

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5931897号
(P5931897)

(45) 発行日 平成28年6月8日(2016.6.8)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

A 61 K 31/7088 ZMD
A 61 K 31/513
A 61 K 48/00
A 61 P 35/00
C 12 N 15/00

G

請求項の数 4 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-538930 (P2013-538930)
(86) (22) 出願日 平成23年11月11日 (2011.11.11)
(65) 公表番号 特表2014-500871 (P2014-500871A)
(43) 公表日 平成26年1月16日 (2014.1.16)
(86) 國際出願番号 PCT/US2011/060349
(87) 國際公開番号 WO2012/065049
(87) 國際公開日 平成24年5月18日 (2012.5.18)
審査請求日 平成26年8月7日 (2014.8.7)
(31) 優先権主張番号 61/413,180
(32) 優先日 平成22年11月12日 (2010.11.12)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 593172050
ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ
・リサーチ・ファウンデイション
THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
アメリカ合衆国オハイオ州43201, コロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
524
(74) 代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100101373
弁理士 竹内 茂雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マイクロRNA-21、ミスマッチ修復および結腸直腸癌に関する物質および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

有効量のアンチセンスm i R - 2 1を含む、結腸直腸癌を伴う患者を治療するための医薬組成物であって、患者は対照と比較して低下したh M S H 2発現を有し、低下したh M S H 2発現を有する患者がアンチセンスm i R - 2 1で処置されたのちにピリミジンアナログを投与されるように用いられることを特徴とし、ピリミジンアナログは5-フルオロウラシルである、医薬組成物。

【請求項2】

アンチセンスm i R - 2 1がロツクト核酸(L N A)をさらに含む、請求項1に記載の医薬組成物。

10

【請求項3】

患者が、一次のピリミジンアナログ耐性である結腸直腸癌、獲得性のピリミジンアナログ耐性である結腸直腸癌、ミスマッチ修復タンパク質の欠損、I I期の結腸直腸癌、およびI I I期の結腸直腸癌からなる群から選択される少なくとも一つの状態を有する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

結腸直腸癌を治療するためのキットであって、癌は低下したh M S H 2タンパク質発現によって特徴づけられ、

h M S H 2発現状態を同定するための手段、ならびに

医薬的に許容できる担体中の有効量のm i R - 2 1のアンタゴニストおよび有効量の5 -

20

フルオロウラシル

を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明者 : Carlo M. Croce, Nicola Valeri

関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2010年11月12日に出願されたUnited States Provisional Application No. 61/413,180の利益を主張し、その開示内容を本明細書に援用する。本出願は、_____ 10
に出願されたPCT Application No. _____ の利益を主張し、その開示内容を本明細書
に援用する。

【0002】

配列リスト

[0002] 本出願は、ASCIIフォーマットでEFS-Webを介して提出した配列リストを含み、
その全体を本明細書に援用する。2011年11月7日に作成した前記ASCIIコピーは53-52535_S
EQ_LIST_OSURF 11085.txtという名称であり、3,139バイトのサイズのものである。

【0003】

発明の分野

[0003] 本発明は一般に分子生物学の分野に関する。より詳細には、本発明は癌関連技術に関する。本発明の特定の観点には、m i R - 2 1 関連結腸直腸癌の診断、療法および予後における適用が含まれる。特に、m i R 2 1、ミスマッチ修復、および結腸直腸癌について本明細書中で考察する。 20

【背景技術】

【0004】

[0004] 結腸直腸癌 (C R C) は米国で最も発症頻度の高い癌のひとつであり、140,000を超える新たな症例および約50,000人の死亡が201に起きると予想される。5-フルオロウラシル (5-FU) に基づく化学療法は、アジュvant設定および転移設定の両方においてC R C処置のためのゴールドスタンダードである。しかし、ピリミジンアナログ処置に対する一次耐性または獲得耐性は、C R C患者の管理における共通の問題である。これらの所見は、耐性機構のより良い理解およびより有効な療法の必要性を強調する。 30

【0005】

[0005] マイクロRNAは、遺伝子発現および細胞恒常性の転写後調節因子として作用する一群の低分子非コードRNAである。m i R - 2 1 の過剰発現は多くの固形悪性腫瘍および血液悪性腫瘍の共通の特色である。m i R - 2 1 の過剰発現は、C R Cに罹患している患者からの血液および大便試料に見出されている。さらに、m i R - 2 1 の過剰発現は、I I およびI I I 期C R Cにおける5-FUアジュvant化学療法による有益性が低いことと関連する。

【0006】

[0006] ミスマッチ修復 (MMR) 系は、DNA損傷の認識と修復に関与する。h MSH2およびh MLH1はコアMMRタンパク質として機能し、それぞれタンパク質ホモログh MSH3またはh MSH6およびh MLH3またはh PMS2とのヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体形成はDNA損傷認識のための基本であり、MMRタンパク質ホモログの安定性にとってきわめて重要な段階である。MMRタンパク質の欠損は、臨床試験において5-FUアジュvant化学療法からの有益性が低いかまたは存在しないことと関連づけられている。MMRの障害は、5-FU代謝産物のDNAへの取り込みを減少させて、5-FU処置後のG2/M停止およびアポトーシスを減少させることにつながると思われる。 40

【0007】

[0007] m i R - 2 1 の過剰発現は結腸直腸癌を含めた多数のヒト腫瘍に関連し、その

10

20

30

40

50

際、p21、PTEN、TGF-RIIおよびBaxを含めた腫瘍抑制遺伝子の発現が調節されると思われる。

【発明の概要】

【0008】

[0008] 本発明は、miR-21がコア-ミスマッチ修復(MMR)認識タンパク質複合体hMSH2およびhMSH6を標的として下方調節することを立証する。高レベルのmiR-21を発現する結腸直腸腫瘍は、hMSH2タンパク質発現の低下を示す。miR-21を過剰発現する細胞は、コアMMR構成要素欠損の特徴である5-フルオロウラシル(5-FU)誘導によるG2/M損傷停止およびアポトーシスの著しい低下を示す。さらに、異種移植研究は、miR-21過剰発現が5-FUの療法効果を劇的に低下させることを立証する。本研究は、miR-21過剰発現に関連するMMRミューテーター遺伝子の下方調節が結腸直腸癌における療法効果の重要な臨床指標となる可能性があることを示す。10

【0009】

[0009] 本発明は、少なくとも1つのアンチセンスmiRNAおよび少なくとも1つの追加組成物を含む組成物を提供し、その際、アンチセンスmiRNAはmiR-21であり、少なくとも1つのコアMMRタンパク質を下方調節することができ、少なくとも1つの追加組成物はMMR関連疾患を処置するのに有用である。好ましくは、少なくとも1つの追加組成物は下記のものからなる群から選択される：化学療法剤；幹細胞；AG1478；ゲフィチニブ(gefitinib)(Iressa)；エルロチニブ(erlotinib)(Tarceva)；セツキシマブ(cetuximab)；パニツマブ(panitumab)；ザルツママブ(zalutumamab)；ニモツザマブ(nimotuzumab)；マツズマブ(matuzumab)；およびラパチニブ(lapatinib)。好ましくは、少なくとも1つのコアMMRタンパク質は下記のものからなる群から選択される：hMSH1；hMSH6；およびhMLH1。20

【0010】

[0010] したがって本発明は、アンチセンスmiR-21および5-フルオロウラシル、またはその医薬的に許容できる製剤を含む組成物を提供する。

[0011] アンチセンスmiR-21、およびヒトMutSホモログ2を増加させるための手段、またはその医薬的に許容できる製剤を含む組成物も提供される。

【0011】

[0012] アンチセンスmiR-21、および結腸直腸癌を処置する化合物、またはその医薬的に許容できる製剤を含む組成物も提供される。

[0013] センスまたはアンチセンスmiR-21およびピリミジンアナログを含む組成物も提供される。30

【0012】

[0014] ピリミジンアナログが5-フルオロウラシルである組成物も提供される。

[0015] 本発明は、請求項4に記載の組成物を含むキットを提供する。

[0016] hMSH2発現状態を同定するための手段をさらに含むものも提供される。

【0013】

[0017] hMSH2発現状態を同定するための手段が抗体であるキットも提供される。40

[0018] 可能性のある結腸直腸癌処置剤として被験化合物をスクリーニングするための指示をさらに含むキットも提供される。

【0014】

[0019] 本発明は、hMutSH2を過少発現する少なくとも1つの細胞に、過少発現を低減する量のアンチセンスmiR-21を導入することを含む、少なくとも1つのヒト細胞に影響を及ぼす方法を提供する。

【0015】

[0020] hMutSH2を過少発現する少なくとも1つの細胞が少なくとも1つの結腸直腸癌細胞である方法も提供される。

[0021] hMutSH2を過少発現する少なくとも1つの細胞がインビトロに存在する50

方法も提供される。

【0016】

[0022] h M u t S H 2 を過少発現する少なくとも 1 つの細胞がインサイチュに存在する方法も提供される。

[0023] h M u t S H 2 を過少発現する少なくとも 1 つの細胞がインビボに存在する方法も提供される。

【0017】

[0024] h M u t S H 2 を過少発現する少なくとも 1 つの細胞のアポトーシスを生じさせる方法も提供される。

[0025] h M u t S H 2 を過少発現する少なくとも 1 つの細胞が、腫瘍を形成する多数の細胞である方法も提供される。 10

【0018】

[0026] アンチセンス m i R - 2 1 を導入した後に腫瘍のサイズが縮小する方法も提供される。

[0027] h M u t S H 2 を過少発現する少なくとも 1 つの細胞に 5 - フルオロウラシルを導入することをさらに含む方法も提供される。

【0019】

[0028] h M u t S H 2 を過少発現する少なくとも 1 つの細胞に 5 - フルオロウラシルを導入することをさらに含む方法も提供される。

[0029] 本発明は、一次または獲得性のピリミジンアナログ耐性である結腸直腸癌を伴う患者にアンチセンス m i R - 2 1 を投与することを含む、一次または獲得性のピリミジンアナログ耐性である結腸直腸癌を伴う患者を処置する方法を提供する。 20

【0020】

[0030] 患者の h M S H 2 が下方調節されている方法も提供される。

[0031] 追加の結腸直腸癌アジュバントまたは処置を患者に施すことをさらに含む方法も提供される。

【0021】

[0032] 5 - フルオロウラシルを患者に投与することをさらに含む方法も提供される。

[0033] I I 期または I I I 期の結腸直腸癌を伴う患者にアンチセンス m i R - 2 1 を投与することを含む、I I 期または I I I 期の結腸直腸癌を伴う患者を処置する方法も提供される。 30

【0022】

[0034] 患者の h M S H 2 が下方調節されている方法も提供される。

[0035] 追加の結腸直腸癌アジュバントまたは処置を患者に施すことをさらに含む方法も提供される。

【0023】

[0036] 5 - フルオロウラシルを患者に投与することをさらに含む方法も提供される。

[0037] 本発明は、a) 結腸直腸癌を伴う患者の h M S H 2 発現が低下しているかどうかを同定すること、および b) 患者の h M S H 2 発現が低下している場合には、その患者をアンチセンス m i R - 2 1 で処置することを含む、結腸直腸癌を伴う患者を処置する方法を提供する。 40

【0024】

[0038] 本発明は、a) 結腸直腸癌を伴う患者の h M S H 2 発現が対照と比較して低下しているかどうかを同定すること、および b) 患者の h M S H 2 発現が低下している場合には、その患者をアンチセンス m i R - 2 1 で処置することを含む、結腸直腸癌を伴う患者を処置する方法を提供する。

【0025】

[0039] 本発明は、a) 結腸直腸癌を伴う患者の h M S H 2 発現が対照と比較して低下しているかどうかを同定すること、b) 結腸直腸癌を伴う患者の m i R - 2 1 発現が対照と比較して増大しているかどうかを同定すること、および c) 対照と比較して患者の m i 50

R - 2 1 発現が増大している場合および患者の h M S H 2 発現が低下している場合には、その患者をアンチセンス m i R - 2 1 で処置することを含む、結腸直腸癌を伴う患者を処置する方法を提供する。

【 0 0 2 6 】

[0040] 本発明は、 a) 被験化合物ならびにアンチセンスおよび / またはセンス m i R - 2 1 を h M S H 2 発現細胞に導入すること、および b) h M S H 2 発現細胞に影響を及ぼすのに有用な被験化合物を同定することを含む、有用な化合物を同定する方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

[0041] 本発明は、 a) 細胞被験試料における h M S H 2 および m i R - 2 1 の状態を対照と関連付けること、および b) 癌細胞試料の状態を同定することを含む、癌細胞試料の状態を同定する方法を提供する。 10

【 0 0 2 8 】

[0042] 本発明は、 a) 結腸直腸癌細胞を含む被験試料における h M S H 2 および m i R - 2 1 の状態を対照と関連付けること、および b) 結腸直腸癌細胞試料の状態を予測することを含む、結腸直腸癌細胞試料の状態を予測する方法を提供する。

【 0 0 2 9 】

[0043] 本発明は、 a) 生物由来の被験試料における h M S H 2 および m i R - 2 1 状態を対照と関連付けること、および b) 生物の状態を同定することを含む、生物の癌の状態を同定する方法を提供する。 20

【 0 0 3 0 】

[0044] 本発明は、 a) 生物由来の被験試料における h M S H 2 および m i R - 2 1 の状態を対照と関連付けること、および b) 生物の結腸直腸癌の状態を同定することを含む、生物の結腸直腸癌の状態を予測する方法を提供する。

【 0 0 3 1 】

[0045] 本発明は、 5 - フルオロウラシル耐性である結腸直腸癌細胞に G 2 / M 停止およびアポトーシスを阻害する量のアンチセンス m i R - 2 1 を導入することを含む、 5 - フルオロウラシル耐性である結腸直腸癌細胞における G 2 / M 停止およびアポトーシスを阻害する方法を提供する。

【 0 0 3 2 】

[0046] 本発明は、 5 - フルオロウラシル耐性である結腸直腸癌細胞に炎症を阻害する量のアンチセンス m i R - 2 1 を導入することを含む、 5 - フルオロウラシル耐性である結腸直腸癌細胞における炎症を阻害する方法を提供する。 30

【 0 0 3 3 】

[0047] 添付の図面を考慮して読むと、以下の好ましい態様の詳細な記述から、当業者には本発明の種々の観点が明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

[0048] この特許または出願のファイルは、着色した 1 以上の図面および / または 1 以上の写真を含みうる。着色した図面（複数可）および / または写真（複数可）を含むこの特許または特許出願の公開明細書のコピーは、申請し必要な手数料を支払えば特許庁により提供されるであろう。 40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 4 】

【図 1 - 1】[0049] 図 1 A ~ 1 D . M S H 2 および M S H 6 は m i R - 2 1 の直接の標的である。 [0050] 図 1 A : h M S H 2 (S E Q I D N O : 1 1) および h M S H 6 (S E Q I D N O : 1 3) 3 ' U T R の m i R - 2 1 推定シード領域 (seed region) (それぞれ S E Q I D N O : 1 2 および 1 4) を示す。

【図 1 - 2】[0051] 図 1 B : C o l o - 3 2 0 D M および S W 6 2 0 を、 m i R - 2 1 、スクランブル m i R (scrambled-miR)、 s i R N A 抗 - M S H 2 または抗 - M S H 6 で 4 8 時間、一過性トランスフェクションした。 h M S H 2 および h M S H 6 m R N A 50

発現をリアルタイムPCRにより分析した。

【図1-3】[0052] 図1C: hMSH2およびhMSH6両方のmiR-21依存性下方調節のウェスタンプロット分析。トランスフェクションは(図1B)と同様であった。

[0053] 図1D: 高い内因レベルのmiR-21を含むHCT-116、SW480およびRKO細胞を、LNA抗-miR-21または抗-miR対照で48時間トランスフェクションし、続いてhMSH2およびhMSH6プロテインをウェスタンプロット分析した。

【図1-4】E: それぞれ、ルシフェラーゼ遺伝子の下流にhMSH2およびhMSH6 3'UTRをサブクローニングし(それぞれ、MSH2-Luc-WTおよびMSH6-Luc-WT)、同様に、miR-21標的部位を欠失したhMSH2およびhMSH6 3'UTRをサブクローニングし(MSH2-Luc-変異体およびMSH6-Luc-変異体)、miR-21またはスクランブルmiRと共にトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性を24時間後に記録した。データは、4つの独立したトランスフェクションからの少なくとも3つの測定値の平均およびS.D.を表わす。^{*} p < 0.01。

【図2-1】[0054] 図2A. MMRコアタンパク質hMSH2の発現はCRC試料中のmiR-21発現と逆相関する。 [0055] 図2A: パラフィン包埋、ホルマリン固定したCRC組織を、LNA-プローブ抗-miR-21またはスクランブルプローブ、およびhMSH2に対するIHC抗体と共にインキュベートした。代表的な写真をNuanceシステムソフトウェアで撮影した。miR-21およびhMSH2の両方について染色が陽性であったCRC試料を示す。青および赤の染色は、それぞれmiR-21およびhMSH2タンパク質を同定する。

【図2-2】[0056] 図2B: 新鮮凍結ヒト結腸直腸組織からRNAおよびタンパク質を抽出した。一連のヒトCRCにおいて、miR-21発現をノーザンプロット法により評価し、MMRタンパク質発現をウェスタンプロット法により評価した。

【図3-1】[0057] 図3. miR-21は5-FU誘導によるアポトーシスをインビトロで阻害する。 [0058] SW620およびColo-320DM細胞を、48時間の血清飢餓によりG0-G1に同期化した。次いで細胞をトリプシン処理し、計数し、スクランブルmiR、miR-21、siRNA抗-MSH2またはsiRNA-対照でトランスフェクションし、10%のFBSを含有する培地に再播種した。解除後16時間(S期に入る直前であるがp53仲介G1-S細胞周期チェックポイント後の時点に対応する)で、5-FUを添加した。5-FU投与の48時間後に、細胞周期を分析した。G2/M停止およびアポトーシス(準G1)細胞の割合の定量結果を示し、3つの独立したトランスフェクションからの3つの測定値の平均およびS.D.を表示する。^{*} p < 0.001。

【図3-2】[0057] 図3. miR-21は5-FU誘導によるアポトーシスをインビトロで阻害する。 [0058] SW620およびColo-320DM細胞を、48時間の血清飢餓によりG0-G1に同期化した。次いで細胞をトリプシン処理し、計数し、スクランブルmiR、miR-21、siRNA抗-MSH2またはsiRNA-対照でトランスフェクションし、10%のFBSを含有する培地に再播種した。解除後16時間(S期に入る直前であるがp53仲介G1-S細胞周期チェックポイント後の時点に対応する)で、5-FUを添加した。5-FU投与の48時間後に、細胞周期を分析した。G2/M停止およびアポトーシス(準G1)細胞の割合の定量結果を示し、3つの独立したトランスフェクションからの3つの測定値の平均およびS.D.を表示する。^{*} p < 0.001。

【図4-1】[0059] 図4. miR-21仲介5-FU耐性は、hMSH2ダウンミュレーションに依存する。 [0060] Lovo(MSH2+)およびLovo(MSH2-)細胞を48時間の血清飢餓によりG0-G1に同期化し、miR-対照、miR-21、siRNA抗-MSH2、siRNA-対照を全長hMSH2 cDNA(miR-21シード領域を含むものまたは含まないもの)をコードするベクターと共にトランス

10

20

20

30

40

50

フェクションした。5-FU投与の48時間後に細胞周期を分析した。Lovo(MSH2+)細胞(青色棒)およびLovo(MSH2-)細胞(桃色棒)両方のG2/M停止およびアポトーシス(準G1)細胞の割合の定量結果を示し、3つの独立した実験からの2つの測定値の平均およびS.D.を表示する(* p < 0.001)。

【図4-2】[0059] 図4. miR-21介在5-FU耐性は、hMSH2ダウンミュレーションに依存する。 [0060] Lovo(MSH2+)およびLovo(MSH2-)細胞を48時間の血清飢餓によりG0-G1に同期化し、miR-対照、miR-21、siRNA抗-MSH2、siRNA-対照を全長hMSH2 cDNA(miR-21シード領域を含むものまたは含まないもの)をコードするベクターと共にトランスフェクションした。5-FU投与の48時間後に細胞周期を分析した。Lovo(MSH2+)細胞(青色棒)およびLovo(MSH2-)細胞(桃色棒)両方のG2/M停止およびアポトーシス(準G1)細胞の割合の定量結果を示し、3つの独立した実験からの2つの測定値の平均およびS.D.を表示する(* p < 0.001)。

【図5-1】[0061] 図5A~5C. miR-21はインビボで5-FUに対する耐性を引き起す。 [0062] Lovo(MSH2+)細胞を、miR-21またはsiRNA抗-MSH2のいずれかをコードするレンチウイルスベクターで安定感染させた。対照として、Lovo(MSH2+)およびLovo(MSH2-)細胞に空のベクターを感染させた。ヌードマウスにLovo(MSH2+) - 空(n=6)、Lovo(MSH2+) - miR-21(n=6)、Lovo(MSH2+) - 抗-MSH2(n=6)およびLovo(MSH2-) - 空(n=6)を注射した。異種移植体が触知可能な体積になった時点で、5-FUを週に連続5日間、2週間、腹腔内注射により投与した(灰色領域)。腫瘍体積を処置前、次いで週1回、測定した。個々の相対腫瘍体積(relative tumor volume)(RTV)を下記に従って計算した: RTV = Vx / V1、ここでVxは所定の時点の体積(立法ミリメートル)であり、V1は処置開始時点の体積である。結果を各グループのマウスについて腫瘍体積の変化の平均パーセントとしてS.D.と共に表示する。 [0063] 図5A: 摘出した腫瘍におけるhMSH2タンパク質発現のウェスタン分析。 [0064] 図5B: 6週目の代表的な腫瘍異種移植片。 [0065] 図5C: 5-FU処理中および処理後の腫瘍増殖。

【図5-2】[0061] 図5A~5C. miR-21はインビボで5-FUに対する耐性を引き起す。 [0062] Lovo(MSH2+)細胞を、miR-21またはsiRNA抗-MSH2のいずれかをコードするレンチウイルスベクターで安定感染させた。対照として、Lovo(MSH2+)およびLovo(MSH2-)細胞に空のベクターを感染させた。ヌードマウスにLovo(MSH2+) - 空(n=6)、Lovo(MSH2+) - miR-21(n=6)、Lovo(MSH2+) - 抗-MSH2(n=6)およびLovo(MSH2-) - 空(n=6)を注射した。異種移植体が触知可能な体積になった時点で、5-FUを週に連続5日間、2週間、腹腔内注射により投与した(灰色領域)。腫瘍体積を処置前、次いで週1回、測定した。個々の相対腫瘍体積(relative tumor volume)(RTV)を下記に従って計算した: RTV = Vx / V1、ここでVxは所定の時点の体積(立法ミリメートル)であり、V1は処置開始時点の体積である。結果を各グループのマウスについて腫瘍体積の変化の平均パーセントとしてS.D.と共に表示する。 [0063] 図5A: 摘出した腫瘍におけるhMSH2タンパク質発現のウェスタン分析。 [0064] 図5B: 6週目の代表的な腫瘍異種移植片。 [0065] 図5C: 5-FU処理中および処理後の腫瘍増殖。

【図6-1】[0066] 図6A~6B [0067] 図6A: Colo-320DMおよびSW620を、miR-21、スクランブルmiR、siRNA抗-MSH2または抗-MSH6で48時間、一過性トランスフェクションした。miR-21発現をリアルタイムPCRにより評価した。 [0068] 図6B: タンパク質発現をデンシティメトリー分析により測定した。棒は3回の実験の平均およびS.D.を示す。 * P < 0.05。

【図6-2】[0066] 図6A~6B [0067] 図6A: Colo-320DMおよびSW620を、miR-21、スクランブルmiR、siRNA抗-MSH2または抗-MSH6で48時間、一過性トランスフェクションした。miR-21発現をリアルタイムPCRにより評価した。 [0068] 図6B: タンパク質発現をデンシティメトリー分析により測定した。棒は3回の実験の平均およびS.D.を示す。 * P < 0.05。

10

20

30

40

50

S H 6 で 4 8 時間、一過性トランスフェクションした。m i R - 2 1 発現をリアルタイム P C R により評価した。 [0068] 図 6 B : タンパク質発現をデンシティメトリー分析により測定した。棒は 3 回の実験の平均および S . D . を示す。 * P < 0 . 0 5 。

【図 7 - 1】 [0069] 図 7 A - 7 C [0070] H C T - 1 1 6 、 S W 4 8 0 および R K O 細胞を、 m i R - 2 1 に対する L N A (抗 - m i R - 2 1) または L N A 対照でトランスフェクションした。トランスフェクションの 4 8 時間後に細胞を回収し、 R N A およびタンパク質を採取した。 [0071] 図 7 A : 対照と比較した抗 - m i R - 2 1 トランスフェクションした細胞におけるリアルタイム P C R により分析した m i R - 2 1 発現。 [0072] 図 7 B : タンパク質発現をデンシティメトリー分析により測定した。 [0073] 図 7 C : h M S H 2 および h M S H 6 m R N A 発現のリアルタイム P C R 分析。棒は 3 回の実験の平均および S . D . を示す。 * P < 0 . 0 5 。 10

【図 7 - 2】 [0069] 図 7 A - 7 C [0070] H C T - 1 1 6 、 S W 4 8 0 および R K O 細胞を、 m i R - 2 1 に対する L N A (抗 - m i R - 2 1) または L N A 対照でトランスフェクションした。トランスフェクションの 4 8 時間後に細胞を回収し、 R N A およびタンパク質を採取した。 [0071] 図 7 A : 対照と比較した抗 - m i R - 2 1 トランスフェクションした細胞におけるリアルタイム P C R により分析した m i R - 2 1 発現。 [0072] 図 7 B : タンパク質発現をデンシティメトリー分析により測定した。 [0073] 図 7 C : h M S H 2 および h M S H 6 m R N A 発現のリアルタイム P C R 分析。棒は 3 回の実験の平均および S . D . を示す。 * P < 0 . 0 5 。

【図 8】 [0074] 図 8 [0075] 高い m i R - 2 1 発現および低い h M S H 2 発現を示す例の散乱プロットおよび回帰曲線 + 信頼区間 (赤色) 。 [0076] 腫瘍組織および正常な隣接組織において、 m i R - 2 1 をノーザンプロット法により分析し、 h M S H 2 をウェスタンプロット分析により分析した。グラフには m i R - 2 1 および h M S H 2 を腫瘍組織と正常組織の比として表わす。相関性は - 0 . 8 1 である。 9 5 % 信頼区間 : - 0 . 9 6 ~ - 0 . 2 5 、 p < 0 . 0 2 。 20

【図 9】 [0077] 図 9 [0078] S W 6 2 0 および C o l o - 3 2 0 D M 細胞を、 4 8 時間の血清飢餓により G 0 - G 1 に同期化した。次いで細胞をトリプシン処理し、計数し、スクランブル m i R 、 m i R - 2 1 、 s i R N A 抗 - M S H 2 または s i R N A - 対照でトランスフェクションし、 1 0 % の F B S を含有する培地に再播種した。解除後 1 6 時間 (S 期に入る直前であるが p 5 3 仲介 G 1 - S 細胞周期チェックポイント後の時点に対応する) で、 5 - F U (5 0 u g / m l) を添加した。 4 8 時間後に、 F A C S 分析によりアポトーシス細胞の割合を分析し、続いてヨウ化プロピジウムおよび A n n e x i n V 染色した。図は G 2 / M 停止およびアポトーシス (準 G 1) 細胞の割合を示す。データは、少なくとも 3 つの独立した実験からの平均および S . D . を表わす。 * p < 0 . 0 1 。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

配列リストの簡単な記述

[0079] 本出願は、 EFS-web を介して提出した配列リストを含み、その全体を本明細書に援用する。2011年11月7日に作成したその ASCII コピーは 53-52535_SEQ_LIST_OSURF 1108 5.txt という名称であり、 3,139 バイトのサイズのものである。 40

【 0 0 3 6 】

【表1】

プライマー名	プライマー Fw 5'-3'	プライマー Rv 5'-3'
SEQ ID NOS 1 と 6 hMSH2-LUC-WT	CAGAAAGCCCTGGAACATTGA	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 2 と 7 hMSH2-LUC-MUTANT	TTTCCATAGTGTTAACTGTCAGTGC	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 3 と 8 hMSH2-cDNA-変異体	CCCAGTAATGGAATGAAGGGTCTG TAATAGTTTATATTG	CAATATAAAACTATTACAGACCCITC ATTCCATTACTGGG
SEQ ID NOS 4 と 9 hMSH6-LUC-WT	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	TAGCTTTCTCCCCCATTT
SEQ ID NOS 5 と 10 hMSH6-LUC-変異体	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	CCACCTTGTCAAGTCAACTC

10

【0037】

発明の詳細な説明

[0080] M i R - 2 1 は、一般に結腸直腸癌を含めた多数のヒト腫瘍に過剰発現する。近年、癌の進行を促進する可能性のある幾つかの m i R - 2 1 腫瘍抑制標的が同定されている。本発明者らは、m i R - 2 1 を過剰発現する結腸直腸腫瘍細胞と h M S H 2 腫瘍抑制タンパク質を発現するものとの間の逆相関性をここに見出した。さらに本発明者らは、m i R - 2 1 は h M S H 2 および h M S H 6 両方の m R N A の 3' - U T R を直接標的として、タンパク質発現の著しい下方調節をもたらすと思われると決定した。

20

【0038】

[0081] 結腸直腸癌の療法処置の技術水準には、5 - フルオロウラシル (5 - F U) が含まれる。5 - F U は、フルオロヌクレオチドの R N A および D N A への誤った取り込み、またチミジル酸シンセターゼ (T S) 酵素を標的とすることによりヌクレオチド合成を阻害することにより、その細胞毒性効果を発揮する。T S 過剰発現、5 - F U 代謝の欠損、T P 5 3 変異、および M M R 系の障害はすべて、5 - F U 耐性の特徴であり、臨床転帰の予測因子である。より最近になって、マイクロ R N A および遺伝子発現の両方の分析によって、アジュvant 化学療法を受けた I I および I I I 期 C R C 患者における 5 - F U の有益性を予測する際の、より高いレベルの複雑さが解明された。事実、5 - F U アナログで処置した I I および I I I 期 C R C 患者の後向き分析は、高い m i R - 2 1 発現を伴う患者の生存率が低いことを示した。同じ所見は I I I 期 C R C 患者のみのサブグループで確認されたが、I I 期 C R C 患者は統計的に有意な相関性を示さなかった。少ない患者数が、この後者の結果を説明する可能性がある。M M R 機構の遺伝的またはエピジェネティックな欠損をもつ細胞は、G 2 / M 停止およびアポトーシスの欠損の結果として 5 - F U 代謝産物に耐性であると思われる。

30

【0039】

[0082] 本発明は、細胞モデルおよび異種移植腫瘍モデルの両方において m i R - 2 1 による h M S H 2 の下方調節が 5 - F U 耐性を誘導することを示す。合わせて考えると、本発明の結果は、m i R - 2 1 腫瘍状態は 5 - F U 治療効果の重要な指標となる可能性があることを示す。

40

【0040】

[0083] m i R - 2 1 は多数の細胞周期および腫瘍抑制遺伝子を調節すると思われる。本発明はまた、h M S H 2 の下方調節が 5 - F U 耐性の発現において中心的役割を果たすことを示す。事実、5 - F U 誘導によるアポトーシスおよび G 2 / M 停止の m i R - 2 1 による阻害は、s i R N A 仲介による選択性的な h M S H 2 阻害により引き起こされるものに匹敵していた。さらに、L o v o (M S H 2 -) 細胞を m i R - 2 1 でトランスフェクションしても細胞周期停止またはアポトーシスは変化せず、これは m i R - 2 1 誘導による効果が h M S H 2 発現に依存することを立証する。合わせて考えると、本発明の結果は

50

、m i R - 2 1 の阻害が 5 - F U 耐性を克服するための相乗的処置であることを示す。

【 0 0 4 1 】

[0084] 本発明はまた、m i R - 2 1 依存性の h M S H 2 - h M S H 6 下方調節は一次または獲得性の両方の 5 - F U 耐性に関与することを示す。臨床試験において、5 - F U は通常は 4 8 時間にわたる連続注入として投与される。興味深いことに、m i R - 2 1 発現は 5 - F U に連続曝露された細胞株において増大するように思われる。本発明を考慮して、本発明者らは、この過剰発現は二次的な耐性機構の可能性があり、細胞は 5 - F U の細胞毒性を克服するために m i R - 2 1 過剰発現を獲得すると主張する。大腸癌および卵巣癌において 5 - F U またはシスプラチニンを含めた一次化学療法の後に h M S H 2 が下方調節される頻度が高いことを考慮すれば、さらに臨床的な関連性が存在する。 10

【 0 0 4 2 】

[0085] 要約すると、本発明者らは、結腸直腸腫瘍における m i R - 2 1 の過剰発現による 5 - F U 薬物耐性が、コア M M R タンパク質 h M S H 2 および h M S H 6 を直接に下方調節し、最終的に損傷誘導性の G 2 / M 停止およびアポトーシスの欠損に導くことを示した。

【 0 0 4 3 】

[0086] 定義および略号

[0087] D N A デオキシリボ核酸

[0088] m R N A メッセンジャー R N A

[0089] P C R ポリメラーゼ連鎖反応

[0090] p r e - m i R N A マイクロ R N A 前駆体

[0091] q R T - P C R 定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応

[0092] R N A リボ核酸

[0093] 上記の全般的な記述および以下の詳細な記述は共に例示および説明にすぎず、本発明の教示の範囲を限定するためのものではないことを理解すべきである。本願において、単数形の使用は、具体的に別に記載しない限り複数形を含む。

【 0 0 4 4 】

[0094] 別に明記しない限り、技術用語は一般的な使用に従って用いられる。分子生物学における一般的用語の定義は下記にある：Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); および Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology : a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。 30

【 0 0 4 5 】

[0095] 本発明の種々の態様の概説を容易にするために、下記の特定の用語の説明を提示する。

[0096] 補助療法：一次処置の効果を向上させるために一次処置と組み合わせて用いられる処置。

【 0 0 4 6 】

[0097] 臨床転帰：疾患もしくは障害に対する処置後または無処置における患者の健康状態を表わす。臨床転帰には、死亡までの時間の長さの延長、死亡までの時間の長さの短縮、生存の見込みの増大、死亡のリスクの増大、生存率、無病生存率、慢性疾患、転移、進行したかまたは侵攻性の疾患、疾患再発、死亡、および療法に対する応答の良好または不良が含まれるが、これらに限定されない。 40

【 0 0 4 7 】

[0098] 生存率の低下：本明細書中で用いる場合、“生存率の低下”は、患者が死亡するまでの期間の短縮、または患者が死亡するリスクの増大を表わす。

[0099] 発現レベルの検出：たとえば、“m i R または m i R N A 発現のレベルを検出すること”は、試料中に存在する m i R または m i R N A の量を定量することを表わす。 50

特定の m i R またはいずれかのマイクロ RNA の発現の検出は、当技術分野で既知であるかまたは本明細書に記載するいずれかの方法を使用して、たとえば q R T - P C R により、達成できる。m i R の発現の検出は、成熟形態の m i RNA または m i RNA 発現と相關する前駆体形態のいずれかの発現の検出を含む。一般に、m i RNA 検出方法は、配列特異的検出、たとえば R T - P C R によるものを伴う。当技術分野で既知であり、本明細書中の S E Q I D N O に提示される、前駆体および成熟 m i R 核酸配列を用いて、m i R 特異的なプライマーおよびプローブを設計することができる。

【 0 0 4 8 】

[00100] マイクロ RNA (m i RNA) : 遺伝子発現を調節する一本鎖 RNA 分子。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、 p r i - m i RNA として知られる一次転写体からプロセシングされて、 m i RNA 前駆体 (p r e - m i RNA) と呼ばれる短いステム - ループ構造体になり、最後に機能性成熟マイクロ RNA になる。成熟マイクロ RNA は 1 以上のメッセンジャー RNA 分子に対して部分的に相補的であり、それらの主機能は遺伝子発現を下方調節することである。マイクロ RNA は RNA i 経路により遺伝子発現を調節する。

【 0 0 4 9 】

[00101] m i R 発現 : 本明細書中で用いる場合、“低い m i R 発現” および “高い m i R 発現” は、試料中にみられる m i RNA のレベルを表わす相対的用語である。ある様において、低いおよび高い m i R 発現は、対照試料と被験試料のグループにおける m i RNA レベルの比較により決定される。その際、試料中の m i の発現が平均または中央 m i R 発現レベルより上である（高い）かまたは下である（低い）かどうかに基づいて、各試料に低い発現および高い発現を割り当てることができる。個々の試料について、高いまたは低い m i R 発現は、試料を高いまたは低い発現をもつことが知られている対照または基準試料と比較することにより、あるいは標準値と比較することにより決定できる。低いおよび高い m i R 発現には、前駆体形態もしくは成熟形態のいずれかの m i RNA 、または両方の発現を含めることができる。

【 0 0 5 0 】

[00102] 患者 : 本明細書中で用いる場合、用語“患者”には、ヒトおよび非ヒト動物が含まれる。処置のための好ましい患者はヒトである。“患者”および“対象”は本明細書中で互換的に用いられる。

【 0 0 5 1 】

[00103] 医薬的に許容できるビヒクル : 本発明に有用な医薬的に許容できる担体 (ビヒクル) は一般的なものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) に、 1 つ以上の療法用の化合物、分子または薬剤の医薬送達に適した組成物および製剤が記載されている。

【 0 0 5 2 】

[00104] 一般に、担体の性質は、採用する特定の投与様式に依存するであろう。たとえば、非経口製剤には通常は、医薬的および生理的に許容できる流体、たとえば水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどをビヒクルとして含む注射用流体が含まれる。固体組成物 (たとえば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤の形態) については、一般的な無毒性固体担体には、たとえば医薬グレードのマンニトール、乳糖、デンブン、またはステアリン酸マグネシウムを含めることができる。生物学的に中性である担体のほかに、投与される医薬組成物は少量の無毒性補助物質、たとえば湿潤剤または乳化剤、保存剤、および pH 緩衝剤など、たとえば酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンを含有することができる。

【 0 0 5 3 】

[00105] 疾患を予防、処置または改善すること : 疾患を“予防すること”は、疾患の完全発症を阻止することを表わす。“処置すること”は、疾患が発症し始めた後にその徴候もしくは症状または病的状態を改善する療法介入を表わす。“改善すること”は、疾患の徴候もしくは症状の数または重症度を軽減することを表わす。

10

20

30

40

50

【0054】

[00106] スクリーニング：本明細書中で用いる場合、“スクリーニング”は、そのような疾患に作用する候補薬剤を評価および同定するために用いるプロセスを表わす。当技術分野で既知であり、本明細書中に記載される多数の技術のいずれか1つを用いて、たとえばマイクロアレイ分析により、またはq R T - P C Rにより、マイクロR N Aの発現を定量することができる。

【0055】

[00107] 低分子：一般に約1000ダルトン未満、またはある態様においては約500ダルトン未満の分子量をもつ分子であって、標的分子の活性を測定可能なる程度で調節できる分子。
10

【0056】

[00108] 治療的(Therapeutic)：診断と処置の両方を含む一般用語。

[00109] 治療剤：対象に適正に投与された際に、所望の治療的效果または予防効果を誘導できる化合物、低分子、または他の組成物、たとえばアンチセンス化合物、抗体、ブロテアーゼ阻害剤、ホルモン、ケモカインまたはサイトカイン。

【0057】

[00110] 本明細書中で用いる場合、“候補薬剤”または“被験化合物”は、それが治療剤として機能できるかどうかを決定するスクリーニングのために選択される化合物である。“インキュベートすること”は、ある薬剤が細胞または組織と相互作用するのに十分な時間を含む。“接触させること”は、固体または液体の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を含む。細胞または組織を有する薬剤で“処置すること”は、その薬剤を細胞または組織と接触させるか、またはそれらと共にインキュベートすることを含む。
20

【0058】

[00111] 治療的有効量：特定した医薬または治療剤で処置される対象または細胞において所望の効果を達成するのに十分な薬剤量。薬剤の有効量は幾つかの要因に依存し、それには処置される対象または細胞、および治療的組成物の投与様式が含まれるが、それらに限定されない。

【0059】

[00112] 本発明方法のある態様において、対照を用いることが望ましい。それに関して、対照は同一患者から得た非癌組織試料、または健康な対象、たとえば健康な組織ドナーから得た組織試料であってもよい。別の例において、対照は歴史的な値から計算された培養した標準品である。腫瘍試料および非癌組織試料は、当技術分野で既知であるいずれかの方法に従って得ることができる。たとえば、腫瘍試料および非癌試料は切除術を受けた癌患者から得ることができ、あるいはそれらは皮下注射針を用いる摘出により、顕微手術により、またはレーザー捕捉により得ることができる。対照(非癌)試料は、たとえば屍体ドナーから、または健康なドナーから得ることができる。
30

【0060】

[00113] ある態様において、スクリーニングは候補薬剤／被験化合物を細胞と接触させることを含む。細胞は患者から得た初代細胞であってもよく、あるいは細胞は不死化またはトランスフォームした細胞であってもよい。
40

【0061】

[00114] 候補薬剤／被験化合物は、いずれかのタイプの薬剤、たとえばタンパク質、ペプチド、低分子、抗体または核酸であってもよい。ある態様において、候補薬剤はサイトカインである。ある態様において、候補薬剤は低分子である。スクリーニングには、ハイスクロープスクリーニング、および個別または小グループの候補薬剤のスクリーニングの両方が含まれる。

【0062】

[00115] マイクロR N Aの検出

[00116] 本発明のある方法において、試料中に存在するm i R N Aを同定するこ
50

望ましい。

【0063】

[00117] マイクロRNA前駆体 (pre-miRNAs) および成熟miRNAの配列は、たとえばmiRBaseデータベースにより公開されており、Sanger Instituteによりオンラインで入手できる(参照: Griffiths-Jones et al., Nucleic Acids Res. 36: D154-D158, 2008; Griffiths-Jones et al., Nucleic Acids Res. 34: D140-D144, 2006; およびGriffiths-Jones, Nucleic Acids Res. 32: D109-D111, 2004)。本発明に開示する好ましいファミリーメンバーの前駆体および成熟形態の配列は本明細書に提示されている。

【0064】

[00118] RNA発現の検出および定量は、当技術分野で周知である多数の方法(たとえば、U.S. Patent Application Publication No. 2006/0211000および2007/0299030を参照; 本明細書に援用する)および以下に記載する方法のいずれか1つにより達成できる。RNAファミリーメンバーの既知の配列を用いて、以下に記載する検出方法に用いるための特異的なプローブおよびプライマーを適宜設計することができる。

【0065】

[00119] ある場合には、RNA検出方法は、核酸を試料、たとえば細胞または組織試料から単離することを必要とする。RNA、具体的にはmiRNAを含めた核酸を、当技術分野で既知のいずれか適切な手法で単離することができる。たとえば、フェノールを基本とする抽出は、RNAを単離するための一般的方法である。フェノールを基本とする試薬は、細胞および組織の破壊ならびにその後の夾雑物からのRNA分離のための、変性剤およびRNase阻害剤の組合せを含有する。フェノールを基本とする単離方法は、10~200ヌクレオチドの範囲のRNA種(たとえば、前駆体および成熟miRNA、5'Sおよび5'8'SリボソームRNA(rRNA)、ならびにU1核内低分子RNA(snRNA))を回収することができる。さらに、抽出法(TRIZOLTMまたはTRI REAGENTTMを用いるものなど)はすべての高分子および低分子RNAを精製し、miRNAおよび低分子干渉RNA(siRNA)を含有する生物試料から全RNAを単離するための効率的な方法である。

【0066】

[00120] ある態様において、マイクロアレイの使用が望ましい。マイクロアレイは、核酸、タンパク質、低分子、細胞または他の物質の顕微的な規則的アレイであって、複雑な生化学的試料の並行分析を可能にするものである。DNAマイクロアレイは、固体支持体に化学的に付着された、捕捉プローブとして知られる種々の核酸プローブから構成され、支持体はマイクロチップ、スライドガラス、またはマイクロスフェアサイズのビーズであってもよい。マイクロアレイは、たとえば多数のメッセンジャーRNA(mRNA)および/またはmiRNAの発現レベルを同時に測定するために使用できる。

【0067】

[00121] マイクロアレイは、先の細いピンでスライドガラス上にプリントすること、予め作製したマスクを用いるフォトリソグラフィー、ダイナミックマイクロミラー装置を用いるフォトリソグラフィー、インクジェットプリントティング、または微小電極アレイ上の電気化学を含めた多様な技術を用いて作製できる。

【0068】

[00122] miRNAのマイクロアレイ分析は、たとえば(これらの方法は、改変した形でいずれのRNA分析にも使用できるが)当技術分野で既知のいずれかの方法に従って達成できる(たとえば、PCT Publication No. WO 2008/054828; Ye et al., Nat. Med. 9(4): 416-423, 2003; Calin et al., N. Engl. J. Med. 353(17): 1793-1801, 2005を参照; これらのそれを本明細書に援用する)。一例において、RNAを細胞または組織試料から抽出し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて低分子RNA(18~26ヌクレオチドのRNA)を全RNAからサイズ選択する。オリゴヌクレオチドリンカーを低分子RNAの5'および3'末端に付加し、得られたライゲーション生成物をRT-

10

20

30

40

50

P C R 反応の鋳型として用いて 10 サイクルの増幅を行なう。センス鎖 P C R プライマーはその 5' 末端に付加された発蛍光団をもち、これにより P C R 生成物のセンス鎖を蛍光標識する。P C R 生成物を変性させ、次いでマイクロアレイにハイブリダイズさせる。アレイ上の対応する m i R N A 捕捉プローブ配列に対して相補的な、標的核酸と呼ばれる P C R 生成物は、その捕捉プローブが固定されているスポットに塩基対合によりハイブリダイズするであろう。次いで、マイクロアレイレーザースキャナーを用いて励起すると、そのスポットは蛍光を発するであろう。次いで、特定の m i R N A のコピー数に関して、多数の陽性および陰性対照ならびにアレイデータ正規化方法を用いて各スポットの蛍光強度を評価し、その結果特定の m i R N A の発現レベルが評価されるであろう。

【 0 0 6 9 】

10

[00123] 別態様において、細胞または組織試料から抽出した低分子 R N A 画分 (m i R N A を含む) を含む全 R N A を低分子 R N A のサイズ選択なしにそのまま使用し、T 4 R N A リガーゼおよび蛍光標識した短い R N A リンカーを用いて 3' 末端を標識する。R N A 試料を 30 度で 2 時間のインキュベーションにより標識し、続いて T 4 R N A リガーゼを 80 度で 5 分間、熱不活性化する。アレイ上の対応する m i R N A 捕捉プローブ配列に対して相補的な蛍光標識 m i R N A は、捕捉プローブが固定されているスポットに塩基対合によりハイブリダイズするであろう。マイクロアレイのスキャンおよびデータ処理を前記に従って実施する。

【 0 0 7 0 】

20

[00124] 使用できる幾つかのタイプのマイクロアレイがあり、これにはスポットテッド - オリゴヌクレオチドマイクロアレイ、プレファブリケーテッド - オリゴヌクレオチドマイクロアレイ、およびスポットテッド - 長鎖オリゴヌクレオチドアレイが含まれる。スポットテッド - オリゴヌクレオチドマイクロアレイにおいて、捕捉プローブは m i R N A 配列に対して相補的なオリゴヌクレオチドである。このタイプのアレイは一般に、2 つの異なる発蛍光団で標識した比較すべき 2 試料 (たとえば、非癌組織、および癌組織または試料組織) からのサイズ選択した低分子 R N A の増幅 P C R 生成物とハイブリダイズする。あるいは、低分子 R N A 画分 (m i R N A を含む) を含む全 R N A を 2 試料から抽出し、低分子 R N A のサイズ選択なしにそのまま使用し、T 4 R N A リガーゼおよび 2 つの異なる発蛍光団で標識した短い R N A リンカーを用いて 3' 末端を標識する。試料を混合し、単一のマイクロアレイにハイブリダイズさせ、次いでそれをスキャンし、上方調節および下方調節された m i R N A 遺伝子を 1 回のアッセイで視覚化することができる。

【 0 0 7 1 】

30

[00125] プレファブリケーテッド - オリゴヌクレオチドマイクロアレイまたは単チャネル - マイクロアレイにおいて、プローブは既知または推定 m i R N A の配列に一致するように設計される。完全ゲノムを網羅する市販の設計がある (たとえば、A f f y m e t r i x または A g i l e n t から) 。これらのマイクロアレイは遺伝子発現の絶対値の推定を与え、したがって 2 条件の比較には 2 つの別個のマイクロアレイの使用が必要である。

【 0 0 7 2 】

40

[00126] スポットテッド - 長鎖オリゴヌクレオチドアレイは 50 ~ 70 - m e r のオリゴヌクレオチド捕捉プローブから構成され、インクジェットまたはロボット式プリンティングにより作製される。短鎖オリゴヌクレオチドアレイは 20 ~ 25 - m e r のオリゴヌクレオチドプローブから構成され、フォトリソグラフィー合成 (A f f y m e t r i x) またはロボット式プリンティングにより作製される。

【 0 0 7 3 】

[00127] ある態様において、定量 R T - P C R の使用が望ましい。定量 R T - P C R (q R T - P C R) はポリメラーゼ連鎖反応の改変であり、ポリメラーゼ連鎖反応の生成物の量を迅速に測定するために用いられる。q R T - P C R は一般に、m i R などの遺伝子配列が試料中に存在するかどうかを決定し、もしそれが存在するならば試料中のコピー数を決定する目的で用いられる。m i R N A を含めた核酸分子の発現を決定できる P C R

50

法はいずれも本発明の範囲に含まれる。q R T - P C R 法の幾つかの変法が当技術分野で知られており、それらのうち 3 つを以下に記載する。

【 0 0 7 4 】

[00128] 定量ポリメラーゼ連鎖反応の方法には、アガロースゲル電気泳動、 S Y B R Green (二本鎖DNA色素) の使用、および蛍光レポータープローブの使用によるものが含まれるが、これらに限定されない。後 2 つはリアルタイムで分析できる。

【 0 0 7 5 】

[00129] アガロースゲル電気泳動について、未知試料、および既知濃度の類似サイズの増幅用標的DNA断片を含む既知試料を調製する。両反応を同じ長さの時間、同一条件で行なう(好ましくは、同じプライマー、または少なくとも同様なアニーリング温度のプライマーを使用)。アガロースゲル電気泳動を用いて、反応の生成物をそれらの元のDNAおよび余分なプライマーから分離する。既知試料と未知試料の相対量を測定して、未知試料の量を決定する。10

【 0 0 7 6 】

[00130] S Y B R Green 色素の使用はアガロースゲル法より正確であり、結果をリアルタイムで得ることができる。DNA結合色素はすべての新たに合成された二本鎖DNAを結合し、蛍光強度の増大が測定されるので、初期濃度を決定できる。しかし、S Y B R Green は何らかの予期せぬ P C R 生成物およびプライマーニ量体を含めてすべての二本鎖DNAを標識し、その結果、混乱およびアーチファクトの可能性が生じる。この反応は、蛍光性二本鎖DNA色素を添加して通常どおり調製される。反応を実施し、20 蛍光レベルをモニターする(この色素は二本鎖DNAに結合した場合にのみ蛍光を発する)。標準試料または標準曲線を基準として、P C R における二本鎖DNA濃度を決定することができる。

【 0 0 7 7 】

[00131] 蛍光レポータープローブ法は、すべての二本鎖DNAではなくプローブ配列のみを定量するために、配列特異的な核酸に基づくプローブを使用する。それは一般に、隣接位置に保持された蛍光レポーターおよびクエンチャーレポーターを含むDNAに基づくプローブ(いわゆる二重標識プローブ)を用いて実施される。レポーターがクエンチャーに近接していると、その蛍光発生が阻止される; 蛍光が検出されるのはプローブが分解した際のみである。このプロセスは、関与するポリメラーゼの 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性に依存する。30

【 0 0 7 8 】

[00132] リアルタイム定量 P C R 反応は、二重標識プローブを添加して調製される。二本鎖DNA鑄型が変性すると、プローブは鑄型DNAの目的領域内のその相補配列に結合できる。P C R 反応混合物を加熱してポリメラーゼを活性化すると、ポリメラーゼはプライミングされた一本鎖鑄型DNAに対する相補鎖を合成し始める。重合が継続するのに伴って、それはその相補配列に結合しているプローブに到達し、次いでポリメラーゼの 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性のため加水分解され、これにより蛍光レポーター分子とクエンチャーレポーター分子が分離する。その結果、蛍光が増大し、それを検出する。リアルタイム P C R 反応の温度サイクリングに際して、各 P C R サイクル中に加水分解された二重標識プローブから放出される蛍光の増大をモニターし、これによってDNAの最終量、したがって初期量の精確な決定が可能になる。40

【 0 0 7 9 】

[00133] ある態様において、インサイチュハイブリダイゼーションの使用が望ましい。インサイチュハイブリダイゼーション(I S H)は、核酸ハイブリダイゼーションの技術を単細胞レベルに適用して外挿し、細胞化学、免疫細胞化学および免疫組織化学の技術と組み合わせて、維持および同定すべき形態の維持および細胞マーカーの同定を行なうことができ、配列を集団、たとえば組織および血液試料内の特定の細胞に位置決定することができる。I S H は、相補的核酸を用いて、1 以上の特定の核酸配列を組織の一部または切片に(インサイチュ)、あるいは組織が十分に小さければ全組織に(全マウント I S H)50

) 位置決定するタイプのハイブリダイゼーションである。RNAISHを用いて、組織における発現パターン、たとえばmiRNAの発現をアッセイすることができる。

【0080】

[00134] 試料細胞または組織を処理してそれらの透過性を高め、プローブ、たとえばmiRNA特異的プローブが細胞に侵入できるようにする。処理した細胞にプローブを添加し、適切な温度でハイブリダイズさせ、過剰のプローブを洗浄除去する。相補的プローブを放射性、蛍光性または抗原性タグで標識し、これにより、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡検査またはイムノアッセイを用いて組織中のプローブの位置および量を決定することができる。試料は本明細書に記載するいずれかの試料、たとえば非癌組織試料または癌組織試料であってもよい。miR-155ファミリーメンバーの配列は既知であるので、プローブがmiR-155を特異的に結合するようにmiR-155プローブを設計できる。

10

【0081】

[00135] ある態様において、インサイチュPCRの使用が望ましい。インサイチュPCRはISH前の標的核酸配列のPCRに基づく增幅である。RNAの検出のために、インサイチュPCRの前に細胞内逆転写段階を導入してRNA錆型から相補的DNAを作製する。これによって低コピーのRNA配列の検出が可能になる。

【0082】

[00136] インサイチュPCRの前に、細胞または組織試料を固定し、透過処理して、形態を保存しつつPCR試薬が細胞内の増幅すべき配列に到達できるようにする。次いで、懸濁状態に保持した無傷細胞において、または直接に細胞遠心調製物もしくはスライドガラス上の組織切片において、標的配列のPCR増幅を実施する。前者の方法では、PCR反応混合物中に懸濁した固定された細胞を、一般的なサーマルサイクラーを用いて温度サイクリングする。PCRの後、細胞をスライドガラス上に細胞遠心し、細胞内PCR生成物をISHまたは免疫組織化学により視覚化する。スライドガラス上のインサイチュPCRは、試料にカバーガラス下でPCR混合物を積層し、次いで反応混合物の蒸発を阻止するためにこれをシールすることにより実施される。温度サイクリングは、一般的または特別に設計されたサーマルサイクラーの加熱ブロック上に直接にスライドガラスを置くことにより、あるいは温度サイクリングオープンを用いることにより、達成できる。

20

【0083】

30

[00137] 細胞内PCR生成物の検出は、一般に2つの異なる手法のうちの一方により達成される；PCR生成物特異的プローブを用いるISHによる間接インサイチュPCR、またはISHを用いずに温度サイクリングに際してPCR生成物に取り込まれた標識ヌクレオチド（たとえば、ジゴキシゲニン-11-dUTP、フルオレセイン-dUTP、3H-CTPまたはビオチン-16-dUTP）の直接検出による直接インサイチュPCR。

【0084】

40

[00138] 予後の予測マーカーとしての、および治療剤同定のための、差示発現するmiRおよびmiRNAの使用。本明細書に、miR-155の特定の発現パターンが、状態指標と共に、特定の患者の生存予後の予測因子であることを開示する。本明細書中で用いる場合、“予後不良”は、一般に生存率の低下、または言い換えると死亡のリスクの増大または死亡までの期間の短縮を表わす。予後不良は、疾患の重症度の増大、たとえば他の臓器への癌の拡散（転移）の増大を表わすこともできる。他の態様において、各マーカーは対照と比較して少なくとも1.5倍の発現増大または低下を示す。1態様において、予後不良は野生型腫瘍対照像と比較して少なくとも2倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、または少なくとも4倍のマーカーの増加または減少によって示される。

【0085】

[00139] 候補薬剤をスクリーニングして疾患を処置するための治療剤を同定する方法は当技術分野で周知である。RNAおよびタンパク質の発現レベルを検出する方法は当技

50

術分野で既知であり、本明細書に記載されており、たとえばマイクロアレイ分析、R T - P C R (q R T - P C R を含む) 、インサイチュハイブリダイゼーション、インサイチュ P C R 、およびノーザンプロット分析であるが、これらに限定されない。1 態様において、スクリーニングにはハイスループットスクリーニングが含まれる。別の態様において、候補薬剤は個別にスクリーニングされる。

【 0 0 8 6 】

[00140] 候補薬剤は、いずれかのタイプの分子、たとえば核酸分子、タンパク質、ペプチド、抗体、脂質、低分子、化学物質、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、または癌の疾患状態（複数可）を直接または間接的に変化させることができる他のいずれのタイプの分子であってもよいが、これらに限定されない。 10

【 0 0 8 7 】

[00141] 一般に、内因性遺伝子、m i R N A または m R N A は細胞において調節される。特定の態様において、核酸配列は表 1 に挙げる 1 以上の m i R N A 配列に対して核酸配列が少なくとも 7 0 、 7 5 、 8 0 、 8 5 、 9 0 、 9 5 または 1 0 0 % 同一である少なくとも 1 つのセグメントを含む。内因性遺伝子、m i R N A または m R N A の発現またはプロセシングの調節は、m R N A のプロセシングの調節による可能性があり、そのようなプロセシングには細胞内の転写、輸送および / または翻訳が含まれる。調節は、細胞、組織または臓器についての m i R N A 活性の阻害または増強により行なわれる可能性もある。 20 そのようなプロセシングは、コードされる生成物の発現または m R N A の安定性に影響を及ぼす可能性がある。さらに他の態様において、核酸配列は修飾された核酸配列を含むことができる。特定の観点において、1 以上の m i R N A 配列は修飾された核酸塩基または核酸配列を含む (include or comprise) ことができる。 20

【 0 0 8 8 】

[00142] 本発明の方法において、細胞または他の生物体、たとえば生物（患者を含む）に、細胞内に入った時点で対応する m i R N A として機能する核酸分子を投与することにより、m i R N A 、または特定の m i R N A に対応する m i R N A 分子をその細胞または生物に供給できることは理解されるであろう。細胞に供給される分子の形態は、細胞内に入った時点で m i R N A として作用する形態でなくてもよい。したがって、ある態様において、生物体に合成 m i R N A または非合成 m i R N A 、たとえば細胞の m i R N A プロセシング機構に到達した時点でプロセシングされて成熟した活性 m i R N A になるものを供給することが考慮される。特定の態様において、具体的には、生物体に供給された m i R N A 分子が成熟 m i R N A 分子ではなく、m i R N A プロセシング機構に到達できる状態になった時点でプロセシングされて成熟 m i R N A になることができる核酸分子であることが考慮される。m i R N A に関して、用語“非合成”は、その m i R N A が本明細書中で定める“合成されたもの”ではないことを意味する。さらに、合成 m i R N A の使用に関する本発明の態様において、対応する非合成 m i R N A の使用も本発明の観点として考慮され、逆も成り立つと考えられる。ある薬剤を“供給すること”という用語が薬剤を患者に“投与すること”を含めて用いられることは理解されるであろう。 30

【 0 0 8 9 】

[00143] 特定の態様において、方法には細胞または生物において m i R N A を標的として調節することも含まれる。用語“m i R N A を標的として調節すること”は、選択した m i R N A を調節するために本発明の核酸が用いられるることを意味する。ある態様において、調節は、標的とした m i R N A に対応する合成または非合成 m i R N A を用いて達成され、これにより、標的とした m i R N A を細胞または生物に効果的に供給する（正の調節）。他の態様において、調節は m i R N A 阻害剤を用いて達成され、これにより、細胞または生物において標的とした m i R N A を効果的に阻害する（負の調節）。 40

【 0 0 9 0 】

[00144] ある態様において、標的とされ調節される m i R N A は疾患、状態または経路に影響を及ぼす m i R N A である。特定の態様において、その m i R N A が標的とされるのは、標的とされた m i R N A の負の調節により処置を提供できるからである。他の 50

態様において、そのm i R N Aが標的とされるのは、標的とされしたm i R N Aの正の調節により処置を提供できるからである。

【0091】

[00145] 本発明の特定の方法には、標的としたm i R N Aの調節に関連する処置を必要とするかあるいは本明細書中に述べた生理的または生物学的結果（たとえば、細胞生存性の低下のような特定の細胞経路または結果に関連するもの）を必要とする細胞、組織、臓器または生物（“生物体”と総称）に、選択したm i R N A調節剤を投与するというさらなる工程がある。したがって、本発明のある方法には、m i R N A調節剤（複数可）により提供できる処置を必要とする患者を同定する工程がある。ある態様において、有効量のm i R N A調節剤を投与できると考えられる。特定の態様において、生物体に付与される治療的利益があり、ここで、“治療的利益”は、疾患または状態に関連する1以上の状態または症状の改善、あるいは疾患に関する予後、持続時間、または状態の改善を表わす。治療的利益には痛みの軽減、罹患率の低下、症状の軽減が含まれるが、これらに限定されないと考えられる。たとえば、癌に関して、治療的利益は下記であってもよいと考えられる：腫瘍増殖の阻害、転移の阻止、転移数の低減、癌細胞増殖の阻害、癌細胞増殖の阻害、癌細胞における細胞死の誘導、癌細胞付近の血管新生の阻害、癌細胞のアポトーシスの誘導、痛みの軽減、再発のリスクの軽減、癌細胞の化学物質感受性もしくは放射線感受性の誘導、寿命の延長、および／または癌と直接もしくは間接的に関連する死亡の遅延。10

【0092】

[00146] さらに、m i R N A組成物を療法の一部として、伝統的な療法または予防剤と併せて、患者に供給できると考えられる。さらに、療法に関して述べたいずれかの方法を、特に、潜在的にその療法を必要とするかまたは療法を必要とする状態もしくは疾患のリスクがあると同定された患者に予防的に適用できると考えられる。20

【0093】

[00147] さらに、本発明の方法は、m i R N Aに対応する1以上の核酸、および治療薬を使用することに関する。その核酸は、薬の効果もしくは有効性を増強し、いずれかの副作用もしくは毒性を軽減し、その生物学的利用能を改変し、および／または必要な投与量もしくは頻度を減らすことができる。特定の態様において、治療薬は癌療法剤である。したがって、ある態様において、患者の癌を処置する方法であって、癌療法剤、および癌療法剤の有効性を改善するかまたは非癌細胞を保護する有効量の少なくとも1つのm i R N A分子を患者に投与することを含む方法がある。癌療法は、化学物質および放射線の両方に基づく処置との多様な併用療法も含む。併用化学療法にはたとえば下記のものが含まれるが、それらに限定されない：ベバシズマブ(bevacizumab)、シスプラチン(cisplatin)30
(CDDP)、カルボプラチン(carboplatin)、E G F R 阻害剤(ゲフィチニブ(gefitinib)およびセツキシマブ(cetuximab))、プロカルバジン(procarbazine)、メクロレタミン(mechlor ethamine)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、カンプトテシン(camptothecin)、C OX-2阻害剤(たとえばセレコキシブ(celecoxib))、イホスファミド(ifosfamide)、メルファラン(melphalan)、クロラムブシリ(chlorambucil)、ブルスルファン(busulfan)、ニトロソウレア(nitrosurea)、ダクチノマイシン(dactinomycin)、ダウノルビシン(daunorubicin)、ドキソルビシン(doxorubicin)(アドリアマイシン(adriamycin))、ブレオマイシン(bl eomycin)、プリコマイシン(plicomycin)、マイトイマイシン(mitomycin)、エトポシド(etop oside) (VP16)、タモキシafen(tamoxifen)、ラロキシafen(raloxifene)、エストロゲン受容体結合剤、タキソール(taxol)、タキソテール(taxotere)、ゲムシタビエン(gemcitabine)、ナベルビン(navelbine)、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチン(transplatinum)、5 - フルオロウラシル、ビンクリスチシン(vincristin)、ビンブラスチシン(vinblastin)およびメトトレキセート(methotrexate)、または以上のいのいずれかの類似体もしくは誘導バリエント。40

【0094】

[00148] 一般に、m i R N Aの阻害剤を投与して、成熟m i R N Aに対応する核酸分子を投与した場合と比較して反対の効果を達成することができる。同様に、成熟m i R N50

Aに対応する核酸分子を投与して、m i R N A 阻害剤を投与した場合と比較して反対の効果を達成することができる。たとえば、細胞増殖を増大させるm i R N A 分子を細胞に供給して増殖を増大させることができ、あるいはそのような分子の阻害剤を細胞に供給して細胞増殖を低下させることができる。本発明は、本明細書に開示する種々のm i R N A 分子およびm i R N A 阻害剤についてみられる種々の生理的効果について、これらの態様を考慮する。これらには下記の生理的効果が含まれるが、それらに限定されない：細胞増殖の増大または低下、アポトーシスの増大または低下、トランスフォーメーションの増大、細胞生存性の増大または低下、生存細胞数の減少または増加、ならびに細胞周期の特定の時期における細胞数の増加または減少。本発明方法は一般に、1つ以上の異なるm i R N A 分子に対応する1つ以上の異なる核酸分子を供給または導入することを含むと考えられる。下記の、少なくとも下記の、または最大で下記の数の異なる核酸分子を供給または導入することができると考えられる：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、1 10
5、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、3
5、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、5
5、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、7
5、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、9
5、96、97、98、99、100、またはその中で派生できるいすれかの範囲。これは、細胞に供給または導入することができる異なるm i R N A 分子数にも適用される。

【0095】

[00149] 本発明の原理および実施様式をその好ましい態様において説明および例示した。ただし、本発明はその範囲から逸脱することなく、具体的に説明および例示したものとは別の形で実施できることが理解されなければならない。 20

【実施例】

【0096】

[00150] 実施例

[00151] 実施例 1

[00152] 材料および方法

[00153] 細胞培養およびトランスフェクション

[00154] C o l o - 3 2 0 D M 、 S W 6 2 0 、 S W 4 8 0 、 H C T - 1 1 6 および R K O 結腸直腸癌 (C R C) 細胞 (American Type Culture Collection A T C C , バージニア州マナッサス) を R P M I 1 6 4 0 (G i b c o , カリフォルニア州カールズバッド) 中で培養し、パッケージング細胞 2 9 3 T N (S y s t e m B i o s c i e n c e s , カリフォルニア州マウンテンビュー) を D M E M (G i b c o , カリフォルニア州カールズバッド) 中で増殖させた。 L o v o + c h r 2 h M S H 2 + / 2 および L o v o (D T 4 0 . 2) - 4 - 1 h M S H 2 2 / 2 - 1 を、 7 0 0 m g / m l の G 4 1 8 (G i b c o) を含有する I M D M (G i b c o , カリフォルニア州カールズバッド) 中で増殖させた。すべての細胞に 1 0 % のウシ胎仔血清 (S i g m a , ミズーリ州セントルイス) + 抗生物質を補充した。細胞をマイクロプラズマ汚染について定期的に検査し、常に陰性であった。細胞を 6 ウェルプレート内で L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n , カリフォルニア州カールズバッド) を用いて製造業者のプロトコルに従ってトランスフェクションした。過剰発現試験のために、特異的 m i R N A または対照オリゴヌクレオチド前駆体を A m b i o n (テキサス州オースチン) から購入し、 5 0 n M で用いた。 h M S H 2 および h M S H 6 に対するオンターゲット - プラス s i R N A (D h a r m a c o n , C O) を対照として用いた。サイレンシング実験のために、 m i R C U R Y L N A ^T M 抗 - m i R - 2 1 または対照 m i R C U R Y ノックダウンプローブ (E x i q u o n , デンマーク、 V e d b a e k) を 5 0 n M で用いた。 m i R N A 発現を、 4 8 時間後に、以下に記載する定量リアルタイム P C R により確認した。全長 M S H 2 c D N A をコードするプラスミドを O r i g e n e から購入した。 m i R - 2 1 シード領域に対する h M S H 2 変異体を Q u i k C h a n g e 部位特異的変異導入キット (S t r a t a g e n e , カリフォルニア州サンディエゴ) により調製した (表 2) 。 30 40 50

【0097】

【表2】

表2.クローニングに用いたプライマーのリスト		
プライマーノム	プライマー Fw 5'-3'	プライマー Rv 5'-3'
SEQ ID NOS 1 と 6 <i>hMSH2-LUC-WT</i>	CAGAAAGCCCTGGAACCTGA	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 2 と 7 <i>hMSH2-LUC-MUTANT</i>	TITCCATAGTGTAACTGTCAGTG C	TCAATTGCAAACAGTCCTCAG
SEQ ID NOS 3 と 8 <i>hMSH2-cDNA-変異体</i>	CCCAGTAATGGAATGAAGGGTCT GTAATAGTTTATATTG	CAATATAAAACTATTACAGACC CTTCATTC CATTACTGGG
SEQ ID NOS 4 と 9 <i>hMSH6-LUC-WT</i>	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	TAGCTTTCTCCTCCCCCATTT
SEQ ID NOS 5 と 10 <i>hMSH6-LUC-変異体</i>	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	CCACCTTGTCAGAAGTCAACTC

【0098】

[00155] ルシフェラーゼアッセイ

[00156] *hMSH2* および *hMSH6* の 3' - UTR 内の推定 miRNA 結合部位を、以下のようにホタルルシフェラーゼ遺伝子の下流にクローニングした。SW-480 細胞に由来する相補的 DNA (cDNA) およびゲノムDNAを、それぞれ *hMSH2* および *hMSH6* クローニングのための特異的プライマー（表2）を用いるPCRにより増幅した。次いで生成物を Spe I および Sac II (New England Biolabs, マサチューセッツ州イプスウィッチ) で消化し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の終止コドンの直下流に Spe I および Sac II 部位を有するように予め改変した pGL3 対照ベクター (Promega, ワイオミング州マディソン) に挿入した。変異miRNA 認識配列を含むレポーター構築体をそれぞれの単一遺伝子について構築した (MUT-21)。*hMSH2* および *hMSH6* の両方の miR-21 のシード領域について、シード領域相補的部位を除外するために推定 miRNA 結合部位の上流または下流に配置したプライマーを用いて、変異構築体を得た。

【0099】

[00157] Colo-320DM および SW480 細胞を、12ウェルプレートにおいて、1 μg の pGL3 ホタルルシフェラーゼレポーター対照ベクター、0.1 μg の pH RL-SV40 対照ベクター (Promega, ワイオミング州マディソン)、および 50 nM の miRNA、対照前駆体、miR-21 に対する LNA、または LNA 対照で、共トランスクレクションした。トランスクレクションの 24 時間後に、二重ルシフェラーゼアッセイ (Promega) を用いてホタルおよびウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼ活性を連続測定した。

【0100】

[00158] ウェスタンプロット法

[00159] イムノプロット分析のために、氷冷した細胞溶解用緩衝液 + プロテアーゼ阻害剤 (Cell Signaling Technology Inc., マサチューセッツ州ダンバース) で細胞を溶解した。等量のタンパク質を、4 × SDS-PAGE 試料用緩衝液に溶解して混合し、4% - 20% および 7.5% 直線勾配 Tris-HCl Criterion Precast Gels (Bio-Rad) で電気泳動し、ニトロセルロース膜または PVDF 膜 (Bio-Rad) に移した。膜を Tris 緩衝化生理食塩水, pH 7.4 (0.05% の Tween 20 を含有) 中の 5% 脱脂粉乳でブロッキングし、製造業者の指示に従って一次および二次抗体と共にインキュベートした。下記の一次抗体を用いた：マウスモノクローナル抗-*MSH2* (1:200, Invitrogen)、マウスモノクローナル抗-*MSH6* (1:500, BD Biosciences)。

10

20

30

40

50

, カリフォルニア州サンノゼ)、マウスモノクローナル抗アクチン(1:5000, Sigma)、マウスモノクローナル抗-GAPDH(1:1000, Santa Cruz Biotechnology)。

【0101】

[00160] 成熟m i R N Aおよび遺伝子についてのリアルタイムPCR

[00161] 全RNAをTrizol (Invitrogen)で単離した。成熟m i RNAを単一チューブTaqManマイクロRNAアッセイにより評価し、一方、目的とするm RNAの発現を遺伝子発現アッセイにより下記のプローブを用いて評価した：h MSH2 = Hs00953523_m1、h MSH6 = Hs00943001_m1 (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスター・シティー)。m i RNA発現をRNU44およびRNU48の発現に対して正規化した。遺伝子発現をビンキュリン(vinculin)に対して正規化した。すべてのレトロトランスクリプターゼ(RT)反応(鑄型なし対照およびRTマイナス対照を含む)を、GeneAmp PCR 9700サーモサイクラー(Applied Biosystems)内で実施した。別に明記しない限り、各試料を三連で試験した。10

【0102】

[00162] ノーザンプロット法

[00163] 成熟m i RNA検出のために、前記2のようにアクリルアミドノーザンプロット法を実施した。20

【0103】

[00164] ホルマリン固定、パラフィン包埋した組織切片のm i RNAロックト核酸(locked nucleic acid) (LNA) インサイチュハイブリダイゼーション

[00165] 50の正常および癌の大腸コアを含む大腸癌組織アレイ(US Biomax BC05118)上で、前記3のようにインサイチュハイブリダイゼーション(ISH)によりマイクロRNA検出を二連で実施した。陰性対照はプローブの除外およびスクランブルLNAプローブの使用を含んだ。m i RNAについてのインサイチュハイブリダイゼーションの後、h MSH2 (Ventana cat #760-4265)に最適な条件を用いてスライドを免疫組織化学分析した。免疫組織化学のために、本発明者らはVentana Medical Systems(アリゾナ州タクソン)のUltra sensitive Universal Fast Redシステムを用いた。代表的スポットの写真をNuanceシステム(Ventana)で撮影した。癌のコアを、コア内の陽性細胞数に基づいてm i R - 21およびh MSH2タンパク質の発現について採点した。30

【0104】

[00166] 組織採取

[00167] 83の一連のCRC症例からの腫瘍組織および正常隣接組織に由来する新鮮凍結組織を、Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori(イタリア、Meldola)において倫理委員会の承認後に採集した。タンパク質およびRNA抽出のための細胞溶解物を上記のように抽出した。40

【0105】

[00168] 細胞周期分析およびアポトーシス分析

[00169] ヨウ化プロピジウム(PI)染色：細胞をトリプシンで剥離させ、冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)-5% FCSで洗浄し、次いで70%エタノール中で24時間固定した。PBSで洗浄した後、細胞を1g/mlのPIと共に25℃で3時間インキュベートした後、Coulter Epics XLフローサイトメーター(Beckman Coulter, カリフォルニア州フラートン)によりFACS分析した。細胞のDNA含量が<2Nである場合にはそれらをアポトーシスとみなした。アネキシンV染色：細胞をトリプシンで剥離させ、PBS-5% FCSで洗浄し、次いで0.14MのNaCl、2.5mMのCaCl₂および0.01MのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(pH 7.4)を含有する結合用緩衝液に入れ、これに50

7 - アミノ - アクチノマイシンD (7 - A A D) およびアネキシンV - F I T C (Ph a r m i n g e n , カリフォルニア州サンディエゴ) を添加した後、F A C S 分析した。アネキシンV - F I T C 陽性および7 - A A D 陰性である場合には、細胞をアポトーシスとみなした。

【 0 1 0 6 】

[00170] 同期実験を以下のように実施した：L o v o - M S H 2 陽性、L o v o - M S H 2 陰性、S W 6 2 0 およびC o l o - 3 2 0 D M 細胞を、集密化および48時間4の低血清処理によってG 0 - G 1 に停止させることにより同期し、次いで細胞をトリプシンで解離させ、計数し、P r e - m i R - 対照、P r e - m i R - 2 1 、h M S H 2 に対するs i R N A 、s i R N A - 対照、および全長M S H 2 c D N A をコードするベクター (m i R - 2 1 シード領域を含むもの、または含まないもの) で、C e l l N u c l e o f e c t o r (登録商標) キット (Lonza Walkersville , Inc M E) またはL i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 T M (Invitrogen , カリフォルニア州カールズバッド) を用いて、製造業者の指示に従ってトランスクレクションし、10%のF B S を含有する培地に再播種した。解除後16時間目 (S 期進入直前であるがp 5 3 仲介G 1 - S 細胞周期チェックポイント後の時点に相当する) に5 - フルオロウラシル (5 0 u g / m l 5) 添加を行なった。

【 0 1 0 7 】

m i R - 2 1 を過剰発現する安定クローンの作製

[00172] L o v o - M S H 2 陽性およびL o v o - M S H 2 陰性細胞に、2つの異なるプロモーターの制御下にある全長m i R - 2 1 およびG F P 遺伝子を含むp C D H - C M V - M C S - E F 1 - m i R N A 発現プラスミド (System Biosciences , カリフォルニア州マウンテンビュー) を安定感染させた。空のベクターを対照として用いた。P r e - m i R - 2 1 発現構築体および対照構築体を、p P A C K H 1 L e n t i v e c t o r パッケージングプラスミドミックス (System Biosciences) で293 - TNパッケージング細胞株にパッケージした。P E G - i t T M ウイルス沈降溶液を用いてウイルスを濃縮し、U l t r a R a p i d レンチウイルス力価測定キット (System Biosciences) を用いて力価を分析した。感染細胞をF A C S 分析 (F A C S Calibur , B e cton D i c k i n s o n I m munocytometry Systems) により選択した。感染効率 > 9 0 % を蛍光顕微鏡検査により証明し、さらにリアルタイムP C R によりm i R - 2 1 発現を確認した。

【 0 1 0 8 】

異種移植試験

[00174] 施設のガイドラインに従って動物試験を実施した。m i R - 2 1 、h M S H 2 に対するs i R N A 、または対照としての空のベクターのいずれかをコードするレンチウイルスベクターを感染させたL o v o M S H 2 陽性細胞、および空のウイルスを感染させたL o v o h M S H 2 陰性細胞を、ヌードマウスの腹部に注入した (5 × 1 0 ⁶) 。異種移植片 (各グループにつき6匹の動物) が触知可能な体積に達した時点で、5 - F U (5 0 m g / k g / 日) を週5日連続、2週間の腹腔内注射により投与した。腫瘍体積を処置開始時、次いで週1回測定した。推定腫瘍体積 (V) を次式により計算した : V = W 2 × L × 0 . 5 ; ここで、Wは最大の腫瘍直径 (センチメートル) を表わし、Lは次の最大の腫瘍直径を表わす。個々の相対腫瘍体積 (relative tumor volume) (R T V) を以下のように計算した : R T V = V × / V 1 ; ここで、V × は所定の時点での体積 (立方ミリメートル) であり、V 1 は処置開始時の体積である。

【 0 1 0 9 】

実施例 2

[00176] M i R - 2 1 はh M S H 2 およびh M S H 6 タンパク質発現を直接標的とする

[00177] インシリコ分析により、m i R - 2 1 がh M S H 2 およびh M S H 6 m R

10

20

30

40

50

N Aを標的とする可能性があることが示された(Target Scan , Whitehead Institute , MIT , 図 1 A)。本発明者らは、 h M S H 2 (N C B I NM_000249 . 2) および h M S H 6 (N C B I NM_000179 . 2) 3 ' - U T R の両方において、 m i R - 2 1 に対する推定結合部位を同定した。本発明者らは、 m i R - 2 1 発現が内因性 h M S H 2 および h M S H 6 mRNA 発現に及ぼす影響を C R C C o l o - 3 2 0 D M 細胞および S W 6 2 0 細胞において調べた。両細胞株は低い基礎 m i R - 2 1 発現を示す。本発明者らはこれらの細胞株を m i R - 2 1 前駆体 (m i R - 2 1) またはスクランブル m i R 前駆体対照でトランスフェクションした (図 6) 。 h M S H 2 (抗 - M S H 2) または h M S H 6 (抗 - M S H 6) に対する特異的な低分子干渉 RNA (s i R N A) の過剰発現は、 m i R - 2 1 のレベルに影響を及ぼさなかつた (図 6 A) 。 h M S H 2 および h M S H 6 の mRNA レベルは、 m i R - 2 1 の過剰発現によって影響を受けなかつた (図 1 B) 。これに対し、抗 - M S H 2 および抗 - M S H 6 s i R N A は、それぞれ h M S H 2 および h M S H 6 mRNA の発現を特異的に低下させた (図 1 B) 。本発明者らは、 h M S H 6 mRNA 発現が抗 - M S H 2 s i R N A によって一貫して低下することを認める。この低下は抗 - M S H 2 s i R N A の h M S H 6 mRNA との縮重ハイブリダイゼーション、またはヘテロ二量体タンパク質パートナー h M S H 2 の減少から起きた h M S H 6 mRNA の安定性低下の結果である可能性がある。この結果は、 m i R - 2 1 過剰発現が h M S H 2 または h M S H 6 の mRNA レベルに影響を及ぼさないことを示す。

【 0 1 1 0 】

10

[00178] 本発明者らは、 m i R - 2 1 を C o l o - 3 2 0 D M 細胞および S W 6 2 0 細胞にトランスフェクションした後の h M S H 2 および h M S H 6 のタンパク質レベルをウェスタンプロット分析により調べた (図 1 C , 図 6 B) 。 h M S H 2 および h M S H 6 タンパク質は、スクランブル m i R と比較して m i R - 2 1 を過剰発現する細胞において有意に減少した。抗 - M S H 2 および抗 - M S H 6 s i R N A を、これらの細胞株に並行してトランスフェクションした。本発明者らは、 m i R - 2 1 でトランスフェクションした細胞が、 s i R N A でトランスフェクションした細胞に匹敵するとと思われる h M S H 2 および h M S H 6 の下方調節を示すことを観察した。逆に、本発明者らは、高レベルの内因性 m i R - 2 1 を含む C R C S W 4 8 0 、 H C T 1 1 6 および R K O 細胞を、 m i R - 2 1 に対するロックト核酸 (L N A) (抗 - m i R - 2 1) またはスクランブル L N A (抗 - m i R 対照) でトランスフェクションした。本発明者らは、抗 - m i R - 2 1 でトランスフェクションした細胞が h M S H 2 および h M S H 6 両方のタンパク質発現の増加を示し (図 1 D ; 図 7 B) 、一方、 mRNA レベルには変化がみられない (図 7 C) ことを見出した。

20

【 0 1 1 1 】

30

[00179] h M S H 2 または h M S H 6 の 3 ' U T R 全体をルシフェラーゼ遺伝子の下流にサブクローニングした。次いで、このルシフェラーゼレポーター構築体を m i R - 2 1 前駆体 (m i R - 2 1) またはスクランブル m i R と共に C o l o - 3 2 0 D M 細胞にトランスフェクションした。本発明者らは、それぞれ h M S H 2 または h M S H 6 に対する m i R - 2 1 シード領域を含む構築体について、 5 0 % および 3 7 % のルシフェラーゼ活性低下を観察した (p < 0 . 0 0 1 ; 図 1 E) 。 m i R - 2 1 シード領域を欠失させると、 h M S H 2 または h M S H 6 を含む両ベクターについてルシフェラーゼ活性が回復した (図 1 E) 。本発明者らは、高レベルの m i R - 2 1 発現を示す S W 4 8 0 細胞を、野生型 (W T) または変異 (变異体) h M S H 2 および h M S H 6 3 ' - U T R シード領域を含むルシフェラーゼレポーターベクターでトランスフェクションした (図 1 F) 。予想どおり、本発明者らは、 m i R - 2 1 結合部位を除去すると、 h M S H 2 および h M S H 6 ベクターでトランスフェクションした細胞は両方ともルシフェラーゼ活性が増大することを見出した。これらの所見を確認するために、 S W 4 8 0 細胞を h M S H 2 および h M S H 6 3 ' - U T R ルシフェラーゼレポーター + L N A 抗 - m i R - 2 1 または抗 - m i R 対照で共トランスフェクションした。 m i R - 2 1 の L N A サイレンシングはル

40

50

シフェラーゼ活性の増大を誘導した(図1F)。全体として考慮すると、この結果は、m i R - 2 1がh M S H 2およびh M S H 6 3' - U T Rに直接作用を及ぼし、それが最終的にh M S H 2およびh M S H 6タンパク質発現を調節することを示す。h M S H 2タンパク質状態はh M S H 6タンパク質の安定性および発現に影響を及ぼす可能性があるので(9)、本発明者らはm i R - 2 1調節およびh M S H 2タンパク質損失がh M S H 6下方調節に寄与するという可能性を除外できない。

【0112】

[00180] 実施例3

[00181] m i R - 2 1はC R C組織におけるM M Rコアタンパク質h M S H 2に逆相関する

10

[00182] 本発明者らは、2つの異なるC R Cコホートにおけるm i R - 2 1およびh M S H 2発現を調べた(図2)。50の未選択C R C症例および対となる正常隣接組織を含む組織マイクロアレイを、h M S H 2タンパク質に対する免疫組織化学的(I H C)染色と組み合わせて、L N A抗-m i R - 2 1または非特異的L N A抗-m i R対照とハイブリダイズさせた(図2A)。m i R - 2 1およびh M S H 2タンパク質両方の発現についてのスコアを、コア内の陽性細胞の割合によって求めた。50のコアのうち42を、腫瘍および対となる正常組織の整合分析のために利用できた。本発明者らは、腫瘍を対となる正常組織と比較した場合にこれらの症例のうち28(66%)においてm i R - 2 1が上方調節されていることを見出した。42(33%)のうち14の症例は、正常組織と比較して腫瘍においてh M S H 2の強い下方調節を伴っていた。これらすべての症例においてm i R - 2 1は上方調節されていることが見出された。このサブグループの患者におけるParson相関分析は、-0.82($p < 0.001$)のr値を示した。全コホートの症例についての相関分析は、-0.63のr値を示した。m i R - 2 1およびh M S H 2の両方について陽性のスコアを示したC R C組織は、同じ癌巣において共発現を示さなかった(参照:図2A, 共標識)。

20

【0113】

[00183] 本発明者らは、癌と正常な隣接組織を得ることができた第2コホートのC R C試料に由来する新鮮凍結腫瘍を調べた(図2B)。m i R - 2 1発現をノーザン分析およびR T - P C Rにより決定し、一方、h M S H 2タンパク質発現をウェスタン分析により決定した。26の症例が、正常な隣接組織と比較して腫瘍においてh M S H 2下方調節を示した。腫瘍を正常な隣接組織と比較した場合、これらの症例のうち24(90%)においてm i R - 2 1発現が増大していることを見出した。m i R - 155はh M S H 2および他のM M Rタンパク質の発現に影響を及ぼす可能性があるので、本発明者らはm i R - 155およびm i R - 2 1の同時過剰発現を示す症例(16症例)をこの分析から除外した。残り8症例において逆相関($r = -0.81$, $p < 0.02$)がなお顕著であり、これは、C R C腫瘍におけるm i R - 2 1過剰発現とh M S H 2下方調節の逆相関を強調する(図2B:図8)。

30

【0114】

[00184] 実施例4

[00185] m i R - 2 1は5-フルオロウラシル曝露後のG 2 / M停止およびアポトーシスを低下させる

40

[00186] M M R欠損細胞株は、5-フルオロウラシル(5-FU)を含めたさまざまな治療薬に対して耐性を示す。本研究では、耐性はD N Aへの5-FU代謝産物の取込みが欠損して損傷依存性のG 2 / M停止およびそれに続くアポトーシスの低下を生じる結果であることを証明した。本発明者らは、m i R - 2 1トランスフェクション後のC o l o - 3 2 0 D MおよびS W 6 2 0細胞において、5-FUにより誘導される細胞周期停止およびアポトーシスを調べた。本発明者らは、スクランブルm i Rを対照として用い、これらの結果をs i R N A抗-h M S H 2を用いた同様のトランスフェクションと比較した(図3)。本発明者らは、m i R - 2 1過剰発現が5-FUで処置した後の準G 1(アポトーシス)およびG 2 / M細胞の割合を低下させることを見出した。m i R - 2 1でトラン

50

スフェクションした細胞は、h M S H 2 に対する s i R N A でトランスフェクションした細胞と同様に、G 2 / M 停止およびアポトーシスの低下を示した（図 3）。5 - F U 仲介アポトーシスに対する m i R - 2 1 発現の影響を、さらに C o l o - 3 2 0 D M および S W 6 2 0 においてアネキシン V 染色で確認した（図 9）。類似の応答が同質遺伝子型の L o v o 細胞においてみられ、この場合は h M S H 2 変異 [L o v o (M S H 2 -)] が第 2 染色体の導入で相補された [L o v o (M S H 2 +)] （図 4）。m i R - 2 1 過剰発現は、h M S H 2 に対する s i R N A と同様に、L o v o (M S H 2 +) 細胞における準 G 1 および G 2 / M 蓄積を低下させ、一方、L o v o (M S H 2 -) 細胞では影響がみられなかった（図 4）。L o v o (M S H 2 +) および L o v o (M S H 2 -) 細胞を、全長 h M S H 2 c D N A をコードするプラスミドで共トランスフェクションすると、5 - F U により誘導されるアポトーシスおよび細胞周期停止が促進された。同じプラスミドを m i R - 2 1 と共にトランスフェクションすると、G 2 / M 停止およびアポトーシスが顕著に低下した（図 4）。さらに、h M S H 2 c D N A 中の標的部位を欠失させると、メッセージが m i R - 2 1 調節に対して不感受性になり、細胞は損傷により誘導される正常な G 2 / M 停止およびアポトーシスを保持した。全体として考慮すると、この結果は、m i R - 2 1 による h M S H 2 発現の下方調節は 5 - F U に対する細胞耐性を生じるという結論と一致する。
10

【 0 1 1 5 】

[00187] 実施例 5

[00188] 結腸直腸癌異種移植モデルにおいて m i R - 2 1 の過剰発現は 5 - F U 耐性を誘導する
20

[00189] この細胞研究は、m i R - 2 1 が h M S H 2 発現を低下させることによって 5 - F U によって誘導される G 2 / M 停止およびアポトーシスを阻害することを示した。本発明者らは、異種移植大腸癌腫モデルを開発した；その際、本発明者らは、L o v o (M S H 2 +) 細胞の、m i R - 2 1 を過剰発現する安定クローン [L o v o (M S H 2 +) - m i R - 2 1] または h M S H 2 に対する s i R N A を過剰発現する安定クローン [L o v o (M S H 2 +) - 抗 - M S H 2] を、レンチウイルス発現系を使用して作製した。L o v o (M S H 2 -) 細胞および空のベクターの安定挿入を含む L o v o (M S H 2 +) を対照として用いた。安定なレンチウイルス発現を含む細胞をヌードマウスの腹部に注入した（ 5×10^6 細胞）。異種移植片が触知可能な体積に達した時点で、5 - F U（ $50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ ）を週 5 日連続、2 週間の腹腔内注射により投与した。本発明者らは、空のベクターと比較して m i R - 2 1 または抗 - M S H 2 s i R N A を発現する L o v o (M S H 2 +) 腫瘍異種移植片において h M S H 2 の発現が劇的に低下することを確認した（図 4 A）。
30

【 0 1 1 6 】

【表 3】

表 1. インビボ実験の統計分析		1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目
Lovo(MSH2+)-miR-21		0.136	0.008	0.026	0.040	0.048	0.035
Lovo(MSH2+)-抗-MSH2		0.183	0.019	0.049	0.004	0.080	0.159
Lovo(MSh2)-空		0.186	<0.001	0.003	0.004	0.008	0.003

【 0 1 1 7 】

[00190] 5 - F U 処置は L o v o (M S H 2 -) 腫瘍異種移植片と比較して L o v o (M S H 2 +) 腫瘍異種移植片についてより有効であることが証明された（図 5；表 1）。この結果は、M M R 能をもつ(MMR-proficient)細胞はより良好に 5 - F U 療法に応答することを示す。重要なことに、m i R - 2 1 の安定過剰発現 [L o v o (M S H 2 +) -
40

m i R - 2 1] は、結果的に 5 - F U に対する応答を低下させ、 h M S H 2 に対する s i R N A を感染させた L o v o (M S H 2 +) 腫瘍細胞 [L o v o (M S H 2 +) - 抗 - M S H 2] のものに匹敵する腫瘍増殖速度をもたらした(図5;表1)。さらに、 5 - F U 中断(2週間)の後、 L o v o (M S H 2 +) - m i R - 2 1 感染細胞の腫瘍増殖は対照と比較して有意に大きいように思われた;これは、 m i R - 2 1 の過剰発現が癌の進行を促進したことを示す。合わせると、これらの結果は、 5 - F U 耐性において m i R - 2 1 依存性の h M S H 2 - h M S H 6 ヘテロ二量体 M M R タンパク質の下方調節が中心的役割をもつことを支持する。

【 0 1 1 8 】

[00191] P 値を示す;これらは、 T - 検定分析を用いて各グループを対照グループ(10 L o v o (M S H 2 +) - 空)と比較することにより計算した。

[00192] 実施例 6

[00193] 治療 / 予防方法および組成物

[00194] 本発明は、有効量の本発明の治療的アンチセンス m i R - 2 1 を併用療法と共にまたは併用療法なしに対象に投与することによる治療および予防の方法を提供する。好ましい観点において、療法剤は実質的に精製されている。対象は、好ましくは動物であり、ウシ、ブタ、ニワトリなどの動物が挙げられるが、これらに限定されず、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトである。

【 0 1 1 9 】

[00195] 多様な送達システムが知られており、本発明の療法剤を投与するために使用される;たとえば、リポソーム、マイクロ粒子、マイクロカプセル内への封入、組換え細胞による発現、受容体仲介エンドサイトーシス、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療的核酸の構築など。導入方法には皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、および経口経路が含まれるが、これらに限定されない。前記化合物はいずれかの都合のよい経路により、たとえば注入もしくはボーラス注射により、上皮もしくは粘膜皮膚内層(たとえば、口腔粘膜、直腸および腸の粘膜など)を介した吸収により投与され、他の生物活性薬剤と一緒に投与することができる。投与は全身または局所であってよい。さらに、脳室内およびクモ膜下注射を含めたいずれか適切な経路で本発明の医薬組成物を中枢神経系に導入することが望ましい場合がある;脳室内注射は、たとえば O m m a y a リザバーなどのリザバーに接続した脳室内カテーテルによって容易に行なうことができる。

【 0 1 2 0 】

[00196] 特定の態様において、処置を必要とする領域に本発明の医薬組成物を局所投与することが望ましい場合がある;これは、たとえば、限定ではなく、下記により達成できる:外科処置中の局所注入、たとえば外科処置後の創傷包帯と併せた局所適用、注射によるもの、カテーテルによるもの、坐剤によるもの、またはインプラントによるものであって、インプラントは多孔質、非孔質、またはゲル状材料のものであり、膜、たとえばシリカスティック(sialastic)膜、または繊維を含む。1態様において、投与は悪性腫瘍または新生組織もしくは前新生組織の部位(または以前の部位)に直接注射することによる。

【 0 1 2 1 】

[00197] 療法剤がタンパク質療法剤をコードする核酸である特定の態様において、その核酸を下記によりインビオ投与して、それがコードするタンパク質の発現を促進する:それを適宜な核酸発現ベクターの一部として構築してそれが細胞内になるように投与するか、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でコーティングすること、あるいはそれを核に侵入することが知られているホメオボックス様ペプチドに連結させて投与すること。あるいは、核酸療法剤を細胞内に導入し、相同組換えにより発現のために宿主細胞 D N A 内に組み込むことができる。

【 0 1 2 2 】

[00198] 本発明はまた、医薬組成物を提供する。そのような組成物は、治療的有効量の治療剤、および医薬的に許容できる担体または賦形剤を含む。そのような担体には生理

10

20

30

40

50

食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびその組合せが含まれるが、これらに限定されない。担体および組成物は無菌でありうる。その製剤は投与様式に適切なものであろう。

【0123】

[00199] 組成物は、所望により少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤をも含有することができる。組成物は、液剤、懸濁液剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、持続放出製剤、または散剤であってもよい。組成物は、伝統的な結合剤および担体、たとえばトリグリセリドを含む坐剤として製剤化することができる。経口製剤は標準的な担体、たとえば医薬グレードのマンニトール、乳糖、デンブン、ステアリン酸マグネシウム、サツカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含むことができる。 10

【0124】

[00200] 好ましい態様において、組成物はルーティンな操作に従って、ヒトへの静脈内投与に適合させた医薬組成物として製剤化される。一般に、静脈内投与のための組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合には、組成物は可溶化剤、および注射部位の痛みを和らげるための局所麻酔剤、たとえばリグノカインも含む。一般に、成分を個別に、または互いに混合して単位剤形で、たとえば凍結乾燥粉末もしくは無水濃縮物として、有効薬剤の量を指示した密封容器、たとえばアンプルまたはサッシュに入れて提供する。組成物を注入により投与する場合、無菌の医薬グレードの水または生理食塩水を収容した注入ボトルで分配すべきである。組成物を注射により投与する場合、成分を投与前に混合するために無菌の注射用水または生理食塩水のアンプルを提供する。 20

【0125】

[00201] 本発明の療法剤は、中性または塩の形で製剤化される。医薬的に許容できる塩類には、遊離アミノ基により形成されるもの、たとえば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるもの、および遊離カルボキシル基により形成されるもの、たとえば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化鉄(III)、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されるものが含まれる。

【0126】

[00202] 特定の障害または状態の処置に有効な本発明の療法剤の量は、その障害または状態の性質に依存し、標準的な臨床手法により決定される。さらに、最適用量範囲の同定を補助するために、場合によりインピトロアッセイを使用できる。製剤中に使用すべき厳密な用量は、投与経路および疾患または障害の重症度にも依存し、担当医の判断および各患者の状況に従って決定される。しかし、静脈内投与に適した用量範囲は、一般に活性化合物約20~500マイクログラム/kg体重である。鼻腔内投与に適した用量範囲は、一般に約0.01pg/kg体重~1mg/kg体重である。有効用量は、インピトロまたは動物モデル試験系から誘導される用量応答曲線から外挿できる。 30

【0127】

[00203] 本発明はまた、本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。場合によりそのような容器(複数可)は、医薬製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する当局が指示した形の注意書を伴ない、その注意書はヒトに投与するための製造、使用または販売の当局による承認を反映する。 40

【0128】

[00204] 実施例7

[00205] 癌患者を処置する方法

[00206] この実施例は、本発明の組成物による処置に対して好ましい応答を示す可能性が高い患者を選択および処置する方法を記載する。

【0129】

[00207] 癌を伴うと診断された患者は、通常はまず治癒を目的とした組織切除を受ける。患者から摘出した組織の一部から腫瘍試料を得る。次いで、低分子RNAを抽出する 50

のに適した当技術分野で周知の任意の方法を用いて、たとえばTRIZOLTMの使用により、組織試料からRNAを単離する。次いで、精製RNAを、場合により遺伝子分析と併せて、m i R 2 1 または開示した他の差示発現するm i RNAに特異的なプライマーを用いるRT - PCRに供する。これらのアッセイを実施して、腫瘍に関係するRNAの発現レベルを決定する。差示発現するm i R 発現パターンが決定された場合、特に変異体状態が確認された場合、その患者は本発明の組成物による処置の候補である。

【0130】

[00208] したがって、その患者は、治療的有効量の本発明組成物で、当技術分野において既知の方法に従って処置される。組成物の用量および投与計画は、さまざまな要因、たとえば患者の健康状態および癌の病期に応じて異なるであろう。一般に処置は経時に多數回施される。10

【0131】

[00209] 実施例 8

[00210] 癌患者の診断方法

[00211] 特定の1観点において、ある対象が癌を有するかまたは発症するリスクがあるかを診断する方法が本明細書中に提供される。この方法は、一般に、m i R - 2 1 のm i R 差示発現パターンおよび / またはMMRタンパク質発現を対照と比較して測定することを含む。m i R / MMRタンパク質の差示発現パターンが確認された場合、それらの結果は結腸直腸癌を有するかまたは発症するリスクがある対象の指標である。特定の態様において、少なくとも1つの遺伝子生成物のレベルをノーザンプロット分析により測定する。また、特定の態様において、被験試料中の少なくとも1つの遺伝子生成物のレベルは対照試料中の対応するm i R 遺伝子生成物および / またはMMRタンパク質の発現レベルより低く、ならびに / あるいは被験試料中の少なくとも1つのm i R 遺伝子生成物および / またはMMRタンパク質の発現レベルは対照試料中の対応するm i R 遺伝子生成物および / またはMMRタンパク質の発現レベルより高い。20

【0132】

[00212] 実施例 9

[00213] m i R 遺伝子生成物の測定

[00214] 少なくとも1つのm i R 遺伝子生成物のレベルは、下記により測定できる：対象から得た被験試料に由来するRNAを逆転写して、一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを得ること；これらの標的オリゴデオキシヌクレオチドを、m i RNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、被験試料についてのハイブリダイゼーションプロファイルを得ること；そして、被験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から作成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較すること。少なくとも1つのm i RNAのシグナルの変調は、その対象が結腸直腸癌を有するかまたは発症するリスクがあることの指標である。30

【0133】

[00215] 実施例 10

[00216] 診断および治療用途

[00217] 別の観点において、少なくとも1つのm i RNAのシグナルが対照試料から発生するシグナルと対比して調節解除（たとえば、下方調節および / または上方調節）されている場合に、対象の癌を処置する方法が本明細書中に提供される。40

【0134】

[00218] また、ある対象が、1以上の予後不良マーカーに関連する癌を有するかまたは発症するリスクがあるかどうかを対象において下記により診断する方法が、本明細書中に提供される：対象から得た被験試料に由来するRNAを逆転写して、一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを得ること；これらの標的オリゴデオキシヌクレオチドを、m i RNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、被験試料についてのハイブリダイゼーションプロファイルを得ること；そして、被験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から作成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較すること。また、ある対象が、1以上の予後不良マーカーに関連する癌を有するかまたは発症するリスクがあるかどうかを対象において下記により診断する方法が、本明細書中に提供される：対象から得た被験試料に由来するRNAを逆転写して、一組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを得ること；これらの標的オリゴデオキシヌクレオチドを、m i RNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、被験試料についてのハイブリダイゼーションプロファイルを得ること；そして、被験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料から作成したハイブリダイゼーション50

プロファイルと比較すること。シグナルの変調は、その対象が癌を有するかまたは発症するリスクがあることの指標である。

【0135】

[00219] 実施例 1 1

[00220] キット

[00221] 本明細書に記載する組成物はいずれもキットに含まれうる。非限定例において、m i R N A を単離し、m i R N A を標識し、および / またはアレイを用いて m i R N A 集団を評価するための試薬が、キットに含まれる。キットはさらに、m i R N A プローブを作製または合成するための試薬を含みうる。したがってキットは、適切な容器手段内に、標識ヌクレオチドを取り込ませることによるかまたは非標識ヌクレオチドを取り込ませて後に標識することにより m i R N A を標識するための酵素を含む。キットは、1 つ以上の緩衝液、たとえば反応用緩衝液、標識用緩衝液、洗浄用緩衝液、またはハイブリダイゼーション用緩衝液、m i R N A プローブを調製するための化合物、および m i R N A を単離するための構成要素も含むことができる。他のキットは、m i R N A に対して相補的なオリゴヌクレオチドを含む核酸アレイを作製するための構成要素を含むことができ、したがって、たとえば固体支持体を含むことができる。10

【0136】

[00222] アレイを含めたいずれのキット態様についても、本発明の配列のいずれかの全部または一部と同一または相補的である配列を含む核酸分子があつてもよい。

[00223] キットの構成要素を、水性媒体中または凍結乾燥形態のいずれかでパッケージすることができる。キットの容器手段は、一般に少なくとも 1 つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器、または他の容器手段を含み、その中に構成要素を入れ、好ましくは適切に小分配することができる。キット内に 1 より多い構成要素がある場合（標識試薬と標識を一緒にパッケージできる）、キットは一般に第 2、第 3 または他の追加の容器も含み、それに追加の構成要素を個別に入れることができる。しかし、多様な組合せの構成要素が 1 つのバイアルに含まれてもよい。本発明のキットは、一般に核酸を収容するための手段、および市販のために密封した（in close confinement）他のいずれかの試薬容器も含むであろう。そのような容器には、所望のバイアルを保持する射出成形または吹込み成形したプラスチック容器を含めることができる。20

【0137】

[00224] キットの構成要素を 1 以上の液体溶液で提供する場合、液体溶液は水溶液であり、無菌水溶液が好ましい溶液である。キットに含めることができる他の溶液は、m i R N A を混合試料から単離および / または濃縮することに関与する溶液である。

【0138】

[00225] しかし、キットの構成要素を乾燥粉末（単数または複数）として提供することができる。試薬および / または構成要素を乾燥粉末として提供する場合、粉末を適切な溶媒の添加により再構成することができる。溶媒を別の容器手段に入れて提供することも考えられる。キットは標識 m i R N A の単離を促進する構成要素も含むことができる。それは、m i R N A を保存もしくは維持する構成要素またはそれを分解に対して保護する構成要素も含むことができる。それらの構成要素は R N A s e を含まないか、あるいは R N A s e に対して保護されていてもよい。40

【0139】

[00226] キットは、一般に適宜な手段において、個々の試薬または溶液につき個別の容器を含むこともできる。キットは、キット構成要素を使用するための、またキットに含まれていない他のいずれかの試薬を使用するための指示も含むことができる。指示は、実行できる変更を含むことができる。そのような試薬は本発明のキットの態様であるものとする。また、キットは前記に述べた特定のものに限定されず、m i R N A の操作または特性分析に用いられるいずれかの試薬を含むことができる。

【0140】

[00227] また、m i R N A アレイに関して述べたいずれかの態様を、より全般的に本

10

20

30

40

50

発明のスクリーニングまたはプロファイリングの方法またはキットに使用できるものとする。言い換えると、特定のアレイに含めることができるものを記載したいずれかの態様を、より全般的にm i R N A プロファイリングに関して実施することができ、アレイ自体を伴う必要はない。

【 0 1 4 1 】

[00228] また、いずれかのキット、アレイ、または他の検出法もしくはツール、またはいずれかの方法が、これらのm i R N A のいずれかについてのプロファイリングを伴うことができるものとする。また、m i R N A アレイに関して述べたいずれかの態様を、本発明の方法においてアレイ形式を用いてまたは用いずに実行できるものとする；言い換えると、m i R N A アレイ中のいずれかのm i R N A を、本発明のいずれかの方法において、当業者に既知のいずれかの手法に従ってスクリーニングまたは評価することができる。スクリーニングおよび診断方法を実行するために、アレイ形式は必要ない。

【 0 1 4 2 】

[00229] m i R N A を治療、予後判定、または診断の用途に使用するためのキット、およびそのような使用が、本明細書において本発明者らによって意図される。キットは、m i R N A アレイ、およびアレイ上のm i R N A についての標準または正規化m i R N A プロファイルに関する情報を含むことができる。また、特定の態様において、対照R N A またはD N A をキットに含めることができる。対照R N A は、標識化および／またはアレイ分析のための陽性対照として使用できるm i R N A であってもよい。

【 0 1 4 3 】

[00230] 本発明により教示される方法およびキットを本明細書に幅広く一般的に記載した。この一般的な開示内容に含まれるより狭い種および下位グループのそれぞれも本発明の教示の一部を形成する。これには、除外されるものが本明細書に具体的に列挙されているか否かに関係なく、属からいずれかの主題を除去するただし書または消極的限定を含む、本発明の教示の一般的記載が含まれる。

【 0 1 4 4 】

[00231] 実施例 1 2

[00232] アレイの作製およびスクリーニング

[00233] 本明細書中、m i R N A アレイの作製および使用も提供され、これらは、複数のm i R N A 分子またはm i R N A 前駆体分子と完全またはほぼ完全に相補的または同一であって支持体材料上に空間的に分離された組織化状態で配置されている核酸分子（プローブ）の規則的マクロアレイまたはマイクロアレイである。マイクロアレイは、一般に、その上にプローブがスポットされたニトロセルロースまたはナイロンのシートである。マイクロアレイには、1 0 , 0 0 0 までの核酸分子を一般には1 ~ 4 平方センチメートルの領域内に配置することができるようにより密に核酸プローブが配置される。

【 0 1 4 5 】

[00234] マイクロアレイは、核酸分子、たとえば遺伝子、オリゴヌクレオチドなどを基材上にスポットすることにより、あるいはオリゴヌクレオチド配列を基材上にインサイチュで作製することにより作製できる。スポットまたは作製した核酸分子を、平方センチメートル当たり約3 0 まで、またはそれ以上まで、たとえば平方センチメートル当たり約1 0 0 、さらには1 0 0 0 までの同一ではない核酸分子の高密度マトリックスパターンで適用することができる。マイクロアレイは一般に、フィルターアレイのニトロセルロース系材料とは対照的に、コーティングされたガラスを固体支持体として用いる。m i R N A に相補的な核酸試料の規則的アレイを用いることにより、各試料の位置をトラッキングして元の試料に関連づけることができる。

【 0 1 4 6 】

[00235] 複数の異なる核酸プローブが固体支持体表面と安定に結合している多様なアレイデバイスが当業者に知られている。アレイに有用な基材には、ナイロン、ガラスおよびシリコンが含まれる。アレイは、平均プローブ長、プローブの配列またはタイプ、プローブとアレイ表面の間の結合の性質、たとえば共有結合または非共有結合などを含めて、

10

20

30

40

50

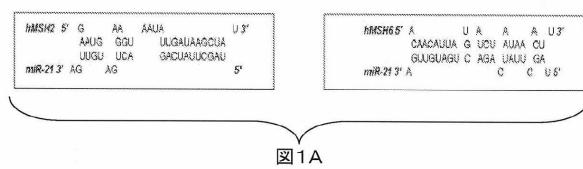
多種多様に変更できる。本明細書に記載する標識およびスクリーニングの方法ならびにアレイは、それらのプローブがm i R N Aを検出すること以外は、いずれのパラメーターに関してもその有用性が制限されることはない；したがって、方法および組成物を多様なタイプのm i R N Aアレイについて使用できる。

【0147】

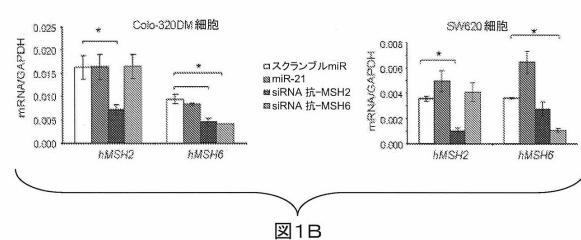
[00236] 本発明の原理を適用できる多数の可能な態様からみて、例示した態様は本発明の好ましい例にすぎず、本発明の範囲に対する限定と解釈すべきではないことを認識すべきである。むしろ、本発明の範囲は以下の特許請求の範囲により定められる。したがつて本発明者らは、これらの特許請求の範囲の範囲および精神に含まれるすべてを本発明として主張する。

10

【図1-1】



【図1-2】



【図1-3】

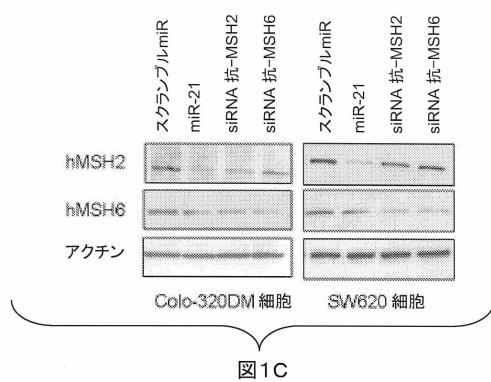


図1C

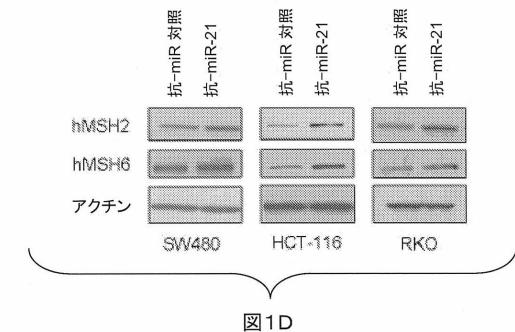


図1D

【図1-4】

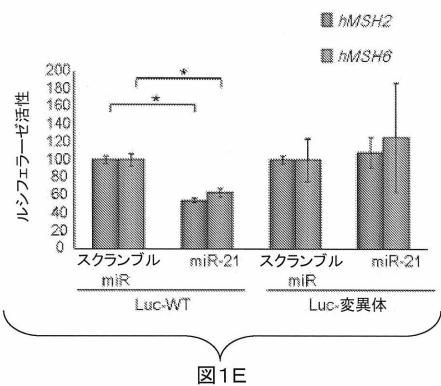


図1E

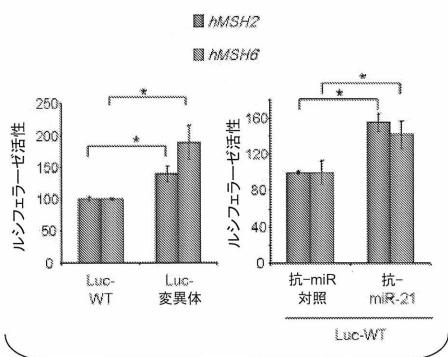


図1F

【図2-1】

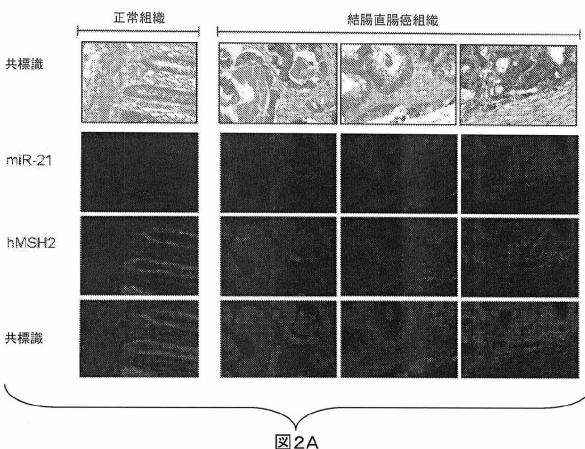


図2A

【図2-2】

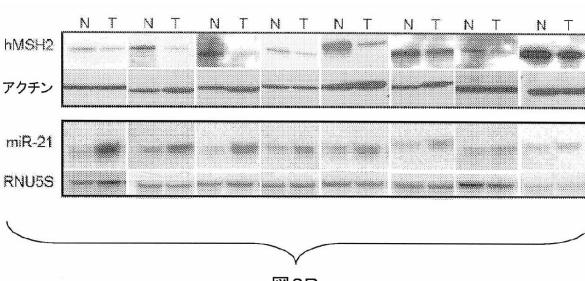


図2B

【図3-1】

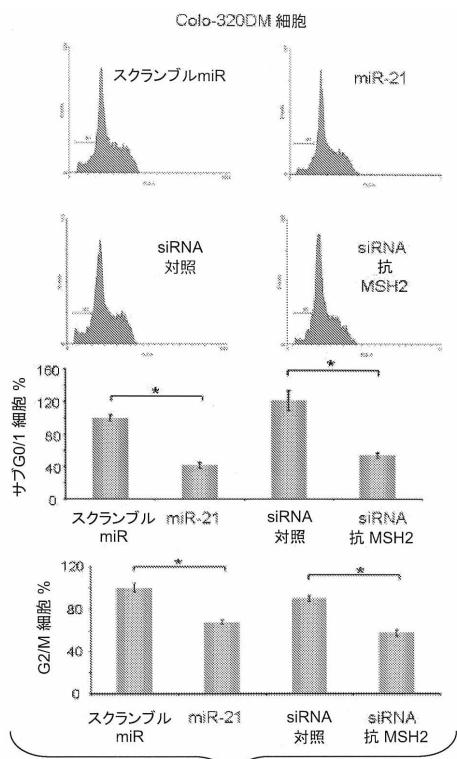


図3A

【図3-2】

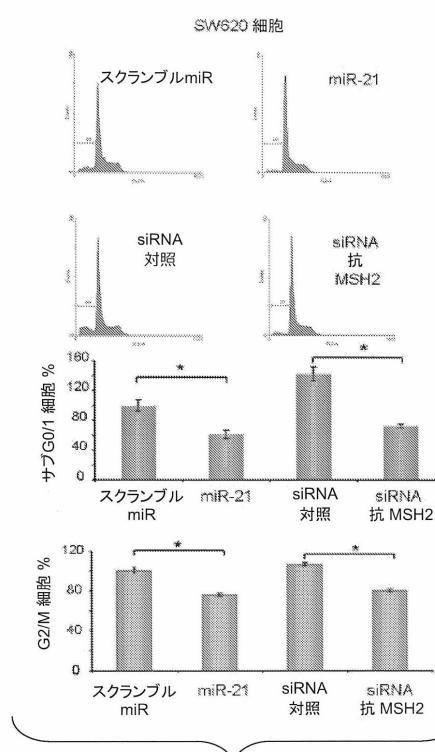


図3B

【図4-1】

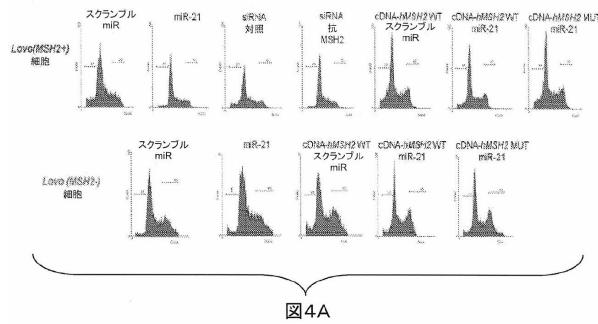


図4A

【図4-2】

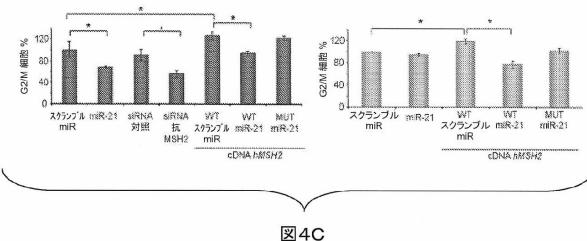


図4C

【図5-1】

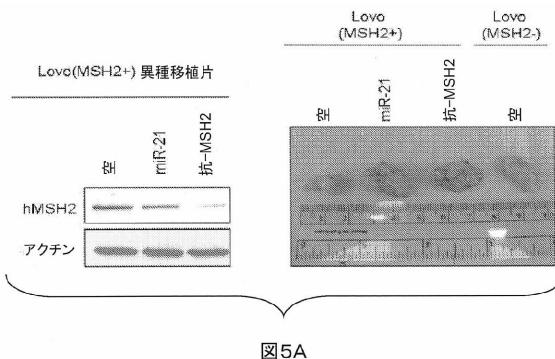


図5A

【図5-2】

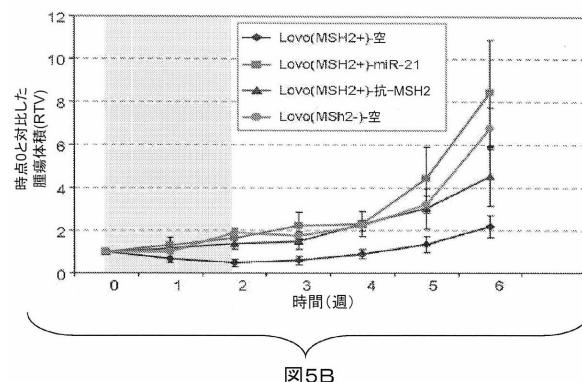


図5B

【図6-2】

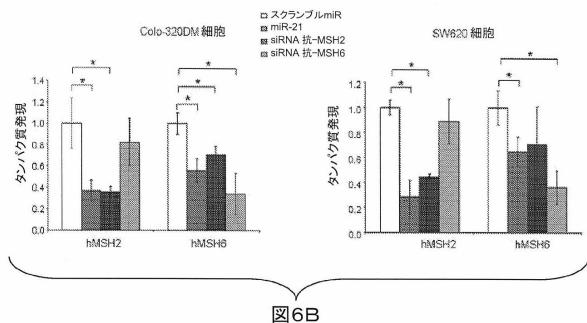


図6B

【図6-1】

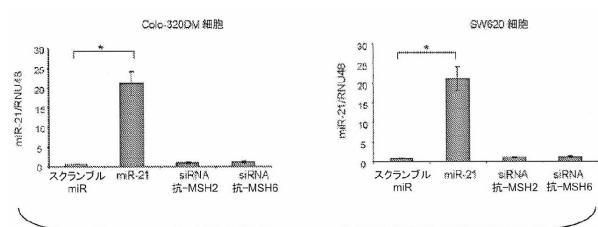


図6A

【図7-1】

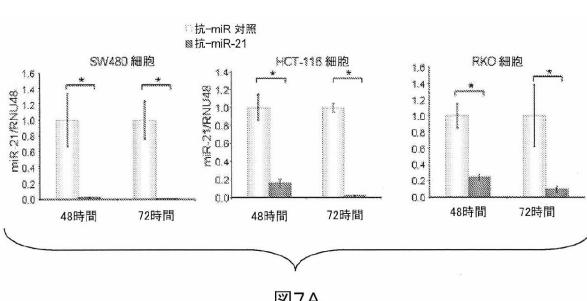


図7A

【図7-2】

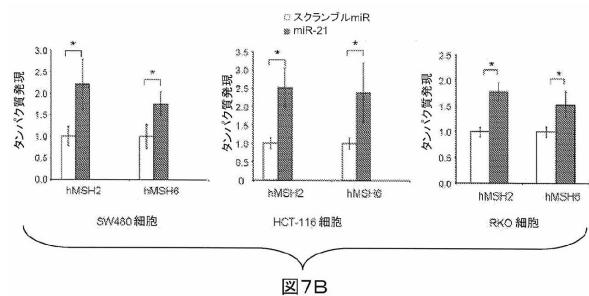


図7B

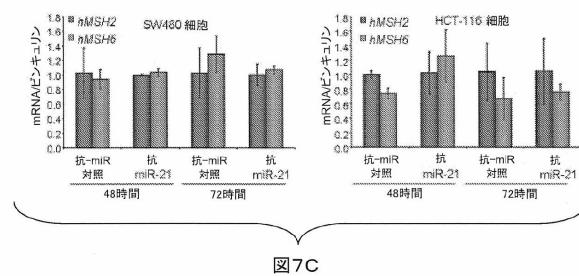


図7C

【図8】

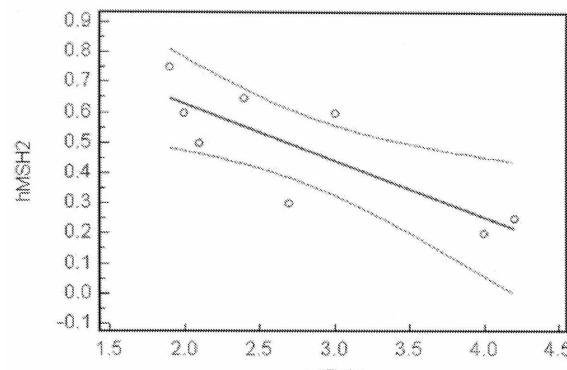


図8

【図9】

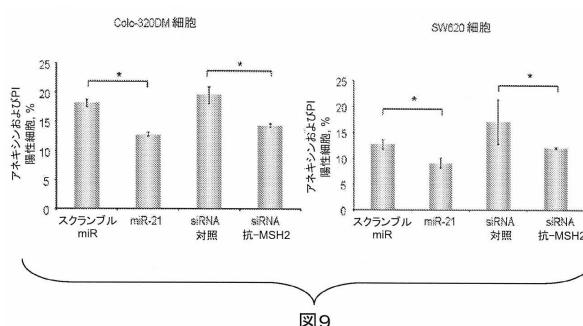


図9

【配列表】

0005931897000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 15/09 (2006.01) C 12 N 15/00 A

(74)代理人 100118902
弁理士 山本 修
(74)代理人 100135415
弁理士 中濱 明子
(72)発明者 クロー・セ , カーロ・エム
アメリカ合衆国オハイオ州43212 , コロンバス , ケンブリッジ・ブルーバード 2140
(72)発明者 ヴァレーリ , ニコラ
アメリカ合衆国オハイオ州43212 , コロンバス , アスキンガー・ブルーバード 1608

審査官 深谷 良範

(56)参考文献 特表2009-543552 (JP, A)
Oncogene , 2008年 , Vol.27 , p.2128-2136
Pharmacological Research , 2007年 , Vol.56 , p.248-253
European Journal of Cancer , 2009年 , Vol.45 , p.365-373
Clinical Cancer Research , 2009年 , Vol.15 , No.12 , p.4009-4016
British Journal of Pharmacology , 2009年 , Vol.158 , p.679-692

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 61 K , C 12 N
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)