヌクレオチドと接触させることを含み、該遺伝子が以下：APC、腺腫性結腸ポリープ症；FADD、デスドメインを介してFas (TNFRSF6) と会合する；FOXO3、フォークヘッドボックスO3；KGF、ケラチノサイト成長因子；HIVEP2、HIV 1型エンハンサー結合タンパク質2；MYO10、ミオシンX；RHOA、Rasホモログ遺伝子ファミリー、メンバーA；RIP1、受容体相互作用タンパク質キナーゼ1；SHIP1、イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ；SMAD1/5、SMADファミリーメンバー1/5；SOCS1、サイトカインシグナル伝達の抑制因子1；TP53INP、腫瘍タンパク質53に誘導される核タンパク質1から選択される、前記方法。

30

**【請求項 9】**

miR-155オリゴヌクレオチドがアンチセンスmiR-155オリゴヌクレオチドを含む、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

40

**【請求項 10】**

miR-155オリゴヌクレオチドがmiR-155アンチセンス化合物を含む、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 11】**

miR-155オリゴヌクレオチドがmiR-155アンタゴニスト化合物を含む、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 12】**

miR-155オリゴヌクレオチドが成熟したmiR-155オリゴヌクレオチド、pre-miR-155オリゴヌクレオチド、およびmiR-155シード配列からなる群から選択される、請求項1~11のいずれ

50

れか1項に記載の方法。

【請求項 1 3】

miR-155アンチセンス化合物が12～30個の連結されたヌクレオシドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含み、該修飾されたオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が成熟したmiR-155、pre-miR-155、miR-155シード配列と少なくとも80%同一である配列に相補的であり、または成熟したmiR-155、pre-miR-155、もしくはmiR-155の配列に完全に相補的な配列である、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 4】

miR-155オリゴヌクレオチドの投与が：アンチセンスmiR-155発現ベクターを標的細胞に投与し；そしてアンチセンスmiR-155を該標的細胞中で発現させる工程；を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

miR-155オリゴヌクレオチドの投与が：miR-155発現ベクターを標的細胞に投与する工程；そしてmiR-155を該標的細胞中で発現させる工程；を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 6】

miRNA-155発現ベクターが操作可能であるようにプロモーターに連結されたmiRNA-155をコードする核酸配列を含む、請求項1～15に記載の方法。

【請求項 1 7】

標的細胞が癌細胞である、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

標的細胞が乳癌または前癌細胞である、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 9】

標的細胞が結腸癌または前癌細胞である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 0】

標的細胞が胃癌または前癌細胞である、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 1】

標的細胞が肺癌または前癌細胞である、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 2】

調節が1個以上の遺伝子の発現を低下させることを含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 2 3】

修飾されたオリゴヌクレオチドが成熟したmiR-155の核酸塩基配列に対して2個より多くないミスマッチを有する、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 4】

調節が1個以上の遺伝子の発現を低下させることを含む、請求項1～23に記載の方法。

【請求項 2 5】

細胞をアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I) と接触させることを含む、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 2 6】

細胞をWEE1レベルを増大させるのに十分な量のアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I) と接触させる、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 7】

炎症関連癌細胞の自然突然変異率を低減することを必要とする対象において、炎症関連癌細胞の自然突然変異率を低減する方法であって、該細胞をアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I) と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 2 8】

細胞をWEE1レベルを増大させるのに十分な量のアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I) と接触させる、請求項27に記載の方法。

【請求項 2 9】

50

miR-155の上方制御を調節することを必要とする対象において、miR-155の上方制御を調節することを含む、炎症と関連する癌の発病を予防する方法。

【請求項30】

対象がヒトである、請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

アンチセンスmiR-155を含む、それを必要とする対象において細胞の自然突然変異率を低減するために有用な組成物。

【請求項32】

以下の工程：

a) miR-155を評価すべき薬剤と接触させ；

b) miR-155の1個以上の標的遺伝子を評価すべき薬剤と接触させ；または

c) それらの組み合わせを接触させる；

を含む、炎症と関連する癌を阻害するために用いることができる薬剤を同定する方法であって、該薬剤がmiR-155の発現を阻害する、その標的遺伝子の発現を増進する、またはそれらの組み合わせを行う場合、該薬剤は該炎症と関連する癌の増殖を阻害するために用いることができる、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明者：Carlo M. Croce

関連出願への相互参照

[0001] この出願は2011年3月7日に提出された米国仮出願第61/449,854号の利益を主張し、その開示全体を明確に本明細書に援用する。

【0002】

連邦政府により資金提供を受けた研究に関する記載

[0002] 本発明は、国立衛生研究所により与えられた助成金番号CA123541の下での政府援助によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

配列リスト

[0003] 本出願はEFS-webを介して提出された配列表を含み、それをそのまま本明細書に援用する。2012年3月6日に作成されたASCIIコピーは604\_52873\_SEQ\_LIST\_11137.txtと名付けられており、大きさは34,668バイトである。

【0004】

本発明の技術分野および産業的利用可能性

[0004] この発明は、概して分子生物学の分野に関する。本発明の特定の観点には、癌および白血病と関係する障害の診断法、療法、および予後徴候における適用が含まれる。

【背景技術】

【0005】

[0005] この節において開示される背景技術が法的に先行技術を構成するという自認は存在しない。

【0006】

[0006] miRNAは、mRNAの翻訳を阻害することにより、またはmRNAの分解を促進することにより遺伝子発現を抑制し、増殖からアポトーシスまでに及ぶ様々なプロセスのマスター制御因子と考えられている。miRNAの機能の喪失および獲得の両方が、異なる標的遺伝子のそれぞれ上方制御およびサイレンシングにより癌の発症に寄与している。

【0007】

[0007] 慢性および持続性の炎症は癌の発症に寄与している。感染に駆動される炎症は、ヒトの腫瘍の約15～20%の病理発生に関わっている。腫瘍浸潤性白血球、例えば単球/マクロファージ、Tリンパ球、および好中球は、癌炎症の主要な制御因子である。さらに、疫学的に病原体に結び付かない腫瘍でさえも、それらの微小環境中の炎症性構成要素の

10

20

30

40

50

存在を特徴とする。

【発明の概要】

【0008】

[0008] 本発明は、少なくとも部分的に、本明細書で記述するような、以下の情報および発見に基づいている。

【0009】

[0009] 第1の広い観点において、本明細書において、マイクロRNA-155 (miR-155) オリゴヌクレオチドを標的細胞に投与することを含む、標的細胞においてWEE1キナーゼの発現レベルを調節するための方法が提供される。

【0010】

[0010] 別の広い観点において、本明細書において、以下：miR-155オリゴヌクレオチドを対象中の標的細胞に投与し；そしてその標的細胞の変異を測定することを含む、対象中の標的細胞の変異を調節する方法が提供され、ここでその標的細胞は癌細胞または前癌細胞である。

【0011】

[0011] 別の広い観点において、本明細書において、内因性のmiR-155のレベルを低減することを含む、それを必要とする対象において細胞の自然突然変異率を低減する方法が提供される。

【0012】

[0012] 別の広い観点において、本明細書において、内因性のmiR-155のレベルを低減することを含む、それを必要とする対象において炎症関連癌細胞の自然突然変異率を低減する方法が提供される。

【0013】

[0013] 別の広い観点において、本明細書において、癌細胞または癌細胞集団において細胞増殖を遅くする、または阻害する方法であって、その細胞または細胞集団を成熟したマイクロRNA-155と少なくとも90%同一である配列に相補的であるmiR-155オリゴヌクレオチドを含むmiR-155アンチセンス化合物と接触させ、それによりその細胞または細胞集団の変異を遅くする、または阻害することを含む方法が提供される。

【0014】

[0014] 別の広い観点において、本明細書において、以下：miR-155癌を有する、または有することが疑われる対象を同定し；そしてその標的細胞にmiR-155オリゴヌクレオチドを投与することを含む、miR-155と関係する癌を処置または予防する方法が提供される。

【0015】

[0015] 別の広い観点において、本明細書において、miR-155と関係する癌を有する、または有することが疑われる対象を同定し、そしてその対象に成熟したマイクロRNA-155と少なくとも90%同一である配列に相補的であるmiR-155オリゴヌクレオチドを含むmiR-155アンチセンス化合物を投与することを含む、miR-155と関係する癌を処置または予防する方法が提供される。

【0016】

[0016] 別の広い観点において、本明細書において、標的細胞において1個以上の遺伝子の発現を調節する方法であって、その標的細胞をmiR-155オリゴヌクレオチドと接触させることを含み、その遺伝子が以下：APC、腺腫性結腸ポリープ症；FADD、デスドメインを介してFas (TNFRSF6) と会合する；FOXO3、フォークヘッドボックスO3；KGF、ケラチノサイト成長因子；HIVEP2、HIV 1型エンハンサー結合タンパク質2；MYO10、ミオシンX；RHOA、Rasホモログ遺伝子ファミリー、メンバーA；RIP1、受容体相互作用タンパク質キナーゼ1；SHIP1、イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ；SMAD1/5、SMADファミリーメンバー1/5；SOCS1、サイトカインシグナル伝達の抑制因子1；TP53INP、腫瘍タンパク質53に誘導される核タンパク質1；から選択される前記方法が提供される。

【0017】

10

20

30

40

50

[0017] 特定の態様において、そのmiR-155オリゴヌクレオチドはアンチセンスmiR-155オリゴヌクレオチドを含む。

【0018】

[0018] 特定の態様において、そのmiR-155オリゴヌクレオチドはmiR-155アンチセンス化合物を含む。

【0019】

[0019] 特定の態様において、そのmiR-155オリゴヌクレオチドはmiR-155アンタゴニスト化合物を含む。

【0020】

[0020] 特定の態様において、そのmiR-155オリゴヌクレオチドは成熟したmiR-155オリゴヌクレオチド、pre-miR-155オリゴヌクレオチド、およびmiR-155シード配列 (seed sequence) からなる群から選択される。 10

【0021】

[0021] 特定の態様において、そのmiR-155アンチセンス化合物は12~30個の連結されたヌクレオチドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含み、ここでその修飾されたオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、成熟したmiR-155、pre-miR-155、miR-155シード配列と少なくとも80%同一である配列に相補的であり、または成熟したmiR-155、pre-miR-155、もしくはmiR-155の配列に完全に相補的な配列である。

【0022】

[0022] 特定の態様において、miR-155オリゴヌクレオチドの投与は以下の工程を含む：アンチセンスmiR-155発現ベクターを標的細胞に投与し；そしてアンチセンスmiR-155をその標的細胞中で発現させる。 20

【0023】

[0023] 特定の態様において、miR-155オリゴヌクレオチドの投与は以下の工程を含む：miR-155発現ベクターを標的細胞に投与し；そしてmiR-155をその標的細胞中で発現させる。

【0024】

[0024] 特定の態様において、そのmiRNA-155発現ベクターは、操作可能であるようにプロモーターに連結されたmiRNA-155をコードする核酸配列を含む。

【0025】

[0025] 特定の態様において、その標的細胞は癌細胞である。 30

【0026】

[0026] 特定の態様において、その標的細胞は乳癌または前癌細胞である。

【0027】

[0027] 特定の態様において、その標的細胞は結腸癌または前癌細胞である。

【0028】

[0028] 特定の態様において、その標的細胞は胃癌または前癌細胞である。

【0029】

[0029] 特定の態様において、その標的細胞は肺癌または前癌細胞である。 40

【0030】

[0030] 特定の態様において、その調節は1個以上の遺伝子の発現を低下させることを含む。

【0031】

[0031] 特定の態様において、その修飾されたオリゴヌクレオチドは成熟したmiR-155の核酸塩基配列に対して2個より多くないミスマッチを有する。

【0032】

[0032] 特定の態様において、その調節は1個以上の遺伝子の発現を低下させることを含む。

【0033】

[0033] 特定の態様において、その方法はその細胞をアンチセンスmiR-155阻害RNA ( 15 50

5-1)と接触させることを含む。

【0034】

[0034] 特定の態様において、その細胞をWEE1レベルを増大させるのに十分な量のアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I)と接触させる。

【0035】

[0035] 別の広い観点において、それを必要とする対象中の炎症関連癌細胞の自然突然変異率を低減する方法であって、その細胞をアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I)と接触させることを含む方法が提供される。

【0036】

[0036] 特定の態様において、その細胞をWEE1レベルを増大させるのに十分な量のアンチセンスmiR-155阻害RNA (155-I)と接触させる。

【0037】

[0037] 特定の態様において、その方法は、それを必要とする対象においてmiR-155の上方制御を調節することにより炎症と関連する癌の発病を予防することを含む。

【0038】

[0038] 特定の態様において、その対象はヒトである。

【0039】

[0039] 別の広い観点において、本明細書において、アンチセンスmiR-155を含む、細胞の自然突然変異率を低減することを必要とする対象において、細胞の自然突然変異率を低減するために有用な組成物が提供される。

【0040】

[0040] 別の広い観点において、本明細書において、以下の工程を含む、炎症と関連する癌を阻害するために用いることができる薬剤を同定する方法が提供される：

a) miR-155を評価すべき薬剤と接触させ；

b) miR-155の1個以上の標的遺伝子を評価すべき薬剤と接触させ；または

c) それらの組み合わせを接触させる；ここで、その薬剤がmiR-155の発現を阻害する、その標的遺伝子の発現を増進する、またはそれらの組み合わせを行う場合、その薬剤はその炎症と関連する癌の増殖を阻害するために用いることができる。

【0041】

[0041] 本発明の他の系、方法、特徴、および利点は、以下の図面および詳細な記述を吟味すれば、当業者には明らかであると考えられ、または明らかになると考えられる。全てのそのような追加の系、方法、特徴、および利点はこの記述内に含まれ、本発明の範囲内であり、そして添付の特許請求の範囲により保護されることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0042】

[0042] 本特許または出願ファイルは、カラーで作成された1個以上の図面および/または1個以上の写真を含有する。カラーの図面(単数または複数)および/または写真(単数または複数)を有するこの特許または特許出願公開のコピーは、要請して必要な料金を払えば特許庁により提供されるであろう。

【図1】[0043] 図1A~1B. SW620およびMBA-MD-231細胞における平均突然変異率は、miR-155の発現の比率と共に増大する。 [0044] 図1Aおよび図1B. モックで処理した(対照)、またはドキシサイクリンで処理した(6-TG選択の48時間前に開始)(示したクローン)、miR-155を安定発現する、SW620(図1A)およびMDA-MB-231クローン(図1B)からの6-TG耐性コロニーの平均突然変異率。 \* P = 0.065 ; \* \* P < 0.006 (スチューデントt検定)。

【図2-1】[0045] 図2A~2D. 炎症促進(proinflammatory)環境は、MDA-MB-231細胞における突然変異率およびT47D細胞における変異コロニーの出現頻度を増大させる。 [0046] 図2A. 48時間、モック処理したかまたはLSMCMで処理したかのどちらかである示した細胞株におけるmiR-155の相対的上方制御をqRT-PCRを用いて決定した。この図はLPSで刺激/未刺激の比率を示す。値は平均±SD(n=3)を表す。

10

20

30

40

50

【図2-2】[0047] 図2B. 示したように処理したMDA-MB-231細胞におけるmiR-155の相対的上方制御をqRT-PCRを用いて決定した。[0048] 図2C. MDA-MB-231細胞における突然変異率(MR)を、モックおよびTNF/LPS処理後の曲線の傾きを計算することにより概算した( $n=4$ 、変異頻度の概算)。[0049] 図2D. 対照のモック処理した細胞に対するLSMCMで48時間処理したT47D細胞における6-TG耐性コロニーの比率。

【図3-1】[0050] 図3A~3D. 高められたmiR-155レベルはWEE1転写産物を標的とすることにより増殖の速度を増大させる。[0051] 図3A. 48時間のモック処理(-ドキシサイクリン)または48時間のドキシサイクリン処理(+ドキシサイクリン)後の6-TG耐性HCT116コロニーの表現型。HCT116細胞にpRetroX-Tight-PurmiR-155およびTet-Onコンストラクトを一過性に感染させた後、ドキシサイクリン処理した。

10

【図3-2】[0052] 図3B. MDA-MB-231クローン19Bからの細胞をCFSEで染色した後、ドキシサイクリン処理によりmiR-155の発現を誘導した。増殖速度を4および5日後にフローサイトメトリーにより分析した。この実験を2回繰り返し、類似の結果が得られた。

【図3-3】[0053] 図3C. pre-miR-対照、pre-miR-155、またはアンチセンスmiR-155阻害RNA(155-I)を用いてトランスフェクトし、続いてモック処理またはLSMCMによる処理のどちらかを48時間行ったT47D細胞中のWEE1のレベルを、ウェスタンブロッティングにより決定した。[0054] 図3D. pre-miR-対照またはアンチセンスmiR-155阻害RNA(155-I)を用いたトランスフェクト後の、E $\mu$ -miR-155トランスジェニックマウスの脾臓から分離された初代B細胞中のWEE1のレベル。

【図4】[0055] 図4. マイクロRNA-155(miR-155)の発現のレベルは、クローンおよび細胞株により様々である。成熟したmiR-155を発現するpRetroX-tight-Purコンストラクトを安定導入したSW620およびMDA-MB-231クローンを、48時間モック処理またはドキシサイクリンで処理した。続いて、定量的RT-PCRを用いてmiR-155の相対レベルを決定した。図4は、モック処理/ドキシサイクリン処理した細胞に関する値の比を示す。値は平均 $\pm$ SD( $n=3$ )を表す。

20

【図5】[0056] 図5. ドキシサイクリンの用量の増大のmiR-155の発現への作用。HCT116細胞を、miR-155前駆体(pre-miR-155)またはmiR-155成熟型(miR-155)を発現するpRetroX-Tight-Purコンストラクトを用いて一過性にトランスフェクトした後、示した用量のドキシサイクリン( $\text{ng/mL}$ )で48時間処理した。

【図6】[0057] 図6. miR-155はWEE1の3'UTRを標的とする。ルシフェラーゼコード領域の下流にWEE1の3'UTRを含有するレポーターコンストラクトを用いてトランスフェクトしたT47D細胞を、未刺激のマクロファージ条件培地で(-LPS)、もしくはLSMCMで(+LPS)処理し、またはpre-miR-対照もしくはpre-miR-155を用いてトランスフェクトした。結果をレニラルシフェラーゼに対して正規化した。値は平均 $\pm$ SD( $n=5$ )を表す。

30

【図7】[0058] 図7. 癌または他の疾患における慢性的な炎症または内因性の遺伝子回路網(genetic circuitries)の脱制御の結果としての長期にわたるmiR-155の上方制御は、in vivoでのより高い突然変異率をもたらす可能性があることを示す図式的表現。miR-155によるWEE1の標的化はさらにDNA損傷を拡張するであろうことが分かった。miR-155の上方制御は、腫瘍抑制因子および細胞の恒常性を制御する他の因子も下方制御する(図10-表2および図7)。まとめると、これらの作用は悪性形質転換のプロセスを短縮し、癌の進行に有利に働き得る。

40

【図8】[0059] 図8. 図2Cの実験設計を要約する図式的表現。HAT、100  $\mu\text{M}$  ヒポキサンチン、400nM アミノプテリン、16  $\mu\text{M}$  チミジン。

【図9】[0060] 図9. 表1-T47D細胞、HCT116細胞およびMDA-MB-231細胞の6-チオグアニン(6-TG)耐性コロニーから調製したHPRTのcDNA中で見付かった変異。

【図10】[0061] 図10. 表2-T47D細胞およびMDA-MB-231細胞の処理の後にそのレベルが有意に低下した、DNAの複製および維持に関する因子をコードする転写産物。

【図11】[0062] 図11. 表S1-miR-155の過剰発現の6-チオグアニン(6-TG)耐性コロニーの出現頻度および平均突然変異率への作用。ヒトHCT116結腸癌細胞の6-TG耐性コロニーから、ならびにヒトT47DおよびMDA-MB-231乳癌細胞から、LPSで刺激したマクロファ-

50



ジによる条件培地への曝露またはドキシサイクリンに誘導されるmiR-155マイクロRNAの過剰発現後に調製したHPRTのcDNA中で見付かった変異。

【図12-1】[0063] 図12. 表S2-ヒトHCT116結腸癌細胞の6-TG耐性コロニーから、ならびにヒトT47D細胞およびMDA-MB-231乳癌細胞から、LPSで刺激したマクロファージによる条件培地への曝露またはドキシサイクリンに誘導されるmiR-155マイクロRNAの過剰発現後に調製したヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) のcDNA中で見付かった変異。ヒトHCT116結腸癌細胞の6-TG耐性コロニーから、ならびにヒトT47DおよびMDA-MB-231乳癌細胞から、LPSで刺激したマクロファージによる条件培地 (LSMCM) への曝露またはドキシサイクリンに誘導されるmiR-155マイクロRNAの過剰発現後に調製したヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) のcDNA中で見付かった変異。HPRTの転写される領域の長さは1,415ntであった。HPRTの分析した領域はヌクレオチド123~1,110であった。<sup>a</sup>モック、未刺激のマクロファージによる条件培地。<sup>b</sup>LSMCM、LPSで刺激したマクロファージによる条件培地。<sup>c</sup>HPRTのコード領域、ヌクレオチド168~824。

10

【図12-2】図12の続きである。

【図12-3】図12の続きである。

【図12-4】図12の続きである。

【図12-5】図12の続きである。

【図12-6】図12の続きである。

【図12-7】図12の続きである。

【図12-8】図12の続きである。

【図12-9】図12の続きである。

【図12-10】図12の続きである。

【図12-11】図12の続きである。

【図12-12】図12の続きである。

20

【図13】[0064] 図13. 表S3-腫瘍抑制因子または細胞の恒常性の制御因子としての役割を果たす、検証されたmiR-155マイクロRNAの標的：APC、腺腫性結腸ポリープ症；BACH1、BTBおよびCNCホモロジー1、塩基性ロイシンジッパー転写因子1；CUTL1、cut様ホメオボックス1；FADD、デスドメインを介してFas (TNFRSF6) と会合する；JARID2、jumonji、ATに富む相互作用ドメイン2；FOXO3、フォークヘッドボックスO3；KGF、ケラチノサイト成長因子；HIVEP2、HIV 1型エンハンサー結合タンパク質2；MYO10、ミオシンX；RHOA、Rasホモログ遺伝子ファミリー、メンバーA；RIP1、受容体相互作用タンパク質キナーゼ1；SHIP1、イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ；SMAD1/5、SMADファミリーメンバー1/5；SOCS1、サイトカインシグナル伝達の抑制因子1；TP53INP、腫瘍タンパク質53に誘導される核タンパク質1。

30

【発明を実施するための形態】

【0043】

[0065] この開示全体を通して、様々な刊行物、特許および公開された特許明細書を、引用を特定することにより参照する。これらの刊行物、特許および公開された特許明細書の開示を、この発明が属する技術の現状をより完全に記述するために本開示の中に援用する。

40

【0044】

[0066] 本発明は、この発見に由来する知識を用いる研究手段、診断法、ならびに療法的方法および組成物を提供する。本発明は、腫瘍細胞を薬物に誘導されるアポトーシスに対して感受性にする目的のために、そして腫瘍細胞の生存、増殖、および浸潤能力を阻害するためにも、産業的に適用可能である。

【0045】

[0067] 用語

[0068] 前記の一般的な記述および以下の詳細な記述は両方とも典型的かつ説明的なものでしかなく、本教示の範囲を限定することは意図していないことは理解されるべきである。この出願において、別途明確に記載しない限り、単数形の使用には複数形が含まれる

50

。本開示の様々な態様の再考を容易にするため、以下の特定の用語の説明を提供する。

【0046】

[0069] 別途言及しない限り、技術用語は慣習的な用法に従って用いられる。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, *Genes V*, Oxford University Press 出版、1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (編者), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd. 出版、1994 (ISBN 0-632-02182-9); および Robert A. Meyers (編者), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc. 出版、1995 (ISBN 1-56081-569-8)において見つけることができる。

【0047】

[0070] 単語“a”または“an”の使用は、特許請求の範囲および/または明細書中で用語“含む”と合わせて用いられる場合、“1”を意味してよいが、それは“1以上”、“少なくとも1”、および“1または1より多く”の意味とも矛盾しない。

【0048】

[0071] また、“含む(comprise)”、“含有する(contain)”、および“含まれる(include)”、またはそれらの基語の修飾、例えば“含む(comprises)”、“含有した(contained)”、および“含まれること(including)”(それらに限定されない)の使用は、限定であることを意図していない。用語“および/または”は、前後の用語と一緒に、または別々に受け取る(taken)ことができることを意味する。説明目的のため、しかし限定としてではなく、“Xおよび/またはY”は“X”もしくは“Y”または“XおよびY”を意味することができる。

【0049】

[0072] miRNAはゲノム配列または遺伝子に由来することは理解されるべきである。この点において、用語“遺伝子”は、単純さのために、所与のmiRNAに関する前駆体miRNAをコードするゲノム配列を指して用いられる。しかし、本発明の態様は、その発現に関わるmiRNAのゲノム配列、例えばプロモーターまたは他の制御配列を含んでよい。

【0050】

[0073] 用語“miR”、“mir”および“miRNA”は一般に、RNAの翻訳を調節することができる小さいRNA分子のクラスであるマイクロRNAを指す(Zeng and Cullen, *RNA*, 9(1):112-123, 2003; Kidner and Martienssen *Trends Genet*, 19(1):13-6, 2003; Dennis C, *Nature*, 420(6917):732, 2002; Couzin J, *Science* 298(5602):2296-7, 2002を参照、そのそれぞれを本明細書に援用する)。

【0051】

[0074] “miRNA核酸”は一般に、上記で定義したようなmiRをコードする、またはmiRをコードする核酸配列に相補的である、または適切なストリンジェンシーの条件下でそのようなRNAもしくはDNAにハイブリダイズしてそれに安定して結合したままであるRNAまたはDNAを指す。特に、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、miRNAおよびアンチセンス分子、pri-miRNA、pre-miRNA、成熟したmiRNA、miRNAシード配列が含まれ; 代替主鎖に基づく核酸または代替塩基が含まれる核酸も含まれる。miRNA核酸は天然源に由来することができ、または合成することができる。

【0052】

[0075] 用語“miRNA”は一般に一本鎖分子を指すが、特定の態様において、本発明において実現される分子は、同じ一本鎖分子の別の領域に、または別の核酸に部分的に(鎖の長さにわたる相補性が10~50%)、実質的に(鎖の長さにわたる相補性が50%より大きい100%未満)、または完全に相補的である領域または追加の鎖も含むであろう。従って、核酸は、分子を含む特定の配列の1個以上の相補または自己相補鎖(単数または複数)または“相補物(complement)(単数または複数)”を含む分子を含んでよい。例えば、前駆体miRNAは100%まで相補的である自己相補的な領域を有してよく、本発明のmiRNAプローブはそれらの標的に少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、または100%相補的であることができ、または相補的である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 3 】

[0076] マイクロRNAは一般に21~23ヌクレオチドの長さである。マイクロRNAは、pri-miRNAとして知られる一次転写産物からプロセシングされて前駆体 (pre) miRNAと呼ばれる短いステムループ構造になり、最終的に機能的な成熟したマイクロRNAになる。成熟したマイクロRNA分子は1種類以上のメッセンジャーRNA分子に部分的に相補的であり、それらの主な機能は遺伝子発現を下方制御することである。マイクロRNAはRNAi経路を通して遺伝子発現を制御する。

## 【 0 0 5 4 】

[0077] “ マイクロRNAシード配列 ”、“ miRNAシード配列 ”、“ シード領域 ”および“ シード部分 ”は、成熟したmiRNAの配列のヌクレオチド2~7または2~8を指して用いられる。miRNAシード配列は典型的にはそのmiRNAの5'末端に位置する。

10

## 【 0 0 5 5 】

[0078] 用語“ miRNA-155 ”および“ miR-155 ”は互換的に用いられており、別途示さない限り、miR-155、pri-miR-155、pre-miR-155、成熟したmiR-155、miRNA-155シード配列、miRNA-155シード配列を含む配列、およびそれらのバリエーションが含まれるマイクロRNA-155を指す。

## 【 0 0 5 6 】

[0079] 用語“ 低miR発現 ”および“ 高miR発現 ”は、試料中にあるmiR/sのレベルを指す相対的な用語である。一部の態様において、低および高miR発現は、癌性試料および対照または非癌性試料の群中のmiR/sレベルの比較により決定される。次いで低および高発現を、試料中のmiRの発現が平均miR発現レベルまたは中央値miR発現レベルよりも上である（高い）か、または下である（低い）かに基づいて、それぞれの試料に割り当てることができる。個々の試料に関して、高または低miR発現は、その試料の高もしくは低発現を有することが既知である対照もしくは基準試料に対する比較により、または標準値に対する比較により決定することができる。低および高miR発現には、miRの前駆体もしくは成熟形態のどちらか、または両方の発現が含まれ得る。

20

## 【 0 0 5 7 】

[0080] 用語“ 発現ベクター ”は一般に、組み換えにより、または合成により生成することができる核酸コンストラクトを指す。発現ベクターには一般に宿主細胞において特定の遺伝子の転写を可能にする一連の特定された (specified) 核酸要素が含まれる。一般に、その遺伝子発現は特定の調節エレメント、例えば構成的または誘導可能なプロモーターの制御下に置かれている。

30

## 【 0 0 5 8 】

[0081] 用語“ 操作可能であるように連結された ”は、調節エレメントと遺伝子またはそのコード領域との間のつながりを記述するために用いられている。すなわち、遺伝子発現は典型的には特定の調節エレメント、例えば（限定ではないが）構成的または誘導可能なプロモーター、組織特異的調節エレメント、およびエンハンサーの制御下に置かれている。遺伝子またはコード領域は、調節エレメント“ に操作可能であるように連結されている ”、または調節エレメント“ に作動式に (operatively) 連結されている ”、または調節エレメント“ と操作可能であるように結合している ”べきであり、それはその遺伝子またはコード領域がその調節エレメントにより制御されている、または影響を受けていることを意味する。

40

## 【 0 0 5 9 】

[0082] 用語“ それらの組み合わせ ”は、本明細書で用いられる際、その用語に先行する列挙された項目の全ての並べ替えおよび組み合わせを指す。例えば、“ A、B、C、またはそれらの組み合わせ ”は、A、B、C、AB、AC、BC、またはABCの少なくとも1つを含み、特定の文脈において順序が重要である場合、BA、CA、CB、ACB、CBA、BCA、BAC、またはCABも含むことを意図している。

## 【 0 0 6 0 】

[0083] 用語“ 抗癌剤 ”および“ 抗癌薬 ”は一般に過剰増殖疾患の処置において用いら

50

れるあらゆる療法剤（例えば化学療法化合物および／または分子療法化合物）、アンチセンス療法、放射線療法、または外科的介入を指す。

【0061】

[0084] 用語“補助的療法”は一般に、一次処置の効果を向上させるために一次処置との組み合わせで用いられる処置を指す。

【0062】

[0085] 用語“臨床転帰”は一般に、疾患もしくは障害に関する処置後の、または処置なしでの対象の健康状態を指す。臨床転帰には、死亡までの時間の長さにおける増大、死亡までの時間の長さにおける減少、生存の機会における増大、死亡の危険性における増大、生存、疾患なしでの生存、慢性疾患、転移、進行した、または侵襲性の疾患、疾患の再発、死亡、および療法に対する望ましい、または乏しい応答が含まれるが、それらに限定されない。

10

【0063】

[0086] 用語“対照”は一般に、実験試料、例えば対象から得られた腫瘍試料との比較のために用いられる試料または標準を指す。一部の態様において、その対照は健康な対象から得られた試料または診断される対象から得られた非癌性試料である。一部の態様において、その対照は同じ対象から得られた非癌性細胞/組織試料である。一部の態様において、その対象は既存対照（historical control）または基準値（すなわち、ベースラインまたは正常値、例えば非癌性試料におけるレベルを表す、以前に試験された対照試料または試料の群）である。他の態様において、その対照は健康な対象、例えば供与者から得られた試料である。癌性試料および非癌性組織試料は、当該技術分野において既知のあらゆる方法に従って得ることができる。

20

【0064】

[0087] 用語“サイトカイン類”は一般に、他の細胞の挙動に影響を及ぼす多種多様な造血および非造血細胞により産生されるタンパク質を指す。サイトカイン類は自然免疫応答および適応免疫応答の両方に関して重要である。

【0065】

[0088] 用語“生存における減少”は一般に、対象の死亡前の時間の長さにおける減少、またはその対象の死亡の危険性における増大を指す。

【0066】

[0089] 用語“miR発現のレベルを検出すること”は一般に、試料中に存在するそのようなmiRの量を定量化することを指す。miRまたはあらゆるマイクロRNAの発現を検出することは、当該技術分野において既知の、または本明細書で記述されるあらゆる方法を用いて、例えばqRT-PCRにより、達成することができる。miRの発現を検出することには、そのmiRの成熟形態またはそのmiRの発現と相関している前駆体形態のどちらかの発現を検出することが含まれる。例えば、miRNA検出法は、例えばRT-PCRによる配列特異的検出を含む。miR特異的プライマーおよびプローブは、その前駆体および成熟したmiR核酸の配列を用いて設計することができ、それは当該技術分野において既知であり、その配列の機能を変化させない修飾が含まれる。

30

【0067】

[0090] 用語“正常な細胞”は一般に、異常な増殖または分裂を経ていない細胞を指す。正常な細胞は非癌性であり、いかなる過剰増殖疾患または障害の一部でもない。

【0068】

[0091] 用語“抗新生物剤”は一般に、標的とされる（例えば悪性）新生物の増殖、成長、または拡散を遅らせるあらゆる化合物を指す。

【0069】

[0092] 用語“予防する”、“予防すること”および“予防”は一般に、動物における病的細胞（例えば過剰増殖性または新生物性細胞）の出現率における減少を指す。予防は完全であってよく、例えば対象における病的細胞の完全な非存在であってよい。予防は、部分的であってよく、その場合対象における病的細胞の出現率が、本発明がない場合に

40

50

出現していたであろう出現率よりも低い。疾患を“ 予防すること ” は一般に、疾患の完全な発現を抑制することを指す。

【 0 0 7 0 】

[0093] 用語“ 疾患を処置すること ” および / または“ 疾患を改善すること ” は一般に、疾患の徴候もしくは症候または病的状態をそれが発現し始めた後に改善する療法的介入を指す。“ 改善すること ” は一般に、疾患の徴候または症状の数または重症度における低減を指す。

【 0 0 7 1 】

[0094] 用語“ 対象 ” にはヒトおよび非ヒト動物が含まれる。処置に関する好ましい対象はヒトである。“ 対象 ( Subject ) ” および“ 対象 ( subject ) ” は、本明細書において互換的に用いられている。

10

【 0 0 7 2 】

[0095] 用語“ 療法的 ” は一般に、診断および処置の両方を含む総称である。

【 0 0 7 3 】

[0096] 用語“ 療法剤 ” は一般に、対象に適切に投与された際に望まれる療法的または予防的作用を誘導することができる化合物、小分子、または他の組成物、例えばアンチセンス化合物、タンパク質、ペプチド、小分子、核酸、抗体、プロテアーゼ阻害剤、ホルモン、ケモカインまたはサイトカインを指す。例えば、療法剤には発現または転移を予防または抑制する薬剤が含まれる。本明細書で用いられる際、“ 候補薬剤 ” は、それが療法剤として機能することができるかどうかを決定するためのスクリーニングのために選択された化合物である。“ インキュベートすること ” には、薬剤を細胞または組織と相互作用するための十分な長さの時間が含まれる。“ 接触させること ” には、固体または液体形態の薬剤を細胞または組織と共にインキュベートすることが含まれる。細胞または組織を薬剤で“ 処置すること ” には、その薬剤をその細胞または組織と接触させること、またはその薬剤をその細胞または組織と共にインキュベートすることが含まれる。

20

【 0 0 7 4 】

[0097] 用語“ 療法上有効量 ” は一般に、結果として障害の1種類以上の症状の改善をもたらす、または障害の進行を防ぐ、またはその障害の後退を引き起こすために十分な療法剤の量を指す。例えば、癌の処置に関して、1態様において、療法上有効量は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも100%、腫瘍増殖の速度を減少させる、腫瘍量を減少させる、転移の数を減少させる、腫瘍の進行までの時間を増大させる、または生存時間を増大させる療法剤の量を指すであろう。

30

【 0 0 7 5 】

[0098] “ 療法上有効量 ” は、その薬剤で処置されている対象において、または細胞において望まれる作用を達成するために十分な明記された医薬品または療法剤の量であることができる。例えば、これは、対象においてmiR/sの発現を変化させ、それによりその疾患または障害を予防、処置または改善する療法剤の量であることができる。その薬剤の有効量は、処置されている対象または細胞、およびその療法組成物の投与の方法が含まれるがそれらに限定されないいくつかの要因に依存するであろう。

40

【 0 0 7 6 】

[0099] 用語“ 医薬的に許容できるビヒクル ” は一般に、一般的に用いられるであろうような医薬的に許容できるキャリアー ( ビヒクル ) を指す。E. W. Martin, Mack Publishing Co. ( ペンシルベニア州イーストン ) によるRemington ' s Pharmaceutical Sciences、第15版(1975)は、1種類以上の療法化合物、分子または薬剤の医薬的送達に適した組成物および配合物を記述している。一般に、そのキャリアーの性質は、用いられる個々の投与方式に依存するであろう。例えば、非経口配合物は通常、医薬的および生理的に許容できる流体、例えば水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロール等

50

が含まれる注射可能な流体をビヒクルとして含む。固体組成物（例えば粉末、丸剤、錠剤、またはカプセルの形態）に関して、一般に用いられる非毒性の固体のキャリアーには、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが含まれ得る。生物学的に中性のキャリアーに加えて、投与される医薬組成物は、少量の非毒性の補助的物質、例えば湿潤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤等、例えば酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含むことができる。

#### 【0077】

[00100] 用語“医薬的に許容できる塩”は一般に、標的動物（例えば哺乳類）中で生理的に許容される本発明の化合物のあらゆる塩（例えば酸または塩基との反応により得られる塩）を指す。本発明の化合物の塩類は、無機または有機酸および塩基に由来してよい。酸の例には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、スルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸等が含まれるが、それらに限定されない。他の酸、例えばシュウ酸は、それら自体では医薬的に許容できないが、本発明の化合物およびそれらの医薬的に許容できる酸付加塩類を得る上での中間体として有用な塩類の調製において用いられてよい。塩基の例には、アルカリ金属（例えばナトリウム）水酸化物、アルカリ土類金属（例えばマグネシウム）水酸化物、アンモニア等が含まれるが、それらに限定されない。塩類の例には以下のものが含まれるが、それらに限定されない：酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩（camphorate）、樟脳スルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩（flucoheptanoate）、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メシル酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモエート（palmoate）、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩等。塩類の他の例には、適切な陽イオン、例えば $\text{Na}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、および $\text{NW}_4^+$ （ここでWは $\text{C}_{1-4}$ アルキル基である）等と化合した本発明の化合物の陰イオンが含まれる。療法的使用に関して、本発明の化合物の塩類は医薬的に許容できるものとして意図されている。しかし、医薬的に許容できない酸および塩基の塩類も、例えば医薬的に許容できる化合物の調製または精製において用途を見出す可能性がある。

#### 【0078】

##### [00101] miR-155核酸分子

[00102] miR-155をコードする核酸分子は、本発明の様々な態様において用いられる。成熟したmiR-155、pre-miR-155に関するmiR-155配列を一部の態様において用いることができる。他の態様において、成熟したmiR-155およびpre-miR-155をコードするcDNAを用いることができる。pri-miR-155をコードする核酸分子も一部の態様において用いることができる。miRNA配列は、約6ヌクレオチドから約99ヌクレオチドまで、またはより多くのヌクレオチドを含んでよい。一部の態様において、miRNA配列は、pre-miRNA-155の最初の約6ヌクレオチド～最初の約22ヌクレオチドを含む。miR-155のコード配列またはその相補物の少なくとも6ヌクレオチド（すなわちハイブリダイズ可能な部分）を有する単離または精製されたポリヌクレオチドが、一部の態様において用いられる。他の態様において、miR-155ポリヌクレオチドは好ましくは少なくとも（連続した）22ヌクレオチド、または完全長のmiR-155のコード配列を含む。

#### 【0079】

[00103] 一部の態様において、miRNAの活性を遮断することができる核酸（抗miRNAまたは抗miR）が用いられる。そのような核酸には、例えばアンチセンスmiR-155が含まれる。例えば、“miR-155アンタゴニスト”は、miRNA-155の活性を妨害する、または阻害する

ように設計された薬剤を意味する。

【0080】

[00104] 特定の態様において、そのmiR-155アンタゴニストはmiRNAを標的としたアンチセンス化合物からなることができる。例えば、そのmiR-155アンタゴニストは、miRNAの活性を妨害する、または阻害する小分子、または同様のものからなることができる。

【0081】

[00105] 特定の態様において、そのmiR-155アンタゴニストは、miRNAまたはその前駆体の核酸塩基配列に相補的な核酸塩基配列を有する修飾されたオリゴヌクレオチドが含まれていてもよい。

【0082】

[00106] 特定の態様において、その抗miRは、合計で約5～約100ヌクレオチド以上、より好ましくは約10～約60ヌクレオチドを含むアンチセンスmiR-155核酸であり、好ましくは少なくともmiR-155のシード領域に相補的である配列を有する。特に好ましい態様において、抗miRNAは合計で少なくとも約5～約26ヌクレオチドを含んでいてよい。一部の態様において、その抗miRNAの配列は、miR-155の5'領域に実質的に相補的である少なくとも5ヌクレオチド、miR-155の3'領域に実質的に相補的である少なくとも5ヌクレオチド、miR-155のシード配列に実質的に相補的である少なくとも4～7ヌクレオチド、またはmiR-155のシード配列の隣接領域に実質的に相補的である少なくとも5～12ヌクレオチドを含むことができる。

【0083】

[00107] 一部の態様において、抗miR-155はmiRNAの配列の相補物を含む。他の態様において、抗miR-155はそのシード配列の相補物を含み、またはストリンジェントな条件下でそのシード配列にハイブリダイズすることができる。好ましい分子は、ストリンジェントな条件下で成熟したmiR-155をコードするcDNAの相補物にハイブリダイズすることができる分子である。

【0084】

[00108] 本明細書で記述される方法はmiR-155または抗miR-155の源により限定されないことは理解されるべきである。そのmiR-155はヒトまたは非ヒト哺乳類からのものであることができ、あらゆる組み換えによる源に由来することができる、in vitroで、または化学合成により合成されることができる。そのヌクレオチドは、個々の状況に応じてDNAまたはRNAであってよく、二本鎖、一本鎖または部分的に二本鎖形成した形態で存在してよい。miR-155および抗miR-155核酸は、大量に核酸を調製するために典型的に用いられる、あらゆる一般に用いられる手段により調製されてよい。例えば、核酸は、商業的に入手可能な試薬および合成装置を用いて、当該技術分野において周知である方法により、および/または自動化された合成法を用いて、化学的に合成されてよい。

【0085】

[00109] 本明細書で記述される方法は天然に存在するmiR-155配列に限定されず；むしろmiR-155配列の変異体およびバリエーションも意図される範囲内であることも理解されるべきである。例えば、1個以上の置換、付加および/または欠失を有するmiR-155であるmiR-155の変異体、miR-155の断片、ならびにmiR-155の短縮化版をコードするヌクレオチド配列も、本明細書で記述される方法において有用である可能性がある。

【0086】

[00110] 特定の態様において、センスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの安定性を増大させる、および/または送達を最適化するために、修飾されたヌクレオチドまたは主鎖修飾を用いることができることも理解されるべきである。一部の態様において、miR-155または抗miR-155オリゴヌクレオチドを修飾して標的細胞への送達を増進することができる。一部の態様において、miR-155および抗miR-155をコードする核酸分子を用いて免疫細胞の機能、活性および/または増殖を調節することができる。

【0087】

[00111] miR-155発現ベクター

【00112】 miR-155または抗miR-155コード配列を含有する発現ベクターを、miR-155または抗miR-155を標的細胞に送達するために用いることができる。特定の態様において、発現ベクターは、標的細胞におけるそのコード配列の発現を方向付ける調節エレメントと場合により結合した、miR-155配列および／または抗miR-155配列を含有することができる。個々のベクターおよび／またはそれにコード配列が操作可能であるように連結される発現制御配列の選択は、一般に（当業者により理解されているように）望まれる個々の機能的特性、例えば形質転換される宿主細胞に依存することは理解されるべきである。

【0088】

【00113】 本明細書で記述される方法と共に有用であるベクターは、好ましくは適切な宿主中での複製および標的細胞中でのmiR-155または抗miR-155の発現を方向付けることができることも理解されるべきである。

10

【0089】

【00114】 有用なベクターにはその発現が薬物耐性のような検出可能なマーカーを与える選択遺伝子が含まれ得ることも理解されるべきである。選択遺伝子の限定的でない例には、抗生物質もしくは他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を与える、栄養要求の欠乏を補う、または培地から与えられない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードするベクターが含まれる。その検出可能なマーカーは場合により別個のプラスミド上に存在し、同時形質移入により導入することができることも理解されるべきである。

20

【0090】

【00115】 発現制御エレメントを用いて操作可能であるように連結されたコード配列の発現を制御することができることも理解されるべきである。限定的でない例には、以下のものが含まれる：誘導可能なプロモーター、構成的プロモーター、エンハンサー、および他の調節エレメント。一部の態様において、容易に制御される、例えば標的細胞の培地中の栄養素に反応する誘導可能なプロモーターが用いられる。一部の態様において、そのプロモーターはU6プロモーターまたはCMVプロモーターである。標的細胞中でのmiR-155の発現への適応に適した他の方法、ベクター、および標的細胞を、その特定の状況に容易に適応させることができることも理解されるべきである。

【0091】

【00116】 オリゴヌクレオチドおよび発現ベクターの標的細胞または組織への送達

30

【00117】 特定の態様において、miR-155または抗miR-155オリゴヌクレオチドが標的細胞に送達される。他の態様において、miR-155または抗miR-155をコードする発現ベクターが標的細胞に送達され、そこでmiR-155または抗miR-155が発現される。オリゴヌクレオチドおよび発現ベクターの標的細胞への送達のために様々な方法を用いることができることは理解されるべきである。

【0092】

【00118】 特定の態様において、その標的細胞は宿主中に、例えば哺乳類中に存在してよく、または宿主の外部で培養されていてよい。従って、miR-155または抗miR-155のインビボ、エキソビボおよびin vitroの標的細胞への送達は、適切な方法で成し遂げることができる。特定の態様において、miR-155または抗miR-155オリゴヌクレオチドは標的器官または組織に送達される。標的器官または組織には、癌細胞またはそのような細胞の前駆体が位置していることが既知である部位が含まれてよく、例えば固形癌、例えば乳癌、結腸癌、胃癌および肺癌が含まれてよい。

40

【0093】

【00119】 特定の態様において、細胞の発生、機能、増殖および／または活性がmiR-155または抗miR-155を送達することにより調節される。

【0094】

【00120】 特定の態様において、miRNA-155または抗miR-155オリゴヌクレオチドをB細胞に投与することにより、細胞の変異を調節する（例えば抑制する）ことができる。miR-155または抗miR-155オリゴヌクレオチドを癌細胞に、または前癌細胞に投与することにより

50



、その細胞の数および／または活性を調節することができる。

【 0 0 9 5 】

[00121] 特定の態様において、miR-155または抗miR-155オリゴヌクレオチドをその細胞に送達することにより、その細胞の免疫機能および／または発生を調節することができる。

【 0 0 9 6 】

[00122] オリゴヌクレオチドおよび／または発現ベクターの標的細胞への送達は様々な方法を用いて成し遂げることができることは理解されるべきである。特定の態様において、形質移入剤を用いることができる。一般に、形質移入剤（例えば形質移入試薬および／または送達ビヒクル）は、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドに結合し、またはそれらと複合体形成してそれらの細胞中への侵入を増進する化合物（単数または複数）であることができる。有用な形質移入試薬の限定的でない例には、以下のものが含まれる：陽イオン性リポソームおよび脂質、ポリアミン類、リン酸カルシウム沈殿、ポリカチオン、ヒストンタンパク質、ポリエチレンジイミン、ポリリジン、および高分子両性電解質錯体。別の送達法には、miRNA/sを細胞中に、著しい細胞死を誘導せずに電気穿孔すること（electroporating）が含まれ得る。加えて、miRNAを異なる濃度で形質移入することができる。

【 0 0 9 7 】

[00123] miRNA、抗miRNAおよび発現ベクターの送達のための有用な試薬の限定的でない例には、以下のものが含まれる：タンパク質およびポリマーの複合体（ポリプレックス（polyplexes））、脂質およびリポソーム（リボプレックス（lipoplexes））、ポリマーおよび脂質の組み合わせ（リボポリプレックス（lipopolyplexes））、ならびに多層および再荷電された（recharged）粒子。形質移入剤は凝縮核酸も含んでよい。形質移入剤は官能基（functional groups）をポリヌクレオチドと会合させるために用いることもできる。官能基には、細胞を標的化する部分、細胞受容体のリガンド、核局在シグナル、エンドソームまたは他の細胞内小胞からの内容物の放出を増進する化合物（例えば膜活性（membrane active compound）化合物）、およびそれらが付着している化合物または複合体の挙動または相互作用を変化させる他の化合物（相互作用調節剤）が含まれ得る。

【 0 0 9 8 】

[00124] 特定の態様において、miR-155または抗miR-155核酸および形質移入試薬は、例えば注射により系統的に送達することができる。他の態様において、それらを標的細胞を含む特定の領域、例えば特定の器官、例えば固形癌組織中に注射することができる。当業者は、miRNA-155、抗miRNA-155または発現ベクターをインビボ、エキソビボおよび／またはin vitroで標的細胞に送達するための適切な系を、過度の実験なしで選択および使用することができるであろう。

【 0 0 9 9 】

[00125] 一般的な説明

[00126] 本明細書において、miR-155の過剰発現および炎症促進環境の、6-チオグアニン（6-GT）への耐性に基づいて検出することができるヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）の自然突然変異の発生頻度への作用を記述する。miR-155の過剰発現および炎症促進環境は両方ともHPRT変異の発生頻度を増大させ、細胞周期の進行を遮断するキナーゼであるWEE1を下方制御した。HPRTの突然変異の増大した発生頻度は、ミスマッチ修復機構における欠陥にはわずかにしか帰することができなかった。この結果は、miR-155は変異を抑制する異なる遺伝子を同時に標的にして、WW1のような細胞周期制御因子の標的化によりDNA保護機構の効率を低下させることにより突然変異率を高めることを示している。

【 0 1 0 0 】

[00127] 腫瘍抑制遺伝子を同時に標的にし、突然変異誘発表現型を誘導することにより、miR-155は腫瘍の発現および進行に必要な遺伝子の変化の選択を可能にする。従って、内因性のmiR-155のレベルを低減する薬物は、炎症と関連する癌の処置において有用で

ある。

【0101】

[00128] 本明細書において、miR-155の突然変異誘発活性およびmiR-155とつながる炎症環境の突然変異誘発活性は炎症および癌を結び付ける重要な機構であることを示す結果を記述する。本明細書において、miR-155および炎症性刺激は自然突然変異率を増大させることを示す結果も記述する。

【0102】

[00129] 医薬的に有効な量の本明細書におけるmiR-155組成物を投与することを含む、そのような処置を必要とする対象において突然変異率を抑制する処置をするための方法も提供する。

【0103】

[00130] 医薬的に有効な量のアンチセンスmiRNAを投与することを含む、そのような処置を必要とする対象において癌を処置するための方法も提供され、ここでそのアンチセンスmiRNAはmiRNA-155に対するアンチセンスである。

【0104】

[00131] アポトーシスに有効な量の本明細書で記述するような組成物を導入することを含む、急速に変異している細胞のアポトーシスを誘導するための方法も提供する。特定の態様において、その方法はアポトーシスに有効な量のアンチセンスmiRNAを導入することを含み、ここでそのアンチセンスmiRNAはmiRNA-155に対するアンチセンスである。

【0105】

[00132] 以下の工程を含む、医薬的に有用な組成物を同定するための方法も提供される：アンチセンスmiRNA-155を細胞培養に導入し；試験組成物をその細胞培養に導入し；そしてアポトーシスを誘導する試験組成物を医薬的に有用な組成物として同定する。

【0106】

[00133] 本発明は以下の実施例においてさらに定義され、別途記載しない限り、ここで全ての部および百分率は重量によるものであり、度はセ氏である。これらの実施例は、本発明の好ましい態様を示すものであるが、説明としてのみ与えられていることは理解されるべきである。上記の論考およびこれらの実施例から、当業者はこの発明の本質的な特徴を確かめることができ、その精神および範囲から逸脱せずに、本発明の様々な変更および修正を行ってそれを様々な使用および条件に適応させることができる。

【実施例】

【0107】

[00134] 実施例I

[00135] 結果

[00136] miR-155の過剰発現は結果として高められた突然変異率をもたらす。

【0108】

[00137] ヒトのmiR-155は、21番染色体上に位置する非コードBIC転写産物（EMBL：AF402776）中に存在する。miR-155は数ある突然変異誘発経路の中でもDNAミスマッチ修復（MMR）機構の中核的な構成要素を標的とし、これはmiR-155の高められたレベルは自然突然変異率を高める可能性があることを示唆している。

【0109】

[00138] 突然変異率を測定するため、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）座位を突然変異率を概算するための方法として用いた。HPRT酵素はプリン回収経路におけるグアニンのグアニンーリン酸への変換およびヒポキサンチンのイノシンーリン酸への変換を触媒する。

【0110】

[00139] HPRT機能の喪失は、6-TGはHPRTによるホスホリボシル化の後にのみ細胞毒性になるため、6-チオグアニン（6-TG）に対する耐性を与える。この耐性を用いて、HPRT座位において変異を獲得した細胞を同定することができる。その獲得される変異はランダムに起こると考えられるため、HPRT遺伝子はレポーター遺伝子として用いることができ、HP

10

20

30

40

50

RT座位における変異の発生頻度を全体的なゲノムの不安定性の概算値として用いることができる。miR-155の突然変異率への作用を測定するため、本発明者はまず成熟したmiR-155をTet-On誘導系の制御下で発現するSW620結腸直腸腺癌細胞およびMDA-MB-231乳癌細胞の安定なクローンを開発した。SW620クローン8A、22C、および23Aをドキシサイクリンと共に培養すると、miR-155の発現がそれぞれ $2.94 \pm 0.23$ 、 $5.58 \pm 0.43$ 、および $8.10 \pm 0.65$ 倍（平均 $\pm$ SD）増大した（図4および図11-表S1）。

【0111】

[00140] 同様に、ドキシサイクリン処理はMDA-MB-231クローン9C、2B、および19BにおいてmiR-155の発現をそれぞれ $12.01 \pm 2.34$ 、 $26.42 \pm 1.11$ 、および $32.07 \pm 3.27$ 倍増大させた。変動解析の修正版に基づいて概算した細胞増殖で調整したHPRT突然変異率は、SW620およびMDA-MB-231細胞クローンの両方において、miR-155のレベルと共に増大した（図1Aおよび図1B）。miR-155の一定の高められた発現は、突然変異率をSW620クローンにおいて3.39倍に至るまで、MDA-MB-231クローンにおいて3.47倍に至るまで高めた（図11-表S1）。

10

【0112】

[00141] さらに、miR-155をTet-On誘導系の制御下で $19.57 \pm 0.62$ 倍一過性に過剰発現するHCT116結腸直腸癌細胞（図5）は、2.81倍高い突然変異率を示した（図11-表S1）。これらの結果は、突然変異率とmiR-155レベルの間の直接のつながりを確立する。

【0113】

[00142] SW620およびMDA-MB-231細胞の細胞増殖で調整された基底の自然突然変異率は比較可能であり（それぞれ細胞あたり $0.75 \pm 0.27 \times 10^{-7}$ および $1.28 \times 10^{-7}$ 突然変異）、HCT116細胞の自然突然変異率（細胞あたり $560 \times 10^{-7}$ 突然変異）よりも約440倍低く（図11-表S1）、これはHCT116細胞がhMLH1 MMR遺伝子の欠失を含有するためである。hMLH1 MMR遺伝子の欠失は155に誘導される突然変異誘発活性を部分的にしか減少させず、これはmiR-155に誘導される突然変異誘発活性は突然変異率の基底レベル（すなわちDNA保護機構の完全性）の影響をあまり受けないこと、ならびにmiR-155がDNA修復および/またはゲノムの安定性に関わりがあることが示されている追加の転写産物を標的とすることを示している。

20

【0114】

[00143] 炎症性刺激は乳癌細胞においてmiR-155を上方制御する。

30

【0115】

[00144] ヒト細胞株を、炎症促進環境のmiR-155発現への作用に関してスクリーニングした。結腸直腸癌の一部は炎症性環境につながりがあるため、結腸癌細胞株（SW480、SW620、HCT15、HCT116、およびRKO）を含めた。乳癌（MDA-MB-231、T47D、453、436、およびMCF7）および肺癌（A459）細胞株を、これらのタイプの癌においてmiRNAが上方制御されているために含めて、4種類の他の細胞株を比較のために含めた。

【0116】

[00145] 細胞を、多くの炎症性サイトカイン類、例えばTNF、IL-6、IL-8およびIL1-を含有する、LPSで刺激したヒトTHP-1単球細胞の上清、すなわちLPSで刺激したマクロファージによる条件培地（LSMCM）で一夜処理した。定量的RT-PCR（qRT-PCR）分析に基づいて、結腸癌および肺癌細胞株におけるmiR-155の発現はLSMCMによりわずかにしか影響を受けなかった（図2A）。

40

【0117】

[00146] 対照的に、miR-155のレベルはMDA-MB-231、BC-453、およびT47D乳癌細胞株においてそれぞれ9、17および21倍増大した。今では本発明者は本明細書においてmiR-155aが免疫応答の終結を制御していると信じているため、本発明者は、特定の腫瘍において、およびLPSで負荷をかけた（challenged）THP-1細胞において上方制御されているマイクロRNAであるmiR-155aの発現も分析した。miR-155とは極めて対照的に、最も高いmiR-155aレベルがHCT15およびHCT116結腸細胞株において見られ（示していない）、これはmiR-155およびmiR-155aの炎症性刺激による上方制御が上記の癌細胞株において独立して起こり、お

50

そらく組織特異的であることを示している。

【0118】

[00147] TNFおよびLPSは両方ともmiR-155を誘導することができるため、本発明者は、これらの2種類の分子のMDA-MB-231細胞における作用を分析した。TNFまたはLPSのどちらかによる、または両方による刺激はmiR-155の発現を増大させることが分かった(図2B)。従って、本発明者は、炎症促進環境の作用を模倣するためにTNF/LPSを用いた。

【0119】

[00148] 炎症性刺激は突然変異率を高める。

【0120】

[00149] 刺激なしのMDA-MB-231細胞において、突然変異率は細胞あたり世代あたり $0.69 \times 10^{-7}$ 突然変異であると計算され、この値は前にSW480細胞において見られた値( $0.75 \times 10^{-7}$ )と類似している。その概算された突然変異率は、平均変異体出現頻度および集団倍加に基づいていた。HCT116細胞とは異なり、MDA-MB-231およびSW480細胞は両方とも完全なDNA修復機構を有することを特筆する。変異体出現頻度は処理の3日後には既に有意に異なる値になっており( $P = 0.038$ )、TNF/LPSで処理したMDA-MB-231細胞では、未処理の対照細胞に対して、突然変異率は2.52倍増大して細胞あたり世代あたり $1.73 \times 10^{-7}$ 突然変異になっていた(図2C)。その処理は、おそらくTNFが乳癌細胞において増殖停止を誘導するため、細胞増殖の速度を低下させた。従って、T47D細胞の1回または2回のLSMCM刺激は、6-TG耐性コロニーの出現頻度をそれぞれ50%および150%増大させた(図2D)。

【0121】

[00150] 従って、結果としてmiR-155発現の上方制御をもたらす炎症促進シグナルは、有意であるが中程度の突然変異誘発表現型を誘導し、それは慢性炎症により増進される可能性がある。

【0122】

[00151] HPRT変異体の特性付け。

【0123】

[00152] 次いで、本発明者は、変異のサイン(signature)を決定するため、T47D、HCT116、およびMDA-MB-231の6-TG耐性コロニーから抽出されたRNAから調製されたcDNA中で見付かったHPRT変異を分析した(図11-表S1および図12-表S2)。

【0124】

[00153] ドキシサイクリンで処理されたHCT116細胞からのHPRT変異は、DNA MMR欠損細胞において一般的に見られるタイプの1塩基の欠失または挿入を示した。大部分は、MMRの欠陥と一致するフレームシフト、転位、および転換変異のサインを示した。miR-155の過剰発現を伴う挿入およびエキソンの欠失における増大も存在し；この増大は一般に変化した組み換え修復に帰せられた。対照的に、組み換え修復の欠陥と一致する欠失変異は、条件に関わらず、LSMCMで刺激したT47D細胞およびドキシサイクリンで処理したMDA-MB-231細胞におけるHPRT変異の大部分を占めていた(図11-表S1および図12-表S2)。これらの結果は組み換え修復に関する役割と一致しており、それはこれらの乳房腫瘍細胞株において乳癌1(BRCA1)および乳癌2(BRCA2)変異により例示される。これらのタイプの変異は以前にいくつかのT細胞白血病細胞株において見付かっていることを特筆する。しかし、本発明者は、これらの細胞における減少したMMRと一致する転位および転換における中程度の増大に気付いた。

【0125】

[00154] miR-155の過剰発現は細胞増殖を増進する。

【0126】

[00155] 注目すべきことに、miR-155の上方制御はHCT116(図3A)およびMDA-MB-231のHPRT変異体コロニーの大きさを増大させ、それらが選択プロセスの間により早く見えてくることを可能にした。前方散乱比較に基づいて、ドキシサイクリン処理後にmiR-155の32倍の上方制御を示したMDA-MB-231クローン19Bのより大きなコロニーは、より大きな細胞の存在からは生じなかった。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 7 】

[00156] 対照的に、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) 染色は、これらの細胞が、未処理の細胞と比較して、少なくとも1回の細胞分裂の余分な回を経たことを示唆した (図3B)。これらの結果は、miR-155がトランスジェニックマウスにおいて増殖を促進することを示す報告と相関する。従って、miR-155を過剰発現するHPR T変異体コロニーのより大きな大きさは、おそらく増進された細胞増殖に起因する。

## 【 0 1 2 8 】

[00157] miR-155および炎症性環境は、細胞周期阻害因子であるWEE1を下方制御する。

## 【 0 1 2 9 】

[00158] 理論により束縛されることを望むわけではないが、本発明者は、本明細書においてここでmiR-155が細胞周期制御因子を標的にすることにより細胞増殖を増進することを信じている。実際、T47D細胞において、LSMCM処理およびmiR-155の過剰発現は両方とも、Cdc2/サイクリンBの阻害性のチロシンリン酸化を触媒するキナーゼであり細胞周期の進行をG2/M期で遮断するWEE1のレベルを低減した (図3C)。対照的に、アンチセンスmiR-155阻害性RNA (155-I) はWEE1の蓄積を増大させた。LSMCMおよびmiR-155の過剰発現は両方とも、WEE1の3' UTRを含有するルシフェラーゼレポーターコンストラクトの発現も低減した (図6)。

## 【 0 1 3 0 】

[00159] 従って、155-IはB細胞系列においてmiR-155を過剰発現するEμ-miR-155トランスジェニックマウスから分離された初代B細胞においてWee1のレベルを増大させ、従ってWee1が本物のmiR-155標的であることが確証された。まとめると、これらの結果は、炎症性刺激はmiR-155の上方制御によりWEE1を下方制御することを示している。WEE1の枯渇は新しく複製されたDNAにおけるDNA損傷を急速に誘導するため、これらの結果は、miR-155の過剰発現は癌と関係する変異の選択に必要な期間を短くする可能性があることを示している。さらに、Affymetrixマイクロアレイは、細胞周期、DNA修復、およびゲノムの安定性を制御するいくつかの因子をコードする転写産物はT47DおよびMDA-MB-231細胞株両方においてLSMCMの影響を受けることを明らかにした (図10-表2)。この結果は、miR-155と類似して欠陥のあるチェックポイントおよびゲノムの不安定性を誘導する炎症性刺激の能力が腫瘍発生に寄与している可能性があることを示している。

## 【 0 1 3 1 】

[00160] 論考

[00161] この実施例において、miR-155の、およびmiR-155と関連する炎症促進環境の突然変異誘発活性を分析した。炎症性刺激が結果としてmiR-155の上方制御をもたらした細胞は、HPRTアッセイにより推定した際に、突然変異率における2~3倍の増大を示した。

## 【 0 1 3 2 】

[00162] さらに、miR-155の誘導可能な発現は結果として突然変異率における類似の増大をもたらし、これは炎症性刺激による突然変異率の上方制御はmiR-155依存性であることを示している。その突然変異率は、炎症性刺激が自然免疫応答に関わっていることが示されている別のマイクロRNAであるmiR-155のみを上方制御した細胞では増大しなかった (データは示していない)。

## 【 0 1 3 3 】

[00163] MDA-MB-231細胞におけるmiR-155のレベルはドキシサイクリン処理の間に一定に12および32倍増大したが、それらはLPS/TNF処理後は一過性にプラスまたはマイナス4倍しか増大しなかった (図1Bおよび図2B)。

## 【 0 1 3 4 】

[00164] それでもなお、突然変異率はドキシサイクリン処理後に1.56~3.47倍およびLPS/TNF処理後に2.52倍増大した (図1Bおよび図2C)。この結果は、慢性炎症、自己免疫疾患、または癌の発症を伴う内因性の遺伝子回路網の脱制御の結果としてもたらされる増大したmiR-155レベルは、著しい突然変異誘発表現型をもたらす可能性があることを示している。これらの結果は、他の炎症性シグナル伝達経路がmiR-155と相乗作用で、または並

10

20

30

40

50

行して働いている可能性があることも示している。

【0135】

[00165] miR-155は腫瘍抑制遺伝子、例えば、デスドメインを介してFasと会合する(FADD)、Jumonji ATに富む相互作用ドメイン2(JARID2)、およびSrcホモロジ-2含有イノシトールホスファターゼ1(SHIP1)を標的とすることを特筆する(図13-表S3)。加えて、突然変異誘発活性を有する他のマイクロRNAがLPSシグナル伝達により上方制御される。hMLH1 DNA修復酵素を欠くHCT116細胞における増大した突然変異率は、この増大がmiR-155のDNA修復、組み換え、または細胞周期チェックポイントに関わる他の転写産物の標的化により起こることを示した。DNAの複製がG2/Mチェックポイントの前に正しく行われる場合、変異はS期の間に蓄積するため、本発明者は、それらの低減した発現は増大した突然変異率と関係している可能性があるため、miR-155の予測される標的でありG2/Mの移行の阻害因子として作用する転写産物を探した。加えて、これらの転写産物はLPS/TNFシグナル伝達の標的として作用し得る。本発明者はまず、それがすべてのこれらの基準を満たしたためWEE1キナーゼに集中したことは理解されるべきである。

10

【0136】

[00166] T47D細胞において、miR-155の過剰発現またはLSMCMによる処理は、結果としてWEE1発現の下方制御をもたらした。WEE1を標的とし、結果としてG2/Mの移行を促進することにより、miR-155はまだDNAを修復していない細胞が有糸分裂に進むことを可能にし、結果として蓄積した変異をもたらす。Aktキナーゼも、G2/M開始因子として機能し、WEE1をリン酸化により不活性化し、そうして細胞周期の移行を促進することが知られている。Aktは、数あるマイクロRNAの中でもmiR-155のレベルを調節することによりLPSシグナル伝達に関わることが示されている。理論により束縛されることを望むわけではないが、本発明者は、本明細書においてここで、発癌性の(oncogenic)Aktおよび腫瘍-炎症性の(onco-inflammatory)miR-155は炎症の間にWEE1のレベルでクロストークしていると信じている。本発明者は、炎症性シグナルと関係する増大した突然変異率は、WEE1およびLPSにより下方制御され、miR-155の直接的または間接的な標的のどちらかである他のDNA修復酵素のmiR-155による標的化の組み合わせ作用であると考えている。癌は体細胞における変異の蓄積の結果もたらされると信じられており、この実施例は、突然変異率を増大させることにより、炎症性のmiR-155が炎症に誘導される癌一般における鍵となるプレイヤーであることを示している。

20

30

【0137】

[00167] 真核生物における細胞周期の進行およびDNA修復の制御は、高度に保存されている。しかし、感染が起きた場合、細胞はサイトカイン類、ケモカイン類、および免疫防御の他の炎症性構成要素を産生することにより迅速に応答しなければならない。この強い応答の間、DNA修復機構および細胞周期チェックポイントは保留されることが可能である。この段階において、抗原を迅速に排除するための炎症性刺激によるmiR-155の上方制御は結果として増大した突然変異率をもたらす。さらに、変異の主因に関わらず、感染が起きた場合にその変異が固定されるであろうという高い蓋然性が存在する。

【0138】

[00168] 理論により束縛されることを望むわけではないが、本発明者は、本明細書においてここで、我々は、突然変異誘発表現型と組み合わせられたいくつかの腫瘍抑制遺伝子の同時のmiR-155に駆動される抑制が、腫瘍発生に必要な一連の段階の短縮を可能にし、癌の病理発生に関するモデルを表していると信じている(図7)。

40

【0139】

[00169] 従って、慢性炎症によるmiR-155の上方制御は癌および炎症の間のミッシングリンクの少なくとも1つを示しているようである。

【0140】

[00170] 材料および方法

[00171] 細胞培養、形質移入、および処理。

【0141】

50

[00172] 細胞を以下の標準的な手順に従って増殖させた。T47D細胞を、lipofectamine (Invitrogen) を用いて形質移入した。未刺激のLSMCMは、モックで刺激した、または腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) 由来のLPS (100ng/mL、Sigma) で6時間刺激したヒトTHP-1単球細胞の上清から調製した。続いてTHP-1細胞を遠心分離し、上清を濾過してあらゆる残存する細胞を排除した。

【 0 1 4 2 】

[00173] 次いで、T47D細胞を未刺激の培地またはLSMCMの存在下で48時間培養した。必要がある場合、細胞を通常の培地中で4日間回復させた後、2回目の刺激を同じ方法で実施した。TNFはInvitrogenから得た。そのB細胞株は、R&D Systemsからの分離キットを用いてE $\mu$ -miR-155トランスジェニックマウスの脾臓からB細胞を純化する (purifying) ことにより確立された。続いてB細胞を100ng/mL RPMI/15%FBS/LPS中で2週間培養し、LPSなしでさらに3週間培養した。それらをAmaxaキット (Lonza) を用いて電気穿孔した。

10

【 0 1 4 3 】

[00174] レトロウイルス感染。

【 0 1 4 4 】

[00175] Retro-X Tet-Advanced System (Clontech) を製造業者の説明書に従って用いた。miR-155を安定して発現するクローンを、MDA-MB-231細胞およびSW620細胞から製造業者の説明書に従って調製した。簡潔には、細胞にまずpRetroX-tight-Pur-miR-155応答ウイルスを感染させた。次いでピューロマイシンに耐性のコロニーにpRetroX-Tet-On Advanced制御ウイルス (regulator virus) を感染させ、ピューロマイシンおよびGeneticin両方に対する耐性に関して選択した。その選択プロセス全体を通して、細胞をテトラサイクリン残留物を一切含有しないTet-FBS (Clontech) を含有する培地中で増殖させた。次いで二重耐性クローンの一部を500ng/mLドキシサイクリンで2日間処理した後、miR-155の発現をqRT-PCRにより分析した。HCT116細胞を、pRetroX-Tet-On Advanced制御ベクターおよび目的のコンストラクトを含有するpRetroX-tight-Pur応答ベクターの両方を含有するウイルス懸濁液を用いて感染させ、次いで通常の培地中で2日間回復させておいた後、ドキシサイクリンを添加した。

20

【 0 1 4 5 】

[00176] 発現コンストラクトの調製

[00177] WEE1レポーターコンストラクトは、HEK-293細胞のゲノムDNAからPCRにより増幅したヒトWEE1の3' UTRを、pGL3-Controlベクター (Promega) のXbaI部位においてルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入することにより調製された。成熟したmiR-155およびmiR-155前駆体 (pre-miR-155) を、以下のプライマーの再アニーリングにより調製された二本鎖DNAのNotIおよびEcoRIによる消化後に、pRetroX-tight-Purベクター中にクローニングした。

30

【 0 1 4 6 】

miR-155成熟 :

V155MatForward :

5' -ATAGCGGCCGCTTAATGCTAATCGTGATAGGGGTGAATTCGCG-3' [ SEQ ID NO: 1 ] および

V155-MatReverse :

5' -CGCGAATTCACCCCTATCACGATTAGCATTAAGCGGCCGCTAT-3' [ SEQ ID NO: 2 ] ;

pre-miR-155 :

V155PreForward :

5' ATAGCGGCCGCTGTTAATGCTAATCGTGATAGGGGTTTTTGCCTCCAAGTACTCCTACATATTAGCATTAACAGGAATTCGCG-3' [ SEQ ID NO: 3 ]

および

V155PreReverse :

5' CGCGAATTCCTGTTAATGCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGAGGCAAAAACCCCTATCACGATTAGCATTAACAGGCGGCCGCTAT-3' [ SEQ ID NO: 4 ] 。

40

【 0 1 4 7 】

50

[00178] 6-TG耐性コロニーの選択。

【0148】

[00179] あらゆる既存のHPRT変異体を排除するため、細胞を100  $\mu$ Mヒポキサンチン、400nMアミノプテリン、および16  $\mu$ Mチミジン（HAT培地、Sigma）中で3日間増殖させた。図2Cで報告した実験のために用いられたMDA-MB-231細胞を、HAT培地中で15日間クレンジングした（cleansed）。3回の洗浄後、細胞を通常の培地中で再懸濁し、さらに3日間培養した。次いでT47D、HCT116、SW620、またはMDA-MB-231細胞を必要に応じてマクロファージ条件培地またはドキシサイクリンで処理した。2日後、30  $\mu$ Mの6-TGを含有する選択培地中で、HCT116細胞を96ウェル丸底プレートに蒔き（ウェルあたり1,000細胞）、T47D、SW620、またはMDA-MB-231細胞を48ウェルプレートに蒔いた（プレートあたり106細胞）。次いでHPRT変異体をそれらの6-TGに対する耐性に基づいて選択した。その選択プロセスの間、レトロウイルスコンストラクトを含有する細胞をドキシサイクリンで常に刺激した。6-TG培地上での2~3週間の選択の後（6-TG含有培地を3日ごとに交換した）、プレートをクリスタルバイオレットで染色して6-TG耐性コロニーの可視化および計数を可能にした。

10

【0149】

[00180] 突然変異率の概算。

【0150】

[00181] SW620およびMDA-MB-231安定クローンを用いた実験に関して（図1および図11-表S1）、突然変異率を細胞増殖に関して調整し、変動解析の修正版に基づいて概算した。細胞増殖で調整された突然変異率は式 $r = f \times 1/t$ に基づいて分析され、ここで“f”は突然変異頻度（細胞あたりの突然変異）であり、“1/t”は1/細胞分裂速度（1日あたりの細胞分裂で）であり、“t”はmiR-155誘導の（日での）長さである。MDA-MB-231細胞を用いた実験（図2C）に関して、その概算された突然変異率は、図8において示した図式に従って、平均変異体出現頻度および集団倍加に基づいていた。

20

【0151】

[00182] 変異体出現頻度および集団倍加を、その後で示した工程のそれぞれで概算した（すなわち、HATクレンジングの直後、HATクレンジングの3日後、モック（対照）またはTNF/LPS処理の3日後、および処理の終了の3日後）。細胞を、6-TGを補った培地中で、10cmディッシュあたり $1.5 \times 10^6$ 細胞の密度で蒔いた。加えて、選択の時点でのコロニー形成効率（PE）を、10cmディッシュあたり500細胞をヒポキサンチンを含まないRPMI培地中で3通りで（in triplicate）蒔くことにより決定した。細胞を14~20日間培養し、4%パラホルムアルデヒド中0.5%クリスタルバイオレット（Sigma）で染色することによりコロニーを可視化した。次いで変異体出現頻度（MF）を以下のように決定し： $MF = a / (60 \times 10^6 \times [b / 1.5 \times 10^3])$ 、ここで“a”は6-TG耐性コロニーの総数であり、“b”は3個全てのプレート上のコロニーの総数である。PEおよび二次培養された細胞の正確な数を用いて、集団倍加（PD）を以下のように計算した： $PD = (\ln[\text{細胞の総数}] - \ln[\text{蒔いた細胞の数} \times PE]) / \ln 2$ 。突然変異率を、観察された変異体出現頻度をPDの関数としてプロットし、その傾きを線形回帰により計算することにより概算した。この傾きは突然変異率（細胞あたり世代あたりの突然変異）を与える。

30

【0152】

[00183] HPRTのcDNAの突然変異の分析。

【0153】

[00184] miR-155-OffおよびmiR-155-Onを感染させた細胞からの6-TG耐性コロニーを、代表的な変異体コロニーとしてランダムに選択した。クローンを1週間拡張した後、RNAを抽出した。全RNAを、Applied BiosystemsからのHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitorを用いて逆転写した。続いてHPRTのcDNA（ヌクレオチド123~1,110）を、ClontechからのAdvantage 2 Polymerase Mixを用いて、順方向プライマー5'-GCGCGCCGCGGCTCCGTT-3' [SEQ ID NO: 5] および逆方向プライマー5'-GGCGATGTCAATAGGACTCCAGATG-3' [SEQ ID NO: 6] により増幅した。

40

【0154】

50



[00185] ほとんどの場合において、そのPCR産物をTOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、続いてプラスミド精製後に配列決定した。他の場合において、そのPCR産物をQiagenからのPCR精製キットを用いて精製し、オハイオ州立大学の配列決定施設において、プライマー5'-GCCGGCCGGCTCCGTTATGG-3' [SEQ ID NO: 7] および5'-ATGTCAATAG GACTCCAGATG-3' [SEQ ID NO: 8] を用いて直接配列決定した。

【0155】

[00186] RNAの単離およびqRT-PCR。

【0156】

[00187] RNAをTRIzol (Invitrogen) を用いて抽出し、続いてそれに対してDNase消化 (Turbo-DNase; Ambion) を行った。miR-155のqRT-PCRをTaqManマイクロRNAアッセイ (Applied Biosystems) を用いて実施した。値をRNU-44を用いて正規化した。リアルタイムPCRは、3つの異なるcDNAから3通りで運転した。

10

【0157】

[00188] FACS分析。

【0158】

[00189] CFSEをMolecular Probes/Invitrogenから購入した。CFSE染色を製造業者のプロトコルを用いて実施した。細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定した後分析した。フローサイトメトリ分析を、オハイオ州立大学の対応する施設で実施した。データをソフトウェアプログラムFlowJo (Tree Star, Inc.) を用いて分析した。

20

【0159】

[00190] ウェスタンブロット。

【0160】

[00191] 細胞を形質移入または電気穿孔の48時間後に溶解させた。抗WEE1および抗-チューブリン抗体は、Cell Signaling Technologyからのものであった。

【0161】

[00192] Affymetrixマイクロアレイ分析。

【0162】

[00193] TRIzol (Invitrogen) で抽出したRNAに対して、続いてDNアーゼ消化 (Turbo-DNase; Ambion) を行った。Affymetrixマイクロアレイ分析を、オハイオ州立大学のマイクロアレイ施設で行った。

30

【0163】

[00194] ルシフェラーゼアッセイ。

【0164】

[00195] 細胞を12ウェルプレートに蒔き (プレートあたり $1 \times 10^6$ 細胞)、それを0.4  $\mu$ gのDNA (pGL3対照ベクターまたはWEE1レポーターコンストラクト; Promega)、20ngのウミシタケルシフェラーゼ対照ベクター (pRL-TK; Promega)、および50nMの前miR対照 (前miR前駆体分子-陰性対照 #1; Ambion)、pre-miR-155 (miR-155前駆体; Ambion)、または155-I (アンチセンスmiR-155阻害RNA; Ambion) のいずれかを用いて形質移入した。形質移入の48時間後に、Dual Luciferaseレポーターアッセイシステム (Promega) を用いてアッセイを実施した。ホタルルシフェラーゼ活性をウミシタケルシフェラーゼ活性に対して正規化した。

40

【0165】

[00196] 本発明を、様々な、および好ましい態様に関して記述してきたが、当業者は、本発明の本質的な範囲から逸脱することなく様々な変更がなされてよく、その要素の代わりに均等物を用いてよいことを理解するべきである。加えて、本発明の本質的な範囲から逸脱することなく、個々の状況または材料を本発明の教示に適応させるために多くの修正を加えてよい。

【 図 1 】

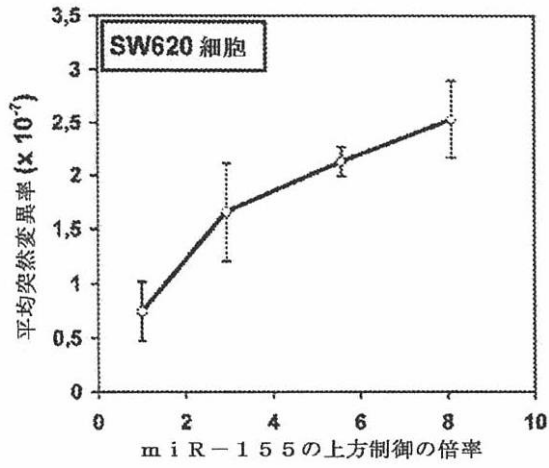


図 1 A

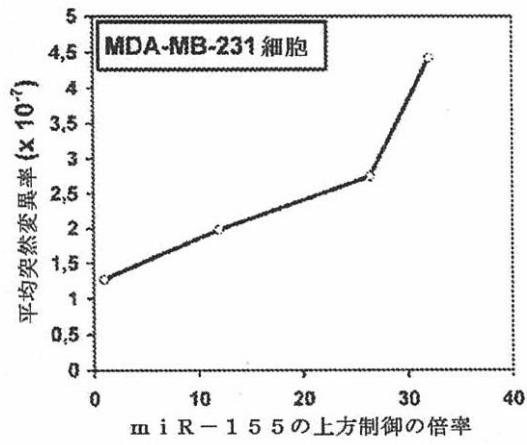


図 1 B

【 図 2 - 1 】

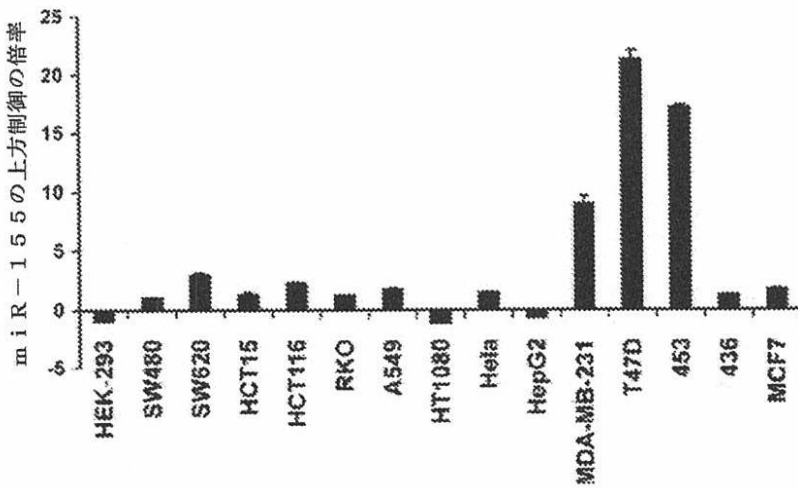


図 2 A

【図 2 - 2】

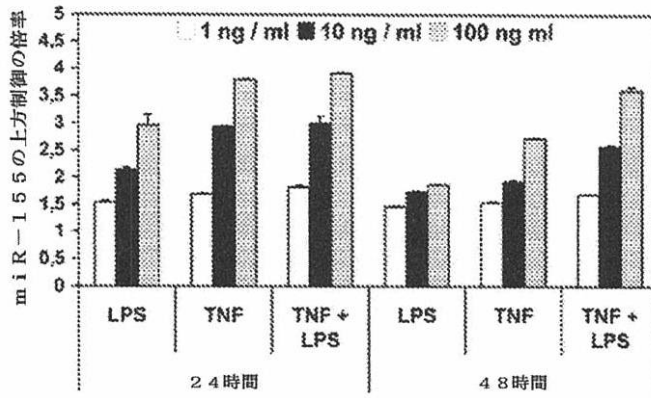


図 2 B

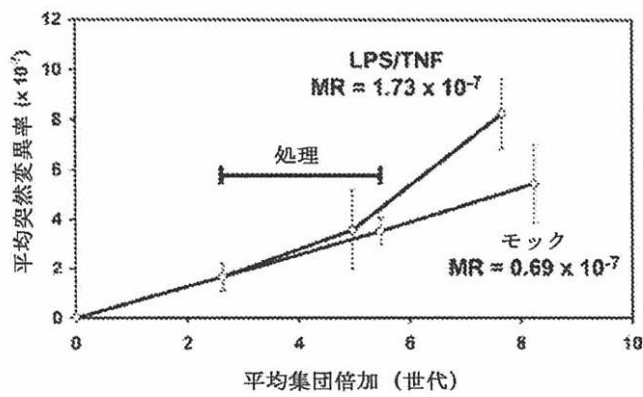


図 2 C

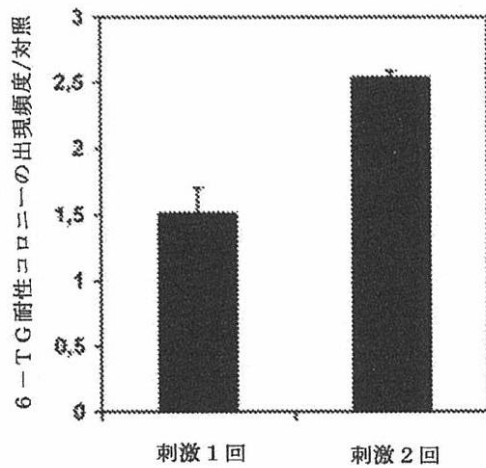


図 2 D

【図 3 - 1】

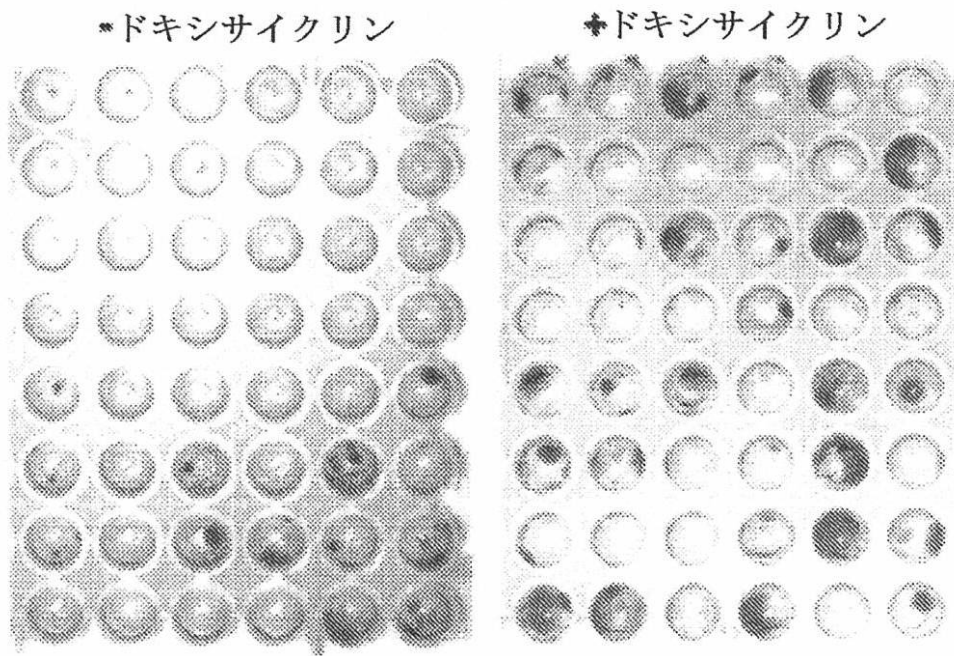


図 3 A

【図 3 - 2】

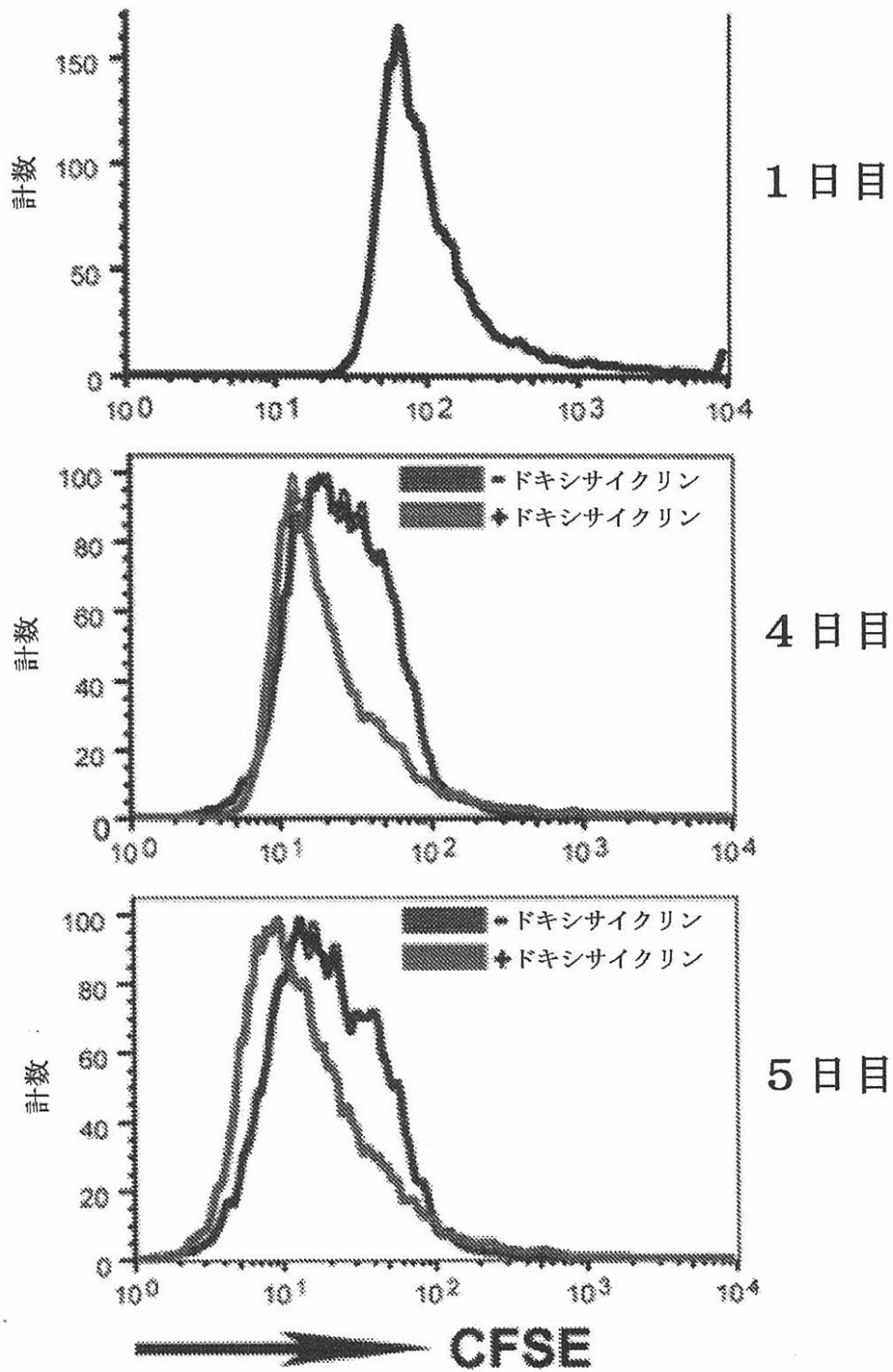


図 3 B

【図 3 - 3】

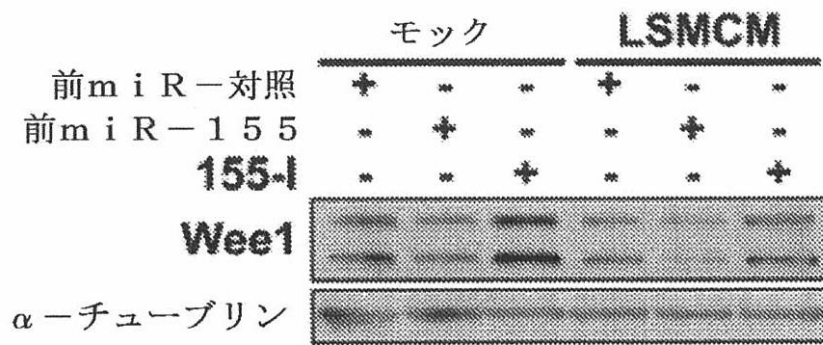


図 3 C



図 3 D

【図 4】

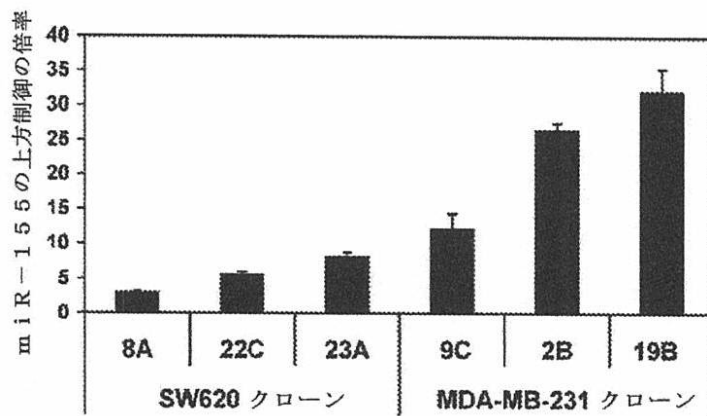


図 4

【 図 5 】

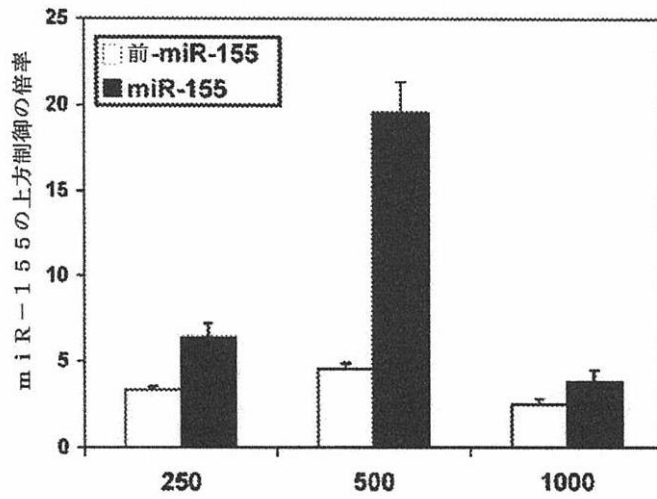


図 5

【 図 6 】

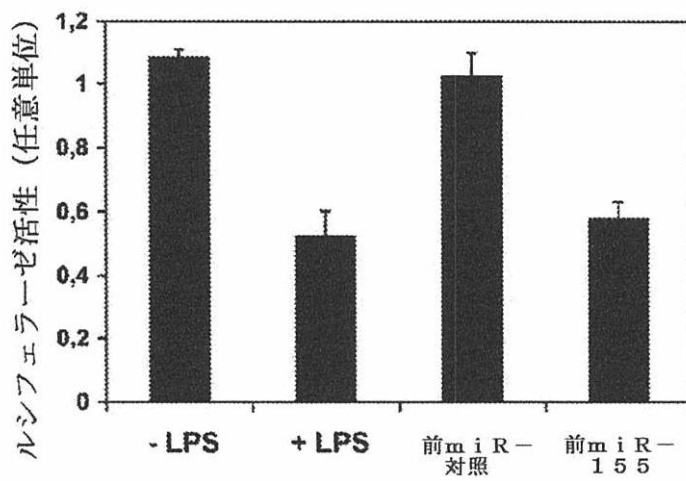


図 6

【図 7】

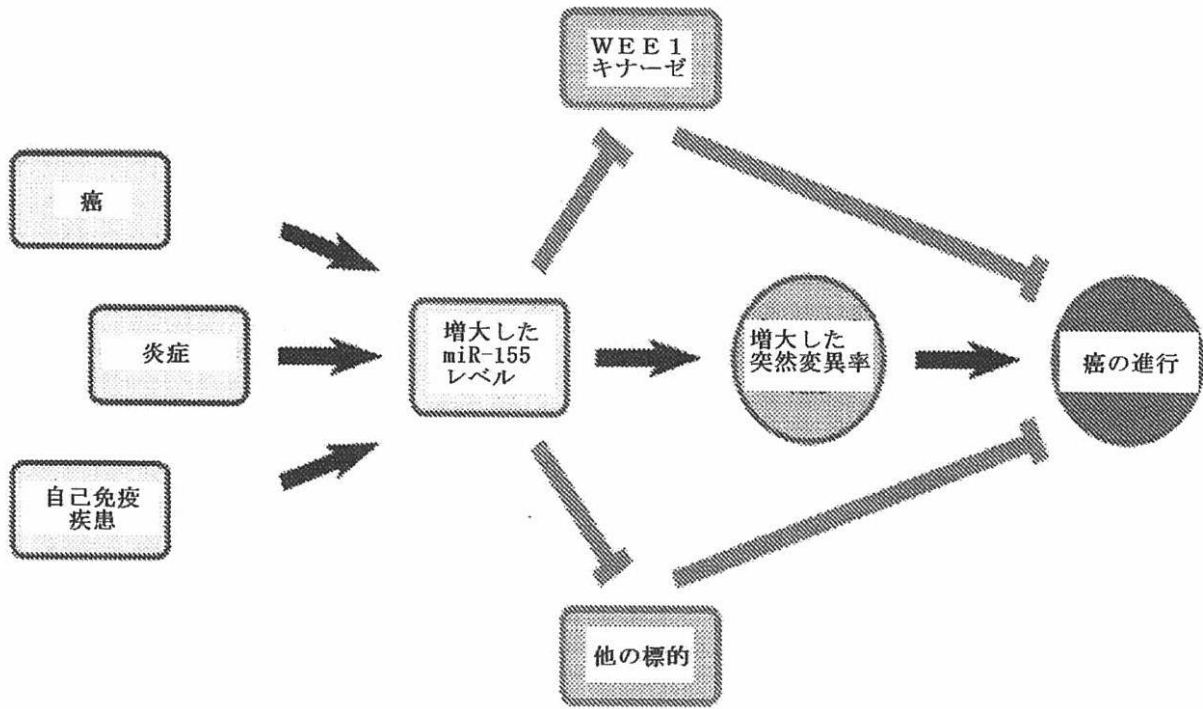


図 7

【図 8】

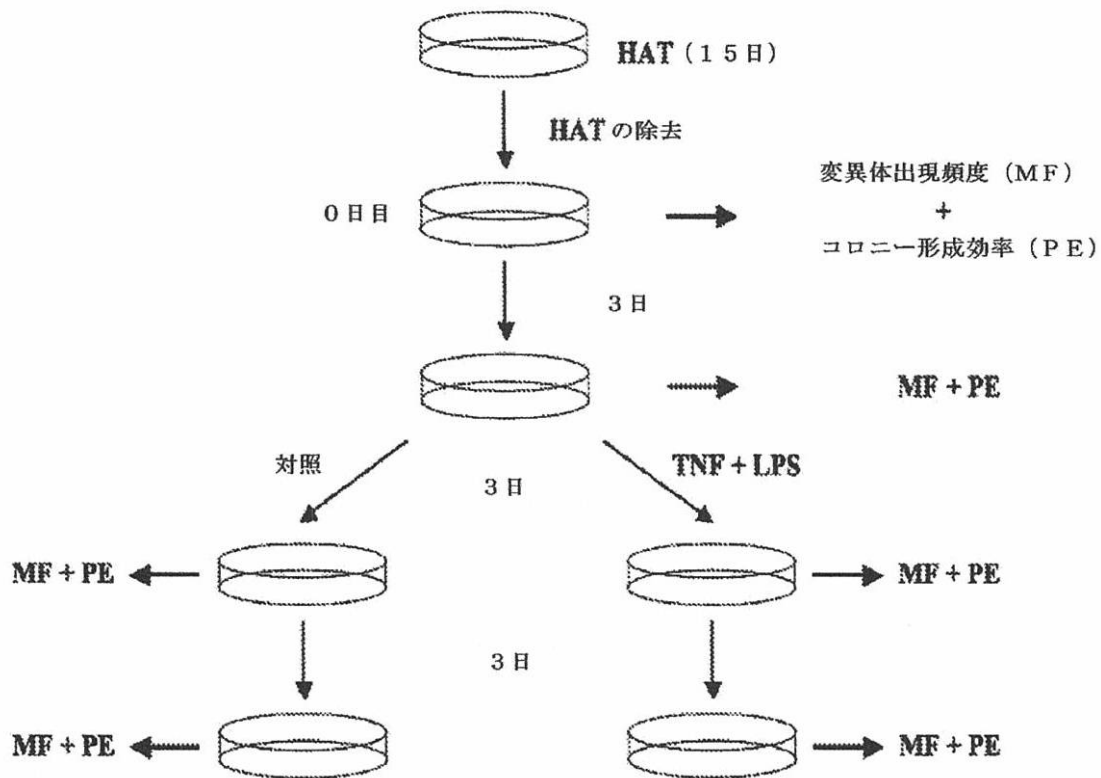


図 8



【図 9】

表 1. T47D 細胞、HCT116 細胞および MDA-MB-231 細胞の 6-TG 耐性コロニーから調製された HPRT の DNA 中で見付かった変異

細胞株	処理	分析したク ローンの数	コード配列中 に変異を有し ないクローン	フレームシフト 変異を有するクローン	欠失を有 するクロー ン	単一の欠失 のみを有す るクローン	1個以上のエキ ソンの欠如を有 するクローン	他のタイプの 欠失を有する クローン	挿入を有す るクローン	転位を有する クローン	転換を有する クローン
T47D	モック	24	0	12	14	17	24	4	1	4	0
							欠失 ex. 3: 11	欠失 : 7	挿入 : 1	転位 : 5	
							欠失 ex. 2+3: 9				
							欠失 ex. 4+5: 4				
T47D	LSMCM	40	0	20	40	25	38	11	3	7	1
							欠失 ex. 3: 14	欠失 17: 3	挿入 : 3	転位 : 7	転換 : 3
							欠失 ex. 2+3: 16				
							欠失 ex. 4 + 5: 5				
							欠失 ex. 2+3+4: 1	欠失 1: 21			
							欠失 ex. 6+7+8: 1				
							欠失 ex. 5: 1				
HCT116	- ドキシサイクリン	14	1	13	13	0	0	13	4	0	2
								欠失 2: 1	挿入 : 5	転位 : 7	転換 : 3
HCT116	- ドキシサイクリン	14	1	13	13	0	0	13	4	0	2
								欠失 1: 12	挿入 : 5		転換 : 2
HCT116	+ ドキシサイクリン	25	4	18	11	0	2	9	13	6	6
							欠失 ex. 3: 1	欠失 1: 16	挿入 : 17	転位 : 6	転換 : 8
							欠失 ex. 2+3: 1				
MDA-MB-231	- ドキシサイクリン	11	3	8	10	5	8	3	0	1	0
							欠失 ex. 2+3: 1	欠失 1: 5		転位 : 1	
							欠失 ex. 7: 8				
MDA-MB-231	+ ドキシサイクリン	24	2	17	21	11	17	9	0	4	2
							欠失 ex. 2: 1	欠失 1: 17		転位 : 6	転換 : 2
							欠失 ex. 2 + 3: 1				
							欠失 ex. 7: 16				

Ex., エキソン ; LSMCM, LPSで刺激したマクロファージによる条件培地 ; モック、未刺激のマクロファージによる条件培地

Figure 9

## 【図 10】

表 2.T47D および MDA-MB-231 細胞の処理の後にそのレベルが有意に低下した、DNA の複製および維持に関する因子をコードする転写産物

記号	遺伝子名	変化倍率
RFC5	複製因子 C (活性化因子 1) 5、 36.5kDa	0.72
NEIL3	Nei エンドヌクレアーゼ VIII 様 3 (E. coli)	0.71
AURKB	オーロラキナーゼ B	0.71
GTSE1	G-2 および S 期発現 1	0.64
RAD54L	RAD54 様 (S. cerevisiae)	0.75
ARL3	ADP リボシル化因子様 3	0.81
BCCIP	BRCA2 および CDKN1A 相互作用タンパク質	0.77
SKP2	S 期キナーゼ関連タンパク質 2 (p45)	0.65
RDM1	RAD52 モチーフ 1	0.75
PARP2	ポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ 2	0.86
RAD54B	RAD54 ホモログ B (S. cerevisiae)	0.67
ERCC6L	除去修復交差補完、齧歯類修復欠損、相 補群 6 様	0.61
DCTPP1	dCTP ピロホスファターゼ 1	0.78
DDB2	損傷特異的 DNA 結合タンパク質 2、 48 kDa	0.84
CDKN2C	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2C (p18、CDK4 を阻害する)	0.64
AK3L1	アデニル酸キナーゼ 3 様 1	0.84
APRT	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	0.84
DDB2	損傷特異的 DNA 結合タンパク質 2、 48kD	0.84
BRCC3	BRCA1/BRCA2 含有複合体、サブユニッ ト 3	0.83
TOP2A	トポイソメラーゼ (DNA) II アルファ 170 kD	0.77
CDT1	クロマチンライセンシングおよび DNA 複製因 子 1	0.74
RECQL4	RecQ タンパク質様	0.72
PARP1	ポリ (ADP リボース) ポリメラーゼ 1	0.86

Affymetrix マイクロアレイ分析の後、未刺激のマクロファージによる条件培地または LPS で刺激したマクロファージによる条件培地のどちらかで処理した細胞の 2 つの集団の間で比較を行った。その 2 つの集団は、T47D および MDA-MB-231 細胞細胞株の両方からの 4 つの独立した複製を含んでいた。転写産物は P の値 (全て  $1 \times 10^{-7}$  未満) の減少に従って並べた。

Figure 10

【図 1 1】

表 S1							
細胞株	クローン または実験	ドキシサイ クリン (ng/ml)	蒔いた 細胞の 数	miR-155 の 上方制御の 倍率±標準 偏差	6-TG耐性 コロニー の数	平均突然 変異率	平均突然 変異率の 増大の 倍率
HCT116 細胞		0	$0.1 \times 10^7$		112	$560 \times 10^{-7}$	
		500	$0.1 \times 10^7$	$19.57 \pm 0.62$	352	$1570 \times 10^{-7}$	2.81
SW620 clone 8A	実験 1	0	$6 \times 10^7$		12		
		500	$6 \times 10^7$		20		
	実験 2	0	$6 \times 10^7$		10		
		500	$6 \times 10^7$		14		
	実験 3	0	$6 \times 10^7$		11		
		500	$6 \times 10^7$		25		
	合計	0	$18 \times 10^7$		33		
		500	$18 \times 10^7$	$2.94 \pm 0.23$	59	$1.66 \times 10^{-7}$	
SW620 クローン 22C	実験 1	0	$3.5 \times 10^7$		7		
		500	$3.5 \times 10^7$		14		
	実験 2	0	$3.5 \times 10^7$		7		
		500	$3.5 \times 10^7$		15		
	実験 3	0	$3.5 \times 10^7$		5		
		500	$3.5 \times 10^7$		16		
	合計	0	$10.5 \times 10^7$		19	$0.75 \times 10^{-7}$	
		500	$10.5 \times 10^7$	$5.58 \pm 0.43$	45	$2.13 \times 10^{-7}$	2.86
SW620 クローン 23A	実験 1	0	$2 \times 10^7$		2		
		500	$2 \times 10^7$		12		
	実験 2	0	$2 \times 10^7$		2		
		500	$2 \times 10^7$		9		
	実験 3	0	$2 \times 10^7$		1		
		500	$2 \times 10^7$		10		
	合計	0	$6 \times 10^7$		5	$0.75 \times 10^{-7}$	
		500	$6 \times 10^7$	$8.10 \pm 0.65$	31	$2.53 \times 10^{-7}$	3.39
MDA- MB-231	クローン 9C	0	$4 \times 10^7$		11	$1.28 \times 10^{-7}$	
		500	$4 \times 10^7$	$12.01 \pm 2.34$	16	$1.98 \times 10^{-7}$	1.56
MDA- MB-231	クローン 2B	0	$2.5 \times 10^7$		6	$1.28 \times 10^{-7}$	
		500	$2.5 \times 10^7$	$26.42 \pm 1.11$	15	$2.74 \times 10^{-7}$	2.15
MDA- MB-231	クローン 19B	0	$2 \times 10^7$		5	$1.28 \times 10^{-7}$	
		500	$2 \times 10^7$	$32.07 \pm 3.27$	20	$4.42 \times 10^{-7}$	3.47

Figure 11

【図 12 - 1】

表 S3											
細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード／ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
T47D	Mock <sup>a</sup>	del 184 (フレーム シフト)	no		302-485	3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	8
		del 184 (フレーム シフト)	yes		302-485	3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				転位	505	4 全体	コード	GGG- G(A>G)C- ATA	10	Asp > Gly	
		del 184 (フレーム シフト)	yes		302-485	3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				転位	556	5	コード	AAT- G(T>C)C- TTG	11	Val > Ala	
		del 184 (フレーム シフト)	yes		302-485	3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				del 1	1061, 1062 or 1063	9	3'- 非翻訳	TGT-AA(A)- TGA	12	なし	
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
		del 291 (フ レームシ フトなし)	no		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	8
		del 291	yes		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				del 1	195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
		del 84 (フ レームシ フトなし)	no		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	1
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	

Figure 12

【図 12 - 2】

細胞	処理	変異のタイプ	関連する変異	関連する変異のタイプ	Nt位置	エキソン	コード／非翻訳領域	配列前後関係	SEQ ID NO:	予想される表現型の変化	出現の回数
				転位	227	2	コード	CCIT-GA(T>C)-TTAT	15	Asp <-> Asp	
				転位	407	3	コード	GCTG-GA(T>C)-TACA	16	Asp <-> Asp	
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT-(AATGAC...GTGGAA)-GATATA	14 & 117	機能喪失	1
				del 1	948, 949, 950 or 951	9	3'-非翻訳	AGAA-TTT(T)-ATCT	17	なし	
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT-(AATGAC...GTGGAA)-GATATA	14 & 117	機能喪失	1
				del 1	170 or 171	1	コード	CGTT-ATG(G)-CGAC	18	フレームシフト(開始コドン)	
				del 1	185	1	コード	CAGC-CC(T)-GGCG	19	フレームシフト	
				ins 1	344, 345 or 346	3	コード	GAGG-CC(C)-ATCA	20	フレームシフト	
				転位	968	9	3'-非翻訳	TACT-TT(A>G)-GAAA	21	なし	
T47D	LSMCM <sup>b</sup>	del 184 (フレームシフト)	no		302-485	3 全体	コード	GTCGTG-(ATTAGT...TATTGT)-AATGAC	9 & 116	機能喪失	11
		del 184	yes		302-485	3 全体	コード	GTCGTG-(ATTAGT...TATTGT)-AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				del 1	1038, 1039 or 1040	9	3'-非翻訳	CTTT-GG(G)-CGGATC	22	なし	
		del 184	yes		302-485	3 全体	コード	GTCGTG-(ATTAGT...TATTGT)-AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				3塩基転換	153, 157 and 161	1	5'-非翻訳	CGCG--(C>G)-CGG-(C>G)-CGG-(C>G)-TCCG	23	なし	
				転位	168	1	コード	CGTT-(A>G)-TGGC	24	開始コドンの欠如	
				ins 1	925, 926, 927, 928, 929 or 930	9	3'-非翻訳	GAGC-TTTTT(T)-GCAT	25	なし	

Figure 12 cont.

【図 12 - 3】

細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
		del 184	yes		302-485	3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				転位	787	9	コード	TTGT- G(T>C)C- ATTA	26	Val > Ala	
		del 291 (フ レームシ フトなし)	no		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	13
		del 291	yes		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				ins 1	1100, 1101, 1102 or 1103	9	3'- 非翻訳	GAGTG- AAA(A)- CATT	27	なし	
		del 291	yes		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	GAAACA- T(T)-GAAC	28	なし	
		del 291	yes		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				転位	497	4	コード	CCAG- TC(A>G)- ACAG	29	Ser <-> Ser	
		del 84 (フ レームシ フトなし)	no		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	1
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	1
				del 1	1045 or 1046	9	3'- 非翻訳	GCGG- AT(T)-GTTG	30	なし	
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAA(A)- TTCT	13	なし	
				del 1	1079, 1080 or 1081	9	3'- 非翻訳	TCTT- AA(A)-CCAC	31	なし	
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	1

Figure 12 cont.

【図 12 - 4】

細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想される 表現型 の変化	出現の 回数
				del 1	145, 146 or 147	1	5'- 非翻訳	TCAG- CC(C)-GCGC	32	なし	
				del 1	152	1	5'- 非翻訳	GCGC-(G)- CCGG	33	なし	
				del 1	175, 176 or 177	1	コード	GCGA- CC(C)-GCAG	34	フレーム シフト	
				del 1	208 or 209	2	コード	TGAT- GA(A)- CCAG	35	フレーム シフト	
				del 1	219	2	コード	TTAT- (G)ACCT	36	フレーム シフト	
				ins 1	257, 258 or 259	2	コード	CTGA- GG(G)-ATTT	37	フレーム シフト	
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	1
				del 1	168	1	コード	CGTT-(A)- TGGC	38	開始コ ドンの欠如	
		del 84	yes		486-569	4 + 5 全体	コード	TATTGT- (AATGAC... GTGGAA)- GATATA	14 & 117	機能喪失	1
				転位	378	1	コード	GGGG- (G>A)GC- TATA	39	Gly > Ser	
		del 357 (フ レームシ フトなし)	yes		195-551	2 + 3 + 4	コード	GTCGTG- (ATTAGT... GGAAAG)- AATGTC	40 & 118	機能喪失	1
				転位	787	9	コード	TTGT- G(T>C)C- ATTA	26	Val > Ala	
		del 207 (フ レームシ フトなし)			570-776	6 + 7 + 8	コード	GTGGAA- (GATATA... TTGAAT)- CATGTT	41 & 119	機能喪失	1
		del 18 (フ レームシ フトなし)	yes		552-569	5 全体	コード	GGAAAG- (AATGTC... GTGGAA)- GATATA	42 & 120	機能喪失	1
				del 1	145, 146 or 147	1	5'- 非翻訳	TCAG- CC(C)-GCGC	32	なし	
				del 1	208 or 209	2	コード	GATG-A(A)- CCAG	43	フレーム シフト	
		del 17 (フ レームシ フトなし)	yes		595-611	6	コード	AACAA- (TGCAGAC ...TTCC)- TTGGT	44 & 121	フレーム シフト	1
				del 1	1079, 1080 or 1081	9	3'- 非翻訳	TCCT- AA(A)-CCAC	31	なし	

Figure 12 cont.

【図 12 - 5】

細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
				del 1	1093 or 1094	9	3'- 非翻訳	ACTA-T(T)- GAGT	45	なし	
		del 17 (フレーム シフト)	yes		595-611	6	コード	AACAA- (TGCAGAC ...TTCC)- TTGGT	44 & 121	フレーム シフト	1
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
		del 17 (フレーム シフト)	yes		595-611	6	コード	AACAA- (TGCAGAC ...TTCC)- TTGGT	44 & 121	フレーム シフト	1
				del 1	170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	
				del 1	175, 176 or 177	1	コード	GCGA- CC(C)-GCAG	34	フレーム シフト	
				転位	307	3	コード	GACTG- (A>G)- ACGTC	47	Glu > Gly	
		del 1	yes		166 or 167	1	5'- 非翻訳	TCCG-T(T)- TGC	48	なし	1
				del 1	175, 176 or 177	1	コード	GCGA- CC(C)-GCAG	34	フレーム シフト	
				del 1	260, 261 or 262	2	コード	GAGGA- TT(T)- GGAAA	49	フレーム シフト	
				転位	315	3	コード	GTCTT- (G>A)- CTCGAG	50	Ala > Thr	
HCT116	ドキシサイ クリン	del 1	yes		145, 146 or 147	1	5'- 非翻訳	GTCAG- CC(C)- GCGCG	51	なし	1
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
		del 1	yes		145, 146 or 147	1	5'- 非翻訳	GTCAG- CC(C)- GCGCG	51	なし	1
				del 1	153 or 154	1	5'- 非翻訳	GCGCG-- C(C)-GGCCG	53	なし	
				del 2	602, 603 or 604	6	コード	CAGAC- T(TT)- GCTTT	54	フレーム シフト	
		del 1	yes		152	1	5'- 非翻訳	CGCGC-(G)- CCGGC	55	なし	1
				del 1	170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	

Figure 12 cont.



【図 12 - 6】

細胞	処理	変異の タイプ	関連す る変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
		del 1	yes		152	1	5'- 非翻訳	CGCGC-(G)- CCGGC	55	なし	1
				del 1	155 or 156	1	5'- 非翻訳	GCGCC- G(G)-CCGGC	56	なし	
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
		del 1	yes		153 or 154	1	5'- 非翻訳	GCGCG-- C(C)-GGCCG	53	なし	1
				del 1	157 or 158	1	5'- 非翻訳	GCCGG- C(C)-GGCTC	57	なし	
				del 1	170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	
		del 1	yes		155 or 156	1	5'- 非翻訳	GCGCC- G(G)-CCGGC	56	なし	1
				del 1	170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
		del 1	yes		170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	1
				del 1	174, 175 or 176	1	コード	GGCGA- CC(C)- GCAGC	58	フレーム シフト	
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
				del 1	196 or 197	2	コード	CGTGA- T(T)- AGTGAT	59	フレーム シフト	
		del 1	yes		182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	1
				del 1	196 or 197	2	コード	CGTGA- T(T)- AGTGAT	59	フレーム シフト	
		del 1	yes		182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	1
				塩基転換	188	1	コード	GCCCT- GG(C>A)- GTGAT	60	Gly <-> Gly	
				欠失 1	191	1	コード	GGCGT-(C)- GTGAT	61	フレーム シフト	
				del 1	196 or 197	2	コード	CGTGA- T(T)- AGTGAT	59	フレーム シフト	
		del 1	yes		170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	1

Figure 12 cont.

【図 12 - 7】

細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード／ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO.	予想される 表現型 の変化	出現の 回数
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
				del 1	196 or 197	2	コード	CGTGA- T(T)- AGTGAT	59	フレーム シフト	
				del 1	227, 228 or 229	2	コード	CTTGA- TT(T)- ATTTG	62	フレーム シフト	
				del 1	231, 232, 233 or 234	2	コード	GATTTA- TTT(T)- GCATA	63	フレーム シフト	
		Ins 1	yes		186, 187 or 188	1	コード	GCCCT- GG(G)- CGTCG	64	フレーム シフト	1
				del 1	190	1	コード	TGGCG-(T)- CGTGAT	65	フレーム シフト	
				del 1	227, 228 or 229	2	コード	CTTGA- TT(T)- ATTTG	62	フレーム シフト	
				del 1	231, 232, 233 or 234	2	コード	GATTTA- TTT(T)- GCATA	63	フレーム シフト	
		del 1	yes		188	1	コード	CCTGG-(C)- GTCGT	66	フレーム シフト	1
				del 1	263 or 264	2	コード	GATTT- G(G)- AAAGG	67	フレーム シフト	
				ins 1	374, 375, 376, 377, 378 or 379	3	コード	CTCAA- GGGGGG(G)- CTATA	68	フレーム シフト	
				塩基転換	596	6	コード	ACA- AT(G>C)- CAGAC	69	Met > Ile	
				ins 1	601	6	コード	GCAGA-(G)- CTTTG	70	フレーム シフト	
		del 1	yes		260, 261 or 262	2	コード	GAGGA- TT(T)- GGAAA	49	フレーム シフト	1
				ins 1	296, 297 or 298	2	コード	ATTAT- GG(G)- ACAGG	71	フレーム シフト	
		ins 1	no		1030, 1031 or 1032	9	3'- 非翻訳	TATCAG- TT(T)- CCCTT	72	なし	1
HCT116	ドキシサイ クリン	del 1	yes		145, 146 or 147	1	5'- 非翻訳	GTCAG- CC(C)- GCGCG	51	なし	1
				塩基転換	182	1	コード	CCCGC- AG(C>G)- CCTGG	73	Ser > Arg	
				del 1	196 or 197	2	コード	CGTGA- T(T)- AGTGAT	59	フレーム シフト	

Figure 12 cont.

【図 12 - 8】

細胞	処理	変異の タイプ	関連す る変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
		del 1	yes		153 or 154	1	5'- 非翻訳	GCGCG- C(C)-GGCCG	74	なし	1
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
		del 1	yes		166 or 167	1	5'- 非翻訳	GCTCCG- T(T)-ATGGC	75	なし	1
				del 1	181	1	コード	GGGCA-(G)- CCCTG	76	フレーム シフト	
				転位	657	7	コード	GCTTG- (C>T)TG- GTGAA	77	Leu <-> Leu	
		del 1	yes		169	1	コード	CCGTTA- (T)-GCCAC	78	開始コド ンの欠如	1
				del 1	174, 175 or 176	1	コード	GGCGA- CC(C)- GCAGC	58	フレーム シフト	
				del 1	215 or 216	2	コード	CCAGG- T(T)- TATGAC	79	フレーム シフト	
				転位	657	7	コード	GCTTG- (C>T)TG- GTGAA>	77	Leu <-> Leu	
		del 1	yes		170 or 171	1	コード	GTTAT- G(G)-CGACC	46	フレーム シフト	1
				del 1	182, 183 or 184	1	コード	CCGCAG- CC(C)- TGGCG	52	フレーム シフト	
		del 291 (フ レームシ フトなし)	yes		195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
				塩基転換	197	2	コード	TCGTG- AT(T>A)- AGTGAT	80	Ile <-> Ile	
		ins 1	no		235	2	コード	TATTTT-(C)- GCATA	81	フレーム シフト	4
		ins 1	yes		235	2	コード	TATTTT-(C)- GCATA	81	フレーム シフト	2
				塩基転換	400	3	コード	GCTGAC- C(T>A)C- CTGGAT	82	Leu > Gln	
				ins 1	407, 408 or 409	3	コード	CTGGA- TT(T)- ACATC	83	フレーム シフト	
		ins 1	yes		235	2	コード	TATTTT-(C)- GCATA	81	フレーム シフト	1
				ins 1	406 or 407	3	コード	GCTGG- A(A)-TTACA	84	フレーム シフト	
		ins 1	yes		235	2	コード	TATTTT-(C)- GCATA	81	フレーム シフト	1
				ins 1	410 or 411	3	コード	GATTA- C(C)-ATCAA	85	フレーム シフト	

Figure 12 cont.

【図 12 - 9】

細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード／ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想される 表現型 の変化	出現の 回数
		ins 1	yes		235	2	コード	TATTTT-(C)- GCATA	81	フレーム シフト	1
				塩基転換	536	4	コード	TCTC- TC(A>C)- ACTTT	86	Ser <=> Ser	
		ins 1	no		239 or 240	2	コード	TGCAT- A(A)-CCTAA	87	フレーム シフト	1
		ins 1	no		240, 241 or 242	2	コード	GCATA- CC(C)- TAATC	88	フレーム シフト	1
		del 184 (フレーム シフト)	no		302-485	3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	1
		塩基転換	yes		409	3	コード	TGGAT- T(A>T)- ATCAA	89	Tyr > Phe	1
				転位	606	6	コード	GACTTTG- (C>T)TT- TCCIT	90	Leu > Phe	
		ins 1	yes		410	3	コード	GATTA- C(C)-ATCAA	85	フレーム シフト	1
				転位	657	7	コード	GCTTG- (C>T)TG- GTGAA	77	Leu <=> Leu	
		転位	yes		476	3	コード	GACTG- AA(G>A)- AGCTA	91	Lys <=> Lys	1
				ins 1	659, 660 or 661	7	コード	TTGCT- GG(G)- TGAAA	92	フレーム シフト	
				ins 1	662 or 663	7	コード	CTGGT- G(G)- AAAAG	93	フレーム シフト	
				転位	667	7	コード	TGAAA- A(G>A)G- ACCCC	94	Arg > Lys	
				塩基転換	674	7	コード	GGACC- CC(A>C)- CGAAG	95	Pro <=> Pro	
				塩基転換	CCCCA- C(G>C)A- AGTGT	7	コード	CCCCA- C(G>C)A- AGTGT	96	Arg > Pro	
		CDS 中変異 なし			del 1	196 or 197	1				2
		CDS 中変異 なし	yes								1
				del 1	157 or 158	1	5'- 非翻訳	GCCGG- C(C)-GGCTC	57	なし	
				del 1	1057 or 1058	9	3'- 非翻訳	TTAAC- C(C)-GTAAA	97	なし	
		CDS 中変異 なし	yes								1

Figure 12 cont.

【図 12 - 10】

細胞	処理	変異の タイプ	関連す る変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
				del 1	157 or 158	1	5'- 非翻訳	GCCGG- C(C)-GGCTC	57	なし	
				転位	866	9	3'- 非翻訳	GTCGGA(T> C)TGACA	98	なし	
MDA- MB-231	+ ドキシサイ クニン	del 47 (フレーム シフト)	no		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	5
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	1
				del 291 (フ レームシ フトなし)	195-485	2+3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	1
				転位	365	3	コード	CCCTC- TG(T>C)- GTGCT	100	Cys <-> Cys	
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	1
				del 1	1061, 1062 or 1063	9	3'- 非翻訳	TGT-AA(A)- TGA	12	なし	
		del 1	yes		1038, 1039 or 1040	9	3'- 非翻訳	CCTTT- GG(G)- CGGAT	101	なし	1
				del 1	1072 or 1073	9	3'- 非翻訳	AAAAA- T(T)-CTCTT	102	なし	
		del 1	yes		1061, 1062 or 1063	9	3'- 非翻訳	TGT-AA(A)- TGA	12	なし	1
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
		変異なし									1
MDA- MB-231	+ ドキシサイ クニン	del 47 (フレーム シフト)	no		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	12
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	1

Figure 12 cont.

【図 12 - 11】

細胞	処理	変異の タイプ	関連す る変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
				del 107 (フレーム シフト)		2 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... GGACAG)- GACTGA	103 & 123	機能喪失	
				del 291 (フ レームシ フトなし)	195-485	2 + 3 全体	コード	GTCGTG- (ATTAGT... TATTGT)- AATGAC	9 & 116	機能喪失	
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	1
				転位	220	2	コード	GGTTAT- G(A>G)C- CTTGAT	104	Asp > Gly	
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
				del 1	1061, 1062 or 1063	9	3'- 非翻訳	TGT-AA(A)- TGA	12	なし	
				del 1	1079, 1080 or 1081	9	3'- 非翻訳	TCTT- AA(A)-CCAC	31	なし	
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	2
				del 1	1061, 1062 or 1063	9	3'- 非翻訳	TGT-AA(A)- TGA	12	なし	
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
		del 47 (フレーム シフト)	yes		653-699	7 全体	コード	CGCAAG- (CTTGCT...C AGACT)- TTGTTG	99 & 122	機能喪失	2
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	
		塩基転換	yes		311	3	コード	CTGAA- CG(T>A)- CTTGC	105	Arg <=> Arg	1
		転位			349	3	コード	GCCAT- C(A>G)C- ATTGT	106	His > Arg	1
				転位	357	3	コード	TTGTA- (G>A)CC- CTCTG	107	Ala > Thr	
				塩基転換	747	8	コード	CCCTT- (G>T)AC- TATAA	108	Asp > Tyr	

Figure 12 cont.

【図 12 - 12】

細胞	処理	変異の タイプ	関連する 変異	関連する 変異の タイプ	Nt 位置	エキ ソン	コード/ 非翻訳 領域	配列 前後 関係	SEQ ID NO:	予想され る表現型 の変化	出現の 回数
		転位	no		357	3	コード	TTGTA- (G>A)CC- CTCTG	107	Ala > Thr	1
		転位	yes		458	3	コード	TGACT- GT(A>G)- GATTT	109	Val <-> Val	1
				del 1	992, 993 or 994	9	3'- 非翻訳	TTCCT- AA(A)- CTGTT	110	なし	1
		転位	yes		570	6	コード	TGGAA- (G>A)AT- ATAAT	111	Asp > Asn	1
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AATG- AAAAA(A)- TTCT	13	なし	1
				del 1	1082 or 1083	9	3'- 非翻訳	TTAAA- C(C)-ACAGC	112	なし	1
		del 1	yes		1061, 1062 or 1063	9	3'- 非翻訳	TGT-AA(A)- TGA	12	なし	1
				del 1	1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AAATG- AAAAA(A)- TTCT	113	なし	
				del 1	1100, 1101 or 1102	9	3'- 非翻訳	GAGTG- AA(A)- CATTG	114	なし	
		del 1	yes		1066, 1067, 1068, 1069, 1070 or 1071	9	3'- 非翻訳	AAATG- AAAAA(A)- TTCTCT	115	なし	1
				del 1	1100, 1101 or 1102	9	3'- 非翻訳	GAGTG- AA(A)- CATTG	114	なし	1

Figure 12 cont.

## 【図 13】

表 S3	
因子	主な機能
APC	miR-155 の予想される標的 (www.targetscan.org)。APC は、Wnt シグナル伝達経路の拮抗物質として作用する腫瘍抑制タンパク質である。それは細胞の移動および接着、転写活性化、ならびにアポトーシスにも関わっている。
BACH1	DNA 複製のチェックポイント制御に関わっている。
CUTL1 / CUX1	二重の機能、細胞の状況に依存して癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子として作用する。E2F1 と一緒に、それらは S 期における有糸分裂複合体の遺伝子 Ect2、MgcRacGAP、および MKLP1 の協調した発現を制御している。
FADD	様々な細胞表面受容体と相互作用し、細胞のアポトーシスシグナルを媒介するアダプター分子。
FOXO3	細胞死に関わる多くの遺伝子の発現を通してアポトーシスを誘発する。
JARID2	細胞の増殖および生存を負に制御し、メチルトランスフェラーゼ複合体の一部でもある。
KGF / FGF-7	上皮特異的成長因子、miR-155 によるその下方制御は結果として増大した細胞移動をもたらす。
RhoA	miR-155 の異所性発現は哺乳類細胞において RhoA タンパク質を低減し、密着結合の形成を崩壊させた。
RIP1	TNF シグナル伝達の下流の壊死性細胞死を誘導する。
SHIP1 / INPP5D	細胞の増殖および生存の負の制御因子。miR-155 によるその下方制御は結果として Akt の活性化をもたらす。
SMAD1	BMP シグナル伝達カスケード。miR-155 によるその標的化は結果として BMP によるサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p21 の誘導をもたらす、それは BMP に媒介される細胞増殖阻害を逆転させる。
SMAD5	SMAD1 と同じ。
HIVEP2	SMAD1 と同じ。
MYO10	SMAD1 と同じ。
SOCS1	サイトカインシグナル伝達の負の制御因子。miR-155 によるその下方制御は結果として JAK 経路による STAT3 の構成的活性化をもたらす。
TP53INP	アポトーシス促進性のストレスに誘導される p53 の標的遺伝子。

Figure 13

## 【配列表】



2014509852000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/28016												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/7088, C12N 5/10(2012.01) USPC - 435/375; 435/455 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/375; 435/455 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/375; 435/455; 514/44A; 514/44R (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, JPAB, PGPB); Google Scholar Search terms: miR-155, antagomir-155, antagonist miR-155, WEE1 kinase, SHIP1, FOXO3, KGF, FADD, SMAD1, MYO10, administer, transfect														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>BUTZ et al., Down-Regulation of Wee1 Kinase by a Specific Subset of microRNA in Human Sporadic Pituitary Adenomas. J Clin Endocrinol Metab, October 2010, Vol 95, No 10, Pages E181-E191. Especially pg E188 fig 4 A,B, D; pg E188 col 2 para 2.</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>O'CONNELL et al., Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. Proc Nat Acad Sci, 28 April 2009, Vol 106, No 17, Pages 7113-7118. Especially pg 7113 col 2 para 4 continued to pg 7114 col 1 para 1</td> <td>8 — 9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MARTIN et al., MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. J Biol Chem, 7 July 2006, Vol 281, No 27, Pages 18277-18284. Especially pg 18282 col 1 para 2 continued to pg 18282 col 2 para 1; pg 18282 fig 5 A, C.</td> <td>9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	BUTZ et al., Down-Regulation of Wee1 Kinase by a Specific Subset of microRNA in Human Sporadic Pituitary Adenomas. J Clin Endocrinol Metab, October 2010, Vol 95, No 10, Pages E181-E191. Especially pg E188 fig 4 A,B, D; pg E188 col 2 para 2.	1	X — Y	O'CONNELL et al., Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. Proc Nat Acad Sci, 28 April 2009, Vol 106, No 17, Pages 7113-7118. Especially pg 7113 col 2 para 4 continued to pg 7114 col 1 para 1	8 — 9	Y	MARTIN et al., MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. J Biol Chem, 7 July 2006, Vol 281, No 27, Pages 18277-18284. Especially pg 18282 col 1 para 2 continued to pg 18282 col 2 para 1; pg 18282 fig 5 A, C.	9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	BUTZ et al., Down-Regulation of Wee1 Kinase by a Specific Subset of microRNA in Human Sporadic Pituitary Adenomas. J Clin Endocrinol Metab, October 2010, Vol 95, No 10, Pages E181-E191. Especially pg E188 fig 4 A,B, D; pg E188 col 2 para 2.	1												
X — Y	O'CONNELL et al., Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. Proc Nat Acad Sci, 28 April 2009, Vol 106, No 17, Pages 7113-7118. Especially pg 7113 col 2 para 4 continued to pg 7114 col 1 para 1	8 — 9												
Y	MARTIN et al., MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. J Biol Chem, 7 July 2006, Vol 281, No 27, Pages 18277-18284. Especially pg 18282 col 1 para 2 continued to pg 18282 col 2 para 1; pg 18282 fig 5 A, C.	9												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
* 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 "Z" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 18 July 2012 (18.07.2012)		Date of mailing of the international search report 03 AUG 2012												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/28016

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-26 and 30  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Group I: Claims 1, 8, and 9 drawn to a method of modulating the expression of one or more genes in a target cell by administering a microRNA-155 (miR-155) oligonucleotide

Group II: Claims 2, 6, and 9, drawn to a method of modulating mutation of a cell or treating a cancer by administering a miR-155 oligonucleotide

Group III: Claims 3-5, 7, 9, 27-29, and 31, drawn to a method of reducing the spontaneous mutation rate of a cell by reducing endogenous levels of miR-155, as for example by administering a miR-155 anti-sense compound, and to such compounds

Group IV: Claim 32, drawn to a method of identifying an agent that can be used to inhibit an inflammatory-related cancer

--please see continuation on extra sheet--

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 8, 9

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/28016

## Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The shared technical feature of the inventions listed as Groups I-IV is miR-155. This shared technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by the article entitled "MicroRNAs in Immune Regulation - Opportunities for Cancer Immunotherapy" by Okada et al. (published in Int J Biochem Cell Biol, August 2010, Vol 42, No 8, pages 1256-1261; hereinafter "Okada"), which discloses miR-155 (abstract; p 1259, left col, para 4). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups II-IV is the association of miR-155 with cancer and the administration of an agent that modulates miR-155 to treat cancer, especially inflammatory-related cancer. This shared technical feature fails to provide a contribution over Okada which further discloses that overexpression of miR-155 in hematopoietic cells induce malignancy or myeloproliferative disorder, and is associated with human acute myeloid leukemia (p 1259, left col, para 4). Okada further teaches that miR-155 also plays key roles in both innate and adaptive immune responses (p 1259, left col, para 4) and that transgenic expression of miR-155 could reverse cancer-induced skewing towards Th2 polarization and promote effective Th1 type anti-tumor immune responses (p 1259, left col, para 4). Okada concludes that modulation of miRs in tumor cells may represent a viable approach to cancer therapy (p 1260, left col, para 1). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups I and IV is a target gene of miR-155. This shared technical feature also fails to provide a contribution over Okada. Okada discloses that the Sh2 domain-containing inositol-5-phosphatase(SHIP)1 gene is directly regulated by miR-155 (p 1259, left col, para 4). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Further, the special technical feature of the inventions listed as Group I is the modulation of expression of a miR-155 target gene. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups II-IV. The special technical feature of the inventions listed as Group III is a miR-155 anti-sense compound. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-II and IV. The special technical feature of the inventions listed as Group IV is the method steps for screening for a therapeutic agent. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-III.

Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. Without a shared special technical feature, the inventions of Groups I-IV lack unity with one another.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード ( 参考 )
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>		A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 K 31/712 (2006.01)</b>		A 6 1 K 31/712	

(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, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 クローチェ , カーロ・エム

アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 2 2 1 , コロンバス , ケンブリッジ・プールバード 2 1 4 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 CA20 DA02 DA03 EA04 FA02 FA06 GA11  
 HA17  
 4B063 QA01 QA18 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02  
 4B065 AA90X AA93Y AB01 BA02 CA44 CA46  
 4C084 AA13 NA14 ZB262  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26