

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007 年 1 月 25 日 (25.01.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/010853 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61D 7/00 (2006.01) A61K 38/22 (2006.01)
A61N 1/30 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/314059
- (22) 国際出願日: 2006 年 7 月 14 日 (14.07.2006)
- (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2005-207067 2005 年 7 月 15 日 (15.07.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学
法人名古屋大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPO-
RATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601
愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武井 佳史 (TAKEL,
Yoshifumi) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区
不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 門松
健治 (KADOMATSU, Kenji) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県
名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学
内 Aichi (JP). 藤島 達也 (FUJISHIMA, Tatsuya) [JP/JP];
〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学
法人名古屋大学内 Aichi (JP). 村松 喬 (MURAMATSU,
Takashi) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不
老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アイテック国際特許事務
所 (ITEC INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒
4600008 愛知県名古屋市中区栄二丁目 9 - 2 6 ポー
ラ名古屋ビル Aichi (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護
が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
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, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR CONTROL OF ELECTROPORATION APPARATUS

(54) 発明の名称: エレクトロポレーション装置の制御方法

(57) Abstract: A method for controlling an electroporation apparatus for use in an animal such as human and a non-human animal, the method comprising a step of applying a voltage to an electrode of the electroporation apparatus placed in/on a biological sample of the animal in the presence of a nucleic acid construct capable of inhibiting the expression of a gene in the animal. In this manner, a nucleic acid construct can be introduced into a cell of a living body with good efficiency.

(57) 要約: ヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法を、前記動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトの存在下、前記動物の生体組織に対して配置される前記エレクトロポレーション装置の電極に電圧を印加する工程、を備えるようにする。こうすることで、核酸コンストラクトは効率的に生体内の細胞に導入される。

WO 2007/010853 A1

明 細 書

エレクトロポレーション装置の制御方法

技術分野

- [0001] 本発明は、遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーション(electroporation:電気穿孔法)により生体に導入する技術及びその利用に関する。

背景技術

- [0002] 近年、細胞にRNA干渉により遺伝子の発現の抑制を引き起こす核酸コンストラクトを導入することにより、細胞内において所望の遺伝子の発現を抑制する試みが行われている。RNA干渉による遺伝子発現の抑制は、各種疾患の予防又は治療への適用が期待されており、生体へのこうした核酸の有効な導入手法やRNAの安定化などが試みられている。
- [0003] 例えば、アテロコラーゲンを用いた標的組織へのデリバリー法が既に開示されている(Y. Takeiら、CANCER RESEARCH 64, 3365-3370, MAY 15, 2004)。このデリバリー法により、マウスにおいて高い抗腫瘍効果が認められている。アテロコラーゲンは、siRNAと複合体を構成した状態で組織に投与されるため、細胞への取り込み効率が高まるとともにsiRNAが安定化されるものと考えられている。

発明の開示

- [0004] siRNA等の核酸コンストラクトによってRNA干渉を発現させるにあたっては、細胞への導入効率が最も重要である。アテロコラーゲンは生体適合性に優れるマトリックスであり、アテロコラーゲンによるデリバリーシステムは徐放性の向上と生体内安定性(持続性)の向上への寄与が大きい反面、生体内への細胞への導入効率という面からみるとまだ改善の余地がある。したがって、アテロコラーゲンによる核酸コンストラクトのデリバリー法は、必ずしもRNA干渉を利用した各種の態様の遺伝子サイレンシングに十分な方法ではなかった。また、できるだけ核酸コンストラクトをnakedな状態で導入することも望まれている。
- [0005] 現在までに、エレクトロポレーションによりプラスミドDNAの生体組織への導入が試

みられており、in vivoでの遺伝子産物の発現に成功している。一方、siRNAなどのRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトの各種細胞に対するデリバリーは、その手法により大きく遺伝子発現抑制効果が異なることが知られている。また、siRNAなどのRNA干渉を発現する核酸コンストラクトをエレクトロポレーションによって導入することによりin vivoで遺伝子サイレンシングを実現したことは確認されてはいない。

[0006] そこで、本発明は、遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトを生体に導入するための有効な技術及びその利用を提供することを一つの目的とする。また、本発明は、表皮経由で表皮下近傍の標的組織に効果的に前記核酸コンストラクトを導入するための技術及びその利用を提供することを他の一つの目的とする。

[0007] 本発明者は、遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより生体内に導入することにより、前記生体において遺伝子サイレンシングが可能であることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明によれば以下の手段が提供される。

[0008] 本発明の一つの態様によれば、ヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法であって、前記動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトの存在下、前記動物の生体組織に対して配置される前記エレクトロポレーション装置の電極に電圧を印加する工程、を備える、方法が提供される。

[0009] この態様においては、前記核酸コンストラクトは、一本鎖又は二本鎖DNA、一本鎖又は二本鎖RNA、DNA-RNAハイブリッド及びDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドから選択することができる。また、前記核酸コンストラクトは、前記動物においてRNA干渉を発現可能な核酸コンストラクトとすることもできる。さらに、前記核酸コンストラクトは、siRNAであることが好ましい。核酸コンストラクトがsiRNAのとき、修飾により血清中での安定性が向上されていることが好ましく、前記核酸コンストラクトは、ヒト血清中での半減期が50時間以上であることが好ましい。なお、この半減期とは、安定化されていない同一構成の核酸コンストラクトが、ヒト血清中における半減期が2時間以内のときの半減期である。

[0010] また、この態様においては、前記核酸コンストラクトは、血管新生を促進する遺伝子

を標的としてRNA干渉を発現可能なコンストラクトであることが好ましい。こうした遺伝子として、例えば、血管内皮増殖因子遺伝子が好適な遺伝子である。

[0011] さらに、この態様においては、前記生体組織は固形腫瘍を含むことができる。さらにまた、この態様においては、前記生体組織は表皮又は表皮下に存在する組織とすることができる。

[0012] 本発明の一つの態様によれば、前記電極に電圧を印加するのに先立って若しくは印加後又は同時に、前記生体組織又はこれらの近傍に生分解性マトリックス材料を供給する工程を備えることが好ましい。また、前記電圧印加工程は、前記核酸コンストラクトを前記生体組織又はその近傍に供給した後又は供給しつつ前記生体組織に対して配置される前記電極に電圧を印加する工程とすることができる。

[0013] さらにまた、この態様においては、前記電極は少なくとも一つのプレート状電極を備えることもできるし、前記電極は、1本又は2本以上のニードル状電極を備えることもできるし、さらに、このニードル状電極には、前記核酸コンストラクトを含む液体が通過可能な中空部と開口とを備えることもできる。また、前記エレクトロポレーション装置は対極となる電極としてプレート状電極とニードル状電極とを備えることもできる。

[0014] 本発明においては、前記プレート状電極は前記核酸コンストラクトを導入しようとする生体組織の表面に対して配置し、前記ニードル状電極は前記生体組織又はその近傍に穿刺して配置することもできる。また、前記生体組織は皮下固形腫瘍であり、前記プレート状電極は、前記皮下固形腫瘍を覆う表皮表面に当接して配置し、前記ニードル状電極は、前記生体組織又はその近傍に穿刺して配置することもできる。さらに、前記電極に印加する電圧は50V以上70V以下とすることもできる。

[0015] 本発明の別の一つの態様によれば、ヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法であって、前記動物においてRNA干渉を発現可能なsiRNAの存在下、前記動物の表皮下の罹患組織の下部に配置されたニードル状電極と前記罹患組織を覆う表皮表面に配置されたプレート状電極とに対して所定の電圧を印加する工程、を備える、方法が提供される。この態様においては、前記動物はヒトであり、前記罹患組織は血管新生阻害によって進行抑制、改善又は治療が可能な組織を含んでいることが好ましい態様である。

- [0016] また、本発明のさらに別の一つの態様によれば、非ヒト動物の作製方法であって、前記非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程、を備える方法が提供される。この態様においては、前記核酸コンストラクトは、疾患関連遺伝子を標的としてRNA干渉を発現可能な核酸コンストラクトであることが好ましい態様である。
- [0017] さらにまた、本発明の別の一つの態様によれば、非ヒト動物の作製方法であって、ヒトの疾患モデルとして成立可能な病態、遺伝子変異又は生体組織若しくは細胞の表現型を有する前記非ヒト動物を準備する工程と、該非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程、を備える方法が提供される。
- [0018] 本発明の別の一つの態様によれば、治療剤の探索方法であって、ヒトの疾患モデルとして成立可能な病態、遺伝子変異又は生体組織若しくは細胞の表現型を有する前記非ヒト動物を準備する工程と、該非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程と、前記核酸コンストラクトが導入された前記モデル動物における病態又は前記生体組織若しくは細胞の表現型を解析する工程と、を備える、方法が提供される。
- [0019] 本発明の別の一つの態様によれば、治療剤の探索方法であって、非ヒト動物の生体組織の細胞内に、前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入して前記非ヒト動物の少なくとも一部においてヒトの疾患における病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を形成する工程と、この非ヒト動物に1種又は2種以上の化合物を投与して前記病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を解析する工程と、を備える、方法が提供される。
- [0020] さらに、本発明の別の一つの態様によれば、創薬のための標的化合物の探索方法であって、非ヒト動物の生体組織の細胞内に、非ヒト動物における疾患関連遺伝子を標的として遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程と、前記核酸コンストラクトが導入された前記生体組織又は細胞の表現型を解析する工程と、を備える、方法が提供される。

図面の簡単な説明

- [0021] [図1]エレクトロポレーション装置の一例を示す図。
- [図2]核酸コンストラクトをエレクトロポレーションによって生体組織の細胞内に導入する操作フローの例(a)～(d)を示す図。
- [図3]エレクトロポレーション装置を用いて核酸コンストラクトを導入する操作の一例を示す図。
- [図4]hVEGF-AのmRNA(CDS)に対するsiRNAの標的部位配列を示す図。
- [図5]各種siRNAの構造を示す図。
- [図6]各種siRNAによるPC-3細胞におけるhVEGF-A発現の抑制効果を示す図。
- 。
- [図7]安定化siRNA、非修飾siRNA及びこれらのスクランブルsiRNAによるPC-3細胞におけるVEGF-A発現の抑制効果を示す図。
- [図8]siRNAのエレクトロポレーションによる抗腫瘍効果(治療効果)を示す図。
- [図9]治療開始40日目の腫瘍の外観写真(a)～(d)を示す図。
- [図10]腫瘍内微小血管密度をCD31をマーカーとして用いた安定化siRNA投与群及びスクランブル配列を有する安定化siRNA投与群の免疫化学的染色像を示す図。
- 。
- [図11]実施例6におけるsiRNAのエレクトロポレーションによる抗腫瘍効果(治療効果)を示す図。

発明を実施するための最良の形態

- [0022] 本発明の一つの態様としてのヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法は、前記動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトの存在下、前記動物の生体組織に対して配置される前記エレクトロポレーション装置の電極に電圧を印加する工程、を備えることを特徴としている。この方法によれば、前記動物の生体組織に配置される電極への電圧に印加により、生体組織を構成する細胞表面が穿孔され、細胞内に核酸コンストラクトが導入可能な状態となる。核酸コンストラクトは細胞内に導入された際、所定の遺伝子の発現を抑制すること

ができる。

- [0023] また、本発明の他の一つの態様としての非ヒト動物の作製方法は、前記非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程、を備えることを特徴としている。この方法によれば、前記生体組織の細胞内にエレクトロポレーションにより核酸コンストラクトが導入されることにより、その細胞内において遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物が取得される。
- [0024] また、本発明のさらに他の一つの態様としての治療剤の探索方法は、ヒトの疾患モデルとして成立可能な病態、遺伝子変異又は生体組織若しくは細胞の表現型を有する前記非ヒト動物を準備する工程と、該非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程と、前記核酸コンストラクトが導入された前記モデル動物における病態又は前記生体組織若しくは細胞の表現型を解析する工程と、を備えることを特徴としている。この探索方法によれば、細胞内に前記核酸コンストラクトが導入され、遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物における病態等を解析することにより、核酸コンストラクトの前記疾患に対する有効性を容易に評価することができる。この結果、所定の疾患の治療や予防に有用な核酸コンストラクトをスクリーニングすることができる。
- [0025] さらに、本発明のさらに他の一つの態様としての治療剤の探索方法は、非ヒト動物の生体組織の細胞内に、前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入して前記非ヒト動物の少なくとも一部においてヒトの疾患における病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を形成する工程と、この非ヒト動物に1種又は2種以上の化合物を投与して前記病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を解析する工程と、を備えることを特徴としている。この探索方法によれば、前記非ヒト動物における病態等を解析することにより、前記化合物の前記疾患に対する有効性を容易に評価することができる。この結果、所定の疾患の治療や予防に有用な薬剤をスクリーニングすることができる。
- [0026] さらにまた、本発明の他の一つの態様としての創薬のための標的化合物の探索方

法は、非ヒト動物の少なくとも一部の生体組織又は細胞に存在する1種又は2種以上の疾患関連遺伝子を標的として遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトを、エレクトロポレーションによって前記生体組織又は細胞に導入する工程と、前記核酸コンストラクトが導入された前記生体組織又は細胞の表現型を解析する工程と、を備えることを特徴としている。この探索方法によれば、前記生体組織又は細胞の表現型を解析することにより前記疾患関連遺伝子の発現抑制によって活性化若しくは発現量が増大する化合物や不活性化又は発現量が低下する化合物を見出すことができる。こうした化合物又はその化合物の活性を阻害剤は、前記疾患を予防又は治療する薬剤のための標的化合物となりえ、本発明の探索方法によれば、創薬のための新たな標的化合物を提供して前記疾患の予防や治療に有用な薬剤のスクリーニング系を提供することができる。

- [0027] これら本発明のいずれの態様においても、前記核酸コンストラクトはエレクトロポレーションにより動物の生体組織の細胞に導入される。さらに、エレクトロポレーションの電極の少なくとも一つとしてニードル状電極を用いることで、表皮経由で表皮下近傍の標的組織に対して効果的に核酸コンストラクトが導入される。
- [0028] 本発明を拘束するものではないが、本発明者が見出した、RNA干渉を発現する核酸コンストラクト等がエレクトロポレーションにより生体組織の細胞内に導入されることで良好な発現抑制効果を発揮する現象は、エレクトロポレーションによる導入効率、核酸コンストラクト分子の大きさ(分子のストークス径)等が関与しているものと推論される。まず、第一に、エレクトロポレーションは、極めて短時間で細胞内へと核酸コンストラクトを導入できるため、従来であれば細胞内に導入するまでに分解されてしまうであろう核酸コンストラクトが細胞内に導入されることで導入時点において高い核酸コンストラクトの細胞内濃度が達成され、それにより予想外の発現抑制効果が発揮されていると考えられる。したがって、DNAコンストラクトの他、一般的に不安定とされるsiRNA等のRNAコンストラクトなど比較的低分子の核酸コンストラクトであっても高い発現抑制効果が得られると考えられる。
- [0029] また、エレクトロポレーション法によれば、細胞膜が電氣的に穿孔されるのであるが、こうした電氣的刺激による穿孔部分とsiRNAなどの低分子の核酸コンストラクトに親

和性が高いかあるいはこうした核酸コンストラクトが従来の一般的なDNA発現ベクター等に比較して小さい分子であるために容易に通過できたことが考えられる。本発明者らによれば、通常、電気穿孔法により細胞膜に孔(pore)が形成された場合、そのpore径と導入される分子の径にある一定の平衡状態の関係が構築されると推論している。すなわち、例えば、分子量1000程度の低分子化合物は、poreを通過して細胞に導入されやすいが、この反応は平衡反応であるため、導入された低分子化合物は、同時に細胞外へ出やすいという不利益をあわせ持つ。siRNA(分子量約13000)などの低分子の核酸コンストラクトは、ほどよい分子量(分子径)をもち、電気穿孔により一たび細胞内に導入されれば、細胞外へ出にくいという利点を備えている。こうした傾向は、細胞レベルでのエレクトロポレーションよりも生体組織に対するエレクトロポレーションにおいてより顕著であると考えられる。

[0030] さらに、コラーゲン等のマトリックスを核酸コンストラクトと共存させることで、核酸コンストラクトを導入しようとする細胞又は組織近傍に核酸コンストラクトを高濃度に維持できることが考えられ、これにより、効率的に核酸コンストラクトが導入されたものと考えられる。

[0031] 以下、本発明を実施するための最良の形態について、本発明の上記した各種態様について説明する。

[0032] (エレクトロポレーション装置の制御方法)

(ヒト及び非ヒト動物)

本発明のエレクトロポレーション装置の制御方法は、ヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の使用に関連している。本明細書において非ヒト動物とは、ヒト以外の霊長類、霊長類以外の哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類等の動物を包含している。哺乳類としては、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ヤギなどの家畜動物、イヌ、ネコなどのペット動物が挙げられる。魚類としては、ゼブラフィッシュ、メダカなどが挙げられる。特に、疾患モデルや研究用としては、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、ブタ、ゼブラフィッシュ、メダカなどが好ましく用いられる。なお、本発明におけるヒト及び非ヒト動物は、胚、胎生及び生後個体のいずれの状態も包含するが、本発明の制御方法のほか、非ヒト動物の作製方法、治療剤の探索方法、

創薬のための標的遺伝子の探索方法等においては、生後の個体を用いることが好ましい。

[0033] (生体組織)

本発明の制御方法は、こうした動物の生体組織に配置されたエレクトロポレーション装置の電極に電圧を印加する。動物の生体組織としては、特に限定しない。後述するように生体組織に配置される電極の形態を選択すること及び電極の配置のための生体組織の切開等の処置の採用により、動物の表皮近傍のみならず、内部の生体組織の全てを対象とすることができる。電圧の印加を経皮的に行うことを考慮すれば生体組織は表皮又は表皮下(表皮直下あるいはその近傍)であることが好ましい。このような部位であれば、電極の少なくとも一部がニードル状などであって表皮に侵入可能な形態であれば、容易にこうした部位に電圧を印加することができる。例えば、経皮的に導入操作のしやすい生体組織としては、膝などの各種関節が挙げられる。関節は、表皮直下にあるとともに体外へ突出している点からも好ましい。その他、歯周組織などの口腔内も好ましい。なお、電極形態によっては血管などを介して経管的に到達できる生体組織も好ましい。また、内視鏡手術の手法により経口、経肛門又は経膈的若しくは経腹腔的な手法によって電極を配置可能な生体組織も好ましい。

[0034] また、生体組織としては固形腫瘍を含む組織であることが好ましい。エレクトロポレーション装置によれば、固形腫瘍細胞内に核酸コンストラクトを導入できるからである。特に、本方法によれば、表皮直下又はその近傍の固形腫瘍に対しては経皮的な治療が可能となる。

[0035] (エレクトロポレーション装置)

本発明におけるエレクトロポレーション装置としては、一般的なエレクトロポレーション装置を利用できる。図1には、エレクトロポレーション装置2の一例を示す。エレクトロポレーション装置2は、本体4と、本体4にケーブル14とホルダー12とを介して接続される電極部材20を備えることができる。本体4にはパルス発生手段5を備えることができる。パルス発生手段6は、ケーブル10及びホルダー14内を挿通する導線を介して電極10a、10bに電圧を印加することができる。パルス発生手段6としては、一般交流電源を用いて電気パルスとしてAC(交流)パルス、エクスポネンシャルパルス、DC

(直流)パルスなどを印加できるものが知られている。特に限定しないが、DCパルス
を印加できるものが好ましい。パルス波形としては、方形波が好ましい。方形波は、セ
ットされた電圧まで急激に上昇し所定時間(パルス長)だけその電圧を維持し、再び
急激に0値にまで降下する波形である。より好ましくはこうした方形波を1秒間に複数
回、好ましくは99回までの周期で印加できるパルス発生手段を用いる。なお、ここで
一周期とは、パルスのオン時間とオフ時間との時間合をいう。

[0036] なお、本体4には、インピーダンス測定手段8を備えることもできる。インピーダンス
測定手段8は、パルス印加前又はその後において電極10a、10b間のインピーダンス
(抵抗値)を測定することができる。

[0037] 本装置2は、本体4のパルス発生手段6に電氣的接続される少なくとも一対の電極1
0a、10bを備えることができる。図1に例示する電極10aは、長形状のプレート状の
導体(例えば白金)であり、電極10bは、3本のニードル状体が整列して全体としてフ
ォーク状を形成して、電極10aに対向するように配置されている。こうしたプレート状
電極は、表皮、粘膜、器官及び臓器などの生体組織、すなわち、核酸コンストラクトを
導入しようとする生体組織に当接させて用いることが好ましい。電極10bの3本のニードル状体は、3本がほぼ同様に緩やかに屈曲して、皮下の生体組織に侵入させやす
くなっている。なお、本発明において用いることのできるニードル状電極は、1本又は
2本以上のニードル状体で構成されていればよい。また、複数本のニードル状体の
配列状態は特に限定しないが、例えば、互いに平行に一行又は複数列に整列させ
ることができる。こうしたニードル状電極は、核酸コンストラクトを導入しようとする生体
組織又はその近傍に穿針して用いることが好ましい。

[0038] 本発明においては、プレート状電極とニードル状電極とを用いるとともに、プレート
状電極は核酸コンストラクトを導入しようとする生体組織の表面に対して配置し、ニードル状電極は前記生体組織又はその近傍に穿針して配置することができる。こうする
ことで、生体組織に核酸コンストラクトを導入しやすい電流量を容易に確保でき、核酸
コンストラクトを確実に導入することができるようになる。また、生体組織が皮下固形腫瘍であるときには、プレート状電極は、皮下固形腫瘍を覆う表皮表面に当接して配置
し、前記ニードル状電極は、前記生体組織又はその近傍に穿針して配置することも

できる。こうすることで、安定して皮下固形腫瘍を保持でき、この結果、核酸コンストラクトを確実にかつ効率的に導入することができるようになる。

- [0039] さらに、プレート状電極を表皮に当接させるとともにニードル状電極を表皮下の固形腫瘍等の標的組織下に配置することにより、表皮下の組織に対して効果的に核酸コンストラクトを導入することができる。特に、表皮を介した場合には、通常、電流量がバラツキやすくしかも低下しやすいが、表皮下の生体組織に対して電極をこのように配置することによって、相対的に低い電圧であってもコンストラクトに十分な電流量を供給して導入効率を確保するほか、処置の低侵襲性を向上させることができる。
- [0040] 本発明者らによれば、後述する実施例で形成した固形腫瘍に対してプレート状電極とプレート状電極との組み合わせ（固形腫瘍を挟むように保持）で通電した場合に比して、プレート状電極とニードル状電極との組み合わせ（固形腫瘍の底部にニードル状電極を差し込むとともに固形腫瘍の上部にプレート状電極を配置して挟むようにして保持）を用いた方が、十分な電流量を確保できることを確認している。すなわち、プレート状電極とニードル状電極（特に2本以上のニードル状電極が整列されたもの）を用いること又は標的細胞を含む生体組織に対してその表面とその内部とに対して電極を配置することにより、生体組織に意図した電流量を安定して供給できるという利点があるといえる。意図した電流量の安定した供給は、エレクトロポレーションによる核酸コンストラクトの安定かつ確実な導入を実現するために有利である。
- [0041] なお、電極10a、10bはこうしたプレート状電極とニードル状電極の組み合わせに限定するものではない。また、本発明において用いる電極の組み合わせは、例えば、双方がプレート状電極または1本または2本以上のニードル状体を備える電極であってもよい。また、電極は一对である必要はなく、1個又は2個以上の正極と1個又は2個以上の陰極との組み合わせとしてもよい。さらに、プレート状電極のプレート部の形状は、円形状、楕円状、正方形等各種の形態を採ることができる。さらにまた、ニードル状電極を採用する場合には、その内部に液体が流通可能な流路を設けるとともにその先端に排出口を設けることができる。この場合、例えば、ニードル状電極の流路に注入用シリンジの先端を接続するなどして流路に対して核酸コンストラクトを含む液体を供給可能に構成することで、核酸コンストラクトを生体内に注入後直ちに

るいは注入しつつ電圧を印加することが可能となる。これにより、核酸コンストラクトが標的部位から拡散するのを抑制することができる。

[0042] こうした電極10a、10bは、ホルダー12とケーブル14とを介してパルス発生手段6に接続されていることが好ましい。ホルダー12は、片手で把持して開閉可能な一对の脚部12a、12bを有し、その各先端に電極10a、10bを備えることができる。ホルダー12の一对の脚部12a、12bの基端部からは先端に端子14a及び14bを有するケーブル14が固定されていてもよい。ホルダー及びケーブル14内には電極10a、10bにそれぞれ接続される導線が挿通しており、ケーブル14の先端側においてこれらの導線の端部が端子14a、14bとされてパルス発生手段6に電氣的に接続されていてもよい。以上のようにして、本装置2においては、電極10a、10b、ホルダー12及びケーブル14は、本体4に対して交換可能な電極ユニット(部材)20を構成することができる。後述するように、こうした電極10a、10bを備えるエレクトロポレーション装置2は、ヒト及び非ヒト動物の生体組織(特に皮下組織)への核酸コンストラクトの導入装置及び遺伝子発現抑制装置並びに核酸コンストラクトによる治療装置(特に皮下の固形腫瘍等の皮下疾患部位の治療装置)として用いることができる。また、こうした電極10a、10bは、同様に、ヒト及び非ヒト動物の生体組織(特に皮下組織)への核酸コンストラクトの導入装置及び遺伝子発現抑制装置並びに核酸コンストラクト用の治療用電極(皮下の固形腫瘍等など特に皮下における疾患部位の治療用電極)として用いることができる。

[0043] (核酸コンストラクト)

本発明における核酸コンストラクトは、遺伝子の発現を抑制可能に構築されている。本明細書において遺伝子の発現を抑制するとは、遺伝子等をコードするDNAとのハイブリダイズなどの相互作用により転写を阻害するアンチジーン核酸法、mRNAなどのRNAとのハイブリダイズなどの相互作用により転写又は翻訳を阻害するアンチセンス核酸法、mRNAなどの転写物とのハイブリダイズ等の相互作用に基づいて転写物を分解又は翻訳を阻害するRNA干渉法、デコイ核酸法、リボザイム法等によるものが挙げられる。なお、遺伝子発現を抑制するものではないがアプタマーをエレクトロポレーションにより導入することもできる。また、核酸コンストラクトとしては、前駆体

マイクロRNA(miRNA)や成熟miRNAなどのmiRNAやその作用を制御する小RNA分子を含んでいる。ここに、本明細書において「核酸」とは、デオキシリボ核酸及びリボ核酸のようなポリヌクレオチドを意味している。また、この用語には、一本鎖(DNA又はRNA、センス又はアンチセンス)又は二本鎖ポリヌクレオチド(DNA又はRNA)が含まれる。また、DNA-RNAハイブリッド(二本鎖)やDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド(一本鎖)、ペプチド核酸(PNA)、モルホリノオリゴヌクレオチドも含まれる。さらにまた、ポリヌクレオチドには天然あるいは人工的な修飾が施されていてもよい。なお、本明細書において「RNA干渉」とは、二本鎖RNAによってその配列特異的に標的遺伝子のmRNAなどの転写産物を分解するか又は翻訳を阻害する現象を意味するものとする。RNA干渉によれば、結果として標的遺伝子の発現を抑制することができる。ここで標的遺伝子の発現を抑制するとは、標的遺伝子がコードするmRNAがポリペプチドに翻訳されるのを抑制し又はその翻訳産物であるタンパク質の発現量が低下することを意味している。

[0044] 標的遺伝子としては、特に限定しない。疾患の予防又は治療のための遺伝子、機能解析が必要とされる遺伝子などであってもよい。例えば、固形腫瘍等の治療目的には、ガン細胞によって放出され血管新生を誘導する血管内皮増殖因子(VEGF)を始め、aFGF、bFGFなどの線維芽細胞増殖因子、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、アンジオゲニンなどの血管新生を誘導する物質やガン細胞の増殖を促進する上皮細胞増殖因子(EGF)などをコードする遺伝子を標的遺伝子とすることができる。これらの血管新生関連遺伝子を標的とすることにより腫瘍特異性が高く副作用が抑制された治療が可能となる。また、血管新生に起因する各種の疾患の予防又は治療が可能となる。

[0045] なかでもVEGFは強力な血管新生作用を持つことから、VEGF遺伝子はガン治療の標的遺伝子として非常に有用である他、ガン以外のVEGF過剰発現をその主病因とする疾患、例えば眼内血管新生(糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症など)、動脈硬化症などの治療の標的遺伝子とすることができる。また、VEGFは分子量約22,000のサブユニットが二量体を形成する構造を持ち、血管内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成を促進し、個体レベルでの血管新生・血管透過性の亢進を起こす。また、

組織因子やプラスミノゲンアクチベーター(plasminogen activator: PA)などの凝固系・線溶系因子の産生亢進、マトリックス・メタロプロテイナーゼやPA受容体の発現などの亢進を誘導し、血管基底膜を分解する(Ferrara, N. : J. Mol. Med. , 77 , 527-543, 1999)。また、VEGFはVPFという別名が示す如く、血管透過性を亢進する。VEGF (VEGF-A)はalternativesplicingにより、5個のサイズの異なるアイソフォーム(すなわちVEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ : 下付の数字は構成アミノ酸数を示す)として存在することが知られている(Tischer, E. et al. : J. Biol. Chem. , 266:11947-11954, 1991)。VEGFを産生している細胞は、何種類かのサブタイプを同時に産生している。通常、VEGF₁₂₁とVEGF₁₆₅が優位であるが、VEGF₁₈₉も多くの細胞で発現が観察されている。このようなalternative splicingによって生合成される5種のVEGFサブタイプの遺伝子の1又は2以上を標的遺伝子とするsiRNAなどの核酸コンストラクトもまた有用である。また、VEGF-B、PLGF(placenta growth factor)を標的とすることもできる。以上のことから、本発明の核酸コンストラクトは、VEGF-A、VEGF-B、PLGFなどを含むVEGFファミリーを標的とすることができる。さらに、VEGFR-1、-2、-3等のVEGFRファミリーの遺伝子を標的としてもよい。他のガン関連遺伝子としては、変異したp53遺伝子やezh2遺伝子などが挙げられる。

[0046] また、標的とする生体組織が腫瘍組織(特に、皮下腫瘍組織)である場合には、腫瘍内部は、血管新生が活発であり血管透過性の高いことから、標的遺伝子が血管内皮増殖因子(VEGF)などの血管新生を促進する血管新生関連遺伝子とする核酸コンストラクトを用いることが好ましいが、こうした組織においては、血管透過性も高くしかも水分が多いため、エレクトロポレーションによる核酸コンストラクトが好ましい。特に、後述するプレート状電極及びニードル状電極との組み合わせによれば、腫瘍組織近傍にニードル状電極を刺し込むために、こうした血管透過性や高水分により電流量が安定的にしかも容易に確保することができるため、効率的な核酸コンストラクトの導入が可能となる。

[0047] 標的遺伝子としては、核酸コンストラクトを導入しようとするヒト及び非ヒト動物の内在性遺伝子でなくてもよい。例えば、ウイルス感染によって引き起こされる疾患の予防

又は治療目的には、RNAウイルス中のRNA配列を標的とすることができる。例えば、HIV-1ウイルス、C型肝炎ウイルス、ポリオウイルス、ラウス肉腫ウイルス、パピローマウイルス、インフルエンザウイルスなどのRNA配列を標的とすることができる。なお、こうしたウイルス感染疾患においては、ウイルス増殖に必要な内在性因子をコードする遺伝子も標的遺伝子としてもよい。

[0048] また、炎症性疾患関連遺伝子も標的遺伝子とすることができる。例えば、炎症性疾患関連遺伝子としてはIL-1(α 及び β)、IL-6、IL-4等が挙げられる。これらは、リウマチや慢性関節等の炎症性疾患に関連している。特に、体外から経皮的に導入操作がしやすいという観点から、こうした関節の炎症性疾患の関連遺伝子を標的とすることは本発明において効果的である。また、別の炎症性疾患関連遺伝子としては、アトピー性皮膚炎などの皮膚炎疾患関連遺伝子であるTNF α 遺伝子及びTNF α 受容体ファミリーの遺伝子などが挙げられる。本発明によれば、皮膚炎疾患に対しても経皮的な導入操作が容易である。

[0049] さらに他の標的遺伝子としては、抗アポトーシス関連遺伝子も挙げられる。抗アポトーシス関連遺伝子は、癌の発症や進行に関連する癌遺伝子である。こうした遺伝子としては、bcl-2遺伝子を始めとする、bcl-x、bcl-w、mcl-1、bfl-1/A1、bax、bad、bikなどのbcl-2ファミリー遺伝子が挙げられる。特に、bcl-2遺伝子を標的とすることが好ましい。bcl2-遺伝子を標的遺伝子とするsiRNAは、例えば、特開2005-13199に記載されている。

[0050] RNA干渉を発現可能な核酸コンストラクトは、こうした標的遺伝子のmRNA等の転写産物の少なくとも一部を標的としてこれら標的遺伝子の発現を抑制可能に構築されている。こうした核酸コンストラクトの一つの態様は、互いにハイブリダイズするオリゴリボヌクレオチドの二本鎖構造を有するRNAコンストラクトである。すなわち、裸の(Naked)RNAである。具体的には、突出した3'末端をそれぞれ有するあるいは有しない比較的短い二本鎖オリゴリボヌクレオチド(small interfering RNA : siRNA)及びヘアピン構造を形成する(又は有する)単一のオリゴリボヌクレオチド(short hairpin RNA : shRNA)が挙げられる。これらのRNAコンストラクトは、直接RNA干渉を引き起こすことができる点において好ましい。また、ヘアピン構造を形成しない一本鎖オリゴヌ

リボヌクレオチドのRNAコンストラクトもRNA干渉を発現することができる。

- [0051] siRNAは、ターゲット配列に対応するセンス配列及びアンチセンス配列を有しており、これらセンス配列及びアンチセンス配列が一定長さでハイブリダイズして二本鎖構造を形成している。すなわち、センス配列及びアンチセンス配列は所定長さで対合する二重鎖をそれぞれ有している。なお、センス配列とアンチセンス配列は互いにハイブリダイズするが、一部において不對合部分を有していてもよい。例えば、センス配列において1又は数個のミスマッチ塩基及び／又は塩基欠損を有していてもよい。siRNAにおけるセンス配列及びアンチセンス配列は、突出する3'末端を有していてもよいし、有していなくてもよい(ブラントエンドタイプ)。オーバーハングを有する場合、オーバーハングする3'末端側はmRNA上の標的配列に対するセンス配列の一致性及びアンチセンス配列の相補性は必ずしも必要ではない。
- [0052] shRNAは、siRNAと同様にターゲット配列に対応するセンス配列を5'側に、アンチセンス配列を3'側に有し、これらは一定長さで対合してステムを形成し、これらの配列間にヌクレアーゼによるプロセッシングを受ける部位を有するループ部位を有している。このため、shRNAは、細胞内においてプロセッシングを受けてsiRNAとなる。siRNAについて説明したように、shRNAから誘導されるsiRNAのオーバーハング部位に相当するセンス配列及びアンチセンス配列においても標的配列との一致性及び相補性は必須ではない。
- [0053] 本態様の核酸コンストラクトにおけるセンス配列及びアンチセンス配列が対合する二重鎖の長さは、RNA干渉効果が得られる限り特に限定しないが、好ましくは50塩基対以下であり、典型的には13～28塩基対であることが好ましく、より好ましくは13～27塩基対の範囲であり、さらに好ましくは19～21塩基対である。最も好ましくは、19又は20塩基対である。また、二重鎖を形成しない3'側構造を含めたセンス配列及びアンチセンス配列は、典型的には15～30ntであることが好ましく、より好ましくは15～29ntの範囲であり、さらに好ましくは21～23ntである。最も好ましくは、21又は22ntである。また、siRNAにおいて突出する3'末端は、2～4ntであることが好ましく、より好ましくは2ntである。さらに、shRNAにおけるループ部位は、こうした態様の二重鎖(shRNAにおいてはステム)及び3'末端構造を形成し維

持するのを妨げない程度のループ部位の長さを備えていればよい。

[0054] この態様の核酸コンストラクトの標的遺伝子のターゲット配列は、例えば、以下のようなルールを適宜適用して決定し、適当なsiRNAやshRNAを設計することができる。

- (1) 標的する遺伝子のCDSにおいてAA(N19)TT、AA(N21)、NA(N21)等となる配列をターゲットとする(siRNAとしてはこれらの配列の第3～21塩基の19塩基を使用する)、
- (2) 転写因子の結合部位を避けるためスタートコドンから下流50～100塩基以上下流側とする、
- (3) 標的mRNAの予想される二次構造を確認して立体障害により結合しにくい部位を避ける、
- (4) BLAST等によるホモロジーサーチによって他の遺伝子と相同性のない配列を選択する、
- (5) GC含量を50%前後(特に、47～52%)とする、等である。

なお、この他ターゲット配列の決定方法を含むsiRNAの設計方法は、<http://design.rnai.jp/sidirect/index.php>、<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html> や Rational siRNA design for RNA interference (Nature Biotechnology, vol. 22, 326 - 330 (2004), Angela Reynolds, Devin Leake, Queta Boese, Stephen Scaringe, William S Marshall & Anastasia Khvorova)、Improved and automated prediction of effective siRNA (Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 18;319(1):264-74, Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhhammer EL.)等公開された各種のルールを適宜適用して行うことができる。

[0055] 例えば、ヒトVEGFのmRNA (GenBANKアクセッション番号NM_003376、Leung, D.W. et al.: Science, 246, 1306-1309, 1989; Keck, P.J. et al.: Science, 246, 1309-1312)) の発現を抑制することができるsiRNAとしては、例えば、特開2004-313141に示す #1～#4のVEGFsiRNAが挙げられる。これらの各siRNAにおいては、センス配列及びアンチセンス配列はそれぞれ3'末端側に2ntのオーバーハング部位を有している。なお、これらのsiRNAのターゲット配列は、AAおよびCAのいずれかを5'末端

側に有するターゲット配列よりGC含有量が45～55%の21塩基の候補配列14種を選択し、「GCの偏り」が比較的少ない配列7種に候補を絞り、さらにこの7種について、BLASTサーチによる類似配列の検索を行い、類似配列の少ないターゲットを選択し、かつその近傍の二次構造解析結果を参考に、比較的立体障害の影響の少ないと想定できたものである。

[0056] このような核酸コンストラクトは、ホスホアミダイト法など公知のポリリボヌクレオチドの化学合成方法により合成することができる。また、in vitro転写法を用いて合成してもよい。例えば、こうしたポリリボヌクレオチドをコードするDNAを合成し、このDNAに対して、PCR法を利用してT7RNAプロモータなどのRNAプロモータ配列を有するプライマーを用いるとともにDNAポリメラーゼを用いて転写用二本鎖DNAテンプレートを作成し、この転写用二本鎖DNAテンプレートに対してRNAポリメラーゼを利用してin vitro転写反応を実施することもできる。こうすることで、所望の一本鎖RNAを得ることが出来る。siRNAの場合には、こうして得たアンチセンスRNAとセンスRNAとをハイブリダイズさせて二本鎖RNAを作製し、適宜末端をRNase等で分解して、得られた二本鎖RNAを精製することによりsiRNAを得ることができる。また、shRNAの場合には、センス配列とアンチセンス配列と、さらにこれらの配列間に各種の塩基特異的RNaseによってトリミングされるループ配列とを備える一本鎖RNAを作製し、センス配列とアンチセンス配列とをアニールさせて得ることができる。こうして得たshRNAのループ配列を塩基特異的ヌクレアーゼで処理してsiRNAを得ることができる。なお、in vitro転写法はこれに限らず各種の方法が知られているとともに、商業的に入手可能な各種のin vitro転写キットを用いて実施することができる。

[0057] siRNAやshRNAなどのRNAコンストラクトとしては、ヒト血清中での半減期が30時間以上、好ましくは50時間以上、より好ましくは60時間以上、さらに好ましくは80時間以上のRNAコンストラクトを用いる。こうした核酸コンストラクトを用いることにより、RNA干渉の効果を容易に持続させることができ、投与回数を低減することができる。なお、ここでいう半減期とは、同じヒト血清中において安定化されてない非修飾の同一のRNAコンストラクトの半減期が2時間以内のときの半減期をいうものとする。こうした安定化されたこの種のRNAコンストラクトは、ポリヌクレオチドのいずれかの部分にヌ

クレアーゼ耐性のための各種公知の修飾基を備えることもできる。こうした修飾としては、例えば、3'オーバーハング部位を分解に対して安定化させることができる。例えば、これらが、プリンヌクレオチド、特にアデノシンまたはグアノシンヌクレオチドからなるように、選択することができる。また、2'ヒドロキシル基の欠如により、組織培地中の突出部のヌクレアーゼ耐性が有意に増強される。また、この種の核酸コンストラクトは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むことができる。修飾ヌクレオチドは、標的特異的活性、例えば、RNA干渉の媒介活性が実質的に影響を受けない位置、例えば、二本鎖RNA分子の5'末端および／または3'末端の領域内に配置することができる。特に、修飾ヌクレオチド類似体を組み込むことにより、突出部を安定化させることができる。好ましいヌクレオチド類似体は、糖または骨格鎖修飾リボヌクレオチドから選択する。しかし、核酸塩基が修飾されたリボヌクレオチド、すなわち、天然に存在する核酸塩基ではなく、下記のように天然に存在しない核酸塩基を含むリボヌクレオチドも好適である。すなわち、天然に存在しない核酸塩基としては、5位置で修飾されたウリジンまたはシチジン、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ブロモウリジン;8位で修飾されたアデノシンおよびグアノシン、例えば、8-ブロモグアノシン;デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザーアデノシン;O-およびN-アルキル化ヌクレオチド、例えば、N6-メチルアデノシンなどである。好ましい糖修飾リボヌクレオチドでは、H、OR、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂またはCNからなる群より選択される基で2'OH基を置換するが、ここで、Rは、C1~C6アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、ハロは、F、Cl、BrまたはIである。好ましい骨格鎖修飾リボヌクレオチドでは、隣接するリボヌクレオチドを結合するホスホジエステル基を、例えば、ホスホロチオエート基の修飾基で置換する。

- [0058] 核酸コンストラクトのもう一つの態様は、上記の態様のRNAコンストラクト、すなわち、siRNAやshRNAを発現可能にコードするベクターの態様である。こうした態様の核酸コンストラクトは、継続性のあるRNA干渉を実現できる点において好ましい。この態様において、shRNA発現ベクターは、アンチセンス配列及びセンス配列の他ループ配列を、細胞内転写によりshRNAを構築可能な連続した一本鎖RNAが転写されるように構成することができる。また、siRNA発現ベクターは、所定のセンス配列及び

アンチセンス配列を有するRNAが転写されるように構成すればよい。siRNA発現ベクターにおいては、センス配列及びアンチセンス配列は単一のベクターによって発現されるようにしてもよいし、また、それぞれ異なるベクターから発現されるようにしてもよい。

- [0059] こうした発現ベクターに用いるプロモータとしては、上記各DNAより対応するRNAを産生し得るものであれば、polIII系、polIII系のいずれであってもよい。このpolIII系のプロモータとしては、例えば、U6プロモータ、tRNAプロモータ、レトロウイルス性LTRプロモータ、アデノウイルスva1プロモータ、5SrRNAプロモータ、7SK RNAプロモータ、7SL RNAプロモータ、H1 RNAプロモータなどが挙げられる。polIII系プロモータとしては、サイトメガロウイルスプロモータ、T7プロモータ、T3プロモータ、SP6プロモータ、RSVプロモータ、EF-1 α プロモータ、 β -アクチンプロモータ、 γ -グロブリンプロモータ、SR α プロモータなどを挙げるができる。
- [0060] 発現ベクターは、プラスミドベクターやウイルスベクターの形態を採ることができる。ベクターの種類は特に問わないで、導入したい細胞などに対応して選択することができる。例えば、哺乳動物細胞では、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、EBウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、フォーミーウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。
- [0061] こうした発現ベクターの態様を採る核酸コンストラクトは、商業的に入手可能なsiRNAやshRNA作製用に構築されたベクターやそれらのプロトコルや実験医学別冊改訂RNAi実験プロトコル(羊土社、2004年10月1日発行)等に基づいて容易に構築することができる。
- [0062] なお、核酸コンストラクトは、アンチジーン核酸、アンチセンス核酸、デコイ核酸、又はリボザイムであってもよい。アンチジーン核酸は、DNAと相補的な塩基配列を有し、DNAと2本鎖又は3本鎖を形成することによりDNAにコードされる遺伝子の発現を抑制するDNA又はRNAである。また、アンチセンス核酸は、任意のRNA(ゲノムRNA及びmRNA)と相補的な塩基配列を有し、これらと2本鎖を形成することによって

該RNAにコードされる遺伝子情報の発現(転写、翻訳)を抑制するものをいう。アンチセンス配列は、遺伝子の翻訳又は転写をブロックする限り必ずしも標的配列に対して完全に相補的でなくてもよいし、修飾した塩基などを用いてもよい。通常、設計すべきアンチセンス核酸配列の長さは、遺伝子の発現を阻害し得る限り特に限定されるものではないが、例えば10～50塩基、好ましくは15～25塩基である。デコイ核酸(RNA)は、例えば、任意の転写因子の結合タンパク質をコードする遺伝子あるいは転写因子の結合部位の配列又は類似の配列を有するRNAであって、これらを「おとり」として細胞内に導入することによって転写因子の作用を抑制するものである。また、リボザイムとは、特定のタンパク質のmRNAを切断して、このタンパク質の翻訳を阻害するものをいう。リボザイムは特定のタンパク質をコードする遺伝子配列より設計することができ、例えば、ハンマーヘッド型リボザイムとしては、FEBS Letter, 228; 228-230(1988)に記載の方法を用いることができる。また、ハンマーヘッド型リボザイムだけではなく、ヘアピン型リボザイム、デルタ型リボザイムなどの、特定のタンパク質のmRNAを切断するものであって、これら特定のタンパク質の翻訳を阻害するものであれば本発明において使用しうる。

[0063] (核酸コンストラクトの導入)

次に、こうした核酸コンストラクトを、エレクトロポレーション装置を用いて生体内の細胞に導入する操作及びエレクトロポレーション装置の制御について説明する。図2には、この操作のフローの例を示す。図2には、電圧印加のタイミングやマトリックス材料の添加形態の異なる4種類のフローを示している。図2(a)及び(b)は、核酸コンストラクトの標的組織への供給及び到達後に電圧印加するフローを示し、図2(c)及び(d)は、核酸コンストラクトの標的生体組織への供給及び到達に伴って電圧印加するフローを示す。なお、これら操作フローは説明の容易化のために明示したが、これら4種のフローに示す操作を組み合わせる用いてもよい。また、これらの4種のフローの一部を組み合わせる用いてもよい。

[0064] 核酸コンストラクトは、電圧の印加に先立って予め又は電圧の印加と実質的に同時に生体組織に供給される。核酸コンストラクトは、どのような形態で標的となる生体組織に供給してもよい。例えば、注射、注入、鼻咽頭吸入、皮膚吸収、経口等で可能で

ある。核酸コンストラクトは全身に供給してもよいし、局所的に供給してもよい。静脈注射や経口等にて核酸コンストラクトを投与した場合には、好ましくは標的となる生体組織にデリバリーされるシステムを用いることが好ましい。また、核酸コンストラクトの供給には、表皮の切開等を伴う外科的手法を用いてもよいし、経皮経管的手法を用いることもできる。さらに、内視鏡的手法を用いることもできる。

[0065] 核酸コンストラクトは、標的となる生体組織の周囲に供給してもよいし、その内部に供給するようにしてもよい。また、電圧の印加方向を考慮してより多くの核酸コンストラクトが生体組織方向に移動するような箇所供給してもよい。こうした核酸コンストラクトの具体的供給部位は、電極形態や標的組織との関係で適宜設定される。

[0066] 核酸コンストラクトは、適当な媒体を伴って生体組織に供給されることが好ましい。例えば、注射や注入による場合には、所定の緩衝液や生理的食塩液などの生体適合性のある媒体を用いることができる。また、局所に注入する場合には、電圧印加以前に核酸コンストラクトが生体組織から拡散するのを抑制するために、血管収縮剤などを媒体に含めるか又は別個に供給してもよい。さらに、経口、鼻咽頭吸入、皮膚吸収等による場合には、そうした投与形態の製剤形態に準じた媒体を用いることができる。

[0067] また、核酸コンストラクトは、生体組織において生分解性マトリックスを形成可能なマトリックス材料とともに供給されてもよい。こうしたマトリックス材料が生体組織に存在することで、核酸コンストラクトの分解を抑制できるとともに、供給箇所からの核酸コンストラクトの拡散を抑制して、エレクトロポレーションにより導入効果を高めることができる。生体組織において生分解性マトリックスを供給可能なマトリックス材料としては、デンプン、アルギン酸、ヒアルロン酸、キチン、キトサン、ペクチン酸、アガロースおよびこれらの誘導体などの多糖類、あるいはゼラチン、アテロコラーゲンなどの各種コラーゲン(コラーゲンのタイプおよびその抽出法はいずれでもよい)などの生体高分子系材料が挙げられる。また、感熱応答性ポリマー、ポリ乳酸グリコール酸などのポリ乳酸系ポリマーなどのポリマーのほか、マトリゲル(日本BD社製、商標)、プルロニック(BASFジャパン社製、商標)なども用いることができる。

[0068] こうしたマトリックス材料としては、コラーゲンを好ましく用いることができる。コラーゲ

ンとしては、可溶性コラーゲン又は可溶化コラーゲンを用いることができる。「可溶性コラーゲン」としては、酸性あるいは中性の水または塩を含有する水に可溶であるもの等が挙げられる。「可溶化コラーゲン」としては、例えば、酵素により可溶化される酵素可溶化コラーゲン、アルカリにより可溶化されるアルカリ可溶化コラーゲン等が挙げられる。

[0069] コラーゲンの由来は特に問わないで、脊椎動物から抽出されたものまたはそれらの遺伝子組換え体を用いることができる。例えば、哺乳類、鳥類、魚類から抽出されたものまたはそれらの遺伝子組換え体を用いることができる。コラーゲンはI型～V型までの種類があるが特に限定しないで用いることができる。なかでも、哺乳動物の真皮から酸抽出したI型コラーゲンまたはそれらの遺伝子組換え体が挙げられる。より望ましくは、例えば、仔牛の真皮から酸抽出した1型コラーゲン、遺伝子工学的に生産される1型コラーゲンなどが挙げられる。遺伝子工学的に生産される1型コラーゲンとしては仔牛の真皮由来またはヒトの真皮由来のものが好ましい。また、安全性の面から抗原性の高いテロペプチドを酵素的に除去したアテロコラーゲンあるいは遺伝子工学的に生産されるアテロコラーゲンが望ましく、1分子あたりチロシン残基が3以下であるアテロコラーゲンがより好ましい。

[0070] コラーゲンをマトリックス材料として用いる場合、例えば、0.001v/v%以上10v/v%以下程度とすることができる。好ましくは、0.1v/v%以上5v/v%以下程度であり、より好ましくは、1.5v/v%以上3.75v/v%以下程度である。

[0071] なお、こうした生分解性マトリックス材料は、図2(b)及び(d)のフローに示すように、核酸コンストラクトと実質的に同時に生体組織に供給するほか、図2(a)及び(c)のフローに示すように、核酸コンストラクトとは別個に、核酸コンストラクトの生体組織への供給到達に先立って当該生体組織に供給されてもよい。さらに、図2(a)及び(c)のフローに示すように、核酸コンストラクトの生体組織への供給又は到達後にマトリックス材料を当該部位に供給してもよい。マトリックス材料の存在が核酸コンストラクトの導入効率を低下させる可能性がある場合には、マトリックス材料は電圧印加後に生体組織に供給してもよい。なお、マトリックス材料は、注射、注入等により局所的に標的となる生体組織に投与されることが好ましい。

- [0072] 本方法においては、核酸コンストラクトの存在下、生体組織に配置される電極に対して電圧を印加する。これにより細胞膜が穿孔され、核酸コンストラクトが細胞内へ導入されることになる。電圧印加のタイミングには、2種類ある。一つは、核酸コンストラクトを電圧印加に先立って予め生体組織に供給到達させておき、核酸コンストラクトが当該生体組織に供給され到達すると同時にあるいはその後（好ましくは速やかに）、生体組織の所定位置に配置された電極に所定条件で電圧を印加するタイミングである（図2(a)及び(b)）。他の一つは、核酸コンストラクトを生体組織に供給しながら電圧を印加するタイミングである（図2(c)及び(d)）。後者のタイミングで電圧を印加する場合には、予め生体組織の所定位置に電極をセットしておき、その状態で、核酸コンストラクトが当該生体組織に供給され到達されつつあるタイミングで電圧を印加することになる。なお、いずれの場合においても、電極の生体組織へのセットは、電圧印加に先立つ適切なタイミングで実施されることが好ましい。
- [0073] なお、電極に印加する電圧は50V以上70V以下とすることもできる。この範囲であると、固形腫瘍などの標的組織に0.2A程度の電流量を確保することができる。この電流量は、本発明者らによれば、siRNAなどの核酸コンストラクトを導入するのに適した電流量であることがわかっている。50V未満であると核酸コンストラクトを導入するのが困難となり、70Vを超えると細胞障害が強くなり組織が破壊されてしまうからである。
- [0074] 電極は生体組織に対して生体組織の部位や電極の形態等によって様々な態様で配置することができる。例えば、固形腫瘍などの罹患組織を含む生体組織の場合には、当該罹患組織を2以上の電極で挟持するように電極を配置することもできるし、少なくとも一本のニードル状電極を罹患組織部分に侵入させた状態で残りの電極を罹患組織の周囲に当接させるようにしてもよい。また、表皮下の固形腫瘍などの罹患組織に対して電極を配置する場合には、罹患組織の底部の下側にニードル状電極を侵入させるとともに、罹患組織を覆う表皮に他方の電極を当接させてもよい。また、血管などの生体組織には、血管を一对のプレート状電極で挟持するように電極を配置する。こうした各種の電極配置形態は、当業者であれば必要に応じ適切に設定することができる。

- [0075] 図3に、図1に示すエレクトロポレーション装置2を用い、図2の左側のフローに基づいて、表皮直下の固形腫瘍を標的生体組織としてsiRNA等の核酸コンストラクトの存在下に電圧を印加する操作の一例について示す。まず、固形腫瘍の中央部分に、表皮を介して核酸コンストラクトを含む液体を注射する。固形腫瘍に核酸コンストラクトが均等に供給及び到達されるように固形腫瘍の中央部分の2箇所以上において注射用ニードルを侵入させて前記液体を注射する。
- [0076] 次いで、核酸コンストラクトが供給された固形腫瘍の底部下側にニードル状電極10bを挿入するとともに、固形腫瘍の上部を覆う表皮にプレート状電極10aを当接させて、電極10a、10bとができるだけ安定して一定距離を保てるようにホルダー12の脚部12a、12bを強く把持し、その状態で本体4のパルス発信手段6を操作して方形波パルスを一周期で一定時間印加する。これにより、電圧が印加された生体組織内の細胞が穿孔され、その孔部から核酸コンストラクトが細胞内に導入される。なお、電極10bをパルス発生手段6のマイナス端子に接続し、電極10aを同じくプラス端子に接続した状態で電圧を印加することで、固形腫瘍の底部近傍に供給されマイナスに荷電した核酸コンストラクトは、固形腫瘍の上部側に移動するとともに穿孔により細胞内に導入されることが考えられる。
- [0077] なお、プレート状電極10aとニードル状電極（好ましくはフォーク状）10bとの配置態様によれば、ニードル状電極10bが組織側に刺し込まれるために、一対のプレート状電極を用いるよりも電気抵抗値が低下するものと推測される。また、ニードル状電極10bとプレート状電極10aとを対向させることで、両電極で皮下組織を直接挟持しても、あるいはニードル状電極10bは皮下に配置しプレート状電極10aについては表皮に当接させて挟持しても、固形腫瘍等の生体組織を確実に挟持するとともに、電極間距離を一定とするように挟持することができる。このために、相対的に低い電圧で高い電流量を安定して得られやすいと推測される。さらに、腫瘍内部は、血管新生が活発であり血管透過性も高いため、こうした組織近傍にニードル状電極10bが差し込まれることで、電流量を確保しやすいと考えられる。以上のことから、プレート状電極10aとニードル状電極10bとの組み合わせが生体組織を直接あるいは皮下組織を低侵襲的に表皮を介して間接的に挟持してエレクトロポレーションを実現するのに好ま

しいといえる。

[0078] 本発明方法によれば、上記例示した操作におけるエレクトロポレーション装置の制御によって、標的生体組織の細胞内にRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトを容易に、しかも迅速にかつ大量に送達させることができる。さらに、必ずしもウイルスベクターやアテロコラーゲンなどの媒介物も必要とせずにnakedな核酸コンストラクトを送達させることができる。このため、RNA干渉効果等の発現によって標的遺伝子の発現を効果的に抑制することができる。また、複数の核酸コンストラクトを導入することも容易である。また、コラーゲンなどのマトリックスを核酸コンストラクトと共存させることにより、核酸コンストラクト自体の安定性を向上させるほか電圧印加時において核酸コンストラクトを標的組織近傍に保持できること等により導入効率を維持向上することができる。

[0079] また、核酸コンストラクトにより標的遺伝子の発現を抑制することができることから、この方法によれば、標的遺伝子の発現抑制による疾患の予防又は治療方法や病態の改善方法も提供される。特に、血管新生を促進する遺伝子を標的とする核酸コンストラクトを用いた場合には、核酸コンストラクトが導入された腫瘍組織などの生体組織における血管新生を抑制することができる。この結果、標的遺伝子の発現抑制により血管新生を阻害できる場合には、固形腫瘍などのガンの進行抑制、予防又は治療方法、血管新生が起因となる眼内血管新生（糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症など）、動脈硬化症などの疾患の進行抑制、予防又は治療方法、リウマチやアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患の進行抑制、予防又は治療方法も提供される。また、標的遺伝子が、ウイルスの遺伝子やウイルスの増殖に関連する内在性遺伝子の場合等には、ウイルスによる感染症の進行抑制、予防又は治療方法も提供される。

[0080] （非ヒト動物の作製方法）

本発明の非ヒト動物の作製方法は、非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物においてRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入することを特徴としている。すなわち、本作製方法は、本発明のエレクトロポレーション装置の制御方法を非ヒト動物のみに適用した態様である。したがって、非ヒト動物、核酸コンストラクト及びエレクトロポレー

ション装置、その操作等については、上記した範囲の全てが非ヒト動物の作製方法についても適用される。

- [0081] この非ヒト動物作製方法によれば、例えば、部位特異的に所望の遺伝子の発現が抑制された非ヒト動物を得ることができる。胚操作によれば致死的であるような遺伝子の発現抑制であっても、容易にこうした遺伝子発現を抑制できるため、広い用途が期待される。また、この方法によれば、2種以上の遺伝子を容易にノックダウンすることができるため、2種以上の遺伝子の発現抑制による複合的な疾患等の研究用途がある。
- [0082] また、血管新生を促進する遺伝子を標的とする核酸コンストラクトを用いた場合には、生体組織における血管新生が抑制された非ヒト動物を得ることができる。このような非ヒト動物は、血管新生の抑制による治療的効果又は他の治療との組み合わせの効果等を容易に評価できる。本発明の非ヒト動物の作製方法においては、特に、非ヒト動物は生後の個体であることが好ましい。こうした非ヒト動物は、例えば、1種又は2種以上の標的遺伝子の発現が抑制された細胞又は生体組織を有している。
- [0083] 以上のように、本発明の非ヒト動物作製方法によれば、容易に所望の細胞又は生体組織での1種又は2種以上の遺伝子のノックダウンを実現できる。また、核酸コンストラクトとして、疾患関連遺伝子を標的としてRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能なsiRNAなどの核酸コンストラクトを用いる場合には、得られる非ヒト動物は、一過性又は局所的な疾患モデル動物となるので、こうした非ヒト動物を用いる治療剤を探索するためのスクリーニング系も提供される。
- [0084] 非ヒト動物の作製にあたっては、この非ヒト動物として疾患モデル動物などヒトの疾患のモデルとなるような病態、遺伝子変異又は生体組織又は細胞の表現型を有する非ヒト動物を準備し、この非ヒト動物に対して、これらの疾患等の関連遺伝子を標的としてRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトを導入することができる。こうした非ヒト動物の作製方法によって得られる非ヒト動物の病態の解析又は生体組織又は細胞の表現型を解析することにより、核酸コンストラクトの有効性評価を行うことができる。なお、核酸コンストラクトを導入するための非ヒト動物としては、商業的に入手可能な疾患モデル動物を用いてもよいし、正常な非

ヒト動物にヒトの疾患モデルとなるように非ヒト動物に予め処置を施すこともできる。例えば、非ヒト動物に腫瘍を人為的に形成させたり、ウイルスを感染させたりしてもよい。腫瘍を人為的に形成するには、変異原の投与や、ウイルス感染、腫瘍細胞又は腫瘍組織を移植し、該移植部位において前記腫瘍細胞を増殖させ、前記腫瘍組織を拡大させ、又は前記移植部位を原発とする転移部を形成させることなどによることができる。

[0085] なお、本明細書でいう病態の解析及び生体組織又は細胞の表現型の解析には、疾患が改善され、治療され、又は予防されたかどうかを評価するためのすべての解析を包含している。例えば、病態の解析としては、食餌、排泄、活動等の観察、全身及び身体部位の外観及び観察等が挙げられ、生体組織又は細胞の表現型の解析とは、生体組織又は細胞の観察や組織又は細胞特異的な遺伝子やタンパク質の発現や活性化の測定、代謝産物の測定等が挙げられる。

[0086] (治療剤の探索方法: 遺伝子治療剤)

本発明の治療剤の探索方法は、ヒトの疾患のモデルとなるような病態、遺伝子変異又は生体組織又は細胞の表現型を有する非ヒト動物の生体組織の細胞内に、前記非ヒト動物においてRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入し、前記核酸コンストラクトが導入された前記非ヒト動物における病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を解析することを特徴としている。この方法によれば、エレクトロポレーションにより核酸コンストラクトを導入するため、導入した核酸コンストラクトの前記疾患に対する有効性を容易に評価することができる。この結果、本発明によれば、遺伝子治療剤としての核酸コンストラクトを選抜できる有効なスクリーニング系が提供される。

[0087] なお、本発明の探索方法における非ヒト動物、核酸コンストラクト、エレクトロポレーション装置及びその操作等については、上記した範囲の全てが適用される。また、ヒトの疾患モデルとなるような病態又は遺伝子変異を有する非ヒト動物は、上記非ヒト動物の作製方法において記載したような手法で作製することができる。

[0088] (治療剤の探索方法: 低分子化合物などの薬剤)

本発明の治療剤の探索方法は、非ヒト動物の生体組織の細胞内に、前記非ヒト動物においてRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入して前記非ヒト動物の少なくとも一部においてヒトの疾患における病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を形成する工程と、この非ヒト動物に1種又は2種以上の化合物を投与して前記病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を解析することを特徴とする。この方法によれば、非ヒト動物に対して、エレクトロポレーションにより核酸コンストラクトを導入してヒトの疾患態様を形成し、化合物を投与してその効果を解析するものであるので、非ヒト動物において前記核酸コンストラクトにより形成された疾患態様に対する低分子化合物等の有効性を容易に評価できる。この結果、低分子化合物を有効成分とする薬剤を選抜できる有効なスクリーニング系を提供できる。なお、低分子化合物等の薬剤候補の投与形態は特に限定しないで、経口、注射、注入等従来公知の各種形態を採用できる。

[0089] (創薬のための標的化合物の探索方法)

本発明の創薬のための標的化合物の探索方法は、非ヒト動物の生体組織の細胞内に、非ヒト動物における疾患関連遺伝子を標的としてRNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入し、前記核酸コンストラクトが導入された前記生体組織又は細胞の表現型を解析することを特徴としている。この方法によれば、前記細胞又は生体組織の表現型を解析することにより、前記疾患の予防又は治療のための標的化合物を見出すことができる。標的化合物を見出すことにより、この化合物を活性化又は阻害する化合物などを探索するスクリーニング系が提供される。なお、この場合の細胞又は生体組織の表現型の解析とは、例えば、こうした細胞又は生体組織の観察や、細胞活性状態、タンパク質の発現量や活性化、各種代謝産物の測定などが挙げられる。なお、疾患関連遺伝子とは、疾患に関連することが明らかである遺伝子のみならず、疾患に関連する可能性のある遺伝子であってもよい。

[0090] 以上説明したように、本発明の各種の実施形態によれば、いずれも、RNA干渉等により遺伝子の発現を抑制可能な1種又は2種以上の核酸コンストラクトを動物の細胞又は生体組織の少なくとも一部にエレクトロポレーションにより導入することにより、

簡易に、迅速に、生体内においてRNA干渉等による遺伝子サイレンシングによるノックダウンを実現させることができる。特に、siRNAやshRNA、より好ましくはsiRNAであるRNAコンストラクトを直接生体にエレクトロポレーションすることにより、直接的に生体において遺伝子サイレンシングが可能となっている。

実施例

[0091] 以下、本発明について実施例を挙げて具体的に説明するが、以下の実施例は本発明を限定するものではない。

[0092] (実施例1)

本実施例では、ヒトVEGF-A(以下、hVEGF-Aという。)(GenBankアクセッション番号NM_003376)のCDS配列に基づいて5種類のsiRNAを作製し、invitroでそのノックダウン効果を検討した。

[0093] <siRNAの作製>

5種類のsiRNAのhVEGF-Aのターゲット配列を図4及び配列番号:1~5に示す。なお、図4における遺伝子配列の標記はCDSとなっている。また、合成したsiRNAのセンス配列を配列番号:6~10に示し、二重鎖RNAとしての形態を図5に示す。なお、全てのsiRNAは、ターゲット配列に基づいてDharmacon社に依頼して合成させた。

[0094] <siRNAの評価>

各種のsiRNAを、PC-3細胞におけるhVEGF-A発現の抑制効果により評価した。ヒト前立腺癌細胞PC-3(ATCC)を35mmディッシュにまき(2×10^5 個/皿)、1晩静置後、各siRNAを無血清条件下で陽イオン脂質試薬(リポフェクトアミン・プラス:インビトロジェン社)にてトランスフェクション(37℃、4時間)した。導入後、10%FBS1mlを添加し、6時間培養後、ヘパリン $20 \mu\text{g/ml}$ 含有無血清培地に交換して16時間培養後に、培養上清を回収し、Quantikinehuman VEGF ELISAキット(R&D Systems社)でhVEGF-A濃度を測定した。結果を、図6に示す。

[0095] 図6に示すように、#2及び#3のsiRNAが高いhVEGF-A抑制効果を示し、#3のsiRNAが最も高い抑制効果を示した。

[0096] (実施例2)

本実施例では、実施例1の#3siRNA(安定化修飾基で修飾されていない)と、#3 siRNAと同じターゲット配列に基づいて安定化されたsiRNAを用いて、hVEGF-A発現の抑制効果を確認した。なお、安定化させたsiRNAは、#3のターゲット配列に基づいてDharmacon社に依頼して、同社による安定化修飾基で修飾したsiRNAであるsiSTABLE(Dharmacon社の商標)として合成させた。

[0097] <siRNAの評価>

これら2種のsiRNAを、PC-3細胞におけるhVEGF-A発現の抑制効果により評価した。ヒト前立腺癌細胞PC-3(ATCC)を35mmディッシュにまき(2×10^5 個/皿)、1晩静置後、各siRNAを無血清条件下で陽イオン脂質試薬(リポフェクトアミン・プラス:インビトロジェン社)にてトランスフェクション(37°C 、4時間)した。導入後、10%FBS1mlを添加し、6時間培養後、ヘパリン $20 \mu\text{g/ml}$ 含有無血清培地に交換して培養を継続した。導入後、48、72、96、120、144及び168時間後に培養上清を回収し、Quantikinehuman VEGF ELISAキット(R&D Systems社)でhVEGF-A濃度を測定した。なお、#3のターゲット配列に対するスクランブル配列についてのそれぞれ非修飾のsiRNAとDharmacon社によるsiSTABLEによる安定化siRNAについて同様の方法にてVEGF-A濃度を測定した。これらの結果を、図7に示す。

[0098] 図7に示すように、#3安定化siRNAは導入48時間後には約70%のノックダウン率であったが、時間の経過とともにRNAi効果を強く発揮する傾向があった。#3非修飾siRNAは、徐々にRNAi効果が減弱していく傾向が認められたが、168時間後において#3非修飾siRNAのRNAi効果は、依然として安定化siRNAの約半分程度を維持していた。#3siRNAのスクランブル配列を備えるsiRNAは、いずれも(安定化タイプも非修飾タイプの双方)、RNAi効果を全く示さなかった。なお、mock(導入脂質試薬のみ)でも、hVEGF-A分泌量は変化しなかった。

[0099] (実施例3)

本実施例では、エレクトロポレーションにより、腫瘍にsiRNAを導入するための至適電圧を決定した。エレクトロポレーションによる導入方法を以下に示す。PC-3細胞(3×10^6 個/部位)をヌードマウス(日本SLC:オス、8週齢)の鼠径部に皮下注射(24

G針)し、PC-3皮下移植腫瘍(Xenograft)担癌マウスを作成した。細胞移植後、3～4週間経過すると、同部位に腫瘍が形成された(腫瘍体積 $=50\text{mm}^3\sim80\text{mm}^3$)。こうしたマウスをエレクトロポレーション実験に用いた。なお、腫瘍体積は次式より求めた。

$$V = (\text{短軸})^2 \times (\text{長軸}) \div 2$$

[0100] ネンブタール麻酔(補助麻酔:エーテル吸入)して四肢を固定した。また、図1に示すような形態を備えるプレート&フォーク型電極(白金の長方形プレート状電極:6.67mm×3.87mm、ステンレス製フォーク状電極:フォーク3本、長さ6.67mm、間隔1.3mm、ネッパジーン社製)のプレート状電極側にあらかじめPBSを浸したパッドを貼っておいた。安定化siRNAのPBS溶液を $10\mu\text{l}$ ずつ計2か所、合計 $20\mu\text{l}$ を盛り上がった皮下腫瘍の中央部に注入した。フォーク状電極側を皮下腫瘍下部に刺し、プレート状電極を腫瘍上部の表皮にかぶせて挟持した。この状態でCUY21(ネッパジーン社製)にて通電した。通電条件は、 $P_{\text{on}}=50\text{msec}$ 、 $P_{\text{off}}=100\text{msec}$ で3回パルス発信した後、極性を切り替えて、同様に3回パルス発信して、合計6回パルス発信した。

[0101] 至適電圧の決定にあたっては、siRNAとしてCy3標識した#3siSTABLE-modified siRNA(Dharmacon社に合成依頼した。)を用いて、siRNAの腫瘍への導入における至適電圧を決定した。Cy3標識安定化siRNA($40\mu\text{M}$)を腫瘍あたり $20\mu\text{l}$ ($10\mu\text{l}\times 2$ か所)ずつ注入し、上記方法にて、エレクトロポレーションを施した。電圧を35, 50, 60, 70, 90, 100Vに設定し、通電を行い、実際に腫瘍に流れた実効電流値を記録した。24時間後に腫瘍を摘出、凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡にてCy3の赤色蛍光を観察・追跡した。また、サイトックス・グリーン(インビトロジェン社)試薬にて、細胞の核を染色した(緑色蛍光)。Cy3標識安定化siRNA($40\mu\text{M}$)を腫瘍あたり $20\mu\text{l}$ ($10\mu\text{l}\times 2$)ずつ注入後、通電しない群も合わせて検討した。これらの結果から、50V以上70V以下の設定電圧で通電するとsiRNAが効率よく細胞内に導入されることがわかった。

[0102] (実施例4)

本実施例では、siRNAの腫瘍内の滞留性について評価した。すなわち、通電導入

後に、5, 10, 15及び20日後に評価し、腫瘍の摘出から凍結切片の作製を行う以外は、実施例3と同様の操作を行い、同様に共焦点レーザー顕微鏡にてCy3標識物を追跡観察した。この結果、Cy3標識安定化siRNAが少なくとも20日間は腫瘍内に滞留することが証明された。

[0103] (実施例5)

本実施例では、エレクトロポレーションによるsiRNAの抗腫瘍効果(治療効果)について評価した。方法を以下に示す。安定化#3siRNAのPBS溶液(6.25, 12.5, 25 μ M液)を、実施例3と同様にしてPC-3皮下腫瘍(治療開始体積=50~80mm³)に注入し(10 μ l×2回)、直ちにプレート&フォーク型電極のフォーク側を腫瘍下部に刺し、通電した(設定電圧一律70V)。なお、対照としてPBSを腫瘍に注入し(10 μ l×2回)、通電する群も設定した。また、スクランブル配列を備える安定化siRNAのPBS溶液(25 μ M)を注入する(10 μ l×2回)群も置いた。さらに、通電しない全くの無処置群も置いた。治療開始日をday0とし、day20に2回目の治療を全く同様の手法で再施行し、42日目まで腫瘍径をモニタし、治療効果の指標としては、day0の腫瘍体積(計算式は実施例3に記載)に対する所定日数経過時点での腫瘍体積の比を治療効果の指標とした。なお、各治療群において担癌マウス5匹を対象とした。なお、腫瘍あたりのsiRNAの使用量は以下のとおりであった。結果を図8に示す。

腫瘍あたりのsiRNA量

6.25 μ M液を20 μ l注入 125pmol

12.5 μ M液を20 μ l注入 250pmol

25 μ M液を20 μ l注入 500pmol

[0104] また、治療開始40日目の腫瘍の外観の写真を図9(a)~(d)に示す。図9(a)は、安定化siRNAであって、siRNA量が500pmol/腫瘍(エレクトロポレーションあり)の腫瘍外観であり、図9(b)は、PBSのみ(エレクトロポレーションあり)の腫瘍外観であり、図9(c)は、スクランブル配列を備えるスクランブル化・安定化siRNAであって、siRNA量が500pmol/腫瘍(エレクトロポレーションあり)の腫瘍外観であり、図9(d)無処理(エレクトロポレーションなし)の腫瘍外観である。

[0105] さらに、安定化siRNA(500pmol/腫瘍)によって治療を施した腫瘍及びスクラン

ブル化・安定化siRNA500pmol／腫瘍)を投与した腫瘍について、腫瘍内微小血管密度をCD31(血管内皮細胞上の表面抗原)をマーカーとした免疫化学的染色法にて測定した。治療開始から起算して、10、20、30日目の腫瘍について検討した。結果を図10に示す。

[0106] 図8に示すように、安定化siRNAについては、腫瘍あたりのsiRNA量が250pmol及び500pmolのとき、ほぼ同等の治療効果(抗腫瘍効果)が認められた。一方、同量が125pmolのときには、これらよりは治療効果が減弱した。また、図8及び図9に示すように、スクランブルでは、全く治療効果は認められなかった。さらに、PBSを注入してから通電する群も治療効果が認められず、通電なしの無処置群と同等であった。通電による組織障害による癌退縮は全く観察されなかった。以上のことから、エレクトロポレーションによるsiRNAのデリバリーは、簡易かつ迅速な手法であるとともに局所適用に優れ、さらに、高い治療効果が得られることがわかった。

[0107] また、本発明者らが既に行ったアテロコラーゲンを用いるsiRNAデリバリー法による結果(Y. Takeiら、CANCER RESEARCH 64, 3365-3370, MAY 15, 2004)と比較すると、本実施例のエレクトロポレーションによるデリバリー法において腫瘍あたりのsiRNA量が250pmol時の治療効果が、アテロコラーゲンデリバリー法において同量が500pmol時の治療効果と一致していた(なお、アテロコラーゲンデリバリー法では、非修飾siRNAを用いている。)。以上のことから、エレクトロポレーションによるsiRNAデリバリーはアテロコラーゲンデリバリー法に匹敵するか又はそれ以上の有効性を有していることがわかった。

[0108] さらに、図10に示すように、安定化siRNAにより治療群では、スクランブル配列を備える安定化siRNA治療群と比較して、明らかに腫瘍内微小血管密度が減少していた。以上の結果より、本治療による癌増殖抑制効果はsiRNAによる腫瘍内hVEGF-A量の低下に起因する腫瘍内血管新生の抑制のメカニズムによるものであることが証明された。

[0109] (実施例6)

本実施例では、安定化#3siRNA単体のPBS溶液(12.5 μ M)をsiRNA溶液と用いる以外は、実施例3と同様にしてPC-3皮下腫瘍(治療開始体積=50~80m

m³)に注入し(10 μ l $\times$ 2回)、直ちにプレート&フォーク型電極のフォーク側を腫瘍下部に刺すとともに、プレート型電極を表皮に当接させて皮下腫瘍を挟持して通電した(設定電圧一律70V)。なお、siRNAは、腫瘍あたり250pmolとなるように導入した。また、比較例として、未修飾 #3siRNA (12.5 μ M)とアテロコラーゲン(1.75%)とを含有する溶液をsiRNA量が同量となるように皮下腫瘍に注入(10 μ l $\times$ 2回)する群も設定した。さらに、対照例としてPBSを皮下腫瘍に注入し(10 μ l $\times$ 2回)、通電する群も設定した。初回治療日をday0とし、20日後にもう一度、上記治療を行い、40日後まで腫瘍の大きさをそれぞれにつき計測した。結果を図11に示す。

[0110] 図11に示すように、安定化 #3siRNA単体をエレクトロポレーションにて導入した群(図中、白抜き丸印)は、未修飾の #3siRNAをアテロコラーゲンで導入した群(比較例)(黒三角印)よりも治療効果があった。以上のことから、siRNAのエレクトロポレーションによる導入方法によれば、アテロコラーゲン導入法よりも優れたsiRNAの作用発現効果、すなわち、遺伝子発現抑制効果及び腫瘍抑制効果が得られることがわかった。

[0111] (実施例7)

本実施例では、エレクトロポレーションに使用する電極形状と通電量について検討した。実施例3と同様にしてヌードマウス皮下にPC-3(ヒト前立腺癌)細胞を移植して腫瘍を形成し、腫瘍体積が50~80mm³程度となった腫瘍組織に対して、一対のプレート状電極(プレート電極(白金の長方形プレート状電極:6.67mm $\times$ 3.87mm)ネッパジーン社製))とプレート状電極とニードル状電極(図1に示すような形態を備えるプレート&フォーク型電極(白金の長方形プレート状電極:6.67mm $\times$ 3.87mm、ステンレス製フォーク状電極:フォーク3本、長さ6.67mm、間隔1.3mm、ネッパジーン社製))とを用いて組織障害が生じない程度の電圧(70V)を印加したときの腫瘍内の実測抵抗値及び実測電流値を計測した。なお、一対のプレート状電極は、表皮を介して腫瘍の側面から固形腫瘍を挟持するように配置し、プレート状電極及びニードル状電極は、ニードル状電極を皮下固形腫瘍の底部の下に刺し込むとともにプレート状電極を表皮を介して固形腫瘍の上方に配置して挟持するようにした。また、各実測値は、それぞれの電極形状につき5つの固形腫瘍を用いて計測したもの

である。エレクトロポレーション装置としては、CUY21(ネッパジーン社製)を用い、各実測値の計測のための通電条件(‘通電条件は、 $P_{on}=50\text{msec}$, $P_{off}=100\text{msec}$ で3回パルス発信した後、極性を切り替えて、同様に3回パルス発信して、合計6回パルス発信した。)は同一とした。結果を表1に示す。

[表1]

電極形態		検出項目	1	2	3	4	5	平均	標準偏差	t-test (vs A法)
A	プレート& プレート	抵抗値 (ohm)	929	1260	1601	840	940	1114	315	—
		極性切替前 (A)	0.08	0.09	0.08	0.05	0.06	0.072	0.016	—
		極性切替後 (A)	0.09	0.07	0.08	0.08	0.05	0.074	0.015	—
B	プレート& ニードル	抵抗値 (ohm)	874	1300	614	599	723	822	289	0.165
		極性切替前 (A)	0.15	0.09	0.47	0.23	0.19	0.226	0.146	0.047
		極性切替後 (A)	0.23	0.09	0.18	0.15	0.28	0.186	0.073	0.010

[0112] 表1に示すように、プレート状電極とニードル状電極とを用いた場合には、一对のプレート状電極を用いた場合と比較して抵抗値には有意差はなかったが、有意に高い電流値が計測された。本発明者は、腫瘍組織へのsiRNAの効率的な導入には、0.2アンペア程度の電流量であるという知見を得ており、当該知見によれば、プレート状電極を用いた場合、腫瘍組織に生体障害性の低い70Vの印加電圧では、siRNAの安全な導入は期待できないことが推測される。なお、印加電圧を増大させれば、電流量が増大するが、組織障害や脱落が生じてしまい生体に対する安全性を確保できない場合も起こりうる。

[0113] このようなプレート状電極とニードル状電極との配置態様によれば、ニードル状電極とプレート状電極とを対向させることで、両電極で皮下組織を直接挟持しても、あるいはニードル状電極は皮下に配置しプレート状電極については表皮を介して挟持しても、固形腫瘍等の生体組織を確実に挟持するとともに、電極間距離を一定とするように挟持することができる。このために、高い電流量が得られやすいと推測される。さらに、腫瘍内部は、血管新生が活発であり血管透過性の高いため、こうした組織近傍にニードル状電極が差し込まれることで、電流量を確保しやすいと考えられる。以上のことから、プレート状電極とニードル状電極との組み合わせが生体組織を直接あるいは皮下組織を低侵襲的に表皮を介して間接的に挟持してエレクトロポレーションを実現するのに好ましいといえる。

- [0114] さらに、標的とする生体組織が腫瘍組織(特に、皮下腫瘍組織)であり、導入するsiRNA等の核酸コンストラクトの標的遺伝子が血管内皮増殖因子(VEGF)である場合には、プレート状電極及びニードル状電極との組み合わせが適切であり、上記した固形腫瘍に対する配置態様での電圧印加によるエレクトロポレーションが有効であると考えられる。
- [0115] 本出願は、2005年7月16日に出願された日本国特許出願第2005-207067号を優先権主張の基礎としており、その内容の全てが引用により含まれる。

産業上の利用の可能性

- [0116] 本発明は、エレクトロポレーション装置の製造及びその利用に有用である。

配列表フリーテキスト

- [0117] 配列番号1～5: target sequence of siRNA to human VEGF-A
配列番号6～10: sense sequence of siRNA

請求の範囲

- [1] ヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法であつて、
前記動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトの存在下、前記動物の生体組織に対して配置される前記エレクトロポレーション装置の電極に電圧を印加する工程、
を備える、方法。
- [2] 前記核酸コンストラクトは、一本鎖又は二本鎖DNA、一本鎖又は二本鎖RNA、DNA-RNAハイブリッド及びDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドから選択される、請求項1に記載の方法。
- [3] 前記核酸コンストラクトは、前記動物においてRNA干渉を発現可能な核酸コンストラクトである、請求項1又は2に記載の方法。
- [4] 前記核酸コンストラクトは、siRNAである、請求項3に記載の方法。
- [5] 前記核酸コンストラクトは、修飾により血清中での安定性が向上されている、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [6] 前記核酸コンストラクトは、ヒト血清中での半減期が50時間以上である、請求項5に記載の方法。
- [7] 前記核酸コンストラクトは、血管新生を促進する遺伝子を標的としてRNA干渉を発現可能なコンストラクトである、請求項1～6のいずれかに記載の方法。
- [8] 前記遺伝子は、血管内皮増殖因子遺伝子である、請求項7に記載の方法。
- [9] 前記生体組織は、固形腫瘍を含む、請求項1～8のいずれかに記載の方法。
- [10] 前記生体組織は表皮又は表皮下に存在する組織である、請求項1～9のいずれかに記載の方法。
- [11] 前記電極に電圧を印加するのと先立って若しくは印加後又は同時に、前記生体組織又はこれらの近傍に生分解性マトリックス材料を供給する工程を備える、請求項1～10のいずれかに記載の方法。
- [12] 前記電圧印加工程は、前記核酸コンストラクトを前記生体組織又はその近傍に供給した後又は供給しつつ前記生体組織に対して配置される前記電極に電圧を印加

- する工程である、請求項1～11のいずれかに記載の方法。
- [13] 前記電極は、少なくとも一つのプレート状電極を備えている、請求項1～12のいずれかに記載の方法。
- [14] 前記電極は、1本又は2本以上のニードル状電極を備えている、請求項1～13のいずれかに記載の方法。
- [15] 前記ニードル状電極には、前記核酸コンストラクトを含む液体が通過可能な中空部と開口とを備える、請求項14に記載の方法。
- [16] 前記エレクトロポレーション装置は対極となる電極としてプレート状電極とニードル状電極とを備える、請求項1～15のいずれかに記載の方法。
- [17] 前記プレート状電極は前記核酸コンストラクトを導入しようとする生体組織の表面に対して配置し、前記ニードル状電極は前記生体組織又はその近傍に穿刺して配置する、請求項1～16のいずれかに記載の方法。
- [18] 前記生体組織は皮下固形腫瘍であり、前記プレート状電極は、前記皮下固形腫瘍を覆う表皮表面に当接して配置し、前記ニードル状電極は、前記生体組織又はその近傍に穿刺して配置する、請求項17に記載の方法。
- [19] 前記電極に印加する電圧は50V以上70V以下である、請求項1～18のいずれかに記載の方法。
- [20] ヒト及び非ヒト動物を含む動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法であって、
前記動物においてRNA干渉を発現可能なsiRNAの存在下、前記動物の表皮下の罹患組織の下部に配置されたニードル状電極と前記罹患組織を覆う表皮表面に配置されたプレート状電極とに対して所定の電圧を印加する工程、
を備える、方法。
- [21] 前記動物はヒトであり、前記罹患組織は血管新生阻害によって進行抑制、改善又は治療が可能な組織を含んでいる、請求項20に記載の方法。
- [22] 非ヒト動物の作製方法であって、
前記非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程、

を備える方法。

- [23] 前記核酸コンストラクトは、疾患関連遺伝子を標的としてRNA干渉を発現可能な核酸コンストラクトである、請求項22に記載の作製方法。

- [24] 非ヒト動物の作製方法であって、

ヒトの疾患モデルとして成立可能な病態、遺伝子変異又は生体組織若しくは細胞の表現型を有する前記非ヒト動物を準備する工程と、

該非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程、
を備える方法。

- [25] 治療剤の探索方法であって、

ヒトの疾患モデルとして成立可能な病態、遺伝子変異又は生体組織若しくは細胞の表現型を有する前記非ヒト動物を準備する工程と、

該非ヒト動物の生体組織の細胞内に前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入する工程と、

前記核酸コンストラクトが導入された前記モデル動物における病態又は前記生体組織若しくは細胞の表現型を解析する工程と、
を備える、方法。

- [26] 治療剤の探索方法であって、

非ヒト動物の生体組織の細胞内に、前記非ヒト動物において遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入して前記非ヒト動物の少なくとも一部においてヒトの疾患における病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を形成する工程と、

この非ヒト動物に化合物を投与して前記病態又は生体組織若しくは細胞の表現型を解析する工程と、
を備える、方法。

- [27] 創薬のための標的化合物の探索方法であって、

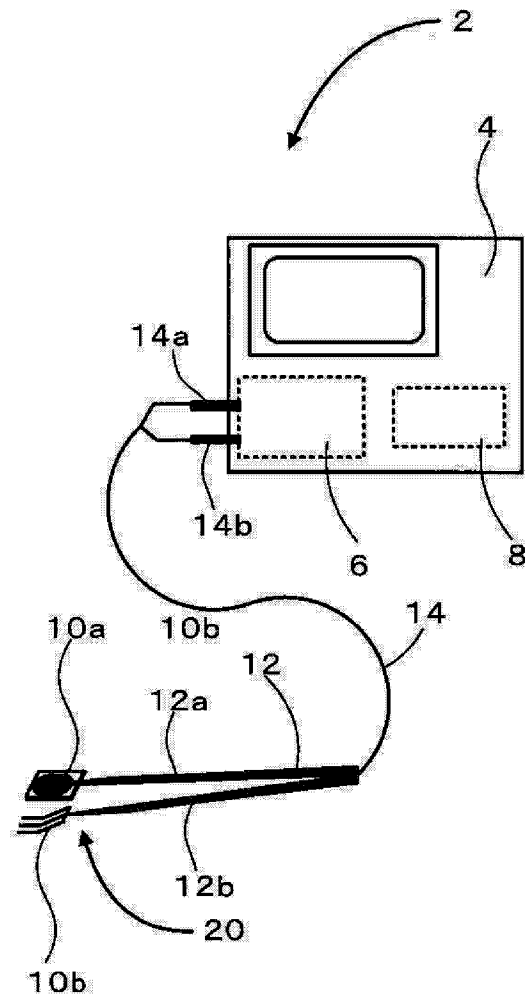
非ヒト動物の生体組織の細胞内に、非ヒト動物における疾患関連遺伝子を標的として遺伝子の発現を抑制可能な核酸コンストラクトをエレクトロポレーションにより導入

する工

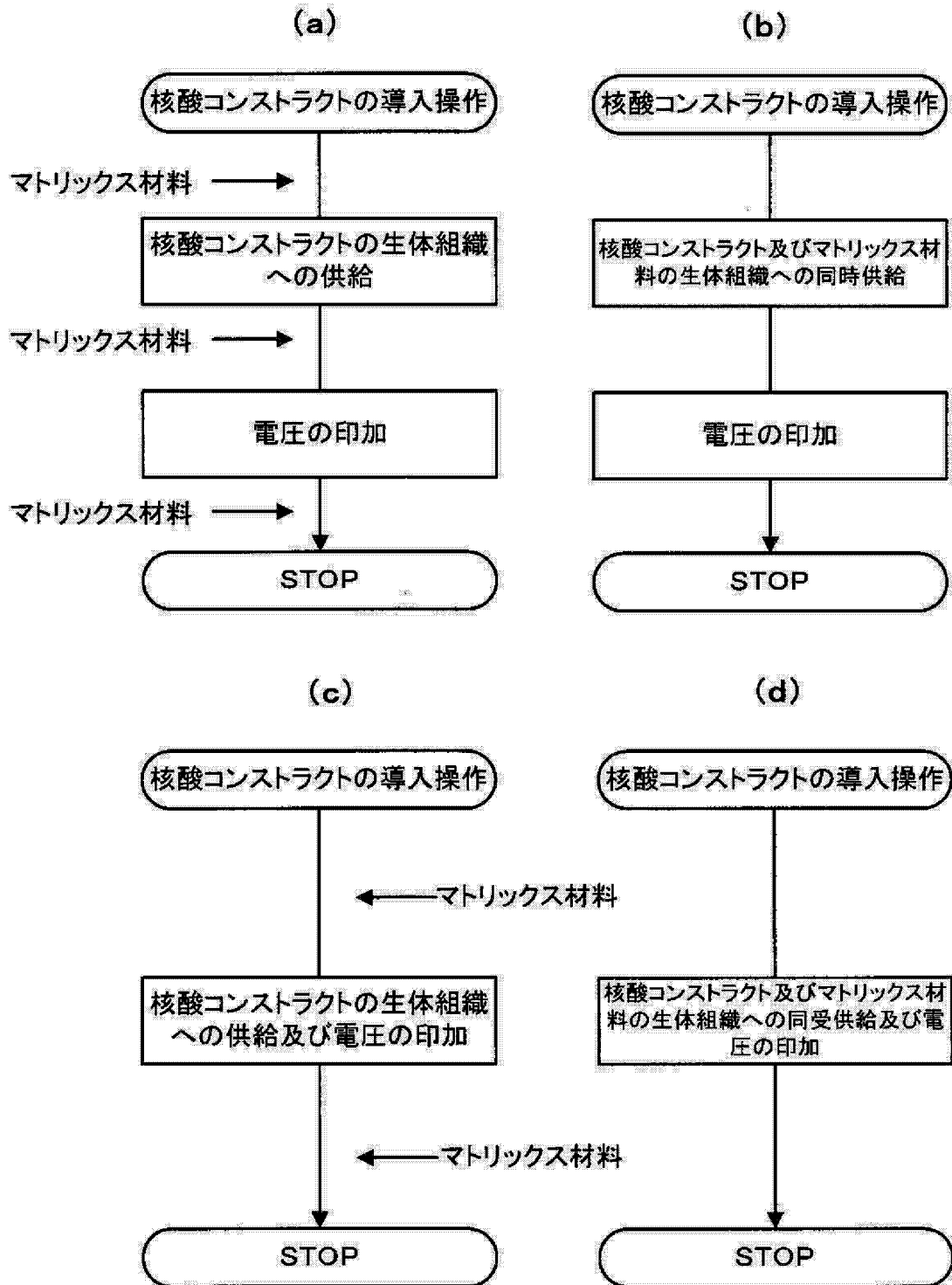
程と、

前記核酸コンストラクトが導入された前記生体組織又は細胞の表現型を解析する
工程と、
を備える、方法。

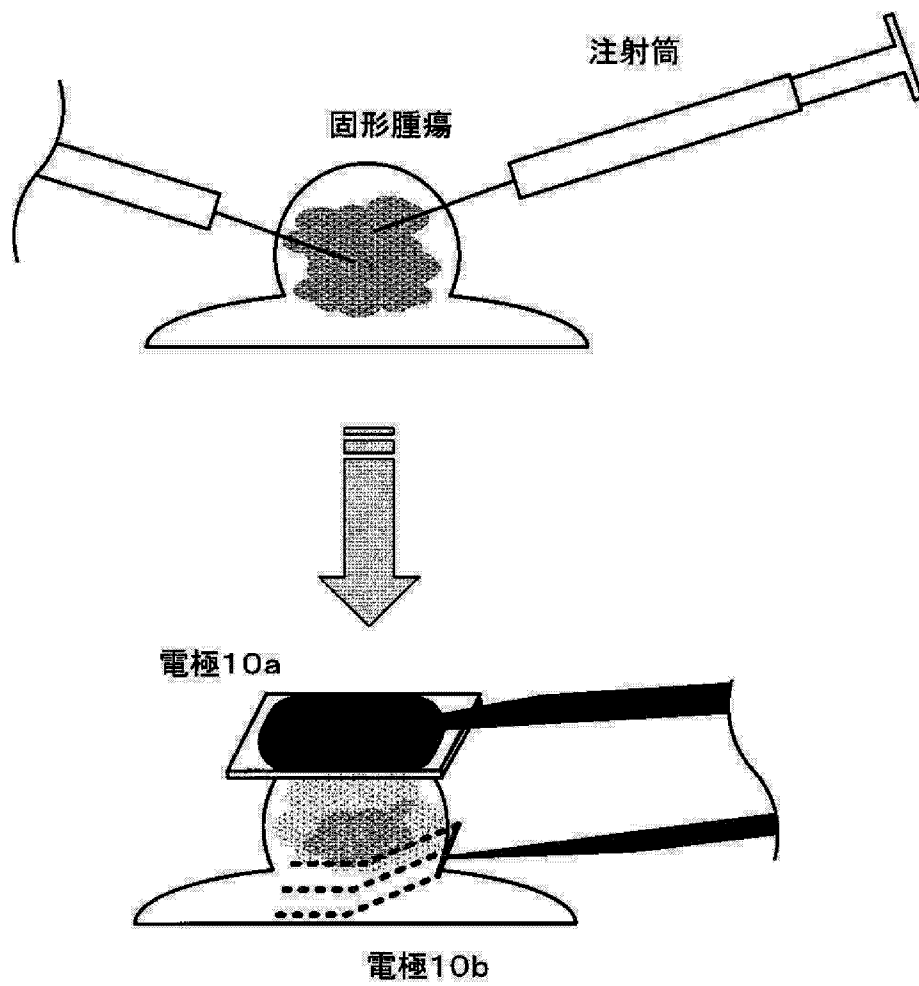
[図1]



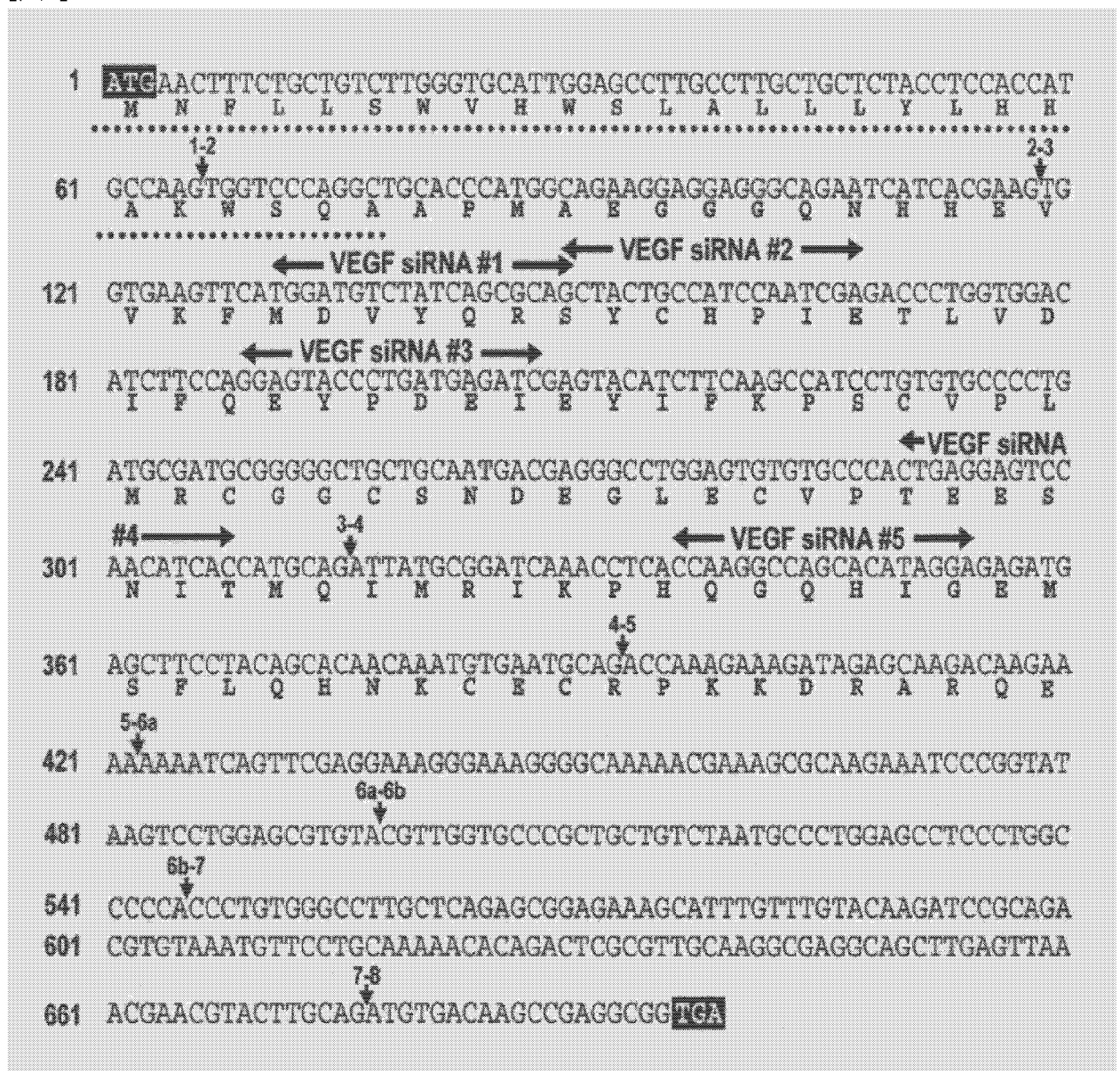
[図2]



[図3]



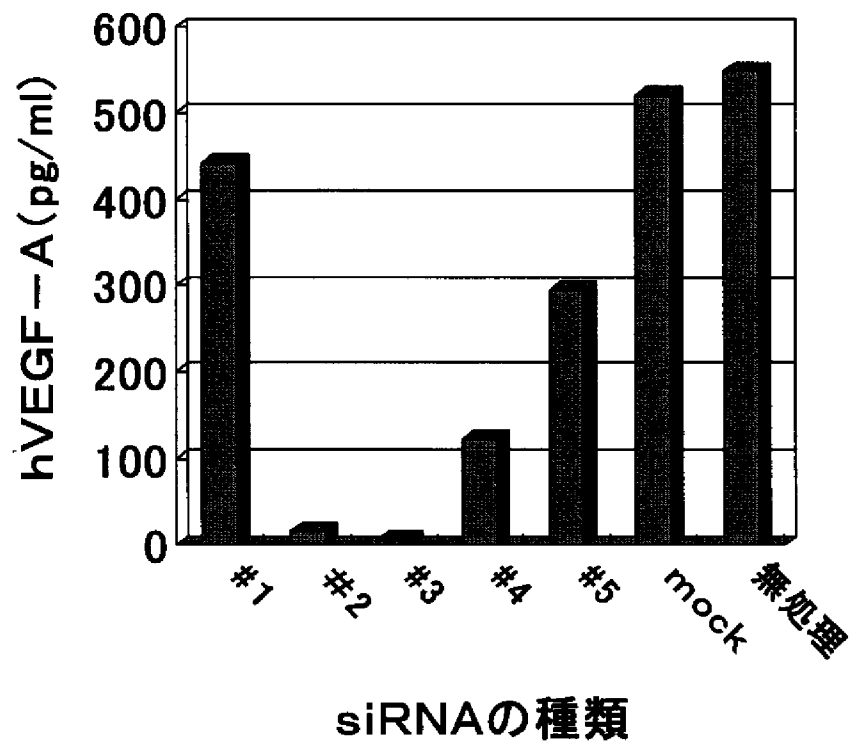
[図4]



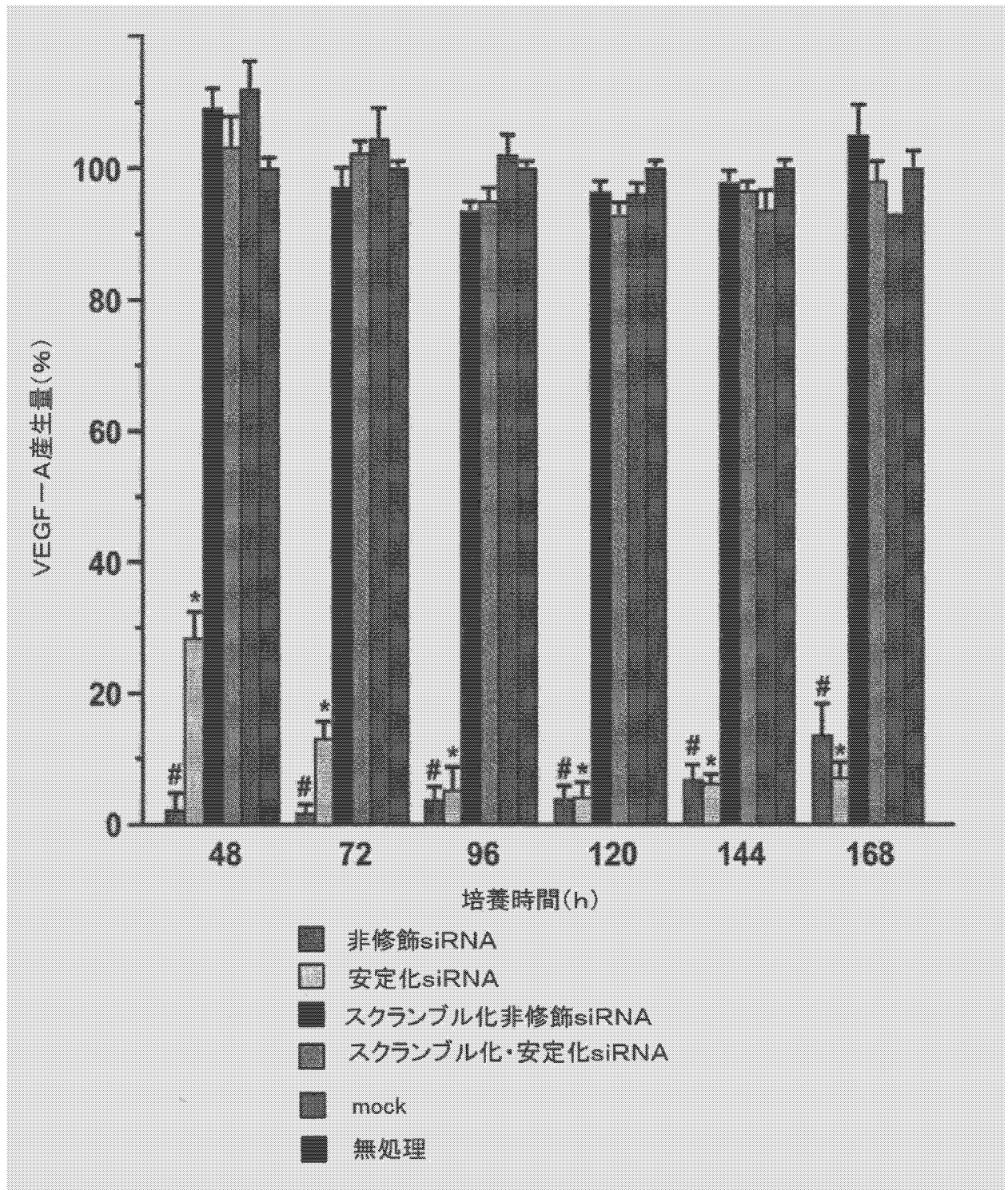
[図5]

#1 siRNA	uggau gucua ucagc gcag dtdt
	dtdt accua cagau agucg cguc
#2 siRNA	gcuac ugcca uccaa uca dtdt
	dtdt cgaug acggu agguu agcu
#3 siRNA	ggagu acccu gauga gauc dtdt
	dtdt ccuca ugga cuacu cuag
#4 siRNA	cugag gaguc caaca ucac dtdt
	dtdt gacuc cucag guugu agug
#5 siRNA	ccaag gccag cacau agga dtdt
	dtdt gguuc cgguc gugua uccu

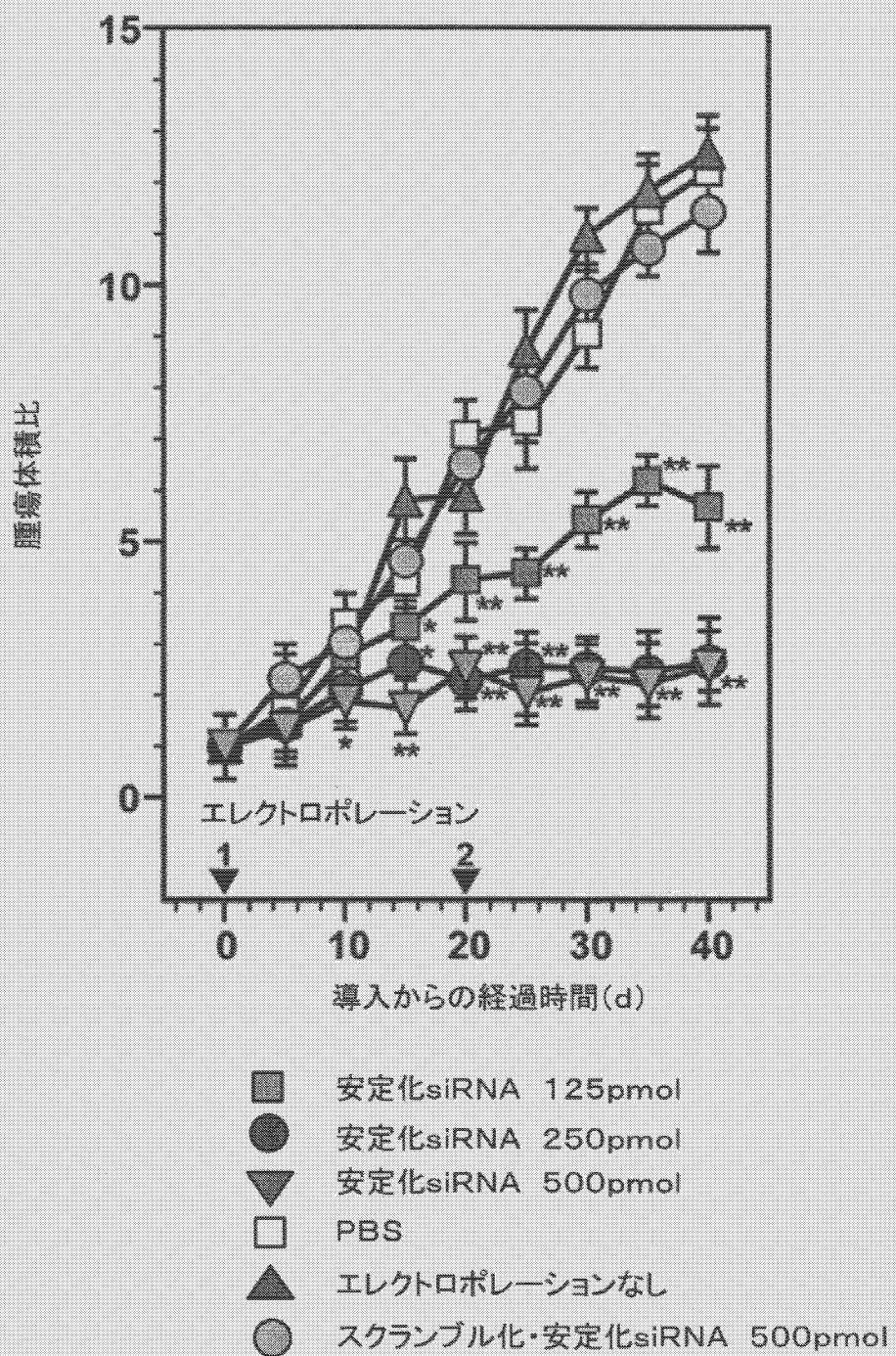
[図6]



[図7]



[図8]



[図9]

導入40日後

(a)

安定化siRNA
500pmol/腫瘍

(b)



PBS

(c)

安定化・スクランブル化
siRNA
500pmol/腫瘍

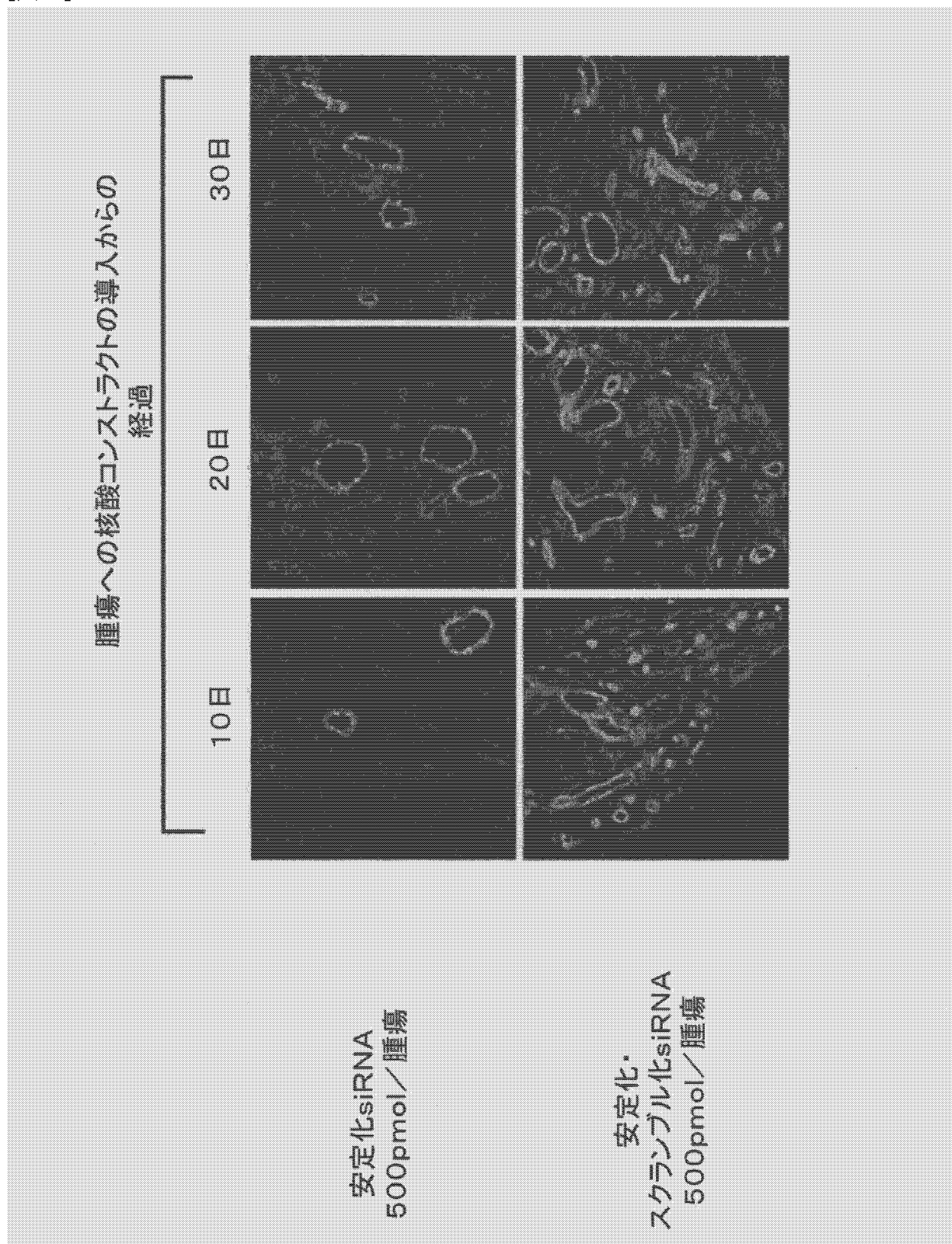
(d)



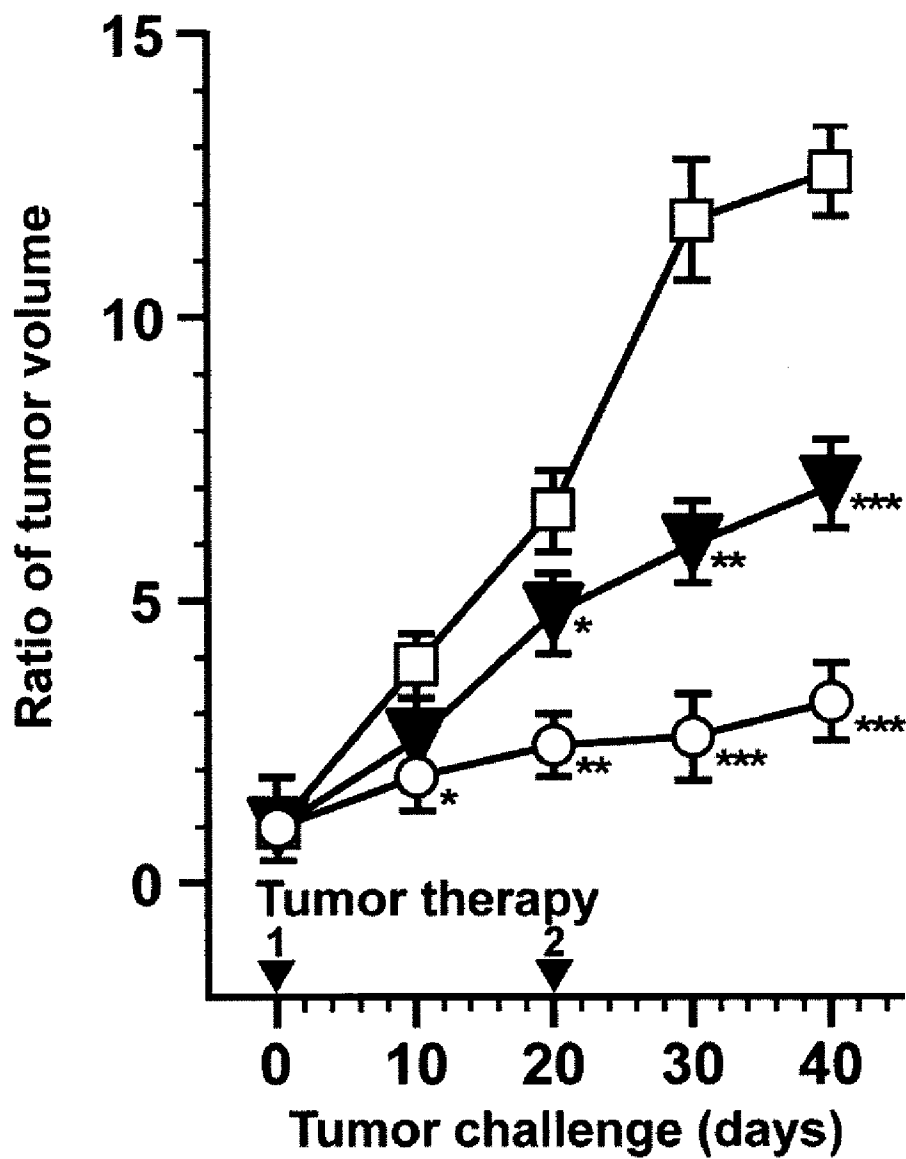
無処理

(a)~(c): エレクトロポレーションあり
(d): エレクトロポレーションなし

[図10]



[図11]



- : 実施例6 (安定化siRNA + エレクトロポレーション)
- ▼ : 比較例 (未修飾siRNA + アテロコラーゲン)
- : 対照例 (PBS + エレクトロポレーション)

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus PBS

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, A61D7/00(2006.01)i, A61N1/30(2006.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,
A61K31/7088(2006.01)n, A61K38/22
(2006.01)n, A61K48/00(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61D7/00, A61N1/30, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50,
A61K31/7088, A61K38/22, A61K48/00, A61P35/00, C12N5/10

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 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-305140 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 04 November, 2004 (04.11.04), (Family: none)	1-20, 22-27
X	JP 2005-518803 A (Sana Serapyutikusu Inc.), 30 June, 2005 (30.06.05), & AU 687001 B2 & CA 2135499 A1 & EP 0641212 A1	1-20, 22-27
P, X	WO 2006/073052 A1 (Shionogi & Co., Ltd.), 13 July, 2006 (13.07.06), (Family: none)	1-4, 7, 9, 10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
28 September, 2006 (28.09.06)

Date of mailing of the international search report
10 October, 2006 (10.10.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314059

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JP 2006-174720 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 06 July, 2006 (06.07.06), (Family: none)	1-4,10,12, 13,19
P,X	JP 2006-129724 A (Senju Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 May, 2006 (25.05.06), (Family: none)	1-5,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314059

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It is relevant to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

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

Remark on Protest
the

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314059

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The inventions of claims 1-20 relate to a method for controlling an electroporation apparatus for use in an animal; the inventions of claims 22-24 relate to a method for producing a non-human animal by using an electroporation apparatus; and the inventions of claims 25-27 relate to a method for screening of a therapeutic agent or a target compound for drug development.

The common matter among these groups of inventions is only the use of an electroporation apparatus. However, this technique is obviously known, and therefore cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

Thus, the inventions of claims 1-20 and 22-27 cannot be considered to be a group of inventions which are so linked as to form a single general inventive concept, and these claims appear to include three groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61D7/00(2006.01)i, A61N1/30(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i,
G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)n, A61K38/22(2006.01)n,
A61K48/00(2006.01)n, A61P35/00(2006.01)n, C12N5/10(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61D7/00, A61N1/30, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61K31/7088, A61K38/22, A61K48/00,
A61P35/00, C12N5/10

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 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)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2004-305140 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2004. 11. 04 ファミリーなし	1-20, 22-27
X	JP 2005-518803 A (サーナ・セラピューティクス・インコーポレイ テッド) 2005. 06. 30 & AU 687001 B2 & CA 2135499 A1 & EP 0641212 A1	1-20, 22-27

☒ 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

2 8 . 0 9 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 0 . 1 0 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

六笠 紀子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

9 7 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 2006/073052 A1 (塩野義製薬株式会社) 2006. 07. 13 ファミリーなし	1-4, 7, 9, 10
P, X	JP 2006-174720 A (三菱瓦斯化学株式会社) 2006. 07. 06 ファミリーなし	1-4, 10, 12, 13 , 19
P, X	JP 2006-129724 A (千寿製薬株式会社) 2006. 05. 25 ファミリーなし	1-5, 12

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 2 1 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
ヒトを治療する方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
別紙参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

別紙

第 III 欄

請求の範囲 1 乃至 2 0 は動物におけるエレクトロポレーション装置の制御方法に係る発明であり、請求の範囲 2 2 乃至 2 4 はエレクトロポレーション装置を利用した非ヒト動物の作製方法に係る発明、請求の範囲 2 5 乃至 2 7 は治療剤あるいは創薬のための標的化合物の探索方法に係る発明である。

ここで、これらはエレクトロポレーション装置を用いることにおいてのみ共通するが、該技術はいうまでもなく公知であるから、P C T 規則 1 3 . 2 における特別な技術的特徴であるとはいえない。

よって、請求の範囲 1 乃至 2 0 及び 2 2 乃至 2 7 に係る発明は単一の一般的発明概念を形成しているように連関している一群の発明であるとはいえず、3 個の発明からなる発明群であると認める。