(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 3 月 19 日(19.03.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/037656 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/074055

(22) 国際出願日: 2014 年 9 月 11 日(11.09.2014)

(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 2013-188234 2013 年 9 月 11 日(11.09.2013) JP

(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP). 国立大学法人弘前大学 (HIROSAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町１番地 Aomori (JP).

(72) 発明者: 佐々木 秀直 (SASAKI, Hidenao); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 内海 潤 (UTSUMI, Jun); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 若林 孝一 (WAKABAYASHI, Koichi); 〒0368560 青森県弘前市文京町１番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目７番１０号山京別館８０１ 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2015/037656 A1

(54) **Title**: MICRO RNA FOR REGULATING AUTOPHAGY

(54) 発明の名称 : オートファジーを調節するマイクロＲＮＡ

(57) **Abstract**: Autophagy-regulating miRNA molecules according to the present invention are formed from base sequences represented by any of SEQ ID NO: 1-203 in the sequence listing. These miRNA molecules were identified using an miRNA screening method newly developed by the present inventors. Said screening method includes a first step for obtaining, for each of a plurality of factors functioning in one biological reaction pathway, miRNA groups predicted to bind with the mRNA coding the factor, and a second step for extracting the miRNA common to at least two of the miRNA groups obtained for each factor.

(57) 要約: 本発明のオートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子は、配列表の配列番号１～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなる。これらのｍｉＲＮＡ分子は、本願発明者らが新規に開発したｍｉＲＮＡ選定方法により同定された。該選定方法は、１つの生体内反応経路で機能する複数の因子のそれぞれについて、該因子をコードするｍＲＮＡに結合すると予測されるｍｉＲＮＡ群を取得する第一工程、及び、各因子に対して得られたｍｉＲＮＡ群の少なくとも２群に共通するｍｉＲＮＡを抽出する第二工程を含む。

明　細　書

発明の名称 ： オートファジーを調節するマイクロＲＮＡ

技術分野

[0001] 本発明は、生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法、該方法により同定された生体細胞内のオートファジーを調節する活性を有するｍｉＲＮＡ分子（以下、「オートファジー調節ｍｉＲＮＡ（分子）」と称することもある）、及び、該ｍｉＲＮＡの利用に関する。

背景技術

[0002] 近年、生命維持のためのタンパク質分解系の研究が大きく進んだ。細胞には、タンパク質を新たに作り出す機構だけでなく、作ったタンパク質が不要になった場合に分解する機構もあり、（１）ユビキチン-プロテアソーム系、（２）オートファジーの二つの主要な機構が存在する。ユビキチン-プロテアソーム系では、分解するべきタンパク質の一つ一つに、ユビキチン分子が複数結合することでプロテアソームにより認識されて分解されるという選択的タンパク質分解系で、個々のタンパク質ごとの分解が行われるのに対し、オートファジーでは一度に多くのタンパク質が分解される。このためオートファジーによるタンパク質分解のことはバルク分解系とも呼ばれる。オートファジーの機構は酵母から高等動植物にまでよく保存されている。オートファジーは、生体の恒常性維持と種々の疾患に関与すると考えられており、その制御は多くの疾患の治療につなげることができると考えられている（非特許文献１）。

[0003] たとえば、神経変性疾患では、病理学的に細胞内封入体が観察され、その中に特定のタンパク質の凝集物が認められている。この細胞内封入体は、細胞内タンパク質分解系の不全による結果と考えられ、これが神経細胞機能の障害を引き起こす可能性が指摘される一方、これらの封入体と凝集体の生成抑制と分解除去が治療法につながる可能性が考えられる。実際に、神経変性疾患の診断や治療への利用に関しては、シヌクレイノパチーの治療に酸性β-

グルコセレブロシダーゼ（GBA）ポリペプチド類やカテプシンＤ類の利用が提案されている（特許文献１）。

[0004] 代表的な難治性神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis：ＡＬＳ）においては、ＳＯＤ１、ＴＡＲＤＢＰ（ＴＤＰ-４３）、ＦＵＳ、Optineurinなどの凝集体が知られており、このうち、ＴＡＲＤＢＰ凝集体の分解を狙ったオートファジーの活性化が、ＡＬＳ病態モデルであるＦＴＬＤ－Ｕマウスの病態を改善させたという報告がある（非特許文献２）。他方、細胞における組織再生や修復の制御因子であるｍＴＯＲ（mammalian target of rapamycin）の阻害はオートファジーを促進させることから、代表的ｍＴＯＲ阻害薬であるラパマイシンを投与してオートファジーの活性化を図ったものの、ＡＬＳモデルマウス（ＳＯＤ１－Ｇ９３Ａ）の運動神経変性は改善せず、逆に早期死亡が多かったことという報告もある（非特許文献３）。すなわち、ＡＬＳモデルマウスにおいては、オートファジーの活性化によって、病態が改善した報告と悪化した報告の両方が存在しているが、これらはいずれもＡＬＳの特徴的病変を増強したモデルマウスであり、実際のヒトのＡＬＳにおける効果を見たものではないことから、統一的な解釈には限界があると思われる。

[0005] ＡＬＳモデルマウスにおける結果の違いは、ｍＴＯＲはオートファジーのみならず免疫系に作用することや過度のオートファジーは細胞死につながる可能性があることも関連していると思われる。また、ｍＴＯＲの調節よりは、オートファジーを選択的に活性化することが適切である可能性がある。それゆえ、直接的にオートファジーを調節することが重要であることが示唆される。

[0006] 以上のように、難治性疾患ではタンパク質分解系に関する因子に注目した診断や治療法の開発が注目されているものの、診断や治療にオートファジーを調節する因子を利用する手法については、未だ確立されていない。

[0007] 一方、生体内の遺伝子発現の調節因子として、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡと略す）が注目されている。ｍｉＲＮＡは、約２２塩基の蛋白質非翻訳Ｒ

ＮＡ（small non-coding RNA）であり、ヒトには約１０００種類以上存在することが示唆されている。ｍｉＲＮＡは生体内でさまざまな遺伝子の発現抑制を行う分子として注目されている。ゲノム上には各ｍｉＲＮＡ遺伝子の領域が存在し、ＲＮＡポリメラーゼIIによって転写され、約数百塩基のｍｉＲＮＡ初期転写産物が形成される。ｍｉＲＮＡ初期転写産物は核内でＤｒｏｓｈａ、細胞質内でＤｉｃｅｒと呼ばれる２種類のＲＮａｓｅ III酵素によってプロセシングされ、成熟ｍｉＲＮＡが形成される。成熟ｍｉＲＮＡは制御タンパク質複合体（RNA-induced silencing complex：ＲＩＳＣ）と協調しつつ、相補的配列をもつ複数のターゲット遺伝子のｍＲＮＡと相互作用し、遺伝子の発現を抑制することが知られている。

[0008] ｍｉＲＮＡはヒト疾患に広く関連が示唆されているが、特にがんとｍｉＲＮＡの関係に関して、様々な臓器において正常組織とがん組織で多くのｍｉＲＮＡの発現様式が異なる事から、発がん過程へのｍｉＲＮＡ発現異常の関与が強く示唆されている。すなわち、腫瘍抑制的ｍｉＲＮＡの発現低下あるいは発がん促進的ｍｉＲＮＡの発現上昇がヒト発がん過程に関与している可能性が強く示唆されている（非特許文献４）。ｍｉＲＮＡの産業上の利用に関しても、もっぱらがんの領域での利用が主体であるが、ようやく各種疾患に対する創薬への利用が報告され始めてきた（非特許文献５）。神経疾患関係においては、損傷後の神経の再生にｍｉＲＮＡを利用する方法（特許文献２）や多能性ストローマ細胞のニューロン分化を刺激する方法（特許文献３）、ＡＬＳの進行抑制にｍｉＲＮＡ－２０６が利用できることを示唆する報告（非文献情報６）などがある。

[0009] 以上のように、疾患に関連するｍｉＲＮＡを特定し、これを診断や治療に利用することは、新技術として非常に有望である。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特表2010-535153号公報

特許文献2：特表2011-515407号公報

特許文献3：特表2012-530054号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：MIzushima N and Komatsu M, Cell. 2011;147(4):728-41.

非特許文献2：Wang IF et al., Autophagy. 2012;9(2):1-2.

非特許文献3：Zhang X et al., Autophagy. 2011;7(4):412-25.

非特許文献4：「microRNAの制御異常と癌」、実験医学　vol.27, No.8, 2009.

非特許文献5：「臨床・創薬利用が見えてきたmicroRNA」、遺伝子医学MOOK23 2012.

非特許文献6：Williams AH et al., Science. 2009;326(5959):1549-54.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 上記のとおり、オートファジーを調節して新たな疾患治療法を開発することは期待されることであり、その手段としてｍｉＲＮＡをオートファジーの調節に用いることが考えられる。しかしながら、大きな課題がある。それは、オートファジーが複数の遺伝子発現が協調して発動される仕組みであること、他方、１種の遺伝子発現は複数のｍｉＲＮＡ（結合性から予測して数百種類）の制御を受けるという関係があることから、この両者が組み合わさると、オートファジーを調節するｍｉＲＮＡは膨大な数となってしまい、治療への応用は難しくなるということである。たとえば、オートファジーが１０種の遺伝子発現で誘導され、１種の遺伝子発現に３００種のｍｉＲＮＡが関与すると仮定すると、実に３０００種のｍｉＲＮＡが候補となる。この膨大な数の候補の中から、実際にオートファジー因子の発現を抑制してオートファジー機構を調節することができるｍｉＲＮＡを特定することは容易なことではなく、その手法も確立されていない。

[0013] ｍｉＲＮＡは逐次発見が続いており、報告されたｍｉＲＮＡは統合データベースｍｉＲＢａｓｅ(http://www.mirbase.org/)に登録される。ｍｉＲＮＡと標的となる遺伝子（ｍＲＮＡ）の同定は、ｍｉＲＮＡをサイレンシングす

るようにした培養細胞を用いた実験系で行われることが多いが、ｍｉＲＮＡ配列と標的遺伝子配列の結合可能性を評価するアルゴリズム（ｍｉＲＮＡ標的予測ツール）で予測することができる。しかしながら、このｍｉＲＮＡ標的予測ツールを用いても、１種のｍｉＲＮＡに対する標的遺伝子は百種以上、他方１種の遺伝子に結合する可能性のあるｍｉＲＮＡは数百種がリストアップされるという精度であることから、複数の遺伝子が関与する細胞内経路に関与するｍｉＲＮＡは数万以上（重複あり）という予測結果になってしまう。従って、特定のｍｉＲＮＡ群を絞り込むには有効な手法が必要となっているが、そうした手法は報告されていない。このｍｉＲＮＡを絞り込む技術が未完成なことが、ｍｉＲＮＡという、遺伝子発現からタンパク質の合成という生命現象の最重要プロセスを制御する分子が発見されながら、ｍｉＲＮＡの産業上利用が進まない大きな理由のひとつである。

[0014] もう一つ重要な課題は、ｍｉＲＮＡを一定のグループで扱うことの重要性である。すでに述べたように、１つの遺伝子を標的として制御するｍｉＲＮＡは複数ある。すなわち、「１種の遺伝子に１種のｍｉＲＮＡ」という対応がなく、「１種の遺伝子に特定のｍｉＲＮＡ群」という対応になるため、標的とする遺伝子に対して特定のｍｉＲＮＡ群を絞り込むということの方が妥当であるということである。そのため、ある疾患の検査診断や治療にｍｉＲＮＡを利用しようとする場合、疾患の原因遺伝子や病態の増悪遺伝子に対しては、それらを標的とする特定のｍｉＲＮＡ群を利用することが有用である。こうした考えに基づくｍｉＲＮＡの絞り込み法も、未だ開発されていない。

[0015] 従って、本発明の目的は、オートファジーを調節するｍｉＲＮＡを絞り込み、オートファジーの調節による新たな疾患治療法及びオートファジー調節ｍｉＲＮＡを指標とした新たな疾患診断法の開発を可能にする手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0016] 本願発明者らは、オートファジーは複数の遺伝子が協調して発動される機

構であることから、それら複数の遺伝子の発現に対し、一定の限定されたｍｉＲＮＡ群が共通して関与している可能性があることに想到した。すなわち、ｍｉＲＮＡの主たる作用機序が標的遺伝子ｍＲＮＡの発現調節であるならば、一連の因子群が連続的に構成されてオートファジーという現象を発現するのであるから、一連の因子群の発現を調節するｍｉＲＮＡには共通性があるはずであるということに想到した。この前提で、オートファジーを構成する一連の因子群をオートファジー因子とし、このなかで主要な１８種の遺伝子のそれぞれについて、公知のｍｉＲＮＡ標的予測ツールを用いて結合が予測されるｍｉＲＮＡを抽出し、結合予測上位５０種をさらに抽出した。そして、各５０種、のべ９００種のｍｉＲＮＡ集団の中から、１８種の遺伝子のうちの複数の遺伝子に共通するｍｉＲＮＡを抽出することにより、オートファジーを調節するｍｉＲＮＡの候補を絞り込むことに成功した。そして、オートファジー経路以外の様々な生体内反応経路についても、上記の手法を適用することにより、当該反応経路を調節するｍｉＲＮＡを絞り込むことが可能であることを見出し、本願発明を完成した。

[0017] すなわち、本発明は、１つの生体内反応経路で機能する複数の因子のそれぞれについて、該因子をコードするｍＲＮＡに結合すると予測されるｍｉＲＮＡ群を取得する第一工程、及び、各因子に対して得られたｍｉＲＮＡ群の少なくとも２群に共通するｍｉＲＮＡを抽出する第二工程を含む、前記生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法を提供する。また、本発明は、配列表の配列番号１～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなり、オートファジーを調節する活性を有するｍｉＲＮＡ分子を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のｍｉＲＮＡ分子、又は、該ｍｉＲＮＡ分子を生体細胞内で産生可能なベクターを有効成分として含む、オートファジー調節剤を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のｍｉＲＮＡ分子を阻害する核酸分子、又は、該核酸分子を生体内で産生可能なベクターを有効成分として含む、オートファジー調節剤を提供する。さらに、本発明は、被検者から分離された試料中の、配列番号１～２０３に記載された塩基配列からなるｍｉＲ

ＮＡの少なくとも１つを測定することを含む、オートファジー関連疾患の検出方法を提供する。さらに、本発明は、１つの生体内反応経路で機能する複数の因子のそれぞれについて、該因子をコードするｍＲＮＡに結合すると予測されるｍｉＲＮＡ群を取得する第一工程、及び、各因子に対して得られたｍｉＲＮＡ群の少なくとも２群に共通するｍｉＲＮＡを抽出する第二工程を含む、前記生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法により選定されたｍｉＲＮＡを用いて、前記生体内反応経路の異常により引き起こされる疾患の治療薬を選定する方法、並びに、当該方法により選定される、生体内反応経路の異常により引き起こされる疾患の治療薬を提供する。

発明の効果

[0018] 本発明により、多数の因子が機能している生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡを絞り込むことができる新規な方法が提供される。また、該方法により、オートファジーの異常（オートファジーの促進又は抑制）により引き起こされる疾患（「オートファジー関連疾患」と称することもある）の治療や診断に有用なオートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子が同定される。本発明は、オートファジーの異常により引き起こされる疾患、例えば神経変性疾患等の治療や診断に貢献する。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明において、「生体内反応経路」とは、複数のタンパク質因子がその経路の発動、進行及び抑制を制御している生体細胞内の反応経路をいい、各種の代謝経路（生合成、分解）やシグナル伝達経路、オートファジー経路、ユビキチン-プロテアソーム経路、ミトコンドリア制御経路が包含される。下記実施例では、タンパク質代謝経路の１つであるオートファジーで機能する１８種の因子を対象にしてｍｉＲＮＡ選定方法を実施したが、他の生体内反応経路についても同様に当該方法を実施することができる。

[0020] 本願発明者らが開発した生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法では、まず、１つの生体内反応経路で機能する複数の因子のそれぞれについて、該因子をコードするｍＲＮＡに結合すると予測されるｍｉＲＮＡ群を取

得する（第一工程）。

[0021] 対象とする複数の因子の数は特に限定されないが、当該経路の中で特徴的に働く主要な因子を対象とすることが望ましい。当該複数の因子は、生体内反応経路において抑制的に機能している因子に統一するか、又は促進的に機能している因子に統一することができる。ある１つの生体内反応経路を抑制する複数の因子を対象にｍｉＲＮＡを抽出して選定すれば、複数の抑制因子の発現を抑制するｍｉＲＮＡ、すなわち当該経路を促進するｍｉＲＮＡを選定することができる。これとは逆に、ある１つの生体内反応経路を促進ないしは発動する複数の因子を対象にｍｉＲＮＡを抽出して選定すれば、複数の促進因子の発現を抑制するｍｉＲＮＡ、すなわち当該経路を抑制するｍｉＲＮＡを選定することができる。

あるいはまた、生体内反応経路の抑制と促進は相互バランスで調節されていることから、抑制と促進の両方の因子を対象にして、両方に関与するｍｉＲＮＡを抽出することも可能である。抑制と促進の両方のイベントに関与するｍｉＲＮＡと、抑制あるいは促進のどちらか一方に関与するｍｉＲＮＡを特定することで、ｍｉＲＮＡの用途に応じてより精密なｍｉＲＮＡの抽出が可能となる。

[0022] 既に膨大な数の遺伝子配列が同定され、様々な生物種のｍｉＲＮＡも多数同定されている。これらの配列情報に基づき、任意の遺伝子のｍＲＮＡとｍｉＲＮＡとの結合を予測する標的予測ツールも各種のものが知られている。上記の第一工程は、そのような公知のツールを用いて実施することができる。標的予測ツールの具体例を挙げると、例えば以下のようなものが知られている。

ComiR (Nucleic Acids Research, 2013, W159-W164. http://www.benoslab.pitt.edu/comir/)

miRmap (Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 22 11673-11683.http://mirmap.ezlab.org/)

MAGIA (Nucleic Acids Res. 2010,W352-359.http://gencomp.bio.unipd.it

/magia/start/)

TargetScan (Mol. Cell, 2007, Vol. 27,91-105.http://www.targetscan.org/)

PITA (Nat. Genet., 2007, Vol. 39, 1278-1284.http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/index.html)

PicTar (Nat. Genet., 2005, Vol. 37, 495-500. http://pictar.mdc-berlin.de/)

miRanda (PLoS Biol., 2004, Vol. 2,e363.http://www.microrna.org/microrna/home.do)

PITA(Nat. Gen. 2007, Vol. 39, 1278-1284. http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html)

RNAhybrid (RNA, 2004, Vol. 10, 1507-1517.http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/)

[0023] 標的予測ツールmiRmapを用いて第一工程を実施する場合、以下のようにして行なえばよい。対象として選んだ細胞内イベント経路に関与する複数の因子の遺伝子名を入力し、これに結合すると予測されるｍｉＲＮＡを出力させる。通常、１つの遺伝子に対し、結合が予測されるｍｉＲＮＡは数百種に上るので、結合予測のスコア（miRmap score）が一定以上のｍｉＲＮＡに絞る、あるいはスコア上位の一定数のｍｉＲＮＡに絞る、などの基準を設けて、ｍｉＲＮＡ群を構成するｍｉＲＮＡの数を限定してよい。１つの因子に対し、１００種以下、例えば５０種以下のｍｉＲＮＡを結合予測上位のものから選択すると、結合性の高いｍｉＲＮＡ群を取得することができる。miRmap以外の予測ツールを使用した場合でも、結合予測の信頼性の高さの目安となるスコアが算出されるので、そのようなスコアに基づいてｍｉＲＮＡ群を抽出することができる。

[0024] 次いで、各因子に対して抽出された複数のｍｉＲＮＡ群の中から、少なくとも２つのｍｉＲＮＡ群に共通しているｍｉＲＮＡを抽出する（第二工程）。第一工程で対象とした因子の数に応じて、第二工程でのｍｉＲＮＡの抽出

は、少なくとも３群、少なくとも４群、あるいはそれ以上の数の群に共通することを条件として実施することができる。

[0025] 以上の工程により選定されたｍｉＲＮＡは、一つの生体内反応経路で機能する複数の因子のうちの２つ以上の因子に結合し、該因子の発現を抑制することにより、当該生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの候補である。選定されたｍｉＲＮＡは、細胞内での機能を実験的に確認し、疾患の治療薬や診断薬として開発することができる。

[0026] 例えば、選定された候補ｍｉＲＮＡに対するアンチセンス核酸分子（ｓｉＲＮＡ，ｓｈＲＮＡなどが包含される）を作製して細胞を処理することにより、細胞内の当該ｍｉＲＮＡの機能を阻害し、細胞の応答を観察する。この機能性評価は、単独または複数のｍｉＲＮＡに対して同時に行うことができる。対象とした生体反応経路の促進ないしは抑制が観察されれば、当該候補ｍｉＲＮＡは実際に細胞内で当該生体反応経路の調節に関与していると判断できる。この場合は、当該候補ｍｉＲＮＡ又はこれを阻害するＲＮＡｉ分子等の核酸分子を、当該反応経路に関連する疾患の治療剤として利用できるほか、当該候補ｍｉＲＮＡを該疾患のマーカーとして利用することも可能である。

[0027] あるいは、細胞に候補ｍｉＲＮＡを導入し、細胞の応答を観察する。この機能性評価も、単独または複数のｍｉＲＮＡに対して同時に行うことができる。対象とした生体反応経路の促進ないしは抑制が観察されれば、当該候補ｍｉＲＮＡは細胞内で当該生体反応経路を促進ないしは抑制する作用があると判断できる。この場合は、当該候補ｍｉＲＮＡ分子を、当該反応経路に関連する疾患の治療剤として利用することができる。

[0028] 上記の候補ｍｉＲＮＡあるいは候補ｍｉＲＮＡに対するアンチセンス核酸分子は、単独または複数で用いることができ、複数で用いる場合は、たとえば検査診断薬としてはマルチプレックスタイプの検査薬、治療薬としては核酸医薬カクテルであり得る。治療薬の場合には、リポソームへ封入したり、ＲＮＡａｓｅ抵抗性のタグをつけて安定化したりして、投与することができ

る。特定の細胞内経路の調節には、対応する複数のｍｉＲＮＡが関与することを考えると、単独利用よりは複数の候補ｍｉＲＮＡを用いる方が好ましい結果を得ることができると期待される。

[0029] 表１－１～１－６に記載したｍｉＲＮＡは、実施例において、オートファジー因子遺伝子１８種のうちの少なくとも２種のｍＲＮＡに結合することが予測されるｍｉＲＮＡとして特定された、１９７種のオートファジー調節ｍｉＲＮＡである。表中、「頻度」は、各ｍｉＲＮＡが結合すると予測されたオートファジー因子遺伝子の個数を表す。「Accession No.」は、マイクロＲＮＡデータベースmiRBase（http://www.mirbase.org/）のアクセッション番号である。

[0030]

[表1-1]

整理番号	頻度	miRNA名	Accession No.	配列番号
1	7	hsa-miR-4685-5p	MIMAT0019771	1
2	5	hsa-miR-3619-5p	MIMAT0017999	2
3	5	hsa-miR-4763-3p	MIMAT0019913	3
4	5	hsa-miR-612	MIMAT0003280	4
5	5	hsa-miR-939-3p	MIMAT0022939	5
6	4	hsa-miR-1207-5p	MIMAT0005871	6
7	4	hsa-miR-1343	MIMAT0019776(3p)	7
			MIMAT0027038(5p)	8
8	4	hsa-miR-1914-3p	MIMAT0007890	9
9	4	hsa-miR-1915-3p	MIMAT0007892	10
10	4	hsa-miR-3184-5p	MIMAT0015064	11
11	4	hsa-miR-4688	MIMAT0019777	12
12	4	hsa-miR-526b-3p	MIMAT0002836	13
13	4	hsa-miR-646	MIMAT0003316	14
14	4	hsa-miR-761	MIMAT0010364	15
15	4	hsa-miR-762	MIMAT0010313	16
16	3	hsa-miR-1183	MIMAT0005828	17
17	3	hsa-miR-1236-3p	MIMAT0005591	18
18	3	hsa-miR-1260a	MIMAT0005911	19
19	3	hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	20
20	3	hsa-miR-146a-3p	MIMAT0004608	21
21	3	hsa-miR-1470	MIMAT0007348	22
22	3	hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	23
23	3	hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	24
24	3	hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	25
25	3	hsa-miR-1909-3p	MIMAT0007883	26
26	3	hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	27
27	3	hsa-miR-1972	MIMAT0009447	28
28	3	hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	29
29	3	hsa-miR-2114-5p	MIMAT0011156	30
30	3	hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	31
31	3	hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	32
32	3	hsa-miR-3139	MIMAT0015007	33
33	3	hsa-miR-3166	MIMAT0015040	34
34	3	hsa-miR-3187-5p	MIMAT0019216	35
35	3	hsa-miR-330-5p	MIMAT0004693	36
36	3	hsa-miR-3612	MIMAT0017989	37
37	3	hsa-miR-3652	MIMAT0018072	38

[0031]

[表1-2]

整理番号	頻度	miRNA名	Accession No.	配列番号
38	3	hsa-miR-370	MIMAT0000722(3p)	39
			MIMAT0026483(5p)	40
39	3	hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	41
40	3	hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	42
41	3	hsa-miR-4270	MIMAT0016900	43
42	3	hsa-miR-4430	MIMAT0018945	44
43	3	hsa-miR-449c-5p	MIMAT0010251	45
44	3	hsa-miR-4505	MIMAT0019041	46
45	3	hsa-miR-4514	MIMAT0019051	47
46	3	hsa-miR-4530	MIMAT0019069	48
47	3	hsa-miR-4632-5p	MIMAT0022977	49
48	3	hsa-miR-4650-5p	MIMAT0019713	50
49	3	hsa-miR-4656	MIMAT0019723	51
50	3	hsa-miR-4690-5p	MIMAT0019779	52
51	3	hsa-miR-4692	MIMAT0019783	53
52	3	hsa-miR-4726-3p	MIMAT0019846	54
53	3	hsa-miR-4731-5p	MIMAT0019853	55
54	3	hsa-miR-4736	MIMAT0019862	56
55	3	hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	57
56	3	hsa-miR-497-5p	MIMAT0002820	58
57	3	hsa-miR-518c-5p	MIMAT0002847	59
58	3	hsa-miR-5194	MIMAT0021125	60
59	3	hsa-miR-5681a	MIMAT0022469	61
60	3	hsa-miR-5787	MIMAT0023252	62
61	3	hsa-miR-596	MIMAT0003264	63
62	3	hsa-miR-6134	MIMAT0024618	64
63	3	hsa-miR-650	MIMAT0003320	65
64	3	hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	66
65	3	hsa-miR-665	MIMAT0004952	67
66	3	hsa-miR-6721-5p	MIMAT0025852	68
67	3	hsa-miR-6722-3p	MIMAT0025854	69
68	3	hsa-miR-765	MIMAT0003945	70
69	3	hsa-miR-940	MIMAT0004983	71
70	2	hsa-miR-105-5p	MIMAT0000102	72
71	2	hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	73
72	2	hsa-miR-1226-5p	MIMAT0005576	74
73	2	hsa-miR-1227-5p	MIMAT0022941	75
74	2	hsa-miR-1260b	MIMAT0015041	76

[0032]

[表1-3]

整理番号	頻度	miRNA名	Accession No.	配列番号
75	2	hsa-miR-1271-5p	MIMAT0005796	77
76	2	hsa-miR-1285-3p	MIMAT0005876	78
77	2	hsa-miR-1293	MIMAT0005883	79
78	2	hsa-miR-1299	MIMAT0005887	80
79	2	hsa-miR-1321	MIMAT0005952	81
80	2	hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	82
81	2	hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	83
82	2	hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	84
83	2	hsa-miR-185-3p	MIMAT0004611	85
84	2	hsa-miR-1914-5p	MIMAT0007889	86
85	2	hsa-miR-198	MIMAT0000228	87
86	2	hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	88
87	2	hsa-miR-211-3p	MIMAT0022694	89
88	2	hsa-miR-2115-3p	MIMAT0011159	90
89	2	hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	91
90	2	hsa-miR-212-5p	MIMAT0022695	92
91	2	hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	93
92	2	hsa-miR-23c	MIMAT0018000	94
93	2	hsa-miR-2681-5p	MIMAT0013515	95
94	2	hsa-miR-2682-5p	MIMAT0013517	96
95	2	hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	97
96	2	hsa-miR-2861	MIMAT0013802	98
97	2	hsa-miR-298	MIMAT0004901	99
98	2	hsa-miR-30b-3p	MIMAT0004589	100
99	2	hsa-miR-30c-1-3p	MIMAT0004674	101
100	2	hsa-miR-3125	MIMAT0014988	102
101	2	hsa-miR-3126-5p	MIMAT0014989	103
102	2	hsa-miR-3150b-3p	MIMAT0018194	104
103	2	hsa-miR-3158-3p	MIMAT0015032	105
104	2	hsa-miR-3158-5p	MIMAT0019211	106
105	2	hsa-miR-3170	MIMAT0015045	107
106	2	hsa-miR-3189-5p	MIMAT0019217	108
107	2	hsa-miR-3194-5p	MIMAT0015078	109
108	2	hsa-miR-320e	MIMAT0015072	110
109	2	hsa-miR-342-5p	MIMAT0004694	111
110	2	hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	112
111	2	hsa-miR-3609	MIMAT0017986	113
112	2	hsa-miR-3663-5p	MIMAT0018084	114

[0033]

[表1-4]

整理番号	頻度	miRNA名	Accession No.	配列番号
113	2	hsa-miR-3667-3p	MIMAT0018090	115
114	2	hsa-miR-3689a-3p	MIMAT0018118	116
115	2	hsa-miR-3689b-3p	MIMAT0018181	117
116	2	hsa-miR-3689c	MIMAT0019007	118
117	2	hsa-miR-3714	MIMAT0018165	119
118	2	hsa-miR-371a-5p	MIMAT0004687	120
119	2	hsa-miR-3916	MIMAT0018190	121
120	2	hsa-miR-3919	MIMAT0018193	122
121	2	hsa-miR-3922-3p	MIMAT0018197	123
122	2	hsa-miR-3929	MIMAT0018206	124
123	2	hsa-miR-4254	MIMAT0016884	125
124	2	hsa-miR-4267	MIMAT0016893	126
125	2	hsa-miR-4290	MIMAT0016921	127
126	2	hsa-miR-4292	MIMAT0016919	128
127	2	hsa-miR-4308	MIMAT0016861	129
128	2	hsa-miR-4419b	MIMAT0019034	130
129	2	hsa-miR-4435	MIMAT0018951	131
130	2	hsa-miR-4436b-3p	MIMAT0019941	132
131	2	hsa-miR-4446-3p	MIMAT0018965	133
132	2	hsa-miR-4446-5p	MIMAT0019233	134
133	2	hsa-miR-4453	MIMAT0018975	135
134	2	hsa-miR-4469	MIMAT0018996	136
135	2	hsa-miR-4478	MIMAT0019006	137
136	2	hsa-miR-448	MIMAT0001532	138
137	2	hsa-miR-4486	MIMAT0019020	139
138	2	hsa-miR-4495	MIMAT0019030	140
139	2	hsa-miR-449b-3p	MIMAT0009203	141
140	2	hsa-miR-4512	MIMAT0019049	142
141	2	hsa-miR-4524b-3p	MIMAT0022256	143
142	2	hsa-miR-4538	MIMAT0019081	144
143	2	hsa-miR-4651	MIMAT0019715	145
144	2	hsa-miR-4652-3p	MIMAT0019717	146
145	2	hsa-miR-4664-5p	MIMAT0019737	147
146	2	hsa-miR-4665-5p	MIMAT0019739	148
147	2	hsa-miR-4667-3p	MIMAT0019744	149
148	2	hsa-miR-4667-5p	MIMAT0019743	150
149	2	hsa-miR-4689	MIMAT0019778	151
150	2	hsa-miR-4694-3p	MIMAT0019787	152

[0034]

[表1-5]

整理番号	頻度	miRNA名	Accession No.	配列番号
151	2	hsa-miR-4700-5p	MIMAT0019796	153
152	2	hsa-miR-4706	MIMAT0019806	154
153	2	hsa-miR-4709-3p	MIMAT0019812	155
154	2	hsa-miR-4717-3p	MIMAT0019830	156
155	2	hsa-miR-4732-3p	MIMAT0019856	157
156	2	hsa-miR-4739	MIMAT0019868	158
157	2	hsa-miR-4741	MIMAT0019871	159
158	2	hsa-miR-4746-5p	MIMAT0019880	160
159	2	hsa-miR-4752	MIMAT0019889	161
160	2	hsa-miR-4755-5p	MIMAT0019895	162
161	2	hsa-miR-4756-5p	MIMAT0019899	163
162	2	hsa-miR-4763-5p	MIMAT0019912	164
163	2	hsa-miR-4774-5p	MIMAT0019929	165
164	2	hsa-miR-4794	MIMAT0019967	166
165	2	hsa-miR-5006-3p	MIMAT0021034	167
166	2	hsa-miR-5008-3p	MIMAT0021040	168
167	2	hsa-miR-501-3p	MIMAT0004774	169
168	2	hsa-miR-502-3p	MIMAT0004775	170
169	2	hsa-miR-5189	MIMAT0021120(5p)	171
			MIMAT0027088(3p)	172
170	2	hsa-miR-541-3p	MIMAT0004920	173
171	2	hsa-miR-548ah-5p	MIMAT0018972	174
172	2	hsa-miR-548au-3p	MIMAT0022292	175
173	2	hsa-miR-5588-3p	MIMAT0022296	176
174	2	hsa-miR-5589-5p	MIMAT0022297	177
175	2	hsa-miR-5700	MIMAT0022493	178
176	2	hsa-miR-586	MIMAT0003252	179
177	2	hsa-miR-603	MIMAT0003271	180
178	2	hsa-miR-605	MIMAT0003273(5p)	181
			MIMAT0026621(3p)	182
179	2	hsa-miR-608	MIMAT0003276	183
180	2	hsa-miR-6081	MIMAT0023706	184
181	2	hsa-miR-609	MIMAT0003277	185
182	2	hsa-miR-6132	MIMAT0024616	186
183	2	hsa-miR-615-5p	MIMAT0004804	187
184	2	hsa-miR-6165	MIMAT0024782	188
185	2	hsa-miR-623	MIMAT0003292	189
186	2	hsa-miR-6511a-5p	MIMAT0025478	190

[0035]

[表1-6]

整理番号	頻度	miRNA名	Accession No.	配列番号
187	2	hsa-miR-664a-5p	MIMAT0005948	191
188	2	hsa-miR-670	MIMAT0010357(5p)	192
			MIMAT0026640(3p)	193
189	2	hsa-miR-708-5p	MIMAT0004926	194
190	2	hsa-miR-767-3p	MIMAT0003883	195
191	2	hsa-miR-874	MIMAT0004911(3p)	196
			MIMAT0026718(5p)	197
192	2	hsa-miR-876-3p	MIMAT0004925	198
193	2	hsa-miR-888-5p	MIMAT0004916	199
194	2	hsa-miR-892b	MIMAT0004918	200
195	2	hsa-miR-922	MIMAT0004972	201
196	2	hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	202
197	2	hsa-miR-96-5p	MIMAT0000095	203

[0036] 上記表に示したｍｉＲＮＡは、生体細胞内のオートファジーを調節する活性を有するｍｉＲＮＡ分子として用いることができる。オートファジーの調節は、オートファジー経路の抑制であり得る。あるいは、オートファジーの調節は、オートファジー経路の促進であり得る。オートファジー経路に抑制的に作用するｍｉＲＮＡと促進的に作用するｍｉＲＮＡを適宜組み合わせて用いることで、オートファジーを様々に調節することができる。上記表に示したｍｉＲＮＡは、特に限定されないが、オートファジー経路の抑制に好ましく使用し得る。

[0037] 本発明におけるオートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子は、例えば、配列番号１～３１、３３～９２、及び、９４～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子；配列番号１～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４４～５６、５８～６６、６８～７０、７２～７５、７７、７９～８１、８４、８６～９２、９４～９７、９９～１１２、１１５～１２６、１２８～１４０、１４２～１４８、１５０～１５６、１５８～１６３、１６５～１８２、１８４～１８６、１８８～１９０、１９３～１９５、及び、１９７～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子；又は配列番号１、４～８、１２～１７、２０

～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４５～５０、５２～５６、５８～６６、６８～７０、７２～７５、７７、７９～８１、８４、８６～９２、９４～９７、９９～１１２、１１５～１２６、１２８～１４０、１４２～１４８、１５０～１５３、１５５、１５６、１５８～１６３、１６５～１８２、１８４～１８６、１８８～１９０、１９３～１９５、及び、１９７～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子であり得る。

[0038] オートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子の好ましい例としては、３種以上のオートファジー因子遺伝子ｍＲＮＡへの結合が予測された、配列番号１～７１のいずれかに記載の塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子を挙げることができる。該ｍｉＲＮＡ分子は、例えば、配列番号１～３１、及び、３３～７１のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子；配列番号１～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４４～５６、５８～６６、及び、６８～７０のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子；又は配列番号１、４～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４５～５０、５２～５６、５８～６６、及び、６８～７０のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子であり得る。

[0039] オートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子のさらに好ましい例としては、４種以上のオートファジー因子遺伝子ｍＲＮＡへの結合が予測された、配列番号１～１６のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子を挙げることができる。該ｍｉＲＮＡ分子は、例えば、配列番号１～８、及び、１２～１６のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子、又は配列番号１、４～８、及び、１２～１６のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子であり得る。

[0040] オートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子の特に好ましい例としては、５種以上のオートファジー因子遺伝子ｍＲＮＡへの結合が予測された、配列番号１～５のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子を挙げることが

できる。該ｍｉＲＮＡ分子は、例えば、配列番号１、４、及び、５のいずれかに記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子であり得る。中でもとりわけ、７種のオートファジー因子遺伝子ｍＲＮＡへの結合が予測された、配列番号１に記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡ分子が好ましい。

[0041] オートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子及び該ｍｉＲＮＡ分子を阻害する核酸分子は、オートファジー調節剤として利用することができる。オートファジー経路に対し抑制的に作用する分子は、オートファジーを抑制する調節剤として利用することができる。オートファジー経路に対し促進的に作用する分子は、オートファジーを促進する調節剤として利用することができる。オートファジー経路に対し抑制的に作用する分子と促進的に作用する分子を組み合わせて利用し、オートファジー経路のバランス等を調節することも可能である。また、オートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子及び該ｍｉＲＮＡ分子を阻害する核酸分子は、各分子を生体細胞内で産生可能なベクターの形態で調節剤として使用してもよい。

[0042] オートファジー調節剤の１つの例では、少なくとも１種の上記したオートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子、又は該ｍｉＲＮＡ分子を生体細胞内で産生可能なベクターを有効成分として含有する。また、オートファジー調節剤のさらなる一例では、少なくとも１種の上記したオートファジー調節ｍｉＲＮＡ分子を阻害する核酸分子、又は該核酸分子を生体細胞内で産生可能なベクターを有効成分として含有する。このような調節剤は、例えば、オートファジーを促進する調節剤として好ましく使用し得る。オートファジーを促進する調節剤は、オートファジーの調節、特に促進が望まれる疾患の治療剤として有用である。そのような疾患の具体例としては、悪性腫瘍、神経変性疾患（多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、シヌクレイン病、鉄蓄積性神経変性病等）、アミロイドーシスなどのオートファゴソームの異常が関与する疾患を挙げることができる。

[0043] オートファジー調節ｍｉＲＮＡを阻害する核酸分子は、例えば、阻害対象のｍｉＲＮＡの少なくとも一部（5～10塩基程度以上）と相補的な配列を含む

核酸分子であり得る。本発明ではこのような核酸分子を「ｍｉＲＮＡに対するアンチセンス核酸分子」という。核酸は、ＲＮＡでもＤＮＡでもよく、また、ＰＮＡやＬＮＡ等の人工核酸であってもよい。また、アンチセンス核酸分子には、ｓｉＲＮＡやｓｈＲＮＡなども包含される。

[0044] ｍｉＲＮＡ等の小分子核酸を生体に送達する手段は公知である。例えば、エキソソームを模倣したリポソームに小分子核酸を封入する方法、コラーゲンとの複合体として徐放化させる方法、ＲＮＡの糖部分のＯ（酸素）をＳ（硫黄）で置き換えた2'-F、2'-0-メチル、2'-0-メトキシエチルに修飾した化学修飾体の利用、などの方法により、生体内での安定性を高めて送達することができる。

[0045] オートファジー調節剤に含まれ得るベクターは、プラスミドベクターでもウイルスベクターでもよい。いずれもそれ自体は核酸医薬の分野において公知の技術である。

[0046] オートファジー調節剤を疾患の治療に用いる場合、投与量は、疾患の状態、症状、患者の年齢・体重等に応じて適宜設定することができる。例えば、有効成分量として、体重１ｋｇ当たり0.1μg～1g程度、又は1μg～100mg程度を、１回で又は数回に分けて投与することができる。投与経路は、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、静脈内、直腸内等への非経口投与が好ましいが、製剤に採用する送達手段次第では経口投与も可能である。全身投与でもよいし、病変部近傍に局所投与してもよい。

[0047] オートファジー調節剤の剤形は特に限定されず、各投与経路及び採用する送達手段に応じて、薬剤的に許容される担体、希釈剤、賦形剤等の添加剤を上記の有効成分と適宜混合させて製剤することができる。

[0048] また、オートファジー調節ｍｉＲＮＡは、オートファジー関連疾患の診断マーカーとして利用可能であり、オートファジー関連疾患のスクリーニング検査等の検査・診断、診断補助に活用できる。「オートファジー関連疾患」とは、オートファジーの異常（促進又は抑制）により引き起こされる疾患であり、オートファジーの促進により治療可能な疾患とオートファジーの抑制

により治療可能な疾患の両者が包含される。本発明における具体例のひとつとして、上記したオートファジーの促進が望まれる疾患の例である神経変性疾患を挙げることができる。また、オートファジーの制御は細胞内におけるファゴソーム性の膜の制御でもあるので、本発明のオートファジー調節ｍｉＲＮＡは、膜形成制御の機能から、細胞膜に存在する分子の異常によって発症する疾患の診断や治療にも利用することができる。代表的な膜分子としては、受容体を挙げることができる。

[0049] オートファジー関連疾患の検出では、被検者から分離された試料を用いて、少なくとも１種のオートファジー調節ｍｉＲＮＡを測定すればよい。健常者のオートファジー調節ｍｉＲＮＡ値と比較して、被検者のオートファジー調節ｍｉＲＮＡの測定値が有意に高い又は低い場合に、該被検者のオートファジー関連疾患が検出される。例えば、オートファジー経路に対し抑制的に作用するオートファジー調節ｍｉＲＮＡの測定値が被検者において高値である場合、該被検者は、オートファジーの抑制により生じる疾患、例えば神経変性疾患に罹患している可能性があると判断することができる。

[0050] 測定するオートファジー調節ｍｉＲＮＡは１つだけでもよいし、複数（例えば、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ又はそれ以上）のオートファジー調節ｍｉＲＮＡを測定してもよい。複数のオートファジー調節ｍｉＲＮＡを測定した結果、一部が健常者ｍｉＲＮＡ値よりも高く、残りが健常者ｍｉＲＮＡ値よりも低く検出された場合には、例えば、健常者ｍｉＲＮＡ値との間で有意差があったｍｉＲＮＡの数が多い方に従って測定結果を判断してもよい。具体的には、高値であったｍｉＲＮＡのうち健常者ｍｉＲＮＡ値と有意差があったｍｉＲＮＡが２つで、低値であったｍｉＲＮＡのうち健常者ｍｉＲＮＡ値と有意差があったｍｉＲＮＡが１つであった場合には、当該被検者ではオートファジーが抑制状態にあり、オートファジーの抑制により生じる疾患に罹患している可能性があると判断することができる。

[0051] 健常者のオートファジー調節ｍｉＲＮＡ値は、複数（できる限り多数であ

ることが好ましい）の健常者を対象にオートファジー調節ｍｉＲＮＡ値を測定し、得られたｍｉＲＮＡ量測定値の平均値を算出して、健常基準値として定めることができる。本発明の検出方法の実施においては、予め定められた健常基準値を用いることができる。

[0052] 健常基準値に加えて、同様の手順により疾患基準値を定めることも可能である。疾患基準値は、オートファジー調節ｍｉＲＮＡの低下により引き起こされる疾患の基準値である「低値基準値」と、オートファジー調節ｍｉＲＮＡの上昇により引き起こされる疾患の基準値である「高値基準値」の２種類を設定し得る。例えば、オートファジー経路に対し抑制的に作用するオートファジー調節ｍｉＲＮＡを測定対象とする場合、低値基準値は、オートファジーの促進により引き起こされる疾患の基準値として、また、高値基準値は、オートファジーの抑制により引き起こされる疾患の基準値として使用し得る。

[0053] オートファジー関連疾患の検出に供する試料としては、血液（全血、血漿、血清）、唾液、涙液、鼻汁、尿、リンパ液、脳脊髄液等の体液試料の他、生検や手術で採取された病変部等の組織試料、病理標本及び組織試料の抽出物等を用いることができる。

[0054] 核酸の測定方法自体は周知である。例えば、プライマーを用いた核酸増幅法による測定法としては、リアルタイムPCRやNASBA法等を挙げることができる。また、プローブを用いた測定法としては、ノーザンブロット、サザンブロットの他、固相化プローブを用いたアレイ解析法等を挙げることができる。試料が組織標本の場合、in situ PCRやin situハイブリダイゼーション法を用いることができる。本発明の方法では周知のいずれの測定法を用いてもよい。リアルタイムPCRによる測定を一例として説明すると、例えば、試料から抽出したRNAの3'末端にプライマーサイトを導入してcDNAを合成した後、各種ｍｉＲＮＡに特異的なプライマーを用いてリアルタイムPCRを行なうことにより、ｍｉＲＮＡの有無およびその量を測定することができる。また、ｍｉＲＮＡの測定のためのキット（例えばApplied Biosystems社のTaqMan Probe

microRNA Assays）が市販されており、そのような市販品を用いて測定を実施することができる。なお、本発明において、「測定」には、検出、定量、半定量が包含される。

[0055] なお、本願発明のｍｉＲＮＡの選定方法により選定されたｍｉＲＮＡは、医薬品の選定にも利用することができる。例えば、本願発明の選定方法により選定されたｍｉＲＮＡそれ自体、当該ｍｉＲＮＡの標的遺伝子、又は、当該ｍｉＲＮＡの標的遺伝子の転写翻訳産物を調節する物質を治療標的分子として選定することにより、生体内反応経路の異常により引き起こされる疾患の治療薬の選定に利用することが可能である。ここで、選定される物質としては、低分子化合物、ｓｉＲＮＡ、核酸などが挙げられ、特に限定されるものではない。また、生体内反応経路の異常により引き起こされる疾患としても、特に限定されるものではないが、例えば、前記神経変性疾患などのオートファジー関連疾患等が挙げられる。

実施例

[0056] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0057] 実施例１：オートファジー因子を制御するｍｉＲＮＡの抽出

オートファジーは複数の遺伝子が協調して発動されることから、発動のための重要因子として、以下の１８種の遺伝子を選択した。

ATG3 (autophagy related 3)

ATG5 (autophagy related 5)

ATG7 (autophagy related 7)

ATG9A (autophagy related 9A)

ATG16L1 (autophagy related 16-like 1)

AMBRA1 (activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1)

BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2)

BECN1 (beclin 1, autophagy related)

GABARAP (GABA(A) receptor-associated protein)

GABARAPL1 (GABA(A) receptor-associated protein like 1)

GABARAPL2 (GABA(A) receptor-associated protein-like 2, GATE-16)

MAP1LC3A (microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3))

NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1)

PIK3C3 (phosphoinositide-3-kinase, class 3)

SQSTM1 (sequestosome 1, p62)

ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1)

ULK2 (unc-51 like autophagy activating kinase 2)

ZFYVE1 (ZFYVE1 zinc finger, FYVE domain containing 1, DFCP1)

[0058] 次に、これらの個々の遺伝子に結合性を有するｍｉＲＮＡを、ｍｉＲＮＡ標的予測ウェブツールであるｍｉＲｍａｐ（Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 22 11673-11683, http://mirmap.ezlab.org/）を用いて抽出した。１遺伝子当たりおおむね２００～５００種のｍｉＲＮＡが抽出された。各遺伝子について、結合予測上位５０種のｍｉＲＮＡをさらに抽出し、１８種の遺伝子全体でのべ９００種（重複あり）のｍｉＲＮＡを母集団とした。

[0059] オートファジーは複数の遺伝子が協調して発動されることから、共通したｍｉＲＮＡが遺伝子発現に関与するはずという前提で、少なくとも２種の遺伝子に共通するｍｉＲＮＡを抽出することとし、得られた９００種のｍｉＲＮＡ集団から１８遺伝子間で重複性のソートを行い、これらがオートファジー因子を制御してオートファジーを調節するｍｉＲＮＡになると判断した。

[0060] その結果、表１（上掲）に示した１９７種のｍｉＲＮＡがオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡとして特定された。すなわち、のべ９００種の母集団から約１/４以下に絞り込むことができ、特定されたｍｉＲＮＡは、最大で７種のオートファジー関連遺伝子に共通していた。

[0061] 実施例２：オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡのカバー率の分析

オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡはオートファジー関連遺伝子を標的と

すると予測されたｍｉＲＮＡ群から選ばれたので、個別のオートファジー関連遺伝子の標的ｍｉＲＮＡの中に高い割合で含まれなくてはｍｉＲＮＡならないはずである。これを検証するために、１８種のオートファジー関連遺伝子を標的とする群において、それぞれ上位５０種の中に存在するオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの割合を算出した。その結果、表２に示すように、実施例１で特定したオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡは、オートファジー関連遺伝子のｍｉＲＮＡ群には２８～８０％の割合で含まれ、平均値は５３．９％であった。

[0062] 他方、対照として、オートファジーが機能していない状況の遺伝子に対するオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの存在比を調べた。仮説として、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡはオートファジー系以外のイベントには関与が高くないはずであるから、存在比は上記の５３．９％をはるかに下回るはずである。神経変性疾患を例にとると、神経細胞内にはオートファジーで分解されないと想定されるタンパク質凝集物が蓄積することから、これら細胞内凝集物をコードする遺伝子は、オートファジーの機能不全とともに生合成のネガティブフィードバックがかからないなど、凝集体を形成するタンパク質遺伝子はオートファジーの正常な制御から逸脱していると考えることができる。それゆえ、これらの遺伝子を標的とするｍｉＲＮＡも正常に作動していないと考えられる。同一細胞内で作動するｍｉＲＮＡ群は同一であることを前提とすると、凝集体タンパク質遺伝子に作用するｍｉＲＮＡ群とオートファジー関連遺伝子に作用するｍｉＲＮＡ群は異なるはずである。言い換えると、凝集体タンパク質遺伝子を標的とするｍｉＲＮＡ群とオートファジー関連因子を標的とするｍｉＲＮＡ群の共通性は低いはずで、すなわち、凝集体タンパク質遺伝子に作用するｍｉＲＮＡ群の中のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの存在率は低いことになる。

[0063] 上記の仮説を確かめるために、神経細胞内凝集体タンパク質として、アルツハイマー病、筋萎縮性側索性硬化症（ＡＬＳ）、多系統萎縮症（ＭＳＡ）などで病的な凝集が報告されている、APP (amyloid beta (A4) precursor pr

otein）、FUS（fused in sarcoma, translocated in liposarcoma protein（TLS））、LRRK2　（leucine-rich repeat kinase 2）、OPTN（optineurin）、SNCA（synuclein, alpha）、SOD1（superoxide dismutase 1, soluble）、TARDBP（TAR DNA binding protein, TDP-43）、UBQLN2（ubiquilin 2）、VCP（valosin containing protein）の９種の遺伝子に対して、実施例１と同様に、個々の遺伝子に結合性を有するｍｉＲＮＡを、ｍｉＲＮＡ標的予測ウェブツールであるｍｉＲｍａｐを用いて抽出し、上位５０種の中に存在するオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの割合を算出した。その結果、表３に示すように、実施例１で特定したオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡは、細胞内凝集体タンパク質遺伝子のｍｉＲＮＡ群には８～２６％の割合で含まれ、平均値は１４．６％であり、オートファジー関連遺伝子における存在比の５３．９％をはるかに下回る結果であった。

[0064]　以上のとおり、本発明に係る生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法では、生体内反応経路で機能する因子を制御する主要なｍｉＲＮＡを抽出同定するのに妥当な手法であることを示された。また同時に、実施例１で特定したオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡは、神経細胞内蓄積性タンパク質関連遺伝子の場合（オートファジーが機能していない遺伝子と想定）に比べてオートファジー関連遺伝子の場合の存在比が明らかに大きく、神経変性疾患には、オートファジー制御が大きく関与することが示唆された。

[0065]

[表2]

略号	オートファジー因子	NCBI Gene ID	オートファジー因子制御miRNAの存在比
ATG3	autophagy related 3	ID: 64422	38%
ATG5	autophagy related 5	ID: 9474	28%
ATG7	autophagy related 7	ID: 10533	74%
ATG9A	autophagy related 9A	ID: 79065	64%
ATG16L1	autophagy related 16-like 1	ID: 55054	58%
AMBRA1	activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	ID: 55626	50%
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	ID: 596	50%
BECN1	beclin 1, autophagy related	ID: 8678	38%
GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein	ID: 11337	52%
GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	ID: 23710	47%
GABARAPL2	GABA(A) receptor-associated protein-like 2, GATE-16	ID: 11345	40%
MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1light chain 3alpha (LC3)	ID: 84557	66%
NBR1	neighbor of BRCA1gene 1	ID: 4077	64%
PIK3C3	phosphoinositide-3-kinase, class 3	ID: 5289	42%
SQSTM1	sequestosome 1, p62	ID: 8878	64%
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1	ID: 8408	80%
ULK2	unc-51 like autophagy activating kinase 2	ID: 9706	50%
ZFYVE1	ZFYVE1 zinc finger, FYVE domain containing 1, DFCP1	ID: 53349	66%
平均値			53.9%

[0066] [表3]

略号	神経細胞内蓄積性因子	NCBI Gene ID	オートファジー因子制御miRNAの存在比
APP	amyloid beta (A4) precursor protein	ID: 351	22%
FUS	fused in sarcoma, translocated in liposarcoma protein (TLS)	ID: 2521	22%
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	ID: 120892	8%
OPTN	optineurin	ID: 10133	16%
SNCA	synuclein, alpha	ID: 6622	20%
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	ID: 6647	8%
TARDBP	TAR DNA binding protein, TDP-43	ID: 23435	14%
UBQLN2	ubiquilin 2	ID: 29978	26%
VCP	valosin containing protein	ID: 7415	24%
平均値			14.6%

[0067] 実施例３：神経変性疾患の病巣組織におけるオートファジー関連因子の発現

変動

正常対照に加え、神経変性疾患（ＡＬＳ及びＭＳＡ）の病巣組織である剖検後の疾患患者の脳ＦＦＰＥ（ホルマリン固定パラフィン包埋切片）におけるオートファジー関連因子の変動を、免疫組織化学によって染色し、光学顕微鏡で観察した。オートファジー関連因子の検出には市販抗体（AMBRA1（SDIX, Newark, DE, USA）; GABARAP/GABARAPL1 (MBL); GATE-16 (MBL; ProteinTech Group, Inc.,USA); NBR1 (ProteinTec Group, Inc., IL, USA)）を用い、アビジン・ビオチン複合体Avidin-Biotin Complex 法（ＡＢＣ法）を用いて染色した。検索部位としては、ＡＬＳ及び正常対照の脊髄、ＭＳＡ及び正常対照の橋（各５例）を用いた。

[0068] その結果、表４のとおり、６種のオートファジー関連因子で発現変動が観察され、オートファジー異常が起きていることが示唆された。ＦＦＰＥにおける変動は、オートファジー因子（タンパク質）の存在状況を検出しており、増大あるいは減少のどちらの変動でもオートファジー経路の抑制や遮断などの異常が起きていることが示唆される。ＡＬＳでは神経細胞内にTARDBP(TDP-43)やSOD1など、ＭＳＡではalpha-synucleinなどの病的なタンパク質凝集体の存在が知られており、これらの病巣部位ではオートファジー因子の制御に異常が起きていることが示唆された。

[0069] [表4]

略号	標的となるオートファジー因子遺伝子	発現変動	被験FFPE
AMBRA1	activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	あり(減少)	ALS
GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein	あり(減少)	MSA
GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein-like 1	あり(減少)	MSA
GABARAPL2	GABA(A) receptor-associated protein-like 2, GATE-16	あり(減少)	MSA
NBR1	neighbor of BRCA1gene 1	あり(増大)	MSA

[0070] 実施例４：オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの神経変性病巣における存在

オートファジーの異常が起きていると想定される神経変性疾患部位におけるｍｉＲＮＡのプロファイリングを行った。

[0071] 確定診断された多系統萎縮症（ＭＳＡ）患者の小脳病巣部位、確定診断された筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）の患者の脳運動野病巣部位、及び健常対照群として脳の非病変部位を、剖検後に採取し、１０％ホルマリンにて固定し、パラフィンにて包埋し、ＦＦＰＥ標本とした。ＦＦＰＥ標本（５ｘ５ｍｍ、５μｍ、２～４枚）を材料とし、ＭＳＡ患者５例、ＭＳＡ非病変対照３例、ＡＬＳ患者３例、ＡＬＳ非病変対照３例の標本から、それぞれＲＮＡ抽出後、マイクロアレイによるｍｉＲＮＡ分析を行った。

[0072] マイクロアレイは３Ｄ-ｇｅｎｅチップ（東レ（株）製）を用い、メーカー指定のｍｉＲＮＡ抽出液並びにハイブリダイゼーション試薬セットとHuman miRNA Oligo chip（データベースmiRBase Release17.0から選定したヒト約１，８００種のｍｉＲＮＡプローブを搭載）で行い、シグナル値３０以上を有効なシグナルとして検出した。その結果、ＭＳＡでは５４１種、ＡＬＳでは５１０種のｍｉＲＮＡが評価対象となった。

[0073] 次に検索群となるｍｉＲＮＡは、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡ群１９７種（表１）と表２に記載した神経細胞内蓄積性因子を制御するｍｉＲＮＡ群とした。後者の神経細胞内蓄積性因子を制御するｍｉＲＮＡ群の特定は、実施例１と同一の手法によるもので、すなわち、APP (amyloid beta (A4) precursor protein)、FUS (fused in sarcoma, translocated in liposarcoma protein (TLS))、LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2)、OPTN (optineurin)、SNCA (synuclein, alpha)、SOD1 (superoxide dismutase 1, soluble)、TARDBP (TAR DNA binding protein, TDP-43)、UBQLN2 (ubiquilin 2)、VCP (valosin containing protein) の９種の遺伝子に対して、個々の遺伝子に結合性を有するｍｉＲＮＡを、ｍｉＲＮＡ標的予測ウェブツールであるｍｉＲｍａｐを用いて抽出し、それぞれ上位５０種（９種の遺伝子について、のべ４５０種）のｍｉＲＮＡで２種以上の遺伝子で共通するｍｉＲＮＡを蓄積性因子制御ｍｉＲＮＡ群として抽出し、５５種のｍｉＲＮＡを特定した。

[0074] 検証すべき仮説としては、神経変性部位ではタンパク質凝集体が存在する

という事実から、これらのタンパク質の生成を制御する「蓄積性因子制御ｍｉＲＮＡの発現は低いはず」、一方、オートファジーは抑制されていることから「オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの発現は高いはず」、という二つの命題と考えられる。これを検証するために、ＡＬＳとＭＳＡの病巣部位で発現上昇した上位５０種のｍｉＲＮＡ群と、発現低下した上位５０種のｍｉＲＮＡ群におけるオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡと蓄積性因子制御ｍｉＲＮＡの存在比率を求めた。

[0075] その結果、表５に示すように、ＡＬＳでもＭＳＡでもオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡは発現上昇したｍｉＲＮＡ群に多く存在しており、結果、オートファジーは抑制される方向が示された。他方、蓄積性因子制御ｍｉＲＮＡは発現低下したｍｉＲＮＡ群に多い傾向があったので、神経細胞内蓄積性因子は生成される方向であることが示された。このことは、蓄積性因子ｍＲＮＡは一定レベルで発現する環境であるが、他方、オートファジー系因子ｍＲＮＡの発現は抑えられる環境にあり、結果として、細胞内ではオートファジー機能の低下が惹起されて蓄積性因子が凝集して蓄積する可能性を示唆している。すなわち、神経変性疾患における神経細胞内凝集体の生成という病理学的事象がｍｉＲＮＡが関与したオートファジーの異常と関連していることを強く示唆している。

[0076] [表5]

病理標本	オートファジー因子制御miRNA		神経細胞内蓄積性因子制御miRNA	
	発現上昇したmiRNA上位50種中の存在比	発現低下したmiRNA上位50種中の存在比	発現上昇したmiRNA上位50種中の存在比	発現低下したmiRNA上位50種中の存在比
ALS脳病変部FFPE	22/50(44%)	7/50(14%)	3/50(6%)	4/50(8%)
MSA小脳病変部FFPE	22/50(44%)	8/50(16%)	1/50(2%)	2/50(4%)

[0077] 実施例５：オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの組織選択性

ｍｉＲＮＡは生体内で臓器や血液中にも広く存在し、血中ｍｉＲＮＡは疾

患関連バイオマーカーとして、検査診断への用途も考えられている。しかしながら、オートファジーは細胞内におけるタンパク質のリサイクルシステムとも言うべき仕組みであるので、実施例１で得られたオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡ群は細胞内に存在することが多いはずである。これを検証するために、臓器中と血中のｍｉＲＮＡ群におけるオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの存在比率を調べた。

[0078] 神経変性組織中のｍｉＲＮＡは実施例４のとおり、ＭＳＡ患者５例、ＭＳＡ非病変対照３例、ＡＬＳ患者３例、ＡＬＳ非病変対照３例の標本から同定された。血漿中のｍｉＲＮＡは、ＡＬＳ患者６例（男性４＋女性２、62.8±8.5歳）、ＭＳＡ患者６例（男性３＋女性３、58.8±1.5歳）、健常者６例（男性３＋女性３、60.6±1.8歳）に対して、本人の同意の下に血液を上腕静脈から２０ｍＬの末梢血を採取し、速やかに４℃、３０００ｒｐｍで１０分間、遠心処理し、上清を０．６ｍＬずつポリプロピレンチューブに分注して－８０℃で凍結保存した。各検体からＲＮＡを抽出し、実施例３と同様にマイクロアレイによるｍｉＲＮＡ分析を行った。評価対象のｍｉＲＮＡは、グルーバルノーマライゼーション後のシグナル値３０以上を有意な発現をするｍｉＲＮＡとした。その結果、ＭＳＡ脳病巣部位では５４１種、ＡＬＳ脳病巣部位では５１０種、ＭＳＡ患者血漿では１８１種、ＡＬＳ患者血漿では１８９種のｍｉＲＮＡがそれぞれ評価対象となった。

[0079] 次に、これらの組織由来ｍｉＲＮＡ群において、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが存在する比率（共通性）を求めたところ、表６に示すように、実施例１で特定されたオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡは血漿中よりは脳病巣組織中に明らかに多く、神経細胞内に多く存在することが強く示唆された。このことは、実施例１で特定したオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが病変部神経細胞に選択的に存在することから、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡ並びにその標的遺伝子が、ＡＬＳやＭＳＡなどの神経変性疾患の治療標的分子になり得ることを示している。

[0080]

[表6]

疾患と分析部位		オートファジー因子制御miRNAの共通性
ALS	脳病変部	59/197 (29.9%)
	血漿	18/197 (9.1%)
MSA	小脳病変部	60/197 (30.5%)
	血漿	18/197 (9.1%)

[0081] また、１９７種のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡのうち、ＡＬＳとＭＳＡの病巣部位で検出されたｍｉＲＮＡ群は表７－１及び７－２に示した６３種であり、神経変性疾患の検査診断や治療標的分子の選定の際に、好んで用いることができる。

[0082]

[表7-1]

整理番号	頻度	ALS FFPE	MSA FFPE	ALS血漿	MSA血漿
1	7	hsa-miR-4685-5p	hsa-miR-4685-5p		
2	5	hsa-miR-3619-5p	hsa-miR-3619-5p		
3	5	hsa-miR-4763-3p	hsa-miR-4763-3p		
4	5	hsa-miR-612	hsa-miR-612		
6	4	hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-1207-5p
7	4	hsa-miR-1343	hsa-miR-1343		
11	4	hsa-miR-4688	hsa-miR-4688		
15	4	hsa-miR-762	hsa-miR-762	hsa-miR-762	hsa-miR-762
19	3	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-3p	
27	3	hsa-miR-1972	hsa-miR-1972		
34	3	hsa-miR-3187-5p	hsa-miR-3187-5p		
35	3	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-330-5p		
37	3	hsa-miR-3652	hsa-miR-3652	hsa-miR-3652	hsa-miR-3652
38	3	hsa-miR-370	hsa-miR-370	hsa-miR-370	hsa-miR-370
39	3	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-423-5p
41	3	hsa-miR-4270	hsa-miR-4270	hsa-miR-4270	hsa-miR-4270
42	3	hsa-miR-4430	hsa-miR-4430		
44	3	hsa-miR-4505	hsa-miR-4505		
45	3	hsa-miR-4514	hsa-miR-4514		
46	3	hsa-miR-4530	hsa-miR-4530		
49	3	hsa-miR-4656	hsa-miR-4656		
50	3	hsa-miR-4690-5p	hsa-miR-4690-5p		
52	3	hsa-miR-4726-3p	hsa-miR-4726-3p		
53	3	hsa-miR-4731-5p	hsa-miR-4731-5p		
54	3	hsa-miR-4736	hsa-miR-4736		
55	3	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-3p
63	3		hsa-miR-650		
65	3	hsa-miR-665	hsa-miR-665		hsa-miR-665
69	3	hsa-miR-940	hsa-miR-940	hsa-miR-940	hsa-miR-940
74	2	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1260b	hsa-miR-1260b
92	2	hsa-miR-23c	hsa-miR-23c		
95	2	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-28-5p
96	2	hsa-miR-2861	hsa-miR-2861	hsa-miR-2861	hsa-miR-2861
101	2	hsa-miR-3126-5p	hsa-miR-3126-5p	hsa-miR-3126-5p	hsa-miR-3126-5p
107	2	hsa-miR-3194-5p			
108	2	hsa-miR-320e	hsa-miR-320e		hsa-miR-320e
109	2		hsa-miR-342-5p		
111	2	hsa-miR-3609	hsa-miR-3609		

[0083]

[表7-2]

整理番号	頻度	ALS FFPE	MSA FFPE	ALS血漿	MSA血漿
112	2	hsa-miR-3663-5p	hsa-miR-3663-5p	hsa-miR-3663-5p	hsa-miR-3663-5p
117	2	hsa-miR-3714		hsa-miR-3714	hsa-miR-3714
125	2	hsa-miR-4290	hsa-miR-4290	hsa-miR-4290	hsa-miR-4290
128	2	hsa-miR-4419b	hsa-miR-4419b		
129	2	hsa-miR-4435	hsa-miR-4435		
130	2	hsa-miR-4436b-3p	hsa-miR-4436b-3p		
131	2	hsa-miR-4446-3p	hsa-miR-4446-3p		
135	2	hsa-miR-4478	hsa-miR-4478		
137	2	hsa-miR-4486	hsa-miR-4486		
142	2	hsa-miR-4538	hsa-miR-4538		
143	2	hsa-miR-4651	hsa-miR-4651		
145	2	hsa-miR-4664-5p	hsa-miR-4664-5p		
146	2	hsa-miR-4665-5p	hsa-miR-4665-5p		
147	2	hsa-miR-4667-3p	hsa-miR-4667-3p		
148	2	hsa-miR-4667-5p	hsa-miR-4667-5p		
149	2	hsa-miR-4689	hsa-miR-4689		
151	2		hsa-miR-4700-5p		
152	2	hsa-miR-4706	hsa-miR-4706		
156	2	hsa-miR-4739	hsa-miR-4739		
157	2	hsa-miR-4741	hsa-miR-4741		
161	2	hsa-miR-4756-5p	hsa-miR-4756-5p		
162	2	hsa-miR-4763-5p	hsa-miR-4763-5p		
183	2			hsa-miR-615-5p	hsa-miR-615-5p
188	2	hsa-miR-670	hsa-miR-670		
191	2	hsa-miR-874	hsa-miR-874	hsa-miR-874	

[0084] 実施例６　脳神経の鉄蓄積による変性におけるオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの関与

脳神経変性の機序のひとつとして、細胞内の鉄蓄積による変性（Aceruloplasminemia、Neuroferritinopathy、Neurodegeneration with iron accumulationなど）が知られている。遷移金属である鉄はヘモグロビンに含まれるように、生体内で種々の酸化還元反応に関与して細胞機能の維持に必須の重要な金属元素である。その一方で、活性酸素やフリーラジカルの活性化を促進し、結果としてアポトーシス、細胞膜破壊、蛋白凝集も促進するため、過剰な鉄が細胞内に沈着すると細胞毒性を示すと考えられている。この鉄蓄積による細胞変性においてもオートファジーの異常があり、それに関与する遺伝子

はWD repeat domain 45 (WDR45)とATPase type 13A2 (ATP13A2)であることが最近報告されている（Levi S, Finazzi D.,Front Pharmacol. 2014; 5(99): 1-20）。

[0085] そうであれば、これらWDR45遺伝子とATP13A2遺伝子もオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの制御を受けている可能性が高いと推察される。そこで、これら２つの遺伝子を標的とするｍｉＲＮＡをｍｉＲＮＡ標的予測ウェブツールであるmiRmapで抽出し、その上位５０種のｍｉＲＮＡに含まれる１９７種のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡ（表１）の存在比を算出した。この仮説が正しければ、WDR45遺伝子とATP13A2遺伝子を標的とするｍｉＲＮＡ群とオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡ群の間には高い重複性があるはずである。比較対象の遺伝子として、同様に鉄蓄積による神経変性の関連因子として報告されているCeruloplasmin (CP) 、Ferritin light chain (FTL)、Transferrin (TF)、solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (SLC40A1)、Pantothenate kinase2 (PANK2)を選定し、同じ手法でオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの存在比を算出した。この５種の遺伝子では、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの存在比は低いはずである。

[0086] 結果は表８に示したように、オートファジー関連因子であるWDR45を標的とするｍｉＲＮＡ群とオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡ群との間で重複する共通性は50%、ATP13A2では46%で、表２のオートファジー因子の場合の存在比（平均53.9%）と同程度であった。一方、比較対象遺伝子のCP、FTL、TF、SLC40A1、PANK2を標的とするｍｉＲＮＡ群では、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの存在比（共通性）は20数%以下であり、WDR45とATP13A2の比率よりもかなり低かった。

[0087] この結果は、WDR45とATP13A2もオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの制御を受けている可能性が高いこと、また本発明のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが鉄蓄積時のオートファジーにも関与することを示している。

[0088]

[表8]

略号	鉄蓄積による脳神経変性に関連する因子	NCBI Gene ID	オートファジー因子制御miRNAの存在比
WDR45	WD repeat domain 45 (鉄蓄積オートファジー関連因子)	ID: 11152	50% (6/12)*
ATP13A2	ATPase type 13A2 (鉄蓄積オートファジー関連因子)	ID: 23400	46% (23/50)
CP	Ceruloplasmin	ID: 1356	20%(10/50)
FTL	Ferritin light chain	ID: 2512	24%(12/50)
TF	Transferrin	ID: 7018	20%(10/50)
SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	ID: 30061	14%(7/50)
PANK2	Pantothenate kinase2	ID: 80025	8%(4/50)

*WDR45を標的とするmiRNAはmiRmapでは12種しか同定されなかった。

[0089] 実施例７　オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの標的遺伝子の疾患関連性解析

オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが標的とする遺伝子群は、オートファジー異常が病態の原因と考えられる疾患に深く関与するはずである。神経変性疾患の病理像では、神経細胞内に凝集体が多く観察され、何らかのオートファジー異常が起きていることが強く推察されている。

[0090] そこで、表１－１に記載したオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡのうち、上位5種（hsa-miR-4685-5p、hsa-miR-3619-5p、hsa-miR-4763-3p、hsa-miR-612、hsa-miR-939-3p、hsa-miR-1207-5p）を選び、これらが標的とする遺伝子群を調べ、この遺伝子群の機能（Gene ontology）が、神経変性の病態に強く関連するか否かをバイオインフォマティクスの手法で検討した。５種のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの標的遺伝子の抽出は、ｍｉＲＮＡ標的予測ウェブツールであるmiRmapを用い、各ｍｉＲＮＡと結合する可能性が高い順に上位５０種の標的遺伝子を選択し、5種合計で２５０種の標的遺伝子が抽出された。次に、これら２５０種の標的遺伝子のうち９６遺伝子が重複していたことから、この９６遺伝子は5種のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡの共通標的となっていると仮定した。すなわち、この９６遺伝子が関与する疾患

は、オートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが高い確率で関わる疾患であると考えることができる。この仮説の評価結果となるGene ontologyと関連疾患候補の推定は、統合的バイオインフォマティクス解析ができるウェブ・ツールMetaCore（ThomsonReuter/GeneGo）を用いて行った。

[0091] その結果、表９に示すように、Gene ontologyは神経細胞機能に関するプロセスが多く検出された。また表１０に示すように、上位１０種に関連性の高い疾患として精神神経関連疾患が多く検出された。これらのことは、本発明における5種のオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが標的とする遺伝子は、神経系機能に大きく影響し、その結果、神経系疾患に強く関与していること、逆に神経系の病態発現に強く関与するオートファジー異常には本発明で同定したオートファジー因子制御ｍｉＲＮＡが強く関与することを示している。

[0092] [表9]

#	GOプロセス	p-value	FDR
1	peptidyl-threonine phosphorylation （ペプチド性スレオニンのリン酸化）	1.368E-08	2.675E-05
2	peptidyl-threonine modification （ペプチド性スレオニンの修飾）	2.184E-08	2.675E-05
3	negative regulation of cell projection organization （細胞突起構成の抑制的制御）	6.177E-08	4.528E-05
4	desmosome organization （デスモゾーム構成）	1.048E-07	4.528E-05
5	positive regulation of dense core granule biogenesis （シナプス前終末粒子生合成の促進的制御）	1.090E-07	4.528E-05
6	cell-cell signaling （細胞間シグナル伝達）	1.244E-07	4.528E-05
7	synaptic transmission （シナプス伝達）	1.294E-07	4.528E-05
8	activation of phospholipase C activity （ホスホリパーゼC活性の活性化）	1.515E-07	4.639E-05
9	negative regulation of cellular process （細胞内プロセスの抑制的制御）	2.913E-07	7.930E-05
10	positive regulation of phospholipase C activity （ホスホリパーゼC活性の促進的制御）	3.576E-07	8.360E-05

p-value:p値、FDR:false discovery rate

[0093]

[表10]

NO.	関連性疾患	p-value	FDR
1	Delirium (せん妄)	2.211E-06	5.163E-04
2	Bipolar Disorder (双極性障害)	2.586E-06	5.163E-04
3	Affective Disorders, Psychotic (精神障害)	2.703E-06	5.163E-04
4	Confusion (錯乱)	3.855E-06	5.523E-04
5	Alcohol Withdrawal Delirium (アルコール離脱せん妄)	1.792E-05	1.711E-03
6	Dermatitis, Irritant (刺激性皮膚炎)	1.792E-05	1.711E-03
7	Mood Disorders (気分障害)	2.277E-05	1.864E-03
8	Borderline Personality Disorder (境界型人格障害)	3.911E-05	2.801E-03
9	Glioma (グリオーマ＝脳腫瘍)	1.305E-04	8.311E-03
10	Alcohol-Induced Disorders, Nervous System (アルコール性神経異常)	1.843E-04	8.737E-03

p-value: p値、FDR: false discovery rate

請求の範囲

[請求項1] １つの生体内反応経路で機能する複数の因子のそれぞれについて、該因子をコードするｍＲＮＡに結合すると予測されるｍｉＲＮＡ群を取得する第一工程、及び、

各因子に対して得られたｍｉＲＮＡ群の少なくとも２群に共通するｍｉＲＮＡを抽出する第二工程

を含む、前記生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法。

[請求項2] 生体内反応経路が、オートファジー経路、ユビキチン-プロテアソーム経路、ミトコンドリア制御経路、シグナル伝達経路又は代謝経路である請求項１記載の方法。

[請求項3] 複数の因子が、生体内反応経路を活性化する因子であり、前記生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡが、前記生体内反応経路を抑制するｍｉＲＮＡである、請求項１又は２記載の方法。

[請求項4] 複数の因子が、生体内反応経路を抑制する因子であり、前記生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡが、前記生体内反応経路を促進するｍｉＲＮＡである、請求項１又は２記載の方法。

[請求項5] 第一工程において、複数の因子のうちの１つの因子に対し１００種以下のｍｉＲＮＡをｍｉＲＮＡ群として取得する、請求項１ないし４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 第二工程において、ｍｉＲＮＡ群の少なくとも３群に共通するｍｉＲＮＡを抽出する、請求項１ないし５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 配列表の配列番号１～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなり、オートファジーを調節する活性を有するｍｉＲＮＡ分子。

[請求項8] 配列番号１～３１、３３～９２、及び、９４～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項７記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項9] 配列番号１～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４４～５６、５８～６６、６８～７０、７２～７５、７７、７９～８１、８４、８６～９２、９４～９７、９９～

１１２、１１５～１２６、１２８～１４０、１４２～１４８、１５０～１５６、１５８～１６３、１６５～１８２、１８４～１８６、１８８～１９０、１９３～１９５、及び、１９７～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項８記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項10] 配列番号１、４～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４５～５０、５２～５６、５８～６６、６８～７０、７２～７５、７７、７９～８１、８４、８６～９２、９４～９７、９９～１１２、１１５～１２６、１２８～１４０、１４２～１４８、１５０～１５３、１５５、１５６、１５８～１６３、１６５～１８２、１８４～１８６、１８８～１９０、１９３～１９５、及び、１９７～２０３のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項９記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項11] 配列番号１～７１のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項７記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項12] 配列番号１～３１、及び、３３～７１のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項１１記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項13] 配列番号１～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４４～５６、５８～６６、及び、６８～７０のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項１１記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項14] 配列番号１、４～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４５～５０、５２～５６、５８～６６、及び、６８～７０のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項１１記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項15] 配列番号１～１６のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項７記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項16] 配列番号１～８、及び、１２～１６のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項１５記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項17] 配列番号１、４～８、及び、１２～１６のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項１５記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項18] 配列番号１～５のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項７記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項19] 配列番号１、４、及び、５のいずれかに記載された塩基配列からなる請求項１８記載のｍｉＲＮＡ分子。

[請求項20] 請求項７ないし１９のいずれか１項に記載のｍｉＲＮＡ分子、又は、該ｍｉＲＮＡ分子を生体細胞内で産生可能なベクターを有効成分として含む、オートファジー調節剤。

[請求項21] オートファジーの抑制に用いられる請求項２０記載のオートファジー調節剤。

[請求項22] 請求項７ないし１９のいずれか１項に記載のｍｉＲＮＡ分子を阻害する核酸分子、又は、該核酸分子を生体内で産生可能なベクターを有効成分として含む、オートファジー調節剤。

[請求項23] 前記核酸分子は、ｍｉＲＮＡに対するアンチセンス核酸分子である請求項２２記載のオートファジー調節剤。

[請求項24] オートファジーの促進に用いられる請求項２２又は２３記載のオートファジー調節剤。

[請求項25] オートファジーの調節が望まれる疾患の治療剤である請求項２０ないし２４のいずれか１項に記載の剤。

[請求項26] 前記疾患が神経変性疾患又はアミロイドーシスである請求項２５記載の剤。

[請求項27] 前記神経変性疾患が、筋萎縮性側索硬化症、多系統萎縮症、アルツハイマー病、パーキンソン病、シヌクレイン病、又は鉄蓄積性神経変性病である請求項２６記載の剤。

[請求項28] 被検者から分離された試料中の、配列番号１～２０３に記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡの少なくとも１つを測定することを含む、オートファジー関連疾患の検出方法。

[請求項29] 配列番号１～３１、３３～９２、及び、９４～２０３に記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡの少なくとも１つを測定する、請求項２８記載の方法。

[請求項30] 配列番号１～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４４～５６、５８～６６、６８～７０、７２～７５、７７、７９～８１、８４、８６～９２、９４～９７、９９～１１２、１１５～１２６、１２８～１４０、１４２～１４８、１５０～１５６、１５８～１６３、１６５～１８２、１８４～１８６、１８８～１９０、１９３～１９５、及び、１９７～２０３に記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡの少なくとも１つを測定する、請求項２８または２９記載の方法。

[請求項31] 配列番号１、４～８、１２～１７、２０～２３、２７～３０、３３～３７、３９、４０、４２、４５～５０、５２～５６、５８～６６、６８～７０、７２～７５、７７、７９～８１、８４、８６～９２、９４～９７、９９～１１２、１１５～１２６、１２８～１４０、１４２～１４８、１５０～１５３、１５５、１５６、１５８～１６３、１６５～１８２、１８４～１８６、１８８～１９０、１９３～１９５、及び１９７～２０３に記載された塩基配列からなるｍｉＲＮＡの少なくとも１つを測定する、請求項２８または２９記載の方法。

[請求項32] 前記オートファジー関連疾患が神経変性疾患である請求項２８ないし３１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項33] 前記神経変性疾患が、筋萎縮性側索硬化症、多系統萎縮症、アルツハイマー病、パーキンソン病、シヌクレイン病、又は鉄蓄積性神経変性病である請求項３２記載の方法。

[請求項34] １つの生体内反応経路で機能する複数の因子のそれぞれについて、該因子をコードするｍＲＮＡに結合すると予測されるｍｉＲＮＡ群を取得する第一工程、及び、

各因子に対して得られたｍｉＲＮＡ群の少なくとも２群に共通する

ｍｉＲＮＡを抽出する第二工程

を含む、前記生体内反応経路を調節するｍｉＲＮＡの選定方法により選定されたｍｉＲＮＡを用いて、前記生体内反応経路の異常により引き起こされる疾患の治療薬を選定する方法。

[請求項35] 請求項３４に記載の方法により選定される、生体内反応経路の異常により引き起こされる疾患の治療薬。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/074055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K31/7105*(2006.01)i, *A61K31/711*(2006.01)i, *A61P21/00*(2006.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P25/16*(2006.01)i, *A61P25/28*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C12Q1/68*(2006.01)i
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)
C12N15/09, A61K31/7105, A61K31/711, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P43/00, C12Q1/68

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 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	PERSSON H et al., Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene, Cancer Res., 2007, Vol.71, p78-86 & Supplementary Material S4	7-19/1-6, 20-35
X/A	WO 2013/033640 A1 (ALLEGRO DIAGNOSTICS CORP.), 07 March 2013 (07.03.2013), table 6; SEQ ID NO:72 & EP 2751292 A1	7-19/1-6, 20-35
X/Y	FRANKEL LB et al., MicroRNA regulation of autophagy, Carcinogenesis, 2012, Vol.33, p.2018-2025	7-14,20-25, 35/1-6, 15-19,26-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 December, 2014 (08.12.14)	16 December, 2014 (16.12.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/074055

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAJIMA M et al., Role of MicroRNAs in the Regulation of Cytochrome P450s and Transcriptional Factors, YAKUGAKU ZASSHI, 2012, Vol.132, p.107-116	1-35

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０７４０５５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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.　C12N15/09, A61K31/7105, A61K31/711, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P43/00, C12Q1/68

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ)

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	関連する請求項の番号
X/A	PERSSON H et al., Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene, Cancer Res., 2007, Vol.71, p78-86 & Supplementary Material S4	7-19/1-6,20-35
X/A	WO 2013/033640 A1 (ALLEGRO DIAGNOSTICS CORP.) 2013.03.07, 表６、配列番号７２ & EP 2751292 A1	7-19/1-6,20-35

☑　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の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 ０８．１２．２０１４	国際調査報告の発送日 １６．１２．２０１４
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　４Ｎ　４８６８ 北田　祐介 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

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	関連する請求項の番号
X/Y	FRANKEL LB et al., MicroRNA regulation of autophagy, Carcinogenesis, 2012, Vol.33, p.2018-2025	7-14,20-25,35/1-6,15-19,26-34
Y	NAKAJIMA M et al., Role of MicroRNAs in the Regulation of Cytochrome P450s and Transcriptional Factors, YAKUGAKU ZASSHI, 2012, Vol.132, p.107-116	1-35