

(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2018-535684
(P2018-535684A)

(43) 公表日 平成30年12月6日(2018.12.6)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/074 (2010.01)
A 61 K 31/7105 (2006.01)
A 61 K 48/00 (2006.01)
A 61 K 35/545 (2015.01)
A 61 P 35/00 (2006.01)

F 1

C 12 N 5/074
A 61 K 31/7105
A 61 K 48/00
A 61 K 35/545
A 61 P 35/00

テーマコード(参考)

4 B 06 4
4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 6
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-528746 (P2018-528746)
(86) (22) 出願日 平成28年8月31日 (2016.8.31)
(85) 翻訳文提出日 平成30年8月1日 (2018.8.1)
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/049583
(87) 国際公開番号 WO2017/095489
(87) 国際公開日 平成29年6月8日 (2017.6.8)
(31) 優先権主張番号 62/262,280
(32) 優先日 平成27年12月2日 (2015.12.2)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 15/048,964
(32) 優先日 平成28年2月19日 (2016.2.19)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 15/167,226
(32) 優先日 平成28年5月27日 (2016.5.27)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 510087807
リン、シーラン
L I N, S h i - L u n g
アメリカ合衆国 9 1 0 0 7 カリフォルニア州 アーケーディア ピクトリア ドライブ 9 2 0
(71) 出願人 516223182
チャン、ドナルド
C H A N G, D o n a l d
アメリカ合衆国 9 0 7 0 3 カリフォルニア州 セリトス ピカデリー レーン 1 6 8 0 8

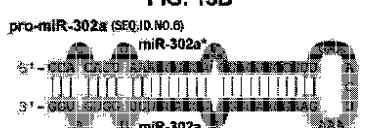
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD34陽性成体幹細胞の増殖を誘導する薬物としてのmicroRNA前駆体の使用

(57) 【要約】

本発明は、概してヒトの老化に関する多種の退行性疾患に対する薬物/ワクチン及び/又は療法の開発に用いることが可能な、CD34陽性成体幹細胞群の増殖及び/又は再生を誘導するための組成物及び方法に関する。また、本発明には、品質が高くて大量の小ヘアピン型RNA(shRNA)組成物の製造に必要な製造と精製方法が教示されている。これらの組成物、例えばmicroRNA前駆体(pri-miRNA及びpre-miRNA)及び低分子干渉RNAs(siRNA)は、ヒト老化関連疾患の治療に用いることができる。ヒト老化関連疾患としては、例えば、アルツハイマー病(Alzheimer's disease)、パーキンソン病(Parkinson's disease)、骨粗鬆症、糖尿病及び癌が挙げられるが、それらに限定されない。得られるshRNA、好ましくはpre-miRNAsは、ヒト退行性疾患に対する治療薬物の開発に用いることが可能であり、特定的には、CD34陽性幹細胞増殖及び/又は再生を誘導するメカニズムにより行う。

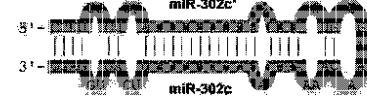
FIG. 13B



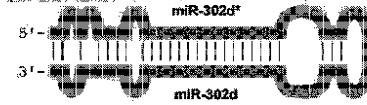
pro-miR-302b (SEQ.ID.NO.7)



pro-miR-302c (SEQ.ID.NO.8)



pro-miR-302d (SEQ.ID.NO.9)



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) SEQ.ID.NO.3を含む少なくとも1つのmicroRNA前駆体を提供することと、
(b) 少なくとも1つのCD34陽性細胞を含む細胞マトリックスを提供することと、
(c) (a)のmicroRNA前駆体と(b)の細胞マトリックスとを接触させ、前記CD34陽性細胞群の増殖又は再生を誘導することと、
を含む、microRNA前駆体(pre-miRNA)を用いてCD34陽性成体幹細胞の増殖又は再生を誘導する方法。

【請求項 2】

前記microRNA前駆体は、原核細胞における真核プロモーターによりRNA転写を駆動することによって生じる、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記真核プロモーターによりRNA転写を駆動することは、3-モルフォリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)の分子構造を含む化学薬剤と、SEQ.ID.NO.8、SEQ.ID.NO.7、SEQ.ID.NO.8、又はSEQ.ID.NO.9の配列をコードする少なくとも1つの発現ベクターを担持する少なくとも1つの形質転換原核細胞とを接触させることで誘導される、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記発現ベクターは、SEQ.ID.NO.5の配列をコードする組換えプラスミドである、請求項3に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記発現ベクターは、サイトメガロウイルス(CMV)又は哺乳動物EF1(EF1alpha)プロモーターを含み、或いはこの両者を同時に含むpLenti-EF1alpha-RGFP-miR302である、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

前記原核細胞は、大腸菌コンピテンツセルである、請求項2に記載の方法。

【請求項 7】

前記microRNA前駆体は、SEQ.ID.NO.6、SEQ.ID.NO.7、SEQ.ID.NO.8、又はSEQ.ID.NO.9の少なくとも1つのヘアピン型配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記microRNA前駆体は、原核生物により生成されるmiR-302前駆体(pre-miR-302)の一種である、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記pre-miR-302は、miR-302a、miR-302b、miR-302c、又はmiR-302dの少なくとも1つの配列を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記pre-miR-302は、医薬及び治療応用の薬物成分の一部として用いられる可能である、請求項8に記載の方法。

【請求項 11】

前記microRNA前駆体は、医薬及び治療応用の薬物成分の一部として用いられる可能である、請求項1に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記CD34陽性成体幹細胞の増殖は、医薬及び治療応用に役立つ、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記CD34陽性成体幹細胞の増殖は、体内でヒト癌細胞の悪性特性を低悪性度の良性状態又は正常に類似する状態に再プログラムすることに役立つ、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記CD34陽性成体幹細胞の増殖は、体内で傷跡のない傷口の治癒を促進することに役立つ、請求項12に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記CD34陽性細胞は、皮膚、毛髪、筋肉、血液（造血細胞）、間質細胞、及び神経幹細胞、又はその組合せを含む、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本発明は、2015年12月2日に出願され、タイトルが「miR-302 Attenuates A -induced Neurotoxicity through Activation of Akt Signaling」である米国臨時出願第62/262,280号の優先権を主張している。また、本発明は、2016年2月19日に出願され、タイトルが「A Composition and Method of Using miR-302 Precursors as Drugs for Treating Alzheimer's Diseases」である米国特許出願第15/048,964号の優先権を主張している。また、本発明は、2016年5月27日に出願され、タイトルが「Use of MicroRNA Precursors as Drugs for Inducing CD34-positive Adult Stem Cell Expansion」である米国特許出願第15/167,226号の優先権を主張している。10

【0002】

本発明は、概して小ヘアピンRNA（shRNA）分子、好ましくはmicroRNA前駆体（pre-miRNA）及び/又はsiRNAによりCD34細胞の増殖及び/又は再生を誘導する組成物及び方法に関する。これらの分子は、ヒトの老化に関する多種の退行性疾患に対する薬物/ワクチン及び/又は療法の開発に用いることが可能である。また、本発明には、品質が高くて大量の小ヘアピン型RNA（shRNA）組成物の製造に必要な製造と精製方法が教示されている。これらの組成物、例えばmicroRNA前駆体（pri-miRNA及び/又はpre-miRNA）及び低分子干渉RNAs（siRNA）は、ヒトの老化関連疾患の治療に用いることができ、前記疾患は、例えば、アルツハイマー病（Alzheimer's disease）、パーキンソン病（Parkinson's disease）、骨粗鬆症、糖尿病及び癌が挙げられるが、それらに限定されない。得られるshRNAs、好ましくはpre-miRNAs及びsiRNAsは、ヒトの退行性疾患に対する治療薬物の開発に用いることが可能であり、特定的には、CD34陽性幹細胞増殖及び/又は再生を誘導するメカニズムにより行う。また、本発明には、高度な肝癌の悪性特性を低度良性、ひいては比較的に正常な段階まで再プログラムできる「癌の逆転（Cancer Reversion）」と称されるメカニズムを有する、pre-miRNAに基づく新規な薬物組成物も開示されている。癌の逆転は、薬物の設計において新しい概念であるので、本発明は、このような新規なメカニズムにより癌の療法に用いる第一選択薬物を設計する。20

【背景技術】

【0003】

幹細胞は、大量の有効成分を含む宝箱の如く、新しい細胞の成長/組織の再生の刺激、損傷/老化組織の修復及び/又は回復、退行性疾患の治療、及び腫瘍/癌の形成/進行の予防に用いることができる。そのため、発明者は、これらの幹細胞を新規な薬物のスクリーニング、識別及び製造の工具として使用できることを想到できる。したがって、こうして得られる薬物は、医薬及び治療への応用の開発、例えば、研究、診断及び/又は療法の生物学的利用、装置及び/又は設備及びその組合せに用いることができる。30

【0004】

MicroRNA（miRNA）は、ヒト胚性幹細胞（hESCs）における主な有効成分の一つである。hESC特異的miRNAの種類は主として、miR-302ファミリー、miR-371～373ファミリー及びmiR-520ファミリーのメンバーを含むが、それらに限定されない。中では、miR-302ファミリーが腫瘍抑制において機能的作用を果たすことが既に見出された（Lin氏ら，2008及び2010）。MiR-302は、八つ（8）のファミリーメンバーを含み、四つ（4）のセンスmiR-302（a、b、c及びd）及び四つ（4）のアンチセンスmiR-302*（a*、b*、c*及びd*）を含む。これらのセンス及びアンチセンスメンバーは、一部がマッチングしており、且つ二本鎖体をそれぞれ形成できる。miR-302の前駆体は、それぞれmiR-302aとa*（pre-miR-302a）、miR-302bとb*（pre-miR-302b）、miR-302cとc*（miR-302c）及びmiR-302dとd*（pre-miR-302d）4050

)から形成され、一端に結合配列(ステムループ)がある。miR-302の機能を活性化するために、miR-302前駆体(pre-miR-302)は、まず、細胞リボヌクレアーゼIII Dicers(RNaseIII Dicers)の処理により成熟miR-302sになり、さらに、あるアルゴノートタンパク質(argonaute protein)とRNA誘導サイレンシング複合体(RISCs)を形成し、その後、標的遺伝子転写物(mRNAs)、特に発癌性遺伝子mRNAsのRNA干渉(RNAi)指向性分解又は翻訳抑制を引き起こす(Lin氏ら, 2008、2010及び2011)。

【0005】

MiR-302は、hESCs及び誘導多能性幹細胞(iPSCs)で見出される最も豊富なncRNA種類である。発明者の従来の研究では、hESCs内のレベルよりも高い、miR-302の異所的過剰発現が、桑実胚段階に類似する初期ヒト受精卵の比較的遅い細胞周期速度(20~24時間/周期)でヒトの正常細胞及び癌細胞の両者とともにhESC様iPSCに再プログラムできることを示した(Lin氏ら, 2008、2010及び2011; EP 2198025; U.S. 12/149,725; U.S. 12/318,806; U.S. 12/792,413)。相対静止(Relative quiescence)は、これらのmiR-302誘導iPSCsの明確な特徴であるが、hESCs及びその他の従来の報告における4因子誘導(Oct4-Sox2-KIf4-c-Myc又はOct4-Sox2-Nanog-Lin28)iPSCsは、いずれも腫瘍/癌細胞に類似する高度の増殖性細胞周期速度を示す(12~15時間/周期)(Takahashi氏ら, 2006; Yu氏ら, 2007; Wernig氏ら, 2007; Wangら, 2008)。このようなmiR-302の腫瘍抑制効果を開示するために、発明者は、2種類のmiR-302標的G1-チェックポイント調節因子に関して識別し、サイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)及びサイクリンDを含む(Lin氏ら, 2010; U.S. 12/792,413; U.S. 13/964,705)。細胞周期進行は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)の活性化により駆動され、正の調節サブユニット(positive regulatory subunits)であるサイクリン及び負の調節因子であるCDK抑制因子(CKIs、例えばp14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1及びp27Kip1)と機能性複合体を形成することが知られている。哺乳動物においては、異なるサイクリン-CDK複合体が細胞周期における異なる時期の移行の調節に関与し、例えば、サイクリン-D-CDK4/6は、G1期進行に用いられ、サイクリン-E-CDK2は、G1~S期の移行に用いられ、サイクリン-A-CDK2は、S期進行に用いられ、サイクリン-A/B-CDC2(サイクリン-A/B-CDK1)は、M期進入に用いられる。したがって、発明者の研究から明らかのように、miR-302の腫瘍抑制機能は、G1~S期の移行期間においてサイクリン-E-CDK2とサイクリン-D-CDK4/6の経路の共抑制により生じる。

【0006】

miR-302は、新規な抗癌薬物/ワクチンの設計及び開発に用いることができるが、その製造が問題となる。天然miR-302は、hESCsのようなヒト多能性幹細胞のみに見られ、その資源が極めて限られているからである。或いは、合成低分子干渉RNA(siRNA)は、pre-miR-302を擬態するために用いることができる。しかし、pre-miR-302の構造が2つのミスマッチのmiR-302及びmiR-302*鎖で形成されるため、完璧にマッチングされたこのようなsiRNAミミックは、miR-302*の機能を置換できず、その配列がsiRNAのアンチセンス鎖とまったく異なる。例えば、siRNA-302aミミックのアンチセンス鎖は、5'-UCACCAAAAC AUGGAAGCAC UUA-3' (SEQ. ID. NO.1) である一方、天然miR-302a*は、5'-ACUUAACGU GGAUGUACUU GCU-3' (SEQ. ID. NO.2) である。miR-302の機能は、そのセンスmiR-302及びアンチセンスmiR-302*鎖の両者により生じるので、このようなsiRNAミミックを用いた従来の報告では、天然miR-302の機能と異なる結果を示した。一方で、発明者の最近のiPSCsの関連研究は、pre-miR-302の製造の代替解決方案を提供できる(EP 2198025; U.S. 12/149,725; U.S. 12/318,806)。しかしながら、このようなiPSCsを成長させるコストが依然として高すぎるので、産業的製造に用いることができない。

【0007】

或いは、ヒトmicroRNAs及びその前駆体を製造可能な方法として、原核コンピテントセルを使用してもよい。しかし、原核細胞は、Drosha及びDicerのような真核microRNAの発現及び処理に必要な幾つかの必須の酵素を有していない。また、原核RNAポリメラーゼは、高度二次構造を有する低分子RNA、例えばヘアピン型pre-miRNAs及びshRNAsを効率よく転写できない。実際、細菌ゲノムでは、真のmicroRNAをコードせず、かつ細菌がmicroRNA

10

20

30

40

50

を自然に発現することができない。そのため、発明者は、ヒトmicroRNAsを原核生物に発現させることができれば、得られるmicroRNAsは、pri-miRNA（複数のpre-miRNAsの1次大クラスタ（large primary cluster））及び/又はpre-miRNA（1つの単一ヘアピンRNA）に類似する前駆構造形態を呈することを保持する可能性が最も高い。以上のすべての問題が存在しているが、眞の挑戦は、如何にヒトmicroRNAを原核生物に発現させるかである。この主な問題を克服するために、発明者の優先権出願である米国第13/572,263号には、最初の段階の方法が既に確定されている。しかし、現在、これらの原核生物により生成されるmicroRNAs（pro-miRNA）がそのヒト対応物と同じ構造及び機能を有するか否かがまだ明らかではない。また、こうして得られるpro-miRNAsは、細菌内毒素に汚染される可能性があるので、療法への直接な応用に適しない。

10

【0008】

現在の教科書から分かるように、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者にとって、原核と真核の転写メカニズムが異なり、これに起因して互いに適合しないことが周知のことである。例えば、現在の理解に基づいて、真核RNAポリメラーゼは、プロモーター配列に直接結合せず、転写を開始させるには、追加の補助タンパク質（補因子）が必要であることに対して、原核RNAポリメラーゼは、プロモーター配列に直接結合することで転写を開始させるホロ酵素を形成する。通常、真核伝令RNA（mRNA）は、RNAポリメラーゼII（pol-2）により細胞核で合成され、その後、処理されて細胞質に出力され、タンパク質の合成に用いられるが、原核RNAの転写及びタンパク質の翻訳は、同じ箇所で同じ部分のDNAにより同時に生じることも知られている。これは、原核生物、例えば細菌及び古細菌がいずれの細胞核様構造も有していないからである。したがって、これらの差異によって、原核細胞が真核プロモーターを利用して真核RNAsを製造することは難しく、ひいては不可能である。

20

【0009】

従来技術において、細菌の細胞で哺乳動物のペプチド及び/又はタンパク質を製造することを試みた。例えば、Buechlerの米国特許第7,959,926号及びMehtaの米国特許第7,968,311号には、細菌又はファージプロモーターを使用している。発現を開始させるために、所望な遺伝子を細菌又はファージプロモーターにより駆動されるプラスミドベクターにクローニングする。細菌がイントロンを処理するための如何なるRNAスプライシングメカニズムも有していないため、遺伝子は、如何なるノンコーディングイントロンも含有してはならない。そして、こうして得られるベクターを大腸菌（Escherichia coli、E. coli）のような細菌の細胞のコンピテント菌株に導入することで、遺伝子の転写物（mRNAs）を発現し、さらにmRNAsをタンパク質に翻訳する。しかし、細菌及びファージプロモーター、例えばTac、Lac、T3、T7及びSP6 RNAプロモーターは、pol-2プロモーターではなく、その転写活動の傾向は、突然変異を引き起こす間違った傾向過程である。なお、Mehtaは、グリセリン（glycerol/glycerin）が細菌の形質転換の効率を向上させるために使用可能であることをさらに教示しているが、RNA転写、特にpol-2プロモーターにより駆動される原核RNA転写を強化することに関する教示はない。真核と原核の転写システムの間には、可能な適合性がないので、このような従来技術は、依然として原核RNAプロモーターを原核生物に用いる遺伝子発現に制限される。

30

【0010】

システムの不適合性及び可能な内毒素汚染の問題に起因して、従来では、原核生物においてヒトpre-miRNA/shRNA類の薬物を製造する方法がない。また、pre-miRNA/shRNAは、約70~85個のヌクレオチドの長さであり、大きすぎて、かつコストが高すぎるので、RNA合成メカニズムにより製造できない。これらの問題を克服するために、本発明は、以下の新規な突破を提供し、即ち、幾つかの転写補因子を擬態する幾つかの明確な化学品を添加することにより、発明者は、間違った傾向の原核プロモーターを介さずに、原核細胞のために新規な適応環境を構築し、真核pol-2及び/又はpol-2類のプロモーターを所望のpre-miRNAs及びshRNAsの転写に用いることができる。この方法の利点は、以下のとおりである。

第一に、細菌の成長が速いので、経済的で大量に製造できる。第二に、専用のhESCs又はi

40

50

PSCsを成長させる必要がないので処置しやすい。第三に、pol-2プロモーターにより駆動されるRNA転写に対して、高忠実度生産性(fidelity productivity)を有する。第四に、原核生物に真のmicroRNAがないので高純度の所望のmicroRNAsを有する。最後に、内毒素がないので、幾つかの化学処理によりさらに除去できる。したがって、システムの不適合性及び内毒素汚染の問題がなく、原核細胞においてヒトpre-miRNAs及び/又はshRNAsを製造する方法は、非常に望ましい。また、こうして得られる薬物は、microRNAの現在の既知の機能以外の新規な治療効果を示すことができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

10

【特許文献1】欧州特許出願公開第2198025号明細書

【特許文献2】米国特許第7,959,926号明細書

【特許文献3】米国特許第7,968,311号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Lin SL, Chang D, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DTS, Chen DT及びYing SY. (2008) Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. RNA 14, 2115-2124

【非特許文献2】Lin SL及びYing SY. (2008) Role of mir-302 microRNA family in stem cell pluripotency and renewal. Ying SY. (Ed.) Current Perspectives in MicroRNAs. Springer Publishers press, New York, 第167-185ページ

【非特許文献3】Lin SL, Chang D, Ying SY, Leu D及びWu DTS. (2010) MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenecity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways. Cancer Res. 70, 9473-9482

【非特許文献4】Lin SL, Chang D, Lin CH, Ying SY, Leu D及びWu DTS. (2011) Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. Nucleic Acids Res. 39, 1054-1065

【非特許文献5】Takahashiら (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663--676

30

【非特許文献6】Yuら (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318, 1917-1920

【非特許文献7】Yuら (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318, 1917-1920

【非特許文献8】Wernigら (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature 448, 318-324

【非特許文献9】Wangら (2008). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. Nat. Genet. 40, 1478-1483

【発明の概要】

【0013】

本発明の原理は、原核と真核RNAの転写システムの間の差異および不適合性という特性に基づいている。自然に、原核RNAポリメラーゼは真核プロモーターを認識せず、逆も同様である。しかし、本発明は、転写誘導剤として原核生物における真核プロモーターにより駆動されるRNA転写を誘導及び/又は強化する化学剤を確認した。したがって、本発明に教示される知識は、現在の原核と真核の転写システムの間の差異についての認知を超える新しい突破である。

【0014】

本発明は、幾つかの化学誘導剤により原核生物における真核プロモーターにより駆動されるRNA転写を刺激及び/又は強化する誘導型遺伝子発現組成物に関する。これらの化学誘導剤は、その抗菌及び/又は殺菌の特性の原因でまだ細胞培地に使用されておらず、3-モ

40

50

ルフォリノプロパン-1-スルホン酸[或いは、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸；MOPSと称する]、グリセリン及びエタノール、並びにその機能類似体、例えば2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸(MES)、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)及びマンニトール(mannitol)を含む。これらの転写誘導剤のような類似する構造を有する化学品は、類似する機能を共有できることは想像できる。例えば、MOPSは、通常、細菌の細胞の分解における緩衝剤として使われ、それに起因して細菌を成長させることに適しない。一方で、エタノールは、周知の消毒剤であり、また、グリセリンは、通常、細菌の細胞壁を脱安定化することにより細菌の形質転換を行うためのものであり、グリセリンは抗菌でエタノールは殺菌であることをそれぞれ示している。MOPS、エタノール及びグリセリンの上記の既知の機能に鑑みて、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者は、本発明の知識を予め知らない場合に、微量(0.001%~4%体積/体積濃度)の上記の化学品を用いて原核細胞における真核プロモーターにより駆動される遺伝子発現を誘導することを予期できない。

10

【0015】

以上の知識に基づいて、本発明は、原核細胞によりヒトmicroRNA前駆体(pre-miRNAs)及び/又はshRNAsを癌の療法の治療薬物及び/又はワクチンとして製造する設計及び方法である。より特定的には、本発明は、原核細胞により特殊なpre-miRNA類薬剤(pro-miRNAと称する)を製造する設計及び方法であり、これらの薬剤は、ヒトの高度な癌細胞の悪性特性を低度良性、ひいては比較的に正常様状態に再プログラムできる。これらのpro-miRNAは、腫瘍抑制microRNAs(TS-miRNA)であり、miR-302a、b、c、d、e及び/又はfの前駆体(pre-miR-302s)及びその天然ファミリークラスター並びにその人工で再設計された小ヘアピンRNA(shRNA)の相同物/誘導体及び/又はその組合せに類似することが好ましい。pro-miRNA様shRNAの相同物/誘導体の設計は、pro-miRNA及びその相同性低分子干渉RNA(siRNA)の不完全及び完全マッチングのヘアピン組成物を含み、単一の単位又は複数の単位クラスターに形成することができる。これらの設計は、標的特異性を改善し、及び/又は有効な送達と療法に必要なpro-miR-302のコピー数を減少させることが可能である。このような薬物治療に適用するヒト細胞は、生体外、インビトロ及び/又は生体内の正常細胞、腫瘍細胞及び癌細胞を含む。

20

【0016】

本発明に用いられる原核細胞は、細菌コンピテントセルであり、特に大腸菌(E. coli)であり、化学誘導剤は、MOPS、エタノールやグリセリン又はその混合物であることが好ましい。使用される真核RNAプロモーターは、真核pol-2プロモーター(即ち、EF1プロモーター)又はpol-2適合(pol-2類)ウイルスプロモーター(即ち、サイトメガロウイルス(cytomegaloviral)CMVプロモーター)であることも好ましい。真核RNAプロモーター媒介遺伝子は、microRNA(miRNA)、小ヘアピンRNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、伝令RNA(mRNA)、その前駆体及び相同物並びにその組合せからなる群から選択されるノンコーディングやタンパク質コードRNA又はその両者(例えば、イントロンを含有する遺伝子転写物)をコードできる。遺伝子発現を誘導するために、真核RNAプロモーター媒介遺伝子で原核細胞のトランスフェクションを行い、そして37、化学誘導剤の添加でLuria-Bertani(LB)培養液に類似する培地に>24時間成長させる。

30

【0017】

これらの化学誘導剤が原核生物におけるヒトmicroRNAの製造を誘導できることを実証するために、発明者は、発明者の優先権出願である米国特許出願第12/149,725号及び第12/318,806号からのレンチウイルスベクターpSpRNAi-RGFP-miR302を新しいプラスミドベクター-pLenti-EF1a-RGFP-miR302に修飾し、そのSpRNAi-RGFPの遺伝子発現は、真核プロモーター、例えばEF1又はCMVにより駆動される(図1A)。そして、図1Bに示すように、発明者は、それを用いて大腸菌コンピテントセルを形質転換し、その後、赤色蛍光タンパク質(RGFP)の生成をmicroRNA miR-302の転写レート及び過程を計測する視認マークとして用いる。図5及び図6に示すように、miR-302ファミリークラスターも修飾されることでRGFP遺伝子の5'-イントロン領域[例えば、5'-非翻訳領域(5'-UTR)又は第1イントロン]にコ-

40

50

ドされるので、各RGFP mRNAの転写は、1つの4ヘアピンのmiR-302前駆体クラスター（pri-miR-302）及び/又は4つの1ヘアピンのmiR-302前駆体（pre-miR-302s）を生じるまでリードする。原核生物にRNase III Dicerがないので、pri-miR-302転写物は、最終的に（大腸菌における幾つかの一本鎖RNasesにより）1ヘアピンのpre-miR-302sに分解され、いずれも抽出され、さらに本発明において治療薬物として用いることができる。広義的には、5'-UTR及び3'-UTRは、本発明において、イントロンの一部と見なされる。

【0018】

すべてのmiR-302メンバーは、前の5'-17個（17）のヌクレオチドにおいて完全に同じ配列である5'-UAAGUGCUUC CAGUUUU-3'（SEQ. ID. NO. 3）を共有し、成熟microRNAの全長23ヌクレオチドにおいて82%を超える相同性を含有する。オンライン計算プログラムTARGETSCAN（<http://www.targetscan.org/>）及びPICTAR-VERT（<http://piptar.mdc-berlin.de/>）の予測の結果によれば、これらのmiR-302は、略同じ遺伝子を同時にターゲティングし、600種類を超えるヒト遺伝子を含む。なお、miR-302は、mir-92、mir-93、mir-200c、mir-367、mir-371、mir-372、mir-373、mir-374及びmir-520のファミリーメンバーと多種の重なる標的遺伝子も共有し、いずれも類似する機能を有することができる。これらの標的遺伝子の大部分は、初期胚の発生期間における幾つかの系譜特異的細胞分化の開始及び/又は確立に関する発育シグナル及び転写因子である（Lin氏ら，2008）。多種のこれらの標的遺伝子も周知の発癌性遺伝子であるため、miR-302sは、腫瘍抑制因子として正常なhESCの成長が腫瘍/癌の形成に偏ることを予防する可能性が高い。

【0019】

原核生物における真核プロモーターにより駆動される遺伝子発現の誘導

大腸菌（*E. coli*）コンピテントセルを、z-コンピテント大腸菌形質転換キット（Zymo Research, Irvine, CA）を用いてpLenti-EF1 -RGFP-miR302プラスミド（図1A）により形質転換し、37℃で170rpmでの頻繁攪拌下で0.1%（v/v）MOPSと0.05%（v/v）グリセリン（誘導剤）の混合物が補充されたLuria-Bertani（LB）培養液でインキュベートする。図2に示すように、一夜インキュベートした後、形質転換された大腸菌コンピテントセルは、LB培養液の色に明らかに見られるように、高度に豊富な赤色RGFPタンパク質を発現するのに対して、プランクの大腸菌は、RGFPを示していない。機能RGFPの存在から明らかのように、コードするRNA及びタンパク質の両者は、いずれもコンピテントセルにおいてうまく発生及び加工された。

【0020】

化学誘導剤に誘導される遺伝子発現の特異性をさらに実証するために、形質転換された2種類の大腸菌菌株を調製する。一つは、CMVプロモーターにより駆動される緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を含有するpLVX-Grn-miR302+367プラスミドベクターを担持し、もう一つは、前記pLenti-EF1 -RGFP-miR302ベクターを担持する。図3に示すように、0.1%（v/v）MOPSのみと共に一夜インキュベートした後、pLVX-Grn-miR302+367により形質転換された大腸菌は、緑色に変色し、pLenti-EF1 -RGFP-miR302により形質転換された大腸菌は依然として赤色を示す。この結果から明らかなように、MOPSのような化学誘導剤は、真核pol-2又はpol-2類のウイルスプロモーターを介して特異性RNAの転写及びその関連タンパク質の発生を刺激することができる。特定的には、RGFP及びGFPの生産量がこんなに豊富であるので、大腸菌の細胞がそれぞれ赤色及び緑色により染色されることさえ視認されたことに注意すべきである。

【0021】

図4に示すように、本発明でテストされるすべての化学品のうち、最も強力な誘導剤の3つは、MOPS、グリセリン及びエタノールである。図5及び実例3に示すように、さらにウェスタンプロット解析（Western blot analysis）により、誘導されるRGFPによる定量的結果を実証する。細菌RuvBタンパク質は、ハウスキーピング標準としてRGFP発現を標準化する。確認されるこれらの誘導剤の誘導性は、その濃度に比例して用量依存性を有することも見出された。如何なる処理も行っていない場合に、陰性対照の大腸菌細胞は、何の蛍光染色剤もない場合にそのオリジナルな色のみを示す。したがって、これらのすべての結果

10

20

30

40

50

によれば、本発明は、明らかに新規な化学誘導型組成物及びその原核細胞における真核pol-I-2により駆動され、又はpol-2類ウイルスプロモーターにより駆動されるRNAの発生を調節するための応用を提供する。以上の論証に基づいて、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者は、RGFP遺伝子の代わりにその他の遺伝子又は関連cDNAsを用いて原核生物において機能RNAs及び関連タンパク質を製造できることは極めて明らかである。

【0022】

原核生物における真核プロモーターにより駆動されるmicroRNA発現の誘導

以上に示すRGFP誘導の実験に従って、発明者は、化学誘導のある又はないpLenti-EF1-RGFP-miR302形質転換細胞におけるpri-/pre-miR-302s及びその成熟miR-302sの発現をさらに計測する。図6及び実例4に示すように、誘導されたpri-/pre-miR-302による定量的結果は、ノーザンプロット解析(Northern blot analysis)により既に実証された。pri-/pre-miR-302の発現は、図4及び図5におけるRGFP誘導の結果に類似し、MOPS、グリセリン又はエタノールの処理を経た形質転換細胞において大きく検知できるが、ブランクにおいて検知されていない。これは、これらの化学誘導剤が実質的に真核pol-2プロモーターを通して原核細胞におけるコードpri-/pre-miRNAsの発現を刺激することを示す(図6)。pre-miRNAsとshRNAsの構造の類似性に起因して、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者は、本発明を用いてその他のタイプのpri-/pre-miRNA種類を製造できることは明らかである。例えば、miR-34、miR-146、miR-371-373及びmiR-520が挙げられるが、それらに限定されない。明らかにするために、これらの原核生物により生じるpri-/pre-miRNAsをpro-miRNAsと称する。

【0023】

pLenti-EF1-RGFP-miR302は、RGFP遺伝子の5'-UTRに位置するmiR-302ファミリークラスター(図1A及び図1B)を含有するので、図1Bに示すように、誘導されたRGFP遺伝子発現もmiR-302クラスター(pri-miR-302)及びその誘導体pre-miR-302a、b、c及びd(pre-miR-302s)を生成する。原核生物にRNase III Dicerがないので、こうして得られるpri-miR-302及びpre-miR-302sは、ヘアピン型microRNA前駆体として保持することができ、治療薬物の開発に用いることができる事が見出された。ヒト細胞において、これらのpre-miR-302s及びpri-miR-302は、処理されて成熟miR-302となることで、その腫瘍抑制機能を引き起こすために用いることができる。同様に、本発明は、その他のタイプのTS-miRNA種類及びその前駆体の製造に用いることもできる。例えば、miR-34a、miR-146a、miR-373及びmiR-520ファミリーが挙げられる。

【0024】

得られるpro-miRNAsは、コンピメント大腸菌細胞から抽出(実例5及び6)し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりさらに精製(図10A及び図10B)することが容易である。精製されたpro-miR-302s内には、発明者は、microRNAマイクロアレイ解析(図11B及び図12)及びRNAシーケンシング[図13A(pri-miR-302)及び13B(pre-miR-302s)]を用いてすべてのmiR-302ファミリーメンバー(miR-302a、a*、b、b*、c、c*、d及びd*)を認識した。特定的には、シーケンシングの結果に示すように、これらのpro-miR-302sは、いずれもその天然pre-miR-302の対応物と完全に同じ配列(図13B)を共有する。また、生体内におけるヒト肝癌に対する治療効果を測定するために、発明者は、これらのpro-miR-302sをIV/生体内注射に用いる溶解性薬物として配合した(実例11)。図14に示すように、3回の注射処理後に、pro-miR-302薬物は、生体内に移植されたヒト肝癌の90%超の体積をうまく減少し、癌の平均サイズを、処理されていない癌に対して10%未満まで縮小させた。また、ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin & eosin、H&E)染色で組織学検査を行った結果により、この顕著な治療効果は、報告されたmiR-302の腫瘍抑制機能(Lin氏ら, 2010)だけでなく、これまでまだ発見されていないもう1つの新規な再プログラム機能にもよることがさらに示された。例えば、図15に明らかに示すように、pro-miR-302薬物は、生体内において高度なヒト肝癌の悪性特性を正常な肝組織に殆ど十分に近似した良性段階に再プログラムできる。処理されたこれらの癌は、正常な肝様構造、例えば、古典的肝小葉

10

20

30

40

50

(liver lobules)、中心静脈 (central veins , CV) 及び門脈三管 (portal triads , PT) を形成できる。したがって、これらの証拠は、pro-miR-302が腫瘍/癌細胞の成長を抑制できるだけでなく、生体内においてヒト癌の悪性を比較的に良性又は正常な状態まで回復させ、癌薬物設計の新しい治療効果をリードできることを強く示す。

【 0 0 2 5 】

本発明において、プラスミドベクター及びそのコードするノンコーディングRNAs (即ち、pre-miRNA/shRNA) の両者は、いずれも原核細胞、好ましくは大腸菌DH5[®] コンピテントセルにおいて同時に増幅することができる (実例1、5及び6) 。増幅されたpLenti-EF1 -RGFP-miR302プラスミドDNAと転写されたpri-/pre-miR-302sを分離させるための方法は、実例5及び6に記載されている。プラスミドベクター (即ち、pLenti-EF1 -RGFP-miR302) を原核細胞に送達する技術は、細胞形質転換と称され、増幅されたノンコーディングRNAs (即ち、pro-/pri-/pre-miR-302s) を真核細胞に送達する方法は、エンドサイトーシス、化学/グリセリン注入、ペプチド/リポソーム/化学媒介のトランスフェクション、電気穿孔法 (electroporation) 、遺伝子銃による貫入 (gene gun penetration) 、マイクロインジェクション、トランスポゾン/レトロトランスポゾン挿入及び/又はアデノウイルス/レトロウイルス/レンチウイルス感染からなる群から選択できる。
10

【 0 0 2 6 】

Pre-miR-302に誘導される多能性幹細胞の誘導体化

報告によれば、MiR-302は、発明者の優先権出願である米国特許出願第12/149,725号及び第12/318,806号に論証されるように、哺乳動物の体細胞をヒト胚性幹細胞 (hESC) 様誘導多能性幹細胞 (iPSCs) に再プログラムできる。これらのiPSCsを使用して多くの幹細胞の応用及び療法を設計して開発した。しかし、これらのiPSCs及びhESCsのインキュベートは、コストが極めて高くて非常に手間がかかるので、これらの多能性細胞からmiR-302及びその前駆体を集めることは困難であり、効率が低い。一方で、合成shRNAミックの製造は、pre-miR-302の製造のもう一つの可能な代替案であるが、コストが依然として極めて高い。また、合成shRNAと天然pre-miR-302の間の類似性は、十分に疑われる。これらの問題を解決するために、本発明は、簡単で安くて、原核生物においてpre-miR-302を効率よく大量に製造する方法を提供する。また、本発明の図6及び実例6に示すように、これらの原核生物により生じるpre-miR-302s (pro-miR-302s) の抽出及び精製は、比較的に簡単で経済的である。
20

【 0 0 2 7 】

実例5及び6に示すように、発明者は、pLenti-EF1 -RGFP-miR302により形質転換された大腸菌細胞を用いて大量で高品質のpLenti-EF1 -RGFP-miR302ベクター及びpro-miR-302sを製造して分離した。pLenti-EF1 -RGFP-miR302及びpro-miR-302sの両者は、いずれもiPSCsの生成に用いることができる。実例2に従って、本発明で製造されるpro-miR-302sによりヒト皮膚初代角化細胞に形質導入する際に、トランスフェクションされた角化細胞は、強いhESCマークOct4を発現するhESC様iPSCsに再プログラムされる (図7) 。図8及び実例8において、発明者は、亜硫酸塩DNAシーケンシング分析をさらに実行することにより、全体的なDNAデスマチル化が確かにOct4とSox2遺伝子の両者のプロモーター (2種類の肝心な再プログラム因子) 及びhESCマークに発生したことを示す。全体的なDNAデスマチル化及びOct4発現は、体細胞を再プログラムしてhESC様iPSCsを形成する第1ステップとして知られている (Simonsson及びGurdon, Nat Cell Biol. 6: 984-990, 2004) ので、MOPSに誘導される大腸菌細胞の抽出物から分離されたpro-miR-302sは、iPSC誘導に用いることが可能な天然pre-miR-302sと同様に有効であると実証された。したがって、pro-miR-302及びpre-miR-302は、幹細胞誘導において同じ機能を有する可能性が高い。
30

【 0 0 2 8 】

Pre-miR-302に誘導されるCD34陽性成体幹細胞の増殖及び/又は再生

MicroRNA miR-302は、哺乳動物の体細胞を胚胎幹細胞 (ESC) 様誘導多能性幹細胞 (iPSC) に再プログラムすることが見出された (Lin, 2008, 2010, 2011 ; Linの米国特許出願第12/149,725号及び第12/318,806号) 。現代再生医学を推進するために、これらのiPSC
40

10

20

30

40

50

sを使用して多種の幹細胞関連応用及び療法を開発した。しかし、miR-302は、ヒトESCsのみで大量に発見され、分化しない組織細胞では発見されない。また、ヒトESCsからmiR-302を分離することは、非常に論争的であり、コストが高くて煩わしい。これらの問題を解決するために、本発明は、簡単で安くて、迅速な誘導型の組成物及び方法を提供することにより、原核生物においてヘアピン型miR-302分子及び/又はその前駆体/相同物を大量に製造する。また、本発明の図6及び実例6に示すように、原核細胞からmiR-302及び/又はその前駆体を分離することは、比較的に簡単で経済的である。

【0029】

実例5及び6に示すように、発明者は、pLenti-EF1 -RGFP-miR302により形質転換された大腸菌細胞を用いて大量で高品質のpLenti-EF1 -RGFP-miR302ベクター及びpre-miR-302sを製造して分離した。発明者の従来の米国特許出願第12/149,725号及び第12/318,806号に基づいて、pLenti-EF1 -RGFP-miR302を使用することにより、ヒトESC様iPSCsを生じることができることが示された。また、発明者の先行研究(Lin氏ら, 2008、2010及び2011)に論証されるように、こうして得られるiPSCsは、さらに各種の体組織細胞に分化することができる。

【0030】

分離されたmiR-302及び/又はpre-miR-302分子の応用は、CD34陽性成体幹細胞の誘導及び増殖をさらに含むことができる。図17A及び図17Bに示すように、新規なmiR-302配合薬物を用いる傷口治癒療法及び癌療法の発明者の最近の研究に示すように、比較的に低い濃度(50-500 μg/mL)の分離されたmiR-302/pre-miR-302分子の処理は、傷跡のない傷口の治癒を極めて強化するだけでなく、生体内で豚の皮膚において傷が付いた領域の周囲のCD34陽性成体幹細胞の増殖を誘導する。図17BのmiR-302処理(miR-302s/pre-miR-302s + 抗生物質軟膏)の結果と図17Aの対照(抗生物質軟膏のみ)結果の比較に基づいて、miR-302処理の後に、生体内のCD34陽性成体幹細胞群(緑色蛍光抗体でマークされた)は、40倍以上増加したことを明らかに示している。現在、既知のCD34陽性成体幹細胞のタイプは、皮膚、毛髪、筋肉、血液(造血)、間質細胞(mesenchymal)及び神経幹細胞を含むが、それらに限定されない。そのため、miR-302は、生体内においてCD34陽性成体幹細胞の増殖及び/又は再生を誘導するために用いることができる。この治療効果は、機能性成体幹細胞を再成長及び/又は再生させることでヒトの退行性疾患を治療することに役立つこともできる。退行性疾患としては、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、骨粗鬆症、糖尿病及び癌が挙げられるが、それらに限定されない。

【0031】

生体内腫瘍/癌療法へのpro-miR-302の応用

発明者の先行研究には、この方法が生体内ではなく生体外でヒト肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)のHepG2細胞を処理する実行可能性が論証された(Lin氏ら, 2010)。図9に示すように、処理された腫瘍/癌細胞は、iPSCs(mirPS-HepG2とマークされる)に再プログラムされ、胚様体様細胞群を形成する。また、miR-302は、処理された癌細胞群における95%を超えるアポトーシスを誘導できることも見出された。図9の一番上の図は、DNA含有量が細胞周期段階に応じるフローサイトメトリー分析をさらに示し、miR-302処理の後に有糸分裂細胞群が顕著に減少した(45.6%から17.2%まで)ことを示す。これらの結果から明らかなように、miR-302は、ヒト肝癌細胞の速やかな細胞周期速度を効果的に低減させ、それによりこれらの癌細胞の顕著なアポトーシスを引き起こすことができる。

【0032】

癌進行の過程は、遺伝子突然変異の累積に起因して、不可逆と見なされるが、本発明には、生体内に高度悪性の癌を低度良性、ひいては正常様段階まで再プログラムできる新規なpre-miRNA(pro-miR-302)機能が提供され、そのメカニズムは、極めて稀で癌の自然退縮(spontaneous cancer regression)と称される自然治癒過程に関連することができる。癌の自然退縮は、癌患者100,000名のうち1人未満の割合で稀に現われる。発明者は、pro-miR-302治療がヒト肝癌においてこの稀な治癒割合を90%超まで増加させることができるを見出した。図14に示すように、pro-miR-302sを薬物としてSCID-ベージュヌードマ

10

20

30

40

50

ウス ($n=6$) におけるヒト肝癌異種移植植物を処理する治療の結果は、このpro-miR-302薬物が癌のサイズを $728 \pm 328\text{mm}^3$ (未処理のプランク、C) から $75 \pm 15\text{mm}^3$ (pro-miR-302に処理されたもの、T) までうまく減小させたことを実証し、癌の平均サイズが約90%減少し、その他の合成siRNAミミック (siRNA-302) による処理は、類似する治療効果をいっさい提供していないことを示す。

【0033】

さらなる組織学検査 (図14の一番右の図) に示すように、正常な肝小葉様構造 (丸付けされ、黒い矢印で示す) は、pro-miR-302により処理された癌の移植植物のみに観察され、その他の処理又は対照には観察されていない。これは、再プログラムメカニズムが発生して悪性の癌細胞の特性を比較的に正常様状態まで回復した (癌の逆転) ことを示す。この新規な再プログラムメカニズムは、ヒト発癌性遺伝子、特に癌進行に関与する突然変異発癌性遺伝子に対するmiR-302の遺伝子サイレンシング効果により発生する可能性が高い。これらの突然変異発癌性遺伝子をサイレンシングさせることにより、pro-miR-302は、癌遺伝子の発現パターンを正常様状態まで回復し、これにより、癌の逆転の治療結果を生じることができる。しかし、Oct4陽性多能性細胞が認識されていないことから、この生体内の再プログラムメカニズムは、従来に報告される体細胞の再プログラムと異なることは明らかである (Lin氏ら, 2008及び2011)。

10

【0034】

より詳細な組織学検査 (図15) は、pro-miR-302薬物が確かに高度 (IV度) なヒト肝癌移植植物をより良性の低度 (II度より低い) 状態まで再プログラムしたことをさらに実証している。図15に示すように、処理された癌の移植植物は、中心静脈 (CV) 様及び門脈三管 (PT) 様構造 (黒い矢印で示す) を含む古典的肝小葉を形成し、正常な肝組織の構造に極めて類似している (一番上の図)。生体内の未処理のヒト肝癌移植植物、siRNAにより処理されたヒト肝癌移植植物、pro-miR-302により処理されたヒト肝癌移植植物及び正常な肝組織の間の組織学比較 (図16) は、未処理の移植されたヒト肝癌 (一番上の図) が侵襲的に周囲の正常な組織 (例えば、筋肉及び血管) に侵入し、大規模な細胞-細胞及び癌-組織の融合構造を形成したことも示し、その高度悪性及び転移を実証している。siRNAミミック (siRNA-302) による処理は、移植された肝癌の悪性を顕著に低減させず (中上の図)、これは、生体内におけるsiRNAの短い半減期に起因する可能性が高い。それに対して、pro-miR-302処理は、移植された癌細胞を正常な肝細胞様形態に再プログラムした (融合がない) だけでなく、何れかの癌の周囲の組織への侵入をうまく抑制した (中下の図)。正常な肝組織 (一番下の図) と比べると、pro-miR-302により処理された癌は、肝小葉に類似する構造、正常な腺細胞様構成、並びに細胞-細胞及び癌-組織の結合部位の間の極めて明らかな境界 (黒い矢印) を明らかに示し、これは、処理されたこれらの癌の悪性が極めて良性の状態まで大幅に低下したことを示す。pro-miR-302薬物によりさらに6~10回連続的に処理すると、6個のサンプル ($n=6$) の全てにおける癌異種移植植物を完全に無くすことができる。

20

30

【0035】

A. 定義

本発明について理解しやすくするために、幾つかの用語は、以下のように定義される。

40

ヌクレオチド：糖部分 (ペントース)、リン酸基 (phosphate) 及び窒素含有複素環塩基 (nitrogenous heterocyclic base) から構成されるDNA又はRNAの単量体単位である。当該塩基は、グリコシド炭素 (glycosidic carbon) (ペントースの1番目の炭素) を介して糖部分と結合され、塩基と糖の組合せは、ヌクレオシド (nucleoside) である。リン酸基を少なくとも1つ含有してペントースの3端又は5端に結合するヌクレオシドは、ヌクレオチドになる。デオキシリボ核酸 (DNA) 又はリボ核酸 (RNA) は、それぞれ異なるタイプのヌクレオチド単位、即ち、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドから構成される。

【0036】

オリゴヌクレオチド (Oligonucleotide) : 2個以上、好ましくは3個より多く、一般的

50

に10個より多いデオキシリボ核酸（DNAs）及び/又はリボ核酸（RNAs）から構成される分子である。13個のヌクレオチド単量体より長いオリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドとも称される。オリゴヌクレオチドの正確な長さは、多くの要素に依存し、当該オリゴヌクレオチドの最終的な機能又は用途により決める。オリゴヌクレオチドは、何れかの方法により生じることができ、この方式は、化学合成、DNA複製、RNA転写、逆転写又はその組合せを含む。

【0037】

ヌクレオチド類似体：プリン又はピリミジンヌクレオチドであり、その構造がアデニン（A）、チミン（T）、グアニン（G）、シトシン（C）又はウラシル（U）と異なるが、核酸分子における正常なヌクレオチドを置換できるほど十分に類似している。

10

【0038】

核酸組成物：核酸組成物は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを指し、例えば、一本鎖又は二本鎖分子構造を呈するDNA又はRNA配列、又はDNA/RNA混合配列が挙げられる。

【0039】

遺伝子：そのオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列がRNA及び/又はポリペプチド（タンパク質）をコードする核酸組成物である。遺伝子は、RNA又はDNAであってもよい。遺伝子は、ノンコーディングRNA、例えば、小ヘアピンRNA（shRNA）、microRNA（miRNA）、rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA及びそのRNA前駆体と誘導体をコードできる。或いは、遺伝子は、タンパク質/ペプチド類の合成に必要なタンパク質コードRNA、例えば伝令RNA（mRNA）及びそのRNA前駆体と誘導体をコードできる。場合によって、遺伝子は、少なくとも1つのmicroRNA又はshRNA配列も含むタンパク質コードRNAをコードできる。

20

【0040】

一次RNA転写物：何のRNA処理又は修飾も受けていなく遺伝子から直接転写されるRNA配列であり、mRNA、hnRNA、rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA、pre-microRNA、ウイルスRNA及びそのRNA前駆体と誘導体からなる群から選択できる。

【0041】

伝令RNA前駆体（pre-mRNA）：タンパク質コーディング遺伝子の一次RNA転写物であり、真核RNAポリメラーゼII（Pol-II）メカニズムによって真核生物において転写と称される細胞内メカニズムにより生じる。pre-mRNA配列は、5'非翻訳領域（UTR）、3'-UTR、エキソン及びインtronを含む。

30

【0042】

インtron：非タンパク質リードィングフレームをコードする遺伝子転写配列の一部又は複数の部分であり、例えば、インフレームインtron、5'-UTR及び3'-UTRが挙げられる。

【0043】

エキソン：タンパク質リードィングフレームをコードする遺伝子転写配列（cDNA）の一部又は複数の部分であり、例えば、細胞遺伝子、成長因子、インシュリン、抗体及びその類似体/相同物並びに誘導体に用いるcDNAが挙げられる。

40

【0044】

伝令RNA（mRNA）：pre-mRNAエキソンの集まりであり、インtronにおいて細胞内RNAスプライシングメカニズム（スプライソソーム）により除去された後に形成され、ペプチド類/タンパク質の合成に用いるタンパク質コードRNAとして使用される。mRNAsによりコードされるペプチド類/タンパク質は、酵素、成長因子、インシュリン、抗体及びその類似体/相同物並びに誘導体を含むが、それらに限定されない。

【0045】

相補的DNA（cDNA）：mRNA配列と相補する配列を含み、何れのインtron配列も含んでいない一本鎖又は二本鎖DNAである。

センス：相同mRNAと同じ配列順序及び組成を呈する核酸分子である。センス構造形態は、「+」、「s」又は「センス」という符号で示す。

50

【0046】

アンチセンス：各mRNA分子と相補的な核酸分子である。アンチセンス構造形態は、「-」又は「*」という符号で示し、或いは、DNA又はRNAの前に「a」又は「アンチセンス」をつけて示し、例えば、「aDNA」又は「aRNA」が挙げられる。

【0047】

塩基対 (bp)：二本鎖DNA分子におけるアデニン (adenine、A) とチミン (thymine、T)、又はシトシン (cytosine、C) とグアニン (guanine、G) の対関係 (partnership) である。RNAにおいて、ウラシル (uracil、U) がチミン (thymine、T) を置換する。一般的には、対関係 (partnership) は、水素結合により実現される。

【0048】

塩基対 (bp)：二本鎖DNA分子におけるアデニン (adenine、A) とチミン (thymine、T)、又はシトシン (cytosine、C) とグアニン (guanine、G) の対関係 (partnership) である。RNAにおいて、ウラシル (uracil、U) がチミン (thymine、T) を置換する。一般的には、対関係 (partnership) は、水素結合により実現される。例えば、センスヌクレオチド配列「5'-A-T-C-G-U-3'」は、そのアンチセンス配列「5'-A-C-G-A-T-3'」と完全な塩基対関係を形成することができる。

【0049】

5'-端：連続ヌクレオチドの5'位置にヌクレオチドを有していない末端であり、そのうちの1つのヌクレオチドの5'-ヒドロキシが、リン酸ジエステルにより次のヌクレオチドの3'-ヒドロキシに結合される。他の基、例えば1つ又は複数のリン酸エステルは、当該末端に存在してもよい。

10

20

【0050】

3'-端：連続ヌクレオチドの3'位置にヌクレオチドを有していない末端であり、そのうちの1つのヌクレオチドの5'-ヒドロキシが、リン酸ジエステルにより次のヌクレオチドの3'-ヒドロキシに結合される。当該末端には、他の官能基が存在してもよく、ヒドロキシ基が最も通常のものである。

30

【0051】

テンプレート：核酸ポリメラーゼにより複製された核酸分子である。テンプレートは、ポリメラーゼに応じて一本鎖、二本鎖又は部分二本鎖であってもよい。合成されたコピーは、テンプレート、二本鎖又は部分二本鎖テンプレートの少なくとも一本鎖と相補的である。RNA及びDNAの両者は、いずれも5'から3'の方向に合成される。核酸二本鎖体の二本の鎖が、この二本の鎖の5'端が当該二本鎖体の反対端にある（必然的に、3'末端も同様である）ように常に整列されている。

【0052】

核酸テンプレート：二本鎖DNA分子、二本鎖RNA分子、ハイブリッド分子であり、例えば、DNA-RNA又はRNA-DNAハイブリッド、或いは一本鎖DNA又はRNA分子である。

40

保存 (Conserved)：ヌクレオチド配列が、予備選択される（参考用）配列の正確な相補物 (exact complement) と非ランダムにハイブリダイズする場合、当該ヌクレオチド配列は当該予備選択される配列に対して保存されている。

【0053】

相同又は相同性：ポリヌクレオチドと遺伝子又はmRNA配列との間の類似性を示す用語である。例えば、核酸配列は、特定の遺伝子又はmRNA配列と一部的に、又は完全に相同的であってもよい。相同性は、類似するヌクレオチド数の全ヌクレオチド数を占める百分率で示してもよい。

【0054】

相補 (Complementary又はComplementarity又はComplementation)：前記塩基対の規則 (「base pair (bp)」rule) により結合され、2つのポリヌクレオチドの間に介在するマッチング塩基対（即ち、mRNAとcDNAの配列）を示すための用語である。例えば、配列「5'-A-G-T-3'」は、配列「5'-A-C-T-3'」及び「5'-A-C-U-3'」と相補的である。相補性は、2本のDNA鎖、一本のDNAと一本のRNA鎖又は2本のRNA鎖の間に存在してもよい。相補性は

50

、「部分的 (partial)」であってもよく、或いは、「完全 (complete)」又は「全体的 (total)」であってもよい。幾つかの核酸塩基のみが塩基対合規則によりマッチングされるときに、部分的相補性 (partial complementarity 又は complementation) が現われる。核酸鎖の間に塩基が完全又は完璧にマッチングされるときに、完全又は全体的相補 (complete or total complementarity or complementation) が現われる。核酸鎖の間の相補性の度合いは、核酸鎖の間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に顕著に影響する。これは、増幅反応及び核酸の間の結合に応じて決める検知方法に特に重要である。相補率 (percent complementarity 又は complementation) は、当該核酸の一本の鎖のうちミスマッチ (mismatch) 塩基数の全塩基を占める割合を指す。そのため、50%相補性は、半分の塩基がミスマッチで半分の塩基がマッチングであることを意味する。核酸の2本の鎖の塩基数が異なっても、2本の鎖は、相補することができる。この場合に、相補は、長い鎖の一部と短い鎖の間に発生し、長い鎖の当該部分の鎖には、短い鎖の塩基と対応する塩基に対応する塩基がある。

10

【0055】

相補的塩基：DNA又はRNAが二本鎖構成を呈する時に、正常に対合するヌクレオチドである。

相補的ヌクレオチド配列 (Complementary Nucleotide Sequence)：一本鎖DNA又はRNA分子の一つのヌクレオチド配列であり、もう一つの1本鎖分子のヌクレオチド配列と十分に相補的であるので、2本の鎖の間が対応する水素結合により特異的にハイブリダイズする。

20

【0056】

ハイブリダイズ (Hybridize 及び Hybridization)：充分に相補的で塩基対合を介して複合体を形成するヌクレオチド配列の間に二本鎖体を形成する。プライマー（又はスプライシングテンプレート）とターゲット（テンプレート）とが「ハイブリダイズ」する時、これらの複合体（又はハイブリッド）が十分に安定してDNAポリメラーゼによるDNA合成開始に必要なプライミング機能 (priming function) を提供する。2本の相補的ポリヌクレオチドの間には、競争的に阻害される (competitively inhibited) 特異的な、即ち非ランダム的な相互作用 (interaction) を有する。

【0057】

転写後遺伝子サイレンシング (Posttranscriptional Gene Silencing)：標的遺伝子の mRNA分解又は翻訳抑制の段階でのノックアウト (knockout) 又はノックダウン (knockdown) 効果であり、通常、外來/ウイルスDNA又はRNAトランスジーン (transgenes) 又は低分子抑制性RNAsのいずれかにより引き起こされる。

30

【0058】

RNA干渉 (RNAi)：真核生物における転写後遺伝子サイレンシングメカニズムであり、低分子抑制性RNA分子、例えば、microRNA (miRNA)、小ヘアピンRNA (shRNA) 及び低分子干渉RNA (siRNA) により引き起こされる。これらの低分子RNA分子は、通常、遺伝子サイレンサーとして、低分子RNAsと完全又は部分的に相補的な細胞内遺伝子の発現を干渉する。

【0059】

遺伝子サイレンシング効果：遺伝子機能が抑制された後の細胞反応であり、細胞周期減衰 (cell cycle attenuation)、G0/G1チェックポイント停止 (G0/G1-checkpoint arrest)、腫瘍抑制、抗腫瘍形成 (anti-tumorigenecity)、癌細胞のアポトーシス、及びその組合せを含むが、それらに限定されない。

40

【0060】

ノンコーディングRNA：細胞内翻訳メカニズムによりペプチド類又はタンパク質を合成できないRNA転写物である。ノンコーディングRNAは、長い及び短い調節性RNA分子、例えば、microRNA (miRNA)、小ヘアピンRNA (shRNA)、低分子干渉RNA (siRNA) 及び二本鎖RNA (dsRNA) を含む。これらの調節性RNA分子は、通常、遺伝子サイレンサーとして、ノンコーディングRNAと完全又は部分的に相補的な細胞内遺伝子の発現を干渉する。

50

【0061】

MicroRNA (miRNA) : microRNAの配列と部分的に相補的な標的遺伝子転写物 (mRNAs) に結合することが可能な一本鎖RNAである。成熟microRNAの通常の長さは、約17~27個のオリゴヌクレオチドの長さであり、microRNAとその標的mRNA(s)の間の相補性に応じて細胞内のmRNA標的を直接分解し、或いは、ターゲティングされるmRNAのタンパク質翻訳を抑制することができる。天然microRNAsは、ほとんどすべての真核生物に発見され、ウイルス感染に対する防御の役割を果たし、植物及び動物の発育期間に特異性遺伝子発現を調節することができる。原則的には、一つのmicroRNAは、通常、複数の標的mRNAsをターゲティングしてそのすべての機能を実現する一方で、複数のmiRNAsは、同じ遺伝子転写物をターゲティングして遺伝子サイレンシングの効果を強化することができる。

10

【0062】

MicroRNA前駆体 (Pre-miRNA) : ステム・アーム及びステム・ループ領域を含むヘアピン型一本鎖RNAであり、細胞内RNase III Dicerリボ核酸エンドヌクレアーゼと相互作用することで、成熟microRNAの配列と完全又は部分的に相補的な標的遺伝子又は標的遺伝子の特定基をサイレンシングさせることができると又は複数の成熟microRNAs (miRNAs) を生じるためのものである。pre-miRNAのステム・アームは、完璧 (100%) 又は部分 (ミスマッチ) 的にハイブリッドする二本鎖体を形成することができ、ステム・ループは、ステム・アーム二本鎖体の一端に連結され、幾つかのアルゴノートタンパク質 (AGO) と共にRNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) に組み立てるのに必要な環状又はヘアピン-環構造形態を形成する。

20

【0063】

原核生物によるMicroRNA前駆体 (Pro-miRNA) : 天然microRNA前駆体 (pre-miRNA) に類似するが、原核コンピテントセルにおいて、真核プロモーターにより駆動され、人工的組み替えmicroRNAの発現プラスミドから転写される小ヘアピン型RNAである。例えば、pro-miR-302は、構造的にpre-miR-302と同じであるが (図13A及び図13B) 、大腸菌DH5⁺コンピテントセルにおいて、pLVX-Grn-miR302+367又はpLenti-EF1⁻-RGFP-miR302ベクターから転写される (実例1)。原核細胞は、一般的に、高二次構造を有する短いRNA、例えば真核pre-miRNAを発現しないので、原核生物においてpro-miRNAを生じるには、通常、真核プロモーターにより駆動されるpre-miRNA転写を刺激するために化学誘導剤を添加する必要がある (図2~図4)。

30

【0064】

低分子干渉RNA (siRNA) : 完璧に塩基対合する約18~27個のリボヌクレオチド二本鎖体の長さであり、殆ど完璧な相補性を有する標的遺伝子の転写物を分解できる短い二本鎖RNAである。

【0065】

小又は短ヘアピンRNA (shRNA) : 一対のマッチングされていないサイクリックオリゴヌクレオチドで区切られてヘアピン型構造を形成する部分的又は完全にマッチングするステム・アームヌクレオチド配列を含む一本鎖RNAである。多種の天然miRNAsは、ヘアピン型RNA前駆体、即ち、前駆microRNA (pre-miRNA) から誘導される。

【0066】

ベクター : 異なる遺伝子環境で移動及び滞在できる組み替え核酸組成物であり、例えば、組み替えDNA (rDNA) が挙げられる。一般的には、別の核酸は、操作可能にそれに連結されている。ベクターは、細胞において自己複製でき、この場合には、ベクター及び連結されるセグメントが複製される。好ましいタイプのベクターは、エピソーム、即ち、染色体外での複製が可能な核酸分子である。好ましいベクターは、自己複製、核酸の発現が可能なベクターである。一つ又は複数のポリペプチドをコードする遺伝子及び/又はノンコーディングRNAの発現を誘導できるベクターは、本文において「発現ベクター」又は「発現コンピテントベクター」と称される。特に重要なベクターは、逆転写酵素を使用して、生成されたmRNAsからcDNAをクローニングできる。ベクターは、ウイルスプロモーター又はRNAポリメラーゼII (Pol-II又はpol-2) プロモーター又はその両者、Kozakコンセンサス翻

40

50

訳開始位 (Kozak consensus translation initiation site)、ポリアデニル化シグナル (polyadenylation signals)、複数の制限/クローニングサイト (restriction/cloning site)、pUC複製開始点 (pUC origin of replication)、複製コンピテント原核細胞において少なくとも一つの抗生物質薬剤耐性遺伝子を発現するためのSV40初期プロモーター (SV40 early promoter)、哺乳動物細胞において複製するための選択性SV40開始点、及び/又はテトラサイクリン応答因子 (tetracycline responsive element) からの成分を含んでもよい。ベクターの構造は、線形又は環形の一本鎖又は二本鎖DNAであってもよく、プラスミド、ウイルスベクター、トランスポゾン、逆トランスポゾン、DNAトランスジーン (DNA transgene)、ジャンピング遺伝子 (jumping gene)、及びその組合せからなる群から選択される。

10

【0067】

プロモーター (Promoter)：ポリメラーゼ分子に認識され、又はそれに結合してRNA転写を開始させる核酸である。本発明の目的に応じて、プロモーターは、周知のポリメラーゼ結合サイト、エンハンサー及びその類似体、並びに必要なポリメラーゼによりRNA転写物の合成を開始させることができるものである。

【0068】

真核プロモーター：RNA及び/又は遺伝子の転写に必要なものであって、真核RNAポリメラーゼII (pol-II)、pol-IIの等価物及び/又はpol-II適合性 (pol-II類) ウィルスポリメラーゼにより認識可能な、RNA/遺伝子転写を開始させるための核酸モチーフの配列である。

20

【0069】

RNAポリメラーゼII (Pol-II又はpol-II) プロモーター：真核RNAポリメラーゼII (Pol-II又はpol-II) により認識でき、これにより真核伝令RNAs (mRNAs) 及び/又はmicroRNAs (miRNAs) の転写を開始させることができるRNAプロモーターである。例えば、pol-IIプロモーターは、哺乳動物RNAプロモーター又はサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターであってもよいが、それに限定されない。

【0070】

RNAポリメラーゼII (Pol-II又はpol-II) 等価物：哺乳動物RNAポリメラーゼII (Pol-II又はpol-II) 及びPol-II適合性 (pol-II類) ウィルスRNAポリメラーゼからなる群から選択される真核転写メカニズムである。

30

【0071】

Pol-II適合性 (pol-II類) ウィルスプロモーター：真核pol-II又はpol-II等価物転写メカニズムにより遺伝子及び/又はRNA発現を開始させることができるウィルスRNAプロモーターである。例えば、pol-II類ウィルスプロモーターは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター又はレトロウイルス長末端反復配列 (LTR) プロモーターであってもよいが、それに限定されない。

【0072】

シストロン：DNA分子において、アミノ酸の残基配列をコードし、上流及び下流DNA発現制御因子を含むヌクレオチド配列である。

イントロン切除：RNAの処理、成熟及び分解の役割を果たす細胞メカニズムであり、RNAスプライシング、エクソソーム消化、ナンセンス変異依存分解 (NMD) 処理及びその組合せを含む。

40

【0073】

RNA処理 (RNA processing)：細胞内メカニズムであり、RNAの成熟、修飾、及び分解の役割を果たし、RNAスプライシング、イントロン切除、エクソソーム消化 (exosome digestion)、ナンセンス変異依存分解 (nonsense-mediated decay、NMD)、RNAエディティング、RNA処理及びその組合せを含む。

【0074】

標的細胞：体細胞、組織、幹細胞、生殖系細胞、奇形腫細胞、腫瘍細胞、癌細胞及びその組合せからなる群から選択される单一又は複数のヒト細胞である。

癌組織：皮膚癌、前立腺癌、乳癌、肝癌、肺癌、脳腫瘍/脳癌、リンパ腫、白血病及び

50

その組合せからなる群から誘導される新生物性組織 (neoplastic tissue) である。

【0075】

発現コンピテントベクター：プラスミド、ウイルスベクター、トランスポゾン、レトロトランスポゾン、DNAトранスジーン、ジャンピング遺伝子及びその組合せからなる群から選択される線形又は円形の一本鎖又は二本鎖DNAである。

【0076】

抗生物質抗性遺伝子：ペニシリンG (penicillin G)、ストレプトマイシン (streptomycin)、アンピシリン (ampicillin (Amp))、ネオマイシン (neomycin)、G418、カナマイシン (kanamycin)、エリスロマイシン (erythromycin)、パロマイシン (paromycin)、フォフォマイシン (phophomycin)、スペクチノマイシン (spectromycin)、テトラサイクリン (tetracycline (Tet))、ドキシサイクリン (doxycycline (Dox))、リファンピシン (rifapicin)、アムホテリシン素B (amphotericin B)、ゲンタマイシン (gentamycin)、クロラムフェニコール (chloramphenicol)、セファロチニン (cephalothin)、タイロシン (tylosin) 及びその組合せからなる群から選択される抗生物質を分解できる遺伝子である。

10

【0077】

制限/クローニングサイト：酵素分解を制限するためのDNAモチーフであり、AatII、AccI、AflII/III、AgeI、ApaI/LI、Asel、Asp718I、BamHI、Bbel、BclI/II、BgIII、BsmI、Bsp120I、BspHI/LU11I/120I、Bsrl/BI/GI、BssHII/SI、BstBI/U1/XI、ClaI、Csp6I、DpnI、DraI/II、EagI、Ecl136II、EcoRI/RII/47III/RV、Ehel、FspI、HaeIII、Hhal、HinPI、HindIII、HinfI、HpaI/II、KasI、KpnI、MaeI/III、MfeI、MluI、Mscl、MseI、NaeI、NarI、NcoI、NdeI、NgoMI、NotI、NruI、NsI、PmlI、Ppu10I、PstI、PvuI/II、RsaI、SacI/II、SalI、Sau3AI、SmaI、SnaBI、SphI、SspI、StuI、TaqI、XbaI、XhoI、XmaIの分解サイトを含むが、それらに限定されない。

20

【0078】

遺伝子送達：ポリソーム (polysomal) トランスフェクション、リポソーム (liposomal) トランスフェクション、化学トランスフェクション、電気穿孔法、ウイルス感染、DNA組み替え、トランスポゾン挿入、ジャンピング遺伝子挿入、マイクロインジェクション、遺伝子銃による貫入、及びその組合せからなる群から選択される遺伝子工学方法である。

30

【0079】

遺伝子工学：DNAの制限酵素反応と接合反応、相同性遺伝子の組替え、トランスジーンの組み込み、トランスポゾンの挿入、ジャンピング遺伝子の組み込み、レトロウイルス感染、及びその組合せからなる群から選択されるDNA組替え方法である。

【0080】

細胞周期調節因子：細胞分裂及び増殖速度の制御に関する細胞遺伝子であり、CDK2、CDK4、CDK6、サイクリン、BMI-1、p14/p19Arf、p15Ink4b、p16Ink4a、p18Ink4c、p21Cip1/Waf1及びp27Kip1及びその組合せを含むが、それらに限定されない。

40

【0081】

腫瘍抑制効果：細胞の抗腫瘍及び/又は抗癌メカニズム及び反応であり、細胞周期減衰、細胞周期停止、腫瘍細胞成長の抑制、細胞の腫瘍発生性の抑制、腫瘍/癌細胞の形質転換の抑制、腫瘍/癌細胞のアポトーシスの誘導、正常な細胞の回復の誘導、高度悪性な癌細胞からより良性の低度状態への再プログラム（腫瘍の消退）及びその組合せを含むが、それらに限定されない。

【0082】

癌治療効果：薬物治療により生じる細胞反応及び/又は細胞メカニズムであり、発癌性遺伝子発現の抑制、癌細胞増殖の抑制、癌細胞の侵入及び/又は遷移の抑制、癌転移の抑制、癌細胞死の誘導、腫瘍/癌形成の予防、癌再発の予防、癌進行の抑制、損傷組織の細胞修復、高度悪性な癌からより良性の低度状態への再プログラム（癌の消退/緩和）及びその組合せを含むが、それらに限定されない。

50

【0083】

遺伝子サイレンシング効果：遺伝子機能が抑制された後の細胞反応であり、発癌性遺伝子発現の抑制、細胞増殖の抑制、細胞周期停止、腫瘍の抑制、癌の消退、癌の予防、細胞のアポトーシス、細胞の修復及び/又は回復、細胞の再プログラム、病気細胞から比較的に正常な状態への再プログラム（自発的な治癒）及びその組合せを含むが、それらに限定されない。

【0084】

癌の逆転：生体外、インビトロ又は生体内において高度な癌の悪性特性を比較的に正常様低度状態へ回復させる再プログラムメカニズムである。

標的細胞：体細胞、組織、幹細胞、生殖系細胞、奇形腫細胞、腫瘍細胞、癌細胞及びその組合せからなる群から選択される單一又は複数のヒト細胞である。

10

【0085】

癌組織：皮膚癌、前立腺癌、乳癌、肝癌、肺癌、脳腫瘍/脳癌、リンパ腫、白血病及びその組合せからなる群から誘導される新生物性組織である。

転写誘導剤：原核細胞においてpol-2又はpol-2類プロモーターにより真核RNA及び/又は遺伝子転写を誘導及び/又は強化できる化学剤である。例えば、転写誘導剤は、MOPS、エタノール、グリセリン及びその機能類似体、例えば、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸(MES)、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)及びマンニトール又はその混合物に類似する化学構造を含むが、それらに限定されない。

【0086】

抗体：予備選択される保存ドメイン構造を有し、予備選択されるリガンドに結合可能な受容体をコードするペプチド類又はタンパク質分子である。

20

医薬及び/又は治療応用：診断、幹細胞の生成、幹細胞の研究及び/又は療法の開発、組織/器官の修復及び/又は回復、傷口の治癒処理、腫瘍の抑制、癌の治療及び/又は予防、疾患の治療、薬物の製造及びその組合せに用いられる生物医学的用途、装置及び/又は設備である。

【0087】

B. 組成物及びその応用

生体外、インビトロ及び生体内においてヒト癌の悪性特性を低度良性又は正常様状態に再プログラムできる原核生物により生じる新規なmicroRNA前駆体(pro-miRNAs)を製造する組成物及び方法であり、当該組成物は、(a)3-モルフォリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)、エタノールやグリセリン又はその混合物に類似する構造を含有する少なくとも一つの化学誘導剤と、(b)真核pol-2及び/又はpol-2類プロモーターにより駆動される転写を介した少なくとも一つのpre-miRNAコーディング遺伝子を含む複数の原核細胞と、を含み、(a)及び(b)は、原核細胞内にコードされるpre-miRNAを生じるように、当該遺伝子発現が誘導される条件で混合される。化学誘導剤は、原核生物における真核プロモーターにより駆動されるRNA転写を刺激できることに注意しなければならない。

30

【0088】

原則的には、本発明は、間違った傾向の原核プロモーターを使用したり、手間がかかり、かつコストが高いハイブリドーマ又は哺乳動物細胞をインキュベートする必要がなく、原核生物の迅速な適応を誘導することで真核pol-2及びpol-2類プロモーターを使用して特定の必要なmicroRNA前駆体(pre-miRNA)を直接発現するための新規な組成物の設計及びその適用可能な策路を提供する。

40

【0089】

当該原核生物は、細菌細胞の菌株、特に大腸菌(E. coli)であり、当該化学誘導剤は、3-モルフォリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)、エタノールやグリセリン又はその混合物であることが好ましい。当該真核プロモーターは、EF1のような真核pol-2プロモーター、又はサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター又はレトロウイルスの長末端反復配列(LTR)プロモーターのようなpol-2適合性(pol-2類)ウイルスプロモーターであることも好ましい。当該真核プロモーターを介したpre-miRNAコーディング遺伝子は、ノンコーディングやタンパク質コードRNA転写物又はその両者(例えば、イントロンを含む遺伝

50

子転写物)をコードする。ノンコーディングやタンパク質コードRNA転写物又はその両者(例えば、イントロンを含む遺伝子転写物)は、microRNA(miRNA)、小ヘアピンRNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、伝令RNA(mRNA)及びその前駆体並びにshRNA/siRNA相同物及びその組合せからなる群から選択される。タンパク質コードRNAは、遺伝子コーディング酵素、成長因子、抗体、インシュリン、ボツリヌストキシン(botox)、機能タンパク質及び/又はその類似体並びにその組合せからなる群から選択できるが、それらに限定されない。当該pre-miRNAコーディング遺伝子の発現を誘導するための当該条件は、細菌インキュベート条件であり、例えば、37℃で前記化学誘導剤が添加されたLuria-Bertani(LB)培養液であることが好ましい。

【0090】

10

本発明又は出願書類は、少なくとも一つのカラーグラフを含む。申請して必要な費用を

払った後、USPTOは、カラーグラフを有する本発明又は特許公開出願のコピーを提供する。

【0091】

本発明を説明するために、図面を特別に参考するが、本発明を限定するものではない。以下のように説明する

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1A及び図1Bは、真核プロモーターにより駆動される発現ベクター組成物(1A)及び原核生物においてRNA転写物及び/又はタンパク質の発生に用いるその発現メカニズム(1B)を示す。本発明を検証するために、新しいpLenti-EF1-RGFP-miR302ベクター(図1A)は、MOPS、グリセリン及び/又はエタノールの刺激で大腸菌DH5αコンピテントセルを形質転換させてRGFPタンパク質及びmiR-302sとその前駆体(pre-miR-302s)を製造するための実例組成物とされる。pLenti-EF1-RGFP-miR302は、本発明者により設計され、原核生物及び真核生物の両者において各種のmicroRNAs/shRNAs、mRNAs及び/又はタンパク質/ペプチド類を発現するレンチウイルスプラスミドベクターである。本発明に述べられるとおり、記載されるメカニズム(1B)によって、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者は、miR-302の代わりに何れかのmicroRNA/shRNAを使用し、あるいはRGFPの代わりに何れかのmRNA/タンパク質を使用することが容易である。黒い矢印は、原核及び真核細胞の両者に現われる経路を示し、ブランク矢印は、真核細胞のみに現われるステップを示す。

20

【図2】図2は、0.1%(v/v)MOPS及び0.05%(v/v)グリセリンの混合物により処理され(左)、又は処理されていない(右)細菌をインキュベートする培養液の結果を示す。大腸菌コンピテントセルが化学誘導剤による処理前にpLenti-EF1-RGFP-miR302により形質転換された。

30

【図3】図3は、異なる細菌凝集塊(pellets)が0.1%(v/v)MOPSにより処理された後の結果を示す。大腸菌コンピテントセルがMOPSによる処理前にpLVX-Grn-miR302+367(緑色)又はpLenti-EF1-RGFP-miR302(赤色)により形質転換された。

40

【図4】図4は、大腸菌コンピテントセルにおけるpol-2プロモーターにより駆動される遺伝子発現の誘導に対する各種の化学誘導剤の誘導性を示す。被検化学品の全てにおいて、最も強力な誘導剤の3つは、MOPS、グリセリン及びエタノールである。使用される化学品の濃度は、約0.001%~4%の範囲にあってもよく、最も好ましくは0.01%~1%である。

【図5】図5は、MOPS、グリセリン及びエタノールによりそれぞれ誘導される赤色RGFPタンパク質発現のウェスタンプロット法による結果を示す。細菌RuvBタンパク質は、ハウスキーピング標準として用いられ、検知されるRGFP発現を標準化する。ブランク大腸菌細胞から抽出される(即ち、ベクターにより形質転換されていない)タンパク質は、陰性対照として用いられる。

【図6】図6は、MOPS、グリセリン及びエタノールによりそれぞれ誘導されるmiR-302ファミリークラスター(約700nt)及び誘導前駆体(1~4個のヘアピンを有するpre-miR-302s)の発現のノーザンプロット法による結果を示す。ブランク大腸菌細胞から抽出されるRN

50

Aは、陰性対照として用いられる。

【図7】図7は、細菌コンピテントセルの抽出物(BE)から分離されるmiR-302及び/又はpre-miR-302を用いるiPSCの生成を示す。それは、図6に示すようなノーザンプロット解析により実証された。報告されるように、miR-302再プログラムiPSCs(或いは、mirPSCsと称される)は球様細胞群を形成し、強いOct4を標準hESCマークとして発現する。

【図8】図8は、細菌コンピテントセルの抽出物(BE)から分離されるmiR-302及び/又はpre-miR-302により誘導されるOct4及びSox2遺伝子プロモーターの全体的なDNAデスマチル化を示す。これは、図6に示すようなノーザンプロット解析により検証された。Simonsson及びGurdon(Nat Cell Biol. 6, 984-990, 2004)が論証したように、全体的なDNAデスマチル化及びOct4の発現という2つの現象は、いずれも体細胞を再プログラムしてiPSCsを形成するのに必要である。

10

【図9】図9は、ヒト肝癌細胞株HepG2がmiR-302によるトランスフェクションに応じる生体外腫瘍形成性分析を示す。miR-302によるトランスフェクションの後に得られる細胞は、mirPS-HepG2とマーキングされ、その癌細胞特性が誘導多能性幹細胞(iPSC)様状態に変化することを示す。miR-302によるトランスフェクション前後の形態及び細胞周期速度の変化を比較する。細胞形態に対するフローサイトメトリー分析のピークグラフ(n=3, p<0.01)により細胞周期段階に対する各細胞のDNA含有量を示す。

【図10】図10A及び図10Bは、合成標準uDNA(Sigma-Genosysに由来する)及びpLenti-EF1-RGFP-miR302形質転換大腸菌細胞から分離される新しく抽出されるpro-miR-302sを用いたHPLC精製及び分析の結果を示す。標準uDNAは、天然pre-miR-302a、即ち、5'-CCACCAUCUA AACGUGGAUG UACUUGCUUU GAAACUAAAG AAGUAAGUGC UUCCAUGUUU UGGUGAUGG-3' (SEQ. ID. NO.4)に相当するように設計される。

20

【図11】図11A及び図11Bは、プランク大腸菌コンピテントセル又はpLenti-EF1-RGFP-miR302(RGFP-miR302)トランスフェクション細胞から抽出される低分子RNAを用いたmicroRNA(miRNA)マイクロアレイ解析の結果を示す。抽出される低分子RNAは、図10Bの緑色マークの領域に示すように、HPLCによりさらに精製される。図11Aは、プランク大腸菌細胞に由来するRNAがmicroRNAを殆ど呈しないことを示す(緑色のスポットは、統計的に顕著ではないことを意味し、赤色のスポットは、陽性の結果を示す)。これは、原核生物がmicroRNAの発現及び処理に必要な若干の必須酵素、例えばPol-2、Drosha及びRNase III Dicerを有していないからである。また、原核RNAポリメラーゼは、高二次構造を有する低分子RNA、例えばヘアピン型pre-miRNAs及びshRNAsを効率よく転写しない。そのため、図11Bに示すように、発明者は、本発明のみにより原核細胞における特定のmicroRNAsの発現、例えば、miR-302a、a*、b、b*、c、c*、d及びd*を刺激できる。原核細胞がDicerを有していないので、すべてのmicroRNAsは、その前駆体構造形態、例えば、pri-miRNA(4ヘアピンのクラスター)及び/又はpre-miRNA(1ヘアピンの前駆体)を呈するように保持される。したがって、図10B及び11Bの結果から、(1)RGFP-miR302トランスフェクション細胞から抽出される低分子RNAは純粋なmiR-302前駆体を主に含有することと、(2)大腸菌コンピテントセルには、その他の種類のmicroRNA汚染が殆どないこと、という2つの事実が既に確定された。

30

【図12】図12は、プランク大腸菌コンピテントセル(第1組、図11Aに示すように)又はpLenti-EF1-RGFP-miR302トランスフェクション細胞(第2組、図11Bに示すように)から抽出される発現microRNAのリストを示す。500より小さいシグナルは統計的に顕著ではなく(図11A及び11Bにおける緑色に示す)、それは、低コピー数の発現又はハイバックグラウンドによって引き起こされる可能性がある。

40

【図13】図13A及び図13Bは、miR-302ファミリークラスター(13A)及び個別のpro-miR-302a、pro-miR-302b、pro-miR-302c及びpro-miR-302dの配列(13B)のシーケンシング結果を示す。miR-302ファミリークラスター(=pri-miR-302)の結果は、5'-AAUUUUUUUC UUCUAAAGUU AUGCCAUUUU GUUUUCUUUC UCCUCAGCUC UAAAUCUCU GAAGUCCAAA GAAGUUGUAU GUUGG GUGGG CUCCCUUCAA CUUUAACAUG GAAGUGCUUU CUGUGACUUU AAAAGUAAGU GCUUCCAUGU UUUAGUAG GA GUGAAUCCAA UUUACUUCUC CAAAAUAGAA CACGCUAACC UCAUUUGAAG GGAUCCCCUU UGCUUUAACA

50

UGGGGGUACC UGCUGUGUGA AACAAAAGUA AGUGCUCUCCA UGUUUUCAGUG GAGGUGUCUC CAAGCCAGCA CAC CUUUUGU UACAAAAAUU UUUUGUUAUU GGUUUUUAAG GUUACUAAGC UUGUUACAGG UUAAAGGAUU CUAACU UUUU CCAAGACUGG GCUCCCCACC ACUUAAACGU GGAUGUACUU GCUUUGAAC UAAAGAAGUA AGUGCUUCC A UGUUUUGGUG AUGGUAAGUC UUCUUUUUAC AUUUUUUAAA UUUUUUAGA AAAUAACUUU AUUGUUAUGA C CGCAGCUA UAUUUUAAG CUUUUUUUG UAUUUUACA UCUGUUAAGG GGCCCCCUCU ACUUUAACAU GGAG GCACUU GCUGUGACAU GACAAAAUA AGUGCUUCCA UGUUUGAGUG UGGUGGUUCC UACCUAAUCA GCAAUUG AGU UAACGCCAC ACUGUGUGCA GUUCUUGGCU ACAGGCCAU ACUGUUGCUA-3' (SEQ. ID. NO. 5) 10 であり、pro-miR-302a、pro-miR-302b、pro-miR-302c 及び pro-miR-302d の個別の配列は、それぞれ 5'-CCACACACUA AACGUGGAUG UACUUGCUU GAAACUAAAG AAGUAAGUGC UUCCAUGUU UGGUGAU GG-3' (SEQ. ID. NO. 6) 、 5'-GCUCCCCUCA ACUUUAACAU GGAAGUGCUU UCUGUGACUU UAAAAGUAAG UGCUUCCAUG UUUUAGUAGG AGU-3' (SEQ. ID. NO. 7) 、 5'-CCUUUGCUU AACAUAGGGGG UACCUGCUGU GUGAAACAAA AGUAAGUGC UCCAUGUUUC AGUGGAGG-3' (SEQ. ID. NO. 8) 及び 5'-CCUCUACUUU AA CAUGGAGG CACUUGCUGU GACAUGACAA AAAUAAGUGC UUCCAUGUU GAGUGUGG-3' (SEQ. ID. NO. 9) である。

【図14】図14は、pro-miR-302を注射薬物として用いてSCID-ベージュヌードマウスにおけるヒト肝癌異種移植植物を処理する予備試験新薬（pre-IND）試験の生体内治療結果を示す。3回の処理（週に1回）の後に、pro-miR-302薬物（=pre-miR-302）は、癌のサイズを $728 \pm 328\text{mm}^3$ （処理されていないプランク、C）から $75 \pm 15\text{mm}^3$ （pro-miR-302により処理されたもの、T）までうまく減少させた。これは、癌の平均サイズが約90%減小したことを示す。合成siRNAミミック（siRNA-302）による処理において、顕著な治療効果が見出されていない。さらなる組織学検査（一番右の図）により、正常な肝小葉様構造（黒い矢印で示す丸）がpro-miR-302により処理された癌のみに形成され、その他の処理又は対照に形成されていないことが見出され、再プログラムメカニズムが発生して悪性癌細胞の特性を比較的に正常様状態に回復させることができる（「癌の逆転」と称する）ことを示す。 20

【図15】図15は、生体内における正常な肝組織とpro-miR-302により処理されたヒト肝癌異種移植植物との間の組織学的類似性を示す。3回の処理（週に1回）の後に、pro-miR-302薬物は、高度（IV度）なヒト肝癌移植植物をより良性の低度（II度より低い）状態にうまく再プログラムした。処理された癌移植植物は、正常な肝組織（一番上の図）に類似し、中心静脈（CV）様及び門脈三管（PT）様構造（黒い矢印で示す）を含む古典的肝小葉を形成することができる。通常、癌細胞は、正常な肝細胞と比べると、酸性がより大きいので、ヘマトキシリソ・エオジン（H&E）染色の結果は、癌細胞において多くの紫色を示したが、正常な肝細胞において多くの赤色を示した。 30

【図16】図16は、SCID-ベージュヌードマウスにおける処理されていないヒト肝癌移植植物、siRNAにより処理されたヒト肝癌移植植物、pro-miR-302により処理されたヒト肝癌移植植物及び正常な肝組織の間の病理組織学比較を示す。処理されていない場合（一番上の図）には、移植されたヒト肝癌は、侵襲的に正常な組織、例えば筋肉及び血管に侵入し、大規模な細胞-細胞及び癌-組織の融合構造を形成し、これは、その悪性及び高転移性を示す。siRNAミミック（siRNA-302）による処理は、移植された癌の悪性を顕著に低減させず（中上の図）、これは、siRNAの短い半減期に起因する可能性が高い。それに対して、pro-miR-302による処理は、移植された癌を比較的に正常様形態に再プログラムした（融合がない）だけでなく、癌の周囲の組織への侵入を極めて抑制した（中下の図）。正常な肝組織（一番下の図）と比べると、pro-miR-302により処理された癌は、正常様小葉構造、腺様細胞構成並びに細胞-細胞及び癌-組織の結合部位の間の明らかな境界（黒い矢印）を形成し、これは、処理されたこれらの癌の悪性が極めて良性の状態まで低下したことを示す。 40

【図17】図17A及び図17Bは、生体内における処理されていない（17A）及びmiR-302により処理された（17B）傷口の間の治癒結果の比較を示す。分離されたmiR-302分子（20~400 μg/mL）をジ-/トリ-グリシルグリセリン（di-/tri-glycerylglycerin）、送達試薬及び抗生素質軟膏とともに配合して選択対象である薬物を形成し、生体内において豚の背中の皮膚における2cm×2cmの大きい開放性傷口の局所処理のテスト（各群において、n=6である）に用いる。約2週間の処理（1日に1回の処理）の後に、治癒された傷口を解剖して、さ 50

らに組織切片に製作して顕微鏡下で組織学検査を行う。データによると、miR-302により処理された傷口には、傷跡がなく、或いは極めて小さい傷跡が視認され（傷跡無し）（図17Bの一番上の図、n=6/6）、それに対し、処理されていない（抗生物質軟膏のみにより処理された）殆どすべての傷口には、大きい傷跡が含まれる（図17Aの一番上の図、n=5/6）。また、大量のCD34陽性成体幹細胞クラスター（緑色蛍光抗体によりマーキングされた）は、miR-302により処理された傷口に顕著に認められた（図17Bの一番下の図、n=6/6）が、処理されていない対照傷口には認められていなかった（図17Aの一番下の図、n=0/6）。これらの結果から明らかなように、pre-miR-302は、CD34陽性成体幹細胞の増殖及び/又は再生を誘導して、組織の修復及び再生を強化し、ヒト退行性疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、骨粗鬆症、糖尿病及び癌による病変に対して極めて有益な治療効果をもたらすことができる。この治療効果は、高度悪性の癌を低度良性、ひいては正常様組織に再プログラムすることにも寄与し、癌の逆転又は癌消退と称される新規なメカニズムである。
10

【発明を実施するための形態】

【0093】

実例：

以下の実験の記載内容において、M（モル濃度）； mM（ミリモル濃度）； μm（マイクロモル）； mol（モル）； pmol（ピコモル）； gm（グラム）； mg（ミリグラム）； μg（マイクログラム）； ng（ナノグラム）； L（リットル）； mL（ミリリットル）； μL（マイクロリットル）； °C（セルシウス度）； RNA（リボ核酸）； DNA（デオキシリボ核酸）； dNTP（デオキシリボヌクレオチド三リン酸）； PBS（リン酸緩衝生理食塩水）； NaCl（塩化ナトリウム）； HEPES（N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸）； HBS（HEPES緩衝生理食塩水）； SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）； Tris-HCl（トリ-ヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸塩）； ATCC（アメリカン・タイプ・カルチャーナー・コレクション、Rockville, MD）； hESC（ヒト胚性幹細胞）； 及びiPSC（誘導多能性幹細胞）という略語が適用している。

20

【0094】

1. 細菌細胞のインキュベート及び化学処理

z-コンピテント大腸菌形質転換キット（Zymo Research, Irvine, CA）から大腸菌DH5αコンピテントセルを一部として獲得し、その後、予め製造された5 μgのプラスミドベクター、例えばpLenti-EF1 -RGFP-miR302又はpLVX-Grn-miR302+367と混合させて形質転換させた。形質転換されていない細胞を37°Cで170 rpmでの頻繁攪拌下で、10 mMのMgSO₄及び0.2 mMのグルコースが補充されたLuria-Bertani (LB) 培養液において正常にインキュベートした。一方、形質転換された細胞を追加の100 μg/mlのアンピシリンがさらに補充された上記のLB培養液においてインキュベートした。化学誘導について、10 mMのMgSO₄及び0.2 mMのグルコースが補充され、100 μg/mlのアンピシリンのある1LのLB培養液に、0.5~2 mlのMOPS、グリセリン及び/又はエタノールをそれぞれ又は組み合わせて添加した。陰性対照について、形質転換された細胞を上記のアンピシリンが補充されたが何の化学誘導剤も添加されていないLB培養液においてインキュベートした。その結果を図2~図4に示す。

30

【0095】

2. ヒト細胞のインキュベート及びMicroRNAによるトランスフェクション

ヒト肝癌細胞株HepG2は、ATCCから獲得され、メーカーの提案に従って培養された。トランスフェクションを行うために、15 μgのpre-miR-302を1 mlの新鮮なRPMI培地に溶解させ、50 μLのX-tremeGENE HP DNAトランスフェクション試薬（Roche, Indianapolis, IN）と混合させた。10分間インキュベートした後、混合物を50%~60%のHepG2細胞密集度を含む100 mmの細胞シャーレに添加した。12~18時間後に培地を更新した。トランスフェクションを経たこれらの細胞が球様iPSC群を形成した後に、培地を、20%遺伝子ノックアウト血清、1%のMEM非必須アミノ酸、100 μMのL-メルカプトエタノール、1 mMのGlutaMax、1 mMのピルビン酸ナトリウム、10 ng/mlのbFGF、10 ng/mlのFGF-4、5 ng/mlのLIF、100 IU/mlのベニシリソングリコサミン、100 μg/mlのストレプトマイシン、0.1 μMのA83-01及び0.1 μMのバルプロ酸（St

40

50

emgent, San Diego, CA) が補充された遺伝子ノックアウトDMEM/F-12培地 (Invitrogen) に変更し、37℃で5%のCO₂の存在下で細胞をインキュベートした。その結果を図9に示す。

【0096】

3. タンパク質の抽出及びウェスタンプロット解析

メーカーの提案に従って、プロテアーゼ阻害剤、ロイペプチド (Leupeptin)、TLCK、TAME及びPMSFが補充されたCellLytic-M分解/抽出試薬 (Sigma) により細胞 (10⁶個) を分解させた。分解物を4℃で12,000 rpm下で20分間遠心させて上澄み液を回収した。E-maxマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, CA) に改良されたSOFTmaxタンパク質解析セットを使用してタンパク質の濃度を計測した。還元 (+50mMのDTT) 及び非還元 (DTTがない) の条件下で30 μgの細胞溶解物をそれぞれSDS-PAGEサンプル緩衝液に添加し、3分間沸騰させて、その後、6~8%のポリアクリルアミドゲルに載置した。タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により解析し、ニトロセルロースフィルムにエレクトロプロッティングし、室温下でOdysseyプロッキング試薬 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB)において2時間インキュベートした。その後、一次抗体を試薬に添加し、混合物を4℃でインキュベートした。一次抗体は、Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、RuvB (Santa Cruz) 及びRGFP (Clontech) を含む。一晩経た後に、フィルムをTBS-Tで3回リーンスし、その後、室温下でAlexa Fluor 680反応性染料によりマーキングされたヤギ抗マウスIgG結合二次抗体 (1:2,000; Invitrogen-Molecular Probes) に1時間暴露した。TBS-Tによるリーンスを3回追加した後に、Li-Cor Odyssey赤外撮影装置及びOdysseyソフトウェアv.10 (Li-Cor) により免疫プロットの蛍光走査及び画像分析を実行した。その結果を図5に示す。

10

20

30

40

50

【0097】

4. RNAの抽出及びノーザンプロット解析

全RNA (10 μg) をmirVanaTM miRNA分離キット (Ambion, Austin, TX) により分離し、1.5%のTBE-尿素ポリアクリルアミドゲル又は3.5%の低融点アガロースゲル電気泳動により分別分離させ、ナイロンフィルムにエレクトロプロッティングした。[LNA]-DNAプローブ (5' - [TCACTGAAAC] ATGGAAGCAC TTA-3') (SEQ. ID. NO. 10) によりmiR-302s及び関連pre-miR-302sの検知を実行した。プローブは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製され、[³²P]-dATP (> 3000Ci/mM, Amersham International, Arlington Heights, IL) の存在下で末端転移酵素 (20単位) で20分間テール標識された。その結果を図6に示す。

【0098】

5. プラスミドの増幅及びプラスミドDNA/全RNAの抽出

形質転換された後の大腸菌DH5[®]コンピテンツセル (実例1から得られた) を、10mMのMgSO₄及び0.2mMのグルコースが補充されたLB培養液において37℃で170rpmでの頻繁攪拌下でインキュベートした。真核プロモーターにより駆動されるRNA転写を誘導するために、0.5~2mlのMOPS、グリセリン及び/又はエタノールをLB培養液1リットルごとに添加することにより形質転換細胞を一夜繁殖させた。HiSpeedプラスミド精製キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、RNase AをP1緩衝液に添加しなかったと少し調整した以外、メーカーの方案に従って、形質転換細胞における増幅されたプラスミドDNAs及び発現されたmRNAs/microRNAsを分離させた。その後、プラスミド及びmRNAs/microRNAsの両者を含む最終的な抽出産物をDEPCにより処理されたddH₂Oに溶解させ、使用する前に-80℃で貯蔵した。増幅されたプラスミドベクターのみを精製するために、RNase AをP1緩衝液に添加し、メーカーの方案に従って抽出プロセスを実行した。

【0099】

6. MicroRNA及びPre-miRNAの分離/精製

microRNAs及びpre-miRNAsを精製するために、mirVanaTM miRNA分離キット (Ambion, Austin, TX) を使用し、メーカーの方案に従って、実例5から分離された全RNAをさらに抽出した。こうして得られる最終産物をDEPCにより処理されたddH₂Oに溶解させ、使用する前に-80℃で貯蔵した。細菌RNAsが自然に極めて迅速に分解する (数時間以内) が、真核ヘアピン型microRNA前駆体 (pre-miRNAs及びpri-miRNAs) の大部分が4℃で安定である (半

減期が3~4日に達する)ので、発明者は、この半減期の差異を利用して比較的に純粋なpri-/pre-miRNAsを獲得してその他の応用に用いることができる。例えば、図9に示すように、こうして得られるpre-miR-302sは、体細胞をhESC類iPSCsに再プログラムするために用いることができる。

【0100】

7. 免疫染色分析

従来に報告されるように(Lin氏ら, 2008)、組織サンプルに対して、包埋、切片化及び免疫染色を施した。一次抗体は、Oct4(Santa Cruz)及びRGFP(Clontech, Palo Alto, CA)を含む。蛍光染料によりマーキングされたヤギ抗ウサギ又はウマ抗マウス抗体を二次抗体(Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA)として用いた。蛍光80i顕微定量システムでMetamorphイメージングプログラム(Nikon)を用いて100×又は200×の倍率で陽性の結果の検査及び分析を行った。その結果を図7に示す。

10

【0101】

8. 亜硫酸塩によるDNAシーケンシング

DNA分離キット(Roche)を用いて約2,000,000個の細胞からゲノムDNAを分離させ、亜硫酸塩(CpGenome DNA修飾キット、Chemicon, Temecula, CA)を用いて、メーカーの提案に従って、分離された1μgのDNAをさらに処理した。亜硫酸塩処理は、すべての非メチル化シトシンをウラシルに転化させ、メチル化シトシンをシトシンとして保持した。亜硫酸塩によるDNAシーケンシングにおいて、発明者は、PCRプライマーによりOct4遺伝子のプロモーター領域を增幅し、プライマーは、5'-GAGGCTGGAG CAGAAGGATT GCTTTGG-3' (SEQ. ID. NO. 11) 及び5'-CCCTCCTGAC CCATCACCTC CACCACC-3' (SEQ. ID. NO. 12)である。PCRにおいて、亜硫酸塩により修飾されたDNAs(50ng)とプライマー(計100pmol)を1×PCR緩衝液に混合し、94℃まで加熱して2分間維持し、直ちに氷上で冷却させた。その後、Expand High Fidelity PCRキット(Roche)を用いて、94℃で1分間持続し、また、70℃で3分間持続するよう25個のPCRサイクルを実行した。正確なサイズを有するPCR産物を3%アガロースゲル電気泳動によりさらに分別分離させ、ゲル抽出フィルタ(Qiagen)により精製し、次にDNAシーケンシングに用いた。その後、転化したDNA配列における変化のないシトシンと転化されていないDNA配列とを比較することにより、図8に示すように、DNAメチル化サイトの詳細なプロフィールを得た。

20

【0102】

30

9. DNA密度のフローサイトメトリー

細胞をトリプシンにより処理し、凝集塊を形成し、-20℃で予備冷却された70%メタノールを含有する1mlのPBSに再懸濁させることにより1時間固定した。細胞を凝集塊として形成し、1mlのPBSで1回洗浄し、そして、再び凝集塊として形成し、37℃で1mg/mlのプロピジウムイオダイン(propidium iodide)、0.5μg/mlのRNaseを含む1mlのPBSに30分間再懸濁させた。その後、BD FACSCalibur(San Jose, CA)において、約15,000個の細胞を解析した。パルス幅対パルス面積の図をプロットして単一細胞をゲーティング(gating)することによって細胞ダブレットを排除した。ソフトウェアパッケージFlowjoを使用し、「Watson Pragmatic」演算法により収集したデータを解析した。その結果を図9の一番上の図に示す。

40

【0103】

10. MicroRNA(miRNA)のマイクロアレイ解析

約70%の細胞密集度で、miRvanaTMmiRNA分離キット(Ambion)を用いて各細胞培養物に由来する低分子RNAを分離させた。1%のホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動及び分光光度計(Bio-Rad)により、分離された低分子RNAsの純度及びその量を計測して評価し、そして直ちにそれをドライアイスで冷凍してLC Sciences(San Diego, CA)に送付してmiRNAマイクロアレイ解析に用いた。各マイクロアレイチップをハイブリッドさせ、単一のサンプルは、Cy3又はCy5によりマーキングされ、或いは、一対のサンプルは、それぞれCy3及びCy5によりマーキングされた。メーカーの提案に従って、バックグラウンド除去及び標準化を実行した。2つのサンプルの分析において、p値の計算を実行し、3倍よりも大

50

きい差で発現した転写物（黄色-赤色のシグナル）のリストを作成した。最終的なマイクロアレイの結果を図11A及び11Bに示し、差異で発現したmicroRNAsのリストを図12に示し、プランク大腸菌細胞分解物から抽出された低分子RNAs（第1群）とpLenti-EF1 -RGFP-miR302形質転換細胞分解物から抽出された低分子RNA（第2群）とを比較した。

【0104】

11. 生体内肝癌療法試験

ヒト肝癌を免疫機能不全のSCID-ベージュマウスに異種移植することは、肝癌の転移及び療法を研究するための有効な動物モデルである。このモデルを構築するために、発明者は、5百万個のヒト肝癌（HepG2）細胞と $100\text{ }\mu\text{L}$ のマトリックスゲルとを混合させ、混合物をマウスの後肢の各側腹にそれぞれ皮下移植した。そのため、マウスの後肢の両側には、いずれも略同じ量の癌細胞が移植された。移植後に約2週間後に、癌を観察し、その平均サイズが約 $15.6 \pm 8\text{ mm}^3$ （処理前の癌の初期サイズ）であった。各マウスに対して、発明者は、サイズがより大きい癌を有する一方の側を処理群として選択し、より小さい癌を有する他方の側を対照群として選択した。同じマウスが一方側でプランク配合試薬（陰性対照）により処理され、他方側で配合薬物（pro-miR-302）により処理されたので、こうして得られる結果は、個体差に起因する何れかの可能な変化を最小化できる。

10

【0105】

生体内においてpro-miR-302を標的癌領域に送達するために、発明者は、プロの配合会社Latitude（San Diego, CA）に注文し、pro-miR-302sをリボソームにより直径 $160 \sim 200\text{ nm}$ のナノ粒子にカプセル封入した。これらのpro-miR-302を含むナノ粒子は、テストされた結果、室温下で2週間を超える時間で殆ど100%安定し、4ヶ月で1ヶ月を超える時間で殆ど100%安定するのに対して、他の合成siRNAミミック（siRNA-302）は、いずれも同じ条件下3~5日内に迅速に50%超分解し、これは、siRNAではなく、pro-miRNAが十分に安定的で治療薬物として用いることができる。毒性分析において、発明者は、さらに、 $300\text{ }\mu\text{L}$ の配合pro-miR-302（ 1 mg/mL ）をそれぞれマウスの尾静脈（n=8）に最大限に注射した。六ヶ月を経て、テストされたすべてのマウスでは、いずれも検知可能な副作用が観察されていなかった。一般的には、非修飾リボ核酸は、比較的に免疫原性を持たず、組織細胞により代謝されることが容易であり、生体内療法に用いる安全な工具を提供する。

20

【0106】

薬物の効果をテストするために、発明者は、 $200\text{ }\mu\text{L}$ の配合pro-miR-302をマウスの一方側に、 $200\text{ }\mu\text{L}$ のプランク配合試薬を他方側にそれぞれ皮下注射し、同じ注射モードで3回続いた（週に1回注射する）。薬物及び試薬は、癌サイトの周囲領域に応用され、18時間内に癌及びその周囲組織に吸収された。3回目の注射から一週間後に、サンプルを収集した。さらなる組織学検査に用いるために、心臓、肝臓、腎臓及び移植された癌を取り出した。触診により腫瘍の形成をモニタリングし、方程式（長さ × 幅²）/2により腫瘍の体積を計算した。腫瘍巣をカウントし、解剖して秤量し、H&E及び免疫染色分析によりそれに対して組織学検査を行った。組織学検査により、心臓、肝臓及び腎臓において検知可能な組織巣がないことを示した。その結果を図14、図15及び図16に示す。

30

【0107】

12. 統計分析

免疫染色、ウェスタンプロット法及びノーザンプロット法の分析において75%より大きいシグナル強度の変化は、いずれも陽性結果と見なされ、また、それを分析して、平均値 $\pm \text{SE}$ で示した。一元配置ANOVAによりデータの統計分析を施した。主な効果が顕著である場合に、ダネットのポストホックテスト（Dunnett's post-hoc test）により、対照と著しく異なる群を識別した。2つの処理群の間を一対ごとに比較（pairwise comparison）するために、両側スチューデントt検定（two-tailed student t test）を使用した。2つ以上の処理群を含む実験に対して、ANOVAを実行した後、ポストホック多重範囲検定を実行した。確率値p<0.05である場合に、顕著と見なされる。すべてのp値は、いずれも両側検定により測定された。

40

【0108】

50

先行技術文献

1. Lin SL及びYing SY. (2006) Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. Ying SY. (Ed.) MicroRNA protocols. Humana press, Totowa, New Jersey, 第295-312ページ。
 2. Lin SL, Chang D及びYing SY. (2006) Transgene-like animal models using intronic microRNAs. Ying SY. (Ed.) MicroRNA protocols. Humana press, Totowa, New Jersey, 第321-334ページ。
 3. Lin SL, Chang D, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DTS, Chen DT及びYing SY. (2008) Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. RN A 14, 2115-2124.
 4. Lin SL及びYing SY. (2008) Role of mir-302 microRNA family in stem cell pluripotency and renewal. Ying SY. (Ed.) Current Perspectives in MicroRNAs. Springer Publishers press, New York, 第167-185ページ。
 5. Lin SL, Chang D, Ying SY, Leu D及びWu DTS. (2010) MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenecity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways. Cancer Res. 70, 9473-9482.
 6. Lin SL, Chang D, Lin CH, Ying SY, Leu D及びWu DTS. (2011) Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. Nucleic Acids Res. 39, 1054-1065.
 7. Simonsson S及びGurdon J. (2004) DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. Nat Cell Biol. 6, 984-990.
 8. Takahashi氏ら (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663--676.
 9. Wang氏ら (2008). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. Nat. Genet. 40, 1478--1483.
 10. 10. Wernig氏ら (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature 448, 318--324.
 20. 11. Yu氏ら (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318, 1917--1920.
 30. 12. Buechlerの米国特許第7,959,926号。
 13. Mehtaの米国特許第7,968,311号。
 14. Linのヨーロッパ特許第EP 2198025号。
 15. Linの米国特許出願第12/149,725号。
 16. Linの米国特許出願第12/318,806号。
 17. Linの米国特許出願第12/792,413号。
 18. Linの米国特許出願第13/572,263号。
 19. Linの米国特許出願第13/964,705号。
- 【0109】
- 配列表
- (1) 全体的な情報 :
 - (iii) 配列数 : 12
 - (2) SEQ ID NO:1の情報 :
 - (i) 配列の特徴 :
 - (A) 長さ : 23個の塩基対
 - (B) タイプ : 核酸
 - (C) 鎖のタイプ : 一本鎖
 - (D) トポロジー : リニア
 - (ii) 分子のタイプ : RNA
 - (A) 説明 : /desc = 「合成」
 - (iii) 仮想 : NO

(iv) アンチセンス : YES		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:1 :		
UCACCAAAAC AUGGAAGCAC UUA	23	
(3) SEQ ID NO:2の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 23個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		
(D) トポロジー : リニア		
(ii) 分子のタイプ : RNA	10	
(A) 説明 : /desc = 「天然」		
(iii) 仮想 : NO		
(iv) アンチセンス : YES		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:2 :		
ACUUAAAACGU GGAUGUACUU GCU	23	
(4) SEQ ID NO:3の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 17個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		20
(D) トポロジー : リニア		
(ii) 分子のタイプ : RNA		
(A) 説明 : /desc = 「天然」		
(iii) 仮想 : NO		
(iv) アンチセンス : NO		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:3 :		
UAAGUGCUUC CAUGUUU	17	
(5) SEQ ID NO:4の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 69個の塩基対		30
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		
(D) トポロジー : ヘアピン		
(ii) 分子のタイプ : その他の核酸		
(A) 説明 : /desc = 「合成」		
(iii) 仮想 : YES		
(iv) アンチセンス : NO		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:4 :		
CCACCACUUA AACGUGGAUG UACUUGCUUU GAAACUAAAG AAGUAAGUGC		
UCCAUGUUU UGGUGAUGG	69	40
(6) SEQ ID NO:5の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 720個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		
(D) トポロジー : 複数のヘアピン		
(ii) 分子のタイプ : RNA		
(A) 説明 : /desc = 「組み替え」		
(iii) 仮想 : NO		
(iv) アンチセンス : NO		50

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:5 :

AAUUUUUUUC UUCUAAAGUU AUGCCAUUU GUUUUCUUUC UCCUCAGCUC
 UAAAUAUCU GAAGUCCAAA GAAGUUGUAU GUUGGGUGGG CUCCCUUCAA
 CUUUAACAUG GAAGUGCUUU CUGUGACUU AAAAGUAAGU GCUUCCAUGU
 UUAGUAGGA GUGAAUCCAA UUUACUUCUC CAAAAUAGAA CACGCUAACC
 UCAUUUGAAG GGAUCCCCUU UGCUUUAACA UGGGGGUACC UGCUGUGUGA
 AACAAAAGUA AGUGCUUCCA UGUUUCAGUG GAGGUGUCUC CAAGCCAGCA
 CACCUUUUGU UACAAAAUUU UUUUGUUAUU GUGUUUUAG GGUACUAAGC
 UUGUUACAGG UUAAGGAUU CUAACUUUUU CCAAGACUGG GCUCCCCACC
 ACUAAAACGU GGAUGUACUU GCUUUGAAC UAAAGAAGUA AGUGCUUCCA
 UGUUUUGGUG AUGGUAGUC UUCUUUUUAC AUUUUUAUUA UUUUUUUAGA
 AAAUAACUUU AUUGUAUUGA CCGCAGCUA UAUUUUAAG CUUUUUUUG
 UAUUUUUACA UCUGUUAAGG GGCCCCCUCU ACUAAAACAU GGAGGCACUU
 GCUGUGACAU GACAAAAAUA AGUGCUUCCA UGUUUGAGUG UGGUGGUUCC
 UACCUAAUCA GCAAUUGAGU UAACGCCAC ACUGUGUGCA GUUCUUGGCU
 ACAGGCCAUU ACUGUUGCUA

10

720

(7) SEQ ID NO:6 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 69 個の塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖のタイプ : 一本鎖
- (D) トポロジー : ヘアピン

20

(ii) 分子のタイプ : RNA

- (A) 説明 : /desc = 「組み替え」

(iii) 仮想 : YES

(iv) アンチセンス : NO

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:6 :

CCACCAUCUA AACGUGGAUG UACUUGCUCU GAAACUAAAG AAGUAAGUGC
 UUCCAUGUUU UGGUGAUGG

69

30

(8) SEQ ID NO:7 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 73 個の塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖のタイプ : 一本鎖
- (D) トポロジー : ヘアピン

30

(ii) 分子のタイプ : RNA

- (A) 説明 : /desc = 「組み替え」

(iii) 仮想 : YES

(iv) アンチセンス : NO

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:7 :

40

GCUCCCUUCA ACUUUAACAU GGAAGUGCUCU UCUGUGACUU UAAAAGUAAG
 UGCUUCCAUG UUUUAGUAGG AGU

73

(9) SEQ ID NO:8 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

- (A) 長さ : 68 個の塩基対
- (B) タイプ : 核酸
- (C) 鎖のタイプ : 一本鎖
- (D) トポロジー : ヘアピン

40

(ii) 分子のタイプ : RNA

- (A) 説明 : /desc = 「組み替え」

50

(iii) 仮想 : YES		
(iv) アンチセンス : NO		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:8 :		
CCUUUGCUUU AACAUAGGGGG UACCUGCUGU GUGAAACAAA AGUAAGUGCU UCCAUGUUUC AGUGGAGG	68	
(10) SEQ ID NO:9の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 68個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖	10	
(D) トポロジー : ヘアピン		
(ii) 分子のタイプ : RNA		
(A) 説明 : /desc = 「組み替え」		
(iii) 仮想 : YES		
(iv) アンチセンス : NO		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:9 :		
CCUCUACUUU AACAUAGGAGG CACUUGCUGU GACAUGACAA AAAUAAGUGC UCCAUGUUU GAGUGUGG	68	
(11) SEQ ID NO:10の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		20
(A) 長さ : 23個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		
(D) トポロジー : リニア		
(ii) 分子のタイプ : LNA-DNAハイブリッド		
(A) 説明 : /desc = 「合成」		
(iii) 仮想 : YES		
(iv) アンチセンス : YES		
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:10 :		
TCACTGAAAC ATGGAAGCAC TTA	23	30
(12) SEQ ID NO:11の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 17個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		
(D) トポロジー : リニア		
(ii) 分子のタイプ : その他の核酸		
(A) 説明 : /desc = 「合成」		
(iii) 仮想 : YES		
(iv) アンチセンス : YES		40
(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:11 :		
GAGGCTGGAG CAGAAGGATT GCTTTGG	27	
(13) SEQ ID NO:12の情報 :		
(i) 配列の特徴 :		
(A) 長さ : 17個の塩基対		
(B) タイプ : 核酸		
(C) 鎖のタイプ : 一本鎖		
(D) トポロジー : リニア		
(ii) 分子のタイプ : その他の核酸		
(A) 説明 : /desc = 「合成」		50

(iii) 仮想 : YES

(iv) アンチセンス : YES

(xi) 配列の説明 : SEQ ID NO:12 :

CCCTCCTGAC CCATCACCTC CACCACC

27

【図1】

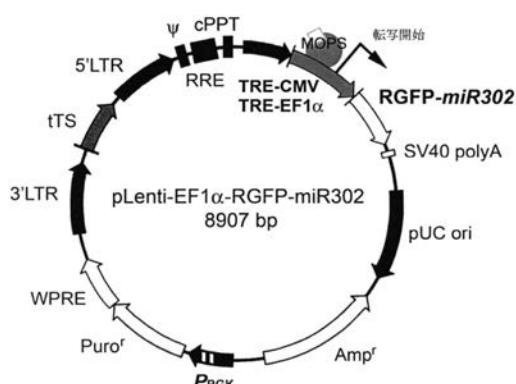


図1A

【図2】

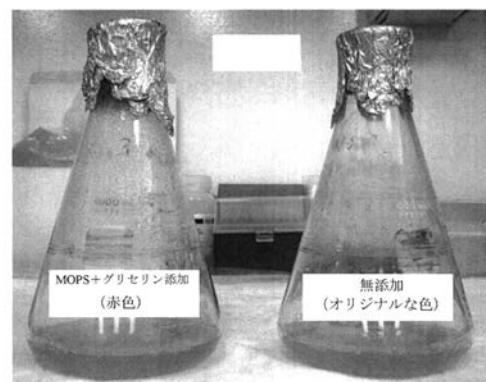


図2

【図3】

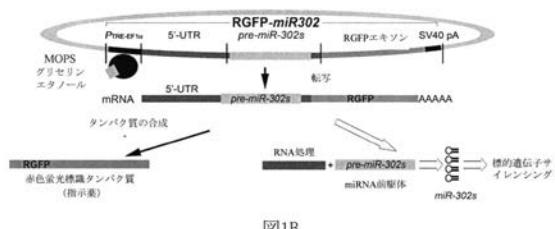


図1B

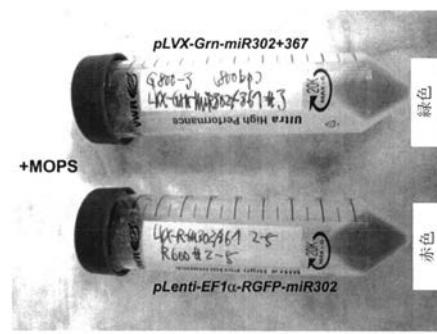


図3

【図4】

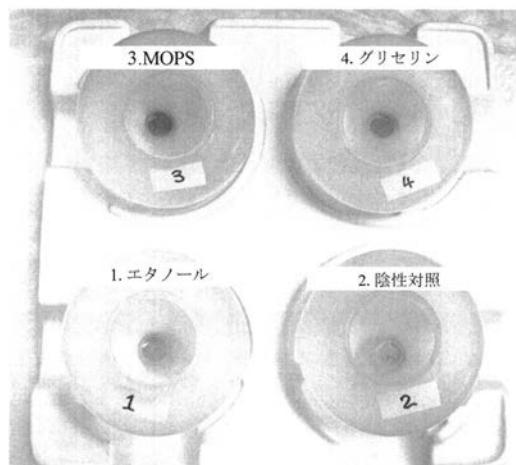


図4

【図5】

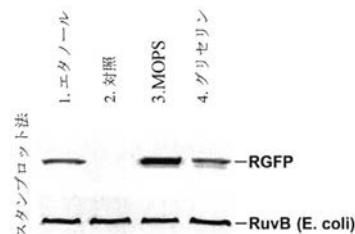


図5

【図6】

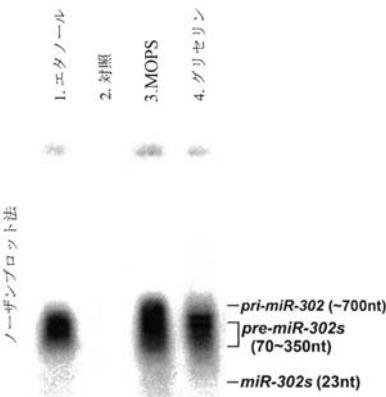


図6

【図7】

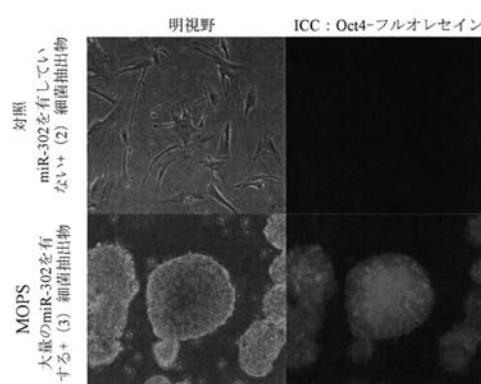


図7

【図8】

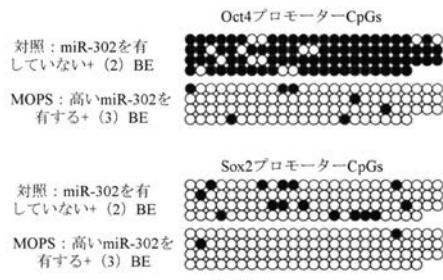
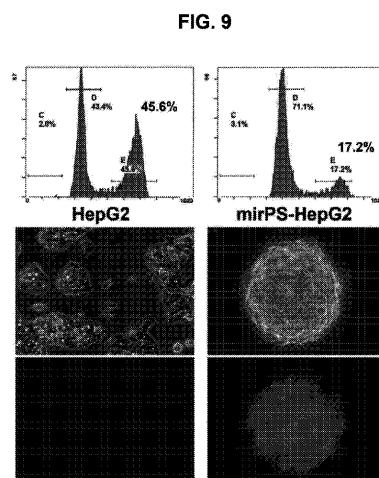


図8

【図9】



【 図 1 0 】

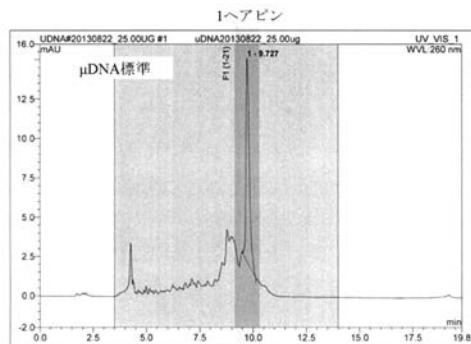


図10A

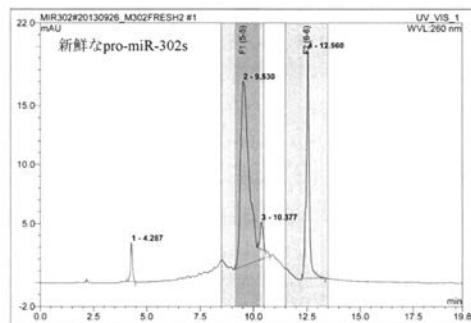


図10B

【 図 1 1 】

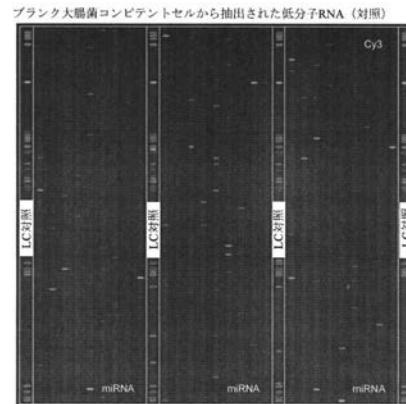


図11A

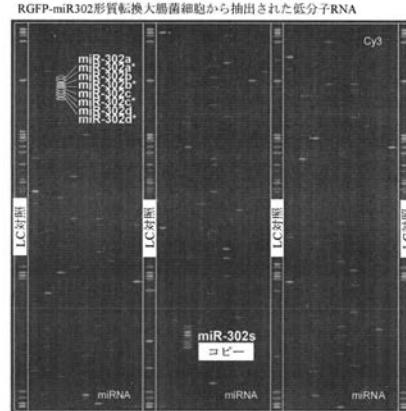


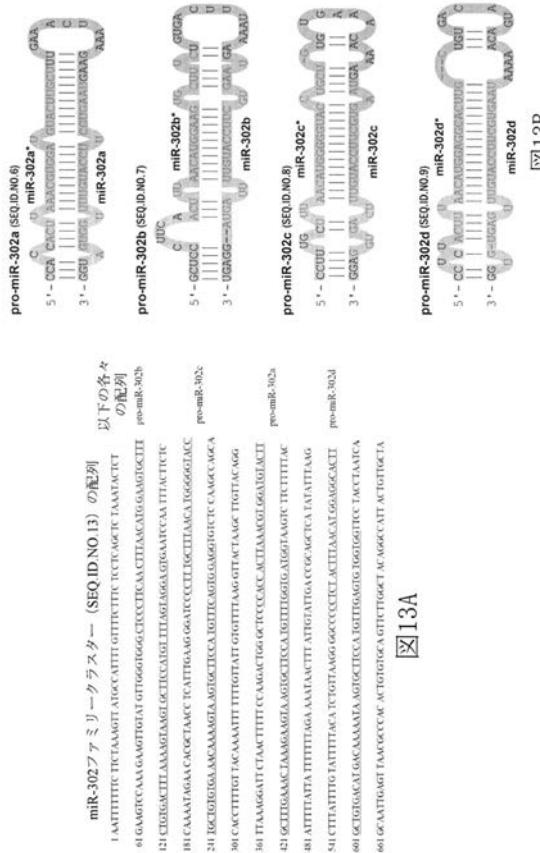
図11B

【 図 1 2 】

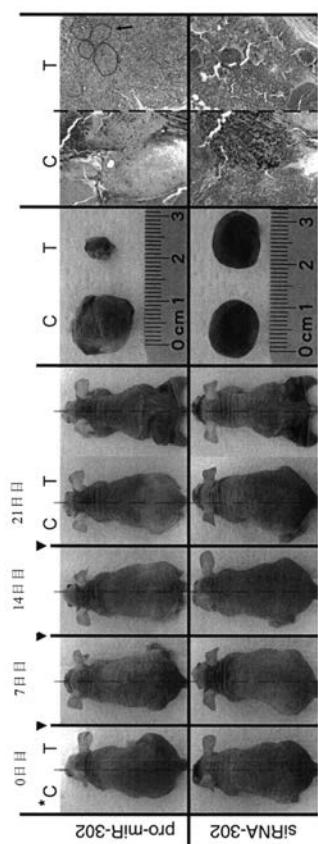
Rpt# インデックス	報告のサブ名	p値	図11A 第1群		図11B 第2群		
			平均値	平均値	#1	#2	Log2 (G2/G1)
445	hsa-mir-302c-5p	1.28E-03	0	52,804			22.65
443	hsa-mir-302a-5p	1.38E-03	0	26,579			21.85
441	hsa-mir-302a-3p	1.52E-03	0	66,718			22.92
444	hsa-mir-302c-3p	3.51E-03	0	15,973			20.71
447	hsa-mir-302d-3p	2.23E-02	3	22,124			12.87
313	hsa-mir-302b-5p	3.09E-02	1	940			3.75
442	hsa-mir-302d-3p	4.86E-02	0	9,579			18.53
591	hsa-mir-320b-3p	4.88E-02	6	1,963			2.23
131	hsa-mir-1275	8.78E-02	749	364			-1.22
以下の転写物は低いシグナル（シグナル<500）の原因で統計的に有意ではない							
554	hsa-mir-3177-3p	2.06E-02	402	76			-2.40
986	hsa-mir-4459	3.59E-02	66	135			1.04
967	hsa-mir-4442	4.52E-02	32	65			1.02
1298	hsa-mir-4758-5p	4.83E-02	7	74			3.45
993	hsa-mir-4466	5.70E-02	58	137			1.23
1120	hsa-mir-4649-5p	5.76E-02	187	385			1.04
1500	hsa-mir-5195-3p	5.81E-02	49	316			2.68
851	hsa-mir-4253	5.86E-02	296	136			-1.12
299	hsa-mir-146a-5p	5.93E-02	7	62			3.21
1156	hsa-mir-4668-5p	7.08E-02	315	70			-2.17
974	hsa-mir-4447	7.41E-02	13	89			2.76
1251	hsa-mir-4728-3p	7.96E-02	42	16			-1.42
750	hsa-mir-146a-3p	8.97E-02	23	88			1.92
870	hsa-mir-4270	9.39E-02	29	113			1.95
1123	hsa-mir-4651	9.46E-02	25	116			2.19

图12

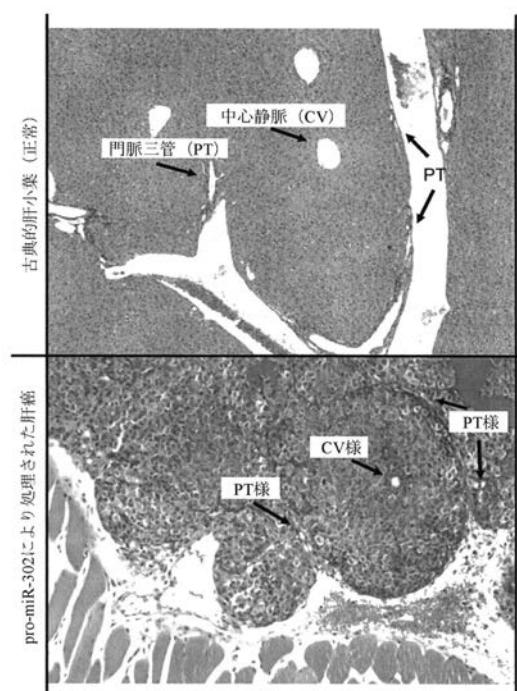
【 図 1 3 】



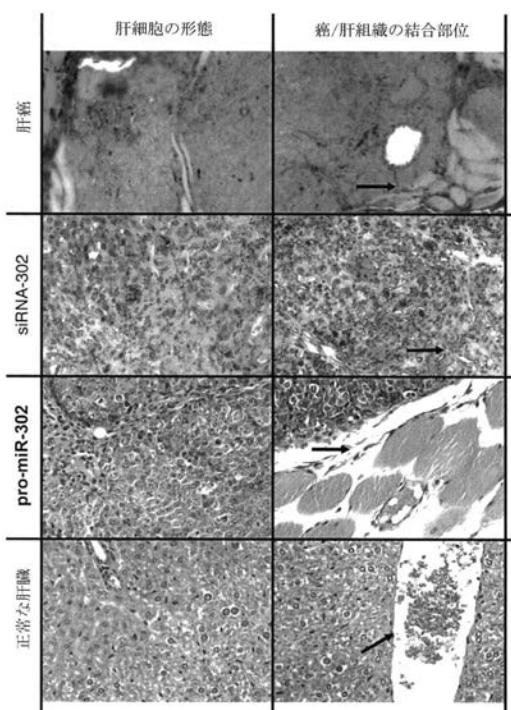
【図14】



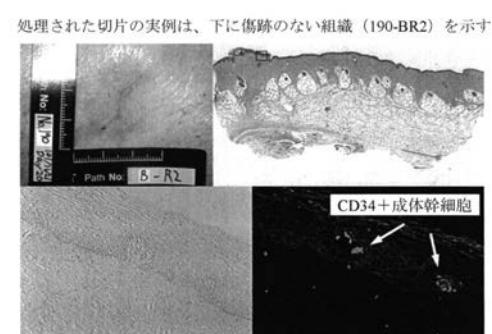
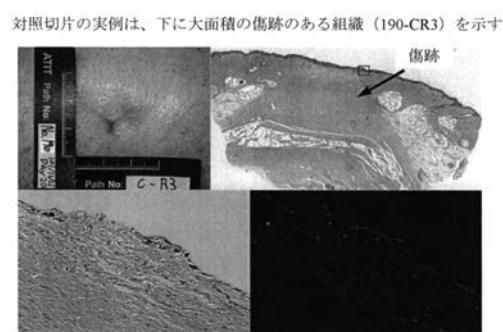
【図15】



【図16】



【図17】



【配列表】2018535684000001.app**【手続補正書】****【提出日】**平成29年3月2日(2017.3.2)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

- (a) 少なくとも1つのCD34陽性成体幹細胞を含む細胞マトリックスを提供することと、
(b) 共通のシード配列SEQ.ID.NO.3を含む少なくとも1つのpre-miRNAを提供すること

(c) (b)のpre-miRNAと(a)の前記CD34陽性成体幹細胞を含む前記細胞マトリックスとを接触させ、前記CD34陽性成体幹細胞の増殖又は再生を誘導することと、
を含む、少なくとも1つのmicroRNA又はその前駆体(pre-miRNA)を用いてCD34陽性成体幹細胞の増殖又は再生を誘導する方法。

【請求項2】

前記microRNA及び前記microRNA前駆体は、原核細胞における真核プロモーターによりRNA転写を駆動することによって生じる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記真核プロモーターによりRNA転写を駆動することは、3-モルフォリノプロパン-1-スルホン酸(MOPS)を含む化学薬剤と、SEQ.ID.NO.6、SEQ.ID.NO.7、SEQ.ID.NO.8、又はSEQ.ID.NO.9の配列をコードする少なくとも1つの発現ベクターを担持する少なくとも1つの形質転換原核細胞とを接触させることで誘導される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記発現ベクターは、SEQ.ID.NO.5の配列をコードする組換えプラスミドである、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記発現ベクターは、サイトメガロウイルス(CMV)又は哺乳動物EF1(EF1alpha)プロモーターを含み、或いはこの両者を同時に含むpLenti-EF1alpha-RGFP-miR302である、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

前記原核細胞は、大腸菌コンピテントセルである、請求項2に記載の方法。

【請求項7】

前記microRNA及び前記microRNA前駆体は、SEQ.ID.NO.6、SEQ.ID.NO.7、SEQ.ID.NO.8、又はSEQ.ID.NO.9の少なくとも1つのヘアピン型配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記microRNA及び前記microRNA前駆体は、原核生物により生成されるmiR-302前駆体(pro-miR-302)である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記pro-miR-302は、miR-302a、miR-302b、miR-302c、又はmiR-302dの少なくとも1つの配列を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記pro-miR-302は、医薬及び治療応用の薬物成分の一部として用いられる、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記microRNA及び前記microRNA前駆体は、医薬及び治療応用の薬物成分の一部として用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記microRNA及び前記microRNA前駆体は、ヒト老化関連疾患の治療に用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 3】

誘導された前記CD34陽性成体幹細胞は、医薬又は治療応用の一部の処理に用いられる、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 4】

誘導された前記CD34陽性成体幹細胞は、体内でヒト癌細胞の悪性特性を低悪性度の良性状態又は正常に類似する状態に再プログラムする、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 5】

誘導された前記CD34陽性成体幹細胞は、体内で傷跡のない傷口の治癒を促進する、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 6】

誘導された前記CD34陽性成体幹細胞は、ヒト老化関連疾患の治療に用いられる、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記CD34陽性成体幹細胞は、皮膚、毛髪、筋肉、血液（造血細胞）、間質細胞、及び神経幹細胞、又はその組合せを含む、請求項1に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/049583

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/713 C12N5/10 C12N5/074
ADD. A61P25/28 A61P39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MING YAN ET AL: "Modulation of Gene Expression by Polymer Nanocapsule Delivery of DNA Cassettes Encoding Small RNAs", PLOS ONE, vol. 10, no. 6, 2 June 2015 (2015-06-02), page e0127986, XP055319413, DOI: 10.1371/journal.pone.0127986 the whole document ----- WO 2013/025248 A1 (MELLO BIOTECHNOLOGY INC [US]; LIN SHI-LUNG [US]; CHANG DONALD C [US]) 21 February 2013 (2013-02-21) cited in the application the whole document ----- -/-	1-15
Y		1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"V" 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

23 November 2016

02/12/2016

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, Serge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/049583

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/049583

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/106011 A1 (LIN SHI-LUNG [US]; CHANG DONALD [US]; WU DAVID TS) 3 July 2014 (2014-07-03) the whole document -----	1-15
A	US 2015/132805 A1 (WU DAVID TS [TW] ET AL) 14 May 2015 (2015-05-14) the whole document -----	1-15
A	BAOJIAN LIAO ET AL: "MicroRNA Cluster 302-367 Enhances Somatic Cell Reprogramming by Accelerating a Mesenchymal-to-Epithelial Transition", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 19, 22 March 2011 (2011-03-22), pages 17359-17364, XP055320364, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.C111.235960 the whole document -----	1-15
E	US 2016/264974 A1 (LIN SHI-LUNG [US] ET AL) 15 September 2016 (2016-09-15) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2016/049583

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2013025248 A1	21-02-2013	EP 2742127 A1		18-06-2014
		JP 2014530596 A		20-11-2014
		TW 201321507 A		01-06-2013
		US 2013210120 A1		15-08-2013
		US 2015064771 A1		05-03-2015
		US 2015118734 A1		30-04-2015
		WO 2013025248 A1		21-02-2013
WO 2014106011 A1	03-07-2014	US 2013324590 A1		05-12-2013
		WO 2014106011 A1		03-07-2014
US 2015132805 A1	14-05-2015	NONE		
US 2016264974 A1	15-09-2016	NONE		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	1 0 0 Z
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34	A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/70 (2006.01)	C 1 2 N 15/70	Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(71)出願人 510087999
 ウー、デイビッド ティーエス
 WU , D a v i d T S
 台湾 タイペイ シティー 104 ジフ ロード レーン 157 ナンバー 15 11エフ

.

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 リン、シー - ラン

アメリカ合衆国 91007 カリフォルニア州 アーケーディア ピクトリア ドライブ 920

(72)発明者 チャン、ドナルド

アメリカ合衆国 90703 カリフォルニア州 セリトス ピカデリー レーン 16808

(72)発明者 ウー、デイビッド ティーエス

台湾 タイペイ シティー 104 ジフ ロード レーン 157 ナンバー 15 11エフ

.

F ターム(参考) 4B064 CA02 CA19 CC24 CC30 CD12 CE02 DA01

4B065 AA90X AB01 AC20 BA05 CA44

4C084 AA13 NA14 ZA891 ZB211 ZB261 ZC521

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA89 ZB21 ZB26 ZC52

4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB45 BB47 BB48 BB57 BB64 BB65

CA04 NA14 ZA89 ZB21 ZB26 ZC52