(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2010-538653
(P2010-538653A)
(43)公表日　平成22年12月16日(2010.12.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	2G045
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G	4B063
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M	4C084
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 57 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-525014 (P2010-525014)
(86)(22)出願日　平成20年9月12日 (2008.9.12)
(85)翻訳文提出日　平成22年5月17日 (2010.5.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/076109
(87)国際公開番号　WO2009/036236
(87)国際公開日　平成21年3月19日 (2009.3.19)
(31)優先権主張番号　60/993,809
(32)優先日　平成19年9月14日 (2007.9.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/055,178
(32)優先日　平成20年5月22日 (2008.5.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　593172050
ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ・リサーチ・ファウンデイション
THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
アメリカ合衆国４３２１０オハイオ州コロンバス、ケニー・ロード１９６０番
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト末梢血微小胞におけるｍｉＲＮＡの発現およびその使用

(57)【要約】
【課題】ｍｉＲの異常な発現と疾患またはその素因との相関を同定することである。
【解決手段】本発明は、微小胞およびその中のｍｉＲを含有するサンプルを検討することによる、障害の診断、予後および治療のための新規方法および組成物を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
被験者の疾患または障害を診断または予後診断する方法であって、以下：
ｉ）被験者由来の微小胞を含有するサンプル中の、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを決定する；そして
ｉｉ）サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルをコントロールと比較し、その場合コントロールのレベルと比較しての、被験者由来サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルの増加が、そのような障害の診断または予後診断となること
を含有する前記方法。
【請求項２】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表Ｉに示した群およびその組み合わせより選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表ＩＩに示したフィルタリング後の発現された血漿ｍｉＲの群、およびその組み合わせより選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表ＩＩＩに示した群およびその組み合わせより選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表ＩＶに示した群およびその組み合わせより選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表Ｖに示した群およびその組み合わせより選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表ＶＩに示した群およびその組み合わせより選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
疾患の病因、および自然免疫反応の全身へのメディエーターに関するバイオマーカーとして、１つまたはそれより多くの微小胞を包含するバイオマーカー。
【請求項９】
バイオマーカーが末梢血中の微小胞より単離される、請求項８に記載のバイオマーカー。
【請求項１０】
障害が、結腸腺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、Ｂ細胞リンパ腫、膵癌、びまん性大細胞型ＢＣＬ、ＣＬＬ、膀胱癌、腎癌、低酸素腫瘍、子宮筋腫、卵巣癌、Ｃ型肝炎ウイルスに関連する肝細胞癌、ＡＬＬ、アルツハイマー病、骨髄線維症、真性多血症、血小板血症、ＨＩＶ、ＨＩＶ－１潜伏期を含む、表Ｉに列記されたものである、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
発現されたｍｉＲＮＡが血漿微小胞内に見出され、そして以下：ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－４８４、ｍｉＲ－１９１、ｍｉＲ－１４６ａ、ｍｉＲ－０１６、ｍｉＲ－２６ａ、ｍｉＲ－２２２、ｍｉＲ－０２４、ｍｉＲ－１２６、およびｍｉＲ－３２、の１つまたはそれより多くを包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
発現されたｍｉＲがＰＢＭＣ内に見出され、そして以下：ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１４６ｂ、ｍｉＲ－０１６、ｍｉＲ－４８４、ｍｉＲ－１４６ａ、ｍｉＲ－１９１、ｍｉＲ－０２６ａ、ｍｉＲ－０１９ｂ、およびｍｉＲ－０２０ａの、１つまたはそれより多くを包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】

疾患が結腸腺癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２０ａ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－１０６ａ、ｍｉＲ－１８１ｂおよびｍｉＲ－２０３がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項１４】

疾患が結腸直腸癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－１２７、ｍｉＲ－３１、ｍｉＲ－９６、ｍｉＲ－１３５ｂおよびｍｉＲ－１８３がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ；ｍｉＲ－３０ｃ、ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－ｌ４３、ｍｉＲ－１３３ｂおよびｍｉＲ－１４５がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項１５】

疾患が前立腺癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２１がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１５ａ、ｍｉＲ－１６－１、ｍｉＲ－１４３およびｍｉＲ－１４５がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項１６】

疾患が肺癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１９１、ｍｉＲ－２０５およびｍｉＲ－２１０がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－ｌｅｔ－７がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項１７】

疾患が乳癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－１５５がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１２５ｂおよびｍｉＲ－１４５がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項１８】

疾患がＢ細胞リンパ腫であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１４２、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２２１、ｍｉＲ－１７－９２、ｍｉＲ－１９ａ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－９２、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１９１、ｍｉＲ－２０５、およびｍｉＲ－２１０がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項１９】

疾患が膵癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１０３、ｍｉＲ－１０７、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－３１、ｍｉＲ－９３、ｍｉＲ－２２１、ｍｉＲ－２２４およびｍｉＲ－１５５がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１３３ａ、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－２１７がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２０】

疾患がびまん性大細胞型ＢＣＬであり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１５５およびｍｉＲ－１７－９２がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２１】

疾患が慢性リンパ性白血病であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２３ｂ、ｍｉＲ－２４－１、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－２２１、ｍｉＲ－３３１、ｍｉＲ－２９ａ、ｍｉＲ－１９５、ｍｉＲ－３４ａ、およびｍｉＲ－２９ｃがアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１５ａ、ｍｉＲ－１６－１、ｍｉＲ－２９およびｍｉＲ－２２３がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２２】

疾患が膀胱癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－２６ｂ、ｍｉＲ－２２１、ｍｉＲ－１０３－１、ｍｉＲ－１８５、ｍｉＲ－２３ｂ、ｍｉＲ－２０３、ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－２３ａ、およびｍｉＲ－２０５がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２３】

疾患が腎癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２８、ｍｉＲ－１８５、ｍｉＲ－２７、およびｍｉＲ－ｌｅｔ－７ｆ－２がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２４】

疾患が低酸素腫瘍であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２３、ｍｉＲ－２４、ｍｉＲ－２６、ｍｉＲ－２７、ｍｉＲ－１０３、ｍｉＲ－１０７、ｍｉＲ－１８１、ｍｉＲ－２１０、およびｍｉＲ－２１３がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２５】

疾患が子宮筋腫であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ　ｌｅｔ－７ファミリー、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２３ｂ、ｍｉＲ－２９ｂ、およびｍｉＲ－１９７がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２６】

疾患が卵巣癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１９９＊、ｍｉＲ－２００ａおよびｍｉＲ－２１４がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１００、ｍｉＲ－ｌｅｔ－７クラスター、およびｍｉＲ－１２５ｂがダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２７】

疾患がＣ型肝炎ウイルスに関連する肝細胞癌であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１２２、ｍｉＲ－１００、およびｍｉＲ－１０ａがアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１９８およびｍｉＲ－１４５がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２８】

疾患が急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１２８ｂ、ｍｉＲ－２０４、ｍｉＲ－２１８、ｍｉＲ－３３１、ｍｉＲ－１８１ｂ－１、およびｍｉＲ－１７－９２がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２９】

疾患がアルツハイマー病であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－９およびｍｉＲ－１２８がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－１０７がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項３０】

疾患が骨髄線維症であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－１９０がアップレギュレートされ；そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－３１、ｍｉＲ－１５０およびｍｉＲ－９５がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項３１】

疾患が骨髄線維症、真性多血症、または血小板血症の１つまたはそれより多くであり、そして少なくとも以下のｍｉＲ：ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－３４２、ｍｉＲ－３２６、ｍｉＲ－１０５、ｍｉＲ－１４９、およびｍｉＲ－１４７がダウンレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項３２】

疾患がＨＩＶであり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２９ａ、ｍｉＲ－２９ｂ、ｍｉＲ－１４９、ｍｉＲ－３７８およびｍｉＲ－３２４－５ｐがアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項３３】

疾患がＨＩＶ－１潜伏期であり、そして少なくとも以下のＭｉＲ：ｍｉＲ－２８、ｍｉＲ－１２５ｂ、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－２２３およびｍｉＲ－３８２がアップレギュレートされる、請求項１に記載の方法。

【請求項３４】

コントロールが以下から成る群：

ｉ）リファレンススタンダード；

ｉｉ）障害を有していない被験者由来の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベル；および
ｉｉｉ）そのような障害を提示していない被験者サンプル由来の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベル
より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３５】
被験者がヒトである、請求項１に記載の方法。
【請求項３６】
被験者が障害による異なる結果を有するかどうかを決定および/または予測する方法であって、以下：
ｉ）微小胞を含有するサンプル中の、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを決定する；そして
ｉｉ）サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルをコントロールと比較し、その場合コントロールのレベルと比較しての、サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルの変化が、そのような障害を示すこと
を包含する前記方法。
【請求項３７】
変化が、サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルの減少である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が、表Ｉ－ＶＩに示した群より選択される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３９】
前記サンプルが被験者由来である、請求項３６に記載の方法。
【請求項４０】
被験者がヒトである、請求項３６に記載の方法。
【請求項４１】
コントロールが以下からなる群：
ｉ）リファレンススタンダード；および
ｉｉ）微小胞を含有するリファレンスサンプル由来の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベル
より選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項４２】
表Ｉ－ＶＩＩに列記した１つまたはそれより多くのｍｉＲ、およびそのサブセットを包含する、肺の障害のためのバイオマーカー。
【請求項４３】
障害が表ＩＩに列記したもの：結腸腺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、Ｂ細胞リンパ腫、膵癌、びまん性大細胞型ＢＣＬ、ＣＬＬ、膀胱癌、腎癌、低酸素腫瘍、子宮筋腫、卵巣癌、Ｃ型肝炎ウイルスに関連する肝細胞癌、ＡＬＬ、アルツハイマー病、骨髄線維症、真性多血症、血小板血症、ＨＩＶ、ＨＩＶ－１潜伏期を含む、請求項４２に記載のバイオマーカー。
【請求項４４】
被験者が疾患または障害を有する、または発症するリスクがあるかどうかを診断する方法であって、被験者由来検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定し、
その場合検査サンプルが被験者由来の微小胞を包含し、そして
その場合コントロールサンプル中の対応するｍｉＲのレベルと比較しての、検査サンプル中のｍｉＲのレベルの変化が、被験者が卵巣癌を有するかまたは発症するリスクがあるかのいずれかであることを示す、
ことを包含する前記方法。
【請求項４５】

ｍｉＲの発現と、疾患またはその素因との相関を同定することであって、以下：
（ａ）疾患または状態を有するまたは有すると疑われる被験者由来サンプルから単離されたｍｉＲを標識する；
（ｂ）そのｍｉＲをｍｉＲアレイとハイブリダイズさせる；
（ｃ）アレイに対するｍｉＲのハイブリダイゼーションを決定する；そして
（ｄ）リファレンスと比較して疾患または状態の典型である、サンプル中で異なって発現されたｍｉＲを同定すること
を包含する、前記同定法を含む請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
異なって発現されたｍｉＲの同定が、サンプルに関するｍｉＲプロファイルを作成し、そしてｍｉＲプロファイルを評価して、サンプル中のｍｉＲが正常なサンプルと比較して異なって発現されているかどうかを決定することを包含する、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
ｍｉＲプロファイルが、表Ｉ－ＶＩに示した１つまたはそれより多くのｍｉＲ、およびそのサブセットより選択される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４８】
疾患または障害の増殖を阻害する方法であって、以下：
ｉ）表Ｉ－ＶＩＩに示した群およびそのサブセットより選択される、１つまたはそれより多くのｍｉＲの発現または活性を阻害する、１つまたはそれより多くの薬剤を細胞内に導入する；
ｉｉ）ｍｉＲの１つもしくはそれより多くの標的遺伝子の発現を高める１つもしくはそれより多くの薬剤を細胞内に導入する、またはｉ）およびｉｉ）の１つもしくはそれより多くの薬剤を組み合わせたものを細胞内に導入する、そして
ｉｉｉ）１つもしくはそれより多くの薬剤が、ｍｉＲの発現もしくは活性を阻害する、ｍｉＲの１つもしくはそれより多くの標的遺伝子の発現もしくは活性を高める、またはそれらを組み合わせた結果に帰着し、それにより疾患または障害の増殖を阻害する、という状態下に細胞を維持すること、
を包含する前記方法。
【請求項４９】
細胞がヒトの細胞である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
癌治療薬を同定する方法であって、検査薬を細胞内の微小胞に提供し、そして細胞内の減少した発現レベルに関連する少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定し、その場合適切なコントロール細胞と比較しての細胞内のｍｉＲのレベルが増加することが、検査薬が治療薬であることを示すこと、を包含する前記方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
ヒト末梢血微小胞におけるｍｉＲＮＡの発現およびその使用に関する。
優先権の主張、および連邦政府による資金提供を受けた研究開発に関する記載
本出願は、２００７年９月１４日に提出された米国仮特許出願６０／９９３，８０９号、および２００８年５月２２日に提出された６１／０５５，１７８号に対する優先権を主張し、これら文献を本明細書において参照としてすべて援用する。本発明は政府のいかなる援助も受けておらず、したがって政府は本発明における権利を有するものではない。
【背景技術】
【０００２】
マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡまたはｍｉＲ）は、動物および植物において発現される低分子ノンコーディングＲＮＡである。これらは、細胞の機能、細胞の生存、細胞の活性化、および発生時の細胞の分化を制御する[7；8]。
【０００３】

マイクロＲＮＡは、１９－２５ヌクレオチドのＲＮＡの低分子ノンコーディングファミリーであり、配列特異的な様式でメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を標的とし、ｍｉＲＮＡおよびそれらの標的との間の相補性の程度に依存して、翻訳の抑制またはｍＲＮＡの分解の誘発することにより、遺伝子の発現を制御する (Bartel, D.P. (2004) Cell 116, 281- 297; Ambros, V. (2004) Nature 431, 350-355)。多くのｍｉＲは、遠位の関連する器官の間で配列中に保存されており、これらの分子が本質的な過程にかかわっていることを示唆する。事実ｍｉＲは、発生時の遺伝子発現の制御(Xu, P., et al. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795)、細胞の増殖 (Xu, P., et al. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795)、アポトーシス (Cheng, A.M., et al. (2005) Nucl. Acids Res. 33, 1290-1297)、グルコース代謝 (Poy, M.N., et al. (2004) Nature 432, 226-230)、ストレス抵抗性 (Dresios, J., et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1865-1870) 、および癌(Calin, G.A, et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 1554-15529; Calin, G.A., et al. (2004) Proc. Natl Acad. ScL USA 101, 11755-11760; He, L., et al (2005) Nature 435, 828-833; およびLu, J., et al (2005) Nature 435:834-838)に関与している。

【０００４】

ｍｉＲが、哺乳類の血球新生に一役を担っているという強力なエビデンスもある。マウスにおいてｍｉＲ－１８１、ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－１４２は、血球新生組織中で差次的に発現され、それらの発現は血球新生および分化系列決定の間に制御を受ける (Chen, C.Z., et al. (2004) Science 303, 83-86)。マウスの血球新生前駆細胞におけるｍｉＲ－１８１の異所的発現は、Ｂ細胞内コンパートメントにおける増殖をもたらした(Chen, C.Z., et al. (2004) Science 303, 83-86)。マウス血球新生系細胞における系統的なｍｉＲ遺伝子のプロファイリングは、神経組織と比較して血球新生系における異なるｍｉＲ発現パターンを明らかにし、細胞分化の間に起こる個々のｍｉＲの発現の変化を同定した(Monticelli, S., et al. (2005) Genome Biology 6, R71)。近年の研究は、ＣＤ３４$^{+}$臍帯血前駆体細胞のヒト赤血球新生培養において、ｍｉＲ－２２１およびｍｉＲ－２２２が低レベルに調節されることを同定した(Felli, N., et al. (2005) Proc. Natl. Acad. ScL USA. 102, 18081-18086)。これらのｍｉＲは、腫瘍遺伝子ｃ－Ｋｉｔを標的とすることが発見された。さらなる機能の研究は、赤血球新生培養におけるこれら２つのｍｉＲの低下が、Ｋｉｔタンパク質の産生を翻訳レベルで遮断できなくなり、早期赤血球細胞のexpansion（成熟血球の増幅）を導くことを示した (Felli, N., et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci USA. 102, 18081-18086)。ｍｉＲ群が細胞分化を制御するという仮定と一致して、ｍｉＲ－２２３は、Ｃ/ＥＢＰａおよびＮＦＩ－Ａの関与する制御回路の鍵となるメンバーであり、オールトランスレチノイン酸処理した急性前骨髄球性白血病細胞株において、顆粒球の分化をコントロールすることが発見された(Fazi, F., et al. (2005) Cell 123, 819-831)。

【０００５】

Ｂ細胞性慢性リンパ性白血病における、２つのｍｉＲの高頻度の欠失および低発現が同定された[9]。この発見が、頭頸部癌、小細胞肺癌、神経膠芽腫、乳癌、慢性リンパ性白血病、およびバーキットリンパ腫における、ｍｉＲの異常な発現を実証する多数の論文を刺激することとなった[9－12]。より最近には、炎症とｍｉＲ間の関連性がマクロファージにおいて報告されている[13]。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Bartel, D.P. (2004) Cell 116, 281-297
【非特許文献２】Ambros, V. (2004) Nature 431, 350-355
【非特許文献３】Xu, P., et al. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795
【非特許文献４】Cheng, A.M., et al. (2005) Nucl. Acids Res. 33, 1290-1297
【非特許文献５】Poy, M.N., et al. (2004) Nature 432, 226-230
【非特許文献６】Dresios, J., et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1865-

1870
【非特許文献７】Calin, G.A, et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 1554-15
529
【非特許文献８】Calin, G.A., et al. (2004) Proc. Natl Acad. Sci USA 101, 11755-1
1760
【非特許文献９】He, L., et al (2005) Nature 435, 828-833
【非特許文献１０】Lu, J., et al (2005) Nature 435:834-838
【非特許文献１１】Chen, C.Z., et al. (2004) Science 303, 83-86
【非特許文献１２】Monticelli, S., et al. (2005) Genome Biology 6, R71
【非特許文献１３】Felli, N., et al. (2005) Proc. Natl. Acad. ScL USA. 102, 18081
-18086
【非特許文献１４】Fazi, F., et al. (2005) Cell 123, 819-831

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
そのような障害に関する検査を目的として、そのようなマクロファージの存在を確認するための組織サンプルが獲得されている。加えて現在までのところ、血中を循環する微小胞がｍｉＲを含有することを示す報告はなされていない。
【０００８】
本発明のさらなる利点、目的、および特色は、以下の記述で部分的に説明することとし、そして当業者には以下の実験で部分的に明らかになり、または本発明を実施することで学ばれることと思う。本発明の目的および利点は、付記した請求項で特に指摘したように理解され、達成されることと思う。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
発明の概要
１つの側面において、微小胞内に存在し、そして/または組織、体液、および/もしくは細胞において具体的なｍｉＲの発現レベルが変化している、具体的なｍｉＲを同定するための方法を提供する。
【００１０】
微小胞は細胞間の情報交換を促進する。マクロファージ、血小板、Ｔ細胞、および腫瘍を含む多くの細胞は、核酸および/またはタンパク質を含有する小さな微小胞を放出する[1-5]。微小胞内に含有される因子は、血管新生、細胞の成長、および細胞の分化を制御する[1-3]。
【００１１】
もう１つの側面において、特定の障害に罹っている患者の末梢血のような体液中のｍｉＲの存在を決定する。
もう１つの側面において、肺線維症に罹っている患者の肺組織中のｍｉＲの存在を決定する。
【００１２】
なおもう１つの側面において、被験者（例えばヒト）の特定の障害を診断または予後診断する方法を本明細書にて提供する。１つの特定の方法に従って、被験者由来検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを、コントロールサンプル中の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルと比較する。コントロールサンプル中の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルと比較しての、検査サンプル中のｍｉＲ遺伝子産生物のレベルの変化（例えば増加、減少）が、被験者が急性炎症性障害を有する、または発症するリスクがあるかのいずれかであることを示す。
【００１３】
１つの態様において被験者由来検査サンプル中のｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、コントロールのレベルより高い。もう１つの態様において、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産

生物は、本明細書に示したようなｍｉＲＮＡから成る群より選択される。
【００１４】
特定の態様において診断または予後診断される障害は、単核食細胞および/またはＴＨＰ－１細胞による微小胞放出を引き起こすものである。
特定の態様において診断または予後診断される障害は、炎症反応を引き起こすものである。
【００１５】
もう１つの態様において本発明は、被験者（例えばヒト）の癌および/または炎症性障害を治療する方法である。
１つの特定の方法において、表Ｉ－ＶＩに見出せる群の１つまたはそれより多くより選択される、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の発現を阻害するための化合物の有効量を、被験者に投与する。
【００１６】
１つの態様において、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の発現を阻害するための化合物は、表Ｉ－ＶＩに見出せる群の１つまたはそれより多くより選択されるｍｉＲ遺伝子産生物の発現を阻害する。
【００１７】
本発明はさらに、癌および/または炎症性障害を治療するための医薬組成物を提供する。１つの態様において本発明の医薬組成物は、少なくとも１つのｍｉＲ発現阻害化合物、および医薬的に受容可能な担体を包含する。特定の態様において、少なくとも１つのｍｉＲ発現阻害化合物は、その発現が正常と比較して疾患患者由来血液中でより高いｍｉＲ遺伝子産生物に対して特異的である。
【００１８】
なおもう１つの態様において、医薬組成物はさらに少なくとも１つの抗炎症薬を包含する。
１つの態様において本発明は、ｍｉＲ遺伝子産生物の過剰発現と関連する癌、および/またはｍｉＲ遺伝子産生物の過剰発現と関連する肺の障害を治療するための、医薬組成物である。そのような医薬組成物は、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の有効量、および医薬的に受容可能な担体を包含し、その場合少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物が結合して、そのｍｉＲ遺伝子産生物の発現を低減させる。もう１つの態様において、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物は、そのｍｉＲ遺伝子産生物の核酸配列と相補的である核酸配列を包含する。まだもう１つの態様において、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物は、ｍｉＲ、またはそのバリアントもしくは生物学的に活性なそのフラグメントである。なおもう１つの態様において、医薬組成物はさらに少なくとも１つの抗癌薬を包含する。
【００１９】
本発明の様々な目的および利点は、添付の図を照らし合わせて読むことで、好ましい態様の以下の詳細な記載から当業者には明らかになろう。
【図面の簡単な説明】
【００２０】
【図１】図１は、分化がマクロファージからの微小胞の放出を誘導したことを示す。末梢血単球（ＰＢＭ）は、未処理のまま（淡黒点）とするか、または２４時間ＧＭ－ＣＳＦで処理（黒点）した。細胞を含まない上清を集め、超遠心した。小胞をＰＢＳ中に再懸濁し、フローサイトメトリーでサイズについて解析した。解析の前に、２μｍ標準ビーズを使用してＦＳＳおよびＳＳＣのパラメータを調整した（示していない）。３名の別個のドナーからの代表的なデータを示す。
【図２】図２Ａ－２Ｃは、微小胞がマクロファージの分化を仲介することを示す。微小胞を、ＰＭＡ処理したＴＨＰ１細胞より集めた後、未分化のＴＨＰ１細胞（図２Ｂ）または単球（図２Ｃ）に加えた。コントロールとして、ＴＨＰ１細胞を未処理のまま残した（図２Ａ）。細胞は毎日写真撮影した。第３日の細胞を示す。
【図３】図３Ａ－３Ｃは、末梢血微小胞の単離を示す。インフォームドコンセント後、正

常なボランティアドナーからの２０ｃｃ血液から血漿を得た。０．５ｃｃ血漿由来の微小胞を、ＣＤ２０６－ＦＩＴＣまたはＭＨＣＩＩ－ＦＩＴＣ抗体と共にインキュベートし、前方散乱　対　側方散乱を使用してのサイズ（図３Ａ）、および表面抗原発現（図３Ｂ）について、ＢＤ　ＦＡＣＳ Caliburで解析した。同位体のコントロールと比較してのＣＤ２０６またはＭＨＣ　ＩＩのいずれかの発現のパーセントを、図３Ａに示したゲート領域に関して決定した（図３Ｃ）。２人のドナーの平均±ＳＥＭを示す。

【図４】末梢血微小胞の由来の解析。図４は、健常なドナー（ｎ＝１０）由来の末梢血微小胞をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の由来を決定するため、微小胞を、ＣＤ３、ＣＤ２０２ｂ（Ｔｉｅ－２）、ＣＤ６６ｂ、ＣＤ７９ａ、またはＣＤ４１ａについて染色し、Ｔ細胞、内皮細胞、好中球、Ｂ細胞、または血小板に由来するものを決定した。単核食細胞由来の微小胞は、ＣＤ１４、ＣＤ２０６、ＣＣＲ３、ＣＣＲ２、またはＣＣＲ５に対してポジティブとした。ゲートされた全イベントの最大値の％の平均±Ｓ．Ｅ．Ｍを示す。

【図５Ａ】末梢血微小胞およびＰＢＭＣからのｍｉＲＮＡの発現。（図５Ａ）微小胞およびＰＢＭＣに関する階層的クラスター解析を、フィルタリング基準に基づいて示す。

【図５Ｂ】末梢血微小胞およびＰＢＭＣからのｍｉＲＮＡの発現。微小胞（図５Ｂ）に関する発現プロファイルを示すヒートマップを作製した。

【図５Ｃ】末梢血微小胞およびＰＢＭＣからのｍｉＲＮＡの発現。ＰＢＭＣ（図５Ｃ）に関する発現プロファイルを示すヒートマップを作製した。

【図５Ｄ】末梢血微小胞およびＰＢＭＣからのｍｉＲＮＡの発現。（図５Ｄ）各サンプル群で共有する数、および各サンプル群に特異的な数を示す。

【図６】図６：表１は、様々な疾患、ならびにそれらに関連してアップレギュレートおよびダウンレギュレートされたｍｉＲを示す。癌および癌以外の適用を含む、ヒトの疾患の組織内において重要であるマイクロＲＮＡを列記する。我々のデータセット（図７、表ＩＩ）からは血漿中に検出されないｍｉＲＮＡを、特定の疾患の組織内で増加することが知られているｍｉＲＮＡと比較して、発見者らは、数種のｍｉＲＮＡが血漿中のバイオマーカーとして役立ててよいことを予測することを今回確信する（図６、表１の増加した発現の列の太字のｍｉＲを参照のこと）。

【図７－１】図７－１：表ＩＩは、血漿中で発現されたｍｉＲ、および検出されなかったｍｉＲを示す。

【図７－２】図７－２：表ＩＩ（続き）は、血漿中で発現されたｍｉＲ、および検出されなかったｍｉＲを示す。

【図７－３】図７－３：表ＩＩ（続き）は、血漿中で発現されたｍｉＲ、および検出されなかったｍｉＲを示す。

【図８】図８：表ＩＩＩはｍｉＲを列記し、すべての個体からの血漿微小胞およびＰＢＭＣにおける最も高発現の１０のｍｉＲＮＡを示す。

【図９】図９：表ＩＶは、Sanger miRBase単独（上）、またはSanger miRBaseおよびTargetScanからの共通の標的（下）を使用すると、獲得免疫系の代謝および制御に関与する基準経路が、これらのｍｉＲＮＡの発現により大きく制御されることを示す。

【図１０－１】図１０－１：表Ｖは、ＰＢＭＣ分画中では２０のｍｉＲＮＡが、微小胞血漿サンプルと比較して３倍の発現増加を有したこと、同様にＰＢＭＣと比較しての血漿小胞における倍数変化（最後の列）を示す。

【図１０－２】図１０－２：表Ｖ（続き）は、ＰＢＭＣ分画中では２０のｍｉＲＮＡが、微小胞血漿サンプルと比較して３倍の発現増加を有したこと、同様にＰＢＭＣと比較しての血漿小胞における倍数変化（最後の列）を示す。

【図１１－１】図１１－１：表ＶＩは、検出されたすべてのｍｉＲに関する正規化した発現データ：ディテクターの名称、平均－ＭＮＣ、標準偏差－ＭＮＣ、ディテクターの名称、平均－血清、標準偏差－血清を示す。

【図１１－２】図１１－２（続き）：表ＶＩは、検出されたすべてのｍｉＲに関する正規化した発現データ：ディテクターの名称、平均－ＭＮＣ、標準偏差－ＭＮＣ、ディテクタ

ーの名称、平均－血清、標準偏差－血清を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
本発明は部分的には、炎症反応に関与し、そして/または血中で発現レベルが変化している具体的なマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）の同定に基づく。本発明はさらに部分的には、特定の診断、予後診断、および治療の特徴と、これらのｍｉＲＮＡとの関連性に基づく。
【００２２】
本明細書において説明して実例を挙げたように、特定のｍｉＲＮＡは、組織の障害時および/または炎症時にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる。
本明細書において互換的に使用される場合、“ｍｉＲ遺伝子産生物”、“マイクロＲＮＡ”、“ｍｉＲ”、“ｍｉＲ（斜体）”、または“ｍｉＲＮＡ”は、プロセシングされていないまたはプロセシングされたｍｉＲ遺伝子からのＲＮＡ転写物をいう。ｍｉＲ遺伝子産生物はタンパク質に翻訳されないため、“ｍｉＲ遺伝子産生物”という用語はタンパク質を含まない。プロセシングされていないｍｉＲ遺伝子転写物はまた、“ｍｉＲ前駆体”とも呼ばれ、典型的には約７０－１００ヌクレオチド長のＲＮＡ転写物を包含する。ｍｉＲ前駆体は、リボヌクレアーゼ（例えばダイサー、アルゴノート、ＲＮＡｓｅＩＩＩ（例えば大腸菌ＲＮＡｓｅ　ＩＩＩ））により活性な１９－２５ヌクレオチドＲＮＡ分子に消化されることにより、プロセシングされ得る。この活性な１９－２５ヌクレオチドＲＮＡ分子はまた、“プロセシングされた”ｍｉＲ遺伝子転写物、または“成熟”ｍｉＲＮＡとも呼ばれる。
【００２３】
活性な１９－２５ヌクレオチドＲＮＡ分子は、天然のプロセシング経路（例えばインタクトな細胞もしくは細胞可溶化液を使用して）を通して、または合成のプロセシング経路（例えば単離されたプロセシング酵素、例えば単離されたダイサー、アルゴノート、ＲＮＡｓｅＩＩＩを使用して）により、ｍｉＲ前駆体から得ることができる。活性な１９－２５ヌクレオチドＲＮＡ分子はまた、ｍｉＲ前駆体からプロセシングするのではなく、生物学的または化学的合成により直接合成することもできる。マイクロＲＮＡを本明細書においてこの名称でいう場合、別に指摘していない限り、その名称は前駆体および成熟型の双方に対応する。
【００２４】
本発明は、被験者が、微小胞が放出される障害を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを診断または予後診断する方法を包括的に含む。
当該方法は、被験者由来サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを決定し、そしてサンプル中のｍｉＲ遺伝子産生物のレベルをコントロールと比較することを包含する。本明細書において使用する場合、“被験者”は、そのような障害を有する、または有すると疑われるあらゆる哺乳類であることができる。好ましい態様において、被験者は、そのような障害を有する、または有すると疑われるヒトである。
【００２５】
少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、被験者から得た生体サンプルの細胞において測定することができる。
もう１つの態様において、サンプルは被験者から採取することができ、そしてＤＮＡは標準的な技術により抽出および単離することができる。例えばある種の態様において、サンプルは、放射線療法、化学療法、またはその他の治療処置の開始前に、被験者から入手することができる。対応するコントロールサンプル、またはコントロールリファレンスサンプル（例えばコントロールサンプルの母集団から得たもの）は、被験者の障害を受けていないサンプルから、正常なヒト個体もしくは正常な個体集団から、または被験者のサンプル中の大半の細胞に対応する培養細胞から得ることができる。その後、コントロールサンプルは被験者由来サンプルと共に処理することができ、その結果被験者のサンプル由来細胞中の所定のｍｉＲ遺伝子から産生されるｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを、コントロー

ルサンプルの細胞由来の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルと比較することができる。あるいはリファレンスサンプルを、検査サンプルとは別に（例えば別の時に）入手して処理することもでき、検査サンプル由来細胞中の所定のｍｉＲ遺伝子から産生されるｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを、リファレンスサンプル由来の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルと比較することができる。

【００２６】

１つの態様において、検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、コントロールサンプル中の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルより高い（すなわちｍｉＲ遺伝子産生物の発現は“アップレギュレート”されている）。本明細書において使用する場合、被験者由来サンプル中のｍｉＲ遺伝子産生物の量が、コントロール（例えばリファレンススタンダード、コントロール細胞サンプル、コントロール組織サンプル）中の前記遺伝子産生物の量より多い場合、ｍｉＲ遺伝子産生物の発現は“アップレギュレート”されている。

【００２７】

もう１つの態様において、検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、コントロールサンプル中の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルより低い（すなわちｍｉＲ遺伝子産生物の発現は“ダウンレギュレート”されている）。本明細書において使用する場合、被験者由来サンプル中のその遺伝子から産生されるｍｉＲ遺伝子産生物の量が、コントロールサンプル中の前記遺伝子から産生される量より少ない場合、ｍｉＲ遺伝子産生物の発現は“ダウンレギュレート”されている。コントロールおよび正常なサンプル中の相対的なｍｉＲ遺伝子の発現は、１つまたはそれより多くのＲＮＡ発現スタンダードに関して決定することができる。スタンダードは、例えばｍｉＲ遺伝子のゼロレベルの発現、スタンダードの細胞株におけるｍｉＲ遺伝子の発現レベル、被験者の障害を受けていないサンプル中のｍｉＲ遺伝子発現レベル、または正常なヒトコントロールの集団に関する先に得たｍｉＲ遺伝子発現の平均レベル（例えばコントロールリファレンススタンダード）を包含することができる。

【００２８】

少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、当業者に周知されている多様な技術（定量的または半定量的ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット解析、液相ハイブリダイゼーション法）を使用して測定することができる。特定の態様において、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、被験者から得た検査サンプル由来のＲＮＡを逆転写して、ひと組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供し、その標的オリゴデオキシヌクレオチドを１つまたはそれより多くのｍｉＲＮＡ特異的なプローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて（例えばｍｉＲＮＡ特異的なプローブオリゴヌクレオチドを包含するマイクロアレイ）、検査サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、そして検査サンプルのハイブリダイゼーションプロファイルを、コントロールサンプルから作成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較することにより測定する。コントロールサンプルと比較しての検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲＮＡのシグナルの変化が、被験者が特定の障害を有する、またはそのリスクがあることを示す。

【００２９】

またマイクロアレイは、公知のｍｉＲＮＡ配列から作成された遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブから調製することができる。アレイは、各ｍｉＲＮＡに対して２つの異なるオリゴヌクレオチドプローブを含有してよく、一方は活性な成熟した配列を含有し、そして他方はｍｉＲＮＡの前駆体に対して特異的なものとする。このアレイはまた、ハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件のためのコントロールとして役立てることができるコントロール、例えばわずか数塩基しかヒトのオルソログと異ならない１つまたはそれより多くのマウスの配列を含有してよい。双方の種由来のｔＲＮＡおよびその他のＲＮＡ（例えばｒＲＮＡ、ｍＲＮＡ）もまた、マイクロチップ上にプリントし、特異的なハイブリダイゼーションのための内部基準の、比較的安定なポジティブコントロールを提供してよい。非特異的なハイブリダイゼーションに関する１つまたはそれより多くの適当

なコントロールもまた、マイクロチップ上に含めてよい。この目的に関しては配列は、いかなる公知のｍｉＲＮＡといかなる相同性もないことに基づいて選択する。

【００３０】

マイクロアレイは、当該技術分野に公知の技術を使用して製作してよい。例えば適当な長さ、例えば４０ヌクレオチドのプローブオリゴヌクレオチドは、Ｃ６位で修飾された５’－アミンとし、市販の利用可能なマイクロアレイシステム、例えばthe GeneMachine OmniGrid（登録商標）100 Microarrayer およびAmersham CodeLink（登録商標）活性化スライドを使用してプリントする。標的ＲＮＡに対応する標識ｃＤＮＡオリゴマーは、標識プライマーによる標的ＲＮＡの逆転写により調製する。最初の二本鎖の合成に続いて、ＲＮＡ/ＤＮＡハイブリッドを変性させ、ＲＮＡの鋳型を分解する。その後このように調製した標識した標的ｃＤＮＡを、ハイブリダイゼーションの条件下でマイクロアレイチップにハイブリダイズさせる、例えば６Ｘ　ＳＳＰＥ/３０％ホルムアミド、２５℃、１８時間、続いて０．７５Ｘ　ＴＮＴ中、３７℃で４０分間洗浄する。固定化したプローブＤＮＡがサンプル中の相補的な標的ｃＤＮＡを認識するアレイ上の位置で、ハイブリダイゼーションが起こる。標識した標的ｃＤＮＡは、結合が起こるアレイ上の正確な位置を指し示し、自動的な検出および定量を可能にする。結果はハイブリダイゼーションのイベントのリストから成り、特異的なｃＤＮＡ配列が比較的多量にあること、そしてそれ故患者サンプル中に対応する相補的ｍｉＲが比較的多量にあることを示す。１つの態様に従って標識ｃＤＮＡオリゴマーは、ビオチン標識プライマーより調製されたビオチン標識ｃＤＮＡである。次に、例えばStreptavidin-Alexa64複合体を使用してのビオチン含有転写物の直接的な検出によりマイクロアレイを処理し、従来のスキャン法を利用してスキャンする。アレイ上の各スポットの画像強度は、患者サンプル中の対応するｍｉＲの量と比例する。

【００３１】

アレイの使用は、ｍｉＲＮＡの発現検出に関していくつかの利点を有する。第一に、数百の遺伝子の網羅的な発現を同一サンプル中で一度に同定することができる。第二に、オリゴヌクレオチドプローブの注意深いデザインを通して、成熟した分子と前駆体分子の双方の発現を同定することができる。第三に、ノーザンブロット解析と比較して、チップは少量のＲＮＡを必要するため、２．５μｇの総ＲＮＡを使用して再現性ある結果を提供する。比較的限定された数のｍｉＲＮＡ（一種あたり数百）であることが、各種に関する個別のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、いくつかの種に関する共通のマイクロアレイの作成を可能にする。そのようなツールは、様々な条件下での公知の各ｍｉＲに関する種横断的な発現の解析を可能にする。

【００３２】

具体的なｍｉＲの定量的発現レベルのアッセイのための使用に加えて、ｍｉＲＮｏｍｅの実質的な部分、好ましくはｍｉＲＮｏｍｅ全体に対応する、ｍｉＲＮＡ特異的なプローブオリゴヌクレオチドを含有するマイクロチップを利用して、ｍｉＲ発現パターンの解析のためのｍｉＲ遺伝子発現プロファイリングを実行してもよい。個別のｍｉＲシグネチャは、確立された疾患のマーカーに、または直接疾患の状態に関連させることができる。

【００３３】

本明細書に記載した発現プロファイリング法に従って、特定の障害を有すると疑われる被験者由来サンプルからの総ＲＮＡを、定量的に逆転写して、サンプル中のＲＮＡに相補的なひと組の標識した標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供する。次に標的オリゴデオキシヌクレオチドを、ｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドを包含するマイクロアレイにハイブリダイズさせて、サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供する。この結果は、サンプル中のｍｉＲＮＡの発現パターンを表す、サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルである。このハイブリダイゼーションプロファイルは、マイクロアレイ中のｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドへの、サンプル由来標的オリゴデオキシヌクレオチドの結合からのシグナルを包含する。プロファイルは、結合の有無（シグナル　対　ゼロシグナル）として記録してよい。より好ましくは記録されるプロファイルは、各ハイブリダイゼーションからのシグナルの強度を含む。この

プロファイルを、正常なコントロールサンプルまたはリファレンスサンプルから作成されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較する。シグナルの変化が、被験者における特定の障害の存在、または発症する傾向を示す。

【００３４】

ｍｉＲ遺伝子の発現を測定する他の技術もまた、当該分野の技術の範囲内であり、ＲＮＡの転写および分解の速度を測定するための様々な技術を含む。

本発明はまた、被験者が有害な予後を伴う特定の障害を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを診断する方法を提供する。本方法において、特定の障害の有害な予後と関連する少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルは、被験者から得た検査サンプル由来のＲＮＡを逆転写して、ひと組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供することにより測定する。次にこの標的オリゴデオキシヌクレオチドを、１つまたはそれより多くのｍｉＲＮＡ－特異的プローブオリゴヌクレオチド（例えばｍｉＲＮＡ－特異的プローブオリゴヌクレオチドを包含するマイクロアレイ）とハイブリダイズさせて、検査サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、そして検査サンプルハイブリダイゼーションプロファイルを、コントロールサンプルから作成されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較する。コントロールサンプルと相対しての検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲＮＡのシグナルの変化が、被験者が有害な予後を伴う特定の障害を有する、または発症するリスクがあることを示す。

【００３５】

症例によっては、サンプル中の複数の異なるｍｉＲ遺伝子産生物の発現レベルを同時に決定することが望ましいこともある。他の症例では、特定の障害に相関するすべての公知のｍｉＲ遺伝子の転写物の発現レベルを決定することが望ましいこともある。数百ものｍｉＲ遺伝子または遺伝子産生物に関する具体的な発現レベルを評価することは、時間もかかり、多量の総ＲＮＡ（各ノーザンブロットに関しては少なくとも２０μｇ）を必要とし、自動放射線撮影技術は放射性同位体を必要とする。

【００３６】

これらの制限を克服するため、ひと組のｍｉＲ遺伝子に対して特異的であるひと組のオリゴヌクレオチド（例えばオリゴデオキシヌクレオチド）プローブを含有する、マイクロチップフォーマット（すなわちマイクロアレイ）上のオリゴライブラリーを構成してよい。そのようなマイクロアレイを使用して、生体サンプル中の多数のマイクロＲＮＡの発現レベルを、ＲＮＡを逆転写してひと組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを作成し、そしてそれらをマイクロアレイ上のプローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて、ハイブリダイゼーション、または発現プロファイルを作成することにより、決定することができる。次に検査サンプルのハイブリダイゼーションプロファイルを、コントロールサンプルのそれと比較して、どのマイクロＲＮＡが変化した発現レベルを有するかを決定することができる。本明細書において使用する場合、“プローブオリゴヌクレオチド”または“プローブオリゴデオキシヌクレオチド”は、標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする能力のあるオリゴヌクレオチドをいう。“標的オリゴヌクレオチド”または“標的オリゴデオキシヌクレオチド”は、検出される分子（例えばハイブリダイゼーションを介して）をいう。“ｍｉＲ特異的プローブオリゴヌクレオチド”または“ｍｉＲに対して特異的なプローブオリゴヌクレオチド”により、特異的なｍｉＲ遺伝子産生物と、または特異的なｍｉＲ遺伝子産生物の逆転写物とハイブリダイズするように選択された配列を有する、プローブオリゴヌクレオチドを意味する。

【００３７】

特定のサンプルの“発現プロファイル”または“ハイブリダイゼーションプロファイル”は、本質的にサンプルの状態のフィンガープリントである；２つの状態で、どれか特定の遺伝子の発現が類似していてもよく、いくつかの遺伝子を同時に評価することで、その細胞の状態に独特である遺伝子発現プロファイルの作成が可能になる。すなわち、正常なサンプルは、対応する障害提示サンプルとは識別されてよい。そのような障害提示サンプルの内で、異なる診断の状態（例えば良好なまたは悪い長期生存の見通し）が決定されて

もよい。異なる状態にある障害提示サンプルの発現プロファイルを比較することにより、これら状態の各々においてどの遺伝子が重要であるか（遺伝子のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーション双方を含む）に関する情報が得られる。

【００３８】

障害提示サンプル内で異なって発現された配列の同定、ならびに異なる予後の結果に至る異なる発現は、いくつかのやり方でのこの情報の使用することが可能になる。例えば特定の治療計画を（例えば特定の被験者における長期的予後を改善するように化学療法薬が作用するかどうかを決定するために）評価してよい。同様に、被験者由来サンプルを公知の発現プロファイルと比較することにより、診断を行う、または確立してよい。さらにこれらの遺伝子発現プロファイル（または個々の遺伝子）は、特定の障害の発現プロファイルを抑制する、または悪い予後のプロファイルをより良好なプロファイルに変換する薬剤候補物質のスクリーニングを可能にする。

【００３９】

細胞内の１つまたはそれより多くのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルの変化は、結果的にこれらｍｉＲに関する１つまたはそれより多くの意図された標的の制御を解除してしまう可能性があり、そのことが特定の障害を導き得る。それ故、ｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを（例えば障害提示細胞内でアップレギュレートされているｍｉＲのレベルを減少させることにより、障害提示細胞内でダウンレギュレートされているｍｉＲのレベルを増加させることにより）変化させることで、障害を治療することができるものと思われる。

【００４０】

したがって本発明は、被験者の障害を治療する方法を包括的に含み、その場合被験者の細胞において少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物は制御が解除されている（例えばダウンレギュレート、アップレギュレートされている）。１つの態様において、検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルが、コントロールサンプルまたはリファレンスサンプル中の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルより高い。もう１つの態様において、検査サンプル中の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルが、コントロールサンプル中の対応するｍｉＲ遺伝子産生物のレベルより低い。少なくとも１つの単離されたｍｉＲ遺伝子産生物が検査サンプル中でダウンレギュレートされている場合、当該方法は、少なくとも１つの単離されたｍｉＲ遺伝子産生物、または単離されたそのバリアントもしくは生物学的に活性なそのフラグメントの有効量を投与し、そうして被験者体内の障害提示細胞の増殖を阻害することを包含する。

【００４１】

例えば、あるｍｉＲ遺伝子産生物が被験者の癌細胞内でダウンレギュレートされている場合、有効量の単離されたｍｉＲ遺伝子産生物を被験者に投与することで、癌細胞の増殖を阻害することができる。被験者に投与する単離されたｍｉＲ遺伝子産生物は、癌細胞内でダウンレギュレートされている内在する野生型ｍｉＲ遺伝子産生物と同一であることができ、またはそのバリアントもしくは生物学的に活性なそのフラグメントであることもできる。

【００４２】

本明細書において定義する場合、ｍｉＲ遺伝子産生物の“バリアント”は、対応する野生型ｍｉＲ遺伝子産生物と１００％より少ない同一性を有するが、対応する野生型ｍｉＲ遺伝子産生物の１つまたはそれより多くの生物的活性を保有するｍｉＲＮＡをいう。そのような生物的活性の例として、標的ＲＮＡ分子の発現の阻害（例えば標的ＲＮＡ分子の翻訳を阻害する、標的ＲＮＡ分子の安定性を調節する、標的ＲＮＡ分子のプロセシングを阻害する）、ならびに癌および/または骨髄増殖性障害と関連する細胞の過程（例えば細胞の分化、細胞の成長、細胞死）の阻害を含むが、これに限定されない。これらのバリアントには、ｍｉＲ遺伝子における種のバリアント、および１つまたはそれより多くの変異（例えば置換、欠失、挿入）の結果であるバリアントを含む。ある種の態様においてバリアントは、対応する野生型ｍｉＲ遺伝子産生物と少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％同一である。

【００４３】
本明細書において定義する場合、ｍｉＲ遺伝子産生物の“生物学的に活性なフラグメント”は、対応する野生型ｍｉＲ遺伝子産生物の１つまたはそれより多くの生物学的活性を保有する、ｍｉＲ遺伝子産生物のＲＮＡフラグメントをいう。上に記載したように、そのような生物学的活性の例として、標的ＲＮＡ分子の発現の阻害、ならびに癌および/または骨髄増殖性障害と関連する細胞の過程の阻害を含むが、これに限定されない。ある種の態様において生物学的に活性なフラグメントは、少なくとも約５、７、１０、１２、１５または１７ヌクレオチド長である。特定の態様において、単離されたｍｉＲ遺伝子産生物は、１つまたはそれより多くの付加的な抗癌治療と組み合わせて被験者に投与することができる。適切な抗癌治療には、化学療法、放射線療法、およびそれらの組み合せ（例えば放射線化学療法）を含むが、これに限定されない。

【００４４】
癌細胞内で少なくとも１つの単離されたｍｉＲ遺伝子産生物がアップレギュレートされている場合、当該方法は、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の発現を阻害し、そうして障害提示細胞の増殖を阻害する化合物の有効量を、被験者に投与することを包含する。そのような化合物は、本明細書においてｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物という。適切なｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物の例として、本明細書に記載したもの（例えば二本鎖ＲＮＡ、アンチセンス核酸、および酵素としてのＲＮＡ分子）を含むが、これに限定されない。

【００４５】
特定の態様において、ｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物は、１つまたはそれより多くの抗癌治療と併用して被験者に投与することができる。適切な抗癌治療には、化学療法、放射線療法、およびそれらの組み合せ（例えば放射線化学療法）を含むが、これに限定されない。

【００４６】
本明細書に記載したように、少なくとも１つの単離されたｍｉＲ遺伝子産生物が癌細胞内でアップレギュレートされている場合、当該方法は、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の発現を阻害する少なくとも１つの化合物の有効量を被験者に投与し、そうして癌細胞の増殖を阻害することを包含する。

【００４７】
“治療する”、“治療すること”、“治療”という用語は、本明細書において使用する場合、疾患の症状の開始を妨げるもしくは遅らせる、および/または疾患、障害もしくは状態の症状の重症度もしくは頻度を軽減することを含む、疾患または状態、例えば癌および/またはその他の状態または障害に関連する症状を寛解させることをいう。“被験者”、“患者”および“個体”という用語は、本明細書において、動物、例えば哺乳類（霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、またはその他のウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、げっ歯類、もしくはネズミの種を含むがこれに限定されない）を含むものと定義する。好ましい態様において動物はヒトである。

【００４８】
本明細書において使用する場合、“単離された”ｍｉＲ遺伝子産生物は、合成されたもの、またはヒトの介入により天然の状態から変化させたもしくは取り出されたものである。例えば、合成ｍｉＲ遺伝子産生物、またはその天然の状態の共存する材料から部分的にもしくは完全に分離されたｍｉＲ遺伝子産生物は、“単離された”とみなされる。単離されたｍｉＲ遺伝子産生物は、実質的に精製された形で存在することができ、またはｍｉＲ遺伝子産生物が送達された細胞内に存在することができる。したがって送達可能なように送達された、または細胞内で発現されたｍｉＲ遺伝子産生物は、“単離された”ｍｉＲ遺伝子産生物とみなされる。ｍｉＲ前駆体分子から細胞内部で産生されるｍｉＲ遺伝子産生物もまた、“単離された”分子であるとみなされる。本発明に従って、本明細書に記載した単離されたｍｉＲ遺伝子産生物を、被験者（例えばヒト）を治療するための医薬剤の製造のために使用することができる。

【００４９】

単離されたｍｉＲ遺伝子産生物は、いくつかの標準的な技術を使用して得ることができる。例えばｍｉＲ遺伝子産生物は、当該技術分野で公知の方法を使用して化学的に合成する、またはリコンビナントにより産生させることができる。１つの態様においてｍｉＲ遺伝子産生物は、適当に保護されたリボヌクレオシドホスホラミダイト、および従来のＤＮＡ/ＲＮＡシンセサイザーを使用して化学的に合成する。合成ＲＮＡ分子または合成試薬の市販供給元として、例えばProligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, U.S.A.), Pierce Chemical (Perbio Scienceの一部, Rockford, IL, U.S.A.), Glen Research (Sterling, VA, U.S.A.), ChemGenes (Ashland, MA, U.S.A.) およびCruachem (Glasgow, UK)を含む。

【００５０】

あるいはｍｉＲ遺伝子産生物は、いずれかの適切なプロモーターを使用して、リコンビナントの環状または直鎖ＤＮＡプラスミドから発現させることができる。プラスミドからＲＮＡを発現するための適切なプロモーターとして、例えばＵ６もしくはＨｌ　ＲＮＡ　ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター配列、またはサイトメガロウイルスプロモーターを含む。その他の適切なプロモーターの選択も当該分野の技術の範囲内である。本発明のリコンビナントプラスミドはまた、細胞（例えば癌細胞、骨髄増殖性障害を提示する細胞）におけるｍｉＲ遺伝子産生物の発現のための、誘導性プロモーターまたは制御可能なプロモーターを包含することができる。

【００５１】

リコンビナントプラスミドから発現させたｍｉＲ遺伝子産生物は、標準的な技術により培養細胞発現系から単離することができる。リコンビナントプラスミドから発現させたｍｉＲ遺伝子産生物はまた、細胞内に送達し、細胞内で直接発現させることができる。

【００５２】

ｍｉＲ遺伝子産生物は、別々のリコンビナントプラスミドから発現させることができ、または同一のリコンビナントプラスミドから発現させることもできる。１つの態様においてｍｉＲ遺伝子産生物は、ただ１つのプラスミドからＲＮＡ前駆体分子として発現させ、そして癌細胞内に現存するプロセシングシステムを含むがこれに限定されない適切なプロセシングシステムにより、前駆体分子を機能的なｍｉＲ遺伝子産生物にプロセシングする。

【００５３】

ｍｉＲ遺伝子産生物を発現するための適切なプラスミドの選択、核酸配列をプラスミド内に挿入して遺伝子産生物を発現させる方法、およびリコンビナントプラスミドを対象の細胞に送達する方法は、当該分野の技術の範囲内である。例えばZeng et al. (2002), Molecular Cell 9:1327-1333; Tuschl (2002), Nat. Biotechnol, 20:446-448; Brummelkamp et al. (2002), Science 296:550-553; Miyagishi et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500; Paddison et al (2002), Genes Dev. 16:948-958; Lee et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505;および Paul et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:505-508を参照のこと。これら文献の全開示内容を本明細書において参照として援用する。例えばある種の態様において、ｍｉＲ遺伝子産生物を発現するプラスミドは、ＣＭＶ即時－早期プロモーターのコントロール下でｍｉＲ前駆体ＲＮＡをコードする配列を包含することができる。本明細書において使用する場合、プロモーターの“コントロール下”は、ｍｉＲ遺伝子産生物をコードする核酸配列がプロモーターの３’に位置し、その結果プロモーターがｍｉＲ遺伝子産生物をコードする配列の転写を開始することができることを意味する。

【００５４】

ｍｉＲ遺伝子産生物はまた、リコンビナントウイルスベクターから発現させることができる。ｍｉＲ遺伝子産生物は、２つの別々のリコンビナントウイルスベクターから、または同一のウイルスベクターから産生させることができると考えられる。リコンビナントウイルスベクターから発現させたＲＮＡは、標準的な技術により培養細胞発現系から単離するか、または細胞（例えば癌細胞、骨髄増殖性障害を提示する細胞）内で直接発現させる

かのいずれかとすることができる。

【００５５】

本発明の治療法のその他の態様において、ｍｉＲの発現を阻害する少なくとも１つの化合物の有効量を、被験者に投与することができる。本明細書において使用する場合、“ｍｉＲの発現を阻害すること”は、治療後にｍｉＲ遺伝子産生物の前駆体および/または活性な成熟した形の産生が、治療前に産生された量より少ないことを意味する。当業者は、例えば本明細書で考察したｍｉＲ転写物のレベルを決定するための技術を使用して、ｍｉＲの発現が細胞内で阻害されているかどうかを容易に決定することができる。阻害は、遺伝子の発現レベルで（すなわちｍｉＲ遺伝子産生物をコードするｍｉＲ遺伝子の転写を阻害することにより）、またはプロセシングのレベルで（例えば成熟した活性なｍｉＲへのｍｉＲ前駆体のプロセシングを阻害することにより）起こることができる。

【００５６】

本明細書において使用する場合、ｍｉＲの発現を阻害する化合物の“有効量”は、癌および/または骨髄増殖性障害に罹っている被験者における細胞の増殖を阻害するための十分量である。当業者は、所定の被験者に投与するｍｉＲ発現阻害化合物の有効量を、因子、例えば被験者のサイズおよび体重；疾患の浸透の程度；被験者の年齢、健康状態および性別；投与経路；ならびに投与が局所的または全身性であるかどうかを考慮することにより、容易に決定することができる。

【００５７】

当業者はまた、ｍｉＲの発現を阻害する化合物を所定の被験者に投与するための適当な投与計画を、本明細書に記載したように容易に決定することができる。ｍｉＲ遺伝子の発現を阻害するための適切な化合物として、二本鎖ＲＮＡ（例えば低分子干渉ＲＮＡまたは“ｓｉＲＮＡ”）、アンチセンス核酸、および酵素としてのＲＮＡ分子、例えばリボザイムを含む。これらの化合物は各々、所定のｍｉＲ遺伝子産生物を標的とし、標的ｍｉＲ遺伝子産生物の発現を（例えば翻訳を阻害することにより、開裂および/または分解を誘導することにより）妨害することができる。

【００５８】

例えば所定のｍｉＲ遺伝子の発現は、ｍｉＲ遺伝子産生物の少なくとも一部分との、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列相同性を有する、単離された二本鎖ＲＮＡ（“ｄｓＲＮＡ”）を用いて、ｍｉＲ遺伝子のＲＮＡ干渉を誘導することにより阻害することができる。特定の態様において、ｄｓＲＮＡ分子は“低分子干渉ＲＮＡ”または“ｓｉＲＮＡ”である。

【００５９】

少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の投与、またはｍｉＲ発現を阻害するための少なくとも１つの化合物の投与は、癌および/または骨髄増殖性障害を有する被験者における、細胞（例えば癌細胞、骨髄増殖性障害を提示する細胞）の増殖を阻害することになる。本明細書において使用する場合、“癌細胞、または骨髄増殖性障害を提示する細胞の増殖を阻害する”ことは、細胞を死滅させる、または細胞の成長を永久にもしくは一時的に抑止もしくは遅延させることを意味する。被験者の体内のそのような細胞の数が、ｍｉＲ遺伝子産生物もしくはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物の投与後に一定であるか、または減少している場合、細胞増殖の阻害を推測することができる。癌細胞または骨髄増殖性障害を提示する細胞の増殖の阻害はまた、そのような細胞の絶対数は増加していても、腫瘍の成長速度が減少している場合にも、推測することができる。

【００６０】

ｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物はまた、あらゆる適切な経腸的または非経口の投与経路により被験者に投与することができる。本方法のための適切な経腸投与経路には、例えば経口、経直腸、または経鼻による送達を含む。適切な非経口経路には、例えば血管内投与（例えば静脈内ボーラス注射、静脈内点滴、動脈内ボーラス注射、動脈内点滴、および血管内へのカテーテル滴下注入）；組織周囲および組織内への注射（例えば腫瘍周囲および腫瘍内への注射、網膜内注射、または網膜下注射）；皮下注入（

例えば浸透圧ポンプによる）を含む皮下注射または皮下設置(deposition)；例えばカテーテルまたはその他の設置デバイス（例えば網膜ペレット、または座剤、または多孔質、非多孔質、もしくはゼラチンの材料を包含するインプラント）による対象組織への直接投与、；および吸入、を含む。特に適切な投与経路は、注射、注入、および腫瘍内への直接注射である。

【００６１】

ｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物は、それらを被験者に投与する前に、当該分野の公知の技術に従って、時には“医薬剤”と呼ばれる医薬組成物として製剤化することができる。したがって本発明は、癌および/または骨髄増殖性障害を治療するための医薬組成物を包括的に含む。

【００６２】

本医薬組成物は、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはｍｉＲ遺伝子産生物もしくはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも１つの核酸）（例えば０．１から９０重量％）、または生理学的に受容可能なその塩を、医薬的に受容可能な担体と混合して包含する。ある種の態様において本発明の医薬組成物は、付加的に１つまたはそれより多くの抗癌薬（例えば化学療法薬）を包含する。本発明の医薬製剤はまた、リポソームおよび医薬的に受容可能な担体によりカプセル化された、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはｍｉＲ遺伝子産生物もしくはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも１つの核酸）を包含することができる。

【００６３】

本発明の医薬組成物はまた、従来の医薬用賦形剤および/または添加剤を包含することができる。適切な医薬用賦形剤には、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調整剤、バッファー、およびｐＨ調整剤を含む。適切な添加剤として、例えば生理学的に生物学的適合性のあるバッファー（例えばトロメタミン塩酸塩）、キレート剤（例えばＤＴＰＡ、ＤＴＰＡ－ビスアミド）もしくはキレートカルシウム複合体（例えばカルシウムＤＴＰＡ、ＣａＮａＤＴＰＡ－ビスアミド）の添加、または所望により、カルシウム塩もしくはナトリウム塩（例えば塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、もしくは乳酸カルシウム）の添加を含む。本発明の医薬組成物は、液体の形での使用のために梱包することができるし、または凍結乾燥することもできる。

【００６４】

本発明の固体医薬組成物用には、従来の非毒性の固体の医薬的に受容可能な担体；例えば医薬グレードのマンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウム、等を含むことができる。

【００６５】

例えば経口投与用の固体医薬組成物は、上に列記した担体および賦形剤のいずれか、および１０－９５％、好ましくは２５％－７５％の少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコードする配列を包含する少なくとも１つの核酸）を包含することができる。エアゾール（吸入）投与用の医薬組成物は、０．０１－２０重量％、好ましくは１重量％－１０重量％の、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはｍｉＲ遺伝子産生物もしくはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも１つの核酸）を、上に記載したようなリポソーム内、および噴霧剤内に封入して包含することができる。担体はまた所望の場合には、例えば鼻腔内送達用のレシチンを含めることができる。

【００６６】

本発明の医薬組成物はさらに、１つまたはそれより多くの抗癌薬を包含することができる。特定の態様において当該組成物は、少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物またはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはｍｉＲ遺伝子産生物もしくはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも１つの核酸）、および少なくとも１つの化学療

法薬を包含する。本発明の方法に適する化学療法薬として、ＤＮＡ－アルキル化薬、抗腫瘍性抗生物質、抗代謝薬、チューブリンの安定化剤、ホルモンのアンタゴニスト剤、トポイソメラーゼ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害薬、ＮＭＧ－ＣｏＡ阻害薬、ＣＤＫ阻害薬、サイクリン阻害薬、カスパーゼ阻害薬、メタロプロテイナーゼ阻害薬、アンチセンス核酸、三重鎖ＤＮＡ、核酸アプタマー、ならびに分子的に修飾されたウイルス、細菌および外毒素の薬剤を含むが、これに限定されない。本発明の組成物に適する薬剤の例として、シチジンアラビノシド、メトトレキセート、ビンクリスチン、エトポシド（ＶＰ－１６）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン（ＣＤＤＰ）、デキサメタゾン、アルグラビン、シクロホスファミド、サルコリシン、メチルニトロソウレア、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ビンブラスチン、カンプトテシン、アクチノマイシン－Ｄ、ミトマイシンＣ、過酸化水素、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、カルムスチン、ストレプトゾシン、ＣＰＴ－１１、タキソール、タモキシフェン、ダカルバジン、リツキシマブ、ダウノルビシン、１－β－Ｄ－アラビノフラノシルシトシン、イマチニブ、フルダラビン、ドセタキセル、およびＦＯＬＦＯＸ４を含むが、これに限定されない。

【００６７】

１つの態様において本方法は、検査薬を細胞に提供し、そして癌細胞内の減少した発現ルベルに関連する少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルを測定することを包含する。適切なコントロール（例えばコントロール細胞内のｍｉＲ遺伝子産生物のレベル）と比較して、細胞内でのｍｉＲ遺伝子産生物のレベルが増加することが、検査薬が抗癌薬であることを示す。

【００６８】

適切な薬剤には、薬剤（例えば低分子物、ペプチド）、および生体高分子（例えばタンパク質、核酸）を含むが、これに限定されない。薬剤は、リコンビナントにより、合成により製造することができるが、あるいは天然の原料から単離（例えば精製）してもよい。そのような薬剤を細胞に提供するための様々な方法（例えば形質導入）は、当該分野において周知されており、そのような方法のいくつかは本明細書でも上述している。少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子産生物の発現を検出するための方法（例えばノーザンブロット法、in situハイブリダイゼーション、ＲＴ－ＰＣＲ、発現プロファイリング）もまた、当該技術分野において周知されている。これらの方法のいくつかもまた本明細書に記載する。

【実施例】

【００６９】

以下の非限定的な実施例を参照することにより本発明はより理解されることと思うが、これら実施例は本発明を説明するためであって、限定するために提示する訳ではない。

本明細書のデータは、活性化された単核食細胞およびＴＨＰ－１細胞が、新たに単離された単球の生存および分化を誘導する微小胞を放出することを示す。理論に拘束されることは望まないが、発見者らは本明細書において、特定の炎症性疾患のもとでは微小胞の含有量が変化して急速に反応を誘導するのではないかと考えている。データはまた、微小胞がヒト末梢血内を循環することを示す。循環血液中の微小胞は、正常な細胞の恒常性を制御し、組織の傷害および炎症の間には遠位の細胞への指示を循環する。

【００７０】

微小胞は、疾患の病因、および自然免疫反応の全身へのメディエーターに関するバイオマーカーとして、役立つものと思われる。したがって侵襲的方法により組織を得る代わりに、末梢血中の微小胞の単離を通して同様の情報を入手できることは、有益である。また末梢血中の微小胞の正常なシグネチャを理解することは、急性炎症イベント時のイベントを理解するための基盤を提供することにもなる。

【００７１】

また本明細書に示したように異常なマクロファージの分化は、免疫の恒常性の破壊をきたす。単球の成熟はＧＭ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦにより誘導されるため、発見者らは、ＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦを介した分化の機序および相違点を理解する研究に着手し

た。Ｍ－ＣＳＦとは異なり、ＧＭ－ＣＳＦに対する応答における分化への傾倒は、急速で非可逆的であった（データは示していない）。わずか４時間の処置でマクロファージの分化が誘導されるため、持続的なＧＭ－ＣＳＦの刺激はこの効果に関しては必要ではなかった。同様の観察結果は、マクロファージの分化のモデルとして使用されるＰＭＡ処理したＴＨＰ１細胞においても得られた。

【００７２】

したがって発明者らは、分化を誘導する際に、シグナルを維持するか、または他の細胞を活性化して分化させるかのいずれかである少なくとも１つの因子が分泌されると特定した。それ故、単球またはＴＨＰ１細胞を、各々ＧＭ－ＣＳＦに４時間またはＰＭＡに１時間暴露させ、その後細胞を洗浄し、刺激物質を含まない最小培地に入れた。２４時間後、培養液の上清を集め、未分化の単球またはＴＨＰ１細胞に加えた。特に、ＰＭＡ処理したＴＨＰ１細胞の上清、またはＧＭ－ＣＳＦ処理した単球の上清は、単球およびＴＨＰ１細胞を分化させた（データは示していない）。

【００７３】

培養液上清中の２７種類までの異なるサイトカインを検出するためBioplex懸濁アレイシステムを使用したが、発見者らは原因となるサイトカインを検出することはできなかった。発見者らは、増殖因子非依存性のＴＨＰ１細胞株をＧＭ－ＣＳＦ刺激した単球の上清を用いて分化させたことから、サイトカイン/増殖因子がこの効果の原因ではないと結論した。発明者らは次に、微小胞が培養液上清中に分泌されて骨髄の成熟を仲介する可能性について調べた。

【００７４】

図１に示したように、ＧＭ－ＣＳＦで２４時間処理した単球は、未処理の単球（淡黒点）と比較して、培養液上清中に有意数の微小胞（黒点）を放出していた。

同様にＰＭＡ処理したＴＨＰ１細胞もまた、分化の間に微小胞を分泌した（データは示していない）。特に図１は、分化がマクロファージからの微小胞の放出を誘導したことを示す。末梢血単球（ＰＢＭ）は未処理のまま（淡黒点）、またはＧＭ－ＣＳＦで２４時間処理（黒点）した。細胞を含まない上清を集め、超遠心した。小胞をＰＢＳ中に再懸濁し、フローサイトメトリーでサイズについて解析した。解析の前に、ＦＳＳおよびＳＳＣのパラメータを、２μｍスタンダードビーズを使用して調整した（示していない）。３名の異なるドナーからの代表的なデータを示す。

【００７５】

ＰＭＡ処理したＴＨＰ１細胞由来の微小胞を精製し、新たに単離した単球、または未分化のＴＨＰ１細胞のいずれかに加えた。形態的に示した（図２Ａ－２Ｃを参照のこと）ように、微小胞単独で、双方の細胞タイプにおいてマクロファージの分化、および表面抗原の発現を誘導した（データは示していない）。

【００７６】

これらの微小胞の含有物を解析した。発見者らは、ＰＭＡ処理したＴＨＰ１細胞由来微小胞内に、ｍｉＲＮＡの存在を検出した（データは示していない）。

発見者らはまた、正常なボランティアの末梢血中の循環する微小胞およびｍｉＲＮＡについても評価した。サイズに基づいて、発見者らは循環血液中の微小胞の３つの亜集団を発見した（図３Ａ）。マクロファージ由来微小胞は、マンノース受容体（ＣＤ２０６）およびＭＨＣ　ＩＩを検出する抗体を使用して検出した（図３Ｂ）。血漿中の全微小胞のおよそ４０％（ゲート領域）が、ＣＤ２０６またはＭＨＣＩＩのいずれかの発現に基づき、マクロファージに由来する（図３Ｃ）。

【００７７】

発明者らはさらに、ｍｉＲＮＡが末梢血微小胞内に含有されているかどうかを決定した。我々は多数のｍｉＲＮＡの発現を検出した。最も高く検出されたｍｉＲＮＡを、表ＩＩＩを示す図８に示す（ｎ＝５１）。

【００７８】

特に、ｍｉＲ－１４６は末梢血中では検出されず、一方ｍｉＲ－１５５の発現は最も高

発現のｍｉＲＮＡの８０分の１であった。ｍｉＲ－１４６およびｍｉＲ－１５５の双方とも我々のＩＰＦ患者サンプル中では上昇していたが、正常なドナー由来末梢血中では低くて検出されなかったことから、循環血液中のｍｉＲＮＡを検討することは、疾患のバイオマーカーとして役立つと思われる。

【００７９】

今回本明細書において、循環血液中の微小胞はｍｉＲＮＡを含有し、そして循環血液中微小胞が、ｍｉＲＮＡが細胞－対－細胞の情報交換を行うための手段を提供することができることを示す。ｍｉＲＮＡを収容する微小胞はまた、疾患の遺伝的基盤への洞察を提供することができ、予測バイオマーカーとして役立てることができる。

【００８０】

またマクロファージの分化の間に放出される微小胞は、未成熟細胞の成熟を仲介することができる。マクロファージの成熟時に集められた微小胞は、ヒト単球の分化および生存を仲介し、ＲＮＡを含有する。ｍｉＲＮＡおよびプロセシングされたｍＲＮＡの双方とも、未成熟細胞に成熟のシグナルを与える原因となる。

【００８１】

実施例－血漿

微小胞は、正常な健康な固体の血漿から単離する。微小胞およびマッチする単核細胞の双方からＲＮＡを単離し、リアルタイムＰＣＲにより４２０の公知の成熟ｍｉＲＮＡについてプロファイリングする。データセットの階層的クラスター解析は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）および血漿微小胞間のｍｉＲＮＡ発現における有意差を示した。

【００８２】

我々は、微小胞およびＰＢＭＣで有意に発現された各々１０４および７５のｍｉＲＮＡについて観察した。特に３３のｍｉＲＮＡは、ＰＢＭＣと比較して微小胞において特異的に発現された。ｍｉＲＮＡのコンピュータによるモデリングを行い、検出されたｍｉＲＮＡにより制御される生物学的経路を決定した。血液由来微小胞で発現されたマイクロＲＮＡの大半は、血液細胞の細胞分化および代謝経路を制御すると予測された。興味深いことに選択された数種のマイクロＲＮＡは、免疫機能の重要なモジュレータであると予測される。

【００８３】

本実施例は、正常な被験者の循環血血漿の微小胞におけるｍｉＲＮＡの発現を同定し定義する初めての例である。

近年のエビデンスは、細胞間のｍＲＮＡおよびｍｉＲＮＡの遺伝子交換が、エキソームを介しての伝達を通して達成される可能性があることを明らかにしている（PMID:17486113）。微小胞は、正常な健常な細胞タイプ、または損傷された細胞タイプにより放出されるエンドサイトーシス由来の小さなエキソソーム/小胞である（PMID: 17337785, PMID: 17409393, PMID: 16791265）。微小胞は細胞膜から細胞外環境に排出されて、細胞間の情報交換を促進する。これらの小さなサイズ（５０ｎｍから１μｍ）にもかかわらず、微小胞は生理活性分子内に濃縮され、核酸および/またはタンパク質を含有すると予想されている：これらの細胞粒子は、成長、分化、および癌の進行に一役を担う（PMID: 16453000）。末梢血において、２/３の微小胞は血小板に由来する。血小板由来微小胞は、血管新生および癌、例えば肺癌の転移拡大に一役を担う（PMID: 15499615）。血小板由来微小胞は、造血細胞、内皮細胞、および単核球細胞における遺伝子発現を制御することで免疫反応を誘導する（PMID: 17378242, PMID: 17127485）。

【００８４】

興味深いことに、微小胞とｍｉＲＮＡとの関係が近年構築されてきた。近年、Valadiおよび共同研究者らは、ヒトおよびマウスのマスト細胞株から放出される小胞が、１２００を越えるｍＲＮＡおよびおよそ１２１のｍｉＲＮＡ分子を含有することを報告した（PMID: 17486113）。反対に本発明は、自然の状態で生成されるヒト血漿および血液の微小胞が、ex vivoで生物学的効果を導くマイクロＲＮＡを含有していることに関する。

【００８５】

図８－表１は、マイクロＲＮＡが、癌および癌以外の適用を含むヒトの疾患において重要であることを示す。ヒト血漿微小胞において、疾患組織では発現が増加するが、正常には本来の低発現または検出できない発現を伴うマイクロＲＮＡ分子（表１、図６に示す）は、健康および疾患の変化を定義する機会を提供し、そして有効なバイオマーカーであってよい（太字、増加した発現の列）。同様に正常には豊富なマイクロＲＮＡが、組織内で観察される減少を反映して、ヒト血漿微小胞内で減少していてもよい（太字、減少した発現の列）。

【００８６】

かなりのエビデンスが、ヒト遺伝子系の不可避な礎石としてのｍｉＲＮＡの重要性を示している。遺伝子材料を伝達するために微小胞の使用を採り入れることは、ヒト体内での有効な伝達方法となるだろう。微小胞によるｍｉＲＮＡの伝達は、遠距離での情報交換を可能にすることだろう。

【００８７】

方法

血液の採集および微小胞の単離。末梢血（４０ｃｃ）は、インフォームドコンセント後２４名女性および２７名男性の健康な非喫煙白人ドナーから、ＥＤＴＡ試験管に採集した。血液の採集は、午前中および午後の早い時間のいずれかに行った。女性ドナー、ならびに男性ドナーの年齢の中央値は２９歳であった。末梢血は無菌低エンドトキシンＰＢＳで１：１希釈し、以前に記載されている（PMID: 16931806）ようにficoll-hypaque (d=1.077)上で層化し、遠心した。単核細胞画分はＰＢＳ中で１回洗浄した。微小胞は血漿から精製した。手短には小胞を１６０，０００×ｇ、１時間、４℃の遠心により濃縮した（PMID: 10648405）。

【００８８】

ＲＮＡ抽出。トリゾール(Invitrogen, Carlsbad, CA)抽出法により、総ＲＮＡを単離した。低分子ＲＮＡの収率を上げるため、ＲＮＡを一晩沈殿させた。ＲＮＡの濃度を決定し、Agilent 2100 バイオアナライザー(Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA)でのキャピラリー電気泳動によりＲＮＡの完全性(integrity)を決定した。単核細胞から単離したＲＮＡに関しては、９以上のＲＮＡ integrity number（ＲＩＮ）のみを使用した。微小胞においてはインタクトの１８ｓおよび２８ｓ　ｒＲＮＡが可変的であったため、これらのサンプルに関してはＲＩＮで制限することはできなかった。

【００８９】

定量的ＰＣＲによるｍｉＲＮＡのプロファイリング。４２０の成熟ヒトｍｉＲＮＡの発現を、リアルタイムＰＣＲによりプロファイリングした。以前にに公開された逆転写条件（PMID: 18158130）を使用して、４２０の公知のヒト成熟ｍｉＲＮＡに対するループプライマーの混合物（Mega Plex kit, Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いて刺激することにより、ＲＮＡ（５０ｎｇ）をｃＤＮＡに変換した。微小胞中の公知のコントロールｍｉＲＮＡがないため、いくつかの内部コントロールについて検討した。内部コントロール、すなわち低分子核小体（ｓｎｏ）ＲＮＡ　Ｕ３８Ｂ、ｓｎｏＲＮＡ　Ｕ６、低分子核（ｓｎ）ＲＮＡ　Ｕ６、ならびに１８Ｓおよび５Ｓ　ｒＲＮＡに対するプライマーを、プライマーの混合物中に含めた。

【００９０】

発現は、３８４ウェル反応プレートを装備したApplied Biosystems 7900HT リアルタイムＰＣＲ装置を使用してプロファイリングした。液体ハンドリングロボットおよびZymak Twisterロボットを使用して、スループットを増加し、エラーを低減した。リアルタイムＰＣＲは標準的な条件を使用して行った。

【００９１】

フローサイトメトリー。末梢血微小胞は、遠心により濃縮せずに直接血漿から免疫染色した。由来する細胞を決定するため、０．５ｃｃの血漿を抗体のパネルごとに免疫染色した。パネルＩは、ＣＤ６６ｂ－ＦＩＴＣ（好中球）、ＣＤ２０２ｂ（Ｔｉｅ２）－ＰＥ（内皮細胞）、ＣＤ２０６　ＰＥ－Ｃｙ５（マクロファージ/樹状細胞）、ＣＤ７９ａ－Ａ

ＰＣ（Ｂ細細胞）およびＣＤ１４　Ｐｅ－Ｃｙ７（単球）を認識する抗体を含有した。パネルＩＩは、ＣＤ４１ａ－ＰＥ－Ｃｙ５（血小板）、ＣＣＲ２－ＡＰＣ（単球）、ＣＣＲ３－ＰＥ（樹状細胞）、ＣＣＲ５－ＰＥ－Ｃｙ７（マクロファージ）、およびＣＤ３－Ａｌｅｘａ６１０（Ｔ細胞）に対する抗体を含有した。パネルＩＩＩはアイソタイプのコントロール抗体を含有した。サンプルはBD Aria フローサイトメーター(BD Biosciences San Jose, CA)で解析した。データはゲートされた細胞のパーセントとして表した。

【００９２】

統計解析。バックグラウンドのノイズを低減するため、個々の観察結果の８０％が３５より高いＣＴ生スコアを有したｍｉＲＮＡは、データ解析時に除外した。内部コントロール（１８Ｓ、５Ｓ、ｓｎｏＲＮＡ　Ｕ３８Ｂ、ｓｎｏＲＮＡ　Ｕ４３、およびｓｎＲＮＡ　Ｕ６）は血漿微小胞においては非常に可変的であり、同様に血漿微小胞　対　末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）における発現レベルも有意に異なった。

【００９３】

したがって、あるｍｉＲＮＡを正規化補正因子として使用することに起因するバイアスを低減し、そしてＲＴ－ＰＣＲアレイ間のサンプルの変動を低減するため、median normalization（中央値による正規化）解析を使用して、各アレイ上のｍｉＲＮＡ全体の発現に対する相対的発現に基づいて、血漿微小胞およびＰＢＭＣ間でｍｉＲＮＡを比較した（PMID: 16854228）。ドナーの性別および年齢をコントロールし、線形混合モデルを使用して、血漿微小胞およびＰＢＭＣ間での特異的なｍｉＲＮＡの差を見積もった。倍数変化は、見積もられた平均の差に基づいて算出した。

【００９４】

各組織に関するフィルタリング基準を満たしたｍｉＲＮＡを使用してヒートマップを作成し、ｍｉＲＮＡの相対的発現の平均に基づいて、ｍｉＲＮＡの階層的クラスタリングを行った。ｍｉＲＮＡの発現はまた、血漿微小胞およびＰＢＭＣに関するそれらのＣ生スコアに基づいてランクづけした。さらなる統計解析、例えばＡＮＯＶＡを行って、２つの処理群間で有意に発現されているｍｉＲＮＡを決定した。

【００９５】

経路の解析および予測。予測されるｍｉＲＮＡの標的は、miRanda (microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/)を使用して決定した。miRandaアルゴリズムに基づき、各標的についてスコアを作成し、１７より大きいスコアのみをIngenuity Pathway Analysis ソフトウェア(Ingenuity Systems, Redwood City,CA)を使用してさらに解析した。このソフトウェアを使用して、基準の経路をｍｉＲＮＡの標的に基づいて決定した。データセットを検討して、ｍｉＲＮＡの標的の遺伝子オントロジーに基づいて関連する経路を決定した。

【００９６】

結果

末梢血微小胞の亜集団

最初に、正常な健康な被験者の末梢血中の微小胞の由来細胞を検討した。フローサイトメトリーを使用して、以前に報告された（PMID: 10648405）ように末梢血微小胞の大半が血小板由来であることを発見した（図４）。

【００９７】

我々はまた、単核細胞食細胞系列に由来する微小胞の第二の大きな集団についても観察した。単核食細胞上の表面抗原を検出する抗体を用いて、この集団を免疫染色した。特にわずかなパーセントの末梢血微小胞だけしか、Ｔ細胞および好中球に由来していなかった。Ｂ細胞に由来する小胞は検出できなかった（データは示していない）。興味深いことに、内皮細胞由来の表面抗原を発現する微小胞の小さな亜集団を検出した。

【００９８】

血漿微小胞およびＰＢＭＣにおけるｍｉＲＮＡの発現

ｍｉＲＮＡが、末梢血中の微小胞内コンパートメントに含有されていて、体内の異なる組織間の情報伝達を可能にし、遺伝子の変化に影響を及ぼすかどうかを検査するため、精製した血漿由来微小胞に関するｍｉＲＮＡプロファイリングを行った。２７名男性および

２４名女性を包含する５１名の非喫煙の健康な個体に由来する微小胞のすべての亜集団について解析した。微小胞およびＰＢＭＣ間でｍｉＲＮＡの発現に違いがあるかどうかを決定するため、各ドナー由来ＰＢＭＣもまた精製した。リアルタイムＰＣＲ解析を行って、４２０のｍｉＲＮＡの発現について検討した。フィルタリングしたデータに、ＰＢＭＣおよび血漿サンプル間のｍｉＲＮＡ発現プロファイルを比較する階層的クラスター解析を行った（図５Ａ）。

【００９９】

３つを除くすべてのＰＢＭＣサンプルを、微小胞サンプルとは別にクラスター化したところ、２群間のｍｉＲＮＡ発現プロファイルが有意に異なることを示した。バックグラウンドのノイズを低減するフィルタリング基準に基づくと、微小胞およびＰＢＭＣサンプルにおいて各々１０４および７５のｍｉＲＮＡが発現されていることを発見した（図５Ｂおよび５Ｃ）。

【０１００】

これらのｍｉＲＮＡのうち、７１は各サンプル群で共有していた（図５Ｄ）。特に、２つのｍｉＲＮＡ、すなわちｍｉＲ－０３１および２９ｃのみがＰＢＭＣサンプル中だけで発現され、一方４つのｍｉＲＮＡ（ｍｉＲ－１２７、－１３４、－４８５－５Ｐ、および－４３２）は血漿画分において独自に発現されていた。血漿中で正常に発現された１０４ｍｉＲＮＡすべてを示す（表ＩＩ、図７に示す）。

【０１０１】

年齢および性別の効果

いずれかのサンプル群からのｍｉＲＮＡ発現において、年齢および/または性別の効果は観察できなかった。特に、女性および男性双方のドナーの年齢の中央値は２９歳であった。最も高年齢の個体は５８歳であり、最も若年齢は２１歳であった。したがって差異を検討するためさらにデータを層別化した。年齢のマッチしたサンプル間の検討でも、ＰＢＭＣおよび微小胞サンプル間でｍｉＲＮＡ発現にいかなる有意な効果も明らかにされなかった。性別をコントロールして、我々はまた年齢の上位四分位点を年齢の下位四分位点と比較した。すなわち各群の平均年齢は各々４８．９±６．２歳および２１．９±１．２歳であった。しかし年齢に基づいてのサンプルセット間で、ｍｉＲＮＡ発現に有意差を検出することはできなかった（データは示していない）。

【０１０２】

ＰＢＭＣおよび微小胞におけるｍｉＲＮＡ発現の比較

表ＩＩＩ、図８に、すべての個体に由来する血漿微小胞およびＰＢＭＣにおいて、最も高発現の１０のｍｉＲＮＡを示す。血漿に関する最も高発現の１０のｍｉＲＮＡは、高い方から順にｍｉＲ－２２３、－４８４、－１９１、－１４６ａ、－０１６、－０２６ａ、－２２２、－０２４、－１２６、および－３２である。一方ＰＢＭＣにおいては、ｍｉＲ－２２３、－１５０、－１４６ｂ、－０１６、－４８４、－１４６ａ、－１９１、－０２６ａ、－０１９ｂ、および－０２０ａが高く発現されていた。微小胞における最も高発現の１０のｍｉＲＮＡは、１００％の個体で検出された。しかしＰＢＭＣサンプルでは、ｍｉＲ－１５０（９８％のドナー）およびｍｉＲ－４８４（８９％のドナー）を除くすべてが１００％の個体で観察された。

【０１０３】

我々はまた、これらｍｉＲの６つ（ｍｉＲ－２２３、ｍｉＲ－４８４、ｍｉＲ－１９１、ｍｉＲ－１４６ａ、ｍｉＲ－２６ａ、およびｍｉＲ－１６）が、ＰＢＭＣおよび微小胞の双方において最も高発現の１０で共有されていることを発見した。特にｍｉＲ－２２３は、双方のコンパートメント内で最も顕著に発現されたｍｉＲである。各個体のドナーのランキング解析に基づいて、具体的なｍｉＲＮＡが最も高発現の１０のｍｉＲＮＡに挙げられる頻度を決定したところ、ｍｉＲ－２２３はＰＢＭＣおよび微小胞の双方において１００％の頻度であった。ｍｉＲ－４８６の発現は、血漿微小胞で最も高い１０のｍｉＲＮＡに挙げられているにもかかわらず、このｍｉＲＮＡは、プロファイリングした個体の２０％のみでしか最も高い１０に挙げられていないことを発見した。興味深いことに血漿微

小胞において最も高発現のｍｉＲＮＡ群は、組織特異的なｍｉＲ群として同定できなかった。

【０１０４】

我々はさらに、各々＞６６％および＞８８％という任意の値（データセットからのnatural cut-off）より大きなランキングスコアを持つ、微小胞およびＰＢＭＣのｍｉＲの集合的機能について検討した。この基準に基づいて、微小胞およびＰＢＭＣのサンプルから最も高い９にランクされたｍｉＲについて、さらに検討した。したがって、血漿で見出されたｍｉＲ－２２３、－４８４、－１９１、－１４６ａ、－０１６、－０２６ａ、－２２２、－０２４、および－１２６の組み合わせた機能を解析した。ＰＢＭＣに関しては、以下のｍｉＲＮＡ、すなわちｍｉＲ－２２３、－１５０、－１４６ｂ、－０１６、－４８４、－１４６ａ、－１９１、－０２６ａ、および－０１９ｂの組み合わせた機能を検討した。Sanger miRBase Target version 5を使用して、血漿微小胞に関する組み合わせたｍｉＲの、１５７８の予測される標的を見出した（データは示していない）。これらの組み合わせの標的についてコンピュータ解析を行って、それらが集合的に制御する経路を決定した。Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを使用し、獲得免疫系の代謝および制御に関与する基準の経路が、ｍｉＲＮＡで示されたこれらの発現により大きく制御されることを発見した（表ＩＶ、図９の上に示す）。

【０１０５】

ＰＢＭＣ画分から検討した９のｍｉＲＮＡについて、１８５７の予測されるｍＲＮＡの標的を見出した（データは示していない）。最終的にこれらのｍｉＲＮＡにより制御される最も高い５の基準の経路は、とりわけ様々なアミノ酸および脂質の代謝経路である（表ＩＶ、図９の上に示す）。我々はまたSanger miRBase およびTargetScanから共通して予測される標的を見出し、それらの機能を決定した（表ＩＶ、図９の下に示す）。

【０１０６】

次に、微小胞およびＰＢＭＣ間でどのｍｉＲＮＡが異なって発現されたかについて検討した。２０のｍｉＲＮＡが、微小胞サンプルと比較してＰＢＭＣ画分において３倍より高く発現された（表Ｖ、図１０に示す）。反対に、１５のｍｉＲＮＡは、ＰＢＭＣと比較して血漿微小胞において有意に発現されていた。

【０１０７】

図１１：表ＶＩは、ＰＢＭＣおよび血漿において発現されたすべてのｍｉＲＮＡ（ディテクターの名称）に関する、正規化したデータの平均を各々の標準偏差と共に示す。

考察

これらの実施例において、発見者らは今回、末梢血中の正常な恒常的状態下でｍｉＲが微小胞内にて循環することを示す。本明細書において、１０４のｍｉＲが血漿微小胞内で発現され、そしてｍｉＲの発現はＰＢＭＣとは有意に異なっていたことを示す。今日までに多数の研究が、多くの細胞の機能を制御するｍｉＲの能力を示している。しかしながらこれらの研究はほとんど、ｍｉＲがそのホスト細胞内にとどまって効果を及ぼすことを意味している（PMID: 17923084）。我々のデータは、微小胞内に含有されたｍｉＲＮＡが、細胞の恒常性を制御するための遠位の細胞への情報伝達シグナルであると思われることを示すものである。

【０１０８】

微小胞内のこれらのｍｉＲＮＡは、異なる組織の標的へと循環すると思われる。血漿微小胞内で最も高発現されたｍｉＲＮＡのさらなる検討は、これらの機能の多くが血球新生および細胞分化プログラムを制御することを示す（表ＩＩＩ、図８に示す）。例えばｍｉＲ－２２３の発現は、骨髄、顆粒球、および破骨細胞の分化を制御する（PMID: 18278031, PMID: 17471500, PMID: 16325577）。ｍｉＲ－２２３はまた造血幹細胞の増殖に一役を担っているようである（PMID: 18278031）。興味深いことにｍｉＲ－２２３は、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）では喪失される（PMID: 18056805）。反対にｍｉＲ－１２６のダウンレギュレーションは巨核球の分化時に起こる（PMID: 16549775）。特にｍｉＲ－２４の発現は、血球新生の強力なポジティブおよびネガティブ制御因子であるＴＧＦ－βにより制

御される（PMID: 16123808, PMID: 18353861）。微小胞内で発現されるｍｉＲ－２４およびｍｉＲ－１６は双方とも赤血球の産生を制御する（PMID: 17906079, PMID: 17976518）が、一方ｍｉＲ－１６はリンパ系の発生もまた調節する（PMID: 16616063）。ｍｉＲ－１６の発現の喪失は、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）において広範に検討されている（PMID: 17327404, PMID: 17351108）。

【０１０９】

血漿微小胞内で発現される多くのｍｉＲはまた、細胞周期の進行にかかわるタンパク質を制御する（PMID: 18365017 PMID: 17914108）。ｍｉＲ－２２２はｐ２７Ｋｉｐｌを標的とし（PMID: 17914108）、一方ｍｉＲ－２４はｐｌ６（ＩＮＫ４ａ）を抑制する（PMID: 18365017）。ｍｉＲ－１６の増加された発現は、結果的に細胞周期Ｇ０/Ｇ１期に細胞を蓄積することになる（PMID: 16123808）。反対に乳癌細胞におけるｍｉＲ－１２６の発現は細胞の増殖および腫瘍の成長を増大するが、転移を阻害する（PMID: 18185580）。このことは血管細胞接着分子－１（ＶＣＡＭ１）を通して起こる（PMID: 18227515）。

【０１１０】

他のｍｉＲが血漿微小胞内で高発現されるのとは異なり、ｍｉＲ－１４６ａは異なるレベルで機能するようである。ｍｉＲ－１４６ａは腫瘍抑制因子として作用し、このｍｉＲの喪失は前立腺癌の発症と関連することが示唆された（PMID: 18174313）が、ｍｉＲ－１４６ａは免疫機能もまた調節する（PMID: 16885212, PMID: 18057241）。血漿微小胞におけるこのｍｉＲの発現が、免疫制御機能を定義する可能性がある（表ＩＶ、図９に示す）。

【０１１１】

標的の遺伝子オントロジーを検討するＩＰＡ解析に基づくと、ｍｉＲ－１４６ａの発現により影響を受けると予測される最大の関連ネットワークは、細胞の増殖、免疫系およびリンパ系の発生および機能である。加えてこのｍｉＲは、自然免疫反応を制御すると予測されている。この解析から我々は、ＬＰＳ/ＩＬ－１およびトール様受容体のシグナリングが、このｍｉＲ－１４６ａにより制御されると予測される最も高い５の基準経路の中にあることを発見した。

【０１１２】

今日までｍｉＲ－４８４またはｍｉＲ－４８６の機能はわかっていない。ｍｉＲ－１４６ａと同様に、ｍｉＲ－４８４およびｍｉＲ－４８６も免疫反応のモジュレータとして機能するようである。特にｍｉＲ－４８４は、相対的発現に基づくと微小胞画分において２番目に高く発現されたｍｉＲである。予測モデリングは、このｍｉＲが複数の機能を有することを示している。微小胞内で発現された多くの他のｍｉＲの様に、ｍｉＲ－４８４は血球新生を制御すると予測される。特に、ＮＫ細胞シグナリング経路およびＩＬ－４シグナリング経路が、ｍｉＲ－４８４の標的であると予測されるが、一方ｍｉＲ－４８４は抗原提示を制御すると提唱されている。加えてｍｉＲ－４８６は、細胞の分化、増殖および成長も制御するようである。

【０１１３】

我々は血漿微小胞内に１０４のｍｉＲを検出したが、プロファイリングした全ｍｉＲから検出できなかったものも多い。血漿微小胞内の検出できなかったｍｉＲもまた、疾患のバイオマーカーとして役立つかもしれない。近年Lawrieらは、Ｂ細胞リンパ腫の患者の血漿中にｍｉＲが検出されたことを報告した（PMID: 18318758）。この研究は、これらの患者由来血漿中でｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２１０およびｍｉＲ－２１が上昇し、そしてｍｉＲ－２１が再発に相関することを示した。この研究に基づき、我々は正常な個体においてｍｉＲ－１５５およびｍｉＲ－２１を検出したが、ｍｉＲ－２１０は発見できなかった。興味深いことに我々は、血漿において７５％の個体がｍｉＲ－１５５を発現し、６０％がｍｉＲ－２１を発現することを発見した（データは示していない）。

【０１１４】

したがって、疾患の予測マーカーとしてこれらのｍｉＲを使用するためには、各個体は疾患の検出の前にベースラインを必要とすることになる。したがってｍｉＲ－２１０の発

現は、Ｂ細胞リンパ腫のより良いマーカーとして役立つものと思われる。さらなる関連性も存在すると思われる。例えばｍｉＲ－２０３は血漿微小胞には検出できない。このｍｉＲの上昇した発現は膀胱癌および結腸腺癌と関連しており、したがってバイオマーカーとして使用できると思われる（PMID: 18230780, PMID: 17826655）。

【０１１５】

正常には発現されるがその後疾患にともなって喪失されるという逆の関係も、血漿ｍｉＲに関して存在すると思われる。例えば急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）において、ｍｉＲ－２２３はダウンレギュレートされる（PMID: 18056805）。ｍｉＲ－２２３は血漿微小胞内で発現される最も顕著なｍｉＲであるため、その減少した発現はＡＬＬの診断マーカーとして有用であると思われる。加えてｍｉＲ－１５ａ/１６は、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）では喪失またはダウンレギュレートされる（PMID: 18362358）。我々は、ｍｉＲ－１６は検討したすべての健常な個体で発現されていたことを発見したが、ｍｉＲ－１５ａはプロファイリングした個体の４４％にしか発現されていなかった（データは示していない）。

【０１１６】

我々が正常な個体の血液中に組織特異的なｍｉＲＮＡを検出しなかったことは興味深い（PMID: 18025253）。正常な個体からの微小胞の大半は、血液細胞に由来する。我々は、わずかなパーセントの内皮細胞由来の微小胞を実に検出した。この内皮細胞由来微小胞は、内皮細胞の損傷時に増加すると思われる。同様に、末梢血中の組織特異的ｍｉＲおよび微小胞の検出は、組織損傷時にしばしば起こるイベントであると思われる。腫瘍は微小胞を産生する（PMID: 16283305）ため、これらが末梢血中に検出されてもよい。

【０１１７】

ｍｉＲが血漿中で検出されることが報告された（PMID:18318758）が、本発明は公知の血漿由来ｍｉＲすべての特徴づけを行った最初の研究である。本研究において我々は、人種を因子としてコントロールした。

【０１１８】

末梢の体液および/または血液中のｍｉＲの存在、不在、またはレベルの変化を検査することは、様々な疾患について検討し、独特のｍｉＲＮＡプロファイルを同定し、そして疾患の予測因子であるバイオマーカーとして、有用となり得る。微小胞内に含有される循環血液中のｍｉＲは、血液細胞の恒常性の産生ならびに代謝機能を制御する上での、生命維持機能を有する。

【０１１９】

明確に参照として援用しなかった本明細書に引用したすべての公開文献の関連技術を、それらの全内容において本明細書にて参照として援用する。本発明は、その好ましい態様に関して特に示し記載してきたが、当業者には、付記した請求項に包括的に含まれる本発明の範囲から離れることなく、形および詳細における様々な変更を行ってよいことは、理解されるものとする。

【０１２０】

本発明を様々なそして好ましい態様に関して記載してきたが、当業者には、本発明の本質的な範囲から離れることなく、その要素について様々な変更を行ってよく、そして均等物を置き換えてよいことは、理解されなければならない。加えて、特定の状況または材料を本発明の技術に適応するために、本発明の本質的な範囲から離れることなく、多くの修飾を行ってよい。それ故本発明は、本発明を実行するために考慮された本明細書に開示された特定の態様に限定されないが、本発明は請求項の範囲内に収まるすべての態様を含むものとすることを意図する。

【０１２１】

対象のｍｉＲは公開データベースに列記されている。ある種の好ましい態様において、公開データベースは、ｍｉＲ配列に命名の割り付けが行われ、同様に世界中のウェブサイトを介して到達でき、オンライン検索できるデータベース内の配列の保管場所でもあるSanger研究所www.http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/により提供される中心的レポ

ジトリであることができる。一般にSanger研究所によりｍｉＲの配列について集められたデータは、種、原料、対応するゲノム配列およびゲノムの位置（染色体の座標）、ならびに完全長の転写産生物、および成熟した完全にプロセシングされたｍｉＲＮＡ（５’末端リン酸基を有するｍｉＲＮＡ）の配列を含む。もう１つのデータベースとして、アメリカのthe National Institutes of Health（国立衛生研究所）およびthe National Library of Medicine（国立医学図書館）により維持管理されている、National Center for Biotechnology Information （ＮＣＢＩ：国立生物工学情報センター）のウェブサイトを通してアクセスするGenBankデータベースが可能である。これらのデータベースをすべて本明細書において参照として援用する。

【０１２２】

【表１】

表ＶＩＩ－１

miR *低レベルで 機能のわからない 生合成副産物	ｍｉＲ塩基 成熟配列 アクセション#	成熟配列	SEQ ID NO
hsa-let-7a*	MIMAT0004481	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	1
hsa-let-7a-1	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	2
hsa-let-7a-2	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	3
hsa-let-7a-3	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	4
hsa-let-7b	MIMAT0000063	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	5
hsa-let-7b*	MIMAT0004482	CUAUACAACCUACUGCCUUCCC	6
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	7
hsa-let-7c*	MIMAT0004483	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA	8
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	9
hsa-let-7d*	MIMAT0004484	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	10
hsa-let-7e	MIMAT0000066	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	11
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	CUAUACGGCCUCCUAGCUUUCC	12
hsa-let-7f-1	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	13
hsa-let-7f-1*	MIMAT0004486	CUAUACAAUCUAUUGCCUUCCC	14
hsa-let-7f-2	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	15
hsa-let-7f-2*	MIMAT0004487	CUAUACAGUCUACUGUCUUUCC	16
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	17
hsa-let-7g*	MIMAT0004584	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC	18
hsa-let-7i	MIMAT0000415	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	19
hsa-let-7i*	MIMAT0004585	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU	20
hsa-mir-009-1	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	21
hsa-mir-009-1*	MIMAT0000442	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU	22
hsa-mir-009-2	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
hsa-mir-009-3	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	24
hsa-mir-010a	MIMAT0000253	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	25
hsa-mir-010a*	MIMAT0004555	CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA	26
hsa-mir-015a	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	27
hsa-mir-015b	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	28
hsa-mir-015b*	MIMAT0004586	CGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUA	29
hsa-mir-016-1	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	30
hsa-mir-016-1*	MIMAT0004489	CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA	31
hsa-mir-016-2	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	32
hsa-mir-016-2*	MIMAT0004518	CCAAUAUUACUGUGCUGCUUUA	33
hsa-mir-017-3-p	MIMAT0000071	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	34
hsa-mir-017-5-p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	35
hsa-mir-018a	MIMAT0000072	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	36
hsa-mir-018a*	MIMAT0002891	ACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGG	37
hsa-mir-019a	MIMAT0000073	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	38
hsa-mir-019b-1	MIMAT0000074	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	39
hsa-mir-019b-1*	MIMAT0004491	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	40
hsa-mir-019b-2	MIMAT0000074	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	41

【０１２３】

【表２】

表ＶＩＩ－２

hsa-mir-019b-2*	MIMAT0004492	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA	42
hsa-mir-020a	MIMAT0000075	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	43
hsa-mir-020a*	MIMAT0004493	ACUGCAUUAUGAGCACUUAAAG	44
hsa-mir-020b	MIMAT0001413	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	45
hsa-mir-021	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	46
hsa-mir-021*	MIMAT0004494	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	47
hsa-mir-023a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	48
hsa-mir-023a*	MIMAT0004496	GGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUU	49
hsa-mir-023b	MIMAT0004587	UGGGUUCCUGGCAUGCUGAUUU	50
hsa-mir-024-1	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	51
hsa-mir-024-1*	MIMAT0000079	UGCCUACUGAGCUGAUAUCAGU	52
hsa-mir-024-2	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	53
hsa-mir-024-2*	MIMAT0004497	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	54
hsa-mir-025	MIMAT0000081	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	55
hsa-mir-025*	MIMAT0004498	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG	56
hsa-mir-026a-1	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	57
hsa-mir-026a-1*	MIMAT0004499	CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG	58
hsa-mir-026a-2	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	59
hsa-mir-026a-2*	MIMAT0004681	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	60
hsa-mir-026b	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	61
hsa-mir-026b*	MIMAT0004500	CCUGUUCUCCAUUACUUGGCUC	62
hsa-mir-027a	MIMAT0000084	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	63
hsa-mir-027a*	MIMAT0004501	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	64
hsa-mir-027b	MIMAT0000419	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	65
hsa-mir-027b*	MIMAT0004588	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	66
hsa-mir-028-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	67
hsa-mir-028-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	68
hsa-mir-029a	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	69
hsa-mir-029a*	MIMAT0004503	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	70
hsa-mir-029b-1	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	71
hsa-mir-029b-1*	MIMAT0004514	GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGA	72
hsa-mir-029b-2	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	73
hsa-mir-029b-2*	MIMAT0004515	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG	74
hsa-mir-029b-3	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	75
hsa-mir-029c	MIMAT0000681	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	76
hsa-mir-030a	MIMAT0000087	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	77
hsa-mir-030a*	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	78
hsa-mir-030b	MIMAT0000420	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	79
hsa-mir-030b*	MIMAT0004589	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	80
hsa-mir-030c-1	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	81
hsa-mir-030c-2	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	82
hsa-mir-030c-2*	MIMAT0004550	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU	83
hsa-mir-030d	MIMAT0000245	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	84
hsa-mir-030d*	MIMAT0004551	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC	85
hsa-mir-031	MIMAT0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	86
hsa-mir-031*	MIMAT0004504	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU	87

【０１２４】

【表３】

表ＶＩＩ－３

hsa-mir-032	MIMAT0000090	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA	88
hsa-mir-032*	MIMAT0004505	CAAUUUAGUGUGUGUGAUAUUU	89
hsa-mir-034a	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	90
hsa-mir-034a*	MIMAT0004557	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU	91
hsa-mir-092a-1	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	92
hsa-mir-092a-1*	MIMAT0004507	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU	93
hsa-mir-093	MIMAT0000093	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	94
hsa-mir-093*	MIMAT0004509	ACUGCUGAGCUAGCACUUCCCG	95
hsa-mir-095	MIMAT0000094	UUCAACGGGUAUUUAUUGAGCA	96
hsa-mir-096	MIMAT0000095	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	97
hsa-mir-096*	MIMAT0004510	AAUCAUGUGCAGUGCCAAUAUG	98
hsa-mir-098	MIMAT0000096	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	99
hsa-mir-099b	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	100
hsa-mir-099b*	MIMAT0004678	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG	101
hsa-mir-100	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	102
hsa-mir-100*	MIMAT0004512	CAAGCUUGUAUCUAUAGGUAUG	103
hsa-mir-103-1	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	104
hsa-mir-103-2	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	105
hsa-mir-105-1	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	106
hsa-mir-105-1*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	107
hsa-mir-105-2	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	108
hsa-mir-105-2*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	109
hsa-mir-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	110
hsa-mir-106a*	MIMAT0004517	CUGCAAUGUAAGCACUUCUUAC	111
hsa-mir-106b	MIMAT0000680	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	112
hsa-mir-106b*	MIMAT0004672	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC	113
hsa-mir-107	MIMAT0000104	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA	114
hsa-mir-122	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	115
hsa-mir-122*	MIMAT0004590	AACGCCAUUAUCACACUAAAUA	116
hsa-mir-125a-3p	MIMAT0004602	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC	117
hsa-mir-125a-5p	MIMAT0000443	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	118
hsa-mir-125b-1	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	119
hsa-mir-125b-1*	MIMAT0004592	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	120
hsa-mir-125b-2	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	121
hsa-mir-125b-2*	MIMAT0004603	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	122
hsa-mir-126	MIMAT0000445	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	123
hsa-mir-126*	MIMAT0000444	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	124
hsa-mir-127-3p	MIMAT0000446	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	125
hsa-mir-127-5p	MIMAT0004604	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU	126
hsa-mir-128-1	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	127
hsa-mir-128-2	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	128
hsa-mir-130a	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	129
hsa-mir-130a*	MIMAT0004593	UUCACAUUGUGCUACUGUCUGC	130
hsa-mir-130b	MIMAT0000691	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	131
hsa-mir-130b*	MIMAT0004680	ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC	132
hsa-mir-132	MIMAT0000426	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	133

【０１２５】

【表４】

表ＶＩＩ－４

hsa-mir-132*	MIMAT0004594	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU	134
hsa-mir-133a-1	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	135
hsa-mir-133a-2	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	136
hsa-mir-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA	137
hsa-mir-134	MIMAT0000447	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	138
hsa-mir-135b	MIMAT0000758	UAUGGCUUUUCAUUCCUAUGUGA	139
hsa-mir-135b*	MIMAT0004698	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG	140
hsa-mir-140-3p	MIMAT0004597	UACCACAGGGUAGAACCACGG	141
hsa-mir-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	142
hsa-mir-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	143
hsa-mir-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	144
hsa-mir-143	MIMAT0000435	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	145
hsa-mir-143*	MIMAT0004599	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU	146
hsa-mir-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU	147
hsa-mir-145*	MIMAT0004601	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU	148
hsa-mir-146a	MIMAT0000449	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU	149
hsa-mir-146a*	MIMAT0004608	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG	150
hsa-mir-146b-3p	MIMAT0004766	UGCCCUGUGGACUCAGUUCUGG	151
hsa-mir-146b-5p	MIMAT0002809	UGAGAACUGAAUUCCAUAGGCU	152
hsa-mir-147	MIMAT0000251	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC	153
hsa-mir-148a	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	154
hsa-mir-148a*	MIMAT0004549	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU	155
hsa-mir-148b	MIMAT0000759	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	156
hsa-mir-148b*	MIMAT0004699	AAGUUCUGUUAUACACUCAGGC	157
hsa-mir-149	MIMAT0000450	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC	158
hsa-mir-149*	MIMAT0004609	AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC	159
hsa-mir-150	MIMAT0000451	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	160
hsa-mir-150*	MIMAT0004610	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG	161
hsa-mir-151-3p	MIMAT0000757	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	162
hsa-mir-151-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	163
hsa-mir-155	MIMAT0000646	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	164
hsa-mir-155*	MIMAT0004658	CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA	165
hsa-mir-181a-1	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	166
hsa-mir-181a-1*	MIMAT0000270	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	167
hsa-mir-181a-2	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	168
hsa-mir-181a-2*	MIMAT0004558	ACCACUGACCGUUGACUGUACC	169
hsa-mir-181b-1	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	170
hsa-mir-181b-2	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	171
hsa-mir-181d	MIMAT0002821	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	172
hsa-mir-182	MIMAT0000259	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	173
hsa-mir-182*	MIMAT0000260	UGGUUCUAGACUUGCCAACUA	174
hsa-mir-183	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	175
hsa-mir-183*	MIMAT0004560	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUAA	176
hsa-mir-185	MIMAT0000455	UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA	177
hsa-mir-185*	MIMAT0004611	AGGGGCUGGCUUUCCUCUGGUC	178
hsa-mir-186	MIMAT0000456	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	179

【０１２６】

【表５】

表ＶＩＩ－５

hsa-mir-186*	MIMAT0004612	GCCCAAAGGUGAAUUUUUUGGG	180
hsa-mir-190	MIMAT0000458	UGAUAUGUUUGAUAUAUUAGGU	181
hsa-mir-191	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	182
hsa-mir-191*	MIMAT0001618	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC	183
hsa-mir-192	MIMAT0000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	184
hsa-mir-192*	MIMAT0004543	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG	185
hsa-mir-193a-3p	MIMAT0000459	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	186
hsa-mir-193a-5p	MIMAT0004614	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	187
hsa-mir-193b	MIMAT0002819	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	188
hsa-mir-193b*	MIMAT0004767	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA	189
hsa-mir-195	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	190
hsa-mir-195*	MIMAT0004615	CCAAUAUUGGCUGUGCUGCUCC	191
hsa-mir-196a*	MIMAT0004562	CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG	192
hsa-mir-196a-1	MIMAT0000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	193
hsa-mir-196a-2	MIMAT0000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	194
hsa-mir-196b	MIMAT0001080	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	195
hsa-mir-197	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	196
hsa-mir-198	MIMAT0000228	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	197
hsa-mir-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	198
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	199
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	200
hsa-mir-199b-3p	MIMAT0004563	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	201
hsa-mir-199b-5p	MIMAT0000263	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	202
hsa-mir-200a	MIMAT0000682	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	203
hsa-mir-200a*	MIMAT0001620	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA	204
hsa-mir-200b	MIMAT0000318	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	205
hsa-mir-200b*	MIMAT0004571	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	206
hsa-mir-200c	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA	207
hsa-mir-200c*	MIMAT0004657	CGUCUUACCCAGCAGUGUUUGG	208
hsa-mir-203	MIMAT0000264	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	209
hsa-mir-204	MIMAT0000265	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	210
hsa-mir-205	MIMAT0000266	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	211
hsa-mir-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	212
hsa-mir-213	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	213
hsa-mir-214	MIMAT0000271	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	214
hsa-mir-214*	MIMAT0004564	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC	215
hsa-mir-216a	MIMAT0000273	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	216
hsa-mir-216b	MIMAT0004959	AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA	217
hsa-mir-217	MIMAT0000274	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA	218
hsa-mir-218-1	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	219
hsa-mir-218-1*	MIMAT0004565	AUGGUUCCGUCAAGCACCAUGG	220
hsa-mir-218-2	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	221
hsa-mir-218-2*	MIMAT0004566	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG	222
hsa-mir-221	MIMAT0000278	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	223
hsa-mir-221*	MIMAT0004568	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU	224
hsa-mir-222	MIMAT0000279	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	225

【０１２７】

【表６】

表ＶＩＩ－６

hsa-mir-222*	MIMAT0004569	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCCU	226
hsa-mir-223	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	227
hsa-mir-223*	MIMAT0004570	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	228
hsa-mir-224	MIMAT0000281	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	229
hsa-mir-302a	MIMAT0000684	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA	230
hsa-mir-302a*	MIMAT0000683	ACUUAAACGUGGAUGUACUUGCU	231
hsa-mir-302b	MIMAT0000715	UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUAG	232
hsa-mir-302b*	MIMAT0000714	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC	233
hsa-mir-302c	MIMAT0000717	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	234
hsa-mir-302c*	MIMAT0000716	UUUAACAUGGGGGUACCUGCUG	235
hsa-mir-302d	MIMAT0000718	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU	236
hsa-mir-302d*	MIMAT0004685	ACUUUAACAUGGAGGCACUUGC	237
hsa-mir-302e	MIMAT0005931	UAAGUGCUUCCAUGCUU	238
hsa-mir-302f	MIMAT0005932	UAAUUGCUUCCAUGUUU	239
hsa-mir-320a	MIMAT0000510	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	240
hsa-mir-320b-1	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	241
hsa-mir-320b-2	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	242
hsa-mir-320c-1	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	243
hsa-mir-320c-2	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	244
hsa-mir-320d-1	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	245
hsa-mir-320d-2	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	246
hsa-mir-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	247
hsa-mir-324-5p	MIMAT0000761	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	248
hsa-mir-326	MIMAT0000756	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	249
hsa-mir-328	MIMAT0000752	CUGGCCCUCUCUGCCCUUCCGU	250
hsa-mir-330-3p	MIMAT0000751	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	251
hsa-mir-330-5p	MIMAT0004693	UCUCUGGGCCUGUGUCUUAGGC	252
hsa-mir-331-3p	MIMAT0000760	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	253
hsa-mir-331-5p	MIMAT0004700	CUAGGUAUGGUCCCAGGGAUCC	254
hsa-mir-335	MIMAT0000765	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	255
hsa-mir-335*	MIMAT0004703	UUUUUCAUUAUUGCUCCUGACC	256
hsa-mir-339-3p	MIMAT0004702	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG	257
hsa-mir-339-5p	MIMAT0000764	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	258
hsa-mir-340	MIMAT0004692	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	259
hsa-mir-340*	MIMAT0000750	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC	260
hsa-mir-342-3p	MIMAT0000753	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	261
hsa-mir-342-5p	MIMAT0004694	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA	262
hsa-mir-345	MIMAT0000772	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	263
hsa-mir-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	264
hsa-mir-361-5p	MIMAT0000703	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC	265
hsa-mir-370	MIMAT0000722	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	266
hsa-mir-374a	MIMAT0000727	UUAUAAUACAACCUGAUAAGUG	267
hsa-mir-374b	MIMAT0004955	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	268
hsa-mir-376a*	MIMAT0003386	GUAGAUUCUCCUUCUAUGAGUA	269
hsa-mir-376a-1	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	270
hsa-mir-376a-2	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	271

【０１２８】

【表７】

表ＶＩＩ－７

hsa-mir-376b	MIMAT0002172	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU	272
hsa-mir-376c	MIMAT0000720	AACAUAGAGGAAAUUCCACGU	273
hsa-mir-378	MIMAT0000732	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	274
hsa-mir-378*	MIMAT0000731	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU	275
hsa-mir-382	MIMAT0000737	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	276
hsa-mir-411	MIMAT0003329	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG	277
hsa-mir-411*	MIMAT0004813	UAUGUAACACGGUCCACUAACC	278
hsa-mir-423	MIMAT0004748	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	279
hsa-mir-423*	MIMAT0001340	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	280
hsa-mir-425-3p	MIMAT0001343	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCCC	281
hsa-mir-425-5p	MIMAT0003393	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	282
hsa-mir-432	MIMAT0002814	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	283
hsa-mir-432*	MIMAT0002815	CUGGAUGGCUCCUCCAUGUCU	284
hsa-mir-433	MIMAT0001627	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	285
hsa-mir-484	MIMAT0002174	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	286
hsa-mir-485-3p	MIMAT0002176	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	287
hsa-mir-485-5p	MIMAT0002175	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC	288
hsa-mir-486-3p	MIMAT0004762	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU	289
hsa-mir-486-5p	MIMAT0002177	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	290
hsa-mir-487a	MIMAT0002178	AAUCAUACAGGGACAUCCAGUU	291
hsa-mir-487b	MIMAT0003180	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	292
hsa-mir-532	MIMAT0002888	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	293
hsa-mir-532-5p	MIMAT0004780	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	294
hsa-mir-539	MIMAT0003163	GGAGAAAUUAUCCUUGGUGUGU	295
hsa-mir-574-3p	MIMAT0003239	CACGCUCAUGCACACACCCACA	296
hsa-mir-574-5p	MIMAT0004795	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU	297
hsa-mir-584	MIMAT0003249	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	298
hsa-mir-628-3p	MIMAT0003297	UCUAGUAAGAGUGGCAGUCGA	299
hsa-mir-628-5p	MIMAT0004809	AUGCUGACAUAUUUACUAGAGG	300
hsa-mir-643	MIMAT0003313	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	301
hsa-mir-660	MIMAT0003338	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG	302

【０１２９】

「参考文献」

1. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran 7, Urbanowicz B, Branski P, Ratajczak MZ, Zembala M. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes（腫瘍由来微小胞は、腫瘍細胞のいくつかの表面決定因子およびｍＲＮＡを保有し、これらの決定因子の一部を単球に移送する）. Cancer Immunol Immunother. 2006; 55:808818.

2. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor（白血球由来組織因子の血小板への移送はＣＤ１５および組織因子により仲介される）. Blood. 2000; 96:170-175.

3. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines（血小板－白血球の相互作用：トロンビンの刺激による血小板の、ヒトの単球、多形核白血球、および関連細胞株への選択的結合）. Blood. 1986; 67:629-636.

4. Lyberg T, Nakstad B, Hetland O, Boye NP. Procoagulant (thromboplastin) activity in human bronchoalveolar lavage fluids is derived from alveolar macrophages（ヒト気管支肺胞洗浄液中のプロコアグラント（トロンボラスチン）の活性は肺胞マクロファージに由来する）. Eur Respir J. 1990; 3:61-67.

5. Thiagarajan P, Le A, Benedict CR. Beta(2)-glycoprotein I promotes the binding of anionic phospholipid vesicles by macrophages（ベータ（２）－糖タンパク質Ｉは、マクロファージによる陰性リン脂質小胞の結合を促進する）. Arterioscler Thromb Vase Biol. 1999;19:2807-2811.

6. Setzer F, Oberle V, Blass M, Moller E, Russwurm S, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Losche W. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells: a DNA microarray study（血小板由来微小胞は、単球細胞における異なった遺伝子発現を誘導する：ＤＮＡマイクロアレイ試験）. Platelets. 2006;17:571- 576.

7. Plasterk RH. Micro RNAs in animal development（動物の発生におけるマイクロＲＮＡ）. Cell. 2006;124:877-881.

8. Willingham AT, Gingeras TR. TUF love for "junk" DNA（ＴＵＦは“ジャンクな”ＤＮＡを愛する）. Cell. 2006;125: 1215- 1220.

9. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome- wide microRNA profiling in human and mouse tissues（ヒトおよびマウスの組織におけるゲノムワイドなマイクロＲＮＡプロファイリングのためのオリゴヌクレオチドマイクロチップ）. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:9740-9744.

10. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance（臨床上の意義を伴う新規プレーヤーとしての慢性リンパ性白血病のマイクロＲＮＡのゲノミクス）. Semin Oncol. 2006;33: 167-173.

11. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk B. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma（高移動度Ａ２は、頭頚部扁平上皮細胞癌においてｍｉＲＮＡ－９８の標的である）. MoI Cancer. 2007;6:5.

12. Voorhoeve PM, Agami R. Classifying microRNAs in cancer: The good, the bad and the ugly（癌におけるマイクロＲＮＡの分類：良好、悪い、非常に悪い）. Biochim Biophys Acta. 2006.

13. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses（自然免疫反応のシグナリングタンパク質を標的とするインヒビターであるマイクロＲＮＡ、ｍｉＲ－１４６の、ＮＦ－カッパＢ依存による誘導）. Proc Natl Acad Sci US A. 2006;103:12481-12486.

【図２ａ】

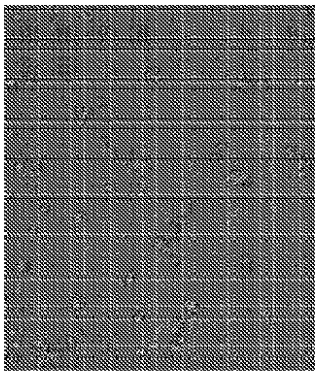


Fig. 2a

【図２ｂ】

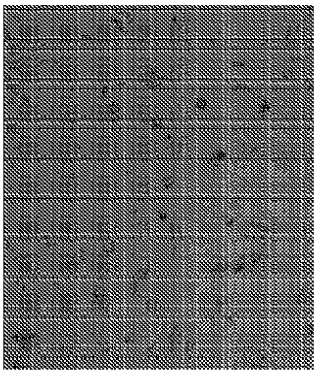


Fig. 2b

【図２ｃ】

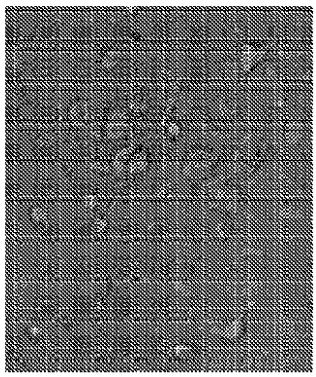
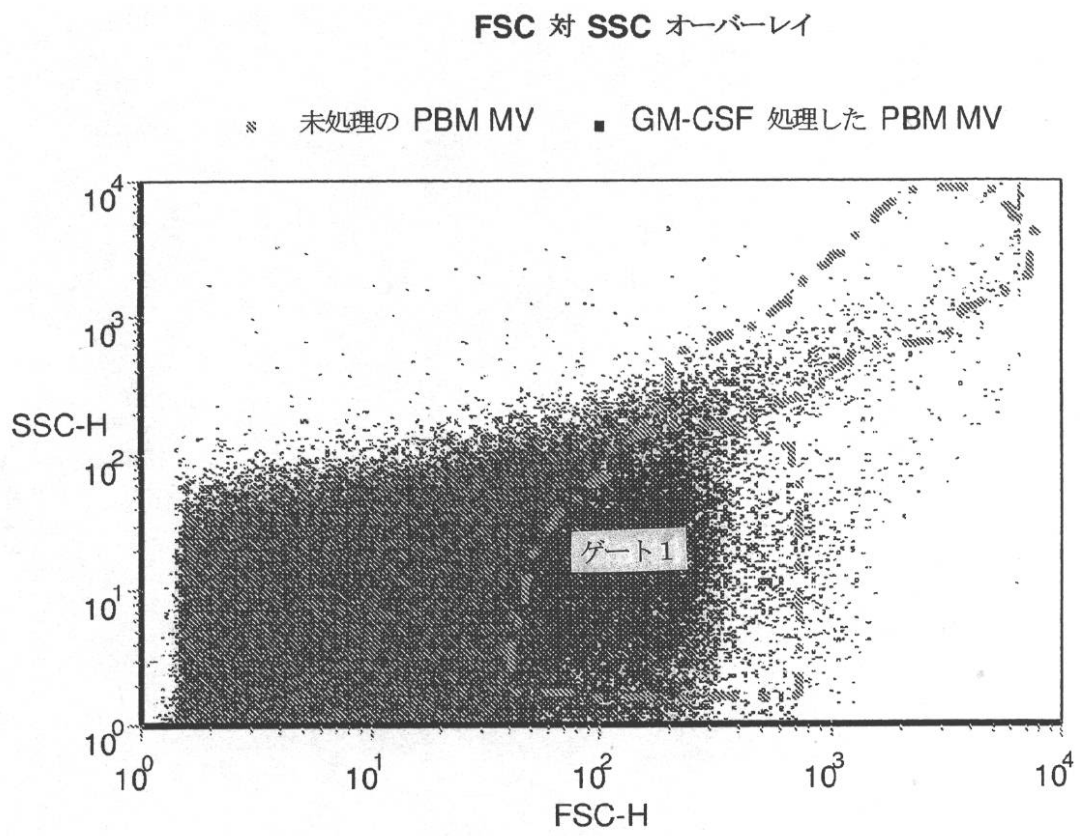


Fig. 2c

【図１】


FSC 対 SSC オーバーレイ
未処理の PBM MV
GM-CSF 処理した PBM MV
SSC-H
FSC-H
ゲート１
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

【図３】

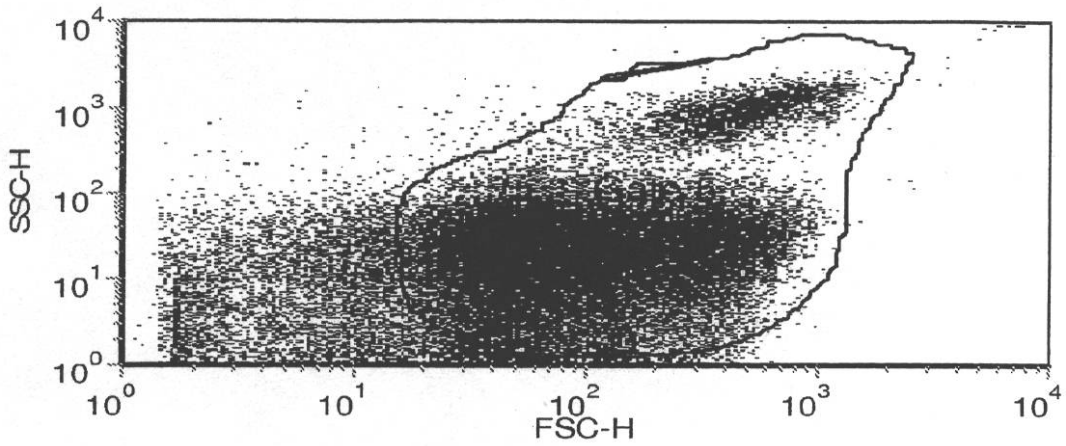


Figure 3a

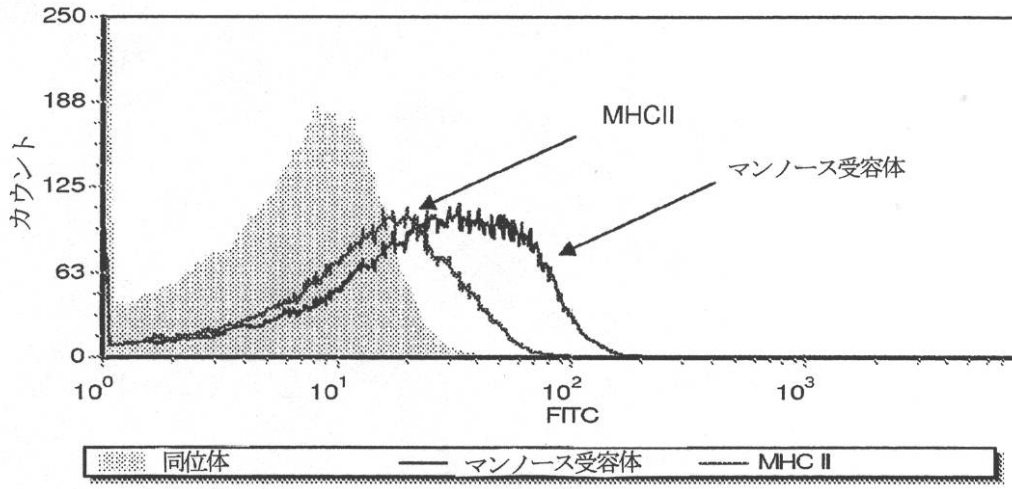


Figure 3b

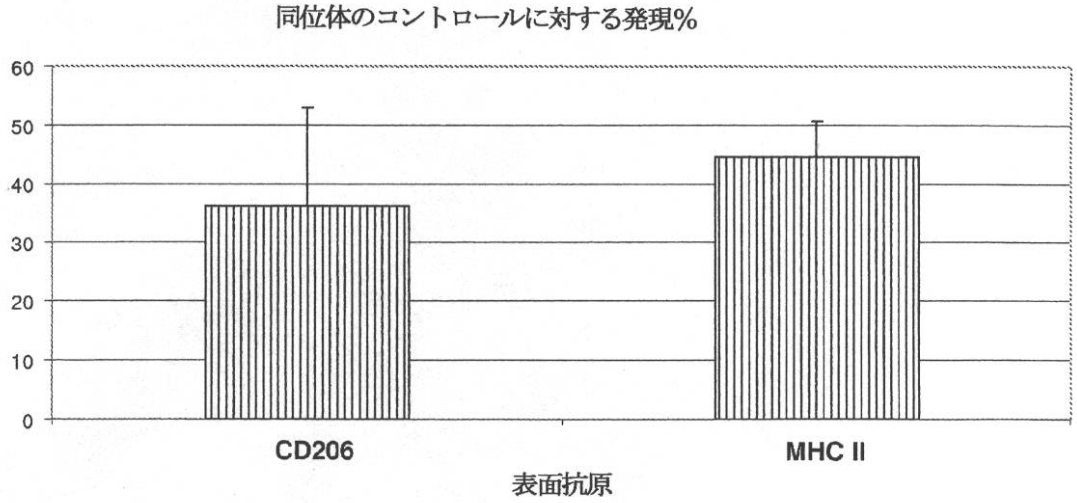
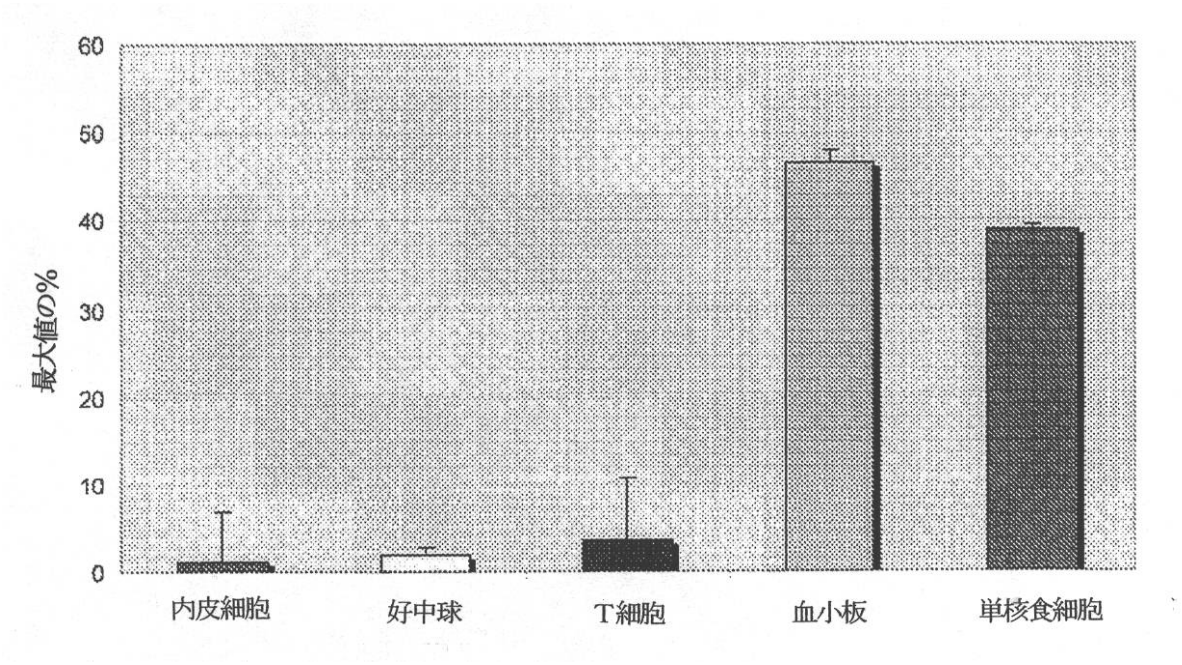
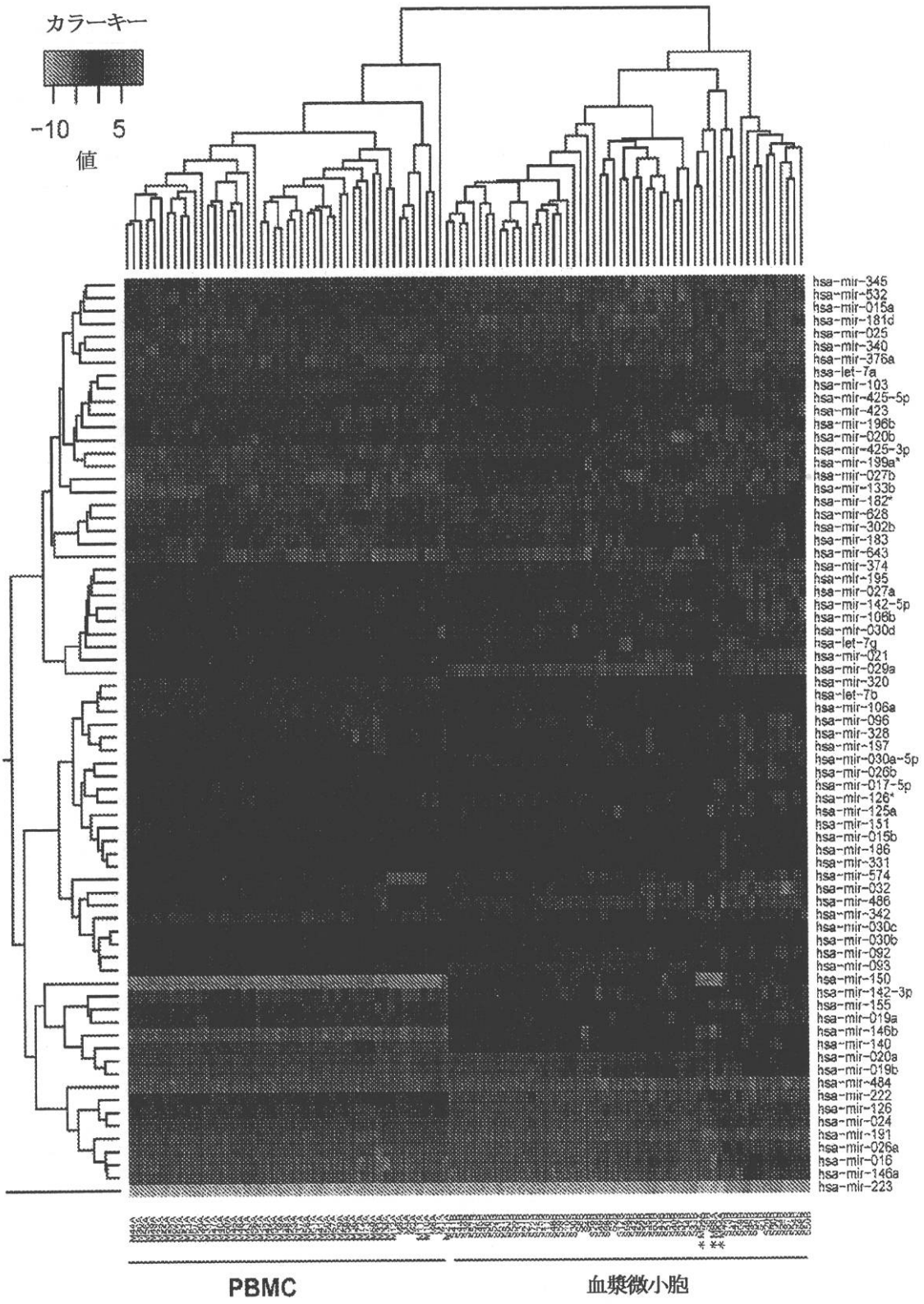


Figure 3c

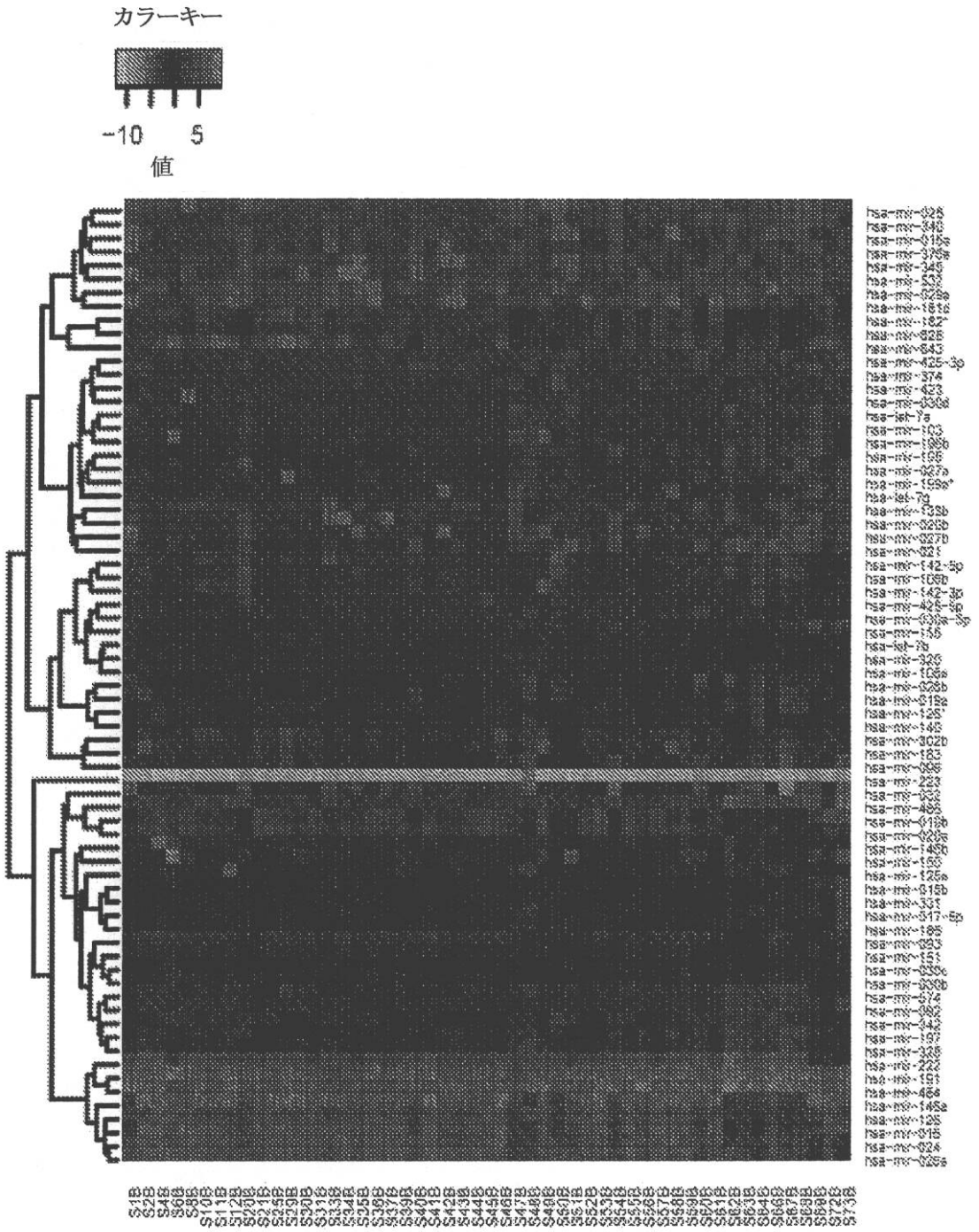
【図４】



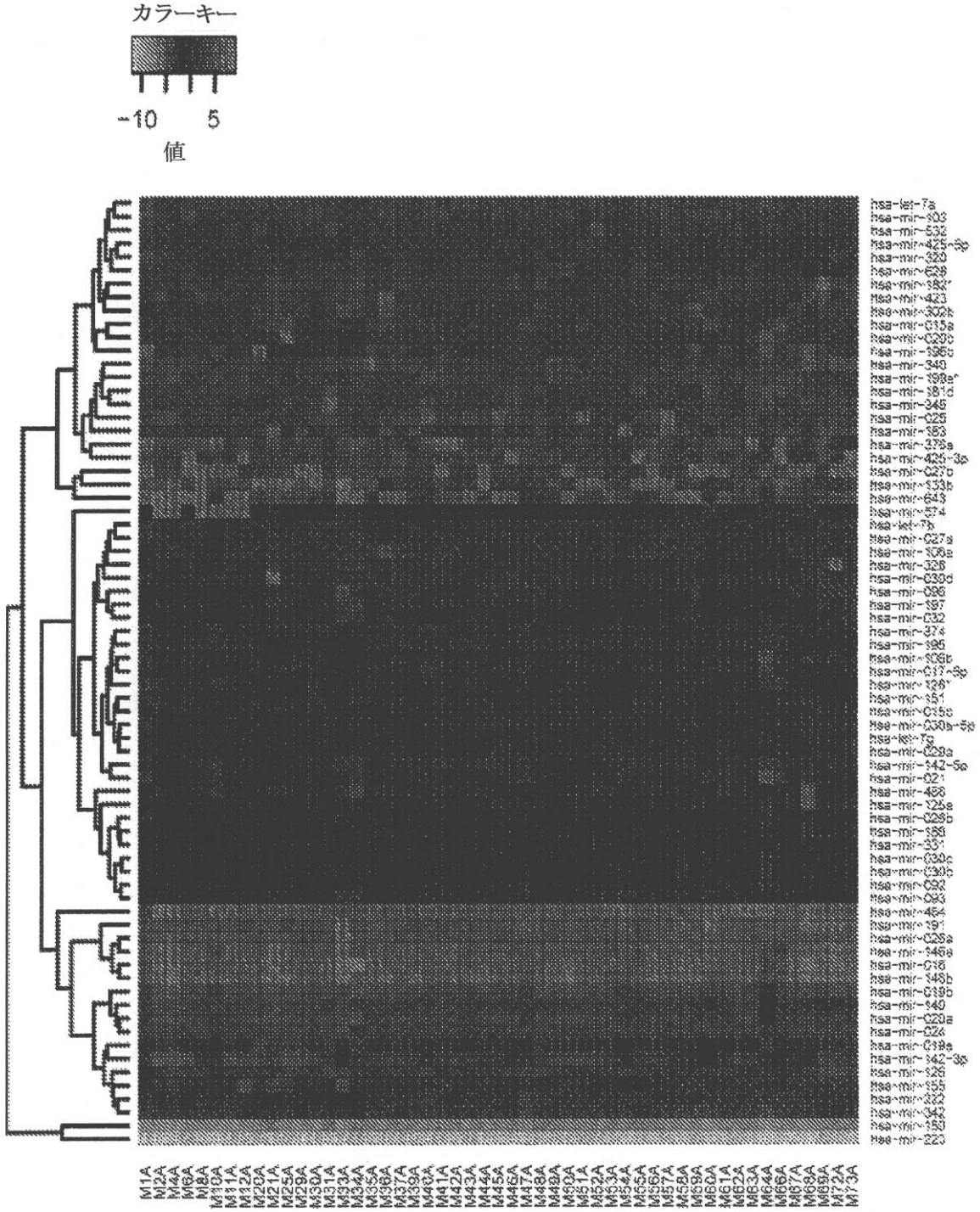
【図５Ａ】


カラーキー
-10
5
値
hsa-mir-345
hsa-mir-532
hsa-mir-015a
hsa-mir-181d
hsa-mir-025
hsa-mir-340
hsa-mir-376a
hsa-let-7a
hsa-mir-103
hsa-mir-425-5p
hsa-mir-423
hsa-mir-196b
hsa-mir-020b
hsa-mir-425-3p
hsa-mir-199a*
hsa-mir-027b
hsa-mir-133b
hsa-mir-182*
hsa-mir-628
hsa-mir-302b
hsa-mir-183
hsa-mir-643
hsa-mir-374
hsa-mir-195
hsa-mir-027a
hsa-mir-142-5p
hsa-mir-106b
hsa-mir-030d
hsa-let-7g
hsa-mir-021
hsa-mir-029a
hsa-mir-320
hsa-let-7b
hsa-mir-106a
hsa-mir-096
hsa-mir-328
hsa-mir-197
hsa-mir-030a-5p
hsa-mir-026b
hsa-mir-017-5p
hsa-mir-126*
hsa-mir-125a
hsa-mir-151
hsa-mir-015b
hsa-mir-186
hsa-mir-331
hsa-mir-574
hsa-mir-032
hsa-mir-486
hsa-mir-342
hsa-mir-030c
hsa-mir-030b
hsa-mir-092
hsa-mir-093
hsa-mir-150
hsa-mir-142-3p
hsa-mir-155
hsa-mir-019a
hsa-mir-146b
hsa-mir-140
hsa-mir-020a
hsa-mir-019b
hsa-mir-484
hsa-mir-222
hsa-mir-126
hsa-mir-024
hsa-mir-191
hsa-mir-026a
hsa-mir-016
hsa-mir-146a
hsa-mir-223
PBMC
血漿微小胞

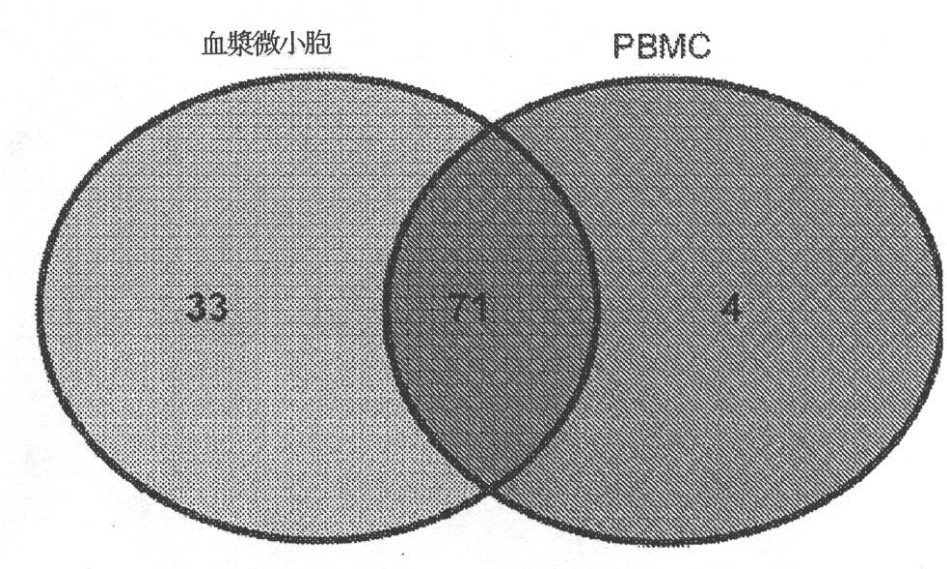
【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



【図５Ｄ】



【図６】

図6、表Ｉ

表Ｉ

疾患	疾患組織における増加した発現	疾患組織における減少した発現	参考文献
結腸腺癌	miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, **miR-203**		JAMA. 2008 Jan 30; 299(4):425-36; Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
結腸直腸癌	miR-19a, miR-21 miR-127, **miR-31**, miR-96, **miR-135b**およびmiR-183,	**miR-30c**, miR-133a, miR-143,**miR-133b**および**miR-145**	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77; Cancer. 2006 Jul 19; 5:29; Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
前立腺癌	miR-21	**miR-15a**, miR-16-1, miR-143, **miR-145**	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
肺癌	mir-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, **miR-205**, miR-**miR-210**	**miR-let-7**	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
乳癌	miR-21, miR-155	miR-125b, **miR-145**	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
Ｂ細胞リンパ腫	miR-155, miR-17-92, miR-19a, miR-92, miR-142, miR- 155, miR-221		Int J Cancer. 2008 Mar 1;122 (5):969-77.
膵癌	miR-103 and **miR-107**, miR-18a, **miR-31**, miR-93, miR-221およびmiR-224, miR-155	miR-133a, miR-216 , miR 217	J Clin Oncol. 2006 Oct 10; 24(29):4677-84; Oncogene. 2007 Jun 28;26(30):4442-52
びまん性大細胞型ＢＣＬ	miR-155, miR-17-92		Int J Cancer. 2008 Mar 1;122 (5):969-77.
CLL	**miR-23b**, miR-24-1, miR-146, miR-155, miR-195, miR-221, miR-331, miR-29a, miR-195, **miR-34a**, および **miR-29c**	**miR-15a**, **miR-16-1**, miR-29, miR-223	Int J Cancer. 2008 Mar 1;122 (5):969-77; Braz J Med Biol Res. 2007 Nov;40(11):1435-40.
膀胱癌	miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, **miR-203**, miR-17-5p, **miR-23a**,および**miR-205**		Urol Oncol. 2007 Sep-Oct;25(5):387-92
腎癌	**miR-28**, **miR-185**, miR-27, および miR-let-7f-2		Urol Oncol. 2007 Sep-Oct;25(5):387-92
低酸素腫瘍	**miR-23**, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, **miR-107**, **miR-181**, **miR-210**,およびmiR-213		Mol Cell Biol. 2007 Mar; 27(5):1859-67.
子宮筋腫	miR-let-7 family, miR-21, **miR-23b**, **miR-29b**,およびmiR-197		Genes Chromosomes Cancer. 2007 Apr;46(4):336-47
卵巣癌	miR-199*, **miR-200a**, **miR-214**	miR-100, **miR- let-7クラスター**, miR-125b	Cancer Res. 2008 Jan 15;68(2):425-33
Ｃ型肝炎ウイルスに関連する肝細胞癌	**miR-122**, **miR-100**,および**miR-10a**	miR-198および**miR-145**	Hepatology. 2007 Dec 19 [Epub ahead of print
ALL	**miR-128b**, **miR-204**, **miR-218**, miR-331,およびmiR-181b-1, miR-17-92		Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
アルツハイマー病	**miR-9**, **miR-128**	miR-107	J Neurosci. 2008 Jan 30; 28(5):1213-23 Neuroreport. 2007 Feb 12;18(3):297-300
骨髄線維症	**miR-190**	miR-31, **miR-150**, および miR-95	Exp Hematol. 2007 Nov;35(11):1708-18
骨髄線維症、真性多血症、血小板血症		miR-34a, -**342**, -326, -105, -149,および-147	Exp Hematol. 2007 Nov;35(11):1708-18
HIV	miR-29a, **miR-29b**, **miR-149**, **miR-378**, miR-324-5p		Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 2; 337(4):1214-8.
HIV-1 潜伏期	**miR-28**, **miR-125b**, miR-150, miR-223およびmiR-382		Nat Med. 2007 Oct; 13(10):1241-7.

【図７－１】

図７－１、表ＩＩ

表ＩＩ

フィルタリング後の発現された血漿ｍｉＲＮＡ		検出されなかったディテクター名称			
ディテクター_名称	フィルター				
hsa-let-7a	0.333333333	hsa-let-7e	hsa-mir-346	hsa-mir-520c	hsa-mir-629
hsa-let-7b	0.058823529	hsa-mir-001	hsa-mir-362	hsa-mir-520d	hsa-mir-630
hsa-let-7c	0.725490196	hsa-mir-007	hsa-mir-363	hsa-mir-520d*	hsa-mir-631
hsa-let-7d	0.529411765	hsa-mir-009	hsa-mir-363*	hsa-mir-520e	hsa-mir-632
hsa-let-7f	0.745098039	hsa-mir-009*	hsa-mir-365	hsa-mir-520f	hsa-mir-633
hsa-let-7g	0.215686275	hsa-mir-010a	hsa-mir-367	hsa-mir-520g	hsa-mir-634
hsa-mir-015a	0.568627451	hsa-mir-010b	hsa-mir-368	hsa-mir-520h	hsa-mir-635
hsa-mir-015b	0.078431373		hsa-mir-369-3p	hsa-mir-521	hsa-mir-636
hsa-mir-016	0	hsa-mir-017-3p	hsa-mir-369-5p	hsa-mir-522	hsa-mir-637
hsa-mir-017-5p	0.117647059	hsa-mir-018b	hsa-mir-371	hsa-mir-523	hsa-mir-638
hsa-mir-018a	0.784313726	hsa-mir-022	hsa-mir-372	hsa-mir-524	hsa-mir-639
hsa-mir-018a*	0.784313726	hsa-mir-023a	hsa-mir-373	hsa-mir-525	hsa-mir-641
hsa-mir-019a	0.176470588	hsa-mir-023b	hsa-mir-373*	hsa-mir-525*	hsa-mir-642
hsa-mir-019b	0.058823529	hsa-mir-028	hsa-mir-375	hsa-mir-526a	
hsa-mir-020a	0	hsa-mir-029b	hsa-mir-376a*	hsa-mir-526b	hsa-mir-644
hsa-mir-020b	0.37254902	hsa-mir-029c	hsa-mir-376b	hsa-mir-526b*	hsa-mir-645
hsa-mir-021	0.411764706	hsa-mir-031	hsa-mir-377	hsa-mir-526c	hsa-mir-646
hsa-mir-024	0	hsa-mir-033	hsa-mir-378	hsa-mir-527	hsa-mir-647
hsa-mir-025	0.647058824	hsa-mir-034a	hsa-mir-379		hsa-mir-648
hsa-mir-026a	0	hsa-mir-034b	hsa-mir-380-3p		hsa-mir-649
hsa-mir-026b	0.176470588	hsa-mir-034c	hsa-mir-380-5p	hsa-mir-542-3p	hsa-mir-650
hsa-mir-027a	0.254901961	hsa-mir-095	hsa-mir-381	hsa-mir-542-5p	hsa-mir-651
hsa-mir-027b	0.352941177	hsa-mir-099a	hsa-mir-383	hsa-mir-544	hsa-mir-652
hsa-mir-029a	0.764705882	hsa-mir-100	hsa-mir-409-5p	hsa-mir-545	hsa-mir-653
hsa-mir-030a-3p	0.37254902	hsa-mir-101	hsa-mir-410	hsa-mir-548a	hsa-mir-654
hsa-mir-030a-5p	0.098039216	hsa-mir-105	hsa-mir-412	hsa-mir-548b	hsa-mir-655
hsa-mir-030b	0.039215686	hsa-mir-107	hsa-mir-422a	hsa-mir-548c	hsa-mir-656
hsa-mir-030c	0.019607843	hsa-mir-122a	hsa-mir-422b	hsa-mir-548d	hsa-mir-657
hsa-mir-030d	0.274509804	hsa-mir-124a	hsa-mir-424	hsa-mir-549	hsa-mir-658
hsa-mir-032	0	hsa-mir-125b	hsa-mir-429	hsa-mir-550	hsa-mir-659
hsa-mir-092	0	hsa-mir-126	hsa-mir-432*	hsa-mir-551a	hsa-mir-660
hsa-mir-093	0.058823529	hsa-mir-128a	hsa-mir-448	hsa-mir-551b	hsa-mir-661
hsa-mir-096	0	hsa-mir-128b	hsa-mir-449	hsa-mir-552	hsa-mir-662
hsa-mir-098	0.784313726	hsa-mir-129	hsa-mir-449b	hsa-mir-553	
hsa-mir-099b	0.549019608	hsa-mir-133a	hsa-mir-450	hsa-mir-554	

【図７－２】

"図７－２、表ＩＩ（続き）

hsa-mir-103	0.235294118	hsa-mir-135a	hsa-mir-451	hsa-mir-555
hsa-mir-106a	0.058823529	hsa-mir-135b	hsa-mir-452	hsa-mir-556
hsa-mir-106b	0.215686275	hsa-mir-136	hsa-mir-452*	hsa-mir-557
hsa-mir-125a	0.078431373	hsa-mir-137	hsa-mir-453	hsa-mir-558
hsa-mir-126	0	hsa-mir-138	hsa-mir-455	hsa-mir-559
hsa-mir-126*	0.117647059	hsa-mir-139	hsa-mir-483	hsa-mir-561
hsa-mir-127	0.176470588	hsa-mir-141	hsa-mir-485-5p	hsa-mir-562
hsa-mir-130a	0.666666667	hsa-mir-143	hsa-mir-487a	hsa-mir-563
hsa-mir-130b	0.705882353	hsa-mir-147	hsa-mir-488	hsa-mir-564
hsa-mir-132	0.705882353	hsa-mir-148a	hsa-mir-489	hsa-mir-565
hsa-mir-133b	0.529411765	hsa-mir-149	hsa-mir-491	hsa-mir-566
hsa-mir-134	0.235294118	hsa-mir-152	hsa-mir-492	hsa-mir-567
hsa-mir-140	0.078431373	hsa-mir-153	hsa-mir-493-3p	hsa-mir-569
hsa-mir-142-3p	0.196078431	hsa-mir-154	hsa-mir-493-5p	hsa-mir-570
hsa-mir-142-5p	0.254901961	hsa-mir-154*	hsa-mir-494	hsa-mir-571
hsa-mir-145	0.705882353	hsa-mir-181a	hsa-mir-495	hsa-mir-572
hsa-mir-146a	0	hsa-mir-181a*	hsa-mir-496	hsa-mir-573
hsa-mir-146b	0.078431373	hsa-mir-181c	hsa-mir-497	
hsa-mir-148b	0.784313726	hsa-mir-182	hsa-mir-498	hsa-mir-575
hsa-mir-150	0.019607843	hsa-mir-184	hsa-mir-499	hsa-mir-576
hsa-mir-151	0.019607843	hsa-mir-185	hsa-mir-500	hsa-mir-578
hsa-mir-155	0.176470588	hsa-mir-187	hsa-mir-501	hsa-mir-579
hsa-mir-181d	0.725490196	hsa-mir-189	hsa-mir-502	hsa-mir-580
hsa-mir-182*	0.196078431	hsa-mir-190	hsa-mir-503	hsa-mir-583
hsa-mir-183	0.058823529	hsa-mir-192	hsa-mir-504	
hsa-mir-186	0.039215686	hsa-mir-193b	hsa-mir-505	hsa-mir-585
hsa-mir-191	0	hsa-mir-194	hsa-mir-506	hsa-mir-586
hsa-mir-193a	0.666666667	hsa-mir-196a	hsa-mir-507	hsa-mir-587
hsa-mir-195	0.31372549	hsa-mir-198	hsa-mir-508	hsa-mir-588
hsa-mir-196b	0.254901961	hsa-mir-199a	hsa-mir-509	hsa-mir-589
hsa-mir-197	0.019607843	hsa-mir-199b	hsa-mir-510	hsa-mir-591
hsa-mir-199a*	0.254901961	hsa-mir-200a	hsa-mir-511	hsa-mir-592
hsa-mir-221	0.784313726	hsa-mir-200a*	hsa-mir-512-3p	hsa-mir-593
hsa-mir-222	0	hsa-mir-200b	hsa-mir-512-5p	hsa-mir-594
hsa-mir-223	0	hsa-mir-200c	hsa-mir-513	hsa-mir-596
hsa-mir-224	0.529411765	hsa-mir-202	hsa-mir-514	hsa-mir-597
hsa-mir-302b	0.078431373	hsa-mir-202*	hsa-mir-515-3p	hsa-mir-599
hsa-mir-320	0.098039216	hsa-mir-203	hsa-mir-515-5p	hsa-mir-600
hsa-mir-324-3p	0.705882353	hsa-mir-204	hsa-mir-516-5p	hsa-mir-601
hsa-mir-324-5p	0.470588235	hsa-mir-205	hsa-mir-517*	hsa-mir-603
hsa-mir-328	0	hsa-mir-206	hsa-mir-517a	hsa-mir-604

【図７－３】

図７－３、表ＩＩ（続き）

hsa-mir-330	0.666666667	hsa-mir-208	hsa-mir-517b	hsa-mir-606
hsa-mir-331	0.039215686	hsa-mir-210	hsa-mir-517c	hsa-mir-607
hsa-mir-335	0.725490196	hsa-mir-211	hsa-mir-518a	hsa-mir-608
hsa-mir-339	0.607843137	hsa-mir-214	hsa-mir-518b	hsa-mir-609
hsa-mir-340	0.529411765	hsa-mir-215	hsa-mir-518c	hsa-mir-610
hsa-mir-342	0.019607843	hsa-mir-216	hsa-mir-518c*	hsa-mir-612
hsa-mir-345	0.705882353	hsa-mir-217	hsa-mir-518d	hsa-mir-613
hsa-mir-361	0.725490196	hsa-mir-218	hsa-mir-518e	hsa-mir-614
hsa-mir-370	0.549019608	hsa-mir-219	hsa-mir-518f	hsa-mir-615
hsa-mir-374	0.37254902	hsa-mir-220	hsa-mir-519a	hsa-mir-616
hsa-mir-376a	0.450980392	hsa-mir-296	hsa-mir-519b	hsa-mir-617
hsa-mir-382	0.607843137	hsa-mir-299-3p	hsa-mir-519c	hsa-mir-618
hsa-mir-411	0.607843137	hsa-mir-299-5p	hsa-mir-519d	hsa-mir-619
hsa-mir-423	0.215686275	hsa-mir-301	hsa-mir-519e	hsa-mir-621
hsa-mir-425-3p	0.31372549	hsa-mir-302a	hsa-mir-519e*	hsa-mir-622
hsa-mir-425-5p	0.215686275	hsa-mir-302a*	hsa-mir-520a	hsa-mir-624
hsa-mir-432	0.392156863	hsa-mir-302b*	hsa-mir-520a*	hsa-mir-626
hsa-mir-433	0.470588235	hsa-mir-302c	hsa-mir-520b	hsa-mir-627
hsa-mir-484	0	hsa-mir-302c*		
hsa-mir-485-3p	0.31372549	hsa-mir-302d		
hsa-mir-486	0	hsa-mir-323		
hsa-mir-487b	0.529411765	hsa-mir-325		
hsa-mir-532	0.62745098	hsa-mir-326		
hsa-mir-539	0.588235294	hsa-mir-329		
hsa-mir-574	0	hsa-mir-337		
hsa-mir-584	0.784313726	hsa-mir-338		
hsa-mir-628	0			
hsa-mir-643	0.568627451			

【図８】

図8、表ＩＩＩ

表ＩＩＩ　血漿微小胞およびＰＢＭＣにおける最も高発現の１０のｍｉＲＮＡ

血漿微小胞				PBMC			
miRNA	正規化した発現（±Ｓ．Ｄ．）	ドナーにおいて発現された頻度（%）	最も高発現の１０にランクされる頻度（%）	miRNA	正規化した発現（±Ｓ．Ｄ．）	ドナーにおいて発現された頻度（%）	最も高発現の１０にランクされる頻度（%）
mir-223	1589 ± 653	100	100	**mir-223**	2143 ± 499	100	100
mir-484	50.9± 22.9	100	96	**mir-150**	241 ± 94.6	98	98
mir-191	46.4± 14.9	100	100	**mir-146b**	57.5± 21.1	100	100
mir-146a	39.5 ± 19	100	88	**mir-016**	54.7 ± 32.9	100	100
mir-016	25.4 ± 13.3	100	78	**mir-484**	40.6 ± 18.8	89	88
mir-026a	25.2± 9.95	100	90	**mir-146a**	39.6 ± 13.0	100	98
mir-222	24.5 ± 12.4	100	76	**mir-191**	32.4 ± 15.6	100	94
mir-024	22.7 ± 10.5	100	80	**mir-026a**	30 ± 8.92	100	100
mir-126	18.2 ± 8.04	100	66	**mir-019b**	21.7 ± 7.49	100	80
mir-032	15.3 ±32.6	100	31	**mir-020a**	15± 5.11	100	4

【図９】

図9、表ＩＶ

SangerのｍｉＲ塩基のみより予測される標的のＩＰＡ解析に基づいての血漿微小胞およびＰＢＭＣ画分中で発現されるｍｉＲＮＡにより制御される予測経路			
血漿微小胞	p値	PBMC	p値
グリセロリン脂質の代謝	3.29E-03	軸索誘導の シグナリング	1.47E-02
イノシトールリン酸の代謝	5.77E-03	シナプスの長期増強	2.07E-02
リン脂質の分解	9.17E-03	エストロゲン受容体のシグナリング	2.23E-02
アラニンおよびアスパラギン酸の代謝	1.96E-02	グリセロリン脂質の代謝	2.45E-02
エストロゲン受容体のシグナリング	2.14E-02	Ｄ－グルタミン酸およびＤ－グルタメートの代謝	2.78E-02
TargetScanおよびSangerのｍｉＲ塩基を組み合わせての標的からの血漿微小胞およびＰＢＭＣ画分中で発現されるｍｉＲＮＡにより制御される予測経路			
血漿微小胞	p値	PBMC	p値
抗原提示経路	1.28E-03	グリシン、セリン、スレオニンの代謝	3.63E-03
グリセロリン脂質の代謝	9.05E-03	グリセロリン脂質の代謝	2.38E-02
グリシン、セリン、スレオニンの代謝	1.56E-02	Ｄ－グルタミン酸およびＤ－グルタメートの代謝	2.54E-02
ナチュラルキラー細胞のシグナリング	1.57E-02	グリオキシル酸、ジカルボン酸の代謝	4.37E-02

【図１０－１】

図１０－１、表Ｖ

血漿＿平均は、血漿に関する５１名の観測値すべてにわたるＣｔ生データの平均である。
ＰＢＭＣ＿平均は、ＰＢＭＣに関する５１名の観測値すべてにわたるＣｔ生データの平均である。
“血漿－ＰＢＭＣ”は血漿およびＰＢＭＣ間の正規化したデータの差である。
血漿－ＭＮＣ“＋”：ｍｉＲレベルはＰＢＭＣにおいてより高く、“－”：ｍｉＲレベルは血漿においてより低い。
“倍数変化”は２^差の値である。ｍｉＲ２９ａに関して：４０．３＝２^（５．３３）であり、これはＰＢＭＣ中のｍｉＲレベルが血清中のレベルより４０倍高いことを意味する。
“ｐ値”は、ｐ値＜０．０５/７２＝０．０００６の場合に、有意とみなした。

ディテクター＿名称	血漿＿平均	ＰＢＭＣ＿平均	血漿－ＭＮＣ	倍数変化	ｐ値	血漿に関する倍数変化
hsa-mir-029a	37.12771586	31.87566924	5.3333	40.31654208	9.70E-28	0.024803715
18S (CT)	12.71460766	9.451029281	3.3449	10.16050356	9.84E-25	0.098420319
hsa-mir-155	32.77301951	29.64446324	3.2098	9.252222752	6.61E-23	0.108082136
hsa-mir-146b	30.87718855	26.44380422	4.5147	22.85915231	1.81E-22	0.043746154
hsa-mir-142-3p	33.45027482	28.97701498	4.5545	23.49855274	1.91E-22	0.042555812
hsa-mir-222	27.69255453	29.77206378	-1.9982	0.250312111	1.18E-21	3.995012452
hsa-mir-328	30.15998382	32.9642692	-2.723	0.151459083	1.64E-21	6.602443268
hsa-mir-151	30.40933518	32.29093225	-1.8003	0.287114879	2.24E-21	3.482926432
hsa-mir-150	30.47592494	24.6518619	5.9053	59.93388544	7.01E-21	0.016685052
hsa-mir-486	28.73173943	31.56628224	-2.7533	0.148311256	4.31E-20	6.74257657
hsa-mir-197	30.22004439	32.22121169	-1.9199	0.264272828	5.34E-18	3.783968293
hsa-mir-140	30.80686384	28.81119314	2.077	4.219289268	2.87E-17	0.237006741
hsa-mir-320	32.3865371	33.86695527	-1.3991	0.379165604	1.63E-16	2.637370031
hsa-mir-374	34.51049488	32.67750663	1.9143	3.76930882	8.01E-15	0.265300629
hsa-mir-019a	32.11311761	29.96710463	2.2273	4.682568177	2.86E-12	0.213558022
hsa-mir-019b	29.4539469	27.85115537	1.6841	3.213398715	7.12E-12	0.311196988
hsa-mir-126	28.07632355	29.10031739	-0.9427	0.520258307	2.61E-11	1.922122121
hsa-mir-016	27.74576263	26.5689361	1.2581	2.391805375	1.35E-10	0.418094219
hsa-mir-532	36.36702118	34.20639555	2.2419	4.730196117	6.15E-10	0.211407725
hsa-mir-092	29.75216725	30.55396618	-0.7205	0.606887075	1.17E-09	1.647753003
hsa-mir-199a*	33.58726049	35.4571252	-1.7886	0.289452796	3.21E-09	3.454794744
hsa-let-7g	33.60687451	31.98889118	1.6993	3.247433539	4.99E-09	0.307935478
hsa-mir-032	29.54416735	31.80526606	-2.1798	0.220706343	8.52E-09	4.530907381
hsa-mir-345	36.51374094	34.71916814	1.8759	3.670305114	1.26E-08	0.272456913
hsa-mir-103	33.43298386	34.64525506	-1.131	0.456599125	1.99E-08	2.190104942
hsa-mir-021	34.3396759	32.34668429	2.0743	4.211400264	4.23E-08	0.237450714
hsa-mir-183	32.45422284	35.11564953	-2.5801	0.167229352	7.17E-08	5.979811469
hsa-mir-142-5p	33.80914806	32.4729949	1.4174	2.671037073	9.83E-08	0.374386417
hsa-mir-017-5p	31.31194325	32.41959375	-1.0264	0.490933663	1.26E-07	2.03693508
hsa-mir-106b	33.74281576	32.50763722	1.3165	2.490611501	1.28E-07	0.401507822
hsa-mir-342	30.04861659	29.34785373	0.782	1.719512972	3.06E-07	0.581560021

【図１０－２】

図１０－２、表Ｖ（続き）

hsa-mir-015a	36.02643541	34.41777394	1.6899	3.226343396	3.25E-07	0.309948408
hsa-mir-106a	32.27341998	33.310393	-0.9557	0.515591362	4.92E-07	1.939520467
hsa-mir-030a-5p	32.84903206	32.11457514	0.8157	1.760151976	4.98E-07	0.56813276
hsa-mir-181d	36.91248884	35.10117465	1.8926	3.713037794	5.30E-07	0.269321255
hsa-mir-574	29.77877718	31.99443544	-2.1344	0.227762162	3.05E-06	4.390544899
hsa-mir-020a	29.10969835	28.36665692	0.8243	1.770675693	3.74E-06	0.564756157
hsa-mir-133b	35.04172861	36.86655569	-1.7435	0.298644281	4.05E-06	3.348465259
hsa-let-7b	32.39289143	33.23120741	-0.757	0.591725511	4.25E-06	1.689972769
hsa-mir-026b	32.29385324	31.16910598	1.206	2.30697121	5.44E-06	0.433468782
hsa-mir-027b	34.97319163	37.12771071	-2.0732	0.23763183	1.20999E-05	4.208190455
hsa-mir-223	21.63665394	21.16179467	0.5561	1.470289246	2.99379E-05	0.680138281
hsa-mir-195	33.54064118	32.45677802	1.1652	2.242643031	0.000055077	0.44590244
hsa-mir-024	27.78702461	28.36258525	-0.4943	0.709906043	0.000137267	1.408637114
hsa-mir-030d	33.8831652	32.98623929	0.9782	1.970005968	0.000154741	0.507612675
hsa-mir-015b	31.44832671	32.07442065	-0.5448	0.685486424	0.000371404	1.458818095
hsa-mir-096	31.46980261	32.73422363	-1.1831	0.44040416	0.000386324	2.270641588
hsa-mir-191	26.63890682	27.27556098	-0.7068	0.612677595	0.00047708	1.632179808
hsa-mir-425-3p	34.77417378	35.82356186	-0.9681	0.511178832	0.00084906	1.95626254
hsa-mir-020b	34.97815304	33.84422814	1.2152	2.321729667	0.000852341	0.430713366
hsa-mir-643	35.6734501	37.16658316	-1.4118	0.375842469	0.00130314	2.660689207
hsa-mir-126*	31.16681945	32.1345669	-0.8865	0.54092482	0.001314585	1.84868574
hsa-mir-423	33.93739253	34.82278949	-0.8041	0.57271925	0.001362239	1.746056205
hsa-mir-425-5p	33.23637712	33.88098071	-0.5633	0.676752398	0.00179719	1.477645299
hsa-mir-026a	27.61150875	27.32677761	0.366	1.28877463	0.003310506	0.775930854
hsa-mir-302b	33.23113157	34.33434284	-1.0219	0.492467356	0.003731969	2.030591447
hsa-mir-484	26.55751618	28.13046808	-1.4917	0.355593289	0.009046242	2.812201558
hsa-mir-125a	30.94104939	31.63410639	-0.6118	0.654379746	0.02785181	1.528164657
hsa-let-7a	34.16573733	34.66154112	-0.4145	0.750279477	0.031855987	1.332836671
hsa-mir-628	33.65892745	34.23451988	-0.4943	0.709906043	0.033363855	1.408637114
hsa-mir-182*	34.51246341	35.19580641	-0.6021	0.65879431	0.04206113	1.517924464
hsa-mir-093	29.92991163	30.33080725	-0.3196	0.801292012	0.043597802	1.247984486
hsa-mir-376a	35.49479343	36.2218518	-0.6458	0.639138279	0.048003434	1.564606648
hsa-mir-196b	33.89190492	34.56216867	-0.589	0.664803554	0.052904716	1.504203751
hsa-mir-025	36.27231106	35.85259422	0.501	1.41519416	0.069149461	0.706616822
hsa-mir-027a	33.33901471	32.99540369	0.4249	1.342479446	0.101287776	0.744890362
hsa-mir-146a	27.051654	26.95885476	0.1741	1.12826034	0.241458101	0.886320262
hsa-mir-340	35.71472961	35.53800265	0.258	1.195819797	0.297093531	0.8362464
hsa-mir-030b	30.55810765	30.72009382	-0.0807	0.945598728	0.389875101	1.057531033
hsa-mir-186	31.31177086	31.45367741	-0.06062	0.958851963	0.659198081	1.042913858
hsa-mir-331	31.20308243	31.25979306	0.02458	1.017183525	0.843135202	0.983106761
hsa-mir-030c	30.93719829	31.01586004	0.002625	1.001821168	0.97816881	0.998182143

【図１１－１】

図１１－１、表ＶＩ

表　ＶＩ

ディテクター＿名称	ＰＢＭＣの正規化した発現の平均	ＰＢＭＣの標準偏差	ディテクター＿名称	血漿の正規化した発現の平均	血漿の標準偏差
hsa-mir-223	2143.797514	499.6723532	hsa-mir-223	1589.265353	653.1441
hsa-mir-150	241.3339986	94.6316509	hsa-mir-484	50.93154102	22.91411
hsa-mir-146b	57.51515588	21.17347322	hsa-mir-191	46.44422571	14.98219
hsa-mir-016	54.79023342	32.92864759	hsa-mir-146a	39.5631478	19.02017
hsa-mir-484	40.62828652	18.89513879	hsa-mir-016	25.45043823	13.32435
hsa-mir-146a	39.66536453	13.01422255	hsa-mir-026a	25.2068328	9.956682
hsa-mir-191	32.44104295	15.62493155	hsa-mir-222	24.51626706	12.42177
hsa-mir-026a	30.05789737	8.928309461	hsa-mir-024	22.79169634	10.53596
hsa-mir-019b	21.72111133	7.496587814	hsa-mir-126	18.20923598	8.04666
hsa-mir-020a	15.03972998	5.117918017	hsa-mir-032	15.32305403	32.61654
hsa-mir-024	14.49037987	2.924884427	hsa-mir-486	12.89548349	11.97428
hsa-mir-142-3p	11.61802275	7.535807778	hsa-mir-020a	10.12067658	5.597534
hsa-mir-140	11.15286241	3.933184767	hsa-mir-019b	9.158209689	6.76422
hsa-mir-126	9.209558485	3.825687483	hsa-mir-150	8.165508668	25.08223
hsa-mir-342	7.803100549	3.388772813	hsa-mir-574	5.939301367	3.722014
hsa-mir-155	6.584151232	4.579272166	hsa-mir-092	5.700980896	3.157407
hsa-mir-222	5.715723219	2.105344287	hsa-mir-093	5.436799962	2.417329
hsa-mir-019a	5.53562668	2.957936571	hsa-mir-342	5.114543492	3.297305
hsa-mir-093	3.756090874	1.000518353	hsa-mir-197	4.9808586	4.507
hsa-mir-092	3.215354275	0.85390195	hsa-mir-328	4.707858075	3.592588
hsa-mir-486	3.096228853	7.676887526	hsa-mir-096	3.674085488	5.965292
hsa-mir-030b	2.865611791	0.76538861	hsa-mir-151	3.452172299	1.08377
hsa-mir-574	2.458205492	1.894539696	hsa-mir-146b	3.272000368	2.101495
hsa-mir-030c	2.335820956	0.663949738	hsa-mir-140	3.196516876	1.71678
hsa-mir-026b	2.129402092	0.705755408	hsa-mir-030b	3.134519745	1.142809
hsa-mir-331	1.985929854	0.609153141	hsa-mir-125a	3.080410769	1.975409
hsa-mir-125a	1.808127477	1.087896802	hsa-mir-126*	3.023376204	2.068206
hsa-mir-186	1.720577641	0.419612713	hsa-mir-183	2.854264163	6.494415
hsa-mir-032	1.716467503	1.338128537	hsa-mir-030c	2.412532336	0.863587
hsa-mir-029a	1.323099465	0.533548819	hsa-mir-017-5p	2.13024101	0.998316
hsa-mir-126*	1.269368187	0.759421276	hsa-mir-331	2.087433557	0.81255
hsa-let-7g	1.199246639	0.349725473	hsa-mir-186	2.022411766	0.916917
hsa-mir-021	1.161213483	0.674584117	hsa-mir-015b	1.808314178	0.81048
hsa-mir-197	1.149407136	0.647186919	hsa-mir-019a	1.697172987	1.453897

【図１１－２】

図１１－２、表ＶＩ（続き）

hsa-mir-015b	1.14628446	0.432407565	hsa-mir-302b	1.339313335	2.387044
hsa-mir-030a-5p	1.094683149	0.306485271	hsa-mir-026b	1.292369054	0.824158
hsa-mir-195	1.017673959	0.797387672	hsa-mir-106a	1.186157531	1.293289
hsa-mir-151	1.007960478	0.397967603	hsa-let-7b	0.97666637	0.625536
hsa-mir-142-5p	0.962665368	0.492490733	hsa-mir-320	0.911092198	0.420503
hsa-mir-017-5p	0.941159371	0.360846484	hsa-mir-155	0.808867743	0.52866
hsa-mir-106b	0.910164376	0.403715009	hsa-mir-030a-5p	0.727538734	0.549257
hsa-mir-096	0.875989336	0.559638262	hsa-mir-628	0.713396354	1.263219
hsa-mir-374	0.764917256	0.274388929	hsa-mir-027a	0.641903058	0.448917
hsa-mir-328	0.720096352	0.412158586	hsa-mir-142-3p	0.627217683	0.607184
hsa-mir-030d	0.662654685	0.22361572	hsa-mir-195	0.564628001	0.392046
hsa-mir-027a	0.622821419	0.251240619	hsa-mir-425-5p	0.554428361	0.275865
hsa-mir-106a	0.542577626	0.312616405	hsa-let-7g	0.515997707	0.337364
hsa-let-7b	0.534079686	0.25068168	hsa-mir-021	0.51383279	0.491008
hsa-mir-020b	0.410435233	0.262371622	hsa-mir-199a*	0.503454664	0.327551
hsa-mir-320	0.344918355	0.140441973	hsa-mir-142-5p	0.485752905	0.504504
hsa-mir-425-5p	0.334114444	0.131686276	hsa-mir-103	0.469571039	0.215895
hsa-mir-628	0.323074686	0.328272174	hsa-mir-106b	0.455236625	0.295268
hsa-mir-302b	0.31107497	0.233922375	hsa-mir-182*	0.450866408	0.779637
hsa-mir-532	0.30283697	0.175299492	hsa-mir-196b	0.424682779	0.283318
hsa-mir-196b	0.291839926	0.203868959	hsa-mir-643	0.410079866	0.934729
hsa-mir-015a	0.263528933	0.156658681	hsa-mir-030d	0.360317322	0.195419
hsa-mir-183	0.223615225	0.225419033	hsa-mir-423	0.355300524	0.267033
hsa-mir-345	0.222589939	0.14617654	hsa-let-7a	0.316043353	0.197157
hsa-mir-423	0.213547231	0.136842846	hsa-mir-027b	0.252490316	0.182518
hsa-mir-103	0.205412359	0.093491856	hsa-mir-374	0.251770179	0.197212
hsa-let-7a	0.198065472	0.082808812	hsa-mir-020b	0.227198431	0.167979
hsa-mir-181d	0.170055022	0.109234879	hsa-mir-133b	0.201227753	0.178372
hsa-mir-182*	0.151155794	0.079789533	hsa-mir-425-3p	0.183808363	0.094868
hsa-mir-340	0.128492001	0.08303611	hsa-mir-376a	0.166829158	0.161986
hsa-mir-425-3p	0.127886265	0.097067479	hsa-mir-340	0.113550436	0.088995
hsa-mir-199a*	0.127527328	0.079775882	hsa-mir-015a	0.110336695	0.095621
hsa-mir-376a	0.124903907	0.160137603	hsa-mir-181d	0.093074354	0.212993
hsa-mir-643	0.116164417	0.195641411	hsa-mir-532	0.086633253	0.064244
hsa-mir-025	0.11319355	0.079644761	hsa-mir-025	0.072911126	0.043857
hsa-mir-133b	0.100108157	0.121551814	hsa-mir-345	0.071420142	0.054899
hsa-mir-027b	0.07101679	0.067406886	hsa-mir-029a	0.058322216	0.093625

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/76109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/48 (2008.04)
USPC - 435/6, 536/24.31, 514/44
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)
USPC – 435/6, 536/24.31, 514/44, 536/24.3

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)
WEST – PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Dialog Classic Files ? 654, 652, 351, 349, 315, 6, 35, 65, 155; Google Scholar, Entrez Pubmed; USPTO Web Page; Search terms – microRNA, diagnosis, cancers, miR gene products, levels of expression, standards, leiomyoma, Alzheimer's, thrombocytoythemia, therapeutic agent, latent HIV-1, label

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	WO 2005/121369 A2 (PIETRZKOWSKI) 22 December 2005 (22.12.2005) pg 1, ln 6-7; pg 2, ln 2 -9; pg 3, ln 18-21; pg 15, ln 6-10; pg 8, ln 21-23; pg 10, ln 18-28; pg 12, ln 26-28; pg 19, ln 6-7, pg 19, ln 31 – pg 20, ln 3; pg 22, ln 11-22	8, 9 1-4, 6-7, 10-41, 44-47, 50
X – Y	US 2007/0161004 A1 (BROWN et al.) 12 July 2007 (12.07.2007) para [0001], [0014], [0016], [0037], [0042], [0050], [0054], [0059], [0061]-[0071], [0079], [0081], [0083], [0090], 0105], [0131], [0133], [0143], [0144], [0229], [0231], [0324], [0345]-[0347], [0375]-[0377]	42, 48, 49 1-4, 6-7, 10-41, 43-47, 50
Y	US 2007/0077553 A1 (BENTWICH) 05 April 2007 (05.04.2007) para [0063], [0066], [0148], [0427], [1399], [1422], [2311], [4433], [5582], [6192], [6307], [7091], [7234], [8269]	12, 25, 30, 43
Y	US 2005/0159378 A1 (McSWIGGEN et al.) 21 July 2005 (21.07.2005) para [0002], [0011], [0392], [0408], [0455]	20, 24, 27, 43
Y	US 2005/0064470 A1 (RANA) 24 March 2005 (24.03.2005) para [0016], [0077], [0078]	33, 43

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 December 2008 (27.12.2008)	12 JAN 2009
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: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/76109

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.: 5
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:
Claim 5 recites an antecedent of micro-RNA gene products as listed in Table IV. However, there are no micro-RNA gene products in Table IV. Therefore, there is no discernable antecedent basis from which the claim may be searched.

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:

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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　33/15	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/15　Ｚ	
Ｇ０１Ｎ　37/00	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	37/00　１０２	
Ａ６１Ｋ　45/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｋ　48/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,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,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(72)発明者　マーシュ，クレイ・ビー
アメリカ合衆国オハイオ州４３２２１，コロンバス，クラブ・ロード　２２６６
(72)発明者　パイパー，メリッサ・ジー
アメリカ合衆国オハイオ州４３０１７，ダブリン，フィンラリグ・ドライブ　８６４０
(72)発明者　イスマイル，ノウラ
アメリカ合衆国オハイオ州４３２１２，コロンバス，アッシンガー・ブールバード　１６１６

Ｆターム(参考)　2G045 AA25 AA26 BB03 BB07 BB10 CA20 CA25 CA26 CB01 DA14
FA37 FB02 FB07
4B024 AA11 AA12 BA80 CA09 CA11 DA03 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ52 QQ61 QR32 QR55 QR82 QS34
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB26