

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-519339

(P2009-519339A)

(43) 公表日 平成21年5月14日(2009.5.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 B	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 21/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 21/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-545718 (P2008-545718)  
 (86) (22) 出願日 平成18年12月12日 (2006.12.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月29日 (2008.7.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/047255  
 (87) 国際公開番号 W02007/070483  
 (87) 国際公開日 平成19年6月21日 (2007.6.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/749,544  
 (32) 優先日 平成17年12月12日 (2005.12.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

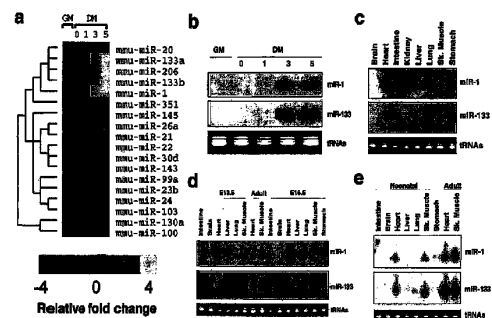
(71) 出願人 501345323  
 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロ  
 ライナ アット チャペル ヒル  
 THE UNIVERSITY OF N  
 ORTH CAROLINA AT CH  
 APEL HILL  
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2  
 7599-4105, チャペル ヒル,  
 キャンパス ボックス 4105, バ  
 イナム ホール 308  
 308 Bynum Hall, Camp  
 us Box 4105, Chapel  
 Hill, North Carolina  
 27599-4105, United  
 States of America  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋細胞増殖及び分化を調節するマイクロRNA

## (57) 【要約】

本出願は、筋細胞における遺伝子発現を調整する方法及び組成物を提供する。さらに、本出願の組成物を含む細胞を提供する。

【選択図】 なし



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

患者における筋肉損傷を治療する方法であって、患者の筋肉損傷部位に有効量のマイクロRNA (miRNA)、該miRNAをコードするベクター、若しくは該miRNAの阻害剤又はこれらの組合せを投与することから成り、該miRNAが筋肉損傷部位における筋細胞内の遺伝子を標的とする方法。

**【請求項 2】**

前記筋肉損傷が機械的筋肉外傷、筋肉変性疾患、心臓発作又はこれらの組合せである請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記患者が哺乳動物である請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記miRNAが、配列番号 1 ~ 11 及び配列番号 1 ~ 11 のいずれかと少なくとも 70 % 相同な配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列から成る請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記miRNAが、miR - 1、miR - 133、miR - 206、miR - 208、miR - 22、miR - 26、miR - 29、miR - 30、miR - 128、miR - 143 及びmiR - 145 から成る群から選択される請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記miRNAが、前記遺伝子の 3' 非翻訳領域を標的とする請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記miRNAをコードするベクターが、

(a) 該miRNA分子をコードする核酸分子に作動可能に連結したプロモーター、及び  
(b) 転写終結配列、  
を含む請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記miRNAの阻害剤が標的miRNAとハイブリダイズすることができる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記標的miRNAが、miR - 1、miR - 133、miR - 206、miR - 208、miR - 22、miR - 26、miR - 29、miR - 30、miR - 128、miR - 143 及びmiR - 145 から成る群から選択される請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記遺伝子が、筋肉細胞分化遺伝子及び筋肉細胞増殖遺伝子から成る群から選択される請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記筋細胞分化遺伝子が、ヒストンジアセチラーゼ 4 (HDAC4) ポリペプチド又は甲状腺ホルモン受容体タンパク質 240 (TRAP240) ポリペプチドをコードする請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記筋細胞増殖遺伝子が、血清応答因子 (SRF) ポリペプチドをコードする請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

第 1 時点において、miR - 133 及びmiR - 1 阻害剤を筋肉損傷部位に共投与し、第 2 時点において、miR - 1 及びmiR - 133 阻害剤を筋肉損傷部位に共投与する請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 14】**

筋細胞分化、増殖又はこの両者を調節する方法であって、筋細胞をmiRNA又は筋細胞中の遺伝子を標的とするmiRNAをコードするベクターと接触させ、これにより筋細胞

10

20

30

40

50

分化、増殖又は両者を調節可能にする方法。

【請求項 15】

前記調節が阻害である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 miRNA が前記遺伝子の翻訳を阻害する請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 miRNA が前記遺伝子の 3' 非翻訳領域を標的とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 miRNA が、配列番号 1 ~ 11 及び配列番号 1 ~ 11 のいずれかと少なくとも 70 % 相同な配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列から成る請求項 14 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記 miRNA が、miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 及び miR-145 から成る群から選択される請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 miRNA をコードするベクターが、

(a) 該 miRNA 分子をコードする核酸分子に作動可能に連結したプロモーター、及び

(b) 転写終結配列、

を含む請求項 14 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記筋細胞分化遺伝子が、ヒストンジアセチラーゼ 4 (HDAC4) ポリペプチド又は甲状腺ホルモン受容体タンパク質 240 (TRAP240) ポリペプチドをコードする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】

前記筋細胞増殖遺伝子が、血清応答因子 (SRF) ポリペプチドをコードする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 23】

筋細胞中の遺伝子発現を調節する方法であって、筋細胞を、筋細胞中の遺伝子を標的とする microRNA (miRNA) 又は miRNA をコードするベクターと接触させることから成る方法。

30

【請求項 24】

前記調節が阻害である請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記 miRNA が前記遺伝子の翻訳を阻害する請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 miRNA が前記遺伝子の 3' 非翻訳領域を標的とする請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 miRNA が、配列番号 1 ~ 11 及び配列番号 1 ~ 11 のいずれかと少なくとも 70 % 相同な配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列から成る請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記 miRNA が、miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143 及び miR-145 から成る群から選択される請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 miRNA をコードするベクターが、

(a) 該 miRNA 分子をコードする核酸分子に作動可能に連結したプロモーター、及び

(b) 転写終結配列、

を含む請求項 23 に記載の方法。

50

**【請求項 30】**

前記遺伝子が、筋肉細胞分化遺伝子及び筋肉細胞増殖遺伝子から成る群から選択される請求項 23 に記載の方法。

**【請求項 31】**

前記筋細胞分化遺伝子が、ヒストンジアセチラーゼ 4 (H D A C 4) ポリペプチドをコードする請求項 30 に記載の方法。

**【請求項 32】**

前記筋細胞増殖遺伝子が、血清応答因子 (S R F) ポリペプチドをコードする請求項 30 に記載の方法。

**【請求項 33】**

筋細胞中の遺伝子発現を阻害する方法であって、該筋細胞を *microRNA* (*miRNA*) 分子をコードするベクターで形質転換することから成り、該 *miRNA* 分子が、連続した 17 ~ 24 ヌクレオチドの前記遺伝子の部分配列に少なくとも 70 % 相同であるヌクレオチド配列から成る方法。

**【請求項 34】**

前記 *miRNA* が前記遺伝子の翻訳を阻害する請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 35】**

前記部分配列が前記遺伝子の 3' 非翻訳領域に局在する請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 36】**

前記 *miRNA* が、配列番号 1 ~ 11 及び配列番号 1 ~ 11 のいずれかと少なくとも 70 % 相同な配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列から成る請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 37】**

前記 *miRNA* が、*miR-1*、*miR-133*、*miR-206*、*miR-208*、*miR-22*、*miR-26*、*miR-29*、*miR-30*、*miR-128*、*miR-143* 及び *miR-145* から成る群から選択される請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 38】**

前記 *miRNA* をコードするベクターが、

(a) 該 *miRNA* 分子をコードする核酸分子に作動可能に連結したプロモーター、及び  
(b) 転写終結配列、

を含む請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 39】**

前記遺伝子が、筋肉細胞分化遺伝子及び筋肉細胞増殖遺伝子から成る群から選択される請求項 33 に記載の方法。

**【請求項 40】**

前記筋細胞分化遺伝子が、ヒストンジアセチラーゼ 4 (H D A C 4) ポリペプチド又は甲状腺ホルモン受容体タンパク質 240 (T R A P 240) ポリペプチドをコードする請求項 39 に記載の方法。

**【請求項 41】**

前記筋細胞増殖遺伝子が、血清応答因子 (S R F) ポリペプチドをコードする請求項 39 に記載の方法。

**【請求項 42】**

筋細胞中で *microRNA* (*miRNA*) 分子を発現するベクターであって、

(a) 該 *miRNA* 分子をコードする核酸分子に作動可能に連結したプロモーター、及び  
(b) 転写終結配列、

を含むベクター。

**【請求項 43】**

発現した前記 *miRNA* が前記遺伝子の翻訳を阻害する請求項 42 に記載の方法。

**【請求項 44】**

前記 *miRNA* が前記遺伝子の 3' 非翻訳領域を標的とする請求項 43 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 45】**

前記 miRNA が、配列番号 1 ~ 11 及び配列番号 1 ~ 11 のいずれかと少なくとも 70 % 相同な配列から成る群から選択されるヌクレオチド配列から成る請求項 42 に記載の方法。

**【請求項 46】**

前記 miRNA が、miR - 1、miR - 133、miR - 206、miR - 208、miR - 22、miR - 26、miR - 29、miR - 30、miR - 128、miR - 143 及び miR - 145 から成る群から選択される請求項 42 に記載の方法。

**【請求項 47】**

前記遺伝子が、筋肉細胞分化遺伝子及び筋肉細胞増殖遺伝子から成る群から選択される請求項 43 に記載の方法。

10

**【請求項 48】**

前記筋細胞分化遺伝子が、ヒストンジアセチラーゼ 4 (HDAC4) ポリペプチド又は甲状腺ホルモン受容体タンパク質 240 (TRAP240) ポリペプチドをコードする請求項 47 に記載の方法。

**【請求項 49】**

前記筋細胞増殖遺伝子が、血清応答因子 (SRF) ポリペプチドをコードする請求項 47 に記載の方法。

**【請求項 50】**

請求項 39 に記載のベクター及び該ベクターを筋細胞へ導入するための少なくとも 1 種の試薬から成るキット。

20

**【請求項 51】**

さらに、前記ベクターを筋細胞へ導入するための取扱説明書を含む請求項 50 に記載のキット。

**【請求項 52】**

請求項 42 に記載のベクターを含む筋細胞。

30

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2005年12月12日に出版された米国仮出願 60/749,544 の優先権を主張し、その内容は引用することによりここに組み込まれているものとする。

本出願は米国 NIH の助成金 R01-HL075251 の支援の下に行われた。従って、米国政府は本出願に対して権利を有する。

本出願にかかる発明は、一般的に、筋細胞における遺伝子発現を調節する方法及び組成物に関し、より詳細には、本出願は、マイクロRNA (microRNA(miRNA)) を用いて、筋細胞中の遺伝子の発現レベルを調節する方法、及び miRNA から成る組成物に関する。

40

**【背景技術】****【0002】**

細胞増殖及び分化を調節する分子機構を理解することは、発生生物学の中心課題である。マイクロRNA (miRNA) は最近発見された種類の約 22 ヌクレオチドから成る調節 RNA であり、転写後に遺伝子調節を行う<sup>1, 2</sup>。ますます多くの事実が、多くの生物過程における miRNA の潜在的役割を示している<sup>3 - 8</sup>。

しかし、生物過程における miRNA の役割又は役割を特徴付ける本技術分野へのニーズが長期間、また継続的にある。本出願は、該技術分野のいくつかのニーズに対処する。

**【発明の開示】**

50

## 【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

## 【0003】

本概説は、本出願で開示した主題のいくつかの実施態様を紹介し、また多くの場合、これらの実施態様の変形物及び置き換えを紹介する。本概説は多数で、多様な実施態様を単に例示する。与えられた実施態様の1又は2以上の代表的特徴についての記載は、同様に例示的である。この様な実施態様は、一般的に既述した特徴を伴う場合も、伴わない場合もある；同様に、本概説で紹介された又はされないに無関係に、これらの特徴は本出願で開示した主題の他の実施態様に適用可能である。過度の繰り返しを避けるために、本概説は、これらの特徴の全ての可能な組合せを紹介しておらず、あるいは示唆していない。

## 【0004】

本出願の一つの実施態様において、患者の筋肉損傷を治療する方法を提供する。いくつかの実施態様において、該方法は患者の筋肉損傷部位に有効量のmiRNA又は、該miRNAをコードするベクター又はmiRNAの阻害剤を投与することから成り、該miRNAは筋肉損傷部位における筋細胞中のある遺伝子を標的とする。いくつかの実施態様において、miRNAの阻害剤は標的miRNAにハイブリダイズすることができ、またいくつかの実施態様において、該標的miRNAは、miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143及びmiR-145から成る群から選択される。いくつかの特定の実施態様において、1回目にmiRNA-133及びmiRNA-1の阻害剤の投与は、組み合わせられて筋肉損傷部位に行われ、第2回目に、miRNA-1及びmiRNA-133の阻害剤の投与が、組み合わせられて筋肉損傷部位の治療のために行われる。いくつかの実施態様において、筋肉損傷は、機械的筋肉外傷、筋肉変性障害、心臓発作又はこれらの組合せに起因する。いくつかの実施態様において、患者は哺乳動物である。

## 【0005】

本出願の別の実施態様において、筋細胞分化、増殖又は両者を調節する方法を提供する。いくつかの実施態様において、該方法は、筋細胞分化、増殖又はこの両者を調節する方法であって、筋細胞をmiRNA又は筋細胞中の遺伝子を標的とするmiRNAをコードするベクターと接触させ、これにより筋細胞分化、増殖又は両者を調節可能にすることから成る。いくつかの実施態様において、調節は阻害であり、いくつかの実施態様において、該miRNAは遺伝子翻訳を阻害する。

本出願の更に他の実施態様において、筋細胞中の遺伝子の発現を調節する方法を提供する。いくつかの実施態様において、該方法は、筋細胞を筋細胞中の遺伝子を標的とするmiRNA又は該miRNAをコードするベクターと接触させることから成る。いくつかの実施態様において、調節は阻害であり、いくつかの実施態様において、該miRNAは遺伝子翻訳を阻害する。

## 【0006】

本出願のさらなる実施態様において、筋細胞中の遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。いくつかの実施態様において、該方法は、該筋細胞をmiRNA分子をコードするベクターで形質転換することから成り、該miRNA分子は、連続した17～24ヌクレオチドの前記遺伝子の部分配列に少なくとも70%相同であるヌクレオチド配列から成る。但し、miRNAは、該遺伝子に通常存在するチミジンの代わりにウラシルを含む。いくつかの実施態様において、miRNAは、遺伝子の翻訳を阻害する。

本出願の方法のいくつかの実施態様において、用いる該miRNAは、配列番号1～11のいずれか及び配列番号1～11のいずれかと少なくとも70%相同な配列から成る群から選択された塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、該miRNAは、miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143及びmiR-145から成る群から選択される。さらに、いくつかの実施態様において、該miRNAは、該遺伝子の3'非翻訳領域を標的とする。

さらに、該方法のいくつかの実施態様において、miRNAの標的となる該遺伝子は、筋細胞分化遺伝子（例えば、ヒストンジアセチラーゼ4（HDAC4）ポリペプチド又は甲状腺ホルモン受容体タンパク質240（TRAP240））、筋細胞増殖遺伝子（例えば、血清応答因子（

10

20

30

40

50

SRF)ポリペプチドをコードする遺伝子)及びホルモン関連タンパク質(例えば、甲状腺ホルモン結合タンパク質1(Thrap1))から成る群から選択される。

#### 【0007】

本出願の他の実施態様において、miRNAをコードするベクターが提供される。いくつかの実施態様において、該ベクターは、該miRNA分子をコードする核酸分子に人工的に連結したプロモーター及び転写終結配列を含む。更に、いくつかの実施態様において、該ベクターは、ベクターを筋細胞に導入するための少なくとも1種類の試薬をさらに含むキットに取り込まれる。いくつかの実施態様において、該キットは、ベクターを筋細胞に導入するための使用説明を更に含む。

従って、本出願の目的は、miRNAを介する手法を用いて筋細胞の遺伝子発現を調節する方法を提供することである。この目的は、本出願により、全体的に又は部分的に成就される。

10

本出願及び無制限の実施例についての以下の研究により、当業者には本出願の上述の目的、他の目的及び利点は自明となろう。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0008】

本明細書において、特定のmiRNAが、筋細胞の分化及び/又は増殖に影響する、筋細胞における特定の遺伝子発現を調節可能であるという決定を開示する。この発見は、本明細書で開示するように、例えば機械的筋肉外傷、筋肉変性障害及び心臓発作など、様々な原因の筋肉障害の治療に適用できる。本明細書に開示した発見は、更に、遺伝子に特異性を有するmiRNAを用いた筋細胞中の1又は2以上の特異的遺伝子の発現調節に適用できて、また言い換えると、例えば、筋細胞の分化及び/又は増殖のような筋細胞の機能性の調節に適用できる。本出願で用いられる非限定的miRNAの例としては、miRNA-1、miRNA-133、miRNA-206、miRNA-208が挙げられる。

20

#### 【0009】

例えば、同一染色体座位に密集するmiRNA-1(miR-1)及びmiRNA-133(miR-133)は発生過程で組織特異的に相伴って転写される。miR-1及びmiR-133は、インビトロ培養筋細胞及びインビボXenopus胚における骨格筋増殖及び分化を調節する上で別個の役割を果たす。miR-1は、筋肉遺伝子発現の転写抑制因子である、ヒストンデアセチラーゼ4(HDAC4)を標的とすることにより、筋形成を促進する。対照的に、miR-133は、血清応答因子(SRF)を抑制することにより、筋細胞増殖を促進する。これらの結果は、同一miRNAポリシストロン由来の共通に転写される2個の成熟miRNAが、別個の生物学的機能を果たすことができることを初めて明らかにした。従って、本開示は、miRNAが筋肉遺伝子発現及び胚発生を制御する転写回路に加わる分子機構を提供する。

30

#### 【0010】

他の非限定的例として、Thrap1発現は同様にmiR-208により調節されている。Thrap1の3'UTRは、2個の推定miR-208結合部位を含む(図18)。2個の標的は、Thrap1終止コードの~80bp下流に位置し、互いに僅か~50bpしか離れていない。両標的は、miR-208のシード領域と完全に相補的である。このThrap1遺伝子は、ユビキタスに発現しているTRAP(甲状腺ホルモン受容体タンパク質)複合体の240kdサブユニットである、TRAP240をコード化している。TRAPは、核受容体に対する活性化補助因子である、複数サブユニットタンパク質複合体であり、またTRAPファミリーメンバーは正常な発生に対して重要である。従って、miR-208は、TRAP240の合成を調節することができ、またホルモン依存性心筋分化を促進する。

40

#### 【0011】

##### 1. 一般的考察

C. elegans幼虫発生の適時性を制御することで、最初に記載されたmiRNAである、lin-4遺伝子は、lin-14mRNAレベルに顕著な効果を持たず、予想外に、lin-14タンパク質発現を抑制する21ヌクレオチド長の非コード性RNAを産生することが発見された。この小RNAがlin-14の3'非翻訳領域(UTR)内の相補的部位を標的にすることが見出された<sup>4,9</sup>、

50

<sup>5 0</sup>。この現象は最初遺伝的奇異として処理され、実質的に無視されたが、今や、lin-4に類似した、miRNAと呼ばれる、何百もの小RNAが様々な種の遺伝子に存在して、相補的mRNAの翻訳を調節していると評価されている。最近の報告では、少数のmiRNAが顕著に様々な生物過程で役割を果たすと示唆されているが、大部分は特徴付けされていない。

【0012】

#### 1. A. miRNA生合成及び機構

miRNA生合成に対する一般的モデルは、図13に示されている。成熟miRNAは~22ヌクレオチド(nt)長を持ち、より長い転写物から処理される<sup>5 1, 5 2</sup>。プライマリーmiRNA(pri-miRNA)は、独立な転写単位として、RNA POL IIにより転写可能であり、宿主遺伝子のスプライスアウトイントロン由来であることができる<sup>5 3</sup>。このmiRNA処理経路は、ステムループ構造を持つ<sup>5 4</sup> ~ 70 nt 長の間中前駆体-miRNA(pre-miRNA)を作る、RNase III エンドヌクレアーゼDroshaによるpri-miRNA切断に始まる。Exportin-5はDrosha切断により残されたスタガードカットを認識し、pre-miRNAを細胞質にRan-GTP依存的に送り出す<sup>5 4 ~ 6 0</sup>。細胞質に入ると、pre-miRNAの両鎖は、もう一つのRNase III 酵素である、Dicerにより、ステムループの元から約2ヘリカルターン離れた箇所で切断される<sup>6 1 ~ 6 3</sup>。結果得られる~22量体RNA 2重鎖はDicerにより放出され、単鎖のステムアームが、RISC(RNA-誘導サイレンシング複合体)に取り込まれることができる。RISCは、miRNA及びmRNA標的と共に、Argonauteタンパク質ファミリー及びアクセサリー因子のメンバーを含む、リボヌクレオタンパク質複合体である。ステムアーム2本鎖の相対的熱安定性が、どちらの鎖がRISCに取り込まれるかを決めると考えられている：RISCに入る鎖は、しばしば5'末端がより不安定な鎖である<sup>6 4, 6 5</sup>。翻訳阻害は、未知の機構により標的mRNAの3' UTR内の標的配列(複数)に対して相補的なmiRNAにより行われる<sup>6 6, 6 7</sup>。一般的に、不完全な相補性は、翻訳抑制をもたらすが、完全又は、準完全相補性は、mRNA切断をもたらす<sup>6 8</sup>。miRNA生合成の多くの側面、トラフィッキング、RISC集合及びRISC機能の機構については不明の点が多いが、特定のmiRNAの機能研究及びmiRNA経路構成成分の遺伝的及び生化学的解析により、miRNAが様々な生物過程において重要であることが示された。

【0013】

#### I. B. 発生におけるmiRNA

多細胞有機体の発生には、遺伝的経路の空間的及び時間的調節が必要である。miRNAは、標的遺伝子の転写後調節により、これらの複雑な遺伝的経路を制御又は微調節すると考えられている。動物発生におけるmiRNAの必要性を決定する一つの研究法は、miRNAを処理して成熟した活性型にするために必要な上流酵素である、Dicerの変異体作成であった。脊椎動物は、全ての脊椎動物miRNAを完全に処理するために必要である、Dicerを1コピーのみ有すると信じられている<sup>6 2, 6 3, 6 9</sup>。マウスにおいて、Dicer機能を欠損させると、7.5日胚(E)で致死的结果となる<sup>6 9</sup>。Dicer欠損マウスは、原始条痕マーカータ(brachury)を発現せず、原腸形成の間に体が構成される前に、発生が停止することを示す。特に、マウス肢中胚葉期にDicer機能が条件的に失われると、肢サイズが減少しまたプログラムされた細胞死が増加する<sup>7 0</sup>。母方の接合体のDicer変異体を作ることにより、ゼブラフィシュのmiRNA形成が完全にブロックされることは、miRNAの欠損は、胚の軸形成又は多くのタイプの細胞のパターン化には影響しないことを示す。しかしながら、原腸形成、脳形成、体節発生及び心臓発生における形態形成全ては、異常であることが証明され、また致死をもたらした<sup>7 1</sup>。まとめると、Dicer機能の遺伝解析は、成熟miRNAは正常な発生のために必要であることを示唆する。全てのmiRNA機能の除去は参考になるが、これらはまた、なまぐらな道具であり、特定のmiRNAの正確な機能への洞察を提供するものではない。

【0014】

#### I. C. 特定のmiRNAの生物的作用

miRNAが多くの生物過程に関与することを示唆する事実は、益々増加している。脾臓島細胞において、miR375の過剰発現は、グルコース誘導のインシュリン分泌を抑制するが、

10

20

30

40

50



内因性miR-375の阻害はインシュリン分泌を促進する<sup>7 2</sup>。同様の過剰発現及び阻害戦略により、ERK5タンパク質発現の調節から、脂肪細胞分化におけるmiR-143の役割が同定された<sup>7 3</sup>。他の実施例において、5個のmiRNAをコードしている多シストロンのmiRNA遺伝子は、腫瘍発生と関係する<sup>7 4</sup>。miRNAの他の機能が、血液新生<sup>7 5</sup>、神経細胞分化<sup>7 6</sup>、<sup>7 7</sup>及びHox遺伝子発現の調節<sup>7 8</sup>、<sup>7 9</sup>において提言されている。

現在、300を超える既知のヒトmiRNAがあるが、約100個のみが生物機能について何らかの意味で割り当てられている。発生と病理学におけるmiRNAを介した調節の普及性及び重要性を理解するためには、特定のmiRNAの研究が必要である。本出願は、筋肉分化と増殖の調節におけるmiRNAの役割について初めて提供する。

#### 【0015】

##### I . D . 心臓発生におけるmiRNA

心臓発生は、異なる遺伝的プログラムの詳細な調節を必要とする、従って、心臓に多量存在する、区別を付けて発現するmiRNAが、この複雑な経路を調節するに役立つと推量することは興味深い。この様な、組織特異的な発現パターンは、いくつかのmiRNAについて本出願に開示する。miR-1及びmiR-133は骨格筋及び心臓筋組織の両者に発現するが、miR-208は心臓筋組織のみに検知される。本明細書開示以前には、これら筋特異的miRNAの機能は明かではなかった。

#### 【0016】

##### I . E . miRNA標的の同定

特定のmiRNAの標的を同定することは、調節経路におけるこれらmiRNAの役割の理解を容易にする。大部分の動物miRNAはこれらの標的部位に対して不完全に相補的であり、このことは動物miRNA標的部位を同定する上で単純なホモロジー探索を用いることを妨げる。この障害を克服するために、いくつかの計算方法が開発され、これらは新しい動物miRNA標的を予想するための基準として、既知のmiRNA標的の保存配列及び特徴を取り込んだ<sup>8 0 ~ 8 5</sup>。例えば、大部分のmiRNAは、“シード”領域と呼ばれる、有効な標的部位内の第2及び第8ヌクレオチドの間に高い相補性を示すことが、いくつかのアルゴリズムでは考慮されている。いくつかの場合、miRNAの3'末端の相補性が、弱い5'末端結合を埋め合わせるので、他のアルゴリズムでは考慮されていない。これらのアルゴリズムではまた、隣接する領域に対し、2又は2以上の種を越えた標的保存配列による予想を評価する。この種の計算方法により、いくつかの哺乳動物miRNA標的部位が成功裏に予想できた。どの様な特定のmiRNAに対して為される予想も、常に間違いなくファルスポジティブを作り出す。しかしながら、この様な予想は仮説ジェネレーター（生成系）として極めて重要である。どの様な予想でも、実験的に証明できて、また関連した生物学的状況に置くことができる。

#### 【0017】

##### I . F . 重要性

現在、miRNA指向性抑制の背後の詳細な分子機構を理解するために、またmiRNA発現を解析し標的部位を同定するためのより良いツールを開発するために、また調節経路内の特定のmiRNAに対する生物学的に適切な役割を定めるために、miRNA研究におけるいくつかの活潑な領域が在る。

心臓発生及び病理学は複雑な遺伝的経路の調節と密接に関係しており、これらの経路を理解するために多くの試みが為されてきた。大部分の研究は、転写因子の役割及び心臓遺伝子転写に要求される調節エンハンサー配列に焦点が向けられてきた。心臓遺伝子発現の調節は、極めて複雑であることが分かり、個々の心臓遺伝子は、心臓における非常に制限された発現パターンを指令する、多種の独立したエンハンサーにより調節される。転写後レベルでの他の調節レイヤーが加わることで、潜在的に、miRNAのこの複雑さはさらに劇的に増加した。本出願は、一つには、心筋及び骨格筋遺伝子発現が如何に調節されているかについての新しい理解を提供し、治療及び、研究にこれらの発見の応用を開示する。更に、本明細書で開示した筋分化と増殖のmiRNA調節に関連する発見により、同様に他の経路におけるmiRNAの機能を理解するためのモデルとして役立つ。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 8 】

## I I . 定 義

便宜上、明細書、実施例及び添付した請求の範囲に用いられる幾つかの用語を此処に集めた。以下の用語は当業者に良く理解されていると信ずるが、以下の定義を、本出願の説明に供するために示す。

異なって定義しなければ、本明細書で用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本出願が属するこの分野の当業者には一般的に理解されている意味と同一である。本明細書に記載した方法、デバイス、材料と等価なこれら全てを、本出願の実行又は試験に用いることができるが、代表的な方法、デバイス及び材料についてこれから説明する。

長年にわたる特許法協定に従い、原文の“不定冠詞 - ある ( a , a n ) ” “定冠詞 - その ( t h e ) ” は、請求の範囲を含め本出願で用いられる場合、“ 1 又は 2 以上 ” を意味する。従って、本明細書で“ある ( a , a n , ) ” その ( t h e ) ”、に言及した場合、1 又は 2 以上 ( 少なくとも 1 の ) の本書の文法的目的物を示す。実施例のために、“ある成分”は 1 成分又は 1 以上の成分を表わす。

10

本明細書で用いるように、値又は質量、重量、時間、容積、濃度、パーセンテージに関する場合、用語“約”は、本出願を実行する上で以下の変動が適切であるように、特定の値から、幾つかの実施態様では、 $\pm 20\%$  又は  $\pm 10\%$ 、いくつかの実施態様では  $\pm 5\%$ 、いくつかの実施態様では  $\pm 1\%$ 、いくつかの実施態様では、 $\pm 0.5\%$ 、いくつかの実施態様では  $\pm 0.1\%$  の変動を含む。もし別に指定しない場合、本明細書及び請求の範囲で用いる構成要素、反応条件、等々の量を表現する全ての数は、全ての実施例において、用語“約”により、修正されていると理解すべきである。従って、これに反すると指示しない限り、本明細書及び添付した請求の範囲に示された数字上のパラメーターは、本出願で得られる所望の特性に依存して変化する様に、近似的である。

20

## 【 0 0 1 9 】

本明細書で用いるように、用語“アミノ酸”及び“アミノ酸残基”は、互換性があり、20 個の自然に存在するアミノ酸及び類似体、誘導体及びこれらの同族体 ( 即ち、様々な側鎖を持つアミノ酸類縁体、前記のいずれかの全ての立体異性体 ) の何れかを表わす。従って、用語“アミノ酸”は、自然又は合成を問わず、アミノ基官能性及び酸官能性を持ち、自然に存在する高分子に含まれ得る、全ての分子を包含する。

アミノ酸はポリペプチドをペプチド結合の部分で化学消化 ( 加水分解 ) して作ることができる。本明細書に記載するアミノ酸残基は幾つかの実施態様では“L”異性体型である。しかしながら、希望の機能特性がポリペプチドに保持される限り、L - アミノ酸残基を“D”異性体型の残基で置き換えることができる。 $\text{NH}_2$  は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する自由アミノ基を表わす。 $\text{COOH}$  は、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する自由カルボキシ基を表わす。標準的ポリペプチド命名法を守りながら、アミノ酸残基の略号を本明細書に示す表に示した。

30

本明細書に、化学式で示した全てのアミノ酸残基配列は、通常のアミノ末端からカルボキシ末端の方向について、左より右への方向で表わすことを注意する。更に、用語“アミノ酸”及び“アミノ酸残基”は、修飾型の及び異常なアミノ酸を含む様に広く定義されている。

40

## 【 0 0 2 0 】

更に、アミノ酸残基配列の初め又は終わりのダッシュは、1 又は 2 以上のアミノ酸残基の配列へのペプチド結合又は  $\text{NH}_2$  の様なアミノ末端基又はアセチル基又は  $\text{COOH}$  の様なカルボキシ末端基への共有結合を示すことを注意する。

本明細書に用いるように、用語“細胞”は、通常の生物学的意味で用いられる。いくつかの実施態様では、細胞は、例えば、脊椎動物のような有機体に存在する。細胞は、真核生物 ( 例えば、骨格筋又は心筋のような、筋細胞 ) 又は原核生物 ( 例えば、バクテリア ) であり得る。細胞は、体細胞系又は生殖細胞系由来であり、全能性、多能性又は何らかの程度分化した、分裂性又は非分裂性であり得る。また細胞は、誘導型又は生殖体又は胚、肝細胞又は完全に分化した細胞を含みうる。

50

本明細書で用いるように、用語“ホスト細胞”及び“組み換えホスト細胞”は、互換性があり、本出願の構成物（例えば、miRNAをコードする発現ベクターのような）の構成物が導入された細胞（例えば、筋細胞）を表わす。更に、この用語は、発現構築物が最初導入された特定の細胞ばかりでなく、このような細胞の子孫又は潜在的子孫を表わす。突然変異又は環境からの影響により、継代中にある種の変化が生じる可能性があり、このような子孫は、実際、親細胞とは同一でないかも知れないが、尚、本明細書で用いられる用語の範囲内に含まれる。

#### 【0021】

本明細書で用いるように、用語“遺伝子”は、例えば、ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含む、がそれに制限されない、核酸配列のような、RNAをコードする核酸を表わす。用語“遺伝子”は、また広く、生物機能と結びついた如何なるDNAの断片でも表わす。従って、用語“遺伝子”は、コードする配列；プロモーター領域；転写調節配列；調節タンパク質に対する特異的認識配列である、非発現DNA断片；例えば本出願の見本であるmiRNAにより標的とされ、結合されるmRNAの3'非翻訳領域に転写されるDNA断片のような、遺伝子発現に寄与する部分である非発現DNA断片；希望するパラメーターを持つようデザインされたDNA断片；又はこれらの組合せを含むがこれらに制限されない配列を含む。ある遺伝子は様々な方法で得ることができて、生物試料からのクローニング、既知の又は予想される配列情報による合成及び1又は2以上の存在する配列由来の組み換えが含まれる。

10

#### 【0022】

当業者は理解するように、遺伝子は概して、コード鎖及び非コード鎖を含む。本明細書で用いるように、用語“コード鎖”及び“センス鎖”は互換性があり、遺伝子産物に翻訳されるmRNAと同じヌクレオチド配列を持つ核酸配列を表わす。やはり、当業者が理解するように、コード鎖及び/又はセンス鎖がDNA分子を表わすために用いられる場合、このコード/センス鎖は、対応するmRNAに存在するウリジン残基の変わりにチミジン残基を含む。さらに、コード/センス鎖をDNA分子を表わすために用いる場合、コード/センス鎖は、プロモーター、エンハンサー、イントロンを含むがこれに制限されない、mRNAに含まれてない付加的因子を含むことができる。同様に、用語“鋳型鎖”及び“アンチセンス鎖”は、互換性があり、コード/センス鎖に相補的な核酸配列を表わす。しかしながら、例えばmiRNA遺伝子のようにポリペプチド産物をコードしてない遺伝子に対して、用語“コード鎖”が、miRNAを含む鎖を表わすために用いられる。この使用法において、miRNAを含む鎖は、miRNA前駆体に関してはセンス鎖であり、他方、標的RNAに関してはアンチセンス鎖である（即ち、標的RNAに対してアンチセンスである配列をmiRNAは含むので、miRNAは標的RNAとハイブリダイズする。）

20

30

#### 【0023】

本明細書で用いるように、用語“相補性”及び“相補的な”は伝統的なWatson-Crick型又は他の非伝統的タイプの相互作用により、他の核酸と1又は2以上の水素結合を形成することができる核酸を表わす。本出願の核酸分子に関連して、核酸分子が相補的配列と結合する自由エネルギーは、いくつかの実施態様において、核酸の関係機能がリボヌクレアーゼ活性を進行可能にするに充分である。例えば、あるmiRNA前駆体のセンス及びアンチセンス鎖の間の相補性の程度は、miRNA前駆体のmiRNAを含む鎖と標的核酸配列の間の相補性の程度と同じ又は異なる可能性がある。核酸分子に対する結合自由エネルギーの測定は当分野ではよく知られている。Freier他、1986<sup>31</sup>；Turner他、1987<sup>32</sup>を参照のこと。

40

本明細書で用いるように、用語“パーセント相補性”、“パーセント同一性”及び“パーセント同一”は、本明細書では互換性があり、第2の核酸配列と水素結合（例えば、Watson-Crick塩基対）を形成する、ある核酸分子における連続残基の割合を表わす（例えば、10塩基対の中5、6、7、8、9、10塩基対は、50%、60%、70%、80%、90%及び100%相補性である）。用語“100%相補性”、“全面的相補性”及び“完全相補性”は、核酸配列の連続残基の全てが、第2の核酸配列の同数の連続残基と水素結合をすることができることを示す。miRNAは約17~24ntであり、また5ミスマ

50

ッチ（即ち、1, 2, 3, 4又は5 mismatches）は、遺伝子発現のmiRNAを指向する調節の間、一般的に許容されるので、あるmiRNA及び標的となるRNAの間の少なくとも約70パーセント相補性は、miRNAが、標的RNAを導く遺伝子の発現を調節するために十分である。

#### 【0024】

用語“遺伝子発現”は、一般的に、生物的に活性なポリペプチドがDNA配列より作られ細胞内で生物活性を示す生物過程を表わす。従って、遺伝子発現は、転写及び翻訳過程を伴うが、遺伝子又は遺伝子産物の生物活性に影響する転写後及び翻訳後の過程を伴う。これらの過程は、RNA合成、RNAプロセッシング、RNA輸送及びポリペプチド合成、ポリペプチド輸送及びポリペプチドの翻訳後修飾を含むが、これらに制限されない。さらに、細胞内のタンパク質-タンパク質相互作用に影響する過程が、本明細書に定義した遺伝子発現に影響を与える可能性がある。

しかしながら、例えば、miRNA遺伝子のように、タンパク質産物をコードしていない遺伝子の場合、用語“遺伝子発現”は、前駆体miRNAが遺伝子から作られる過程を表わす。タンパク質をコードする遺伝子に対するRNAポリメラーゼIIにより行われる転写とは異なり、miRNA遺伝子の転写産物はタンパク質を作るために翻訳されないが、一般的に、この過程は転写と呼ばれる。それでもなお、miRNA遺伝子から成熟したmiRNAの合成は、本明細書で用いるように用語“遺伝子発現”に含まれる。

#### 【0025】

本明細書で用いるように、用語“単離した”は、他の核酸、タンパク質、脂質、炭水素及び/又は、細胞物質又は合成媒体と通常結合している、他の物質から実質的に遊離した分子を表わす。従って、用語“単離した核酸”は、自然又は合成由来又はその組合せのリボ核酸分子又はデオキシリボ核酸分子（例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、miRNAその他）を表し、この核酸分子は（1）“単離した核酸”が自然で見られる細胞と結合していない又は（2）自然で連結していないポリヌクレオチドと作動可能に連結している。同様に、用語“単離したポリペプチド”は、幾つかの実施態様では、組み換えDNA又はRNAから合成された又は合成由来の又はこれらの何らかの組合せによる、ポリペプチドを表し、このポリペプチドは、（1）自然で通常見出されるタンパク質と結合していない、（2）本来そこに存在する細胞から単離された、（3）同じ細胞由来の他のタンパク質から遊離している、（4）異なる種の細胞により発現される又は（5）自然に存在しない物である。

用語“単離した”は、“単離した細胞”という文脈で用いる場合、例えば、器官、組織又は有機体の一部として、自然の環境から取り除かれた細胞を表わす。

#### 【0026】

本明細書で用いるように、用語“標識”及び“標識された”はプローブ分子に分光学的に、放射線学的に及び他の方法で検出可能な分子部分を結合させることを表わす。従って、用語“標識”又は“標識した”は、ポリペプチドのような分子に検出可能なマーカを任意に共有結合的に又は非共有結合的に取り込む又は結合することを表わす。ポリペプチドを標識する様々な方法は、当技術分野で既知であり、使用できる。ポリペプチドの標識の実施例としては、以下の標識があるが、これらに制限されない：放射性同位元素、蛍光標識、重原子、酵素標識又はレポーター遺伝子、化学発光基、ビオチニル基、第2のレポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、抗体の結合位置、金属結合領域、エピトープタグ）。いくつかの実施態様において、標識には様々な長さのスペーサーアームを結合して、潜在的な立体障害を減少させる。

#### 【0027】

本明細書で用いるように、用語“調節する”は、生化学的実体の、どんな又は全ての科学的及び生物学的活性又は特性を増加、減少又は他の如何なる変化も表わすことが可能である。例えば、用語“調節する”は、発現、レベル又は活性が、調節因子がない場合に観測される値より大きい又は小さいと言うように、遺伝子の発現レベル又は1又は2以上のタンパク質又はタンパク質サブユニットをコードしているRNA分子又は等価なRNA分子のレベルを変化させること；又は上方制御又は下方制御された1又は2以上のタンパク質又はタ

ンパク質サブユニットの活性を表視、その結果発現、レベル又は活性は、調節因子なしで観測される結果より大きい又は小さい。例えば、用語“調節する”は、“阻害する”又は“抑制する”ということの意味するが、語“調節する”はこの定義に制限されない。

#### 【0028】

本明細書で用いる、用語“調節”は、ある応答の上方制御（即ち、活性化又は刺激）及び下方制御（即ち、阻害又は抑制）を表わす。従って、用語“調節”は、機能特性又は生物活性又はプロセス（例えば、酵素活性又は受容体結合）と関連して用いる場合、上方制御（例えば、活性化、刺激化）、下方制御（例えば、阻害又は抑制）の能力を表わす又はそうでなければ、このような特性、活性又はプロセスの性質を変化させる。ある実施例では、このような調節は、シグナル伝達経路の活性化の様な、連続した特定のでき事であり得る及び/又は特定の細胞型だけに表れうる。

10

#### 【0029】

用語“調節因子”は、調節を行うことができる、ポリペプチド、核酸、高分子、複合体、分子、小分子、化合物、種又はその他（自然に又は非自然に存在）又は、バクテリア、植物、菌類又は動物細胞又は動物組織からの単離物を表わす。アッセイ系に加えることにより、調節因子は、機能的特性、生物活性又は生物過程又はこれらの組合せ（例えば、作用薬、部分的拮抗剤、部分的作用薬、反作用薬、拮抗剤、抗生物質、細菌感染又は細菌増殖の阻害剤、等々）の阻害剤又は活性剤（間接的又は直接的）として可能な活性に対して評価される。このようなアッセイにおいて、多くの調節因子が一度で探索できる。調節因子の活性は、既知、未知又は部分的既知である。

20

調節因子は、選択的又は非選択的である。本明細書で用いるように、用語“選択的”は、調節因子の文脈（例えば、阻害剤）で用いられる場合、測定しうる又はさもなければ、調節因子が、生物学的に対応して、他の類似であるが同一ではない分子（例えば、興味の対象としての標的RNAと同じ遺伝子ファミリーのメンバー由来のRNA）と比べて、一つの分子（例えば、興味の対象としての標的RNA）と相互作用の様式が異なることを表わす。

#### 【0030】

選択的調節因子と考える調節因子に対して、標的との相互作用の性質は、標的に関連した他の分子（例えば、標的自体以外のファミリーメンバーからの転写物）との相互作用を完全に排除するものではないと理解すべきである。言い方を変え、用語、選択的調節因子は、興味ある遺伝子からのmRNA転写物にのみ結合して、関連するファミリーメンバーからの転写物には結合しない分子に制限されることを意図してない。この用語は、興味のある遺伝子からの及び関連するファミリーメンバーからの、転写物と相互作用することができる調節因子を含むことを意図するが、しかしながらこれに関しては、ファミリーメンバーと比較して標的との相互作用を変えて、生物学的に該当する結果をもたらすような条件をデザインすることは可能である。このような条件としては、調節因子とファミリーメンバーの間で配列が同一でない場合及び、いくつかの調節因子を発現するが全てのファミリーメンバーを発現しない、特定の組織又は細胞型において調節因子を使用する場合を含むが、これに限定されない。後者の条件下で、もしある調節因子が標的と相互作用し、生物学的に対応する効果をもたらすならば、ある調節因子は所定の組織における所定の標的に対して選択的であるかも知れないが、この場合、他の組織においては、さらなるファミリーメンバーが発現して、この調節因子が標的と相互作用しても、他のファミリーメンバーが存在するために、この調節因子が組織から“抜き取”られてしまい、生物効果を全くもたらさないこともあり得る。

30

40

#### 【0031】

選択的調節因子と同定されると、調節因子は、他の分子（例えば、興味ある遺伝子と関連する遺伝子のmRNA転写物）と結合する様式とは異なる様式で（例えば、より強く）、一分子（例えば、興味ある遺伝子のあるmRNA転写物）と結合する。本明細書で用いるように、この調節因子は、この調節因子が結合する他のいくつかの可能な分子と比較してより強く結合する分子に対して“選択的結合”又は“優先的結合”を示すという。

本明細書で用いるように、用語“阻害”、“抑制”、“下方制御”及びこれらの文法的

50

言い換えは互換性があり、遺伝子産物（例えば、ポリペプチド）、遺伝子発現、ポリヌクレオチドの活性（例えば、miRNA）又は1又は2以上の遺伝子産物をコードするRNAのレベルが、本出願を実行しない場合観察されるレベル以下に減少する。

【0032】

いくつかの実施態様において、miRNA分子による障害は、標的RNAの定常状態の発現レベルの減少に帰結する。いくつかの実施態様において、miRNA分子による障害は、標的の発現レベルを下方制御できない不活性な又は弱力化した分子存在下で観測されるレベル以下の標的遺伝子の発現をもたらす。いくつかの実施態様において、本出願のmiRNA分子による遺伝子発現の障害は、miRNA分子存在下の方が非存在下の場合よりも大きい。いくつかの実施態様において、遺伝子発現の障害は、遺伝子によりコードされたmRNAの分解速度の促進と結びついている（例えば、miRNAを介する遺伝子発現の障害）。いくつかの実施態様において、本出願のmiRNAによる障害は、標的遺伝子からの遺伝子産物の、miRNA非存在下で観測されるレベル以下の、発現レベルをもたらす。

10

【0033】

いくつかの実施態様において、例えば内在性miRNAの様な、miRNAはmiRNA障害剤により障害される可能性があり、miRNAが障害されてない場合の遺伝子発現レベル（例えば、遺伝子産物の産生）と比較して、miRNAによる標的となった遺伝子発現レベルの増加をもたらす。本明細書で用いるように、用語“miRNA障害剤”及び“miRNAの障害”は互換性があり、miRNAの活性を障害する分子を表わす。

【0034】

20

いくつかの実施態様において、miRNA障害剤は、特定の条件下で、特定の標的miRNAとハイブリダイズするポリヌクレオチドであり、これにより標的miRNAの活性を障害する。miRNA障害剤が標的miRNAとハイブリダイズする条件としては、例えば、生理学状態がある。標的miRNAポリヌクレオチドに対するmiRNA障害剤ポリヌクレオチド配列の相補性に基づき、miRNA障害剤は標的miRNAとより多く又はより少ない度合いでハイブリダイズする。いくつかの実施態様において、miRNAは、標的miRNAの全て又は部分と完全に相補的である又は不完全に相補的であり、例えば、標的miRNAに対して99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%又は70%相補性が挙げられ、当業者により一般的に理解されているように、これらは特定の応用によるものであり、また特異性の必要性による。miRNA障害剤は、特定の条件セットの下で、標的miRNA活性の要求量を障害するために必要なことは、標的miRNAと相補性を共有しさえすればよい。本出願に用いられるmiRNA障害剤の実施例としては、2'-O-メチルポリヌクレオチドのような修飾ポリヌクレオチドが含まれるが、これに制限されない。代表的、非限定の実施例は、表2及び表3に示し、2'-O-メチル-miR-1、2'-O-メチル-miR-133及び2'-O-メチル-miR-208が挙げられ、これらは有意に、それぞれ、miR-1、miR-133又はmiR-208の活性を特異的に障害できる。

30

【0035】

本明細書で用いるように、用語“突然変異”は伝統的な内包的意味を保ち、核酸又はポリペプチド配列における、遺伝による、自然発生による又は導入された変化を表し、当業者に一般的に既知の意味で用いられる。

本明細書でも用いるように、用語“筋細胞”は、広く、全ての発生段階にある全ての種類の筋肉細胞を表わす。従って、“筋細胞”は、例えば筋芽細胞のような、未分化の筋肉細胞及び例えば、最終分化した管状筋細胞のような分化した筋肉細胞の両者を含む。“筋細胞”はまた、線状筋肉細胞（例えば、骨格筋細胞）、平滑筋細胞（例えば、小腸筋肉細胞）及び心臓筋肉細胞を含むが、これらに制限されない、様々な組織型の筋肉細胞を含む。さらに、本明細書で用いる“筋細胞”は、種特異的ではない。

40

目的物に対して使われる、用語“自然に生ずる”は、ある目的物が自然に見出されることを表わす。例えば、自然源から単離ができて、実験室でヒトにより意図的に改変されて無い、有機体（微生物を含め）に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、自然に生ずる。しかしながら、本明細書で用いる用語によると、人の手による全ての操作は、“自然に生ずる”対象物を“単離した”対象物にすることができる。

50

## 【 0 0 3 6 】

本明細書で用いるように、用語“核酸”、“ポリヌクレオチド”及び“核酸分子”は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により作られた断片及び結合、切断、エンドヌクレアーゼ作用及びエキソヌクレアーゼ作用のいずれかにより作られた断片のいずれかを表わす。核酸は、（デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドのような）自然に存在するヌクレオチド又は自然に存在するヌクレオチドの類似体（例えば、自然に存在するヌクレオチドの - エナンチオマ型）又は両者の組合せである、モノマーを含むことができる。修飾されたヌクレオチドには、糖部分及び / 又はピリミジン又はプリン塩基部分の修飾があることができる。糖修飾としては、例えば、1又は2以上の水酸基をハロゲン、アルキル基、アミン及びアジド基による置き換えが挙げられる又は糖はエーテル又はエステルとして官能化できる。さらに、糖部分全体は、アザ糖及び炭素環式糖類似体のような、立体的に及び電子的に同様な構造により置き換えることができる。塩基部分の修飾の実施例としては、アルキル化プリン及びピリミジン、アシル化プリン及びピリミジン又は既知の複素環置換体が挙げられる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合又は類似の結合により連結できる。ホスホジエステル結合の類似体としては、ホスホロチオリン酸、ホスホロジチオリン酸、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオアート、ホスホロアニリダート、ホスホラミダート等々が挙げられる。用語“核酸”はまた、いわゆる“ペプチド核酸”も含み、これは、ポリアミン骨格に結合した自然又は修飾核酸塩基を含む。核酸は、1本鎖又は2本鎖である。

10

20

## 【 0 0 3 7 】

用語“作動可能に連結”は、2個の核酸領域の関係を記載する場合、これらの領域が意図したやり方で機能することを許容するような並列を表わす。例えば、コードする配列に“作動可能に連結”したコントロール配列は結合した結果、適切な分子（例えば、インデューサー及びポリメラーゼ）がコントロール又は調節配列に結合した時、コード配列は、コントロール配列と両立する条件の下に行われる様に発現する。従って、いくつかの実施態様において、用語“作動可能に連結”は、コード配列の転写がプロモーターによりコントロール及び調節されるやりかたで、コード配列に結合したプロモーターを表わす。コード配列にプロモーターを作動可能に連結する技術は、当技術分野で既知である；興味あるコード配列に対する詳細な方向及び位置は、とりわけ、プロモーターの特定の性質に依存する。

30

## 【 0 0 3 8 】

従って、用語“作動可能に連結”は、ヌクレオチド配列の転写がそのプロモーター領域によりコントロール及び調節されるように、ヌクレオチド配列に結合したプロモーター領域を示す。同様に、ヌクレオチド配列は、作動可能に連結したプロモーターの“転写コントロール”の下にあると言われる。ヌクレオチド配列へのプロモーター領域の作動可能な連結の技術は当技術分野で既知である。

用語“作動可能に連結”はまた、ヌクレオチド配列の転写の終結が、転写終結配列によりコントロールされるように、ヌクレオチド配列と連結した転写終結配列を表わすことができる。いくつかの実施態様において、転写終結配列は、RNAポリメラーゼIIIによる転写を、終結配列、TTTTTTの第3番目又は4番目Tで終結させる配列を含む。従って、合成初期の小転写物は、3'末端に3又は4Uを有する。

40

## 【 0 0 3 9 】

2個の核酸又はタンパク質配列において、用語“パーセント同一性”及び“パーセント同等”は、比較し、以下の配列比較アルゴリズムの一つ又は目視を用いて測定し、最大的一致があるようにアラインした時、いくつかの実施態様では、少なくとも60%の、またいくつかの実施態様では、少なくとも70%の、またいくつかの実施態様では、少なくとも80%の、またいくつかの実施態様では、少なくとも85%の、またいくつかの実施態様では、少なくとも90%の、またいくつかの実施態様では、少なくとも95%の、またいくつかの実施態様では、少なくとも96%の、またいくつかの実施態様では、少なくと

50

も 98% の、またいくつかの実施態様では、少なくとも 99% のヌクレオチド又はアミノ酸残基同一性を有する、2 又は 3 以上の配列又は部分配列を表わす。パーセント同一性は、いくつかの実施態様では少なくとも 10 残基長の配列領域にわたって存在し、またいくつかの実施態様では少なくとも 20 残基長の配列領域にわたって存在し、またいくつかの実施態様では少なくとも 50 残基長の配列領域にわたって存在し、またいくつかの実施態様では少なくとも 100 残基長の配列領域を越えて存在し、またいくつかの実施態様では少なくとも 150 残基長の配列領域にわたって存在する。いくつかの実施態様において、パーセント同一性は、コード領域又は全 miRNA の様な、所与の領域の全長にわたって存在する。

#### 【0040】

配列比較のために、一般的には 1 配列を参照配列として用い、これに対してテスト配列を比較する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、テスト配列及び参照配列を計算機にインプットし、必要なら配列座標をデザインし、また配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。その後、指定されたプログラムパラメータに基づき、配列比較アルゴリズムにより、参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性が計算される。

比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith & Waterman、1981<sup>33</sup>に記載されている局所相同性アルゴリズム；Needleman & Wunsch、1970<sup>34</sup>に記載されている相同性アラインメントアルゴリズム；Pearson & Lipman、1988<sup>35</sup>に記載されている類似性探索方法；これらのアルゴリズムの計算機化した実行(Accelrys、Inc.、San Diego、California、United States of America から入手可能なGCG<sup>(R)</sup> Wisconsin Package<sup>(R)</sup>、中のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)又は目視で行うことができる。一般的には、Ausubel 他、1989<sup>36</sup>を参照のこと。

#### 【0041】

パーセント配列同一性及び配列類似性の測定に適したアルゴリズムの 1 実施例は、BLAST アルゴリズムであり、これはAltschul 他.、1990<sup>37</sup>に記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、the World Wide Web を経由してNational Center for Biotechnology Informationから公共的に入手可能である。このアルゴリズムには、最初、クエリー配列に、長さWのショートワード(short word)を特定することにより、高スコア配列対(high scoring

sequence pairs、HSP)を同定する、この高スコア配列対はデータベース配列における同じ長さのワードとアラインした時、ある正值閾値スコア(positive-valued threshold score) Tと一致する又はTを満足させる。Tは近隣ワードスコア閾値(neighborhood word score threshold)<sup>37</sup>を表わす。これらの最初の近隣ワードヒットは、これらを含むもっと長いHSPを見出すための探索を始めるためのシードとして働く。その後、ワードヒットは累積するアライメントスコアが増加するに従い、各配列の両方向に伸長される。ヌクレオチド配列に対し、パラメーターM(一致する残基対に対する報酬スコア；常に>0)及びN(ミスマッチ残基に対するペナルティスコア；常に<0)を用いて、累積スコアが計算される。アミノ酸配列に対して、累積スコアを計算するために、スコアリングマトリックスを用いる。累積アラインメントスコアが到達最大値より量Xだけ低下した場合、各方向へのワードヒットの伸長は停止する又は1又は2以上の負のスコアリング残基アラインメントの蓄積により累積スコアはゼロ又はゼロ以下になり又はどちらかの配列の終わりとなる。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T及びXはアラインメントの感度及びスピードを決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列に対する)は、ワード長(W)を11として、期待値(E)を10として、カットオフを100として、M=5、N=-4及び両鎖の比較を初期設定、として用いる。アミノ酸配列に対して、BLASTPプログラムを、ワード長(W)を3、期待値(E)を10及びBLOSUM62スコアリングマトリックスを初期設定として用いる<sup>38</sup>。

#### 【0042】

パーセント配列同一性に加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2個の配列間の類似性の統計解析を行う。Karlin 及びAltschul 1993<sup>39</sup>を参照のこと。BLASTアルゴリズムで提供

10

20

30

40

50



される類似性の 1 測定は、最小和確率 (smallest sum probability、 $P(N)$ ) であり、これは 2 個のヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然生ずる確率の表示を提供する。例えば、もし、参照核酸配列に対してテスト核酸配列の比較の最小和確率が、いくつかの実施態様で、約 0.1 以下、またいくつかの実施態様で、約 0.01 以下、またいくつかの実施態様で、約 0.001 以下であるならば、テスト核酸配列は参照配列と類似すると考える。

#### 【0043】

2 個のヌクレオチド配列の文脈において、用語“実質的に同一”は、以下の配列比較アルゴリズムの一つ又は目視により測定し、最大一致のために比較し、またアラインした時、いくつかの実施態様において、少なくとも 70%、またいくつかの実施態様において、少なくとも 75%、またいくつかの実施態様において、少なくとも 80%、またいくつかの実施態様において、少なくとも 85%、またまたいくつかの実施態様において、少なくとも 90%、またいくつかの実施態様において、少なくとも 95%、またいくつかの実施態様において、少なくとも 97%、またいくつかの実施態様において、少なくとも 99% ヌクレオチド同一性を持つ、2 又は 3 以上の配列又は部分配列を表わす。一実施例において、少なくとも 17 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 18 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 19 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 20 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 21 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 22 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 23 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 24 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 25 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 26 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 27 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 30 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 50 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 75 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 100 残基のヌクレオチド配列において、いくつかの実施態様において、また少なくとも 150 残基のヌクレオチド配列において、また他の実施例において全長のコード配列を含むヌクレオチド配列において、実質的同一性がある。いくつかの実施態様において、多様性配列は実質的に同一な配列である。用語“多型性”は、集合において、2 又は 3 以上の遺伝的に決定された代替の配列又は対立遺伝子が生ずることを表わす。対立遺伝子の差異は、1 塩基対ほど小さいことも可能である。しかしながら、当業者は、多型性配列は同じ遺伝子に対応すると認識している。

#### 【0044】

2 個のヌクレオチド配列が実質的に同一である他の兆候は、ストリンジェントな条件で、2 個の分子が互いに特異的に又は実質的にハイブリダイズする事である。核酸ハイブリダイゼーションの文脈において、比較される 2 個の核酸配列を、“プローブ配列”及び“テスト配列”と表わすことができる。“プローブ配列”は参照核酸分子であり、また“テスト配列”は異種類の核酸分子の集合の中に見出される、テスト核酸分子である。

ハイブリダイゼーション研究又は検定に使われるヌクレオチド配列の実施例としては、いくつかの実施態様において、本出願の核酸分子の少なくとも約 14 から 40 ヌクレオチド配列に相補的又は類似したプローブ配列が含まれる。一実施例として、プローブは、与えられた遺伝子の 14 から 20 ヌクレオチド又は、望む場合、より長く、30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 又は 500 ヌクレオチド又は全長に至る長さまで含まれる。この様な断片は、例えば、化学合成、核酸増幅技術の適用、組み換え産物のための組み換えベクターに選択した配列を導入して、直接断片を合成するにより、直ちに調整することができる。

## 【 0 0 4 5 】

用語“ に対して標的とする ”は、“ に対して特異的にハイブリダイズする ”を含み、これはストリンジェントな条件で、特定のヌクレオチド配列が、複雑な核酸混合物（例えば、全細胞DNA又はRNA）に存在する場合、特定のヌクレオチド配列に対してのみ分子が結合、2重鎖になる又はハイブリダイズすることを表す。

非限定的例として、ハイブリダイゼーションは、少なくとも約1時間、2時間、5時間、12時間、24時間の間、5 x SSC、4 x SSC、3 x SSC、2 x SSC、1 x SSC又は0.2 x SSC中で行うことができる（SSC緩衝液及び他のハイブリダイゼーション条件の記述について、Sambrook 及びRussell、2001を参照）。ハイブリダイゼーションの温度を、反応のストリンジェンシーに合わせて増加することができ、例えば、約25（室温）から約45、50、55、60又は65までである。ハイブリダイゼーション反応は、ストリンジェンシーに影響を与える他の試薬を含むことができ、例えば、50%ホルムアミド存在下のハイブリダイゼーションは、ある温度におけるハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加させる。

## 【 0 0 4 6 】

ハイブリダイゼーション反応に続いて、単一ステップ又は2、又は3以上の洗浄ステップが行われ、洗浄ステップは、同一又は異なる塩度及び温度で行われる。例えば、洗浄温度は、ストリンジェンシーと合わせるために、約25（室温）から約45、50、55、60、65又はより高温まで上昇できる。洗浄ステップは、界面活性剤、例えば、SDS存在下で行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションに続いて、2 x SSC、0.1% SDS中で65、2回、各約20分の洗浄ステップ及び付加的に0.2 x SSC、0.1% SDS中で65、2回、各約20分の洗浄ステップを行うことができる。

## 【 0 0 4 7 】

以下は、本出願の参照ヌクレオチド配列と実質的に同一であり、相同なヌクレオチド配列をクローンするために用いる、ハイブリダイゼーション及び洗浄条件の実施例である：一つの実施例において、プローブヌクレオチド配列を標的ヌクレオチド配列と、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5 M NaPO<sub>4</sub>、1 mmエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）中50でハイブリダイズして、2 X SSC、0.1% SDS中50で洗浄する；いくつかの実施態様において、プローブ及びテスト配列を、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5 M NaPO<sub>4</sub>、1 mmエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）中50でハイブリダイズして、1 X SSC、0.1% SDS中50で洗浄する；いくつかのプローブ及びテスト配列を7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5 M NaPO<sub>4</sub>、1 mmエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）中50でハイブリダイズして、0.5 X SSC、0.1% SDS中50で洗浄する；いくつかの実施態様において、プローブ及びテスト配列を、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.5 M NaPO<sub>4</sub>、1 mmエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）中50でハイブリダイズして、0.1 X SSC、0.1% SDS中65で洗浄する。

## 【 0 0 4 8 】

さらなるストリンジェントハイブリダイゼーション条件の例としては、50%ホルムアミド、10 X

Denhardt（0.2%フィコール、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%仔牛血清アルブミン）及び200 mg / mlの、例えば切断したサケ精子DNAのような、変性担体DNA、から成る又はのみから成る溶液を用いて42における一晚のハイブリダイゼーションに続く、2回の2 X

SSC、0.1% SDS中65 各約20分洗浄ステップ及び2回の0.2 X SSC、0.1% SDS中65 各約20分の洗浄ステップが挙げられる。

ハイブリダイゼーションには、（1）溶液中の2種の核酸のハイブリダイゼーション又は（2）溶液中の1種の核酸と、例えばフィルターのような、固体支持体に結合した核酸

とのハイブリダイゼーションが挙げられる。1 核酸が固体支持体上にある場合、ハイブリダイゼーションの前にプレハイブリダイゼーションが行われることができる。プレハイブリダイゼーションは、( 相補的ポリヌクレオチド鎖なしに ) ハイブリダイゼーションと同じ溶液及び同じ温度で少なくとも、約 1 時間、3 時間又は 10 時間行うことができる。

従って、本開示の吟味に際して、ストリンジェンシー条件は、当業者には既知である又は不必要な実験なしに、当業者により決定できる<sup>36, 40-44</sup>。

#### 【0049】

用語“ に実質的にハイブリダイスする ” はプローブ核酸分子及び標的核酸分子の間の相補的なハイブリダイゼーションを表し、また軽微なミスマッチを含む、望みのハイブリダイゼーションを得るために、ハイブリダイゼーション溶液のストリンジェンシーを減少させる。

10

用語“ 表現形質 ” は、細胞又は有機体の全体としての物理的、生化学的及び生理学的性質を表し、例えば、どれか一つの遺伝形質を持つこと又はどれかの遺伝形質グループをもつことである。従って、表現形質は、細胞又は有機体内で、遺伝子発現に由来し、また観測可能又は検定可能な遺伝形質を表わす。

#### 【0050】

本明細書で、互換性を持って使われる、用語“ ポリペプチド ”、“ タンパク質 ” 及び“ ペプチド ” は 20 タンパク質アミノ酸又はアミノ酸類似体のポリマーを表し、大きさ又は機能を問わない。“ タンパク質 ” はしばしば、比較的大きなポリペプチドを参照して用いられ、“ ペプチド ” は、小さなポリペプチドを参照して用いられるが、当該分野において、これらの用語は重なって居り、変わる。本明細書で用いる、用語“ ポリペプチド ” は、特別な注意書きがなければ、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質を表わす。本明細書で用いるように、用語“ タンパク質 ”、“ ポリペプチド ” 及び“ ペプチド ” は、遺伝子産物を表わす場合、互換性がある。用語“ ポリペプチド ” は、酵素を含め全てのタンパク質を包含する。従って、ポリペプチドの例としては、遺伝子産物、自然に存在するタンパク質、ホモログ( ある一つの共通祖先から進化した遺伝子 )、オルソログ( 共通祖先からの遺伝によって 2 つの生物に存在する遺伝子 )、パラログ( 重複により、ある生物に 2 つ以上コピーが存在する遺伝子 )、断片及び、他の同等物、変異物及びこれらの類似体が挙げられる。

20

#### 【0051】

用語“ ポリペプチド断片 ” 又は“ 断片 ” は、参照ポリペプチドに対して用いられた場合、参照ポリペプチド自体と比較してアミノ酸残基が欠失したポリペプチドを表し、その場合、残余のアミノ酸配列は、参照ポリペプチドの対応する位置と通常同一である。このような欠失は、参照ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端又は両末端で生ずることができる。通常断片の長さは、少なくとも、5、6、8、又は 10 アミノ酸であり又は少なくとも 14 アミノ酸であり、少なくとも、20、30、40 又は 50 アミノ酸であり又は少なくとも 75 アミノ酸であり又は少なくとも 100、150、200、300、500 残基長又はより多くのアミノ酸である。断片は、参照タンパク質の 1 又は 2 以上の生物活性を有することができる。さらに、断片は、特定の領域の部分断片を含むことができ、この部分断片はそれが由来する領域の機能を保持する。

30

40

#### 【0052】

本明細書で用いるように、用語“ プライマー ” は、いくつかの実施態様において、2 又は 3 以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから成る配列、いくつかの実施態様では、3 以上の、いくつかの実施態様では 8 以上の及びいくつかの実施態様では、少なくとも約 20 ヌクレオチド以上のエクソン又はイントロン領域ヌクレオチドを表わす。このようなオリゴヌクレオチドの長さは、いくつかの実施態様において、10 から 30 塩基である。

#### 【0053】

用語“ 精製した ” は、圧倒的に多く存在する、目的化学種を表わす( 例えば、モルベースで、組成物の中で他の化学種より多く存在する )。“ 精製した分画 ” は、目的化学種が

50

存在する全ての化学種の中で少なくとも約 50 % (モルベースで) 含まれる組成物である。溶液又は懸濁物中で化学種の純度を決定する上で、化学種が溶けている又は分散している、溶媒又はマトリクスは通常含まれず; 代わりに、溶解した又は分散した化学種 (興味の対象を含め) のみ考慮する。一般的に、精製した組成物は、組成物中に存在する全ての化学種の約 80 % 以上含む又は存在する全ての化学種の 85 %、90 %、95 %、99 % 又はそれ以上含む 1 化学種であろう。組成物は本質的に単一化学種を含み、精製した目的化学種は、実質的に同一性 (汚染化学物質は従来型の検出方法では、組成物中に検出できない) を持つことができる。ポリペプチドの純度は、当業者に既知の多くの方法で決定できて、例えば、アミノ末端アミノ酸配列解析、ゲル電気泳動及び質量分析法がある。

#### 【0054】

“参照配列”は、配列比較のためのベースとして用いる定義済みの配列である。参照配列は、例えば、全長のヌクレオチド又はアミノ酸配列の断片のような、より長い配列の部分集合であり得る又は完全配列を含む。2 個のタンパク質は、(1) それぞれ 2 個の蛋白質間で類似した配列 (即ち、完全長タンパク質配列の一部) を含み及び (2) 2 個の蛋白質間で相違する配列を含むので、2 個 (又は 3 個以上) のタンパク質の配列比較は、一般的に “比較窓” (上記本明細書で定義) 上で 2 個のタンパク質の配列を比較することで行われ、局所領域の配列類似性を同定し、比較することができる。

#### 【0055】

用語 “調節配列” は、本明細書を通して用いられる総称的な用語であり、開始シグナル、エンハンサー、レギュレーター、プロモーター及び終結配列のようなポリヌクレオチド配列を表し、これらは作動的に連結しているコード又は非コード配列の発現に影響を及ぼすために必要又は望ましい。調節配列の例は、Goeddel、1990<sup>45</sup> に記載されており、また、例えば、シミアンウィルス (SV40)、アデノウィルス又はサイトメガロウィルス最初期プロモーター、CMV 最小プロモーター、lac システム、trp システム、TAC 又は TRC システム、発現が T7RNA ポリメラーゼで行われる T7 プロモーター、ラムダファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fd コートタンパク質のコントロール領域、例えば、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の解糖系酵素のプロモーター、例えば、Pho5 の様な、酸ホスファターゼ野プロモーター、酵母 a- 接合因子のプロモーター、バキュオロウィルス系の多面体プロモーター及び原核及び真核細胞又はこれらのウィルスの遺伝子発現をコントロールすると知られている他の配列及びこれらの様々な組合せ、が挙げられる。このようなコントロール配列の性質及び使用は宿主有機体により異なる。原核生物におけるこのようなコントロール配列としては、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列が挙げられる。用語 “調節配列” は、最小限、存在することで発現に影響を与える構成要素を含むことを意図し、さらに例えば、存在することでリーダー配列及び融合パートナー配列にとって有利となる構成要素を含むことができる。

#### 【0056】

ある種の実施態様において、ポリヌクレオチド配列の転写は、発現が想定されている細胞型中のポリヌクレオチドの発現を制御する、プロモーター配列 (又は他の調節配列) の制御下に在る。またポリヌクレオチドは、自然に存在する形のポリヌクレオチドの発現を調節する配列と同じ又は異なる調節配列の制御下にあることも可能であると理解すべきであろう。いくつかの実施態様において、プロモーター配列は、CMV 最小プロモーター、筋肉クレアチンキナーゼ (MCK) 及び ミオシン重鎖 (MHC) プロモーターから成る群から選択される。例えば、骨格筋中での遺伝子発現を制御する、筋肉クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーターは例えば、現在入手可能な遺伝子導入 (トランスジェニック) 技術を用いて骨格筋を含む組織中の miR-1, miR-133, 又は miR-206 のような miRNA を発現するために用いることができる。どのようなプロモーター (例えば、本明細書に提示された) に対しても、同定された全プロモーターを使う必要はなく、その機能的誘導体を使うことができることは、理解されている。本明細書で用いるように、用語 “機能的誘導体” は、他の、作動的に結合した核酸分子の転写を制御するに十分な配列を含む核酸配列を表わす。従って、“機能的誘導体” は、本明細書で定義したように、最小プロモーターとして機能するこ

10

20

30

40

50

とができる。

【0057】

ポリヌクレオチド配列の転写終結は、通常作動的に結合した転写終結配列（例えば、RNAポリメラーゼIII終結配列）により調節される。ある例では、転写終結は、正しいmRNAポリアダニル化にも関係する。3'非転写制御DNA配列は、いくつかの実施態様では、約50から約1000、またいくつかの実施態様では、約100から約1000ヌクレオチド塩基対を含み、また転写及び翻訳終結配列を含む。いくつかの実施態様において、RNAポリメラーゼIII終結配列は、ヌクレオチド配列TTTTTTを含む。

【0058】

用語“レポーター遺伝子”は、その存在又は活性を直ちに検出できるタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸を表し、このようなタンパク質として、ルシフェラーゼ、蛍光性タンパク質（例えば、緑色蛍光性タンパク質）、クロランフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、分泌性胎盤アルカリホスファターゼ、ラクタマーゼ、ヒト成長ホルモン及び他の分泌性酵素レポーターがある、がこれらに制限されない。一般的に、レポーター遺伝子は、宿主細胞では例えば、直接蛍光分析、放射性同位元素又は細胞の分光学的分析によって、また一般的にシグナル解析のために細胞を殺す必要がなしに、細胞分析により検出可能な、他の方法では産生できないポリペプチドをコード化する。ある場合には、レポーター遺伝子は、酵素をコード化し、この酵素は、宿主細胞の蛍光特性に変化を与え、この変化が定性的、定量的又は半定量的機能又は転写活性化により検出できる。酵素の例としては、エステラーゼ、ラクタマーゼ、ホスファターゼ、パーオキシダーゼ、プロテアーゼ、（組織プラスミノゲン活性化因子又はウロキナーゼ）及び、当業者に既知又は将来開発される適切な発色性の又は蛍光性の基質により検出可能な、他の酵素が挙げられる。

【0059】

本明細書で用いるように、用語“配列決定”は、従来型の手動又は自動化実験技術を用いて、DNA、RNA又はタンパク質標的試料の核酸又はアミノ酸の規則正しい線状の配列を決定することを表わす。

本明細書で用いるように、用語“実質的に純粋”は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが、自然状態で結合している、配列又は分子及び分離の際に用いる分子を実質的に含まないことを表わす。用語“実質的に含まない”は、試料が自然状態では結合している材料及び化合物を、いくつかの実施態様において、試料が少なくとも50%、いくつかの実施態様において、試料が少なくとも70%、いくつかの実施態様において、試料が80%、いくつかの実施態様において、試料が90%含まないことを表わす。

本明細書で用いるように、用語“標的細胞”は、その細胞の中に核酸配列又はポリペプチドを導入すること又は非修飾細胞に、標準的として知られている状態に変化を与えることを望む細胞を表わす。標的細胞に導入される核酸配列は、様々な長さがある。さらに、核酸配列は、標的細胞中に、プラスミドの成分又は他のベクター又は裸の配列として導入することができる。

【0060】

本明細書で用いるように、用語“標的遺伝子”は、本出願の方法及び組成物を用いて、変化させる標的となる遺伝子を表わす。従って、標的遺伝子は、発現レベルが、mRNA又はポリペプチドレベルで、miRNAにより下方調節される、核酸配列を含む。同様に、用語“標的RNA”又は“標的mRNA”はmiRNAが結合して、標的遺伝子の発現を変化させようとする、標的遺伝子の転写物を表わす。標的遺伝子は、細胞由来の遺伝子、内因性遺伝子、トランスジーン（導入遺伝子）又は病原体遺伝子、例えばその感染後細胞内に存在するウィルス、のような外因性遺伝子である。標的遺伝子を含む細胞は、例えば、植物、動物、原生動物、ウィルス、バクテリア又は菌類のような如何なる有機体由来でも可能であり又は含有され得る。

【0061】

本明細書で用いるように、用語“転写”は、RNAポリメラーゼ及び遺伝子の相互作用を

伴う細胞過程を表し、この遺伝子は、遺伝子のコード配列に存在する構造的情報の、RNAとしての、発現を調節する。この過程は、次のステップを伴うが、これらに制限されない：(a) 転写開始；(b) 転写伸長；(c) 転写スプライシング；(d) 転写物キャッピング；(e) 転写終結；(f) 転写物ポリアデニル化；(g) 転写物の核外移動；(h) 転写物校正；(i) 及び転写物の安定化。

#### 【0062】

本明細書で用いるように、用語“転写因子”は細胞質の又は核のタンパク質を表し、これらは遺伝子に結合し又は遺伝子のRNA転写物に結合し又は、入れ替わって遺伝子又はRNA転写物に結合する他のタンパク質に結合して、遺伝子の発現を調節する。このような変化は、さらに、他の機構によりやり遂げることができる；“遺伝子に対する転写因子”の本質は、何らかの方法で、遺伝子の転写物のレベルを変化させる因子に関する。

用語“トランスフェクション”は、例えば、発現ベクターのような核酸の受容細胞への導入を表し、これは、ある場合、核酸を介した遺伝子移動を伴う。用語“形質転換”は、外来性核酸を細胞に取り込む結果として、細胞の遺伝子型が変わる過程を表わす。例えば、形質転換細胞は、本出願のmiRNAを発現することができる。

#### 【0063】

本明細書で用いるように、“有意”又は“有意性”は、2個又は3個以上の存在物間に無作為ではない関係がある確率の統計学的解析に関する。関係が“有意”であるか又は“有意性”を持つか、持たないか決定するために、データの統計的操作を行い、“p - 値”として表される確率を計算する。ユーザーが定義したカットオフ値以下のp - 値は、有意であると考えられる。ある実施例において、0.05に等しいか、以下であるp - 値、いくつかの実施態様において、0.01以下であり、いくつかの実施態様において、0.005以下であり、またいくつかの実施態様において、0.001以下であるp - 値は、有意であることを示す。

#### 【0064】

本明細書で用いるように、用語“標的RNA”は、変化の標的であるRNA分子（例えば、遺伝子産物をコードしているmRNA分子）を表わす。いくつかの実施態様において、標的RNAは標的遺伝子によりコードされている。同様に、用語“標的部位”は、標的部位に相補的なアンチセンス鎖内の配列を含むmiRNA構築物を介した切断の“標的となる”標的RNA内の配列を表わす。また同様に、用語“標的細胞”は、miRNAの導入を意図している、標的RNAを発現する細胞を表わす。標的細胞は、いくつかの実施態様において筋細胞である。

#### 【0065】

miRNAは、あるRNA分子に対して十分なヌクレオチド同一性を有するならば、miRNA及び該RNA分子が相互作用するという条件下で、該RNA分子の発現を変化させると期待されている該RNA分子を“標的”とする。いくつかの実施態様において、相互作用は筋細胞の中で発生する。いくつかの実施態様で、相互作用は、生理的条件下で生ずる。本明細書で用いるように、用語“生理学的条件”は、筋細胞が対象の部分又は対象組織の部分又はインビトロで増殖するにもかかわらず、筋細胞中のインビボ条件を表わす。従って、本明細書に用いるように、用語“生理学的条件”は、筋細胞が対象の部分又はインビトロでの生育下に筋細胞が暴露される条件下での筋細胞中の条件を表わす。

#### 【0066】

本明細書で用いるように、用語“検知し得るレベルの切断”は、標的RNAのランダム分解により生ずるRNAのバックグラウンド以上の切断産物の検知を可能にするに十分な、標的RNAの切断（及び切断したRNA産物の生成）の程度を表わす。標的RNAの少なくとも1～5%由来のmiRNAを介した切断生成物の産生は、大部分の検知方法のバックグラウンド以上の検知に充分である。

#### 【0067】

用語“マイクロRNA”及び“miRNA”は互換性があり、プリmiRNA、プレmiRNA又は機能的等価物から作られる約17～24ヌクレオチドの核酸分子を表わす。外因的に供給された

10

20

30

40

50

miRNAとsiRNAの文脈では、この差異は多かれ少なかれ人工的であるが、miRNAは短鎖干渉RNA (siRNA) と対比される。記憶すべき差異は、miRNAは必然的に本明細書で記載した、ヘアピン分子に対するヌクレアーゼ活性の産物であり、siRNAは、完全2重鎖RNA分子又はヘアピン分子から作られ得る。一般的に、mi-RNAに関するさらなる情報及び既知の発刊されたmiRNAのデータベース及びデータベースを採掘するための探索技術は、参照文献として取り込まれている、Wellcome Trust Sanger Institute miRBase:Sequenceに見出すことができる。また、参照文献として取り込まれている、The microRNA Registry, Griffiths-Jones S, NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111を参照されたい。

#### 【0068】

本明細書で用いるように、用語“RNA”は、少なくとも1リボヌクレオチド残基を含む分子を表わす。“リボヌクレオチド”は、-D-リボフラノース分子の2'位置に水酸基を持つヌクレオチドを意味する。この用語は、2重鎖RNA、単鎖RNA、2重鎖及び単鎖領域を有するRNA、部分的に精製したRNAのような分離したRNA、実質的に精製したRNA、合成RNA及び遺伝子組み換えで産生したRNAを含む。従って、RNAは、mRNA転写物、miRNA及びmiRNA前駆体及びsiRNAを含むが、これらに制限されない。本明細書で用いるように、用語“RNA”は、また自然のRNAと比べ、付加、欠失、置換及び/又は1又は2ヌクレオチド以上の変化により変わった改変RNA又は、RNA類縁物質を含むことを意図する。この様な改変は、RNA末端又は内部に、例えば、RNAの1又は2以上のヌクレオチドに、非ヌクレオチド材料の付加を含むことができる。本出願のRNA分子のヌクレオチドは、自然に存在しないヌクレオチド又は化学的に合成したヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドのような鎖を作らないヌクレオチドを含むことができる。これらの改変RNAは、自然に存在するRNAの類縁物質と呼ばれる。

#### 【0069】

本明細書で用いるように、用語“2重鎖RNA”は、少なくともRNAの一部が2重鎖を形成するWatson-Crick塩基対にあるRNA分子を表わす。従って、この用語は、完全に2重鎖又は部分的に2重鎖であるRNA分子を含むと理解すべきである。2重鎖RNAの例としては、分子間ハイブリダイゼーションにより部分的に又は完全に2重鎖である少なくとも2本の区別可能なRNA鎖を含む分子を含むが、これに制限されない。さらに、この用語は、分子内ハイブリダイゼーションにより、2重鎖領域(例えば、ヘアピン)を形成できる単一RNA分子を含むことを意図する。従って、本明細書に用いるように、用語“分子間ハイブリダイゼーション”及び“分子内ハイブリダイゼーション”は、2重鎖形成を伴うヌクレオチドが、それぞれ、異なる分子上に存在又は同一分子上に存在する2重鎖分子を表わす。

#### 【0070】

本明細書で用いるように、用語“2重鎖領域”は、ヌクレオチド間の水素結合により2重鎖コンフォメーションをもつ核酸分子のどれかの領域及び当業者に理解されている他のどれかの核酸2重鎖を表し、この水素結合は、シトシンとグアノシン間、アデノシンとチミジン間、アデノシンとウラシル間の水素結合を含むがこれらに制限されない。2重鎖領域の長さは、連続した約15塩基対から数千塩基対に及ぶことができる。いくつかの実施態様において、2重鎖領域は少なくとも15塩基対であり、またいくつかの実施態様において、2重鎖領域は15~300塩基対であり、またいくつかの実施態様において、2重鎖領域は15塩基対から約60塩基対である。上記の様に、2重鎖領域の形成は、分子間ハイブリダイゼーション(即ち、2又は3以上の明確なRNA分子を含む)又は分子内ハイブリダイゼーションを介した、相補的RNA鎖(例えば、センス鎖及びアンチセンス鎖)のハイブリダイゼーションの結果であり、後者のハイブリダイゼーションは、単一RNA分子が、同じRNA分子内に互いにハイブリダイズできる自己相補的な領域を持つ場合に生ずることが可能である。これらの自己相補的領域は、一般的にショートストレッチのヌクレオチド(例えば、約5~10ヌクレオチド)で隔てられており、分子内ハイブリダイゼーションにより当分野において“ヘアピン”又は“ステムループ構造”と呼ばれるものを形成

する。

【 0 0 7 1 】

### I I I . 核 酸

本出願に基づき使われる核酸分子は、筋細胞遺伝子産物をコードする核酸分子及び本出願に基づき筋細胞遺伝子（例えば、miRNA核酸分子）の発現を変化させるために使われる核酸分子を含む。従って、本出願に基づき使われる核酸は、上記核酸分子を含むが、これらに制限されない。例えば、本明細書で用いられる核酸分子は、miR-1 ( U G G A A U G U A A A G A A G U A U G U A ; 配列番号1)、miR-133 ( U U G G U C C C C U U C A A C C A G C U G U ; 配列番号2)、miR-206 ( U G G A A U G U A A G G A A G U G U G U G G ; 配列番号3)、miR-208 ( A U A A G A C G A G C A A A A A G C U U G U ; 配列番号4)、miR-22 ( A A G C U G C C A G U U G A A G A A C U G U ; 配列番号5)、miR-26 ( U U C A A G U A A U y C A G G A U A G G y ( U ) ; 配列番号6)、miR-29 ( U A G C A C C A U y U G A A A U C r G U ( k U U ) ; 配列番号7)、miR-30 ( y k U w m A s w y s s h h s w y U v n v v ( b C ) ; 配列番号8)、miR-128 ( U C A C A G U G A A C C G G U C U C U U U y ; 配列番号9)、miR-143 ( U G A G A U G A A G C A C U G U A G C U C A ; 配列番号10)及びmiR-145 ( G U C C A G U U U U C C C A G G A A U C C C U U ; 配列番号11);本明細書上記の配列と実質的に同一な配列（例えば、いくつかの実施態様において、配列番号1～11の何れかに対し少なくとも、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%相同な配列）；及びこれらの配列の部分配列及び伸長配列が含まれる。本出願は、開示した核酸配列を含む遺伝子、cDNA、キメラ遺伝子及びベクターを含む。

本明細書の上記又は他の箇所で用いた1文字ヌクレオチドコードは、本明細書に参考文献として組み込まれた、WIPO Standard ST.25 (1998)、Appendix 2、表1、(M.P.E.P. 24 22,表1)に従う。特に、以下の1文字コードは、表1に示した対応するヌクレオチドを表わす。括弧（例えば、( n )）内のヌクレオチドは、ヌクレオチドが存在又は不在であり得ることを示すことを意図する。さらに、図21は、配列番号5～11に示すヌクレオチド置換に基づく配列番号5～11に対し可能な個々の配列を示す。

【 0 0 7 2 】

表1：1文字ヌクレオチド略号

【表1】

A	アデニン	k	G 又は U/T	v	G, A, 又は C
G	グアニン	w	U/T 又は A	b	C, G, 又は U/T
C	シトシン	m	C 又は A	n	A, G, C, 又は U/T
T	チミン	s	G 又は C	y	C 又は T/U
U	ウラシル	h	A, C, 又は U/T		

【 0 0 7 3 】

本明細書に開示した方法に用いられるヌクレオチド配列の例は、互いに相補的な配列を含み、互いに相補的な領域は、いくつかの実施態様では少なくとも約15から300塩基対の2重鎖を、またいくつかの実施態様においては、少なくとも約15～24塩基対の2重鎖を形成する。2重鎖の1鎖は、本出願の核酸分子の核酸配列を有する少なくとも約15連続塩基を有する核酸配列を含む。ある実施例において、2重鎖の1鎖は、15, 16, 17又は18ヌクレオチドを含む核酸配列を含み又は望むならば19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29又は30ヌクレオチドのようなさらに長い配列又は本明細書に記載した核酸配列のどれかの全体長までを含む。このような断片は、容易に、例えば、化学合成による断片の直接合成、核酸増幅技術の応用又は組み換え産生のために選択した配列を組み換えベクターに組み入れることにより合成できる。用語“に対して特異的にハイブリダイズする”とは、その配列が（例えば、全細胞DNA又はRNAのような）複雑な核酸混合物中に存在する場合、ある分子がストリンジェントな条件下で特定のヌクレオチド配列に対して結合、2重鎖形成又はハイブリダイズすることを表わす。



## 【 0 0 7 4 】

用語“部分配列（サブシクエンス）”は、より長い核酸又はアミノ酸配列の或る部分を含む核酸分子又はアミノ酸分子の配列を表わす。配列の例としては、ヌクレアーゼ作用の後成熟miRNAとなるヌクレオチド又はmiRNA前駆体の1本鎖領域を含む、がこれらに制限されない、pri-miRNA又はpre-miRNA（“miRNA前駆体”）の2重鎖領域の部分を含む配列がある。

用語“伸長した配列”は、核酸に取り込まれたヌクレオチド（又は他の類似した分子）の付加を表わす。例えば、あるポリメラーゼ（例えば、あるDNAポリメラーゼ）は核酸分子の3'末端に配列を付加することができる。さらに、ヌクレオチド配列は、プロモーター、プロモーター領域、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、イントロン配列、付加的な制限酵素部位、多重クローニング部位及び他のコード領域などの、他のDNA配列と結合できる。

## 【 0 0 7 5 】

本出願の核酸は、クローン化、合成、組み換え変換、突然変異化可能であり又はこれらの技術の組合せの対象となる。核酸を単離するための標準的組み換えDNA及び分子クローニング技術は、当分野では既知である。例えば、非限定の方法は、Silhavy 他、1984<sup>46</sup>；Ausubel 他、1989<sup>36</sup>；Glover 及びHames、1995<sup>47</sup>；及びSambrook 及びRussell、2001<sup>40</sup>に記載されている。塩基対変化、欠失又は小さな挿入を作り出す部位特異的突然変異化もまた、出版物（例えば、Adelman他、1983<sup>48</sup>；Sambrook 及びRussell、2001<sup>40</sup>）により例示されているように、当技術分野では既知である。

## 【 0 0 7 6 】

I V , miRNA - 発現ベクター

本出願のいくつかの実施態様において、miRNA分子又はmiRNA前駆体分子は、核酸ベクター（あるいは、一般的に“組み換えベクター”又は“発現ベクター”と表される）に挿入された転写単位から発現する。ベクターは、miRNAをコードする核酸分子を筋細胞に運搬し、特定の遺伝子を標的とするために使うことができる。組み換えベクターは、例えば、DNAプラスミド又はウィルスベクターであることができる。様々な発現ベクターが、当分野で既知である。発現ベクターは、発現を希望する細胞種を含むが、これに限定されない、いくつかの因子をベースとして適切に選択される。

用語“ベクター”は、これに連結した他の核酸を輸送できる核酸分子を表わす。ベクターは、連結した核酸の自律的複製及び発現可能なベクターを含む。作動可能に連結した遺伝子の発現をコントロールできるベクターを本明細書では“発現ベクター”と呼ぶ。一般的に、組み換え技術で用いられる発現ベクターは、しばしばプラスミドの形である。しかしながら、本出願は、同等の機能を持ち、これに関してその後当技術分野では既知となった発現ベクターの他の形を含むよう意図している。

## 【 0 0 7 7 】

本明細書で用いられる、用語“発現ベクター”は、適切な宿主細胞中で特定のヌクレオチド配列の発現をコントロールできるヌクレオチド配列を表し、転写終結配列に作動可能に連結した所定のヌクレオチド配列に、作動可能に連結したプロモーターを含む。この用語は、また一般的に、ヌクレオチド配列の正常な翻訳に必要な配列を含む。所定のヌクレオチド配列を含む構築物は、キメラであることができる。この構築物は、また、自然に存在するが、異種発現に有用な組み換え型で得られる物である。ヌクレオチド配列が正常に発現するようデザインされた付加的な全ての配列を含む、所定のヌクレオチド配列は、また“発現カセット”とも表される。

## 【 0 0 7 8 】

本明細書で用いる、用語“異種遺伝子”、“異種DNA配列”、“異種ヌクレオチド配列”、“外因性核酸分子”又は、“外因性DNA部分”は、各々意図した宿主細胞に対して異種由来の配列又はもし同種由来の場合は、元々の形を改変した配列を表わす。従って、宿主細胞中の異種遺伝子は、特定の宿主細胞に対して内因性であるが、改変した遺伝子を含み、改変は、例えば、突然変異剤により又は自然の転写制御配列からの分離による

10

20

30

40

50

。この用語はまた、自然に存在するヌクレオチド配列の多数コピーで生ずる非自然遺伝子を含む。従って、本用語は細胞にとって、異質又は異種のDNA部分又は細胞に対しては同種であるが、ホスト細胞核酸中の、成分が元々見出されるものではない位置にあるDNA部分を表わすことができる。

用語“プロモーター”又は“プロモーター領域”の各々は、コード配列に対し5'に位置し、コード配列転写の制御機能をする遺伝子内のヌクレオチド配列を表わす。プロモーター領域は転写開始部位を含み、さらに、1又は2以上の転写制御要素を含むことができる。いくつかの実施態様において、本出願の方法は、RNAポリメラーゼIIIプロモーターを用いる。

#### 【0079】

“最小プロモーター”は、基礎レベルの転写が行われるために必要な最小要素を持つヌクレオチド配列である。従って、最小プロモーターは、完全なプロモーターではなく、実験系において構築したレポーターの基礎レベルの転写を制御することができるプロモーターの部分配列である。最小プロモーターは、サイトメガロウィルス(CMV)最小プロモーター、ヘルペスシンプレックスウィルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)最小プロモーター、シミアンウィルス40(SV40)最小プロモーター、ヒト-アクチン最小プロモーター、ヒトEF2最小プロモーター、アデノウィルスE1B最小プロモーター及び熱ショックタンパク質(hsp)70最小プロモーターを含むが、これらに限定されない。最小プロモーターは、しばしば1又は2以上の転写制御要素と共に増加して、作動可能に連結した遺伝子の転写に影響する。例えば、細胞型特異的又は組織特異的転写制御要素は、最小プロモーターに付加できて、作動的に連結したヌクレオチド配列の転写を細胞型特異的又は組織特異的に制御する、組み換えプロモーターを作り出す。本明細書で用いるように、用語“最小プロモーター”は、またRNAポリメラーゼIIIプロモーター(例えば、H1, 7SL, 5S又はU6プロモーター)、アデノウィルスVA1プロモーター、Vaultプロモーター、テロメラーゼRNAプロモーター及びtRNA遺伝子プロモーターを含むが、これらに限定されない、本明細書で開示したプロモーターの機能的誘導体を含む。

#### 【0080】

異なるプロモーターは、転写制御因子の異なった組合せである。遺伝子が細胞内で発現しているかいないかと言うことは、遺伝子プロモーターを作り上げる特定の転写制御要素及び細胞の核内に存在する異なる転写要素の組合せに依存する。従って、プロモーターはしばしば、インビボ又はインビトロの機能的活性により、“構成的”、“組織特異的”、“細胞型特異的”又は“誘導的”と分類される。例えば、構成的プロモーターは、有機体の様々な細胞型(いくつかの実施態様において、全ての細胞型)における遺伝子の転写を制御することができるプロモーターである。構成的プロモーターの例としては、ある種の構成的又は“ハウスキーピング”機能をコードする以下の遺伝子に対するプロモーターを含む：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、ジヒドロフォレートリダクターゼ(DHFR; (Scharfmann他、1991)、アデノシンデアミナーゼ、ホスホグリセリン酸塩キナーゼ(PGK)、ピルビン酸塩キナーゼ、ホスホグリセリン酸塩ムターゼ、-アクチンプロモーター(例えば、Williams他、1993参照)及び当業者に既知の他の構成的プロモーター。他方、“組織特異的”又は“細胞型特異的”プロモーターは、有機体のいくつかの組織又は細胞型における転写を制御するが、いくつかの組織又は細胞型において不活性である。組織特異的プロモーターの例としては、本明細書の以下でより詳細に記載するプロモーター及び、当業者に既知の他の組織特異的及び細胞型特異的プロモーターを含む。

プロモーターの文脈で用いると、本明細書で用いる、用語“連結した”は、作動的に連結したヌクレオチド配列の転写を共に制御する、プロモーター因子への物理的な近傍を表わす。

#### 【0081】

本明細書で用いる、用語“転写制御配列”又は“転写制御要素”は各々、制御的転写因子に対して応答できる、プロモーター領域中のヌクレオチド配列を表わす。応答性は、転

10

20

30

40

50

写アウトプットの減少又は増加を含むことができ、また転写制御要素を含むヌクレオチド配列に対する転写因子の結合を介している。いくつかの実施態様において、転写制御配列は、転写終結配列であり、あるいは、本明細書では、転写終結シグナルと表わす。

用語“転写因子”は、転写制御要素及び転写の細胞成分と相互作用することにより、一般的に、遺伝子発現を変化させるタンパク質を表し、RNAポリメラーゼ、転写関連因子(TAF)、クロマチン改造タンパク質及び遺伝子転写に影響する他の関連するタンパク質を含む。

#### 【0082】

#### V. 筋細胞における遺伝子発現を変化させる方法

本出願は、筋細胞における遺伝子発現を特異的に変化させる方法を提供する。いくつかの実施態様において、この方法は、筋細胞と、筋細胞中の遺伝子を標的とするmiRNA又はmiRNAをコードするベクターとの接触を含む。筋細胞中の1又は2以上の特定の遺伝子を標的とすることで、筋細胞の機能又は発生(例えば、分化)を高度に特異的に操作することが可能となる。従って、いくつかの実施態様において、本出願は、さらに、筋細胞と、筋細胞機能又は発生を変化することができる筋細胞中の遺伝子を標的とするmiRNAと接触させることにより、筋細胞機能又は発生を操作する方法を提供する。

いくつかの実施態様において、特定の遺伝子を標的とするmiRNAは、配列番号1~11のいずれかに示された配列と、少なくとも約70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 又は99%相同な配列を有するmiRNAを含む、miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143及びmiR-145(それぞれ、配列番号1~11)から成る群から選択される。

もしあるmiRNAが、あるRNA分子と十分類似したヌクレオチド配列を有し、miRNAとRNA分子が相互作用するに十分な条件下で、このRNA分子の発現を変化させると予期されるならば、このmiRNAは該RNA分子を“標的とする”。いくつかの実施態様において、この相互作用は、筋細胞内で行なわれる。いくつかの実施態様において、この相互作用は、生理的条件下で行なわれる。本明細書で用いるように、用語“生理的条件”とは、この筋細胞が患者又は患者組織の一部であろうと又はこの筋細胞がインビトロで生育しようとするを問わず、筋細胞中のインビボ条件を表わす。従って、本明細書で用いるように、用語“生理的条件”は有機体の一部として又はインビトロでの生育であろうと、筋細胞が曝される条件下で、筋細胞内の条件を表わす。

#### 【0083】

いくつかの実施態様において、標的となる遺伝子は、筋細胞分化遺伝子又は筋細胞増殖遺伝子であり、また発現されると、それぞれ、筋細胞分化及び/又は増殖を変化させることができる。いくつかの実施態様において、標的遺伝子は、筋細胞分化及び/又は増殖を阻害する遺伝子産物を発現することができる。従って、1又は2以上のこれらの分化及び/又は増殖標的遺伝子の発現を、miRNAにより標的として阻害すると、処置した筋細胞の分化及び/又は増殖が増すことができる。本出願の非限定実施態様例において、筋細胞分化遺伝子は、ヒストンジアセチラーゼ4(HDAC4)ポリペプチド又は甲状腺ホルモン受容タンパク質240(TRAP240)をコード化することができ、また筋細胞増殖遺伝子は、血清応答因子(SRF)ポリペプチドをコード化することができる。

1又は2以上の筋細胞分化又は増殖遺伝子の発現を、本明細書に開示したmiRNAの中の1個を用いて、阻害するために標的とすることができる。例えば、miRNA miR-1及びmiRNA-133はそれぞれ特異的にHDAC4及びSRFの3'非翻訳領域を標的とし、またこれらの遺伝子によりコードされる遺伝子産物の発現を阻害する。従って、本出願のいくつかの実施態様において、筋細胞の分化は、筋細胞を、HDAC4をコードする遺伝子を標的とするmiR-1と接触させることにより増加するが、接触によりHDAC4の発現を実質的に阻害し、筋細胞分化を増す。同様に、本出願のいくつかの実施態様において、筋細胞を、SRFをコードする遺伝子を標的とするmiR-133と接触させることにより、筋細胞増殖を増すことができるが、接触によりSRFの発現を実質的に阻害し、筋細胞増殖を増す。

## 【 0 0 8 4 】

## V I . 治 療 方 法

いくつかの実施態様において、本出願は、患者の筋肉損傷を処置する治療方法を提供する。本明細書に開示するように、miRNAは遺伝子を標的とすることにより、遺伝子発現を変化させることができる。特に、筋細胞分化及び／又は増殖を阻害する機能を有する遺伝子産物を発現する遺伝子は、miRNAの標的となり、これらの遺伝子の発現は阻害され、筋細胞分化及び／又は増殖がもたらされる。さらに、miRNA阻害剤は、内因性miRNAを標的とし、特定の遺伝子産物の発現の相対的な増加をもたらす、筋損傷を治療するために有用となる。さらに、miRNA及び／又はmiRNA阻害剤の組合せを筋損傷に共投与することにより、損傷の治癒を最適化することができる。筋細胞分化及び／又は増殖の増加は、損傷した筋組織の治癒上又は失われた筋組織の再増殖の促進上、有用であることができる。

従って、本出願のいくつかの実施態様において、患者の筋肉損傷を治療する方法は、患者の筋肉損傷部位に有効量の、筋肉損傷部位の筋細胞中の遺伝子を標的とするmiRNA、このmiRNAをコードするベクター、miRNAの阻害剤又はこれらの組合せを投与することを含む。

筋肉発生及び比較しうる筋肉増殖及び／又は損傷後の治癒は、段階的に生ずる。代表的な段階としては、未分化筋細胞増殖、その後、筋肉組織中の成熟した細胞への筋細胞の分化が続く。従って、筋肉損傷部位における筋肉組織の修復には、損傷部位への、未分化筋細胞の増殖を促進する、miRNA及び／又はmiRNA阻害剤の良く調整された投与及び損傷部位への、増殖した筋細胞の成熟した機能性筋肉組織への分化を促進する、miRNA及び／又はmiRNA阻害剤の投与が役立つ。

## 【 0 0 8 5 】

本明細書に開示するように、例えば、miR-1及びmiR-133の各々は、骨格筋増殖及び分化を調節する上で別個の役割を果たすと判断された。miR-133はSRFの抑制により筋細胞増殖を促進する。対照的に、miR-1は、筋肉遺伝子発現の転写抑制体である、HDAC4を標的として、筋細胞分化を促進する。従って、本出願の非限定的で、代表的な実施態様において、損傷部位における筋細胞増殖を促進するために、第1時点において、miR-133及びmiR-1阻害剤（例えば、2'-O-メチルmiR-1）を筋肉損傷部位に最初共投与する。次ぎに、第2時点において、miR-1及びmiR-133阻害剤（例えば、2'-O-メチル-miR-133）を筋肉損傷部位に共投与し、増殖した筋細胞の分化を増した。多種のmiRNA及び／又はmiRNA阻害剤の時間的に調整した共投与により、筋肉損傷からの回復をさらに改善することができる。

いくつかの実施態様において、筋肉損傷は、機械的筋肉外傷、筋肉変性疾患、心臓発作又はこれらの組合せに起因する。機械的筋肉外傷は、例えば、筋肉組織が切り取られ又は裂かれる、自動車事故又は刺し傷のような鈍力外傷に起因する可能性がある。例えば、非限定的、筋肉変性疾患としては、筋肉ジストロフィー（例えば、Duchenne筋肉ジストロフィー（DMD））、運動ニューロン疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS））、炎症性ミオパチ（例えば、皮膚筋炎（DM））、神経筋接合部疾患（例えば、重症筋無力症（MG））、内分泌性ミオパシー（例えば、甲状腺機能促進ミオパシー（HYPTM））及び代謝筋肉疾患（例えば、ホスホリラーゼ欠乏症（MPD））がある。例えば、非限定的、心臓発作筋肉損傷としては、心筋梗塞及び心筋再灌流障害がある。

## 【 0 0 8 6 】

いくつかの実施態様において、特定の遺伝子を標的とするmiRNAは、配列番号1～11のいずれかに示された配列と、少なくとも約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%相同な配列を有するmiRNAを含む、miR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143及びmiR-145（それぞれ、配列番号1～11）から成る群から選択される。いくつかの実施態様において、この遺伝子は、筋細胞分化遺伝子（例えば、HDAC4又はTRAP240をコードする）又は筋細胞増殖遺伝子（例えば、SRFをコードする）である。

本出願の治療方法に関しては、好ましい患者は脊椎動物患者である。好ましい脊椎動物は、温血動物である：好ましい温血脊椎動物は哺乳動物である。好ましい哺乳動物は最も

10

20

30

40

50

好ましくは、ヒトである。本明細書で用いるように、用語“患者”は、ヒト及び動物患者を含む。従って、獣医の治療上の使用が、本出願に従って提供される。

#### 【0087】

従って、本出願は、ヒト及びシベリアトラのような絶滅危機にあることにより重要な哺乳動物；ヒトの消費のために農場で飼われている動物のような、経済的重要性を持つ哺乳動物；及び／又はペット又は動物園で飼われている動物のような、ヒトにとって社会的に重要な哺乳動物の治療を提供する。このような動物の例としては以下の動物があるが、これらに制限されない：ネコ及びイヌのような肉食動物；ピッグ、ホッグ及び野生イノシシのような豚；ウシ、雄牛、羊、キリン、シカ、ヤギ、バイソン及びラクダのような反芻動物及び／又は有蹄動物；及びウマ。また、鳥類の治療が提供され、絶滅の危機にある及び／又は動物園で飼われている鳥類の治療及びヒトにとって経済的重要性があるので、ニワトリ、特に家禽、例えば、シチメンチョウ、チキン、アヒル、ガチョウ、ギニア家禽等々が含まれる。従って、また、家畜の治療が提供され、家畜豚、反芻動物、有蹄動物、ウマ（競技用ウマ）、家禽等々が含まれる。

10

#### 【0088】

患者にmiRNA又はmiRNAをコードするベクターを投与する適切な方法としては、全身投与、非経口投与（血管内、筋肉内、動脈内投与を含む）、経口投与、舌下投与、皮下投与、吸入、気管内滴注、外科的埋植、経皮投与、局部注射及び超高速注射／照射等があるが、これらに制限されない。適用可能なところでは、連続輸液は標的部位での薬剤蓄積を促進することができる。

20

本出願に従って使用される投与の特定の様式は、様々な因子に依存し、これらの因子としては、使用されるmiRNA及び／又はベクター担体、治療する健康状態の重篤度及び投与後の活性化化合物の代謝又は除去機構が挙げられるが、これらに制限されない。

#### 【0089】

本明細書で用いる用語“有効量”は、測定しうる生物学的応答（例えば、筋細胞分化及び／又は増殖の増加）を生み出すに十分な治療薬組成物（例えば、miRNA又はmiRNAをコードするベクターを含む組成物）の量を表わす。本出願の治療組成物中の活性化化合物の実際の用量は、特定の患者及び／又は応用に対して、望ましい治療応答を達成するために有効な活性化化合物量を投与するために変わりうる。選択した用量レベルは、様々な因子によって変わり得て、これらの因子としては、治療組成物の活性、処方、投与の経路、他の薬剤又は治療との組合せ、治療すべき健康状態の重篤度及び治療する患者の物理的状态及び病歴が挙げられる。好ましくは、最小容量が投与される、また用量は最小有効量に対して、用量規定毒性なしに増量される。有効用量の決定及び修正及びこのような修正の時期及び方法は、当業者に委ねられる。

30

#### 【実施例】

#### 【0090】

以下の実施例は本出願の様式を説明するために含まれている。本開示と、当業者の一般レベルを考慮すると、当業者は、以下の実施例は例示を意図したもので、無数の変化、修正及び交換を、本出願の範囲を離れることなく、行うことができることを理解するであろう。

40

#### 【0091】

##### 実施例 1

骨格筋増殖及び分化における、microRNA (miRNA) の潜在的関与を理解するために、確立したマイクロアレイ解析<sup>9</sup>を用いて、骨格筋分化の間のmiRNAの発現を解析した。C2C12筋芽細胞株は、培養液から血清が除去されると、筋芽細胞は最終的に分化した管状筋細胞に誘導され得る様に、筋芽細胞がインビトロで忠実に骨格筋分化を模倣するので<sup>10-12</sup>、C2C12筋芽細胞を用いた。分化したC2C12筋芽細胞／管状筋細胞において、検査したmiRNAのある分画の発現は上方制御したことを見出した（図1a及び図6）。分化した筋芽細胞におけるmiR-1及びmiR-133の発現上昇は、ノーザンブロット解析で確認した（図1b及び図7）。

50

## 【 0 0 9 2 】

## 実施例 2

miR-1及びmiR-133は、成体心臓及び骨格筋組織において特異的に発現するが、検査した他の組織では発現しない（図 1 c 及び図 8）。しかしながら、哺乳動物発生における特定miRNAの時間分布については殆ど知られてない。従って、マウス胚及び新生児におけるmiR-1及びmiR-133の発現を調べた。miR-1及びmiR-133は、E13.5及びE16.5胚の発生過程の心臓及び骨格筋において、非常に低レベル発現する（図 1 d 及び図 8）。miR-1及びmiR-133の発現量の増加が、新生児心臓及び骨格筋で観察されたが、なお成体のものより有意に低レベルである（図 1 e 及び図 8）。これらのデータは、大多数のmiRNAは発生過程の比較的后期に発現されるという、zebrafishにおける知見<sup>1 6</sup>と一致する。

10

## 【 0 0 9 3 】

## 実施例 3

miR-1及びmiR-133両者は、マウス第 2 染色体（9 . 3 k b 分離）及び第 1 8 染色体（2 . 5 k b 分離）上に共にクラスターしている（図 9 及び参考文献 1 4）。miR-1又はmiR-133配列を含む～300 b p ゲノム遺伝子プローブを用いて、ノーザンブロット解析を行った（図 9 a ～図 9 e）。第 1 8 染色体由来のmiR-1及びmiR-133プローブは、心臓及び骨格筋から単離した全RNAより～6 k b の単一の最初の転写体を検知し（図 9 b 及び図 9 c）、このことはmiR-1及びmiR-133は実際に共に転写されることを示す。第 2 染色体由来のmiR-1及びmiR-133プローブが心臓及び骨格筋から～10 k b の転写体を検知したが、miR-133プローブはまた～4 . 5 k b 及び～2 . 2 k b の 2 個のさらなる転写体とハイブリダイズした、一方miR-1プローブもまた主要な～6 k b 転写体を検知した（図 9 d 及び図 9 e）、このことは転写後プロセッシングが行われている可能性を示唆する。まとめると、これらのデータは、心臓及び骨格筋特異的miR-1及びmiR-133の発現が最初の転写段階で指令されていることを示す。

20

## 【 0 0 9 4 】

## 実施例 4

第 2 染色体及び第 1 8 染色体miR-1及びmiR-133クラスターの転写を制御する制御要素は恐らく保存されていると推定した。従って、塩基配列解析を行い、第 2 染色体及び第 1 8 染色体両者の上のmiR-1/133クラスターの約 50 k b 上流にある、高度に保存された領域（～2 k b）を同定した（図 10）。第 2 染色体由来のこのゲノム断片を用いて、トランスジェニックXenopus中のdsRedレポーター遺伝子の発現を促進させて、トランス遺伝子の心臓及び骨格筋特異的発現を見出した（図 10）。

30

## 【 0 0 9 5 】

## 実施例 5

骨格筋におけるmiR-1及びmiR-133の機能を検定するために、最初動物細胞中でのmiR-1及びmiR-133の過剰発現を試みた。ノーザンブロット解析及び、miR-1及びmiR-133に対する相補的配列をdsRedコード配列の下流にクローンした、miR-1及びmiR-133 “センサー”<sup>1 7</sup>を用いて、両miRNAの発現と活性をテストし、確認した（図 11 及び非表示データ）。C2C12筋芽細胞にmiR-1及びmiR-133をトランスフェクトし、トランスフェクト後、細胞を増殖培地（GM）中に保つ又は分化培地（DM）に移した。miR-1は、それぞれ、初期及び後期筋発生マーカーであるミオゲニン及びミオシン重鎖（MHC）及びMyoD、Mef2及び骨格筋アクチンを含む、他の筋発生マーカーの発現の増加が示すように、強く筋形成を促進した（図 2 a ～図 2 e、図 2 i、図 2 j 及び表 2）。miR-1は対数期増殖条件（図 2 c）及び分化条件（図 2 , 図 2 d、図 2 e）の両条件に維持された細胞の筋発生マーカー遺伝子発現を誘導した。ホスホヒストン H 3 発現の顕著な減少によりマークされるように（図 2 , 図 2 c、図 2 e 及び表 2）、miR-1により誘導された筋発生分化の加速は、また細胞増殖の減少を伴う。特に注意すべきことは、骨格筋細胞において内因的に発現しないGFPコントロール又はmiR-208の過剰発現は、効果を示さないのので、miR-1誘導の筋形成は特異的である（図 2 a ～図 2 e）。さらに、miR-1 “シード” 配列に導入された突然変異は、筋発生遺伝子発現の活性化能を失う（図 2 d ～図 2 e）。これに対し、miR-133の過剰

40

50

発現は、ミオゲニン及びMHCの発現を抑制し（図2 a～図2 e 及び表2）、また筋芽細胞増殖を促進する（図2 c～図2 e 及び表2）。対照は効果が無く、また導入した突然変異は、miR-133の機能を除去したので、再び、miR-133の筋芽細胞増殖への効果は特異的である（図2 a～図2 e、図2 j）。

【0096】

miR-1およびmiR-133過剰発現とノックダウンの、筋細胞の増殖および分化への効果

処理	DM (8 hr)		DM (12 hr)		DM (24 hr)					
	ミオゲニン ポジティブ 細胞	対照に対する 相対値	ミオゲニン ポジティブ 細胞	対照に対する 相対値	ホスホ-H 3ポジティブ 細胞	対照に対する 相対値	ミオゲニン ポジティブ 細胞	対照に対する 相対値	MHCポジ ティブ細胞	対照に対する 相対値
GFP	172	100%	93	100%	135	100%	118	100%	137	100%
miR-1	206	121%	230	247.3%	93	68.9%	251	212.7%	76	55.5%
miR-133	89	51.7%	68	73.1%	168	124.4%	93	78.8%	201	146.7%
2'-O-メチ ル-GFP	146	100%	145	100%	172	100%	348	100%	207	100%
2'-O-メチ ル-miR-1	120	82.2%	98	67.6%	214	124.4%	299	85.9%	283	136.7%
2'-O-メチ ル-miR-133	205	140.4%	211	145.5%	107	62.2%	498	143.1%	191	92.3%
									44	200%

C2C12筋芽細胞に、miRNAの機能を阻害すると報告されている<sup>18-19</sup>、miR-1又はmiR-133に対しアンチセンス2'-O-メチル阻害オリゴ（又は対照GFP及びmiR-208）をトランスフェクトするという逆の実験も行った。miR-1阻害剤をトランスフェクトした細胞は



、筋発生マーカーの減少及びホスホヒストンH3の増加で示されるように、筋形成の阻害及び筋芽細胞増殖阻害を示した(図2f~図2i及び表2)。筋芽細胞増殖及び分化の阻害におけるmiR-133の役割と一致して、miR-133の阻害により、筋形成は促進し、細胞増殖は阻害されるという、逆の効果を引き起こした(図2f~図2j及び表2)。これに反して、対照2'-O-メチル阻害剤は効果がなかった(図2f~図2j)。上記の結果からの結論は、miR-1及びmiR-133は、骨格筋増殖と分化において別個の働きを有するということである:miR-1は筋芽細胞分化を促進するのに対し、miR-133は筋芽細胞増殖を促進する。

【0098】

#### 実施例 6

miR-1及びmiR-133の両者が、大部分の動物種、Drosophilaからヒトまでに存在することは、進化の過程で保存されていることを示唆する。miR-1及びmiR-133のインビボの骨格筋及び心臓発生に対する効果をテストするために、XenopusにおけるmiR-1及びmiR-133のコピーを同定し、誤発現によりこれらの機能を検査した。1細胞期にmiR-1を導入すると、非注入又はmiGFP注入対照と比較して、劇的に軸柱の短縮、前部構造の減少及び背面腹部軸に沿う体長の増加が生じた( $n > 45$ , 独立した2実験)(図3)。miR-1注入胚において体節は形成したが(図3)、抗体染色全組織標本及び連続切片から、組織は非常に無秩序化し、分節した構造に発生することができなかった(図3e、図3f、図3j)。心臓組織は、組織学的、トロポミオシン染色(図3f、図3j)及び心臓アクチン染色により検査すると、完全に欠如する。これらの欠陥に加えて、ホスホヒストンH3染色の劇的な減少が見られ(図3i~図3k)、このことは、筋細胞増殖及び分化の制御上におけるmiR-1の本質的役割と一致する。miR-133の誤発現もまた、前部構造の減少及び体節発生の欠陥をもたらすが、miR-1と比較して、前部後部長の減少は小幅であり、胚体欠陥は、体節形成が欠ける胚のより後部又は前部の外観において特に重篤である(図3g、図3h)。さらに、miR-133胚において、非常に無秩序で、心臓系蹄又は心室形成を欠くが、心臓組織はしばしば形成される(図3g、図3h、図3k)。まとめると、これらのデータによると、正常な骨格筋及び心臓発生のためには、miR-1及びmiR-133の正しいタイミング及びレベルが必要である。

【0099】

#### 実施例 7

HDAC4は、その3'UTRに2個の自然発生の推定miR-1部位を有し、これは脊椎動物種において進化上保存されている(図12)。同様に、哺乳動物SRF遺伝子の3'UTRに、2個の保存されたmiR-133結合部位が存在し(図12)、これはインビボ及びインビトロの筋肉増殖及び分化に重要な役割りを演ずることが示されている<sup>11, 24, 25</sup>。

マウスSRF及びHDAC4の3'UTRをルシフェラーゼレポーター遺伝子に連結し、これらの構築物をトランスフェクションコントロールにより哺乳動物細胞にトランスフェクトした。miR-1の異所性過剰発現により、HDAC4 3'UTRルシフェラーゼレポーター遺伝子は抑制され、他方、miR-133はSRF 3'UTRルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を阻害した(図4a)。これに対し、miR-1又はmiR-133“シード”配列に導入した突然変異により、このような抑制は除去され、作用の特異性を示す(図4a)。

【0100】

上記レポーターをC2C12筋芽細胞にトランスフェクトし、細胞分化の前後にルシフェラーゼ活性を測定すると、レポーター活性は、分化した細胞で劇的に抑制されていることが分かり(図4b)、内因性miR-1及びmiR-133のレベルが上がると、レポーター遺伝子を抑制することを示す。内因性miR-1及びmiR-133の効果及び特異性は、miRNA“センサー”によりモニターした(図11)。これに対し、筋肉分化の指示薬であるMCK-lucレポーターのルシフェラーゼ活性は分化した筋細胞で増加した(図4b)。さらに、miR-1の過剰発現は、増殖条件(図4c)及び分化条件(図4e)におけるC2C12細胞中の内因性HDAC4タンパク質の下方制御をもたらしたが、他方miR-133は、内因性SRFタンパク質の発現を抑制した(図4c、図4e)。これに対し、SRF及びHDAC4のmRNAレベルは、これらのmiRNAにより変わらなかった(図4d)ので、miRNAは主に翻訳を阻害することにより、これらの

標的遺伝子の機能を抑制するという考えを支持する。miR-1又はmiR-133に対してアンチセンスな2'-O-メチルオリゴを適用すると、これらは、mRNAレベルへの効果なしに(図4 f)、それぞれHDAC4又はSRFのタンパク質レベルに働いた抑制を除去した(図4 g)。

#### 【0101】

HDAC4及びSRFが、骨格筋遺伝子発現を調節する上で、miR-1又はmiR-133の同系の標的であることを重ねて証明するために、SRF又はHDCA4を発現するプラスミドのコトランスフェクションがmiRNAを介した筋形成を“抑制”するかどうかテストした。実際、図4 hに示すように、筋発生遺伝子のmiR-133により誘導された抑制は、SRFの過剰発現により部分的に逆転した。一方、HDAC4は、miR-1の骨格筋遺伝子発現への効果を弱めた(図4 h)。

#### 【0102】

miR-1及びmiR-133依存的骨格筋増殖及び分化へのHDAC4及びSRFが潜在的に関与することに一致して、内因性HDAC4及びSRFタンパク質レベルは筋原性分化マーカーの発現上昇及び細胞分裂指標マーカーであるホスホヒストンH3発現の減少を伴い、分化したC2C12細胞において下方制御された(図4 i及び図7 d)。SRF及びHDAC4タンパク質の発現レベルの減少は、miR-1及びmiR-133の発現上昇を伴った(図4 iと図1 bを比較)。まとめると、これらのデータから、miR-1及びmiR-133は、それぞれ特異的にHDAC4及びSRFタンパク質レベルを抑制し、そのことは逆に、これらのmiRNAの筋芽細胞増殖及び分化を調節する効果に(少なくとも部分的に)寄与することが分かる。

#### 【0103】

心筋及び骨格筋特異的miR-1及びmiR-133が特徴付けられ、骨格筋増殖と分化を調節するこれらの機能が示された。重要なことに、同一染色体上にクラスターし、また単一転写物として同時に転写される、miR-1及びmiR-133は、異なる標的遺伝子を阻害することで達せられる明確な生物的功能を持った、2個の独立した、成熟miRNAとなることが分かった。このことは、複雑な分子機構にmiRNAが関与することを示す。興味あることに、miR-1及びmiR-133の組織特異的発現はmyoD及びSRFにより調節されるが<sup>8</sup>、SRF発現は、miR-133で抑制されることである。従って、これらの知見はmiRNAが細胞増殖及び分化を調節する調節経路に関与する、ネガティブ調節ループを明らかにする。

#### 【0104】

##### 実施例1～7の材料と方法

##### マイクロアレイによるMicroRNA発現の解析

全RNAを、10%仔牛胎児血清(FBS)(Sigma)及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.)を添加したDulbecco改変Eagle培地(DMEM)(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.)から成る増殖培地(GM)中又は、2%ウマ血清(Sigma)を添加した

DMEM(Sigma)から成る分化培地(DM)で培養したC2C12細胞より、異なる時点で(DMに移した最初の日を0日目とカウントし、0.1.3.及び5日目)単離した。マイクロアレイハイブリダイゼーションは記載されているように行い、データ解析した<sup>9</sup>。要約すると、2.5 µg単離RNAを、RNAリガーゼを用いて5'-リン酸-シチジルウリジルCy3-3'(Dharmacon, Inc., Lafayette, Colorado, U.S.A)で標識し、ALEXA647(R)(Cy5)(Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A)で標識した124microRNAに対してオリゴヌクレオチドプローブの0.5 mM混合物とディスプレイチップ(MJ Research, Reno, Nevada, U.S.A.; パート数 SLF-0601)の中でハイブリダイズした。正規化した自然対数データを遺伝子により階層的にクラスター化しヒートマップとしてプロットした。シグナルの範囲は、-4倍から+4倍であった。黄色は培地と比べた高発現を示し、また青色は低発現を示す。

#### 【0105】

##### ノーザンブロット解析

全RNAをC2C12細胞、マウス胚又は成体組織より、TRIZOL(R)試薬(Invitrogen)を用いて単離した。miRNAのノーザンブロット解析のために、PEGを用いて、サイズの大きなRNAを除いた。要約すると、30 µgの各全RNA試料を5 x PEG溶液と1:1で混合し、氷上に

10

20

30

40

50

10分間置いた。10分後、4 で、最高速度で遠心し、上清を新チューブに移した。次に、RNAを2.5容量の100%EtOHを加えて沈殿させ、30分、最高速度で遠心した。miRNAに対するノーザンブロット解析は、記載のように行った<sup>1 3</sup>。プローブとして用いたmiR-1及びmiR-133オリゴヌクレオチド配列を表3に示した。ノーザンブロット解析はmiRNAの初期の転写体を検出するために用い、各試料から20 µg全RNAを用いて、記載のように行った<sup>2 8</sup>。miR-1及びmiR-133に対するゲノム断片は、PCRでクローン化し、プローブとして用いた。

【0106】

【表3】

10

# 本明細書で開示したオリゴヌクレオチドの配列

名前	配列
miR-1 probe	TACATACTTCTTTACATTCCA
miR-133 probe	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAA
miR-133a-1-up	CATGTGACCCCTCACACACA
miR-133a-1-down	ACAAGGGGAGCCTGGATCCC
miR-133a-2-up	GGACATATGCCTAAACACGTGA
miR-133a-2-down	GAAACATCTTTATCCAGTTT
miR-1-2-up	AGACTGAGACACAGGCGACACC
miR-1-2-down	TGCCGGTCCATCGGTCCATTGC
miR-1-1-up	CACTGGATCCATTACTCTTC
miR-1-1-down	TTGGAATGGGGCTGTAGTA
miR-1mut-up	TGAACATTCACTGCTATAAAGAAGTATGTATTTGGGTAGGTA
miR-1mut-down	TACCTACCCAAATACATACTTCTTTATAGCACTGAATGTTCA
miR-133mut-up	AATCGCCTCTTCAATGGATTGTCAACCAGCTGTAGCTATGCATTGAT
miR-133mut-down	ATCAATGCATAGCTACAGCTGGTTGACAAATCCATTGAAGAGGCGATT
miR-1 duplex	UGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUACAUUCCAUA
miR-1-mut duplex	UUAACCAUAAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUUAUGGUUAAUA
miR-133 duplex	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGGGGACCAAU
miR-133-mut duplex	UCAAGUAACUUAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGUUACUUGAAU
miR-208 duplex	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU AAGCUUUUUGCUCGUCUUAUAC
GFP duplex	AACUUCAGGGUCAGCUUGCCUU GGCAAGCUGACCCUGAAGUUGG
2'-O-methyl-miR-1	AAAUACAUACUUCUUUACAUUCCAUAGC
2'-O-methyl-miR-133	AGCUACAGCUGGUUGAAGGGGACCAAUCCA
2'-O-methyl-miR-208	GACCAACAAGCUUUUUGCUCGUCUUAUACGUG
2'-O-methyl-GFP	AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
HDAC4-UTR-up	CAGCACTGGTGATAGACTTGG
HDAC4-UTR-down	CTTAAGAATAAGTTCAATAAGAC
SRF-UTR-up	AGATATGGGGGCTTGTGCCC
SRF-UTR-down	CTGGGAGAAAGGGGGTAGAC
Myogenin F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC
Myogenin R	TGGACAATGCTCAGGGGTCCC
MyoD F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC
MyoD R	TGCAGTCGATCTCTCAAAGCACC
Skeletal α-actin F	CAGAGCAAGCGAGGTATCC
Skeletal α-actin R	GTCCCCAGAATCCAACACG
MEF2D F	CAAGCTGTTCCAGTATGCCAG
MEF2D R	AAGGGATGATGTCACCAGGG
HDAC4 F	GAGAGAATTCTGCTAGCAATGAGCTCCCAA

20

30

40

50

## 【 0 1 0 7 】

miR-1及びmiR-133のクローニングと発現

マウス第2番染色体及び第18染色体(c h 2 及び c h 1 8 )由来のmiR-1及びmiR-133前駆体にたいするゲノム断片は、マウスゲノムDNAを鋳型(PCRプライマーについては、上記表3を参照)として用い、PCR増幅した。PCR産物は、pcDNATM(+)<sup>3</sup> . 1ベクター(Invitrogen)にクローン化し、miRNAの発現は、発現ベクターを哺乳動物細胞(COS7、10T1/2又はC2C12)にトランスフェクトして測定し、ノーザンブロット解析で検知した。

## 【 0 1 0 8 】

細胞培養、インビトロ筋形成分化及びルシフェラーゼレポーター検定

記載<sup>1 2</sup>のように、C2C12筋芽細胞を培養し、また筋形成を誘導した。一時的トランスフェクション=ルシフェラーゼレポーター検定は記載<sup>1 2</sup>、<sup>2 6</sup>のように行った。miRNA二重鎖及びmiR-1、miR-133、miR-208 及びGFPに対してアンチセンスな2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチドは、Dharmacon(配列については表3参照)より購入した。これらは、哺乳動物細胞中にLIPOFECTAMINE<sup>TM</sup>(Invitrogen)トランスフェクション(200nM)又はAmaya Biosystems(Gaithersburg, Maryland, U.S.A.) NUCLEOFECTOR(R)システム(5mg)を用いて電気穿孔により導入した。

3'-UTRルシフェラーゼレポーター構築のために、pGL3-対照ベクター(Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A.)の多重クローニング部位を取り除き、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に置いた。マウスHDACV4及びSRFの3'UTRは、PCR増幅し、改変したpGL3対照ベクターにクローン化し、構築物SRF-3'UTR 及びHDAC4-3'UTRを得た(PCRプライマー配列については表3を参照)。ルシフェラーゼレポーター検定は、記載<sup>2 6</sup>のように行った。

## 【 0 1 0 9 】

ウェスタンブロットと免疫染色

ウェスタンブロットは既に記載<sup>2 7</sup>のように行った。以下の抗体を用いた:抗ミオゲニン; SRF; MEF2; HDAC4; 及びb-チューブリン(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, U.S.A.); 及びホスホヒストン H3(Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, U.S.A.)。筋繊維のある筋肉特異的MHCを認識する、MF20抗体は、DSHB(University of Iowa, Iowa City, Iowa, U.S.A)より得た。

免疫染色のために、12ウェルプレート中の処理したC2C12細胞を4%ホルムアルデヒドで、5分間、37℃で、固定し、その後0.1% NP40/PBS溶液に15分間、RTで移した。一次抗体は、3%BSAを含む0.1% NP40-PBS中で2時間次の濃度でインキュベートした:抗ミオゲニン(1:200希釈)、抗ホスホヒストンH3(1:100希釈)、MF20(1:10希釈)。二次抗体フルオレッセイン抗マウス/ラビット(1:1000希釈; Vector Laboratories, Burlingame, California, U.S.A.)は、3%BSAを含む0.1%NP40-PBSに、1時間、37℃で加えた。DAPIを室温で、5分間加えた。PBSで数回洗浄後、細胞を蛍光顕微鏡観察に付した。全ウェルをカバーする10視野を拾い、緑色蛍光ポジティブ細胞及びDAPI染色の全細胞を各ウェル毎にそれぞれ計数した。

## 【 0 1 1 0 】

RT-PCR解析

RT-PCRは、本質的に記載<sup>2 7</sup>に従って行った。全RNAをC2C12細胞からTRIZOL(R)試薬(Invitrogen)を用いて単離し、2,0µg分量をランダムヘキサマー及びMMLV逆転写酵素(Invitrogen)を用いて、cDNAに逆転写した。各場合、増幅のために2.5% cDNAプールを用い、PCRを24~28サイクル行った。PCRプライマーの配列は、表3に見出すことができる。

## 【 0 1 1 1 】

Xenopus胚注入及びトランスジェネシス

Xenopus laevis胚の取得及び培養のために、標準的手法を用いた。DNA構築物をKpnIにより線型にし、トランスジェニック胚をKroll & Amaya<sup>2 8</sup>に記載された方法に従い作成した。。トランスジーンの発現は、Leica MZFLIII顕微鏡下で解析した。miRNAの調整及び

10

20

30

40

50

Xenopusへの注入は、実質的に既述<sup>2 9</sup>のように行った。しかしながら、RNAは注入前にキャップしなかった。免疫組織全標本解析は、記載<sup>3 0</sup>のように行った。

#### 【0112】

##### 実施例 8

miR-208は、ヒト、マウス及びラット間で保存されている心臓特異的miRNAである（図14）。ノーザンブロット解析により、miR-208発現は、発生的に調節されていることが分かった（図15）。ノーザンブロットは、ステージの決まったマウス組織から調整し、miR-208に相補的な放射性標識したプローブで探知した。miR-208レベルは、E13.5、E16.5及び新生期心臓と比較し成体マウス心臓において顕著に高かった。miR-208は、心筋 - ミオシン重鎖（ $\beta$ -MHC）遺伝子のイントロンをホストとしている（図14）。2個の心筋重鎖イソ型の一つ、 $\beta$ -MHCはマウス発生過程で弱く発現するが、その後、成体マウス心臓では、支配的なイソ型になる。miR-208及び $\beta$ -MHCは、共に、心臓特異的であり、また逆鎖から転写され、このことは、miR-208は $\beta$ -MHCイントロンから処理された物であり、 $\beta$ -MHC転写と並行して発現されることを示唆する。

10

#### 【0113】

##### 実施例 9

心筋細胞におけるmiR-208のインビトロ機能を調べるために、新生児ラット心筋細胞を選んだが、その理由は、この細胞は心臓細胞の形態学的、生化学的及び電気生理学的特徴の研究のために良く特徴の分かったインビトロモデルであるからである。新生児胃心筋細胞は、誕生後の複製能を失わず；大多数が細胞分裂を行いまたインビトロ及びインビボで増殖し、心臓遺伝子発現もまた活性化している。miR-208は、初期の発生段階に比べて成体心臓で高く発現しているので、心筋細胞分化を促進すると思われる。心臓におけるmiR-208機能を測定するために、このモデル系が心筋形成プログラムへのmiR-208発現及び阻害の効果を研究するために用いられた。

20

#### 【0114】

##### インビトロモデル系

培養心筋細胞は、心臓研究において、最も広く用いられる実験モデルの一つである。小哺乳動物より心筋細胞の調整は、全動物研究と比較して経済的であり、信頼性があり、また幅の広い実験が可能となる。経済的及び技術的理由から、心筋細胞は新生児ラットより最も普通に分離される。ラット心筋細胞は、小さな修正を伴い、本質的に既述の記載<sup>8 6</sup>通り行った。

30

機能的、成熟したmiRNAは、miRNA前駆体配列プラス隣接した $\sim 150$ ヌクレオチドの転写を制御するRNA Pol IIIプロモーター配列を用いて、異所的に発現することができる。得られたRNA転写物は、miRNAプロセスマシーンに認識され、翻訳抑制を調節できる完全に機能的なmiRNAとなる。miR-208前駆体配列及び隣接領域をマウスゲノムDNAからPCR増幅し、この断片をアデノウィルスベクターに挿入し、miR-208を発現する組み換えアデノウィルスを得た（Ad-208）。ノーザンブロット解析により、単離し、Ad-208の濃度を上げながら感染させた、心筋細胞中でmiR-208発現が用量依存的に増加することが分かった（図16）。この道具を、インビトロでの心筋表現形質に対するmiR-208過剰発現の効果の研究のために用いることができる。

40

#### 【0115】

##### 異所性miR-208発現の解析

miR-208発現の変化が増殖に効果を持つか調べるために、細胞計数検定を行った。心筋細胞を低密度でプレートし、Ad-208を感染させた。心筋細胞研究において、アデノウィルスは大きな成功を伴って、頻繁に用いられているが、アデノウィルス感染により引き起こされる間接効果をコントロールするために、細胞をAd-208と同じ感染多重度（MOI）のAd-GFPで感染させた。両ウィルスは緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するので、感染効率は落射蛍光顕微鏡によりコントロールした。

細胞は感染前及び感染後24, 48, 72及び96時間後明視野下で計数した。10視野の細胞を、各時点、両条件について、計数した。細胞計数データに統計解析を適用した

50

。視野当たり計数した細胞数の平均値が、各時点で、Ad-208及びAd-GFP感染間で、有意に異なる確率をStudent 片側 t - テストを用いて決定し、一方、Student ペア t - 検定により、各感染に対して計数した細胞数平均値が、各時点間で有意に異なる確率を決定した。どの両平均値でも有意に異なる確率が、95%以上又は95%に等しいならば、これらの差異は有意であると考えられる。

#### 【0116】

細胞計数検定は、ホスホヒストンH3抗体を用いた細胞分裂指数の決定及びBrdU取り込みによるDNA合成する細胞の割合決定の研究で補完された。miR-208過剰発現が細胞死を引き起こす可能性を排除するために、固定した細胞をTUNEL染色した。心筋細胞増殖に対するAd-208感染の結果の可能性は、細胞数の減少、増加又は不変である。理論により制限されなければ、miR-208は通常分化した成体心筋細胞で高度に発現しているので、miR-208発現は、対照に比べてゆっくりとした心筋増殖を示す可能性がある。

Nkx2.5、MEF2C、GATA4、ミオカルジン及びTBX5を含め1セットの心臓転写因子は、初期分化しつつある心筋細胞において発現しており、これらを心臓分化の初期遺伝子マーカーにしている。 -MHC、 -MHC、 -CA及びMLV2Vのような心筋特異的収縮性タンパク質は、心筋細胞の最終分化マーカーである。これらの心臓遺伝子の幾つかは、発生過程で区別を付けて調節されている。例えば、 -MHCは胚心臓において高度に発現されているが、新生後、下方制御される、これに対し -MHCは、反対の発現パターンを持つ。心臓遺伝子発現調節に、miR-208が役割を果たしているか調べるために、新生児ラット心筋細胞における心臓マーカー遺伝子発現の調節に対して、異所性miR-208発現が効果を持つか調べた。理論により制限されることなしに、miR-208発現は胎児遺伝子発現を減少させる及び/又は成体心臓遺伝子の発現を促進することが予想される。

#### 【0117】

半定量的逆転写PCR (RT-PCR) 法を用いて、Ad-208対Ad-GFP感染新生児ラット心筋細胞における様々な心臓マーカー遺伝子のmRNA転写物レベルの相対値を解析した。cDNAライブラリーは、従来の技術を用いて感染心筋細胞から単離したRNAから作成した。殆ど全ての組織で大量に発現するGAPDHを増幅し、cDNAレベルを正規化するために用いた。全てのPCRプライマーセットは、1又は2以上のイントロンをカバーする産物を増幅するように設計したが、この産物は、もしコンタミネートしたDNAが在るならば、より長いPCR増幅産物を作ることができる。さらに、購入可能な抗体を用いて、様々な心臓マーカーのタンパク質発現レベルを、ウェスタンブロット解析を用いて、調べたが、これは、タンパク質発現レベルに何らかの変化がある場合、mRNA転写レベルと対応するかどうか調べるためである。

miR-208の心臓遺伝子発現への効果の研究に加えて、転写因子及び構成成分を含む様々な心臓タンパク質の局在性に対する何らかの影響が在るか調べた。Ad-208感染心筋細胞の観測によると、これらの細胞は、Ad-GFP感染心筋細胞と異なる形態を示すことが示唆された(図16b)。Ad-208感染心筋細胞は、Ad-GFP感染心筋細胞と比べて“丸形”のようである。

Ad-208及びAd-GFP感染心筋細胞を、ガラスカバースリップ上で固定し、適切な一次抗体及び2次抗体でプローブし、核染色し、顕微鏡分析のためにスライドに取り付けた。

#### 【0118】

##### miR-208不活性化

miR-208過剰発現研究と並行して、miR-208に対してアンチセンスな2'-O-メチルオリゴヌクレオチドを用いたmiR-208阻害効果を研究した。2'-O-メチルオリゴヌクレオチドは、miRNA機能の配列特異的及び不可逆的阻害剤として、化学量論的に、働く。このmiRNA阻害系を心筋細胞に適用した。アンチセンスmiR-208 2'-O-メチルオリゴヌクレオチド又は、対照として、ランダム2'-O-メチルオリゴヌクレオチドを、カチオン性脂質試薬又は、代わりとして、電気穿孔により、心筋細胞にトランスフェクトした。アンチセンスmiR-208配列を直接ルシフェラーゼ遺伝子の3'に結合して構築したレポーター (luc-miR-208 - センサー) を対照として用いて、miR-208機能を阻害するための系の有効性をテストした。mRNA及びタンパク質レベル及びタンパク質局在性を、miR-208過剰発現研究に記

載した様に研究した。

【0119】

#### 実施例 10

miR-208は肺心臓において弱く発現し、この発現は、成体心臓において劇的に増加する。本実施例において、miR-208機能は、心臓発生において又は成体心臓において、どちらの遺伝子調節により重要であるか解析した。胚においてmiR-208は弱く発現するので、発生過程において、miR-208は、重要でないように見えると主張できるかも知れない。この主張に反して、発生過程において、ある遺伝子過程を調節するためには、正確なmiR-208用量が決定的であるかも知れない。さらに、成体段階と比較して発生過程で弱く発現するホスト遺伝子  $\beta$ -MHCのノックアウトマウスは、miR-208の発現がこれらの動物に影響を及ぼすか否か知られてないが、胚期致死性である<sup>8 7</sup>。成体心臓において検知されたmiR-208の高発現は、この遺伝子の重要な機能は発生後期であることを示すかも知れない。この種の問題を片づけるために、miR-208機能の研究のために2種のマウスモデルを作成した：miR-208ノックアウトマウス及び条件付でmiR-208を過剰発現するトランスジェニックマウスである。

10

【0120】

#### miR-208ノックアウトマウスのデザイン

miR-208について機能的にゼロであるマウスをデザインし、このホスト遺伝子  $\beta$ -MHC発現に影響なく作成する。miR-208ノックアウトマウス由来の胚幹細胞の作成は、3段階過程である：標的を狙うベクターの作成；相同組み換えによる胚幹細胞へのDNA配列の導入；及び胚幹細胞由来の遺伝的に改変したマウスの作成である。関係するmiRNAは、シード領域の配列相同性によりファミリーにグループ分けする。これらのファミリーは、インビボにおけるこれらの遺伝子解析を複雑にする可能性のある、同一遺伝子の発現を重複して調節するであろう。miR-208のシード領域は、他の既知のmiRNAと、系統樹においてクラスターせず、miR-208を適切なmiRNAノックアウト候補としている。

20

miR-208を標的とする構築物は、線型DNA断片と環状プラスミドの間の相同組み換えを用いる<sup>8 8 , 8 9</sup>、リコンビニアリングと呼ばれる方法を用いて作られる。環状プラスミドは、内部にmiR-208が確かに存在する、 $\beta$ -MHC遺伝子の6~7 kb断片を含むことができる。線型DNA断片は、22 ntのmiR-208配列をloxPに挟まれた(floxed)選択カセットで置き換えるようデザインした2本の相同的アームを含む。環状プラスミドで形質転換したバクテリアに線型DNA断片を電気穿孔し、その後、線型断片によりコードされた抵抗性を用いて、組み換えコロニーを選択する。得られた構築物を、相同組み換えによりES細胞を標的とするために用いる。PCRベースのスクリーニング又はサザンブロッティングを用いて、異形接合のES細胞が同定できたら、胚盤胞注入によりキメラを作るために用いる。今回開示したノックアウトデザインは、 $\beta$ -MHCのイントロン内の外因性DNAの小さなフットプリントしか残さず、 $\beta$ -MHCの転写又は $\beta$ -MHC mRNAのスプライシングパターンは、影響を受けず残ることを保証する。

30

【0121】

#### 条件付トランスジェニックマウスデザイン

条件付トランスジェニックマウス法を図17に図示した。条件付トランスジェニックアプローチは、2個のトランスジーンを含む2成分系である。一方のトランスジーンは、miR-208(tet208)をコードし、他方のトランスジーンは、そのプロモーター内の調節配列と結合することによりmiR-208トランスジーンを活性化する、トランスアクティベータ(tTA)をコードする。tTAの結合は、ドキシサイクリン(DOX)が存在する時は常に阻害され(即ち、“tet-オフ”)、従って、DOX処理により、miR-208トランスジーンの一時的調節を可能にする。

40

miR-208トランスジーンに対しホモ接合のマウスコロニーを確立する。tet208マウスは、tTAトランスジーンを含むトランスジェニックマウスと掛け合わせ、研究のための二重トランスジェニックを作成する。メンデル遺伝を仮定すると、4子孫の中の1子孫は、二重トランスジェニックであり、またtTAが発現するところではどこでもmiR-208を発現する。

50

tTA発現を調節するために、 $\beta$ -MHCプロモーターを用いる。 $\beta$ -MHCプロモーターは、良く特徴付けられており、また初期発生において組織特異的発現を正しく調節するに充分である<sup>9 0</sup>。tTAを発現させるための $\beta$ -MHCプロモーターの使用は、内因性miR-208は通常 $\beta$ -MHC遺伝子内のイントロン由来であるので、二重トランスジェニック動物における内因性miR-208のように、同じ組織中のmiR-208量を増加させる。tTA発現を調節するためにマウス $\beta$ -MHCプロモーターを使用する、トランスジェニックマウス系統は、存在し、成功裏に、使用されてきた<sup>9 1, 9 2</sup>。tet208トランスジェニックマウス系統は、発生過程の胚又は成体マウス心臓、において独立にmiR-208発現の用量効果の研究を可能にする。通常のトランスジェニックマウスにおける初期胚致死性は、研究のために利用可能な発生過程で停止した胚の数を非常に制限し、また表現形質解析を妨げる。条件付方法により、二重トランスジェニックマウスにおける、初期のmiR208過剰発現は致死性と証明されたので、miR-208トランスジェニック発現を遅らすことができる。

10

#### 【 0 1 2 2 】

##### 解析

特異的な解析は、表現形質がどの様に現れるかに依存する。一般的に、発生過程の胚及び/又は成体における潜在的表現形質を特徴付けるために、組織学的及び生化学的研究方法が受け入れられる。心臓は、全体の異常について吟味され、より微妙な発生的欠陥を同定できるように組織学的解析のために切片にされる。欠陥の可能性は、無数にあり、中隔形成の欠陥から心房の肥厚まで全てが含まれる。表現形質は、電気生理学的に特徴付けられる、収縮性の欠陥でもあり得ると言うことも同様に可能である。

20

#### 【 0 1 2 3 】

##### 実施例 1 1

miR-208の直接の分子標的の同定は、生物機能に内在する機構を理解することを容易にする。標的の予想は、インビトロ及びインビボマウスモデルにおけるmiR-208機能の研究に関係する補足的観察に使われる。

理論に制約されることなく、Thrap1発現はmiR-208により調節されると仮定する。Thrap1の3' UTRには、2個の予期したmiR-208結合部位が含まれる(図18)。2個の標的は、Thrap1終止コドンの~80bp下流に位置し、互いに~50bpのみ隔てられている。両標的は、miR-208のシード領域と完全に相補的である。このThrap1遺伝子は、遍在的に発現する<sup>9 3</sup>、TRAP(甲状腺ホルモン受容体タンパク質)複合体の240kdサブユニットをコードしている。TRAPは、核受容体のコアアクチベーターである、多サブユニットタンパク質の複合体である。TRAPは最初、甲状腺ホルモン核受容体として特徴付けられた<sup>9 4</sup>。Thrap1は特徴付けられてないが、他のTRAPサブユニットを欠くと核受容体シグナリングに影響を与えることが示された。マウスにおけるTRAP220の遺伝子除去は心臓及び神経系発生を損ねるが、TRAP230及びTRAP240のDrosophila相同体は正常な複眼・触角原基発生のために要求される<sup>9 5, 9 6</sup>。Trap2と呼ばれる、Trap1に非常に類似した遺伝子の突然変異が、先天性心臓欠陥である大動脈転位<sup>9 7</sup>の患者に発見された。従って、TRAPファミリーメンバーは、正常な発生にとって重要である。特に興味のあることは、甲状腺ホルモンは心臓収縮性に非常な効果を有するので、miR-208の標的としてのThrap1である。

30

#### 【 0 1 2 4 】

甲状腺ホルモンは、心筋イソ型切り替えとリンクしている。心筋細胞において、甲状腺ホルモンは、同時に $\beta$ -MHC発現を阻害しつつ<sup>9 8, 9 9</sup>、 $\beta$ -MHC mRNAの急速な蓄積をひきおこす。いくつかのポジティブに作用する甲状腺応答因子(TRE)は、 $\beta$ -MHCプロモーター内に局在し、ネガティブに作用する半TREは $\beta$ -MHCプロモーター内に局在することが同定された<sup>1 0 0, 1 0 1</sup>。 $\beta$ -MHC及び $\beta$ -MHC遺伝子は、第14番染色体上に直列に並び、これらは、異なる速度でATPを機械的仕事に転換する、2個の心筋重鎖イソ型をコードし、またこれらのタンパク質発現比は、心臓筋節(sarcomere)の収縮性に影響する： $\beta$ -MHCは“早く”、一方 $\beta$ -MHCは“おそく”。これらの発現は、発生学的に調節される。マウス及びラットにおいて、 $\beta$ -MHCは、後期胎児期において優性的で在るが、生後間もない時期より $\beta$ -MHCは優性的に成体心臓イソ型となる。この移行は、生後間もない時期に生ず

40

50



る甲状腺ホルモンの急激な循環により恐らく引き起こされる<sup>9, 8</sup>。ウサギ及びヒトのような、より大きな哺乳動物では、 $\beta$ -MHCが優性的な成体心臓イソ型である。しかしながら、 $\beta$ -MHC及び $\beta$ -MHC遺伝子のプロモーターは、マウスとヒト間で高度に保存され、これらは同様に調節されていることを示唆する。 $\beta$ -MHCイントロンにmiR-208が由来するとして、理論に制約されなければ、miR-208は、TRAP複合体の成分を標的とすることにより、心筋重鎖イソ型比を調節するネガティブフィードバックループにおいて、甲状腺ホルモンシグナリングの組織特異的な阻害剤として働く可能性がある(図19)。

#### 【0125】

最初のスクリーニング研究の質問は、miR-208の過剰発現が、3' UTRにおける標的部位と予想されるレポーター遺伝子の発現を下方制御するかどうかである。Trap1 3' UTRを、構成的に発現するルシフェラーゼレポーターのコード配列の後に直接挿入した。結果から、miR-208はTrap1 UTRを標的とすることが示唆される(図18)。この観察を確認するために、Trap1 UTR内の2個の推定標的部位のシード領域に、独立に及び組み合わせて、突然変異をおこさせた。突然変異したポリヌクレオチドをテストして、これらがmiR-208を介する抑制を解除するかどうか測定した。

これまでの研究から、甲状腺ホルモンは、心筋細胞において $\beta$ -MHC鎖発現を転写的に活性化し、また $\beta$ -MHC発現を阻害する<sup>9, 8, 9, 9, 10, 2</sup>。心筋細胞にAd-208を感染させて、miR-208発現が甲状腺ホルモンシグナリングを阻害するかどうか、 $\beta$ -MHC及び $\beta$ -MHCの転写物及びタンパク質レベルを監視することにより測定する。miR-208による $\beta$ -MHC発現の阻害は、間接的に、miR-208は甲状腺ホルモンシグナリング経路の成分を標的とするという仮説を支持する。

予想した標的をさらに確認するために、miR-208発現がmiR-208ノックアウト及びmiR-208トランスジェニックマウスモデルからの、心臓中のmRNA又はタンパク質レベルを減少させるかどうか測定できる。標的タンパク質に対する特異的抗体が用いられる。ヒトThrap1は、商品として購入可能である。マウス研究において効果的でなかったら、マウスThrap1特異的抗体を作成する。

#### 【0126】

##### miR-208のさらなる標的候補

レポーター研究のために、Thrap1に加えて、4個の他の興味あるmiR-208の推定標的を直接ルシフェラーゼ遺伝子にクローニングした。該3' UTRはSP3 (Sp3 トランス作用転写因子3)、EYA4 (眼欠失相同体4)、CSNK2A2 (カゼインキナーゼ2、アルファブライムポリペプチド)及びTTN (Titin)由来である。

SP3タンパク質発現は、miR-208発現と反対である；SP3はGCボックスを含む様々なプロポーターと相互作用する転写因子である<sup>10, 3, 10, 4, 10, 5</sup>。SP3タンパク質は、胎児マウス心臓において直ちに検知されるが、成体心臓では僅かに検知される。SP3とmiR-208の反対の発現パターンは、miR-208がSP3翻訳を調節することを形式上可能にする。

EYA4は、ヒト心臓の病理学との確立したリンクを考えると、miR-208の興味ある潜在的標的である。拡張した心ミオパシー及び関連する心臓故障を引き起こすヒトEYA4中に、突然変異が同定された<sup>10, 6, 10, 7</sup>。EYA4は、sine-oculisファミリー(Six1-Six6)メンバー及びDach転写因子と相互作用し、遺伝子活性化を起こす転写コアクチベーターである<sup>10, 8, 10, 9</sup>。ヒト突然変異の特徴付けは、弱力化したEYA4レベルが、ヒト心臓故障の形態学的及び血行特性をもたらす<sup>10, 6</sup>と同様に、zebrafishにおける仕事により支持された。現在、EYA4の潜在的下流心臓遺伝子は同定されていない。

CSNK2A2は、DNA複製、基礎的及び誘導転写の調節、翻訳及び代謝の調節<sup>11, 0, 11, 1</sup>に関係する、広汎に発現しているタンパク質セリン/スレオニンキナーゼである。様々な遺伝的経路を調節する潜在力を持つCSNK2A2に興味を持たれる。

#### 【0127】

EYA4同様、TTNは、心臓血管機能及び病理学と関連することが確立しているので、TTNはまた、興味あるmiR-208の標的候補である。TTNは、心臓及び骨格筋組織の両者に発現する巨大筋節タンパク質であり、また筋節集合体及び力の伝達に重要である。TTNの突然変異

は、肥大性及び拡大性心臓ミオパシーと関係してきた。心臓及び骨格筋機能に対するTTNの要求を仮定すると、miR-208が強くTTN発現を調節することが疑わしくなるが、一つの筋節遺伝子（即ち  $\beta$ -MHC）は、他の筋節遺伝子（即ちTTN）の発現を微調整し、心筋細胞の収縮性を調節すると言う可能性がある。

推定標的遺伝子の3' UTRは、ポーター検定によりテストし、これがmiR-208を介した抑制を与えるかどうか測定した。候補遺伝子を、推定標的部位を突然変異させること及びmiR-208抑制が減少したかどうかテストすることで、さらに特徴付けた。標的候補の最初のレポータースクリーニングの後、転写及びタンパク質レベルで、インビトロmiR-208過剰発現が、候補遺伝子発現へおよぼす効果を、心筋細胞を用いて解析した。様々な標的の生物学的関連性を、インビボにおいて、miR-208ノックアウト及び誘導性トランスジェニックマウスモデルを用いて、研究した。インビトロ及びインビボにおける、潜在的miR-208標的の解析により、標的予想が正しいと確認し、心臓におけるmiR-208により調節される遺伝子経路を理解するために、生物学的関連性を確認した。

10

20

30

40

50

#### 【0128】

##### 実施例 1 2

生きる過程で、骨格筋は、損傷を受け、繰り返し修復される。筋肉再生は、経年変化の過程で、運動機能を維持し、またDuchenne筋肉ジストロフィーのような神経筋肉疾患における臨床的症状の出現を遅らせる。この組織修復能力は、成熟筋繊維の基底膜と筋細胞膜の間に局在する衛星細胞と呼ばれる幹細胞様細胞の一部により与えられる。損傷を受けると、衛星細胞は細胞周期に再び入り、増殖し、その後細胞周期から出て、静止衛星細胞プールを更新する又は成熟筋繊維に分化する。細胞増殖及び分化プログラムの両者は筋形成に極めて重要である。

本出願は、miRNAは、筋肉細胞の増殖及び分化に対し応答することを示すデータを提供する。

#### 【0129】

##### 方法

Yan他<sup>1 1 4</sup>に従い、カルジオトキシンを、6週齢の雄C57BL/6マウスの前脛骨筋（TA）に注入した。筋肉を注入後3日目に採取した。非注入TA筋を対照として用いた。全RNAをT A筋から単離し、5  $\mu$ gをmicroRNAのマイクロアレイ解析のために用いた。

##### 結果

図20A及び図20Bは、カルジオトキシン注入（損傷）又は非注入（対照）前脛骨筋（TA）からのmiRNAアレイ発現データである。正規化した自然対数データは、遺伝子により、階層的にクラスター化し、またヒートマップとしてプロットした。シグナルの範囲は、4倍から+4倍であった。明るい陰影は、培地に比較し高発現を示し、また暗い陰影は、低発現を示す。図20Aは損傷した筋肉における下方制御したmiRNAを表し、図20Bは、損傷を受けた筋肉における上方制御したmiRNAを表わす。

#### 【0130】

##### 実施例 1 3

骨格筋衛星細胞は、成熟、多核筋肉繊維の細胞膜と周囲の基底膜の間の1群の小単核細胞である。衛星細胞は、長い間、成体骨格筋の前駆細胞と考えられてきた。最近の知見によると、衛星細胞は、不均質であり、幹細胞様能力を持つという考えを支持する。これらの細胞は、静止状態で維持されるが、一度活性化されると、大規模に増殖し、分化及び再生又は筋肉組織の修復を行う筋芽細胞のプールを形成する。

正常状態において、衛星細胞を不活性な休止状態に保つ経路及び分子機構、ならびにこれらの細胞が、筋肉損傷に応答して筋肉再生を促進するためにどの様に活性化するかについては、明らかにされ始めた。対となるボックス/ホメオドメイン転写因子のファミリーメンバーである、Pax3及びPax7が、衛星細胞関係骨格筋再生過程を介して、重要で、明確な役割を果たすことが示されてきた。しかしながら、衛星細胞の維持及び活性化の過程で、Paxタンパク質の発現が、どのように調節するかについては、はっきりしない。興味深いことに、Pax3及びPax7の発現は、分化しつつある筋芽細胞において下方制御されてい

る。より重要なことに、C2C12筋芽細胞におけるPax3及びPax7の異所性過剰発現は、この細胞の分化を阻害する。これらの観察により、衛星細胞の休止及び自己再生、ならびに筋芽細胞増殖及び分化は、タイトな転写及び転写後調節の下に置かれていることが示唆される。

さらに、脳由来の神経栄養因子（BDNF）は、骨格筋衛星細胞において発現され、筋芽細胞分化を阻害する。Pax7及びBDNFの両者は、miR-1/206の推定標的であり、miR-1/206は骨格筋衛星細胞調節において重要な役割を果たすことを関係付けていることが見出され、本明細書において開示されている。

#### 【0131】

#### 衛星細胞における確立したmiRNA過剰発現及び検知システム

異所的に衛星細胞内で効率よくmiRNAを過剰発現させるために、レトロウィルスベースの過剰発現システムを適用した。miR-1及びmiR-206に隣接したゲノム配列（約300～400bp）は、ネズミ科幹細胞ウィルス（MSCV）由来のレトロウィルスベクター内において、スプライスドナー（SD）及びスプライスアクセプター（SA）と隣接し、このレトロウィルス内に、miRNA-SDSA配列の下流に緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードする配列が局在する。この様にして、miR-1/206及びGFPは、同時に発現し、GFPの発現はmiR-1/206発現の優れた指標として役立つ（図23）。

衛星細胞内のmiRNAの発現及び阻害効果を追跡するために、dsRed遺伝子の発現が、構造的に活性なCMVプロモーターの転写調節下にある、“miRNAセンサー”を作成した。miR-1/206の相補的配列を、dsRedレポーター遺伝子の3'に連結し、MSCV由来レトロウィルスベクターに挿入して、機能性miRNAがdsRedタンパク質の翻訳を抑制するようにした（図22）。このシステムを用いて、衛星細胞におけるmiRNAの発現及び阻害効果を正確に検出することができて、提供されたこのシステムは、骨格筋内でのmiRNA機能のさらなる研究のための強力な道具となる。

#### 【0132】

#### Pax7及びBDNFは、衛星細胞におけるmiR-1/206の調節標的である

Pax7及びBDNF遺伝子が、これらの3'UTRに高度に保存されたmiR-1/206標的部位を含むことを発見した（図24, 25, 26）。これら3'UTR配列を、ルシフェラーゼレポーター中にクローニングし、該miRNAによりこれらレポーターが抑制されたかどうかテストした。図24に示すように、miR-1及びmiR-206は、これらのレポーターを強く抑制した。miRNAを介した抑制は、保存されたmiRNA結合配列が突然変異された場合、消失し、抑制の特異性を示す。これらのデータより、miR-1/206は、筋肉細胞及び/又はこれらの前駆体の増殖及び分化を、重要な標的遺伝子を抑制することにより調節することができることが示唆される。

#### 【0133】

#### 単一骨格筋繊維から衛星細胞の単離

衛星細胞は、成体骨格筋前駆細胞であり、誕生後の生育及び再生に応答的である。理論に制限されることなく、miRNAもまた、衛星細胞のレギュレーターであると仮定できる。この仮説をテストするために、新生児又は成体マウスの後ろ肢又は仕切り板骨格筋から衛星細胞を単離した。最も混ざり気のない衛星細胞群を産生し、再現性ある結果を提供する、単一筋繊維より、衛星細胞の単離ができる。これらの衛星細胞は、培地にbFGFが含まれる場合、未分化の状態で維持することができて、この培地には、Pax7の発現及び他の衛星細胞マーカーが検出できる。しかしながら、インビトロの骨格筋分化過程に正確に類似して、これらは、増殖因子bFGFの除去により、誘導されて筋芽細胞及び管状筋細胞に分化する（図28）。

#### 【0134】

#### miR-1/206は、衛星細胞の増殖を阻害する

骨格筋前駆細胞におけるmiR-1/206の機能を定義するために、成体マウスの単一筋繊維から単離した衛星細胞を24ウェル組織培養プレートに置き、miR-1/206を該細胞に、SDSAベクターベースのレトロウィルスを用いて、導入する。異所的に発現したmiRNA

Aの発現及び活性を、いくつかの方法で追跡する：ノーザンブロット解析を、miR-1の発現を検知して、定量的に測定するために適用した。miR-1/206活性もまた、“センサー”レポーターを用いて追跡するが、この“センサー”レポーターは、miR-1/206に対する相補的配列をdsRedレポーター遺伝子の3'方向にクローニングする。

増殖検定において、培養衛星細胞は、採取1時間前に、BrdUで標識した。次ぎに該細胞を固定し、増殖細胞は、BrdUポジティブ染色細胞を計数して測定した。図27に示すように、衛星細胞におけるmiR-1/206過剰発現は、これらの増殖を阻害する。

#### 【0135】

miR-1/206は、衛星細胞の分化を促進する

分化動特性解析のために、単一筋繊維からの衛星細胞をコラーゲンで被覆した24ウェルプレート上、DMEMプラス20%FBS及び10ng/mlのbFGF中にプレートした。細胞密度は約 $5 \times 10^3$ 細胞/cm<sup>2</sup>であり、またmiR-1/206レトロウイルス又は対照レトロウイルスで感染させた。培地よりbFGFが取り除かれると、衛星細胞は自然に細胞周期から出て、分化する。図28及び図29に示すように、miR-1及びmiR-206の過剰発現は、衛星細胞の分化を促進し、分化動特性を加速する。

まとめると、本実施例に示したデータは、miR-1及びmiR-206は、骨格筋衛星細胞の増殖及び分化過程を調節する上で重要な役割をはたすことを示す。骨格筋再生及び修復過程における衛星細胞の重要な機能を考えると、理論で制限されることなく、miR-1、miR-206及びmiR-133は、骨格筋再生に重要であることが示唆される(図30)。

#### 【0136】

#### 参考文献

以下に記載した参考文献、及び明細書において引用した全ての文献は、本明細書に参考文献として取り込まれる。但しその範囲は、本明細書で用いた方法、技術、及び/又は組成物に対する背景を提供する文献、又は教える文献である。

1. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281-97 (2004).

2. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. Nature 431, 350-5 (2004).

3. Lee, R.C., Feinbaum, R.L.

& Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75, 843-54 (1993).

4. Wightman, B., Ha, I. &

Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 75, 855-62 (1993).

5. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science 303, 83-6 (2004).

6. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature 435, 828-33 (2005).

7. Giraldez, A.J. et al.

MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. Science 308, 833-8 (2005).

8. Zhao, Y., Samal, E. &

Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature 436, 214-20 (2005).

9. Thomson, J.M., Parker, J.,

Perou, C.M. & Hammond, S.M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. Nat Methods 1, 47-53 (2004).

10. Blau, H.M. et al.

Plasticity of the differentiated state. Science 230, 758-66 (1985).

11. Soulez, M. et al. Growth

and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol Cell Biol* 16, 6065-74 (1996).

12. Lu, J., McKinsey, T.A.,

Zhang, C.L. & Olson, E.N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* 6, 233-44 (2000).

13. Lee, R.C. & Ambros, V.

An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-4 (2001).

14. Lagos-Quintana, M. et al.

Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-9 (2002).

15. Sempere, L.F. et al.

Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13 (2004).

16. Wienholds, E. et al.

MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310-1 (2005).

17. Mansfield, J.H. et al.

MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36, 1079-83 (2004).

18. Hutvagner, G., Simard,

M.J., Mello, C.C. & Zamore, P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98 (2004).

19. Meister, G., Landthaler,

M., Dorsett, Y. & Tuschl, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* 10, 544-50 (2004).

20. Lewis, B.P., Shih, I.H.,

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Burge, C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-98 (2003).

21. Kiriakidou, M. et al. A

combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165-78 (2004).

22. Krek, A. et al.

Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500 (2005).

23. McKinsey, T.A., Zhang,

C.L., Lu, J. & Olson, E.N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-11 (2000).

24. Wang, D. et al. Regulation

of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 97-105 (2002).

25. Li, S. et al. Requirement

for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1082-7 (2005).

26. Wang, D. et al. Activation

of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum

10

20

30

40

50

response factor. *Cell* 105, 851-62 (2001).

27. Cao, D. et al. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol* 25, 364-76 (2005).

28. Kroll, K.L. & Amaya, E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173-83 (1996).

29. Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M. & Smith, J.C. Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm. *Development* 122, 2427-35 (1996). 10

30. Brown, D.D. et al. *Tbx5* and *Tbx20* act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development* 132, 553-63 (2005).

31. Freier et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9373-9377.

32. Turner et al. (1987) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* LII:123-133.

33. Smith & Waterman (1981) *Adv Appl Math* 2:482-489. 20

34. Needleman & Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48:443-453.

35. Pearson & Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2444-2448.

36. Ausubel et al., eds (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, New York, United States of America.

37. Altschul et al. (1990) *J Mol Biol* 215:403-410.

38. Henikoff & Henikoff (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10915-10919. 30

39. Karlin & Altschul (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5873-5877.

40. Sambrook & Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

41. Agrawal S (ed.) *Methods in Molecular Biology*, volume 20, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States of America.

42. Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*. Elsevier, New York, United States of America. 40

43. Tibanyenda et al. (1984) *Eur J Biochem* 139:19-27.

44. Ebel et al. (1992) *Biochem* 31:12083-12086.

45. Goeddel (1990) *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology*, Volume 185, Academic Press, San Diego, California, United States of America.

46. Silhavy (1984) *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 50

United States of America.

47. Glover & Hames (1995) DNA Cloning: A Practical Approach, 2nd ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.

48. Adelman et al. (1983) DNA 2:183-193.

49. Lee, R. C., Feinbaum, R.

L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs

with antisense complementarity to *lin-14*. Cell 75, 843-854.

50. Wightman, B., Ha, I., and

Ruvkun, G. (1993).

Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell 75, 855-862.

51. Lee, Y., Kim, M., Han, J.,

Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA

polymerase II. Embo J 23, 4051-4060.

52. Bracht, J., Hunter, S.,

Eachus, R., Weeks, P., and Pasquinelli, A. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of *let-7*

microRNA primary transcripts. Rna 10, 1586-1594.

53. Rodriguez, A.,

Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res 14, 1902-1910.

54. Lee, Y., Ahn, C., Han, J.,

Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003).

The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425, 415-419.

55. Basyuk, E., Suavet, F.,

Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. (2003). Human *let-7* stem-loop precursors harbor

features of RNase III cleavage products. Nucleic Acids Res 31, 6593-6597.

56. Lund, E., Guttinger, S.,

Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors.

Science 303, 95-98.

57. Yi, R., Qin, Y., Macara,

I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and

short hairpin RNAs. Genes Dev 17, 3011-3016.

58. Yi, R., Doehle, B. P.,

Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA

interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. Rna 11, 220-226.

59. Bohnsack, M. T.,

Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that

mediates nuclear export of pre-miRNAs. Rna 10, 185-191.

10

20

30

40

50

60. Gwizdek, C.,  
Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A. M., Evers, S., Macara, I. G., and Dargemont, C. (2004).  
Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* 279, 884-891.
61. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23-34. 10
62. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
63. Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659. 20
64. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
65. Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
66. Pillai, R. S., Artus, C. G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human go proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* 10, 1518-1525. 30
67. Doench, J. G., and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-511.
68. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
69. Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., and Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215-217. 40
70. Harfe, B. D., McManus, M. T., Mansfield, J. H., Hornstein, E., and Tabin, C. J. (2005). The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
71. Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., and Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brai 50



n morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.

72. Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., and Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230.
73. Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., et al. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279, 52361-52365. 10
74. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005). A micro RNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.
75. Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86. 20
76. Johnston, R. J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845-849.
77. Chang, S., Johnston, R. J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S., and Hobert, O. (2004). MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* 430, 785-789.
78. Yekta, S., Shih, I. H., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594-596. 30
79. Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., et al. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36, 1079-1083.
80. Zhao, Y., Samal, E., and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA A 40 that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 214-220.
81. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
82. John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
83. Kiriakidou, M., Nelson, P. T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C., Mourelatos, Z., and Hatzigeorgiou, A. (2004). A combined computational-experimental approach predict 50

s human

microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165-1178.

84. Krek, A., Grun, D., Poy,

M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions.

*Nat Genet* 37, 495-500.

85. Rajewsky, N., and Socci,

N. D. (2004).

Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* 267, 529-535.

10

86. Nicol, R. L., Frey, N.,

Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J., and Olson, E. N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J* 20, 2757-2767.

87. Jones, W. K., Grupp, I.

L., Doetschman, T., Grupp, G., Osinska, H., Hewett, T. E., Boivin, G., Gulick, J., Ng, W. A., and Robbins, J. (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to

dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* 98, 1906-1917.

20

88. Liu, P., Jenkins, N. A.,

and Copeland, N. G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating

conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476-484.

89. Cotta-de-Almeida, V.,

Schönhoff, S., Shibata, T., Leiter, A., and Snapper, S. B. (2003). A new method for

rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res* 13, 2190-2194.

90. Subramaniam, A., Jones, W.

30

K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., and Robbins, J. (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266, 24613-24620.

91. Sanbe, A., Gulick, J.,

Hanks, M. C., Liang, Q., Osinska, H., and Robbins, J. (2003). Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 92, 609-616.

92. Czubyrt, M. P., McAnally,

J., Fishman, G. I., and Olson, E. N. (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl*

40

*Acad Sci U S A* 100, 1711-1716.

93. Ito, M., Yuan, C. X.,

Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel

pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3, 361-370.

94. Fondell, J. D., Ge, H.,

and Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid

50

hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8329-8333.

95. Treisman, J. (2001). *Drosophila* homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* 128, 603-615.

96. Ito, M., Yuan, C. X.,

Okano, H. J., Darnell, R. B., and Roeder, R. G. (2000). Involvement of the TRAP20 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* 5, 683-693.

10

97. Muncke, N., Jung, C.,

Rudiger, H., Ulmer, H., Roeth, R., Hubert, A., Goldmuntz, E., Driscoll, D., Goodship, J., Schon, K., and Rappold, G. (2003). Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* 108, 2843-2850.

98. Lompre, A. M.,

Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V. (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha-

and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* 259, 6437-6446.

20

99. Everett, A. W., Sinha, A.

M., Umeda, P. K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M., and Zak, R. (1984). Regulation of

myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry* 23, 1596-1599.

100. Darling, D. S., Carter,

R. L., Yen, P. M., Welborn, J. M., Chin, W. W., and Umeda, P. K. (1993). Different

30

dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem* 268, 10221-10227.

101. Subramaniam, A., Gulick,

J., Neumann, J., Knotts, S., and Robbins, J. (1993). Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem* 268, 4331-4336.

102. Gustafson, T. A.,

Markham, B. E., Bahl, J. J., and Morkin, E. (1987). Thyroid hormone regulates expression of a

40

transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3122-3126.

103. Santalucia, T., Boheler,

K. R., Brand, N. J., Sahye, U., Fandos, C., Vinals, F., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (1999). Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene

transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem* 274, 17626-17634.

104. Hagen, G., Muller, S.,

Beato, M., and Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3.

50

Embo J 13, 3843-3851.

105. Hagen, G., Muller, S.,

Beato, M., and Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box

binding proteins: a family of Sp1 related genes. Nucleic Acids Res 20, 5519-5525.

106. Schonberger, J., Wang,

L., Shin, J. T., Kim, S. D., Depreux, F. F., Zhu, H., Zon, L., Pizard, A., Kim, J. B., Macrae, C. A., et al. (2005). Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes

10

dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. Nat Genet 37, 418-422.

107. Wayne, S., Robertson, N.

G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C. C., Ryan, A. F., Van Camp, G., and Smith, R. J. (2001). Mutations in the transcriptional activator

EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. Hum Mol Genet 10, 195-200.

108. Borsani, G., DeGrandi,

A., Ballabio, A., Bulfone, A., Bernard, L., Banfi, S., Gattuso, C., Mariani, M., Dixon, M., Donnai, D., et al. (1999). EYA4, a novel vertebrate gene related to

20

Drosophila eyes absent. Hum Mol Genet 8, 11-23.

109. Bonini, N. M., Leiserson,

W. M., and Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and

differentiation in the developing Drosophila eye. Cell 72, 379-395.

110. Heanue, T. A., Reshef,

R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B., and Tabin, C. J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. Genes Dev 13, 3231-3243.

30

111. Xu, X., Rich, E. S., Jr.,

and Seldin, D. C. (1998). Murine protein kinase CK2 alpha': cDNA and genomic cloning

and chromosomal mapping. Genomics 48, 79-86.

112. Pinna, L. A., and Meggio,

F. (1997).

Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its

implication in cell division and proliferation. Prog Cell Cycle Res 3, 77-97.

113. Granzier, H. L., and

Labeit, S. (2004).

40

The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. Circ Res 94, 284-295.

114. Yan et al (2003). J. Biol. Chem. 278(10), 8826-8836.

本出願の様々な詳細は、本出願の範囲を超えることなく、変えることが出来ることに留意すべきである。さらに、既に記載した内容は、例証のためのみであり、制限を意図したものではない。

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1】図1a～図1eは、発生過程での心筋及び骨格筋におけるmiR-1及びmiR-133の発現についてのデータを図示する。図1aは、それぞれ、増殖培地(GM)又は分化培地(D

50

M) 中で培養したC2C12筋芽細胞からの、0, 1, 3及び5日目のmiRNAアレイの発現データを示す。正規化した自然対数データを、遺伝子により階層的にクラスター化し、ヒートマップとしてプロットする。シグナルの範囲は、-4倍から+4倍である。培地と比較して、黄色は、高発現を示し、青色は低発現を示し、また分化培地で上方制御されたmiRNAノードのみ示す。図1bは、それぞれ、GM又はDM中で、0, 1, 3及び5日間培養したC2C12筋芽細胞から分離した全RNAを用いた、miR-1及びmiR-133発現のノーザンプロット解析を示す。tRNAをローディングコントロールとして用いた。図1cは成体マウス組織中のmiR-1及びmiR-133発現のノーザンプロット解析を示す。図1dはマウス13.5日目(E13.5)及び16.5日目(E16.5)胚組織中のmiR-1及びmiR-133発現のノーザンプロット解析を示す。図1eはマウス新生児組織中のmiR-1及びmiR-133発現のノーザンプロット解析を示す。胚及び新生児RNAとの比較のために成体心筋及び骨格筋から同量の全RNAをプロットにローディングした(図1d及び図1e)。

【図2】図2a~図2jはmiR-1及びmiR-133による筋芽細胞増殖及び分化を調節することを示すデータを示す。増殖培地(GM)中で培養したC2C12筋芽細胞に、GFPを対照として、miR-1及びmiR-133に対する二重鎖miRNAを電気穿孔により導入した。図2a~図2eは、細胞をトランスフェクション後24時間GM中で連続的に培養し、その後分化培地(DM)に移し12時間後、ミオゲニンに対する免疫染色を行い(図2a)又は36時間後、MHCに対する免疫染色を行った(図2b)実験結果を示す。GM中で培養したC2C12筋芽細胞に、GFPを対照として、miR-1、miR-133(又は図示したこれらの変異体)又はmiR-208に対する二重鎖miRNAを電気穿孔で導入し、24時間培養後：図示した抗体を用いたウェスタンブロッティング(図2c)；又は細胞をDMに24時間移し図示した遺伝子についてRT-PCRを行った(図2d)；又は細胞をDMに24時間移動し図示した抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った(図2e)。図2f~図2hは、GM中で培養したC2C12筋芽細胞に、GFPを対照として、miR-1、miR-133又はmiR-208に対してアンチセンスな2'-O-メチルオリゴヌクレオチドを電気穿孔した実験結果を示す。トランスフェクション後、細胞を24時間GM中で培養し、DMに移動し：12時間後ホスホヒストンH3に対して免疫染色(図2f)；又は24時間後図示した遺伝子に対するRT-PCRを行い(図2g)；又は24時間後図示した抗体によるウェスタンブロッティングを行った(図2h)。図2i及び図2jは、GM中で培養したC2C12筋芽細胞に、二重鎖miRNA又は図示した2'-O-メチルアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤を電気穿孔により導入した実験結果を示す。細胞をトランスフェクション後24時間GM中で培養し、その後DMに移し、12時間後ミオゲニン(図2i)又はホスホヒストンH3(図2j)、に対する免疫染色を行った。ポジティブに染色された細胞を計数し、データをGFP対照(100%)に対する相対発現レベルとして提示する。

【図3】図3a~図3kは、インビボにおけるmiR-1及びmiR-133による心筋及び骨格筋の分化のコントロールを示すデータを示す。図3a~図3hはXenopus胚実験からのデータを示す。Xenopus非注入由来(図3a及び図3b)、GFP RNA対照注入由来(図3c及び図3d)、miR-1-注入由来(図3e及び図3f)又はmiR-133注入由来(図3g及び図3h)のXenopus胚を抗トロポミオシンで染色し、ステージ32を明視野下(図3a、図3c、図3e及び図3g)又は蛍光下(図3b、図3d、図3f及び図3h)に示す。心臓組織に染色が欠けていること(図3b及び図3d、H矢印)及び体節の崩壊(図3f及び図3h、S矢印)に注目のこと。図3i~図3kは、Xenopus胚の横断面からのデータを示す。非注入由来(図3i)、miR-1-注入由来(図3j)又はmiR-133注入由来(図3k)胚のステージ32の心臓位置に対応するXenopus胚横断面を抗トロポミオシンで染色し、体節(S矢印)及び心臓組織(H矢印)を視覚化し、抗ホスホヒストンH3(赤)で染色しS期細胞を視覚化した。各セットの注入は少なくとも2回独立に行い、表現形質は、全マウント免疫染色により記録した少なくとも50の胚の少なくとも90%について観測したものである。

【図4】図4a~図4iは、骨格筋中のmiR-1及びmiR-133標的遺伝子の同定を示すデータである。図4aは、miR-133及びmiR-1によるSRF及びHDAC4 3' UTRの抑制を示すデータである。マウスSRF 3' UTR (SRF-3'-UTR)からのmiR-133相補部位又はマウスHDAC4 3' UT

R (HDAC4-3' -UTR) からのmiR-1相補部位又はmiR-133 (miR-133-luc) 又はmiR-1 (miR-1-luc) の完全アンチセンス配列を含むルシフェラーゼレポーターを、図示したようなmiRNA発現ベクター又はこれらの変異体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トランスフェクション後48時間に測定した。データは、少なくとも3回の独立したデュプリケート実験の平均値 $\pm$ s.d.を示す(\* $P < 0.05$ )。図4bはC2C12筋芽細胞にトランスフェクトしたSRF-3' -UTR、HDAC4-3' -UTR及びMCK-lucルシフェラーゼレポーターの結果を示すデータを表わす。GMに24時間維持した細胞(GM)、又は1日目にDMに移した細胞(DM1)又は3日目に移した細胞(DM3)のルシフェラーゼ活性を測定した。図4c~図4eは、GM中で培養し、GFPを対照として、図示する二重鎖miRNA(又はその変異体)又はmiR-208を電気穿孔導入したC2C12筋芽細胞の結果を示すデータを表わす。トランスフェクション後細胞を24時間GM中で培養し、抗SRF及び抗HDAC4抗体を用いてウェスタンブロッティングし(図4c); 細胞を24時間DMに移し、図示した遺伝子についてRT-PCRを行い(図4d); 細胞をDMに24時間移動し、図示した抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。GM中で培養したC2C12筋芽細胞に、図示した2'-O-メチルアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害剤を電気穿孔により導入した(図4e)。図4f及び図4gは、トランスフェクト後24時間GMで培養し、その後24時間DMに移した細胞について、図示した遺伝子についてRT-PCRを行い(図3f); 及び図示した抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った(図4g)、結果を示す。図4hは、GM中で培養し、図示した二重鎖miRNA又は/及び図示したようなSRF又はHDAC4に対する発現プラスミドを電気穿孔導入したC2C12筋芽細胞の結果を示すデータを表わす。細胞をトランスフェクション後、24時間GM中で培養した。DMに移した24時間後に、図示した抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。図4iは、GM中で培養又はDM中に0, 1, 3, 又は5日間培養したC2C12筋芽細胞の結果を示すデータを表わす。

10

20

30

40

50

【図5】図5は、miR-1及びmiR-133を介した骨格筋増殖及び分化の調節に対するモデルを示す。

【図6】図6は、それぞれ、増殖培地(GM)又は分化培地(DM)に0, 1, 3及び5日間培養したC2C12筋芽細胞からのmiRNAアレイ発現データからの解析データを示す。正規化した自然対数データは、遺伝子により階層的にクラスター化しており、ヒートマップとしてプロットされる。シグナル範囲は-4倍から+4倍である。明るい陰影は、培地と比べて高発現を示し、暗い陰影は低発現を示す。

【図7】図7a~図7dは、C2C12細胞におけるmiR-1、miR-133及び骨格筋分化マーカー遺伝子の発現データを示す。図7a及び図7bは、増殖培地(GM)又は分化培地(DM)に0, 1, 3及び5日間培養したC2C12筋芽細胞からの全RNAを用いたmiR-1(図7a)及びmiR-133(図7b)の発現のノーザンブロッティング解析を示す。成熟miRNA及びその前駆体(Pre)の両者が図示されている。tRNAをローディング対照として用いた。図7cは骨格筋分化マーカー遺伝子の半定量的RT-PCR解析を示す。GAPDHを等量ローディングの対照として用いた。図7dは、骨格筋分化マーカーの発現を示す。C2C12筋芽細胞を増殖培地(GM)又は分化培地(DM)に0, 1, 3及び5日間培養し、細胞単離物について、図示した抗体を用いて、ウェスタンブロットを行った。-チューブリンをローディング対照として用いた。

【図8】図8a~8fは成体マウス及び全過程分化における心筋及び骨格筋中のmiR-1及びmiR-133の発現データを示す。ノーザンブロット解析は、成体マウス中のmiR-1の発現(図8a)及びmiR-133の発現(図8d)を示す。マウス13.5日胚(E13.5)及び16.5日胚(E16.5)組織のmiR-1の発現(図8b)及びmiR-133の発現(図8e)をノーザンブロット解析が示す。比較のために、成体心筋及び骨格筋から得た等量の全RNAもまたブロットにロードした。マウス新生児組織のmiR-1の発現(図8c)及びmiR-133の発現(図8f)をノーザンブロット解析で示す。比較のために、成体心筋及び骨格筋から得た等量の全RNAもまたブロットにロードした。成熟miRNA及びこれらの前駆体(Pre)の両者を図示する。tRNAをローディング対照として用いた。

【図9】図9a~図9eは心筋及び骨格筋中のmiR-1及びmiR-133初期転写物の発現を示す

データである。図 9 a はマウス第 2 及び第 18 染色体にクラスターする miR-1 及び miR-133 遺伝子を示す。図 9 b ~ 図 9 e で用いたノーザンブロットのためのプローブを示す。

図 9 b ~ 図 9 e は、第 2 染色体 (図 9 d 及び図 9 e) 及び第 18 染色体 (図 9 b 及び図 9 c) からの miR-1 (図 9 c 及び図 9 e) 及び miR-133 の初期転写物発現 (図 9 b 及び図 9 c) のノーザンブロット解析のデータを示す。図示した成体マウス組織から 20  $\mu$ g の全 RNA を用いた。

【図 10】図 10 a ~ 図 10 g は、miR-1 及び miR-133 エンハンサーが心筋及び骨格筋中のレポーター遺伝子発現を制御できることを示すデータである。図 10 a は、ステージ 28 における dsRed を説明する体節 (S 矢印) 発現に連結したマウス miR-1 及び miR-133 ゲノム配列に対するトランスジェニック *Xenopus laevis* のデータを示す。図 10 b は、ステージ 46 (下方胚) 及び負対照 (非トランスジェニック、Ct, 上方胚) の miR-1 及び miR-133 を含有するトランスジーン (導入遺伝子) を担う、明視野下の、トランスジェニック (Tg) *Xenopus laevis* を示す。図 10 c は図 10 b に示す同一胚を蛍光下に置いた写真である。図 10 d は、図 10 b におけるトランスジェニック胚の明視野下の高倍率顕微鏡写真であり、心臓 (H 矢印) 及び鰓弓 (BA 矢印) における導入遺伝子の発現を示す。図 10 e は、図 10 b におけるトランスジェニック胚の蛍光下の高倍率顕微鏡写真であり、心臓 (H 矢印) 及び鰓弓 (BA 矢印) における導入遺伝子の発現を示す。図 10 f は、ステージ 46 トランスジェニック胚の高倍率顕微鏡写真であり、体節 (S 矢印) における導入遺伝子の発現を示す。図 10 g は、マウス第 2 染色体からの miR-1/133 エンハンサーのゲノム DNA 配列 (配列番号 82) を示す。推定上の MEF2 部位及び CArG ボックスを選び出し、またこれらの部位における変異を示した。

【図 11】図 11 a ~ 図 11 h は、C2C12 細胞において、miR-133 による miR-133 センサーの抑制を示すデータを示す。安定的に miR-133 センサーを発現する C2C12 細胞に、GFP (対照)、野生型 miR-133 (miR-133)、変異体 miR-133 (miR-133mut) に対する発現ベクターを形質導入し、ここで “シード” 配列は変異している又は miR-133 発現ベクターと 2' -O-メチルアンチセンスオリゴ (miR-133 + 2' -O-メチル) の組合せである。細胞を分化培地に移動し 12 時間後、位相差 (P/C) (図 11 a ~ 図 11 d) 又は蛍光顕微鏡を用いて、dsRed レポーター遺伝子 (図 11 e ~ 図 11 h) の発現を示す画像を得た。各条件下の細胞を採取し dsRed レポーター遺伝子の発現を、FACS 解析を用いて定量化した (下段パネル)。曲線下の空白領域は細胞の自動フルオレセイン染色を示し、曲線下の縞領域は ds-Red 発現を示す。

【図 12】図 12 は HDAC4 及び SRF 遺伝子の 3' UTR における miR-1 及び miR-133 標的部位の配列を示す。上段パネル：脊椎動物種ヒト (配列番号 24)、チンパンジー (配列番号 25)、マウス (配列番号 26)、ラット (配列番号 27)、イヌ (配列番号 28) 及びニワトリ (配列番号 29) からの保存された HDAC4 3' UTR 配列及びこれら配列と miR-1 (配列番号 1) 及び miR-206 (配列番号 3) とのアラインメント。下段パネル：ヒト (配列番号：30 及び 31) 及びラット (配列番号 32 及び 33) からの SRF 3' UTR 配列及びこれら配列と miR-133 とのアラインメント。上記の場合、保存された塩基配列を記載する。

【図 13】図 13 は、miRNA 生合成のモデルを示す。(A) RNA ポリメラーゼ II により、核内で pri-miRNA が転写され、(B) これらはステムループを含む pre-miRNA に Drosha (ドロシャ) により処理される。(C) Exportin-5 (エクスポートイン - 5) が、Drosha により残された 3' オーバーハングを認識し、pre-miRNA を細胞質に運び出し、ここで (D) Dicer (ダイサー) がステムループ以下の pre-miRNA を切断し、~ 22 ヌクレオチドの二本鎖配列を作る。(E) 単鎖が RISC に取り込まれ、(F) この RISC は mRNA の 3' 非翻訳領域内の相補配列を認識し、翻訳抑制又は mRNA 切断により遺伝子発現を調節する。

【図 14】図 14 a ~ 図 14 c は、miR-208 ゲノムを表わす。図 14 a は、mFold を用いて折りたたまれたマウス前駆体 miR-208 配列 (配列番号 34) 及び右側に、成熟した miR-208 配列 (配列番号 35) を示す。図 14 b は、マウス (配列番号：35)、ラット (配列番号 36) 及びヒト (配列番号 37) 前駆体 miR-208 配列のアラインメントを示す。成熟 miR-208 配列を図 14 A の右上に示す。星印は完全配列保存を表わす。図 14 c は、-MHC イ

10

20

30

40

50

ントロン由来のmiR-208を示す。マウスmiR-208は  $\beta$ -MHCのイントロン 2 9 中に位置する。同様にヒトmiR-208は  $\beta$ -MHCのイントロン 2 8 中に在る。

【図 1 5】図 1 5 a ~ 図 1 5 c は、miR-208が発現過程で調節されることを示すデータである。異なるマウス組織からの全RNAをプロットし、miR-208に相補的な 5' - 放射標識したオリゴデオキシヌクレオチドで検出した。ゲル上への等量の全RNAローディングをトランスファー前のエシジウムブロマイド染色により確認した。図 1 5 a は、miR-208が心臓特異的であることを示すデータである。上方のシグナルはpre-miR-208転写物であり、下方のシグナルは成熟 2 2 ヌクレオチドである。図 1 5 b は、成体心筋及び骨格筋に相対的な、新生児マウスからの組織中のmiR-208発現のデータを示す。図 1 5 c は、成体心筋及び骨格筋に相対的な、E13.5及びE16.5マウスからの様々な組織中のmiR-208発現のデータを示す。

10

【図 1 6】図 1 6 a 及び図 1 6 b は、心筋細胞における異所性miR-208発現のデータを示す。図 1 6 a は放射標識miR-208にアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて検出した、Ad-GFP又はAd-208を感染させた心筋細胞から調整したノーザンプロットを示す。図 1 6 b は、MOI 1及びMOI 10で感染させた心筋細胞のエピ蛍光顕微鏡写真を示す。

【図 1 7】図 1 7 は本明細書で開示した条件トランスジェニックシステムの概略図を示す。2系統の独立したトランスジェニックマウス株を用いた：一系統は  $\beta$ -MHCプロモーターの制御下のtTA-VP16融合タンパク質発現し、第2系統はCMV最小プロモーター制御下のmiR-208導入遺伝子を含む。CMV最小プロモーターは直接上流に位置する数個の繰り返しテトラサイクリンオペロン (tetO) を有する。該2系統を互いに交配させ、二重にトランスジェニックなマウスを、メンデル遺伝型を仮定して、4匹に1匹得た。二重にトランスジェニックなマウスにデオキシサイクリン (DOX) を投与すると、tTA-VP16タンパク質はDOXと結合し、miR-208の転写が阻害される。もしDOXが無いと、tTAタンパク質はtetOコンカテマーを結合させ、VP16領域はCMV最小プロモーターからのmiR-208転写誘導をすることができる。心臓特異的標的遺伝子発現は、DOX添加又は回収により作動オン又はオフすることができる。James 他 Am J Physiol 273: H2105-H2118からの引用を参考文献に取り込む。

20

【図 1 8】図 1 8 a ~ 図 1 8 c は、miR-208標的Thrap1を示すグラフ及び配列アラインメントである。アンチセンスmiR-208配列 (miR-208センサー) 又はHemoglobin- (Hbb) 及び甲状腺ホルモン結合タンパク質 1 (Thrap1) (図 1 8 a) の3' UTR又は4コピーのThrap1 3' UTR (図 1 8 b) からの推定miR-208結合部位と結合したルシフェラーゼレポーターをルシフェラーゼ遺伝子の下流に直接結合させ、293T細胞に、増加量のpCDNA3.1 miR-208と共に同時形質導入を行った。miR-208センサー、Thrap1及び4xThrap1レポーターは用量依存的に抑制され、他方負対照のCSNKは有意には変化しなかった。図 1 8 c は、成熟miR-208配列 (配列番号4) がヒト (配列番号38) 及びマウス (配列番号39) Thrap1遺伝子の3' UTR内の推定miR-208標的部位に結合することを示す。両推定標的内の完全に保存された標的シード領域 (miR-208の5' 末端の第2から第8番目のヌクレオチド) に注目。

30

【図 1 9】図 1 9 は、miR-208による心臓ミオシン重鎖イソ型切り替え制御のモデルを示す。甲状腺ホルモン核受容体 (TR) は、 $\beta$ -MHC及び  $\beta$ -MHC遺伝子のプロモーター内の甲状腺受容体因子 (TRE) 配列に結合する。該  $\beta$ -MHCプロモーターは、2個のTRが結合した全長TREを含むが、他方  $\beta$ -MHCは1個のTRが半TREに結合したものを有する。TR単量体及び二量体の両者は、TRコファクターであるTRAP複合体とヘテロ二量体化する。甲状腺ホルモン (T3) はTRに結合し、 $\beta$ -MHCの転写を阻害するが、 $\beta$ -MHC発現を誘導する。miR-208は、 $\beta$ -MHCタンパク質と同時に発現し、TRAP複合体の最大のサブユニットである、Thrap1の翻訳を制御すると予想されている。miR-208は、T3シグナリングを阻害することにより心臓ミオシン重鎖イソ型発現を制御する、ネガティブフィードバックループの成分であると信じられている。

40

【図 2 0】図 2 0 a 及び図 2 0 b は、損傷 / 再生骨格筋のmiRNAアレイ解析からのデータを示す。図 2 0 a は、損傷筋肉中で下方制御されるmiRNAからのデータを示す。図 2 0 b は、損傷筋肉中で上方制御されるmiRNAからのデータを示す。

50



【図 2 1】図 2 1 は配列番号 6 ~ 9 の配列例を示す。

【図 2 2】図 2 2 は miRNA センサーを用いた分化する骨格筋衛星細胞中の miR-1 発現を示すデータである。miR-1 センサー (dsRed::miR-1) 又は変異センサー (dsRed::miR-1-Mut) を安定して発現する衛星細胞は、bFGF が除かれた分化培地に移動すると誘導されて分化し、蛍光を用いて得られた画像は、dsRed レポーター遺伝子 (dsRed::miR-1) 又は筋肉分化マーカー遺伝子であるミオシン重鎖 (MF20) の発現を示す。センサーが発現する分化細胞において dsRed 発現が低いことは、これらの細胞で miR-1 の発現があることを示す。DAPI は細胞核を染色する。

【図 2 3】図 2 3 a 及び図 2 3 b は、miR-1/206 発現システム (図 2 3 a) 及び miR-1/206 センサー (図 2 3 b) の確立を示すデータである。図 2 3 a は、miR-1/206 及び GFP タンパク質の発現のための、発現構築物の概略図を示す (図 2 3 a, 左パネル)。ノーザンブロット解析により、miR-1 の発現を示す (図 2 3 a, 右パネル)。図 2 3 b は 293 細胞における miR-1/206 センサーの miR-1 による抑制を示す。miR-1/206 センサーを恒常的に発現する 293 細胞は、miR-1/206 (SDSA::miR-1) に対する発現ベクターで形質変換し、また位相差 (293 細胞) 又は蛍光を用いて得られた画像により dsRed レポーター遺伝子 (dsRed::miR-1) 又は miRNA::GFP (SDSA::miR-1) 又は両者のオーバーレイ (Overlay) の発現を示す。dsRed センサー及び miR-1 の発現は排他的であり、miR-1 は特異的にセンサーレポーターの発現を抑制すること示す。

【図 2 4】図 2 4 A 及び 2 4 B は miR-1/206 による PaX7 及び BDNF 3' UTR の抑制を示すデータである。図 2 4 A はマウス PaX7 UTR (配列番号 40 ~ 41) と MiR-1 (配列番号 1) 及び miR-206 (配列番号 3) との配列アラインメントを示すデータである。図 2 4 B は、マウス PaX7 3' UTR (Luc-PaX7::UTR) 又はその変異体 (Luc-PaX7::UTR-M) 又は BDNF 3' UTR (Luc-BDNF::UTR) 又はその変異体 (Luc-BDNF::UTR-M) のいずれかを含むルシフェラーゼレポーターを、図示した miRNA 発現ベクターと、コトランスフェクトすることを示すグラフを開示する。ルシフェラーゼ活性は、トランスフェクト 48 時間後測定した。データは、少なくとも独立した 3 回のデュプリケート実験の平均値  $\pm$  s.d. を示す。miR-1/206 は、PaX7 及び BDNF 3' UTR レポーターの発現を強く抑制することに注目。

【図 2 5】図 2 5 A ~ 図 2 5 C は miR-1/206 が、衛星細胞の PaX7 の発現を阻害するが PaX3 の発現を阻害しないことを示す。図 2 5 A は PaX7 発現のノーザンブロット解析であり、PaX7 mRNA の転写レベルは 3' UTR により阻害されないことを示す。図 2 5 B は PaX3 ではなく PaX7 タンパク質レベルが miR-1/206 過剰発現衛星細胞において低いことを示すウェスタンブロット解析である。図 2 5 C は、位相差顕微鏡 (位相 / コントラストパネル) 又は蛍光顕微鏡で得た画像であり、骨格筋衛星細胞における PaX7 又は PaX3 タンパク質 (PaX7 及び PaX3 パネル) 又は miRNA::GFP (SDSA::miR-1/206 パネル) 又はオーバーレイ (Overlay パネル) の発現を示す。PaX3 ではなく、PaX7 の発現が miR-1/206 により阻害されることに注目。

【図 2 6】図 2 6 は、miR-1/206 が衛星細胞において GDNF ではなく BDNF の発現を阻害することを示す。位相差顕微鏡 (位相 / コントラストパネル) 又は蛍光顕微鏡で得た画像が、骨格筋衛星細胞における、BDNF 又は GDNF タンパク質 (BDNF 及び GDNF パネル) 又は miRNA::GFP (SDSA::miR-1/206 パネル) 又はオーバーレイ (Overlay パネル) の発現を示す。GDNF ではなく、BDNF の発現が miR-1/206 により阻害されることに注目。

【図 2 7】図 2 7 A 及び図 2 7 B は、miR-1/206 が衛星細胞増殖を阻害することを示す。図 2 7 A は、位相差顕微鏡又は蛍光顕微鏡を用いて得た衛星細胞の画像であり、BrdU (BrdU パネル) 又は miRNA::GFP (SDSA::miR-1+206 パネル) でマークした細胞増殖インデックスを示す。miR-1/206 過剰発現衛星細胞において、BrdU ポジティブ細胞が少ないことが観測される。図 2 7 B は BrdU ポジティブ染色細胞を対照及び miR-1/206 過剰発現細胞において計数した実験結果を示し、データを、BrdU ポジティブ細胞と全細胞の比で表わす。

【図 2 8】図 2 8 A 及び 2 8 B は、miR-1/206 が衛星細胞分化を促進することを示す。図 2 8 A 及び 2 8 B は、miR-1/206 (SDSA-miR-1+206) 又は GFP (対照) を恒常的に過剰発現する衛星細胞を、bFGF を除いた分化培地に 24 時間 (図 2 8 A) 又は 48 時間 (図 2 8 B) 移し、抗ミオシン重鎖 (MyHC) 抗体を用いて免疫染色した実験結果を示す。miR-1/

10

20

30

40

50

206過剰発現細胞における促進したMyHC染色に注目。DAPIは細胞核を標識する。

【図29】図29は、miR-1/206過剰発現が衛星細胞分化を促進する時間変化を示す実験結果である。miR-1/206(黒の四角)又はGFP(対照：黒の菱形)を過剰発現する衛星細胞を増殖培地で培養する又はbFGFを除いた分化培地に、異なる時点(0, 12, 24, 36及び48時間)で移し、ミオシン重鎖(MyHC)ポジティブ細胞を計数した。結果をMyHCポジティブ細胞と全細胞の比で示した。

【図30】図30は、骨格筋衛星細胞増殖と分化を調節するmiR-1/206のモデルを示す。

【0138】

#### 表の簡単な説明

表1は、本明細書で用いるヌクレオチドの1文字略語の一覧である。

10

表2は、筋原細胞増殖及び分化へのmiR-1及びmiR-133の効果である。増殖培地(GM)で培養したC2C12筋芽細胞に、miR-1、miR-133に対する二重鎖miRNA又は2'-O-メチルアンチセンスオリゴ又はネガティブ対照としてGFPを電気穿孔導入した。36時間後、GMを分化培地(DM)に8, 12, 24時間移し、細胞をミオゲニン、ホスホヒストンH3及びミオシン重鎖(MHC)に対する抗体を用いて免疫染色解析を行った。ランダムに選んだ視野から選んだ5000個のDAPI染色細胞からポジティブ細胞を計数した。検定を、独立した3回行い比較しうる結果を得た。

表3は、本明細書で開示したオリゴヌクレオチドの名称及び配列を示す。

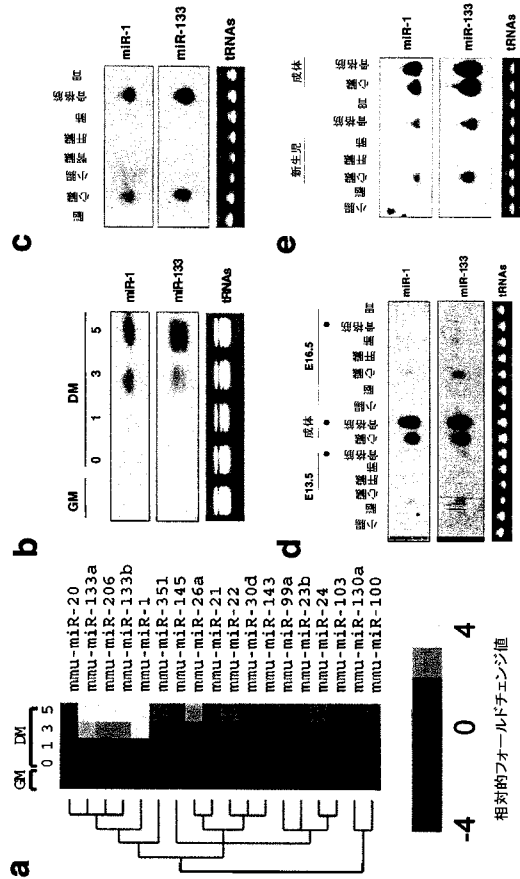
【0139】

#### 配列表の簡単な説明

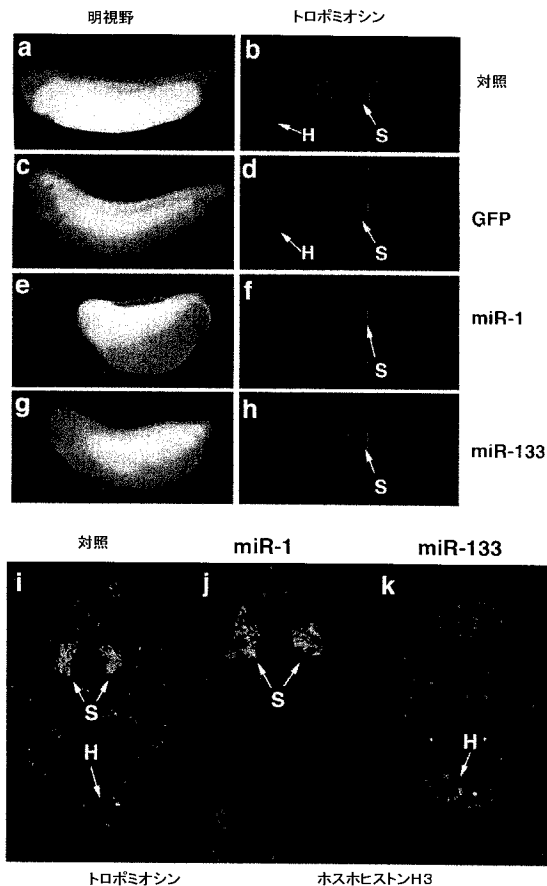
20

配列一覧では、とりわけ、様々なmiRNA、特にmiR-1、miR-133、miR-206、miR-208、miR-22、miR-26、miR-29、miR-30、miR-128、miR-143及びmiR-145(それぞれ、配列番号1~11)及び本明細書で開示した追加的ポリヌクレオチド配列を開示する。いくつかの実施例では、RNA配列は、DNAの形で表わす(即ち、ウラシルの代わりにチミジンを示す)。これらの配列は、これらのDNA配列のRNA転写物に対応することを意図している(即ち、各UをTで置き換えて)ことを理解すべきである。

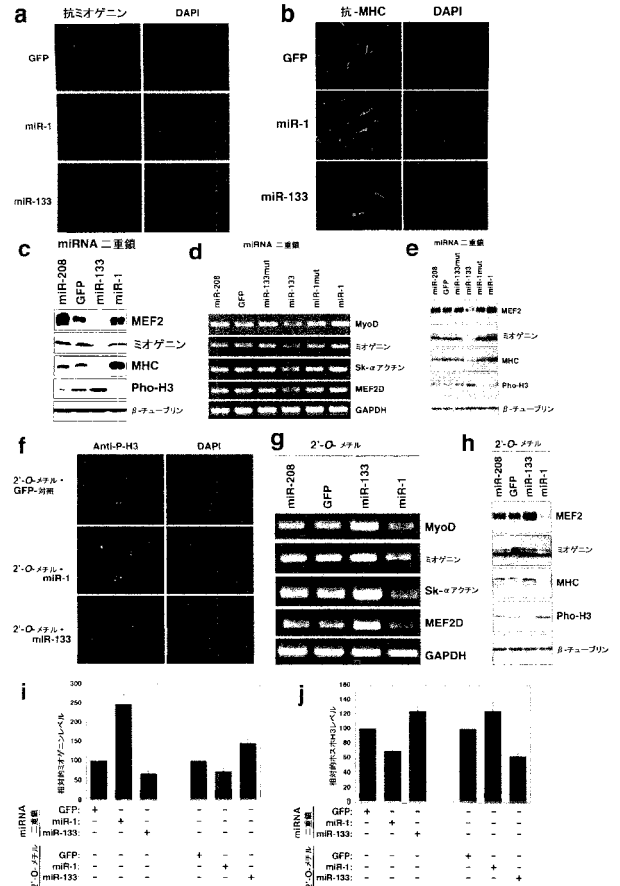
【図 1】



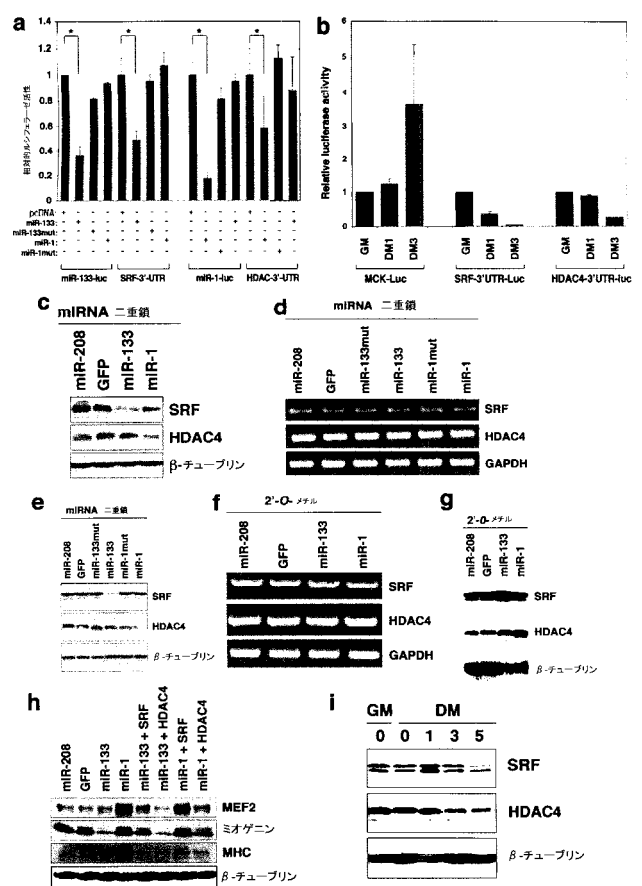
【図 3】



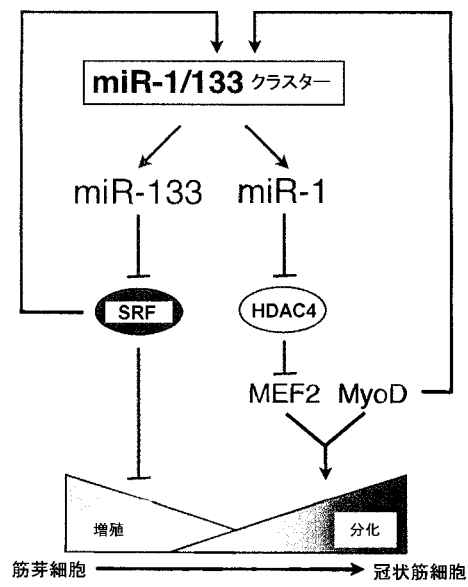
【図 2】



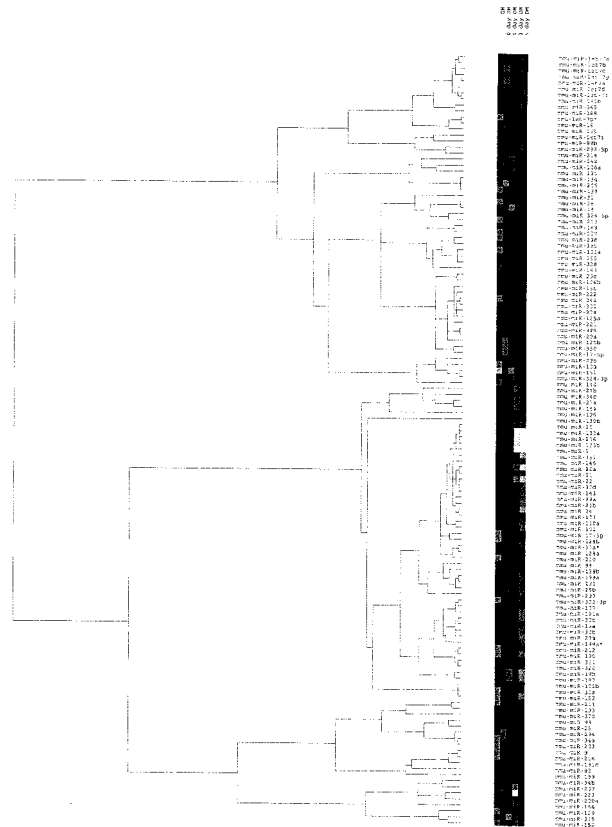
【図 4】



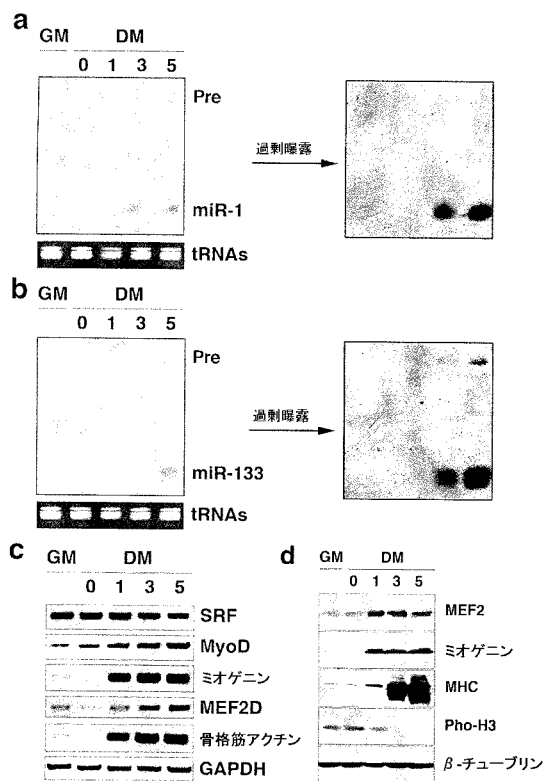
【図 5】



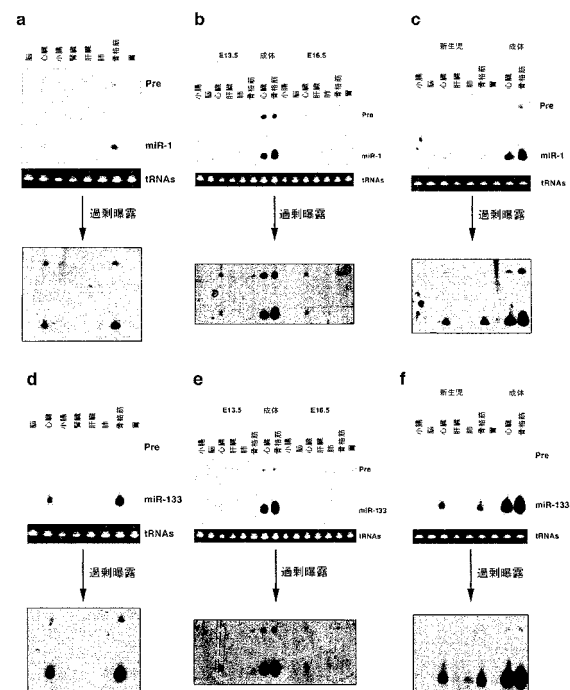
【図 6】



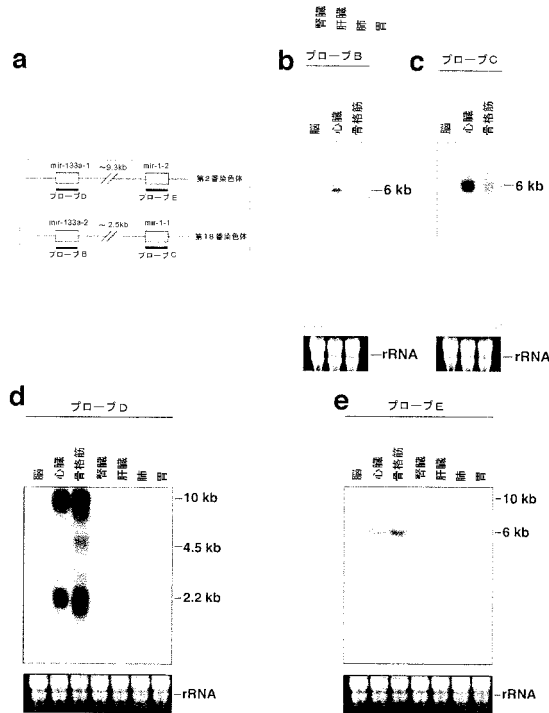
【図 7】



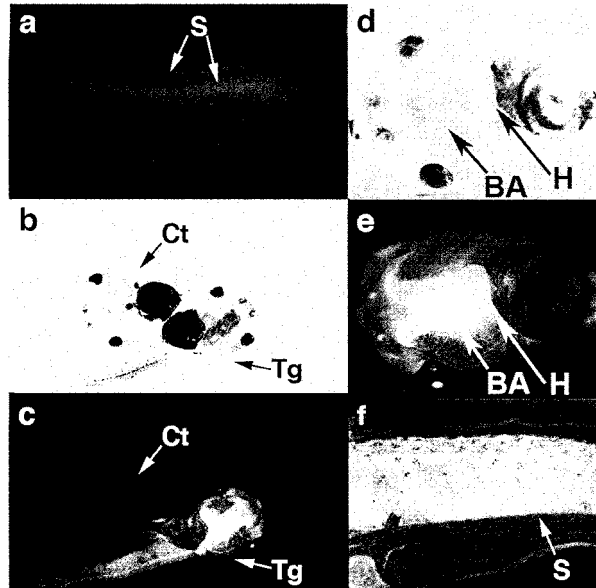
【図 8】



【図 9】



【図 10 A - F】



【図 10 G】

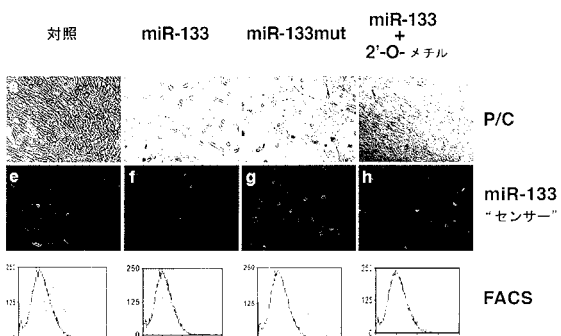
第2番染色体miR-1/133クラスター配列

```

1  GAGCAGTCT  CACTAGGGCC  ACACAGTATC  ATTGAGCATC  GAGCGTGGAA  GGAGCAGAT
61  GGGCCACGTT  TCTCTCCCTC  CTCTGAGCC  TTCTCTCCCT  CTCTCTCTTC  TATATCATTA
121  TATCTCTGCG  GCGATTTTCC  CTCTCTCCAC  TCTCTCCCAT  TCTCTCTCCA  CTCTCATTTT
181  CCCCAGATTC  CATTCTCTCT  ATGCCCTCCC  CCCCAGAGAG  CAGGCTTTCC  ATGAAATACC
241  ACCAAGCATG  GCAATACAGG  TTACATACAG  ATCCAGGACA  AACCTTCTAA  TCAGGCTTGG
301  AAGAGGCGAC  CCAACAGGAG  GAAAGGCGCC  CCAGAGGCGAG  GCAAAAACCT  CCCACTGTTG
361  TGCTCTCTGC  TAGACACAAA  AGCTACACAA  CTATATGTGA  TAGCAGAGG  ACCCAGCTCA
421  GCTCTACAGG  GGTCCGTGTT  TGTGTGACAA  GTTCTGAGGA  ACTCTCTGCG  GCTCTGCTTA
481  GTTGTGCTTG  TGGGTGTTGT  TCTGTGAGCA  TCTCTACATC  CTCTGCTTCC  TACAACTCTT
541  CTCTCTCTCT  TCTTGTGAGT  TCTCTGAGCA  ATGCTGTGAG  TTTGTGTTCC  TGTCTGTTGT
601  GGGCCCTGAC  ATTATTTTCC  GTCACTGCTC  GGAAGCATCT  CCTCTGTTGA  CAGTGTGTTT
661  ATGCACTGAT  CTATGAGGAT  AGCAGAGTAT  CACTAGAGAT  TACTTTATGT  TCTTTTGTTC
721  CAGTGTGTTT  TGGTCTCTTC  CTGAGTCTCT  TGGTGTGCTC  TGTCTGTTCC  CTGAGTCTTC
781  CAGCAGCTCT  CAGTGTGCTC  TCTCTGTTTC  TGGTGTGCTC  TCTCACTTGG  CAGTGTGCTC
841  GTTGTGCTCT  CCAACAGTAT  CTACACACCC  ATTACCTTGG  CAGTGTGCTC  AGCCAGGACA
901  GATGTGCTCT  GGAAGGATTT  ATGCTGCTCT  TATGCTGCTC  TCCAGGCTCT  GGAAGGCTCT
961  CTTGTGTTAA  GAGACAGCTC  AGTCTGCTCT  CAGTGTGCTC  TGTCTGTTAG  AGGATCTCTT
1021  AGGATCTCTC  TCTCTGCTCT  GCAATCTCTC  CAGCAGTCTC  GTTCTGCTCT  GCTCTGCTCT
1081  TACCTCTCTC  AATCTGCTCT  GCTCTGCTCT  GAGCAGTCTC  CCCCAGGCTC  GATCTGCTCT
1141  GTTCTCTCTC  CCACTGCTCT  CCACTGCTCT  TACAGCTCTC  TTTCTCTCTC  CCAGAGGATC
1201  CCACTGCTCT  CTCTGCTCTC  GAGATCTCTC  GTATGCTCTC  TGGATCTCTC  AGCTGCTCTC
1261  CACTGCTCTC  TGTATCTCTC  CCACTGCTCT  TTTGCTCTCT  GGTATCTCTC  CTAGGCTCTC
1321  ATTTGCTCTC  TTTTCTCTCT  AGGCTCTCTC  ATTTGCTCTC  AATGCTCTC  ATGCTCTCTC
1381  TTTTACAGCT  TGAGGATCTC  TCTAGAGCTC  ACATTTCTCT  TATGCTCTCT  TCAGATCTCT
1441  CCCAGTCTCT  GCTATCTCTC  AGGCTCTCTC  GACAGTCTCT  GACAGTCTCT  CTTGTGCTCT
1501  GGAATCTCTC  TCTCTGCTCT  ATATGCTCTC  GAGTGTCTCT  GATGCTCTCT  GAGGATCTCT
1561  AATCTCTCTC  TCTCTGCTCT  ATATGCTCTC  GAGTGTCTCT  GATGCTCTCT  GAGGATCTCT
1621  CTTCTCTCTC  CAACTGCTCT  GTCTCTCTCT  TACTCTCTCT  ACATATCTCT  CAGTGTCTCT
1681  TGTCTCTCTC  GTTCTGCTCT  TTAGCTCTCT  TTAGCTCTCT  AGATCTCTCT  CTCTAGCTCT
1741  CTTCTCTCTC  CATTCTCTCT  CTCTGCTCTC  ATGCTGTCTC  TTTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
1801  CCACTGCTCT  TTTATCTCTC  GAGATCTCTC  TTAGCTCTCT  AGCTCTCTCT  TCTATCTCTC
1861  TATCTCTCTC  TTTATCTCTC  CCACTGCTCT  TTTGCTCTCT  GGTATCTCTC  CTAGGCTCTC
1921  TCTCTCTCTC  GTGCTCTCTC  TGAAGCTCTC  TTTCTCTCTC  GTAGCTCTCT  TCTATCTCTC
1981  AGTCTCTCTC  GCTCTCTCTC  AGCTCTCTCT  TTTCTCTCTC  TCCATCTCTC  TGAATCTCTC
2041  TCTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  ATGCTCTCTC  AGGATCTCTC  CTCTCTCTCT  ATGCTCTCTC
2101  AGGCTCTCTC  CCACTCTCTC  TTTCTCTCTC  TTTCTCTCTC  CTCTCTCTCT  GTTCTCTCTC
2161  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2221  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2281  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2341  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2401  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2461  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2521  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC
2581  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC  TGTCTCTCTC

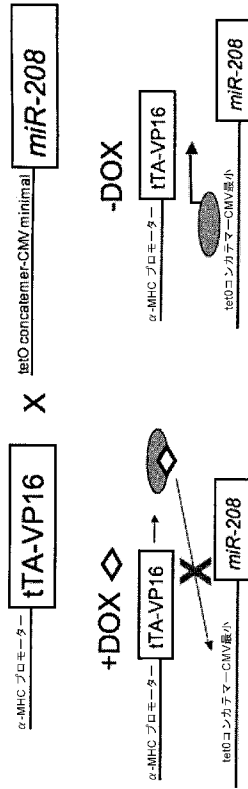
```

【図 11】

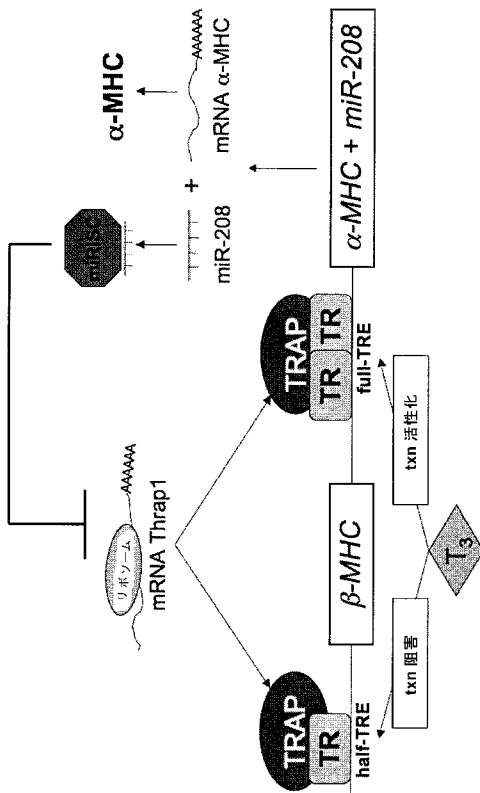




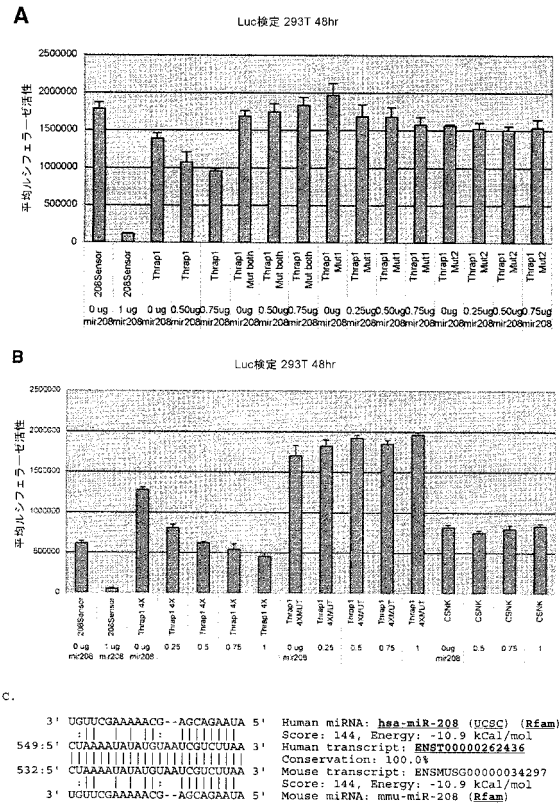
【 図 1 7 】



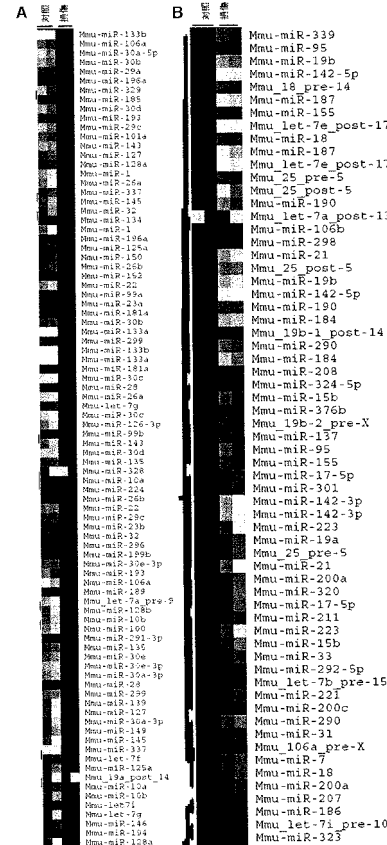
【 図 1 9 】



【 図 1 8 】



【 図 2 0 】



【図 2 1】

**miR-26 (SEQ ID NO:6)**  
 mmu-miR-26a MIMAT0000533  
 UUCAAAGUAAUCCAGGAUAGGC (SEQ ID NO:12)  
 mmu-miR-26b MIMAT0000534  
 UUCAAAGUAAUUCAGGAUAGGUU (SEQ ID NO:13)

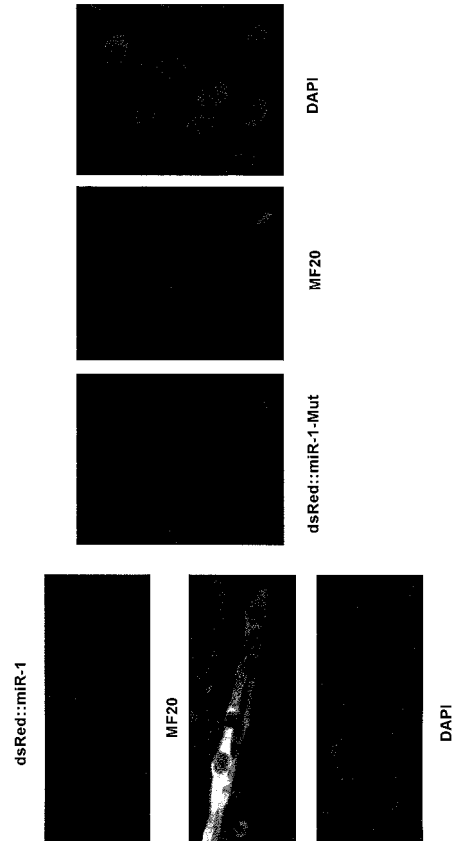
**miR-29 (SEQ ID NO:7)**  
 mmu-miR-29a MIMAT0000535  
 UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU (SEQ ID NO:14)  
 mmu-miR-29b MIMAT0000127  
 UAGCACCAUUGAAAUCAGUGUU (SEQ ID NO:15)  
 mmu-miR-29c MIMAT0000536  
 UAGCACCAUUGAAAUCGGU (SEQ ID NO:16)

**miR-30 (SEQ ID NO:8)**  
 mmu-miR-30a-3p MIMAT0000129  
 CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (SEQ ID NO:17)  
 mmu-miR-30b MIMAT0000130  
 UGUAAACAUCUACACUCAGCU (SEQ ID NO:18)  
 mmu-miR-30e MIMAT0000514  
 UGUAAACAUCUACACUCAGC (SEQ ID NO:19)  
 mmu-miR-30d MIMAT0000515  
 UGUAAACAUCUACACUCAGC (SEQ ID NO:20)  
 mmu-miR-30e\* MIMAT0000249  
 CUUUCAGUCGGAUGUUUACAG (SEQ ID NO:21)

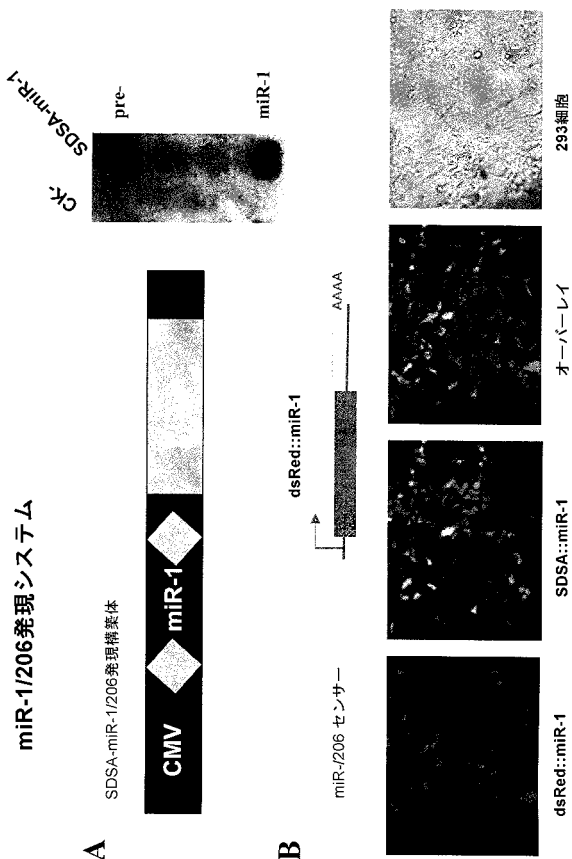
**miR-128 (SEQ ID NO:9)**  
 mmu-miR-128a MIMAT0000140  
 UCACAGUGAACCGGUCUCUUU (SEQ ID NO:22)  
 mmu-miR-128b MIMAT0000675  
 UCACAGUGAACCGGUCUCUUU (SEQ ID NO:23)

【図 2 2】

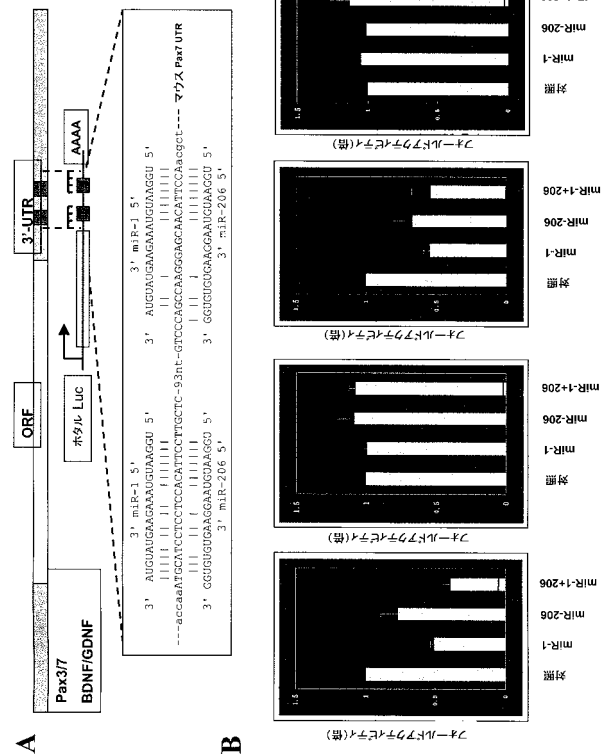
miR-1は骨格筋細胞分化の過程で漸進的に発現する



【図 2 3】

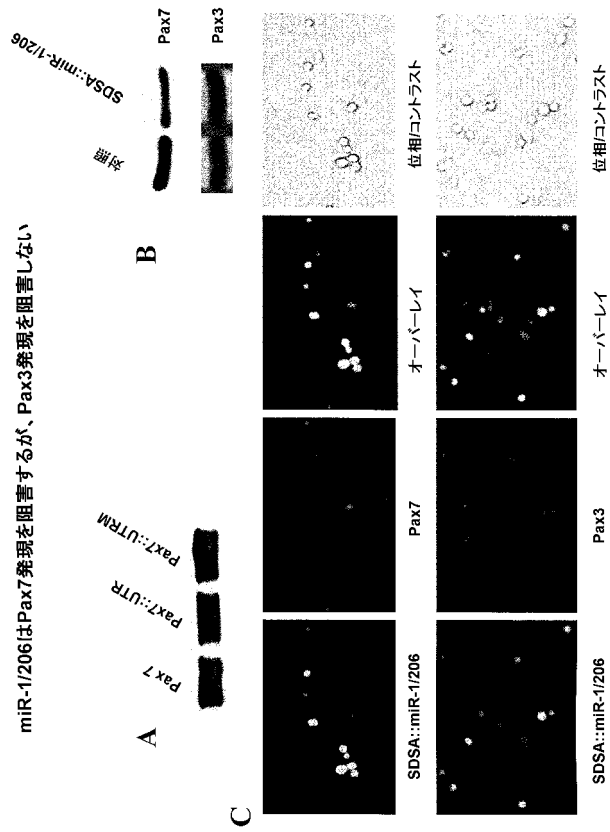


【図 2 4】



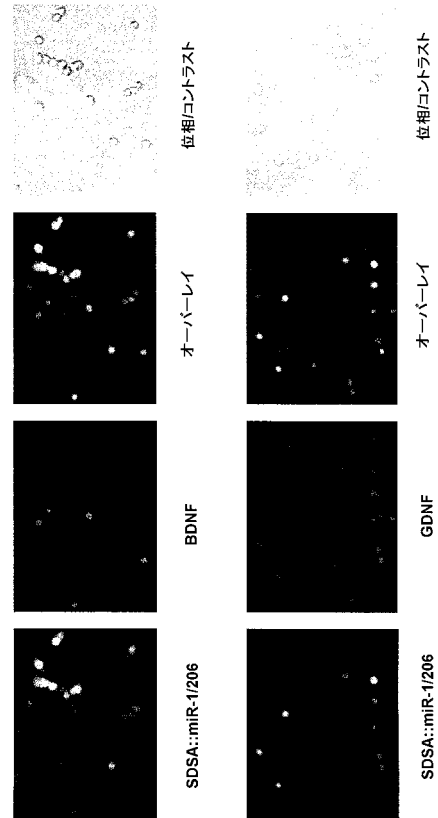


【図 25】

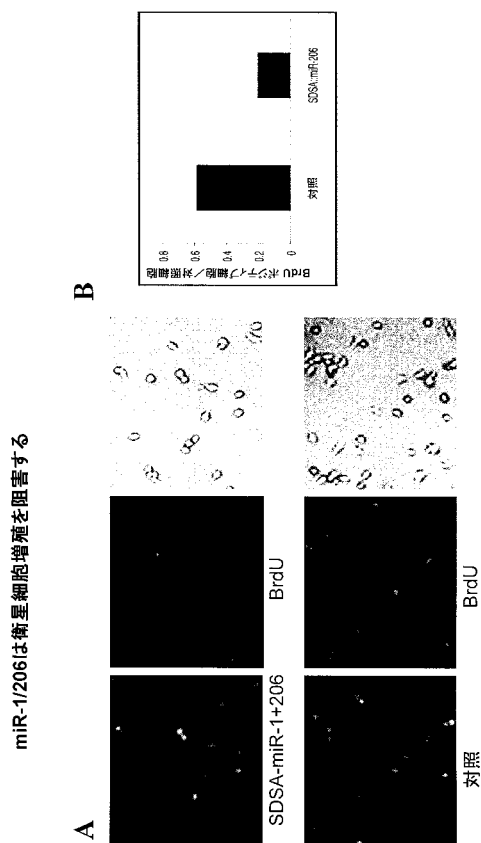


【図 26】

MIR-1/206はBDNF発現を阻害するが、GDNF発現を阻害しない

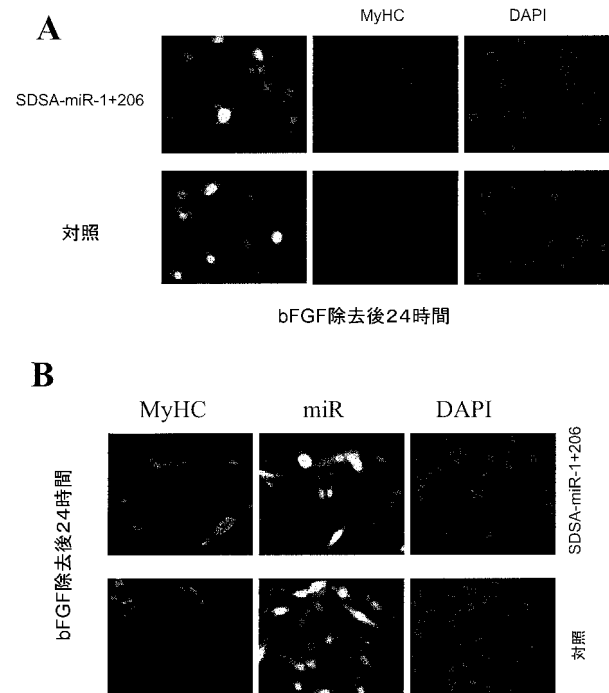


【図 27】



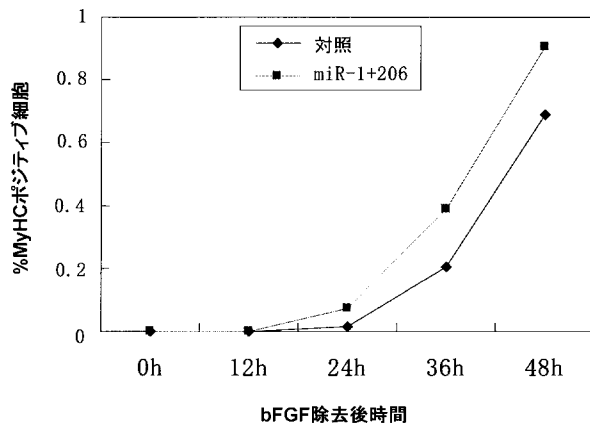
【図 28】

miR-1/206は衛星細胞分化を促進する



【図 29】

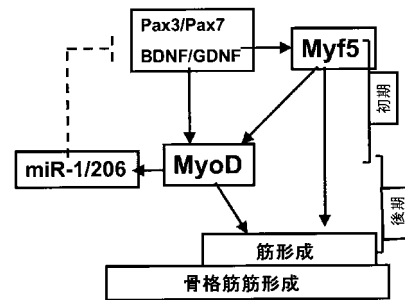
miR-1/206の過剰発現は、衛星細胞分化動特性を促進する



【図 30】

作業モデル：

miR-1/206の発現は、筋肉細胞分化にとって不利であるBDNF/Pax7の要求されないメッセンジャーを抑制することによって、骨格筋の発生的移行を促進する



【手続補正書】

【提出日】平成20年8月11日(2008.8.11)

【手続補正1】

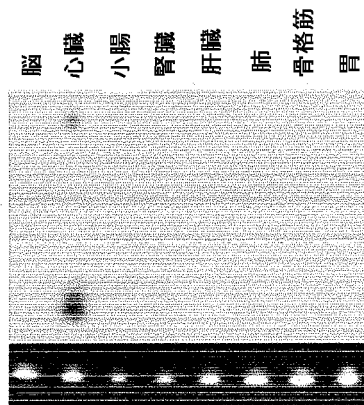
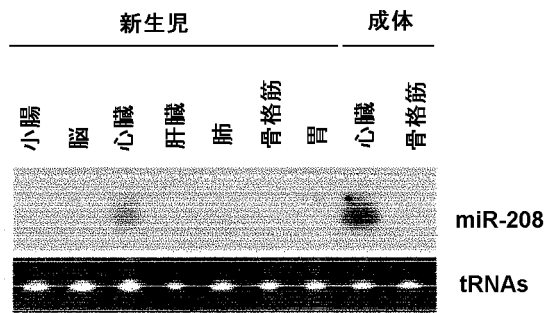
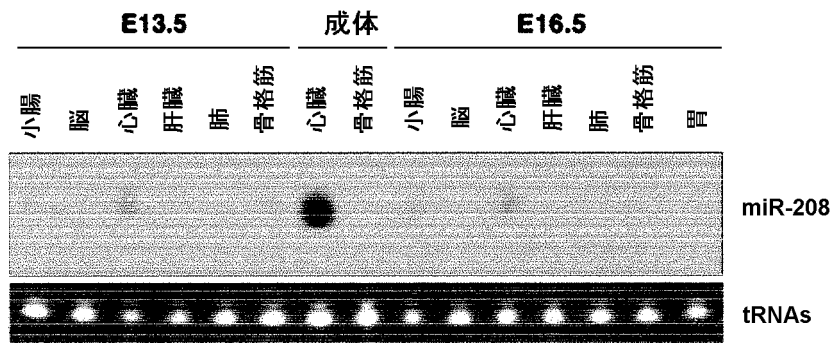
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図15

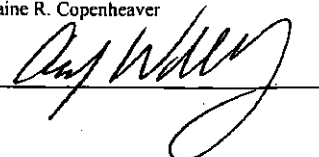
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 15】

**A****B****C**

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2006/047255</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <b>C12N 15/11 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)</b> U.S. CL.: 435/6; 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, WPIDS, MEDLINE, USPATFULL: myocyte, muscle cell, micro RNA, miRNA, stRNA, small temporal RNA, differentiate, proliferate, growth, multiply. USPTO PatFT and AppFT: miR-1, miR-133 (etc), vector, expression.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0059005 A1 (Tuschl et al.), 17 March 2005 See the whole document, particularly Figure 7, Tables 1-6, paragraphs [0019]-[0022], [0024], and all claims.	14-52
Y	As above.	42-52
X	WO 2004/076622 A2 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY), 10 September 2004. See the whole document, particularly summary of the invention on page 4, page 11 line 20 – page 12 line 3, page 71 line 12 – page 73 line 9, page 79 line 24 – page 77 line 6, page 80 line 8 – page 81 line 11, page 82 line 6, and all claims.	14-52
Y	As above.	42-52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 November 2007		Date of mailing of the international search report <b>22 MAY 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer:  Blaine R. Copenheaver Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/047255

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0124566 A1 (Robin et al) 9 June 2005 See the whole document, particularly the abstract, paragraphs [0003], [0012]-[0033], [0062], [0122]-[0158], [0212], [0245]-[0246], [0374]-[0378], and all claims.	1-3, 6-7, 10, 14-17, 20, 23-26, 29-30, 33-35, 38-39, 42-44, 47, 50-52
Y	As above.	4-5, 11-12, 18-19, 21-22, 27-28, 31-32, 36-37, 40-41, 45-46, 48-49
X	US 2004/0242528 (Hagstrom et al) 2 December 2004 See the whole document, particularly the abstract, paragraphs [0004], [0006], [0028]-[0030], [0044], [0046], [0055]-[0060], and Example 13.	1-3, 6-7, 14-17, 20, 23-26, 29, 33-35, 38, 42-44, 50-52
Y	As above.	4-5, 10-12, 18-19, 21-22, 27-28, 30-32, 36-37, 39-41, 45-49
X	US 2004/0157790 A1 (Herweijer et al) 12 August 2004 See the whole document, particularly the abstract, paragraphs [0004], [0006], [0012], [0014]-[0015], [0020], [0023], [0029], [0036]-[0037], [0040], Example 1, and claims 5 and 16.	1-3, 6-7, 14-17, 20, 23-26, 29, 33-35, 38, 42-44, 50-52
Y	As above.	4-5, 10-12, 18-19, 21-22, 27-28, 30-32, 36-37, 39-41, 45-49
Y	Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. <i>Curr Biol.</i> 2002 Apr 30;12(9):735-9. See the whole document.	4-5, 10-12, 18-19, 21-22, 27-28, 30-32, 36-37, 39-52
Y	Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. <i>RNA.</i> 2003 Feb;9(2):175-9. See the whole document.	4-5, 10-12, 18-19, 21-22, 27-28, 30-32, 36-37, 39-52
P, X	WO 2006/107826 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 12 October 2006. See the whole document, particularly the abstract, summary of the invention on pages 2-5, claim 21 and supporting text).  Note: For the Y indications, US 2005/0059005 (D1) may be combined with Lagos-Quintana M et al. (2003), and WO 2004/076622 (D2) may be combined with Lagos-Quintana M et al. (2002 & 2003), for different aspects defined in claims 42-52 (alternative miRNA species). Both D1 and D2 are also indicated as X for claims 42-52, for yet further different aspects provided for in the claims, and which are taught by those documents alone.	1-52

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/047255

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
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:  
Please see Supplemental Box.

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

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/047255

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

**Continuation of Box No: III**

(Please note: claims to a substance or compound "for use" are considered to claim the substance or compound per se, which must at least be suitable for said use. Therefore claim 42 is considered to claim vectors per se, which need only be at least suitable for expressing a miRNA molecule in a myocyte. Please see the PCT INTERNATIONAL SEARCH AND PRELIMINARY EXAMINATION GUIDELINES at part 5.21 for more information of "Use claims".)

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

In assessing whether there is more than one invention claimed, I have given consideration to those features which can be considered to potentially distinguish the claimed combination of features from the prior art. Where different claims have different distinguishing features they define different inventions.

This International Searching Authority has found that there are different inventions as follows:

- Invention 1: Claim 1 and the appended claims thereto. It is considered that treating a muscle injury using a micro RNA (miRNA) or vector encoding the miRNA, or an inhibitor of a miRNA wherein the miRNA is targeted to a gene in a myocyte, comprises a first distinguishing feature.
- Invention 2: Claim 14 and the appended claims thereto. It is considered that a method of modulating myocyte differentiation and/or proliferation using a miRNA or vector encoding the miRNA comprises a second distinguishing feature.
- Invention 3: Claims 23 and 33 and the appended claims thereto. It is considered that methods of modulating or inhibiting gene expression in a myocyte using a miRNA or vectors encoding the miRNA comprise a third distinguishing feature.
- Invention 4: Claim 42 and the appended claims thereto. It is considered that vectors suitable for expressing miRNA molecules in a myocyte comprise a fourth distinguishing feature.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

The only feature common to all of the claims is miRNA and/or vectors encoding miRNAs that can regulate gene expression in cells (including those genes regulated by miR-1, -133, -206, -208, -22, -26, -29, -30, -128, -143, and miR-145). However this concept is not novel in the light of:

US 2005/0059005 A1 (Tuschl et al), Mar. 17, 2005 (see the passages indicated in Box C of the search report).

This means that the common feature can not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, since it makes no contribution over the prior art.

Because the common feature does not satisfy the requirement for being a special technical feature it follows that it cannot provide the necessary technical relationship between the identified inventions. Therefore the claims do not satisfy the requirement of unity of invention *a posteriori*.

This International Searching Authority chose not to invite the applicant to pay additional search fees because all of inventions 1-4 could be searched with no additional effort.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2006/047255

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. These particulars are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	2005059005	CA	2462144	EP	1430128	US	7232806
		WO	03029459				
WO	2004076622	AU	2004215097	CA	2515586	CN	1768139
		EP	1592791	KR	2005011523	US	2006247193
US	2005124566	AU	10904/95	AU	10973/95	AU	15665/95
		AU	18214/95	AU	26422/95	AU	36657/99
		AU	38111/01	AU	38724/99	AU	42229/93
		AU	42489/93	AU	43454/01	AU	44120/96
		AU	47698/93	AU	48760/99	AU	52096/98
		AU	60255/98	AU	67085/98	AU	68041/98
		AU	72905/98	AU	72992/01	AU	73755/94
		AU	74733/00	AU	76662/96	AU	80886/94
		AU	98253/98	AU	2002365084	AU	2002367785
		AU	2003207708	AU	2003210895	AU	2003211058
		AU	2003211082	AU	2003213005	AU	2003213054
		AU	2003213057	AU	2003213090	AU	2003213119
		AU	2003213163	AU	2003213203	AU	2003215161
		AU	2003215203	AU	2003215345	AU	2003216245
		AU	2003216255	AU	2003216265	AU	2003216311
		AU	2003216315	AU	2003216323	AU	2003216324
		AU	2003217550	AU	2003217594	AU	2003219712
		AU	2003219751	AU	2003219781	AU	2003219817
		AU	2003219818	AU	2003219833	AU	2003220136
		AU	2003221258	AU	2003228667	AU	2003245512
		AU	2003247204	AU	2004266311	AU	2004274951
		AU	2004288143	AU	2005201389	AU	2005212433
		AU	2006336384	CA	2135499	CA	2135646
		CA	2140343	CA	2168566	CA	2169645
		CA	2174339	CA	2175824	CA	2176035
		CA	2180740	CA	2183992	CA	2190513
		CA	2207593	CA	2235368	CA	2279548
		CA	2288640	CA	2326695	CA	2330574



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2006/047255**

CA	2398282	CA	2400415	CA	2403243
CA	2414256	CA	2442092	CA	2447161
CA	2448320	CA	2455447	CA	2455506
CA	2456444	CA	2457528	CA	2459532
CA	2463595	CA	2468048	CA	2471421
CA	2476112	CA	2476394	CA	2477014
CA	2526831	CA	2528963	CA	2537085
CA	2541643	CA	2542527	CA	2542835
CA	2543013	CA	2543029	CA	2543030
CA	2554212	CA	2597724	CN	1312856
EP	0641212	EP	0642589	EP	0654077
EP	0716693	EP	0725788	EP	0728204
EP	0728205	EP	0737247	EP	0746614
EP	0748382	EP	0763106	EP	0786522
EP	0799313	EP	0859837	EP	0980424
EP	0986637	EP	1073732	EP	1075508
EP	1212416	EP	1251170	EP	1253199
EP	1260586	EP	1263947	EP	1265995
EP	1288296	EP	1321521	EP	1383782
EP	1386004	EP	1390385	EP	1390472
EP	1408111	EP	1423404	EP	1423406
EP	1430157	EP	1432724	EP	1432725
EP	1436314	EP	1442143	EP	1448580
EP	1448590	EP	1458741	EP	1463842
EP	1465910	EP	1470256	EP	1470257
EP	1472265	EP	1472267	EP	1472269
EP	1474433	EP	1476457	EP	1476458
EP	1476459	EP	1476574	EP	1478730
EP	1493818	EP	1495041	EP	1499628
EP	1499631	EP	1501853	EP	1502950
EP	1521768	EP	1522583	EP	1549660
EP	1572067	EP	1572128	EP	1602725
EP	1622572	EP	1627061	EP	1644498
EP	1644500	EP	1664299	EP	1670915
EP	1675948	EP	1675949	EP	1675950
EP	1675951	EP	1675953	EP	1682660
EP	1682661	EP	1694838	EP	1710307

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2006/047255**

EP	1713915	EP	1735443	EP	1741781
EP	1767632	EP	1817415	EP	1844147
GB	2396155	GB	2396616	GB	2396864
GB	2397062	GB	2397818	GB	2406568
GB	2406569	GB	2413557	GB	2415961
ID	28053	JP	2000342285	JP	2000342286
JP	2004147666	JP	2005118056	JP	2006271387
JP	2007300926	MX	9302726	MX	9302808
MX	9304329	MX	9406022	MX	9603638
US	5496698	US	5525468	US	5610054
US	5612215	US	5616488	US	5616490
US	5622854	US	5627053	US	5631359
US	5631360	US	5639647	US	5646020
US	5646042	US	5658780	US	5672501
US	5672511	US	5686599	US	5693532
US	5693535	US	5714383	US	5716824
US	5731295	US	5767263	US	5783425
US	5795778	US	5804683	US	5811300
US	5817796	US	5831071	US	5837542
US	5837855	US	5840876	US	5869253
US	5877021	US	5879938	US	5891683
US	5891684	US	5902880	US	5972699
US	5972704	US	5977343	US	5985621
US	6017756	US	6022962	US	6054576
US	6057156	US	6093555	US	6103890
US	6117657	US	6127535	US	6132966
US	6132967	US	6146886	US	6159692
US	6162909	US	6183959	US	6194150
US	6239272	US	6258585	US	6280936
US	6303773	US	6316612	US	6346398
US	6353098	US	6362323	US	6365374
US	6379954	US	6410224	US	6432704
US	6436644	US	6437117	US	6440719
US	6448009	US	6451540	US	6469158
US	6482932	US	6489465	US	6509460
US	6528639	US	6528640	US	6548657
US	6555668	US	6566127	US	6617438

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2006/047255

US 6623962	US 6649751	US 6673918
US 6797815	US 6818447	US 6818759
US 6849726	US 6852535	US 7022828
US 7034009	US 7041817	US 7109165
US 7176304	US 7315983	US 2001006801
US 2001012618	US 2002013458	US 2002028919
US 2002036654	US 2002082225	US 2002102568
US 2002103366	US 2002177568	US 2002192685
US 2002193579	US 2002197684	US 2003003469
US 2003004122	US 2003008295	US 2003050259
US 2003060611	US 2003064945	US 2003065155
US 2003068301	US 2003073207	US 2003088087
US 2003092003	US 2003092646	US 2003104985
US 2003105051	US 2003105308	US 2003113891
US 2003119017	US 2003124513	US 2003125270
US 2003125291	US 2003130186	US 2003140362
US 2003143708	US 2003143732	US 2003144489
US 2003148507	US 2003148985	US 2003153521
US 2003165900	US 2003165969	US 2003166896
US 2003166917	US 2003170644	US 2003170891
US 2003171311	US 2003175950	US 2003186909
US 2003190635	US 2003191077	US 2003203870
US 2003206887	US 2003207837	US 2003216335
US 2004006035	US 2004009510	US 2004019001
US 2004023292	US 2004054156	US 2004077565
US 2004102389	US 2004102413	US 2004110296
US 2004127446	US 2004138163	US 2004142895
US 2004147735	US 2004161758	US 2004192626
US 2004198682	US 2004209831	US 2004209832
US 2004219671	US 2004220128	US 2004249178
US 2005014172	US 2005020525	US 2005032733
US 2005048529	US 2005054596	US 2005054598
US 2005070497	US 2005075304	US 2005079610
US 2005080031	US 2005096284	US 2005106726
US 2005119211	US 2005119212	US 2005124567
US 2005124568	US 2005124569	US 2005130181
US 2005136436	US 2005137153	US 2005137155

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2006/047255

US	2005142578	US	2005143333	US	2005148530
US	2005153914	US	2005153915	US	2005153916
US	2005158735	US	2005159376	US	2005159378
US	2005159379	US	2005159380	US	2005159381
US	2005159382	US	2005164224	US	2005164966
US	2005164967	US	2005164968	US	2005170371
US	2005171039	US	2005171040	US	2005176024
US	2005176025	US	2005176038	US	2005176663
US	2005176664	US	2005176665	US	2005176666
US	2005182006	US	2005182007	US	2005182008
US	2005182009	US	2005187174	US	2005191618
US	2005191638	US	2005196765	US	2005196767
US	2005196781	US	2005203040	US	2005209179
US	2005209180	US	2005209182	US	2005222064
US	2005222066	US	2005227935	US	2005227936
US	2005227937	US	2005233329	US	2005233344
US	2005233996	US	2005233997	US	2005233998
US	2005239731	US	2005239739	US	2005256068
US	2005260620	US	2005261212	US	2005261219
US	2005266422	US	2005267058	US	2005277133
US	2005277608	US	2005282188	US	2005287128
US	2005288242	US	2006019913	US	2006019917
US	2006025361	US	2006127891	US	2006142225
US	2006142226	US	2006142557	US	2006148743
US	2006154271	US	2006160757	US	2006211642
US	2006216747	US	2006217331	US	2006217332
US	2006217334	US	2006217335	US	2006217336
US	2006217337	US	2006223990	US	2006240554
US	2006241075	US	2006247194	US	2006247428
US	2006247429	US	2006270623	US	2006275903
US	2006276422	US	2006276635	US	2006281175
US	2006287266	US	2006287267	US	2006292691
US	2006293271	US	2006293272	US	2007004663
US	2007004664	US	2007004665	US	2007004667
US	2007026394	US	2007032441	US	2007042029
US	2007042983	US	2007049543	US	2007093437
US	2007099858	US	2007160980	US	2007161596

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2006/047255

US	2007167393	US	2007173467	US	2007173473
US	2007179104	US	2007185043	US	2007185049
US	2007203333	US	2007266326	US	2007270360
US	2007270579	US	2008020058	WO	0116312
WO	0159103	WO	0166721	WO	0201391
WO	9323057	WO	9323569	WO	9402595
WO	9504818	WO	9511910	WO	9513378
WO	9513380	WO	9519429	WO	9523225
WO	9531541	WO	9618736	WO	9715662
WO	9833893	WO	9850530	WO	9955847
WO	9955857	WO	02081494	WO	02081628
WO	02094185	WO	02096927	WO	02097114
WO	03057709	WO	03070193	WO	03070197
WO	03070742	WO	03070743	WO	03070744
WO	03070750	WO	03070881	WO	03070884
WO	03070885	WO	03070886	WO	03070887
WO	03070888	WO	03070895	WO	03070896
WO	03070897	WO	03070903	WO	03070910
WO	03070911	WO	03070912	WO	03070914
WO	03070917	WO	03070918	WO	03070966
WO	03070968	WO	03070969	WO	03070970
WO	03070972	WO	03070983	WO	03072590
WO	03072704	WO	03072705	WO	03074654
WO	03089650	WO	03102131	WO	03106476
WO	2004092383	WO	2004097020	WO	2004111237
WO	2005003350	WO	2005007854	WO	2005007855
WO	2005007859	WO	2005014811	WO	2005019453
WO	2005028649	WO	2005028650	WO	2005035759
WO	2005040379	WO	2005041859	WO	2005044981
WO	2005045032	WO	2005045034	WO	2005045035
WO	2005045036	WO	2005045037	WO	2005045038
WO	2005045039	WO	2005045040	WO	2005045041
WO	2005078097	WO	2005105995	WO	2006060598
WO	2006078798	WO	2006128141	WO	2007022369
WO	2007067981	WO	2007076328	WO	2007084865
WO	2007086881	WO	2007086883	WO	2007092059
WO	2007147143	WO	2008011431		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2006/047255

US	2004242528	AU	2004242978	CA	2527303	EP	1075283
		EP	1098667	EP	1102784	EP	1102785
		EP	1113836	EP	1161547	EP	1233671
		EP	1246649	EP	1397043	EP	1427450
		EP	1458870	EP	1461052	EP	1506218
		EP	1581053	EP	1597357	EP	1610612
		EP	1626755	EP	1636385	EP	1646282
		EP	1651239	EP	1660099	EP	1667728
		EP	1679964	MX	PA05012253	US	6265387
		US	6379966	US	6627616	US	6630351
		US	6740643	US	6818626	US	6867196
		US	6897068	US	7015040	US	7019113
		US	7101995	US	7138382	US	7144869
		US	7148205	US	7214369	US	2001004636
		US	2001008882	US	2001009904	US	2001019723
		US	2001044412	US	2002001574	US	2002052335
		US	2002132788	US	2002137707	US	2002165183
		US	2003092180	US	2003125281	US	2003130224
		US	2003143204	US	2003166280	US	2003216347
		US	2003220264	US	2004019007	US	2004019008
		US	2004058446	US	2004067907	US	2004072785
		US	2004106567	US	2004110697	US	2004137064
		US	2004137625	US	2004197318	US	2004198678
		US	2004198687	US	2004224879	US	2004229358
		US	2004259828	US	2005036995	US	2005037989
		US	2005143332	US	2005153451	US	2005182013
		US	2005192242	US	2005222075	US	2005250683
		US	2005260270	US	2006063731	US	2006093584
		US	2006122096	US	2006189553	US	2007021364
		US	2007036865	US	2007105804	US	2007128169
		US	2007173465	US	2007219363	US	2007244067
		WO	0003738	WO	0015285	WO	0050617
		WO	0075162	WO	0075164	WO	0132223
		WO	0137665	WO	9955379	WO	02095048
		WO	03040375	WO	03048338	WO	03080794
		WO	03100081	WO	2004062368	WO	2004065587
		WO	2004090107	WO	2004105836	WO	2005004879

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2006/047255**

	WO	2005006864	WO	2005009346	WO	2005009476
	WO	2005016355	WO	2005017098	WO	2005116045
US	2004157790	EP	1587925	WO	2004072248	
WO	2006107826	CA	2603881	EP	1877557	US 2006246491
						END OF ANNEX

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	
<b>A 6 1 K 31/711 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/711	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, GT, 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, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100110249  
弁理士 下田 昭

(74)代理人 100113022  
弁理士 赤尾 謙一郎

(72)発明者 ダジ ワン  
アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2 7 5 1 6、チャペル ヒル、ブレンダン コート 1 0  
0 2

(72)発明者 ジャンフ チェン  
アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2 7 5 1 4、チャペル ヒル、コナー ドライブ 2 0 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 DA02 EA04 GA11 HA17  
4B065 AA90X AB01 BA02 CA44  
4C084 AA13 MA16 MA52 MA55 MA63 MA65 MA66 MA67 NA13 NA14  
ZA361 ZA362 ZA941 ZA942 ZB211 ZB212  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA65 NA13 NA14 ZA36 ZA94  
ZB21  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA65 NA13 NA14 ZA36 ZA94 ZB21