

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年2月3日 (03.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/010189 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, A61K 31/7105, 31/713, 48/00, A61P 5/24, 5/30, 15/00, 15/08, 15/16, 15/18, 35/00, 35/02, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003449
- (22) 国際出願日: 2004年3月15日 (15.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-278429 2003年7月23日 (23.07.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4-1-8 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菅原 照夫 (SUGAWARA, Teruo) [JP/JP]; 〒0010024 北海道札幌市北区北24条西12丁目1-7-1112 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 下田 昭 (SHIMODA, Akira); 〒1040031 東京都中央区京橋3-3-4京橋日英ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE INHIBITING THE EXPRESSION OF StAR-BINDING PROTEIN (SBP) GENE AND METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: StAR結合蛋白質(SBP)遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチド及び方法

(57) Abstract: A means of inhibiting the production of an StAR-binding protein which binds to StAR protein serving as a cholesterol transportation promoter and thus controls the function of the StAR protein. By damaging its function, apoptosis is introduced specifically to a cancer cell. A protein interacting with StAR protein is found out. Then an RNA fragment homologous with a gene sequence specific to this StAR-binding protein (SBP) is synthesized and introduced into a cancer cell. As a result, it is confirmed that the expression of the StAR-binding protein is thus inhibited and, furthermore, the appearance of an apoptotic cell is confirmed.

(57) 要約: コレステロール輸送促進因子であるStAR蛋白質と結合し、StAR蛋白質の機能を調節するStAR結合蛋白質の産生を抑制する手段に関し、更にその機能を傷害することにより癌細胞に特異的にアポトーシスを導入する。StAR蛋白質と相互作用する蛋白質を見出し、このStAR結合蛋白質(SBP)に特異的な遺伝子配列と相同なRNA断片を合成し、癌細胞内に導入した。その結果、StAR結合蛋白質の発現が抑制されることを確認し、更にアポトーシス細胞の出現を確認した。

WO 2005/010189 A1

明 細 書

StAR 結合蛋白質 (SBP) 遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチド及び方法

5 技術分野

この発明は、コレステロール輸送促進因子である StAR 蛋白質と結合し、StAR 蛋白質の機能を調節する StAR 結合蛋白質の産生を抑制する手段に関し、更にその機能を傷害することにより癌細胞に特異的にアポトーシスを導入する手段に関する。

10

従来技術

StAR 蛋白質 (急性調節性蛋白質) はミトコンドリア外膜から内側へのコレステロールの輸送において重要な役割を演ずる (Endocr. Rev. 17, 221-224 (1996))。StAR 蛋白質は細胞質でステロイドホルモン生成を促進すると考え

15

られる (Recent Prog Horm Res 54, 369-94 (1999))。

一方、アポトーシスは変性したり、悪性変化した細胞を生体から除去する生体作用である。癌細胞では放射線や化学療法で生じ、癌の治療に用いられてきたが、癌細胞に対する特異性が低く、有効とはいえなかった。そのため、細胞膜を構成するコレステロールの輸送促進因子である StAR 蛋白質の機能を調節することにより、癌細胞にアポトーシスを導入することができるのではないかと考えられて

20

きた (Proc Natl Acad Sci USA 99, 6943-6948 (2002))。

なお、本発明では、細胞内に RNA 断片を導入することによりその遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉技術 (RNA interference) を利用した (Nature, 391, 806-811 (1998); 特表 2002-516062)。

25

発明が解決しようとする課題

癌細胞は分裂増殖する速度が正常の細胞よりも早く、細胞内の物質の代謝も正常細胞に比べると早い。そのため、本発明は、細胞膜を構成するコレステロールの代謝に着目して、コレステロール輸送促進因子である StAR 蛋白質と結合し、

StAR 蛋白質の機能を調節する蛋白質の産生を抑制して細胞の機能を傷害することにより癌細胞に特異的にアポトーシスを導入することを目的とした。

課題を解決するための手段

- 5 本発明者は、ステロイドホルモン産生細胞の細胞質における S t A R 蛋白質のステロイドホルモンの生成を促進する機構を研究する過程において、この S t A R 蛋白質と相互作用する蛋白質をスクリーニングしたところ、得られたクローンの一つが 2. 3 k b の挿入遺伝子を含んでおり、このクローンと S t A R 蛋白質が相互作用していることを確認した。この挿入遺伝子の翻訳産物は StAR 蛋白質
- 10 結合蛋白質 (SBP、DDBJ Accession number AB112474 (80..2428), AB112475 (431..2779)、配列番号 1) であることが分かった。

- 本発明者は、RNA 干渉技術 (Nature, 391, 806-811 (1998); 特表 2002-516062) を利用して、この StAR 結合蛋白質に特異的な遺伝子配列と相同な RNA 断片を合成し、癌細胞内に導入した。その結果、StAR 結合蛋白質の発現
- 15 が抑制されることを確認し、更にアポトーシス細胞の出現を確認した。

- 即ち、本発明は、配列番号 1 (ヒト StAR 結合蛋白質遺伝子) の塩基配列における、その 1 8 7 ~ 2 0 5 又は 4 7 4 ~ 4 9 4 を含む連続する 2 3 塩基以下の塩基配列に相当するオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA である。この 2 3 塩基以下の塩基配列は、配列
- 20 番号 1 の塩基配列の 1 8 7 ~ 2 0 5 又は 4 7 4 ~ 4 9 4 の塩基配列であることが好ましい。

また、本発明は、上記オリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA を、癌細胞へ導入することから成る、該細胞における SBP 遺伝子の発現を抑制する方法である。

- 25 更に、本発明は、上記オリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA を含み、該オリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る 2 本鎖 RNA を癌細胞へ導入する手段を含む癌治療用キットである。

図面の簡単な説明

第1図は、StAR蛋白質とクローン4のプルダウンアッセイの結果を示す。

第2図は、ヒト組織におけるSBP遺伝子発現を示す。

第3図は、種々の細胞株におけるSBP遺伝子発現を示す。HepG2はヒトの肝癌
5 細胞、KGNはヒトの顆粒膜癌細胞、H295Rはヒトの副腎癌細胞、MCF-7はヒト
の乳がん細胞を示す。

第4図は、ステロイド生成に対するSBPの効果を示す。値はチトクロームP450
sccシステムとSBPを $0.05\mu\text{g}$ を共導入したプレグネノロンの産生量の増加量
で表した。

10 第5図は、siRNA-SBP-I及びsiRNA-SBP-IIで処理したH295R細胞により生
産されるプレグネノロンの量を示す。

第6図は、siRNA-SBP-I及びsiRNA-SBP-IIで処理したKGN細胞により生産
されるプレグネノロンの量を示す。

第7図は、siRNA(SBP II)の導入によるアポトーシス細胞の出現を示す。Aは
15 、siRNA-Scramble、Bは、siRNA-SBP IIを遺伝子導入したもの、Cは、Bを
DNAase処理したものを示す。

発明の実施の形態

本発明で用いるRNA断片としては、標的RNAのセンス又はアンチセンスの
20 ものもよいが、これらはRNaseで容易に分解され、また効果が劣ると考えら
れるため、これらから成る2本鎖RNAが好ましく用いられる。この2本鎖RNA
は通常センスとアンチセンスの2本を別々に合成し、それをハイブリダイズさ
せて2本鎖にして用いられる。

このRNA断片の長さは21～23塩基が有効と考えられているが、一般には
25 21塩基のものが好ましく使われ、後述の実施例においても21塩基のもので有
効に機能している。

本発明においては対象とする細胞はヒト等の癌細胞である。

これらのSBP遺伝子の特定の塩基配列に「相当する」オリゴヌクレオチド
とは、この遺伝子が転写されて生成するmRNAの、SBP遺伝子の特定の塩基配

列に相当する部分に相補的なRNAという意味であり、具体的にはこのSBP遺伝子の特定のDNA配列のTをUに置き換えたものという意味である。

RNA断片を細胞に導入する手段については、特に制限はなく、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション、ウイルスベクターを用いる方法などが挙げられるが、リボソーム等に基づく市販のトランスフェクション試薬を用いるのが簡便である。

本発明のsiRNA及びこれを用いた方法は、固形癌：上皮性癌（胃がん、肺癌、肝臓ガン、すい臓癌など）、非固形癌：白血病、悪性リンパ腫、悪性肉腫（骨肉腫、線維肉腫など）の抗癌剤および抗悪性腫瘍剤、ステロイドホルモン依存性悪性腫瘍のホルモン療法（乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、卵巣癌など）、エストロゲン依存性の良性疾患の治療薬（子宮内膜症、子宮筋腫など）、精子成熟の促進や抑制、排卵誘発剤、避妊薬、思春期早発症の治療、性同一性障害の治療等に利用することができる。

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。この実施例で用いたプラスミドと細胞については下記のように調整及び培養を行った。

プラスミドの構築

ヒトStAR cDNAを鋳型としてPCRで作製したEcoRI断片を、転写因子GAL4活性化ドメイン(GAD)を有するpACT2ベクター(CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)に挿入し、ミトコンドリア輸送シグナルである最初の62アミノ酸を除いて、プラスミドを構築した。このプラスミドは転写因子GAL4とミトコンドリア輸送シグナルを欠くStAR(即ち、N-62-StAR)の融合タンパク質(GAL4-N-62-StAR)を発現する。

同様に、GAL4-StAR変異体(GAL4-R193X, GAL4-Q253X, GAL4-frameshift)を作製した。

また、ヒトN-62-StAR cDNAから作製したEcoRI断片を、単純性疱疹ウイルスのVP16タンパク質由来の活性化ドメイン(AD)を有するpVP16ベクター(CLO

NTECH Laboratories, Inc.)に挿入し、プラスミド(pVP16-StAR)を構築した。

また、SBP cDNA の EcoRI/BamHI 断片を、GAL4 DNA 結合ドメイン(DNA-BD)を有する pM ベクター (CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入し、プラスミド(pM-SBP)を構築した。

更に、SBP の EcoRI/BamHI 断片を pVP16 ベクター (CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入し、プラスミド(pVP16-SBP)を構築した。

pM-StAR プラスミドを作製するために、N-62-StAR の EcoRI 断片をクローニングして pM ベクター (CLONTECH Laboratories, Inc.)に挿入した。

10 PG5luc (Promega Corp., Madison, WI) は CAT 遺伝子又はルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして含む。RACE の結果、精巢 cDNA から PCR で得た完全コード領域の EcoRI 断片を pTarget ベクター (Promega Corp.)に挿入し、発現プラスミド(pSBP)を得た。

これらのプラスミドは Qiagen Maxiprep システム (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてトランスフェクトした。

細胞培養

COS-1 細胞及びヒト G2 細胞は理研細胞バンクから入手した。ヒト副腎皮質癌腫 H295R 細胞は大阪大学岡本博士から得た。ヒト MCF-7 胸癌細胞は ATCC (Manassas, VA) から得た。ヒト顆粒層様腫瘍 KGN 細胞は九州大学西博士から得た。

COS-1 細胞は 35mm プラスチック皿で増殖し、10%胎児ウシ血清及び 50 μ g/ml のゲンタマイシンを添加した DMEM 培地で培養した。

KGN 細胞は 10%胎児ウシ血清及び 50 μ g/ml のゲンタマイシンを含む DMEM/F12 培地で培養した。

25 H295R 細胞は 2%ULTROSER G (BioSeptra, Cergy-Pontoise, France) 及び 1%ITS Premix (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) を含む DMEM/F12 培地で培養した。

実施例 1

本実施例では、GAL4 ベースの酵母 2 ハイブリッドシステムを用いて、StAR タンパク質と相互作用するタンパク質を特定した。

酵母 2 ハイブリッド相互作用スクリーニングは以下のようにして行った。

ヒト精巢 cDNA を組み込んだ pACT2 プラスミドと、転写因子 GAL4 とミトコン
5 ドリア輸送シグナルを欠く StAR (即ち、N-62-StAR) の融合タンパク質 (GAL4-N-62-StAR) を発現するレポーター遺伝子を酵母株 CG-1945 に導入した (MAT α
, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 11
2, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA
3::GAL417-mers (x3)-CyC1_{TATA}-lacZ) (MATCHMAKER Two-Hybrid System 2, C
10 LONTECH)。 1×10^6 形質転換株を、ヒスチジン、ロイシン及びトリプトファン
を欠く選択的合成培地 (SD) で、30°C で 5 日間培養した。全酵母 DNA を大腸菌株
HB101 にエレクトロポレーションにより導入し、ロイシンを欠く M9 培地で選択
した後、全ての HIS⁺ 及び LacZ⁺ クローンからプラスミド DNA を単離した。

その結果、9 クローンが得られた。DNA シークエンスとデータベース分析から
15 、これらのクローンは 3 つのグループに分けられることが分かった。即ち、表 1
に示すように、 α ヘリックスコイルドコイルロッドホモログ (HCR, accession
NM019052)、rabaptin-5 (RAB5EP, accession NM 004703)、及び nucle
obindin 2 (NUCB2, accession NM 005013) である。HEC と NUCB2 は La
cZ 表現型を発現する。これらのクローンにコードされるタンパク質の細胞間局在
20 予想から、クローン 4 を選択して分析した。

その結果、クローン 4 は推定細胞質タンパク質をコードする 2.3Kb の挿入遺
伝子を含み、657 アミノ酸から成るタンパク質をコードする 1972nt のオープン
リードフレームと 3 末端に 62nt の未翻訳配列を有することが分かった。

表 1

Clone	Insert size (kb)	Identity	Colony color
1	-	-	
4	2.3	HCR	positive
5	2.2	HCR	positive
11	3.8	RAB5EP	negative
26	2.6	NUCB2	positive
36	0.8	HCR	negative
44	-	-	
45	4.3	RAB5EP	negative
49	2	HCR	positive

実施例 2

- 5 本実施例では、インビボで StAR タンパク質とクローン 4 の相互作用を調べるために、GAD-クローン 4 融合タンパク質を発現するプラスミド及び GAL4-N-62-StAR と GAL4-StAR 変異体融合タンパク質を発現するプラスミドを調べた。

この検査には、MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, 1
eu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3::GAL417-mers(x3)-CyC1_{TATA}-lacZ
10 cZ の遺伝子型を持つ酵母株 Y187 (CLONTECH Laboratories, Inc.) を用いた。
プラスミド GAL4 及び GAD 融合構築物により Y187 株を形質転換した。この形質転換体をロイシン及びトリプトファンを欠く選択培地 (SD) で 30°C で 5 日間培養した。X-gal フィルター検査を用いて、 β ガラクトシダーゼ活性を決定した。

クローン 4 を GAL4 に融合させたリバーコンビネーションと N-62-StAR を
15 GAD に融合させたリバーコンビネーションを用いてトランスフェクトを行った
結果は、表 2 に示すように、StAR とクローン 4 ハイブリッドベクターでトランスフェクトした酵母は LacZ 表現型を示したが、StAR 変異体とクローン 4 ハイブリッドベクターでトランスフェクトした酵母は LacZ 表現型を示さなかった。
このことは、酵母の中で N-62-StAR がクローン 4 と相互作用していることを示
20 している。

表 2

DNA-BD	AD	LacZ Phenotype
GAL4	GAD	white
GAL4-N-62-StAR	GAD-Clone 4	blue
GAL4-Clone4	GAD-N-62-StAR	weak blue
GAL4-R193X	GAD-Clone 4	white
GAL4-Q258X	GAD-Clone 4	white
GAL4-Frameshift	GAD-Clone 4	white

実施例 3

- 5 本実施例では、StAR タンパク質とクローン 4 の直接相互作用を調べるために、プルダウン評価を行った。プルダウン評価は以下の手順で行った。

PCR で得た EcoRI 断片を pCI ベクター (Promega Corp.) に挿入し、プラスミド発現クローン作製した。T7 RNA ポリメラーゼに基づく TNT-結合網状赤血球溶解システム (Promega Corp.) を用いて、翻訳タンパク質をインビトロで合成
 10 した。StAR cDNA を鋳型として用いた PCR により得た EcoRI 断片を、C 末端に His タグ (Novagen, San Diego, CA) を有する pET38b に挿入して、His タグを付した CBD-N-62-STAR 融合タンパク質 (62 アミノ酸末端を欠く) を発現するプラスミドを構築した。CBD は Cellulose Binding Domain 配列であつてセルロースに特異的に結合する性質を有しており、融合蛋白質をセルロースや
 15 キチンなどの不活性な担体に化学的に修飾を行うことなく、固定化させることができる。

His 結合樹脂 (Novagen) に結合した His タグを付した N-62-STAR 融合タンパク質を、250 μ l の緩衝液 (50mM potassium phosphate, pH 7.4, 150mM KCl, 1mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Triton-X) 中で 35S メチオニン
 20 ンでラベルされた翻訳クローン 50 μ l と共に、3 時間インキュベートした。樹脂をマイクロ遠心分離で集めて 3 回洗浄した。洗浄したビーズは 20 μ l の 2 \times SDS サンプル緩衝液に懸濁し、5 分間加熱し、ペレット化して、その上澄みを SDS-PAGE とオートラジオグラフにかけた。

その結果を第1図に示す。クローン4の翻訳されたタンパク質が CBD-N-62-StAR 融合タンパク質とは相互作用するが、CBD とは相互作用しないことが分かった。このクローン4を StAR 結合タンパク質 (SBP) と呼ぶ (DDBJ Accession number AB112474 (80..2428), AB112475 (431..2779)、配列番号1)。

5

実施例 4

本実施例では、SBP の発現をノーザンブロット解析で調べた。

ノーザンブロットは、それぞれ $2\mu\text{g}$ のポリ A と各組織から単離された RNA について、プローブに SBP と β アクチン cDNA を用いて行った。SBP 遺伝子の発現は試験した全ての組織で検出された。その発現レベルは、第2図に示すように、転写産物が 2.4kb 又は 3.8kb のサイズの組織に顕著に高かった。

種々の細胞ラインで SBP の発現を調べるために、HepG2 細胞 (ヒトの肝細胞癌)、KGN 細胞 (ヒトの顆粒膜細胞癌)、H295R 細胞 (ヒトの副腎癌細胞) 及び MCF-7 細胞 (ヒトの乳がん細胞) から抽出された mRNA を用いて RT-PCR を行った。

15

RT-PCR は以下の手順で行った。

用いた mRNA は、Hep G2 細胞、KGN 細胞、H295R 細胞、MCF-7 細胞から単離された。相補的 DNA の合成は、150 pmol のオリゴ dT をプライマーとして用い、 $1\mu\text{g}$ 全 RNA 及び 200 ユニットの SUPERSCRIPIT II Rnase H (Life Technologies, Inc./BRL, Washington, DC) を用いて、 37°C で 60 分間行った。逆転写酵素を含む反応溶液 $20\mu\text{l}$ は、50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl_2 , 20mM dithiothreitol 及び各 0.5mM の dATP, dCTP, dGTP, 及び dTTP を含む。次に、プライマーとして配列番号 2 及び配列番号 3 の合成オリゴヌクレオチドを用いて、SBP を増幅した。この PCR 反応溶液 ($50\mu\text{l}$) は、10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs 及び 10 pmol の各プライマーを含む。PCR 反応は、 94°C で 45 秒間の変性、 55°C で 45 秒間の 2 次アニール、及び 72°C で 1 分間の延長から成るサイクルを 35 サイクル行った。

25

その結果、第3図に示すように、全ての細胞ラインから増幅産物 (400bp) が得

られた。

以上から、SBP 遺伝子は、H395R 細胞や KGN 細胞などステロイドホルモンを産生する細胞に発現することが分かった。

5 実施例 5

本実施例では、ステロイド生成に SBP がどのような影響を持つかについて調べた。

COS-1 細胞を、F2、シトクロム P450 コレステロール側鎖切断システム (Dr
Walter L Miller of the University of California)、pStAR (pSPOR
10 T StAR CDNA) 及び FuGENE 6 を用いた pSBP で共トランスフェクトした。細胞 (F2/StAR/SDP) はトランスフェクト後 48 時間インキュベートした。いくつかの培養皿を、最後の 24 時間の培養の際に、22R-hydroxy-cholesterol で処理した。トランスフェクションの 48 時間後に、培地を回収し、プレグネノロンのイムノアッセイを行った。このアッセイの結果は、トランスフェクションの効
15 率のばらつきを是正するため、22R-hydroxy-cholesterol を有する培養物によって生成する血清プレグネノロン濃度で標準化した。各評価は 3 回繰り返した。

その結果を第 4 図に示す。共トランスフェクトした COS-1 細胞 (F2/StAR/SDP) によって生産されるプレグネノロン (pregnenolone) の量は、F2、StAR 又は
20 空のベクターでトランスフェクトした細胞 (F2/StAR) によって生産されるプレグネノロンの量の 138%であった。

実施例 6

本実施例では、RNA 干渉により SBP の発現を抑制し、ステロイドホルモンを検
25 査した。SBP 遺伝子における 2 つの標的配列を選択し、siRNA の効果を RT-PCR で測定した。

RNA 干渉は以下の手順で行った。

副集密的 (40~50%集密的) な H295 細胞と KGN 細胞の培養物を 35mm 皿に、それぞれ細胞数が同じになるようにまく。これら細胞の内因性の SBP mRNA を標的

として、19ヌクレオチド重鎖(sirRNA-SBP-I)と21ヌクレオチド重鎖(sirRNA-SBP-II)を加えて形質転換した(Dharmacon, Inc., Lafayette, CO)。これらの重鎖RNAは、それぞれSBP(配列番号1)の開始コドンの下流187と474のヌクレオチドを標的としている。

5 sirRNAはリボオリゴヌクレオチドペアSBP-IとSBP-IIを用いて構成された。SBP-Iは、5'-CGGGAUGUUUCCAGUGACAdTdT-3'(配列番号4)及び5'-UGUCACUGGAAACAUCCCGdTdT-3'(配列番号5)、SBP-IIは5'-GAACUUGGAAGAGGGAGGCAdTdT-3'(配列番号6)及び5'-UGCCUCCCCUCUCCAAGUUCdTdT-3'(配列番号7)である。更に、コントロールとして、5'-GCGCGCUUUGUAGGAUUCGdTdT-3'(配列番号8)と5'-CGAAUCCUACAAAGCGCGCdTdT-3'(配列番号9)の、スクランブルリボオリゴヌクレオチドペア(sirRNA-scramble)を用いた。

これらのオリゴヌクレオチドはDharmaconプロトコルに従ってアニールした。300pmolの各二重鎖を15 μ lのmetafectene(Biontex Laboratories GmbH, Munich, Germany)を用いて、製造業者の指示に従って、細胞に導入した。H395R細胞の皿は、トランスフェクション後に3 β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 β -HSD)の酵素活性を抑制するために、15 μ Mのtriestane(持田製薬)を用いて6時間処理した。3 β -HSDはプレグネノロン(pregnenolone)をプロゲステロン(progesterone)に形質転換する。トランスフェクションの48時間後に、細胞を集めて、ステロイドホルモンのラジオイムノアッセイを行った。全RNAは抽出され、GAPDH用のプライマー(sense: 配列番号10; anti sense: 配列番号11)を用いて、RT-PCRを行った。

結果を第5図と第6図に示す。

細胞をDsRNAでトランスフェクトした後、sirRNA-SBP-I又はsirRNA-SBP-I Iで処理されたH295R細胞(sirRNA-SBP-Iで処理した場合85 \pm 5.0ng/dish及びsirRNA-SBP-IIで処理した場合66 \pm 8.2ng/dish)により生産されるプレグネノロンの量は、第5図に示すように、スクランブルsirRNAによりトランスフェクトしたH295R細胞により生産されるプレグネノロンの量の、それぞれ56.5%及び37.5%であった。

siRNA-SBP-I 又は siRNA-SBP-II で処理された KGN 細胞によって生産されるプレグネノロンの量は、第6図に示すように、スクランブル siRNA によりトランスフェクトした KGN 細胞により生産されるプレグネノロンの量の、それぞれ 71%及び 55%であった。

- 5 SBP 遺伝子の発現レベルは、siRNA-SBP-I と siRNA-SBP-II のいずれにおいても減少していた。これは、SBP 遺伝子の標的配列を siRNA 処理することによって、SBP 遺伝子の発現が減少した結果、ステロイドホルモンの生産量が減少したことを示している。

10 実施例 7

本実施例では、副腎癌細胞 H295R 細胞を用いて、アポトーシス細胞の出現を確認した。

- H295R 細胞は 2%の ULTROSER G (BioSeptra 社) と 1%の Premix(ベクトン デ
15 イキンソン社)を含んだ培養液 DMEM/F12 で培養した。遺伝子導入する前日に径 3
5ミリのプラスチック製の培養皿に 24mm×24 ミリメートルのカバーガラスを敷
き、その上に細胞がコンフルエンス (40-50%) となるようにサブカルチャー
した。SBP mRNA の発現を抑制するために、metafectene を用いて、siRNA-I 又は
siRNA-II を遺伝子導入した。遺伝子導入後 24 時間培養したのち、培養細胞を
4%のホルムアルデヒド燐酸緩衝生理食塩液で 30 分間固定した。アポトーシス細
20 胞の検出には、DeadEnd Fluorometric TUNEL システム (Promega 株式会社) を用
い、方法はシステムのプロトコルに従った。燐酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した
のち、カバーガラスの裏側をスライドガラスにのせ、顕微鏡で観察した。観察は
450-490nm の励起波長と 吸収フィルター 515-565nm の条件で蛍光顕
25 微鏡観察した (Axiophot、カール Zeiss 社)。蛍光を発した細胞は DNA が断片
化したアポトーシス細胞である。デジタルのカメラ (DXM 1200、ニコン社)
を顕微鏡に付け、画像を撮影した。撮影した画像はアドービ・フォトショッ
プ 5.0 (アドービシステム社) を用いて、画像処理した。画像の倍率は 400 倍で
ある。

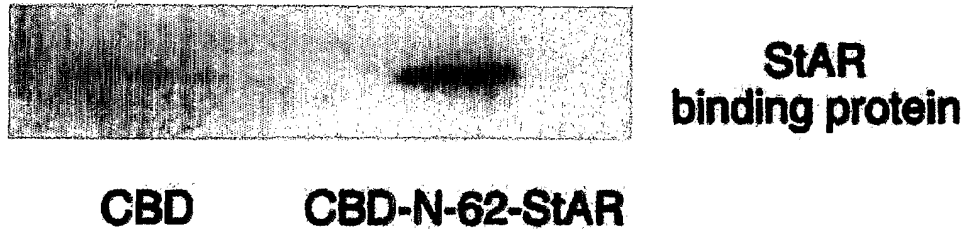
siRNA-SBP II を遺伝子導入した結果を第7図(B)に示す。siRNA-SBP II 導入に

よりアポトーシス細胞の出現が認められる。

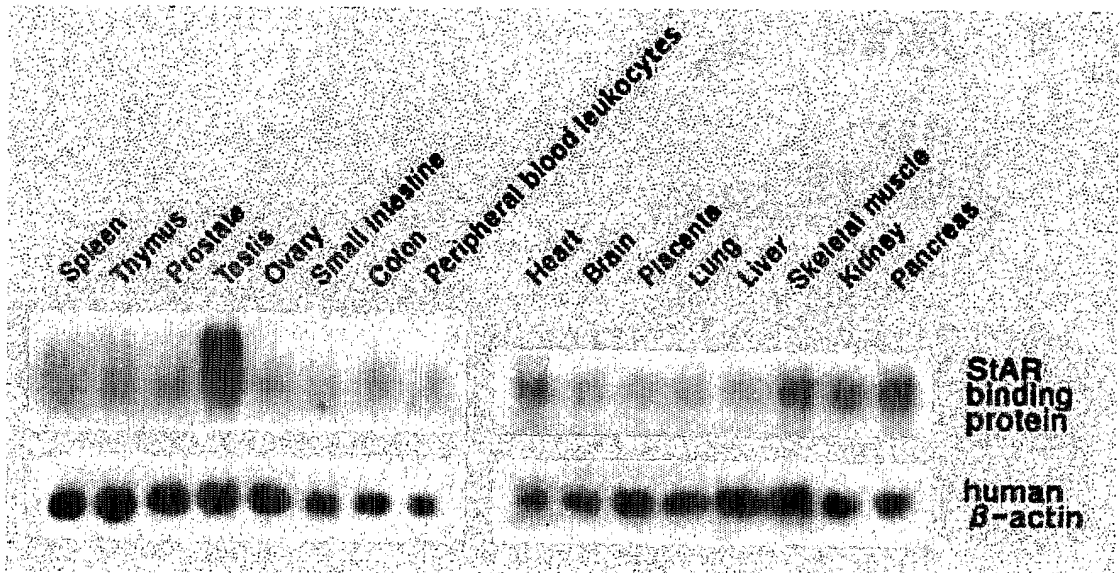
請求の範囲

1. 配列番号1（ヒト StAR 結合蛋白質遺伝子）の塩基配列における、その1
87～205又は474～494を含む連続する23塩基以下の塩基配列に相当
5 するオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれら
から成る2本鎖RNA。
2. 前記23塩基以下の塩基配列が配列番号1（ヒト StAR 結合蛋白質遺伝子）
の塩基配列の187～205又は474～494の塩基配列である請求項1に記載
10 載のオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれら
から成る2本鎖RNA。
3. 請求項1又は2に記載のオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボ
ヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを、癌細胞へ導入することから
成る、該細胞における SBP 遺伝子の発現を抑制する方法。
4. 請求項1又は2に記載のオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボ
15 ヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを含み、該オリゴリボヌクレオ
チド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAを
癌細胞へ導入する手段を含む癌治療用キット。

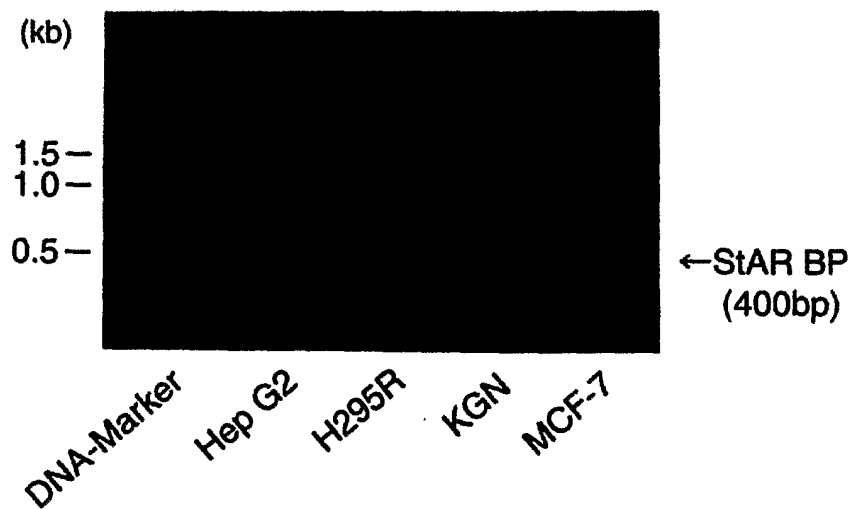
第 1 図



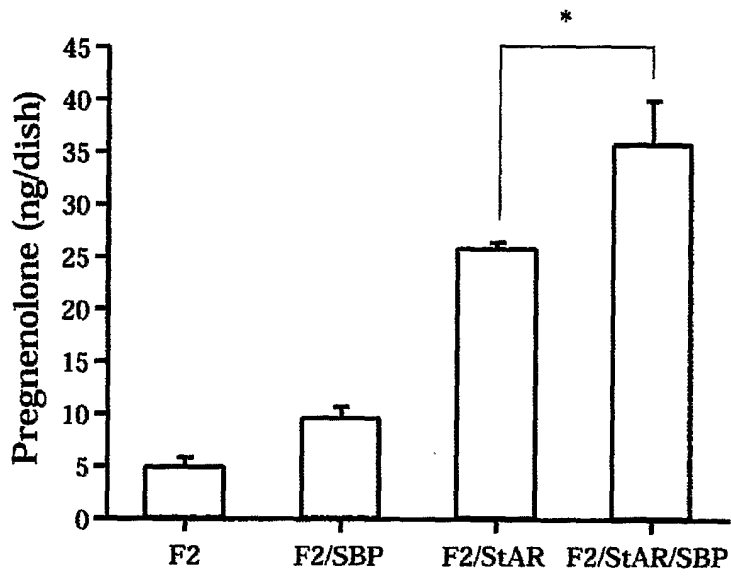
第 2 図



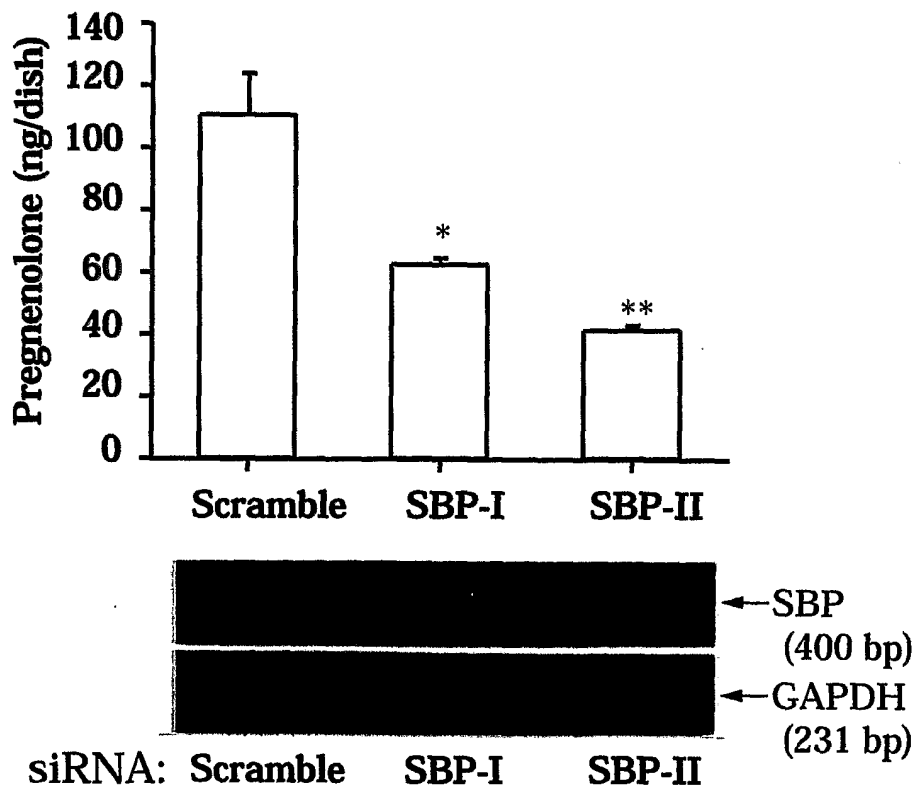
第 3 図



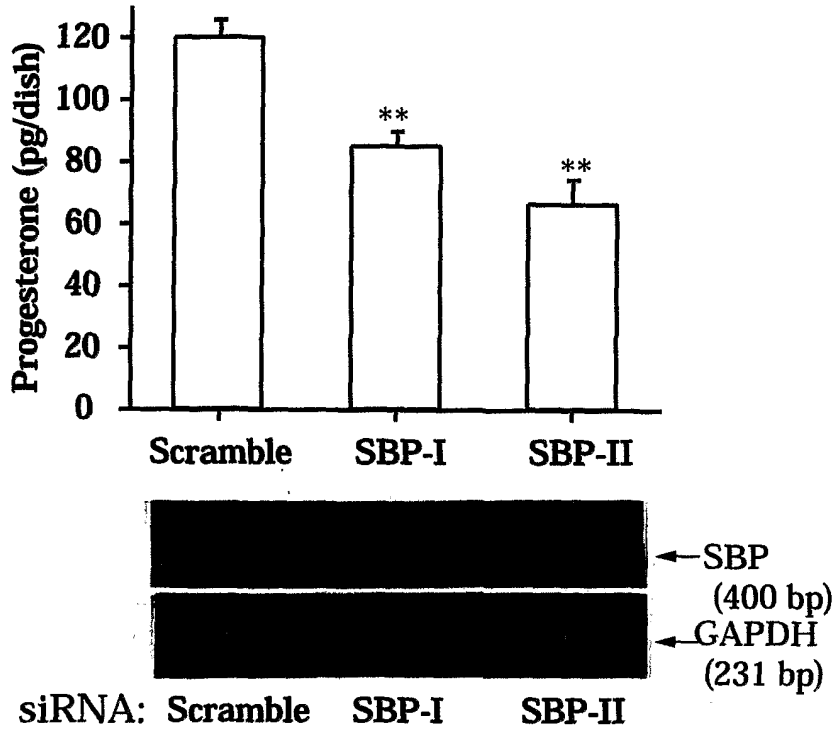
第 4 図



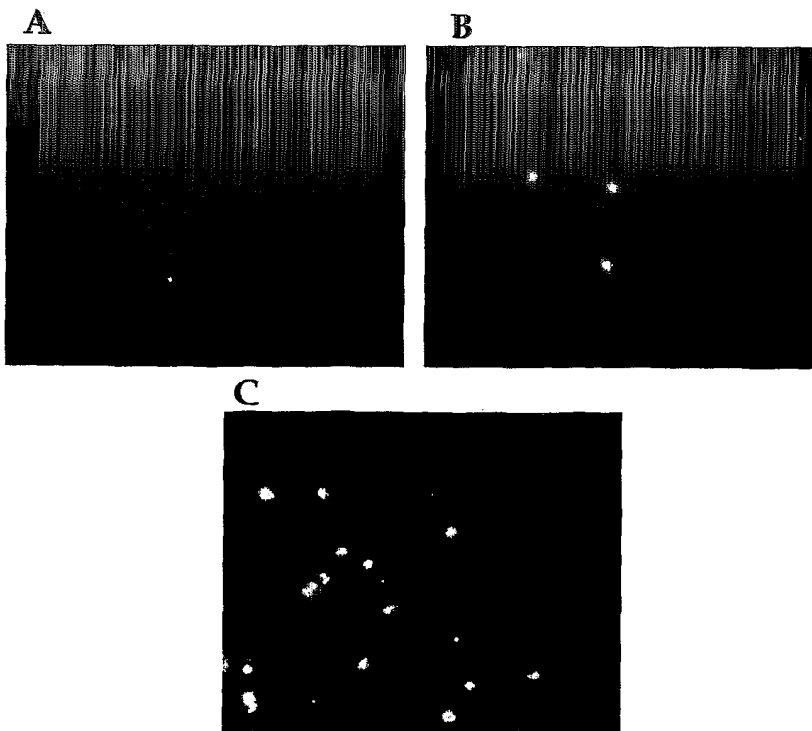
第 5 図



第 6 図



第 7 図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> StAR 結合蛋白質(SBP) 遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチド及び方法

<130> FS04-410PCT

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2349

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgtttccac cttcagggtc cactgggetg attccccct ccaacttca agctcggccc 60

ctttcaactc tgccaagaat ggctcccacc tggctctcag acattcccct ggtccaaccc 120

ccaggctatc aagatgtctc agagaggcgg ctagacaccc agagacctca agtgaccatg 180

tgggaacggg atgtttccag tgacaggcag gagccagggc ggagaggcag gtcctggggg 240

ctggaggggt cacaggcct gagccagcag gctgaggtga tcgttoggca gctgcaagag 300

ctgcggcggc tggaggagga ggtccggctc ctgcgggaga cctcgtgca gcagaagatg 360

aggctagagg cccaggccat ggagctagag gctctggcac gggcggagaa ggccggccga 420

gctgaggctg agggcctgcg tgctgcttg gctggggctg aggtgtccg gaagaacttg 480

gaagagggga gccagcggga gctggaagag gttcagaggc tgcaccaaga gcagctgtcc 540

tctttgacac aggctcacga ggaggctctt tccagttga ccagcaagc tgagggcttg 600

gagaagtctc tgagtagtct ggaaccaga agagcagggg aagccaagga gctggccgag 660

gctcagaggg aggccgagct gcttcggaag cagctgagca agaccagga agacttggag 720

gctcaggtga ccctggttga gaatctaaga aatatgttg gggaacaagt cccttctgag 780

gtccacagcc agacatggga actggagcga cagaagcttc tggaaccat gcagcacttg 840

caggaggacc gggacagcct gcatgccacc gggagctgc tgcaggtgcg ggtgcagagc 900

ctcacacaca tcctgccct gcaggaggag gagctgacca ggaaggttca accttcagat 960

tccttgagc ctgagtttac caggaagtgc cagtccctgc tgaaccgctg gcgggagaag 1020

gtgtttgcc tcatggtgca gctaaaggcc caggagctgg aacacagtga ctctgtaag 1080

cagctgaagg gacaggtgac ctactccag gaaaaagtga catcccagag ccaggagcag 1140

gccatcctgc agcgatccct gcaggacaaa gccgagagg tggaggtgga gcgtatgggt 1200

gccaaaggcc tgcagttgga gctgagccgt gctcaggagg ccaggcgtca gtggcagcag 1260

cagacagcct cagccgagga gcagctgagg cttgtggcca atgctgtcag cagctctcag 1320

atctggctcg agaccacat ggctaagggtg gaaggggctg ccgccagct tcccagcctc 1380

aacaaccgac tcagctatgc tgtccgcaag gtctcacca ttggggcct gattgctcga 1440

aagcttgccc ttgctcagct gccccaggag agctgtcccc taccaccacc gccacagat 1500

gtgagccttg agttgcagca gctgcgggaa gaacggaacc gcctggatgc agaactgcag 1560

ctgagtgcc gcctcatcca gcaggagtg ggccgggctc gggagcaagg ggaggcagag 1620

ggcagcagc tgagcaaggt ggcccagcag ctggagcagg agctgcagca gaccaggag 1680

tocctggcta gcttggggct gcagctggag gtagcacgcc agggccagca ggagagcaca 1740

gaggaggctg ccagtctcg gcaggagctg acccagcagc aggaactcta cgggcaagcc 1800

ctgcaagaaa aggtggctga agtggaaact cggctcggg agcaactctc agacacagag 1860

aggaggctga acgaggctcg gagggagcat gccaggccg tggctctctt acgccagatt 1920

cagcgagag ccgccagga aaaggagcgg agccaggaac tcaggcgtct gcaggaggag 1980

gccgggaagg aggaggggca gcgactggcc cggcgttgc aggagctaga gagggataag 2040

aacctcatgc tggccacctt gcagcaggaa ggtctctctt ccggttaca gcagcagcga 2100

4/8

ctgttgacag ttcttccttc cctactggat aagaagaaat ctgtggtgtc cagccccagg 2160

octccagagt gttcagcatc tgcacctgta gcagcagcag tgcccaccag ggagtccata 2220

aaagggtccc tctctgtcct gtcgatgac ctgcaggacc tgagtgaagc catttccaaa 2280

gaggaagctg tttgtcaagg agacaacctt gacagatgct ccagctcaa tccccagatg 2340

agcagctaa 2349

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

acttgaggc tcaggtgacc c 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

ttcctggagt gaggccacct

20

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 4

cggauguuu ccagugaca

19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 5

ugucacugga aacaucg

19

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 6

gaacuuggaa gaggggaggc a

21

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 7

ugccuccccu cuccaaguu c

21

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 8

gcgcgcuuug uaggauucg

19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> siRNA

<400> 9

cgaauccuac aaagcgcgc

19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

tgccgtctag aaaaacctgc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

accctgttc ttagccaaa

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/12, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P5/24, A61P5/30, A61P15/00, A61P15/08, A61P15/16, A61P15/18, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/12, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P5/24, A61P5/30, A61P15/00, A61P15/08, A61P15/16, A61P15/18, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00 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) JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG), CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	DDBJ Accession No. AB112474, 16 June, 2003 (16.06.03), Sugawara T., Homo sapiens mRNA for STAR protein binding protein, complete cds.	1-4
A	Zhou Y. et al., Post-transcriptional suppression of gene expression in Xenopus embryos by small interfering RNA, Nucleic Acids Res., 2002, Vol.30, No.7, pages 1664-9	1-4
A	Scherr M. et al., Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA, Blood, 2003, Vol.101, No.4, pages 1566-9	1-4
A	Kosciolek B.A. et al., Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference, Mol. Cancer Ther., 2003, Vol.2, No.3, pages 209-16	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input 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 07 April, 2004 (07.04.04)	Date of mailing of the international search report 27 April, 2004 (27.04.04)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003449

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. 7 C12N15/12, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P5/24, A61P5/30, A61P15/00, A61P15/08, A61P15/16, A61P15/18, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00</p>											
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. 7 C12N15/12, A61K31/7105, A61K31/713, A61K48/00, A61P5/24, A61P5/30, A61P15/00, A61P15/08, A61P15/16, A61P15/18, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI (DIALOG) CA (STN)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P Y</td> <td>DDBJ Accession No. AB112474, June 16, 2003, Sugawara T., Homo sapiens mRNA for StAR protein binding protein, complete cds.</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Zhou Y. et al., Post-transcriptional suppression of gene expression in Xenopus embryos by small interfering RNA, Nucleic. Acids. Res., 2002, Vol.30, No.7, pages 1664-9</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	P Y	DDBJ Accession No. AB112474, June 16, 2003, Sugawara T., Homo sapiens mRNA for StAR protein binding protein, complete cds.	1-4	A	Zhou Y. et al., Post-transcriptional suppression of gene expression in Xenopus embryos by small interfering RNA, Nucleic. Acids. Res., 2002, Vol.30, No.7, pages 1664-9	1-4
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
P Y	DDBJ Accession No. AB112474, June 16, 2003, Sugawara T., Homo sapiens mRNA for StAR protein binding protein, complete cds.	1-4									
A	Zhou Y. et al., Post-transcriptional suppression of gene expression in Xenopus embryos by small interfering RNA, Nucleic. Acids. Res., 2002, Vol.30, No.7, pages 1664-9	1-4									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日 07.04.2004</p>	<p>国際調査報告の発送日 27.4.2004</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子</p>	<p>4N 3126</p>									
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Scherr M. et al., Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA, Blood, 2003, Vol.101, No.4, pages 1566-9	1-4
A	Kosciolek B. A. et al., Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference, Mol. Cancer Ther., 2003, Vol.2, No.3, pages 209-16	1-4

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：