(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 7 月 16 日(16.07.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/105172 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/04 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/050467

(22) 国際出願日: 2015 年 1 月 9 日(09.01.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2014-003726 2014 年 1 月 10 日(10.01.2014) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

(72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 遠藤 慧(ENDO, Kei); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町２丁目１３番５号赤坂エイトワンビル７階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2015/105172 A1

(54) **Title**: METHOD FOR IDENTIFYING DESIRED CELL TYPE USING miRNA EXPRESSION AS AN INDICATOR

(54) 発明の名称 : ｍｉＲＮＡの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法

(57) **Abstract**: This is a method for identifying cell type with a high degree of accuracy while the cell is still alive. This method for identifying desired cell type includes the following steps, and uses as an indicator the expression of miRNA from cell groups containing two or more cell types: (1) a step in which mRNA which contains a marker gene functionally concatenated to the target sequence of miRNA which acts as an indicator is introduced into a cell; and (2) a step in which cells are identified, using the translation level of said marker gene as an indicator.

(57) 要約: 生細胞を生きたまま、高精度で判別する方法。以下の工程を含む、２種以上の細胞を含む細胞群から miRNA の発現を指標として所望の細胞種を判別する方法； （１）指標となる miRNA の標的配列と機能的に連結したマーカー遺伝子を含む mRNA を細胞に導入する工程、および （２）当該マーカー遺伝子の翻訳量を指標として、細胞を判別する工程。

明　細　書

発明の名称 ：

ｍｉＲＮＡの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法

技術分野

[0001] 本発明は、miRNAの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法に関する。

[0002] 多細胞生物の組織や器官は、多種類の細胞で構成されている。ヒトは、６０兆（６×１０^{13}）個もの細胞から構成され、その種類は、成熟細胞だけでも４１１種にも及ぶ。これらの細胞については、個々の細胞の機能を解析するだけでなくて、医療応用のための細胞調製において、細胞種を判別したり、同定したりする技術が重要になってきている。

[0003] 細胞を同定するためには、特異的に発現した細胞表面のリガンドを、抗体で検出する手法が一般的に知られている。しかし、抗体で細胞内の情報を検出するためには、対象細胞を固定・膜透過させる必要があり、生細胞の分取には応用することができないという問題があった。また、細胞表面に必ずしも細胞の特定が可能なレセプターが存在するものではない。また、抗体によるリガンド検出のような、一因子を、positive/negative（陰性または陽性）の２つに分類する手法（すなわち定性的に分類する手法）では、検出可能な組み合わせがごく限られ、詳細な分類が難しいという問題がある。

[0004] 細胞をより詳細に分類する方法、すなわち細胞を定量的に分類する方法としては、例えば、マイクロアレイや次世代シーケンシングなどを用いた多変量の測定に基づく細胞のプロファイリングが知られている。これらの方法では、タンパク質やRNAなどの細胞内分子について、多種類の分子を同時に定量測定し、また多変量解析などの統計解析を用いるなどして、定量的に細胞を分類することが可能である。しかし、測定をなされた細胞は破壊されてしまうため、細胞を生存させた状態では測定できないという問題がある。

[0005] 細胞を同定するための指標となる対象として、マイクロＲＮＡ（以下、miR

NAと指称する）が、着目されている。生細胞内でmiRNAを検出するための手法として、ＤＮＡもしくはウイルスを用いたレポーターコンストラクトを導入して行われるレポーターアッセイが用いられている。しかし、このような方法では、当該レポーターコンストラクトが宿主細胞のゲノムに組み込まれて残存するおそれがあり、この方法で同定された細胞は、医療応用時に問題が残る。また、従来のレポーターアッセイによるmiRNAの検出は、当該miRNAの標的遺伝子を探索することを目的とされており、細胞を同定することには用いられていない。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 細胞を生存させた状態で、高精度で判別する方法が望まれている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、特定の構造を有するmRNAを用いて生細胞内のmiRNAの発現の情報を定量的に得ることで、２種以上の細胞を含む細胞群から所望の細胞種を判別することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、一実施の形態によれば、以下の工程を含む、２種以上の細胞を含む細胞群からmiRNAの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法に関する：

（１）指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結した第一のマーカー遺伝子を含むmRNAを細胞

に導入する工程、および

（２）当該第一のマーカー遺伝子の翻訳量を指標として、細胞種を判別する工程。

[0009] 前記方法において、前記工程（１）が、指標となるmiRNAの標的配列および第一のマーカー遺伝子が共に異なる２以上のmRNAを同時に細胞に導入する工程であることが好ましい。

[0010] 前記方法において、前記所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞種であり、前記工程（２）が、当該第一のマーカー遺伝子の翻訳量が

多い細胞種を判別する工程であることが好ましい。

[0011] 前記方法において、前記所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が多い細胞種であり、前記工程（２）が、当該第一のマーカー遺伝子の翻訳量が少ない細胞種を判別する工程であることが好ましい。

[0012] 前記方法において用いられるmRNAにおいて、前記miRNAの標的配列が、第一のマーカー遺伝子の５’側に連結されていることが好ましい。

[0013] 前記方法において、前記判別が、フローサイトメトリーを用いて行われることが好ましい。

[0014] 前記方法において、前記判別が、イメージアナライザーを用いて行われることが好ましい。

[0015] 前記方法において、前記工程（１）の前に、所望する細胞種に特異的な指標となるmiRNAをスクリーニングする工程をさらに含むことが好ましい。

[0016] 本発明はまた別の局面によれば、指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結した第一のマーカー遺伝子を含むmRNAを含んでなる細胞判別キットに関する。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、細胞内情報であるmiRNA活性を指標として利用することで、高い分解能で細胞種を判別することができる。本発明による方法は、細胞が生存した状態で適用することができるため、判別後の細胞を種々の用途、特には医療用途において利用することができる点で特に有利である。また、本発明の方法は、細胞群にmRNAを導入することにより実施することができ、このmRNAは約１日程度の半減期で分解されて、細胞内から速やかに除去されるため、細胞内におけるウイルス感染やＤＮＡの残存により、ゲノムに損傷を与えるといった問題を生ずることがない。また、サイトメーターを利用した簡便な検出の方法においても有利である。特に、合成したmRNAを細胞に導入することにより、指標とする活性の検出誤差を低減でき、分離能を向上させることができ、高精度な判別が可能になった。本発明の有効な応用例として、例えば、多能性幹細胞を特定の細胞に分化させるに当たって、所望の特

性を備える多能性幹細胞、または当該多能性幹細胞から分化誘導により得られた細胞群より所望する細胞種を判別することによって、当該所望の細胞を分類、単離または選択的に排除することができる。

[0018] さらに、本発明の方法は、細胞群に含まれる複数の細胞種間で、指標とするmiRNAの発現にわずかな差しか存在しない場合、例えば、約１．５倍以下程度である場合でも、少なくとも二つの指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結した第一のマーカー遺伝子を含む２つのmRNAを用いることで、それらの細胞を判別することができる。これは、共導入した２つのmRNAから発現するレポーター蛋白質の活性比は、細胞集団内で一定でばらつきが小さいという発見に基づくものである。また、共導入するmRNAの種類を増やすことによって、より多くの指標に基づき、さらに多数の細胞の判別が可能になる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１は、フローサイトメトリーのドットプロット平面上で、異なる二種の細胞を分離する本発明の技術及び従来技術を模式的に説明する図である。

[図2]図２は、miRNA応答性レポーターmRNAあるいはコントロールmRNAを、２種類、二つの異なる細胞種に導入した場合の、シグナル率を示すヒストグラムである。

[図3A]図３Ａは、１種もしくは２種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる、既知の細胞株の二次元分離を示す一連の図である。

[図3B]図３Ｂは、二つの蛍光シグナルの比率を示すヒストグラム及び、2種のmiRNA応答性レポーターmRNAの累積曲線を示すグラフである。

[図3C]図３Ｃは、１種もしくは２種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる、既知の２種の細胞株の混合物の二次元分離を示す図、及び二つの蛍光シグナルの比率を示すヒストグラムである。

[図4]図４は、３種もしくは４種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる、既知の細胞株の二次元分離もしくは三次元分離を示す一連の図である。

[図5A]図５Ａは、４種のコントロールmRNAを用いた、3種の細胞株の三次元分離を示す一連の図である。

[図5B]図５Ｂは、４種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた、3種の細胞株の三次元分離を示す一連の図である。

[図6]図６は、miRNA応答性レポーターmRNAにおいて、miRNA標的配列の挿入部位が翻訳効率に及ぼす影響を示す図である。

[図7]図７は、miRNA応答性のレポーターmRNAが、細胞内のmiRNA活性に阻害効果を及ぼさないことを示す図である。

[図8]図８は、3種の細胞株における、選択された２０種のｍｉＲNA応答性レポーターmRNAの翻訳効率を示すグラフである。

[図9A]図９Ａは、２種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた、2種の細胞株の二次元分離を示す一連の図である。

[図9B]図９Ｂは、２種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた、2種の細胞株の二次元分離を示す一連の図である。

[図9C]図９Ｃは、２種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた、2種の細胞株の混合物の二次元分離を示す図である。

[図10]図１０は、イメージングアナライザーを用いた判別方法における、細胞の着色画像、並びに既知の細胞株の二次元分離を示す図である。

[図11A]図１１Ａは、フローサイトメトリー及びイメージングサイトメトリーによる、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた二次元分離を示す図である。

[図11B]図１１Ｂは、フローサイトメトリー及びイメージングサイトメトリーによる、３種の核局在化シグナル遺伝子に連結されたmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた二次元分離を示す図である。

[図12A]図１２Ａは、実施例９における、IMR-90において分離に用いるためのmiRNA応答レポーターmRNAのスクリーニング結果、及びTGF刺激あり、なしのIMR-90に、miRNA応答レポーターmRNAを共導入した場合のフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図12B]図１２Ｂは、図１２Ａ（ｃ）及び図１２Ｃ（ｆ）の結果を、ヒストグラムで示す図である。

[図12C]図１２Ｃは、TGF刺激あり、なしのIMR-90に核局在するレポーター蛋白質を発現するmiRNA応答レポーターmRNAを共導入した場合の、イメージングサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図13]図１３は、実施例１０における、NHLFにおいて分離に用いるためのmiRNA応答レポーターmRNAのスクリーニング結果、及び、同じ細胞集団NHLF正の相関性の高い miRNA に対する mRNA セット、またはそうではない miRNA セットを用いてを分離解析した結果を示す図である。

[図14]図１４は、第一スクリーニングの結果を細胞株(IMR-90）と初代培養細胞（NHLF）で比較した結果を示す図である。

[図15]図１５は、ある細胞群が同じ量のmRNAを取り込んだと仮定したとき、細胞群で2 つのmiRNA活性の分布がある場合、想定される結果を模式的に示す図である。

[図16]図１６は、第二スクリーニングの結果に基づいて選択した4種類のmiRNA応答mRNAをIMR-90に共導入した場合の結果を三次元の密度プロットとして示す図である。

[図17]図１７（ａ）は、TGF-β1で刺激なし（-TGF-β１；左図）または刺激あり（+ TGF-β１；右図）のIMR-90へコントロールmiRNA（hmAG1-M9）およびmiRNA応答レポーターmRNA（α(miR-145-5p)-hmKO2-M9）を共導入した場合のイメージングサイトメトリー解析結果を示す図である。図中、Bright Fieldは、位相差像を示し、hmAG1は、hmAG1の蛍光像を示し、APCは、αSMA抗体での染色像を示し、hmKO2は、hmKO2の蛍光像を示し、Hoechistは、核染色像を示し、ratioは、重ね合わせた蛍光像を示す。図１７（ｂ）は、TGF-β1で刺激なし（-TGF-β１：緑）または刺激あり（+ TGF-β１：紫）のIMR-90へコントロールmRNA（hmAG1-M9）およびmiRNA応答レポーターmRNA（α(miR-145-5p)-hmKO2-M9）を共導入した場合のフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。以下の実施形態は本発明を限定するものではない。

[0021] 本発明は、第一実施の形態によれば、２種以上の細胞を含む細胞群からmiRNAの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法に関する。本実施形態による判別方法は、以下の工程を含む：

（１）指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結した第一のマーカー遺伝子を含むmRNAを細胞に導入する工程、および

（２）当該第一のマーカー遺伝子の翻訳量を指標として、細胞種を判別する工程。

[0022] 本発明の、判別方法において、対象となる細胞群は、２種以上の細胞を含む細胞群であり、多細胞生物種から採取した細胞群であってもよく、単離された細胞を培養することによって得られる細胞群であってもよい。当該細胞群は、特には、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）採取した２種以上の体細胞を含む細胞群、若しくは哺乳動物より単離された細胞又は哺乳動物細胞株を培養することによって得られる細胞群である。体細胞としては、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Ｔリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、

歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。また、好ましい細胞群は、前期体細胞を採取後に人為的な操作を加えた細胞群であり、所望しない細胞を含む可能性がある細胞群である。例えば、前記体細胞から調製したｉＰＳ細胞を含んでなる細胞群であり、あるいはES 細胞やｉＰＳ細胞などによって例示される多能性幹細胞を分化させた後に得られる細胞群であって、所望する細胞以外に分化された細胞を含み得る細胞群である。本実施形態において、判別対象の細胞群は、生存状態にあることが好ましい。本発明において、細胞が生存状態にあるとは、代謝能を維持した状態の細胞を意味する。本発明は、細胞を本発明の方法に供し、判別方法の終了後においても、その生来の特性を失うことなく、生存状態のまま、特に分裂能を維持したまま、続く用途に用いることができる点で有利である。

[0023] 本発明の方法において、判別される「所望の細胞種」とは、miRNAの発現を指標として、他の細胞種と分類されるある一群の細胞をいう。特には、後に詳述するmiRNA活性について共通する特性を備えるある一群の細胞をいう。本発明においては、このようなmiRNAを指標として、他の細胞種と分類されるある一群の細胞を「同種の細胞」とも指称する。本発明の方法で判別される所望の細胞種は、１種であっても良く、２種以上、例えば、３種、４種、５種、６種、７種、または８種以上であってもよい。理論上、判別可能な細胞種は限定されるものではなく、本発明によれば、同時に１００種以上の細胞種を判別することもできる。

[0024] 本発明において、「所望の細胞種を判別する」とは、２種以上の細胞を含む細胞群の中から、所望の、特定の１以上の細胞種について、他の細胞種と異なる検出可能な信号情報を提示することをいい、特には、視覚的に認識可能な情報を提示することをいうものとする。なお、視覚的に認識可能な情報とは、細胞が直接的に視認しうる信号を発することに限定されるものではなく、細胞が発した信号を、数値、図表又は画像等によって視覚的に認識可能

な情報に変換された情報であり、当業者が視覚的に認識可能な情報をいう。本明細書において、判別するという文言には、当該判別の後に、所望の細胞種を認識し、所望の細胞種を識別し、所望の細胞種を同定し、所望の細胞種を分類し、所望の細胞種を単離し、所望しない細胞種を除去し、所望の細胞種の生死を判定し、所望の細胞種の特定の生物学的な信号を検出あるいは定量し、所望の細胞種の特定の物理的あるいは化学的な信号に基づいて分画することを含んでも良い。２種以上の細胞を含むことが未知であった細胞群が、本発明の方法を用いることによって異なる細胞種として判別することも、本発明において、所望の細胞種を判別することの一態様をなす。

[0025] ２種以上の細胞を含む細胞群からmiRNAの発現を指標として所望の細胞種を判別する態様は、上記のような種々の判別態様を含むほか、「２種以上の細胞を含む細胞群」についての属性が予めある程度既知である場合と、当該細胞群の属性について何ら情報がない場合とに分けられる。

細胞群の属性が予めある程度既知である場合とは、予め別の方法等で、細胞群に含まれる細胞種がある程度特定されている場合である。例えば、従来技術として説明した、抗体を用いて分類する方法や、マイクロアレイや次世代シーケンシングなどを用いた多変量の測定に基づく細胞のプロファイリングであるOmics解析/profiling法により、特定の細胞群に含まれる特定の細胞種が予め分析され、予測されている場合がある。その場合であっても、細胞が生存した状態で、本発明の方法により、所望の細胞種を判別することは有用である。

一方、細胞群の属性について何ら情報がない場合であっても本発明は適用することができる。

[0026] 前者の場合と、後者の場合とでは、指標となるmiRNAをスクリーニングする工程におけるスクリーニング方法が異なる場合がある。このようなスクリーニング工程は、任意選択的な前工程として本発明の方法に含んでも良い。詳細は、スクリーニング工程において後述する。

[0027] 本発明の方法においては、指標となるmiRNAの標的配列（以下、miRNA標的

配列ともいう）と機能的に連結した第一のマーカー遺伝子を含むメッセンジャーＲＮＡ（mRNA）を用いる。このようなmRNAは、特定のmiRNAが存在する場合に、その存在量に応じて第一のマーカー遺伝子の翻訳が制御される。好ましくは、特定のmiRNAが存在する場合に、その存在量に応じて第一のマーカー遺伝子の翻訳が抑制されることで、当該第一のマーカー遺伝子より翻訳された蛋白質（以下、マーカー蛋白質と指称する）の量が減少するmRNAである。

[0028] 本発明における「miRNAの発現」とは、成熟miRNAが、所定の複数の蛋白質と相互作用して、RNA-induced silencing complex（ＲＩＳＣ）を形成した状態にあるmiRNAが存在していることをいうものとする。「成熟miRNA」は、一本鎖ＲＮＡ（２０～２５塩基）であり、核外でDicerによる切断によってpre-miRNAから生じ、「pre-miRNA」は、Droshaと呼ばれる核内酵素による部分切断によって、ＤＮＡから転写された一本鎖ＲＮＡであるpri-mRNAから生じる。本発明におけるmiRNAとは、少なくとも１０，０００種類以上のmiRNAから適宜選択される。詳細には、データベースの情報（例えば、http://www.mirbase.org/又はhttp://www.microrna.org/）に登録されたmiRNA、及び／または当該データベースに記載されている文献情報に記載されたmiRNAより適宜選択される。すなわち、本発明においては、指標となるmiRNAは特定のmiRNAに限定されるものではない。本発明の方法を用いて判定する細胞種の特性に応じて指標となるmiRNAを適宜選択することができる。また、特には、判定対象となる細胞群中で、ある細胞では高発現（高活性）であり、別の細胞では低発現（低活性）であるような、１つのmiRNA、あるいは複数のmiRNAの組み合わせを選択することが好ましい。分離の精度をより高くするためである。このようなmiRNA、あるいは複数のmiRNAの組み合わせの選択は、後述するスクリーニング方法により実施することができる。このような、指標となるmiRNAは、本出願時において特定されているmiRNAには限定されず、今後、その存在及び機能が特定されるあらゆるmiRNAを含むものとする。

[0029] miRNA標的配列は、指標となるmiRNAに特異的に結合可能な配列をいう。miRNA標的配列は、例えば、指標となるmiRNAに完全に相補的な配列であることが

好ましい。あるいは、当該miRNA標的配列は、miRNAにおいて認識され得る限り、完全に相補的な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。当該miRNAに完全に相補的な配列からの不一致は、所望の細胞において、通常にmiRNAが認識し得る不一致であれば良く、生体内における細胞内の本来の機能では、４０～５０％程度の不一致があっても良いとされている。このような不一致は、特に限定されないが、１塩基、２塩基、３塩基、４塩基、５塩基、６塩基、７塩基、８塩基、９塩基、若しくは１０塩基又は全認識配列の１％、５％、１０％、２０％、３０％、若しくは４０％の不一致が例示される。また、特には、細胞が備えている mRNA 上の miRNA 標的配列のように、特に、シード領域以外の部分に、すなわち miRNA の 3’ 側 16 塩基程度に対応する、標的配列内の 5’ 側の領域に、多数の不一致を含んでもよく、シード領域の部分は、不一致を含まないか、１塩基、２塩基、若しくは３塩基の不一致を含んでもよい。

[0030] 第一のマーカー遺伝子は、細胞内で翻訳されて、マーカーとして機能し、細胞種の判別を可能にする任意の蛋白質をコードする遺伝子である。細胞内で翻訳されてマーカーとして機能しうる蛋白質としては、一例としては、蛍光、発光、呈色、若しくは蛍光、発光又は呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができる蛋白質であってよい。蛍光蛋白質としては、Sirius、EBFPなどの青色蛍光蛋白質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光蛋白質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green（例えば、hmAG1）、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、などの緑色蛍光蛋白質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光蛋白質；KusabiraOrange（例えば、hmKO2）、mOrangeなどの橙色蛍光蛋白質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、などの赤色蛍光蛋白質；TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRasberry、mPlumなどの近赤外蛍光蛋白質が挙げられるが、これらには限定されない。

[0031] 発光蛋白質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光又は呈色を補助する蛋白質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、βラクタマーゼなどの蛍光、発光又は呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらには限定されない。ここで本発明において、蛍光、発光又は呈色を補助する蛋白質を第一のマーカー遺伝子として使用する場合、所望の細胞の判別において、対応する前駆物質と細胞を接触させること、又は細胞内に対応する前駆物質を導入することによって行われ得る。

[0032] また、細胞内でマーカーとして機能しうる蛋白質の別の例としては、細胞の機能に直接影響を与える蛋白質類が挙げられる。細胞増殖蛋白質、細胞死滅蛋白質、細胞シグナル因子、薬剤耐性遺伝子、転写制御因子、翻訳制御因子、分化制御因子、リプログラミング誘導因子、RNA結合タンパク質因子、クロマチン制御因子、膜タンパク質を例示することができるが、これらには限定されない。例えば、細胞増殖蛋白質は、それを発現した細胞のみを増殖させ、増殖した細胞を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅蛋白質は、それを発現した細胞の細胞死を引き起こすことで、特定のmiRNAを含有、もしくは含有しない細胞自体を死滅させ、細胞の生死を示すマーカーとして機能する。細胞シグナル因子は、それを発現した細胞が、特定の生物学的信号を発し、この信号を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅蛋白質として、例えば、BaxまたはBimが例示される。翻訳制御因子は、一例としては、特定のRNAの3次構造を認識して結合することで他のmRNAからの蛋白質への翻訳を制御することでマーカーとして機能する。翻訳制御因子として、5R1、5R2 (Nat Struct Biol. 1998 jul; 5(7):543-6) 、B2 (Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov;12(11):952-7) 、Fox-1 (EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):163-73.) 、GLD-1 (J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):91-104.) 、Hfq (EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):396-405) 、HuD (Nat Struct Biol. 2001 Feb;8(2):141-5.) 、SRP19 (RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50) 、L1 (Nat Struct Biol. 2003 Feb;10(2):104-8.) 、L11 (Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7.

) 、L18 (Biochem J. 2002 Mar 15;362(Pt 3):553-60) 、L20 (J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.) 、L23 (J Biomol NMR. 2003 Jun;26(2):131-7) 、L25 (EMBO J. 1999 Nov 15;18(22):6508-21.) 、L30 (Nat Struct Biol. 1999 Dec;6(12):1081-3.) 、LicT (EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1987-97.) 、MS2 coat (FEBS J. 2006 Apr;273(7):1463-75.) 、Nova-2 (Cell. 2000 Feb 4;100(3):323-32) 、Nucleocapsid (J Mol Biol. 2000 Aug 11;301(2):491-511.) 、Nucleolin (EMBO J. 2000 Dec 15;19(24):6870-81.) 、p19 (Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811) 、L7Ae (RNA. 2005 Aug;11(8):1192-200.) 、PAZ (PiWi Argonaut and Zwille) (Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.) 、RnaseIII (Cell. 2006 Jan 27;124(2):355-66) 、RR1-38 (Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6.) 、S15 (EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908.) 、S4 (J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7.) 、S8 (J Mol Biol. 2001 Aug 10;311(2):311-24.) 、SacY (EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5019-29.) 、SmpB (J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39) 、snRNP U1A (Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7.) 、SRP54 (RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50) 、Tat (Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):3974-81.) 、ThrRS (Nat Struct Biol. 2002 May;9(5):343-7.) 、TIS11d (Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):257-64.) 、Virp1 (Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):5534-43.) 、Vts1P (Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb;13(2):177-8.) 、およびλN (Cell. 1998 Apr 17;93(2):289-99.) が例示される。より好ましい翻訳制御因子は、MS2 coat 、L7Aeである。

[0033] 本発明において、第一のマーカー遺伝子は、局在化シグナルをコードする遺伝子を備えていてもよい。局在化シグナルとしては、核局在化シグナル、細胞膜局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、タンパク質分泌シグナル等を挙げることができ、具体的には、古典的核移行配列 (NLS) 、Ｍ９配列、ミトコンドリア標的配列(MTS)、小胞体移行配列を挙げることができるが、これらには限定されない。このような局在化シグナルは、後述するイメージングサイトメトリー等で、本発明の方法における判別工程を、画像上で

行うときに特に有利である。

[0034] 本発明において、マーカーとして、翻訳制御因子を用いる場合、当該翻訳制御因子によって翻訳が制御される第二のマーカー遺伝子を有するmRNAを同時に細胞へ導入する。このような蛋白質によって翻訳が制御される第二のマーカー遺伝子を有するmRNAとして、当該翻訳を制御しうる蛋白質が結合できるRNA配列と機能的に連結された第二のマーカー遺伝子配列を有するmRNAが例示され、例えば、WO2009/066757またはWO2014/014122に開示されたmRNAが挙げられる。前記刊行物の全ての開示を参照により本明細書に含める。当業者は上記刊行物を参照することにより本発明の方法に好適に使用可能な蛋白質によって翻訳が制御される第二のマーカー遺伝子を有するmRNAを適宜選択することが可能である。本発明において、使用する第二のマーカー遺伝子は、上述した第一のマーカー遺伝子と同様の遺伝子を用いることができる。

[0035] 本発明の方法で用いるmRNAは、指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結した第一のマーカー遺伝子を含む。本発明の説明において、かかるmRNAを、miRNA応答性レポーターmRNAとも指称する。本発明においてmiRNAの標的配列と第一のマーカー遺伝子が機能的に連結するとは、第一のマーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む。）の５’ＵＴＲ内、３’ＵＴＲ内、及び／または当該オープンリーディングフレーム内に、少なくとも１つのmiRNA標的配列を備えることを意味する。mRNAは、好ましくは、５’末端から、５’から３’の向きに、Ｃａｐ構造（７メチルグアノシン５’リン酸）、第一のマーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム並びに、ポリＡテイルを備え、５’ＵＴＲ内、３’ＵＴＲ内、及び／またはオープンリーディングフレーム内に少なくとも１つのmiRNA標的配列を備える。mRNAにおけるmiRNA標的配列の位置は、５’ＵＴＲであっても、３’ＵＴＲであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの３’側）であってもよく、これらのすべてにmiRNA標的配列を備えていてもよい。したがって、miRNA標的配列の数は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つあるいはそれ以上であっても良い。

[0036] 好ましくは、miRNA標的配列は、５’ＵＴＲに１つ存在する。効率的な翻訳抑制を達成することができるためである。このとき、ｃａｐ構造とmiRNA標的配列と間の塩基数及び塩基の種類は、開始コドンとなるAUGを含まず、かつステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、ｃａｐ構造とmiRNA標的配列と間の塩基数は、０～５０塩基、好ましくは、１０～３０塩基となるように設計することができる。また、miRNA標的配列と開始コドンと間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、miRNA標的配列と開始コドンと間の塩基数は、０～５０塩基、好ましくは、１０～３０塩基となるように設計することができる。なお、miRNA標的配列が３’ＵＴＲに４つ存在する場合であっても、翻訳抑制を達成することは可能であることが確認されている。

[0037] miRNA応答性レポーターmRNAは、通常のウリジン、シチジンに替えて、シュードウリジン、５－メチルシチジンなどの修飾塩基を含んでいることが好ましい。細胞毒性を低減させるためである。修飾塩基の位置は、ウリジン、シチジンいずれの場合も、独立に、全てあるいは一部とすることができ、一部である場合には、任意の割合でランダムな位置とすることができる。

[0038] miRNA応答性レポーターmRNAは、上記に従って配列が決定されれば、遺伝子工学的に既知の任意の方法により当業者が合成することができる。特には、プロモーター配列を含むテンプレートDNAを鋳型として用いたin vitro転写合成法により、得ることができる。

[0039] miRNA応答性レポーターmRNAは、判別の目的、対象、あるいは指標となるmiRNA活性により、１種のみ用いる場合もあり、２種以上、例えば、３種、４種、５種、６種、７種、または８種以上用いる場合もある。例えば、２種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる場合、それぞれのmiRNA応答性レポーターmRNAは、miRNA標的配列、第一のマーカー遺伝子ともに、異なることが望ましい。また、２種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる場合、miRNA応答性レポーターmRNAに含まれるmiRNA標的配列の数、miRNA標的配列の５’末端からの距離、並びにmiRNA応答性レポーターmRNAにおけるその他の構造的

特徴は、各miRNA応答性レポーターmRNAにおいて異なっていても良い。

[0040] 本発明において、miRNA応答性レポーターmRNAを細胞に導入する工程（以下、導入工程と指称する）は、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて、１種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを直接、細胞群に含まれる細胞に導入する。異なる２種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入する場合、あるいはmiRNA応答性レポーターmRNAとコントロールとなるmRNA（以下、コントロールmRNAとも指称する）とを用いる場合には、複数のmRNAを細胞群に共導入することが好ましい。共導入した２以上のmRNAから発現するマーカー蛋白質の活性比は、細胞集団内において一定であるためである。この時の導入量は、導入される細胞群、導入するmRNA、導入方法および導入試薬の種類により異なり、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。ここで、コントロールmRNAとは、miRNA標的部位を有さず、miRNA応答性レポーターmRNAがコードする第一のマーカー遺伝子とは異なるマーカー遺伝子をコードするmRNAをいう。コントロールmRNAの導入量もまた、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。

[0041] miRNA応答性レポーターmRNAが細胞に導入されると、細胞内では、細胞に所定のmiRNAがＲＩＳＣとして存在する場合、miRNA応答性レポーターmRNAがコードする第一のマーカー遺伝子の翻訳量が制御、例えば翻訳量が抑制される。そして、翻訳量の制御は、miRNA活性に応じて定量的になされる。一方、細胞に所定のmiRNAが存在しない場合、もしくは所定のmiRNAがＲＩＳＣとして存在しない場合、miRNA応答性レポーターmRNAがコードする第一のマーカー遺伝子の翻訳量が抑制されることはない。したがって、所定のmiRNAがＲＩＳＣとして存在する細胞と、存在しない細胞との間で、第一のマーカー遺伝子の翻訳量が異なる。なお、本明細書において、所定のmiRNAがＲＩＳＣとして存在する場合を、「miRNA活性が存在する場合」とも指称する。一方、コントロールmRNAは、miRNA活性に関係なくマーカー蛋白質を発現する。導入されても

、miRNA標的配列が存在しないため、miRNA発現量に応じて翻訳制御されることがないためである。

[0042] 次いで、第一のマーカー遺伝子の翻訳量を指標として、細胞を判別する工程（以下、判別工程とも指称する）を実施する。判別工程では、上記のような第一のマーカー遺伝子の翻訳量から、細胞を判別する。すなわち、所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞であり、第一のマーカー遺伝子の翻訳量が多い細胞を判別する工程、及び／または、前記所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が多い細胞であり、当該第一のマーカー遺伝子の翻訳量が少ない細胞を判別する工程とすることができる。このような指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞、あるいは多い細胞は、２種以上の細胞を含む細胞群に属する細胞間で、第一のマーカー遺伝子の翻訳量の比率を得ることにより決定することができる。ここで、第一のマーカー遺伝子として、翻訳制御因子を用いた場合、同時に細胞へ導入した第二のマーカー遺伝子の翻訳量から、細胞を判別する。上述した第一のマーカー遺伝子により翻訳が抑制される第二のマーカー遺伝子を有するmRNAを利用することで、第二のマーカー遺伝子の翻訳量は、指標となるmiRNAの発現量と比例する。すなわち、所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞である場合、第二のマーカー遺伝子の翻訳量が少ない細胞を判別し、指標となるmiRNAの発現量が多い細胞である場合、第二のマーカー遺伝子の翻訳量が多い細胞を判別する。従って、例えば、第二のマーカー遺伝子として細胞死滅蛋白質を用いた場合、指標となるmiRNAの発現量が多い細胞は、特異的に細胞死を誘導され、取り除かれることができる。

[0043] 具体的には、判別工程は、所定の検出装置を用いて、マーカー蛋白質からの信号を検出することにより実施することができる。検出装置としては、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、CCDカメラ等が挙げられるが、これらには限定されない。このような検出装置は、マーカー蛋白質及び判別の態様により、当業者が適したものを用いることができる。例えば、マーカー蛋白質が、蛍光蛋白質又は発光蛋白質の

場合には、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、CCDカメラといった検出装置を用いてマーカー蛋白質の定量が可能であり、マーカー蛋白質が、蛍光、発光又は呈色を補助する蛋白質の場合には、発光顕微鏡、CCDカメラ、ルミノメーターといった検出装置を用いたマーカー蛋白質の定量方法が可能であり、マーカー蛋白質が、膜局在蛋白質の場合には、抗体などの細胞表面蛋白質特異的な検出試薬と、上記の検出装置を用いたマーカー蛋白質の定量方法が可能である他、磁気細胞分離装置(MACS)といった、マーカー蛋白質の定量過程を経ない細胞の単離方法が可能であり、マーカー蛋白質が薬剤耐性遺伝子の場合、薬剤投与により第一のマーカー遺伝子の発現を検出して、生細胞を単離する方法が可能である。

[0044] マーカー蛋白質が蛍光蛋白質の場合の好ましい検出方法の一例として、フローサイトメトリーが挙げられる。フローサイトメトリーは、個々の細胞において翻訳されたマーカー蛋白質である、蛍光蛋白質、発光酵素が発する光の強度を、判別の情報として提供することができる。以下に、フローサイトメトリーを用いた１以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた細胞種の判別の態様について、場合に分けて説明する。

[0045] ［ａ．miRNA応答性レポーターmRNAを用いる発現強度に基づく分離］

本発明の一態様によれば、miRNA応答性レポーターmRNAを１種類のみを用いる。miRNA応答性レポーターmRNAを１種類のみをある所望の細胞群に導入した場合に得られる蛍光強度値は、例えば、図１（ａ）を参照すると、グラフ平面外、紙面上の山型の分布のようになる。これは、対象の細胞群中において、各細胞に導入されるmRNAの数にばらつきが生じるためである。たとえば、所望の細胞内のmiRNA活性にしたがって、miRNA応答性レポーターmRNAからの翻訳が抑制されると、所望の細胞の山形の分布が左に移動する。この所望の細胞群から得られる蛍光強度値の分布が、他の細胞群から得られる蛍光強度値の分布と重ならない場合、これらのある所望の細胞群は、特定の蛍光強度値を備えるもののみを分離することにより、他の細胞群と、分離し、判別することができる。あるいは、図１（ａ）紙面上に示されるように、蛍光強度

値の分布に重なりがある場合であっても、分布に重なりのない端の領域を判別し、分離することができる。

[0046] ［ｂ．miRNA応答性レポーターmRNAとコントロールmRNAを用いる一次元分離］

本発明の一態様によれば、miRNA応答性レポーターmRNAを１種類のみ用い、コントロールmRNAを細胞に共導入することができる。コントロールmRNAの第一のマーカー遺伝子の翻訳は、miRNAの影響を受けることなく、細胞により一定であるといえる。コントロールmRNAは、miRNA標的部位を有さないこと以外は、miRNA応答性レポーターmRNAと同様に設計し、調製することができる。なお、本明細書中において、「次元」とは、マーカー遺伝子の翻訳比率、特には測定された蛍光強度値の比率についての「次元」をいうものとする。

[0047] 本発明においては、miRNA応答性レポーターmRNAとコントロールmRNAとが共導入された場合に、２つのmRNAから発現するマーカー蛋白質の活性比は、細胞集団内で一定でばらつきが小さいことがわかっている。したがって、２つのmRNAから発現するマーカー蛋白質の蛍光強度の比率を得ることにより、各細胞における特定のmiRNAの発現比率が得られる。

[0048] マーカー蛋白質の発現比率は、同種の細胞間ではほぼ一定であるが、ある程度のばらつきが存在する。これは、以下のような理由によるものである。

（１）miRNA発現量は、同種の細胞間でも多少のばらつきがある。

（２）発現したmiRNAと共導入されるmRNAとの反応率にもばらつきがある。

（３）共導入される２つのmRNAの細胞導入比率にも多少のばらつきがある。

その結果として、同種の細胞間でもマーカー蛋白質の発現比率にある程度の差が生ずる場合がある。そして、フローサイトメトリーで測定した場合に、miRNA応答性レポーターmRNAがコードするマーカー蛋白質の発現強度と、コントロールmRNAがコードするマーカー蛋白質の発現強度とをそれぞれＸ軸、Ｙ軸とした場合のドットプロットでは、同種の細胞は幅をもった帯状に分布する。この幅は、上記ばらつきに起因するものである。そして、異なる細胞種の数に対応する複数の帯状プロットが現れ、これらが分離されている場合

に、これらの細胞は判別可能である。一例として、判別工程において、フローサイトメトリーで測定した場合に、第１のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第１のマーカー蛋白質の発現強度と、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第２のマーカー蛋白質の発現強度とをそれぞれＸ軸、Ｙ軸とした場合のドットプロットでは、同種の細胞は幅をもった帯状に分布する。かかる態様を、図１（ａ）に模式的に示す。図１（ａ）においては、３つの帯状のプロット群が存在する。紙面、左上及び右下の帯状プロットは、２種のmiRNA応答性レポーターmRNAを共導入することにより、ドットプロット平面上で判別された異なる二種の細胞群を示す。真ん中の帯状プロットは、コントロール実験として、同じ細胞群にコントロールmRNAのみを導入した場合のマーカー蛋白質の発現強度を模式的に示すものであり、異なる二種の細胞群はドットプロット平面上で判別することができない。

[0049] 図１（ａ）の分離において、例えば、miRNA（ａ）を標的とする、第１のmiRNA応答性レポーターmRNA、miRNA（ｂ）を標的とする、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAとを用いる場合について説明する。これらのmRNAを用いて、細胞Ａ及び細胞Ｂを分類するとき、一方の細胞ＡでmiRNA（ａ）がより高発現（高活性）であり、もう一方の細胞ＢでmiRNA（ｂ）がより高発現（高活性）であると分離能が高くなる。言い換えると、一方の細胞Ａで、miRNA（ａ）応答性mRNAの翻訳が抑制され、他方の細胞ＢではmiRNA（ｂ）応答性mRNAの翻訳が抑制されると分離能が高くなる。図１（ａ）中、Ｘ軸に沿って紙面右から左への矢印と、Ｙ軸に沿った紙面上から下への矢印が、異なる方向への翻訳抑制を示すものである。そして、第１のmiRNA応答性レポーターmRNAについて、細胞Ａの翻訳抑制が細胞Ｂに対してα倍（α＞１）強く、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAについて、細胞Ｂの翻訳抑制が細胞Ａに対してβ倍（β＞１）強いと仮定したとき、α×βが約１．９倍以上であれば、フローサイトメトリーのドットプロット上で細胞Ａと細胞Ｂとを区別することができる。好ましくは２．０倍以上、さらに好ましくは２．５倍以上であれば、細胞Ａと細胞Ｂとをより明確に区別することができる。他の態様として、２つのmRNA

から得られる２つの蛍光値の比率によりヒストグラムを展開することによっても（例えば、図１（ａ）の左下のヒストグラム）、判別することができる。このような比率を用いて判別することで、細胞間のmRNA導入効率の違いを相殺することができる。

[0050] このような態様における、細胞種の分解能について、さらに説明する。図２は、細胞種Ａと細胞種Ｂとを、高い分解能で識別する本発明の原理を模式的に示した図である。前述の図１（ａ）において、複数の異なるmiRNA応答性レポーターmRNAについて、蛍光強度を観察すると、それらがフローサイトメトリーのドットプロット上で、分離した帯状に観察される。このことから、複数の蛍光強度値の比率の値（図１（ａ）左下）が、より良い分離を与えることがわかる。すなわち、２種類のmRNAを導入すると、２種類の蛍光強度値を測定でき、1種類の蛍光強度比率を得ることができる。そのため、対象の細胞は一次元的に（蛍光強度比率の数直線上に）分布し、分離される。図２（ａ）は、miRNA応答性レポーターmRNAと、コントロールmRNAをそれぞれ、二つの異なる細胞群Ａ、Ｂに導入した場合のシグナル率を示すヒストグラムである。ここでは、蛍光強度比率の分布の幅が、すなわちドットプロット上に示される帯の幅が、４倍のときを想定する。図２（ａ）を参照すると、マーカー蛋白質の量比として得られるmiRNA応答性レポーターmRNAの翻訳効率（すなわち当該miRNAの活性）に、細胞A、B の間で４倍の差があれば、ヒストグラム上で、２種類の細胞群の分離が可能であることがわかる。

[0051] ［ｃ．２種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる一次元分離］

本発明の別の態様においては、好ましくは、２種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを細胞に共導入する。２種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いることにより、細胞の分離能を高めることができるためである。図２（ｂ）は、翻訳効率の差がわずかしか存在しない場合であっても、高分解能を可能とする本実施形態を説明する模式図である。すなわち、細胞Ａに導入したときに、コントロールmRNAと比較して２倍程度の翻訳効率の差しかない第１のmiRNA応答性mRNA（フローサイトメトリーで得られた蛍光強度ＦＬ１）と、細

胞Ｂに導入したときに、コントロールmRNAと比較して２倍程度の翻訳効率の差しかない第2のmiRNA応答性mRNA（フローサイトメトリーで得られた蛍光強度ＦＬ２）であっても、これらの２種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いることにより、十分な分離することが可能になることが示される。ここで、第１のmiRNA応答性レポーターmRNAについて、細胞Ａの翻訳抑制が細胞Ｂに対してα倍（α＞１）強く、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAについて、細胞Ｂの翻訳抑制が細胞Ａに対してβ倍（β＞１）強いと仮定したとき、α×βの積算値が、図２で示されているそのある細胞種の分布の幅（この図では例として４倍）以上であれば、細胞ＡとＢとは分離できると考えられる。ここで例示されている４倍の幅は、比較的広い幅ができてしまった場合、つまり困難度が高い場合といえる。

[0052] なお、α＞１でβ＜１の場合、図２（ｂ）で説明すると、細胞集団は同じ方向に動くことになる。図では、右矢印に対応するβは（β＞１）、β＜１のとき左向きになる。たとえば、この図ではα＝８でＡが左に８倍動いて、β＝０．５で細胞Bが左に２倍動いても、細胞間には４倍の幅が残り（積算値：８×０．５）、分離される。しかし、この場合、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAではなく、miRNAに応答しないレポーターmRNA（β＝１）を使用した方が分離はよくなる（積算値８×１）。

[0053] 一方、比率のヒストグラムで細胞の分離を考える（図２）として、あるmiRNA応答性mRNAを使用すると、細胞集団のピークが左右にシフトするだけでなくて、細胞集団の幅も変わる。細胞の分離は、「細胞分布の幅」を超えられるまで、細胞の分布全体を左右にシフトさせる、といえ、分布全体のシフト量（差）がαβの積算値で決まる。一方、細胞分布の幅は、2種類のmiRNA応答性mRNAの組み合わせによっても広がったり、狭まったりする（実施例１０、図１５参照）。そこで、全体のシフト量を犠牲にしても、分布の幅を狭めることの方が、細胞の分離に有利な場合が想定される。

[0054] 従来技術に従って、異なる蛍光色素に結合した２種の抗体を用い、細胞の表面抗原により細胞を分離しようとした場合に、同様にフローサイトメトリ

ーで蛍光強度を測定すると、図１（ｃ）に模式的に示すようなドットプロットが得られる。すなわち、細胞Ａと細胞Ｂとの重なる部分が多く、これらの細胞を高精度で分離することは不可能である。これに対し、miRNA応答性レポーターmRNAを用い、かつ上記のようにある細胞では翻訳効率が相対的に抑えられ、別の細胞では翻訳効率が相対的に多くなるような、２種以上のmiRNA応答性mRNAの組み合わせを用いることで、分解能を高めることができる。

[0055] ［ｄ．３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる二次元分離］

さらに、miRNA応答性レポーターmRNAを３種以上用いて、複数の細胞に共導入することにより、同様の原理で分離能をさらに高めることが可能である。例えば、３種類のmRNAを導入すると、３種類の蛍光強度値を測定でき、２種類の蛍光強度比率を得ることができる。そのため、対象の細胞は二次元的に（蛍光強度比率の平面上に）分布し、分離される。一例として、２種の異なる細胞Ａ、Ｂに、miRNA（ａ）を標的とする、第１のmiRNA応答性レポーターmRNAと、miRNA（ｂ）を標的とする、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAと、miRNA（ｃ）を標的とする、第３のmiRNA応答性レポーターmRNAとを共導入する場合について説明する。フローサイトメトリーで測定した第１のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第１のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ１、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第２のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ２、第３のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第３のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ３とする。そして、ＦＬ１／ＦＬ３、ＦＬ２／ＦＬ３をそれぞれＸ軸、Ｙ軸としてドットプロットを作成すると、同種の細胞は、帯状ではなく、塊状に表れる。かかる態様を、図１（ｂ）に模式的に示す。図１（ｂ）における紙面左上から右下へ向かう点線上に存在する２つの塊は、第３のmiRNA応答性レポーターmRNAではなく、いずれのmiRNAにも応答しないコントロールmRNAを使用した場合に見られるドットプロットの塊を示す。これは、図１（ａ）の平面を、紙面左上から右下へ向かう大きな矢印で切断した面を示すものともいえる。これに対し、第３のmiRNA応答性レポーターmRNAを共導入することで、miRNA（ｃ）の活性の違いによって、さらに異なる

方向へ翻訳制御がなされた結果、点線上に存在する２つの塊が、それぞれ、さらに異なった方向（紙面右上並びに左下）に翻訳制御され、ドットプロット平面状でより明確に細胞Ａと細胞Ｂとが分離されるようになることがわかる。なお、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いて二次元分離をする場合に、３種のうち、いずれのmiRNA応答性レポーターmRNAからの蛍光強度を上記計算のＦＬ３としても、同様の分離結果を得ることができる。

[0056] ３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる二次元分離によれば、miRNAの活性状態が２倍単位で異なる細胞を２５種～６０種以上判別、分離することが可能になる。上述のように、理論上、2種のmiRNA応答性レポーターmRNAについての2種の細胞における翻訳効率の積算値が１．９倍以上であれば、フローサイトメトリーのドットプロット上で二種の細胞を区別することができるためである。よって、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる二次元分離は、細胞種の判別において実用的に用いることができる。例えば、あるmiRNAの活性状態が２倍ずつ５段階違う細胞がありえるとすると、２種類のmiRNA応答性mRNAと１種類のコントロールmRNAを同時に導入して、５×５＝２５種類の細胞を分離できると考えられる。３種類のmiRNA応答性レポーターmRNAでは、計算上、 ５×５×５＝１２５種類の細胞を分離できるが、実際にはオーバーラップがあるため、６１種程度の細胞を分離することができる。このことは、実施例２、図４（ｆ）にて実証している。

[0057] ［ｅ．４種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いる三次元分離］

上記ｄの態様と同様にして、４種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いて、三次元分離をすることも可能である。すなわち、４種類のmRNAを導入すると、４種類の蛍光強度値を測定でき、３種類の蛍光強度比率を得ることができる。そのため、対象の細胞は三次元的に（蛍光強度比率の空間中に）分布し、分離される。一例として、２種の異なる細胞Ａ、Ｂに、miRNA（ａ）を標的とする、第１のmiRNA応答性レポーターmRNAと、miRNA（ｂ）を標的とする、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAと、miRNA（ｃ）を標的とする、第３のmiRNA応答性レポーターmRNAと、miRNA（ｄ）を標的とする、第４のmiRNA応答性

レポーターmRNAとを共導入する場合について説明する。フローサイトメトリーで測定した第１のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第１のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ１、第２のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第２のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ２、第３のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第３のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ３、第４のmiRNA応答性レポーターmRNAがコードする第４のマーカー蛋白質の発現強度をＦＬ４とする。そして、ＦＬ１／ＦＬ４、ＦＬ２／ＦＬ４、ＦＬ３／ＦＬ４をそれぞれＸ軸、Ｙ軸、Ｚ軸としてドットプロットを作成すると、同種の細胞は、三次元空間に、それぞれが塊状に分布する。

[0058] また、更なる高次元分離が理論上可能であり、（ｎ＋１）種類の異なるmiRNA応答性レポーターmRNAを用いれば、（ｎ＋１）種類の蛍光強度値を測定でき、ｎ種類の蛍光強度比率を得ることができる。その結果、ｎ次元空間において、複数種の細胞分離が可能である。この場合も、（ｎ＋１）種類のmiRNA応答性レポーターmRNAにおいて、miRNA標的配列と、第一のマーカー遺伝子がそれぞれ異なる必要がある。特に、蛍光強度で分離する場合は、ｎ種のマーカー蛋白質が、検出可能に異なる波長領域を有する必要がある。

[0059] 本発明の判別工程における、別の検出方法の一例として、イメージングサイトメトリーが挙げられる。イメージングサイトメトリーは、イメージアナライザーを用いて実施することができる。イメージアナライザーは、細胞内の第一のマーカー遺伝子の翻訳量の経時変化の情報を得ることができ、また、画像化、視覚化の点で優れており、単位時間あたりの解析量を向上できるほか、細胞の形態情報や位置情報を包含した解析、培養容器に接着した状態の細胞や、平面的あるいは立体的に組織化された細胞群を対象にした細胞の同定といった応用が可能となる点で有利である。

[0060] イメージアナライザーを用いる場合であっても、フローサイトメーターを用いる場合と同様に、２種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAから得られる蛍光強度比をドットプロットとして平面上に示すことで、異なる細胞種を分離することができ、上記ａ～ｄの態様が実施可能である。

[0061] さらには、画像処理により、細胞の蛍光強度比を色情報に変換して、より視覚的に利用可能な判別工程とすることができる。具体的には、複数のmiRNA応答性レポーターmRNAにおいて、核局在化シグナルをコードする配列、例えばＭ９を含むように設計する。これにより、細胞内で、マーカー蛋白質が、核局在化シグナルに融合された状態で翻訳され、細胞内の核にマーカー蛋白質を局在化させて、より鮮明な細胞の蛍光画像を得ることができる。

[0062] 本発明の方法においては、任意選択的な前工程として、指標となるmiRNAをスクリーニングする工程を含むことが好ましい。スクリーニング工程では、測定対象となる「２種以上の細胞を含む細胞群」に含まれる、もしくは含まれると予測される複数種の細胞において、活性が異なる１つあるいは複数のmiRNAを選別する。上述の所望の分解能を達成するためである。特に、予め細胞群に含まれる細胞種がある程度分かっている場合には、ある細胞Ａでは高発現（高活性）であり、別の細胞Ｂでは低発現であるような１つのmiRNAを選別する。２種以上の指標となるmiRNAを選択する場合、ある細胞Ａでは高発現（高活性）であり、別の細胞Ｂでは低発現（低活性）であるようなmiRNA（ａ）と、ある細胞Ａでは低発現（低活性）であり、別の細胞Ｂでは高発現（高活性）であるようなmiRNA（ｂ）である、miRNAの組み合わせを選別する。かかる工程において決定された１もしくは２以上のmiRNAに基づいて、miRNA応答性レポーターmRNAにおける、miRNA標的配列を決定する。

[0063] 細胞群に含有される細胞が単離された細胞（例えば、細胞Ａおよび細胞Ｂ）としてそれぞれが入手可能な場合、スクリーニング工程は、以下の３つのステップを含む方法によって成し得る。第１ステップは、miRNAライブラリから選択した複数種のmiRNAをスクリーニングする。例えば、６０～７０種のmiRNAについて、各miRNAを標的とし、同一の蛍光蛋白質をコードするmiRNA応答性レポーターmRNAを調製する。そして、既知の細胞Ａ、Ｂのそれぞれに、各miRNA応答性レポーターmRNAと、別の蛍光蛋白質をコードするコントロールmRNAとを共導入し、翻訳効率（コントロールmRNAから翻訳されたマーカー蛋白質／ miRNA応答性レポーターmRNAから翻訳されたマーカー蛋白質）を測定する。

[0064] 第２ステップは、第１のステップで測定された翻訳効率の値のうち、２種、３種、あるいは４種を組み合わせて、それらの値で構成されるベクトルを、細胞A、細胞Bのそれぞれの座標ベクトル（例えば、ＸＹ座標、ＸＹＺ座標、あるいは任意のｎ次元座標（ｎは4以上の整数）とし、当該座標における細胞間の距離を算出する。既知の細胞を３種類以上含む場合は、含まれる全ての２細胞間の距離のうち、もっとも短い距離を算出する。

[0065] 第３ステップは、第２のステップで計算された細胞間の距離を大きくする、２種、３種、あるいは４種のmiRNAを標的配列とし、各々異なる蛍光蛋白質遺伝子をコードする、１セットのmiRNA応答性レポーターmRNAを調製する。１セットのmiRNA応答性レポーターmRNAを、細胞Ａ、Ｂあるいは３種類以上の細胞それぞれに共導入し、分離能について試験する。複数のセットのうち、それぞれの細胞の蛍光比率の分布が、それぞれ異なる領域にあらわれ、分布間のオーバーラップが小さいという試験結果が得られたものを、以下の導入工程及び判別工程で用いることが好ましい。

[0066] 一方、本発明とは異なる分離方法が既知である細胞群の場合には、スクリーニング工程の第１ステップにおいて、別の手法を用いた分離を同時に実施し、分離された細胞ごとの翻訳効率、すなわちmiRNA活性の値を測定する、といった操作をさらに必要とする。本発明とは異なる分離方法とは、例えば、分離時に細胞を固定、膜透過して抗体を用いて細胞内因子を検出する方法や、生細胞であってもあらかじめ遺伝子を改変するなどして、スクリーニング工程を目的に使用する細胞（レポーターラインなど）を用いる手法が考えられるが、これらの方法には限定されない。第２ステップ、第３ステップについては、上記と同様にして実施することができる。本スクリーニング方法については、実施例９に実証する。

[0067] 測定対象となる「２種以上の細胞を含む細胞群」に含まれる複数種の細胞が未知である場合には、上記のスクリーニング工程を、以下の第１～第４ステップを含んでなるスクリーニング工程に代えることができる。第１ステップでは、細胞群のmiRNA活性の値を測定するとともに、細胞群内の個々の細胞

が示すmiRNA活性の分布を得る。その結果、miRNA活性が広い分布を示すような複数種のmiRNAを選択する。例えば、６～１０種のmiRNAを選択することが好ましい。

[0068] 第２ステップは、第１のステップで選択されたmiRNAのうち、２種、３種、あるいは４種の組み合わせのセットをつくる。第２ステップは、１セットに含まれる２種、３種、あるいは４種のmiRNAを標的配列とし、各々異なる蛍光蛋白質遺伝子をコードする、１セットのmiRNA応答性レポーターmRNAを調製する。

[0069] 第３ステップは、第２のステップで調製された、２種、３種、あるいは４種のmiRNA応答性レポーターmRNAから構成される１セットのmiRNA応答性レポーターmRNAを、細胞群に共導入し、細胞群内におけるmiRNA活性の相関関係を分析する。

[0070] 第４ステップは、第３のステップで分析された、miRNA活性の相関関係に基づいて、２種、３種、あるいは４種のmiRNA応答性レポーターmRNAから構成される１セットのmiRNA応答性レポーターmRNAをあらたに調製し、細胞群に共導入し、分離能について試験する。複数のセットのうち、細胞群の蛍光比率の分布が２種、３種、４種、あるいはそれ以上の集団に分離されるという試験結果が得られたものを、以下の導入工程及び判別工程で用いることが好ましい。このような、「２種以上の細胞を含む細胞群」に含まれる複数種の細胞が未知である場合には、本発明の判別方法は、新しい細胞種の定義を与える方法であるともいえる。本スクリーニング方法については、実施例１０及び１１に実証する。

[0071] 別の任意選択的な前工程として、miRNA応答性レポーターmRNAを合成する工程を含んでもよい。かかる合成工程は、前記スクリーニング工程において、指標となるmiRNAもしくはmiRNAの組み合わせが決定されたら、それらを標的とするmiRNA標的配列を備えるmiRNA応答性レポーターmRNA、もしくはmiRNA応答性レポーターmRNAの組み合わせを合成する。

[0072] さらに、任意選択的な別の工程として、判別工程の後に、細胞を分離する

工程を含んでも良い。

[0073] 上記においては、細胞の具体的な判別例として、判別工程において、フローサイトメトリー及びイメージングサイトメトリーを用いる場合を例示して説明したが、本発明は上記態様には限定されず、理論的に種々の態様での判別が可能となる。

[0074] 本発明はまた、別の局面によれば、１種のmiRNA応答性レポーターmRNAもしくは、2種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAの組み合わせを少なくとも含んでなり、任意選択的にコントロールｍRNAをさらに含んでなる、細胞種の判別のためのキットに関する。このようなキットは、上記で説明したmiRNA応答性レポーターmRNAもしくは、2種以上のmiRNA応答性レポーターmRNAの組み合わせを保存可能な容器等に封入してなるものであってよい。また、使用方法についての説明書を備えるものであっても良い。

実施例

[0075] 以下に、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は本発明を限定するものではない。

[0076] ［プラスミドの構築］

コントロールtagRFP mRNA（配列番号24）のIVTテンプレート（mRNAの合成用の鋳型DNA）は、T7Fwd5UTR 及びRev120Aのプライマーセットを用いて、プラスミドpSRT-tagRFPからPCR増幅した。最初に、FwdMCS及びRevMCSのプライマーセットを用いて、PCR-based site directed mutagenesisにより、pGEM T-easy (Promega)のマルチクローニングサイトを改変してpAM空ベクターを得た。次に、pCDFDuet-1 (Novagen)をNheI 及び AgeIで消化したDNA断片を平滑末端化し、pAM のDraI で消化したDNA断片に挿入し、ｐSM空ベクターを生成した。次に、pSRT空ベクターを造るために、オリゴDNAのペアであるCode5UTR 及びComp5UTRをアニーリングしてEcoRI-NcoIサイトに挿入し、次いで、アニーリングしたCode3UTR及びComp3UTR を、 XbaI-HindIII サイト（あるいは「部位」）に挿入した。最後に、tagRFPのコード配列を適切なプライマーセットを用いてPCR増幅して、NcoI及びBglIIで消化し、pSRTのNcoI及びBglIIサイ

トに挿入し、pSRT-tagRFPを得た。

[0077] 蛍光蛋白質に、核局在化シグナルであるM9を融合するために、hmAG1、hmKO2、tagBFPのコード領域を適当なプライマーセットを用いて増幅し、pSRT-tagRFPのtagRFP領域を置換した。次いで、M9配列をp4LambdaN22-3mEGFP-M9（参考文献［４］）からのプライマーセットFwdM9及びRevSV40を用いて増幅し、BamHI及びBglIIで消化し、BglIIサイトに挿入した。プライマー及びオリゴヌクレオチドの配列は、以下の表１に示す。

[0078]

[表1A]

name	sequence (5' to 3')	Seq ID No.
FwdEGFP	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCGTGAGCAAGGGC	40
RevEGFP	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	41
FwdtagBFP	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCAGCGAG	42
RevtagBFP	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACTCGAGATGCATATGAGATC	43
FwdhmAG1	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGTGATCAAGCCCG	44
RevhmAG1	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCACTTGGCCTGGCTGGGC	45
FwdhmKO2	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGTGTGATTAAACCAGAGATG	46
RevhmKO2	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCAGGAATGAGCTACTGCATCTTCTACCTG	47
FwdhdKeimaRed	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGTGATCGCCAAG	48
RevhdKeimaRed	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCAGCCCAGCAGGCTGTGC	49
RevM9	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACTCGAGATGCATATGAGATC	50
T7Fwd5UTR	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG	51
Rev5UTR	CATGGTGGCGACCGGTGTCTTATATTTCTTCTTACTC	52
temp5UTR	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACACCGGTCGCCACCATG	53
Fwd3UTR	TCTAGACCTTCTGCGGGGC	54
Rev3UTR	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCAAG	55
temp3UTR	TCTAGACCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGG	56
T7FwdA	GCTAATACGACTCACTATAGGTCAGATCCGCTAGGATC	57
T7FwdB	GCTAATACGACTCACTATAGGTTCCTTAATCGCGGATCC	58
Rev120A	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

[表1B]

name	sequence (5' to 3')	Seq ID No.
CFwdtagRFP	GCCACCATGGGATCCGTGTCTAAGGGCGAAGAGC	66
CRevtagRFP	GCTCGAGATCTATTAAGTTTGTGCCCCAGT	67
CFwdtagBFP	GCCACCATGGGATCCAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC	68
CRevtagBFP	ACTCGAGATCTGTGCCCCAGTTTGCTAG	69
CFwdhmAG1	GCCACCATGGGATCCGTGAGCGTGATCAAGCCCG	70
CRevhmAG1	TATGAGATCTCTTGGCCTGGCTGGGC	71
CFwdhmKO2	GCCACCATGGGATCCGTGAGTGTGATTAAACCAGAGATG	72
CRevhmKO2	TATGAGATCTGGAATGAGCTACTGCATCTTCTACCTG	73
FwdM9	GAGATCCATGGGATCCAATCAGTCTTCAAATTTTGGAC	74
RevSV40	CTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGC	75
Rev120A-2	TTTT

[表2]

miRNA		Primer	
name	ID	name	Sequence ID
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	5Tmi133a_Afwd/5Tmi133a_Arev	182/183
hsa-miR-17-3p	MIMAT0000071	5Tmi17_3_Afwd/5Tmi17_3_Arev	184/185
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	5Tmi17_5_Afwd/5Tmi17_5_Arev	186/187
hsa-miR-1	MIMAT0000416	5Tmi1_Afwd/5Tmi1_Arev	188/189
hsa-miR-206	MIMAT0000462	5Tmi206_Afwd/5Tmi206_Arev	190/191
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	5Tmi21_Afwd/5Tmi21_Arev	192/193
hsa-miR-367-3p	MIMAT0000719	5Tmi367_Afwd/5Tmi367_Arev	194/195
hsa-miR-373-5p	MIMAT0000725	5Tmi373_5_Afwd/5Tmi373_5_Arev	196/197

[0081] [表3]

miRNA		Primer	
name	ID	name	Sequence ID
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	5UTR-T92a-3p	198
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	5UTR-T16-5p	199
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	5UTR-T197-3p	200
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	5UTR-T24-3p	201
hsa-miR-339-5p	MIMAT0000764	5UTR-T339-5p	202
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	5UTR-T224-5p	203
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	5UTR-T127-3p	204
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	5UTR-T365a-3p	205
hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261	5UTR-T183-5p	206
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	5UTR-T331-3p	207
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	5UTR-T203a	208
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	5UTR-T214-3p	209

[0082] [表4]

miRNA		Primer	
name	ID	name	Sequence ID
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	3UTRtemp_4xT21-5p	210
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	3UTRtemp_4xT17-5p	211

[0083] IVTのテンプレートを生成するために、それぞれ、１０ｐｍｏｌの５’ＵＴＲ断片及び３’ＵＴＲ断片、及び５０ｎｇのレポーター蛋白質の蛋白質コード領域を、表２に示したT7FwdA及びRev120Aのプライマーセットを用いてＰＣＲ増幅して、連結した。表３に示した、他の５’ＵＴＲは、オリゴＤＮＡから合成し、PCRで作製した5’ UTR 断片に替えて、２回目のＰＣＲに添加した。コントロールmRNAまたはスクリーニングライブラリ調製するために、２回目のＰＣＲでは、T7FwdA に替えて、それぞれ、T7Fwd5UTRまたはT7FwdBを使用した。３’ＵＴＲにmiRNAの標的配列を4コピー含むmRNAのIVTテンプレートは、表４に示したオリゴＤＮＡを３’ＵＴＲのＰＣＲ断片の代わりに使用し、Rev120Aに替えて、Rev120A-2を使用してＰＣＲ増幅し、連結した。ＰＣＲ産物は、MinElute PCR purification kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製した。精製の前に、プラスミドから増幅されたＰＣＲ産物を、Dpn I (Toyobo)を用いて、37 °Cで３０分消化した。プライマーの配列は、表１に示す。

[0084] ［mRNAの合成及び生成］

miRNA応答性レポーターmRNAは、修正されたプロトコル（下記の参考文献［１］を参照）において、MegaScript T7 kit (Ambion)を用いて調製した。この反応にいて、ウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に替えて、シュードウリジン-5’-三リン酸及び5-メチルシチジン-5’-三リン酸(TriLink BioTechnologies)をそれぞれ用いた。IVT (mRNA合成) 反応の前に、グアノシン-5’-三リン酸は、Anti Reverse Cap Analog (New England Biolabs)で５倍希釈した。反応混合液を３７度で４時間インキュベートして、TURBO DNase (Ambion)を添加した後、３７度でさらに３０分インキュベートした。得られたｍＲＮＡは、FavorPrep Blood / Cultured Cells total RNA extraction column (Favorgen Biotech) で精製し、Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)を用いて、３７度で３０分インキュベートした。その後、RNeasy MiniElute Cleanup Kit (QIAGEN)により、さらに精製した。

[0085] ［miRNA応答性mRNAのスクリーニング］

miRNA応答性mRNAのスクリーニングは３ステップで行った。第１のステップでは、miRNA応答性reporter hmAG1 mRNA を、コントロールhmKO2 mRNAと共導入して、活性が細胞により大きく異なる８つのmiRNAを選択した。第２のステップでは、４つのmiRNA応答性レポーターmRNAの組み合わせ表を作成して、試験した。この組み合わせ表では、８つのmiRNAから選ばれた、どの２つのmiRNAのペアについても、４種類のマーカー蛍光蛋白質から選ぶことができる、あらゆる２つの組み合わせが網羅されるようにした。第３のステップでは、新たに４つのmiRNA応答性レポーターmRNAを組み合わせて、いくつかのセットについて、試験した。

[0086] ［細胞培養］

HeLa細胞及びMCF-7細胞は、10% Fetal Bovine Serum (FBS) 及び 1% Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)-F12及びRPMI 1640でそれぞれ培養した。293FT細胞(invitrogen)は、10% FBS, 2 mM L-Glutamine (invitrogen), 0.1 mM Non-Essential Amino Acids (invitrogen), 1 mM Sodium Pyruvate (Sgima), 0.5% Penicillin-Streptomycin (invitrogen)を添加したDMEM中で成長させた。細胞を混合した実験においては、それぞれの細胞をHeLa細胞と同じ培地で調製し、同数の細胞を混合して播種した。

[0087] IMR-90細胞(ATCC)は、10% FBS 、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco)を添加したイーグル基礎培地中の、ゼラチンコートしたプレート上で培養した。正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF; Lonza)は、製造者の指示に従って培養した。IMR-90は２０継代以内、NHLFは１０継代以内のものを用いた。IMR-90細胞をin vitroで分化させるために、これらの細胞を低血清培地 (0.01% FBS)中で４８時間飢餓状態とし、低血清培地中で、10 ng/mLのhuman TGF-β1 (哺乳類由来; PeproTech)の存在下あるいは非存在下、２４時間刺激した。次いで、上記で設計、調製したmiRNA応答性レポーターmRNAでトランスフェクトした。トランスフェクションの４時間後、培地をトランスフェクションのと

きと同じ培地に交換した。

[0088] ［miRNA応答性レポーターmRNAによるトランスフェクション］

培養細胞(HeLa, 293FT, MCF-7, IMR-90)は２４ウェルプレートに播種し、翌日に、合成したmRNAを導入した。NHLFは２４ウェルプレートに播種し、その日に、合成したmRNAを導入した。導入には、１μＬのStemFect（Stemgent)を用いて、製造者の指示に従って実施した。翻訳効率の測定においては、それぞれ１００ｎｇの、各種miRNAに応答するレポーターEGFP mRNAと、コントロールtagRFP（Evrogen）mRNAとをそれぞれの細胞に共導入した。ただし、mRNAの設計を比較した実験（実施例３、図６）では、２ｐｍｏｌのmirVana miRNA inhibitor (Applied Biosciences)の存在下で翻訳効率を決定した。

[0089] インヒビターアッセイにおいては、0.1～1pmolのmiRNAインヒビター、または、２５～２００ｎｇのレポーターmRNA（クリックビートルルシフェラーゼCBRluc (Promega)の遺伝子をＯＲＦに含み、レポーターEGFPと同じ5’ＵＴＲを有する）が、２つのレポーターmRNAとともに共導入された。導入の24時間後、Accuri C6 (BD Biosciences) を用いたフローサイトメトリー法で細胞を測定した。各細胞における二種類のレポーター蛋白質の蛍光強度の比を計算し、プロットした。翻訳効率は、miRNAに応答したEGFPの平均強度を、フローサイトメトリーにより測定したコントロールｔａｇＲＦＰの平均強度で割ることにより決定した。

[0090] 二つのmiRNA応答性レポーターmRNAを用いて細胞を分離するために、１００ｎｇのEGFPを発現するレポーターmRNA、及び１２５ｎｇのhmKO2（Amalgaam）を発現するレポーターmRNAを細胞またはその混合物に共導入した。IMR-90細胞の最初のスクリーニングでは、５０ｎｇのレポーターhmAG1（Amalgaam）mRNA、及び８０ｎｇのコントロールhmKO2 mRNAを細胞にトランスフェクトした。分化させたIMR-90細胞及びNHLF細胞については、hmAG1 mRNA及びhmKO2 mRNAsを２倍にした。３つのmRNAの共導入においては、４０ｎｇのhmAG1 mRNA、１０ｎｇのhmKO2 mRNA、２００ｎｇのtagBFP（Evrogen）mRNAを、４つのmRNAの共導入においては、これらの３つに加えて、２５０ｎｇのhdKeimaRed（Ama

lgaam）mRNAを用いた。CBG68luc mRNA（配列番号31）は、hmAG1 mRNA, hmKO2 mRNA 及びtagBFP mRNAを希釈するために用いた。培地はトランスフェクションの４時間後に交換した。

[0091] ［フローサイトメトリー］

トランスフェクションの２４時間後に細胞を培養皿から分離し、メッシュを通して、フローサイトメトリーにより分析した。２つのmRNAによる共導入の分析には、FL1 (530/30 nm) 及び FL2 (585/40 nm) filters フィルターを備えたAccuri C6 (BD Biosciences)を用いた。３つのmRNAもしくは４つのmRNAによる共導入の分析には、FACSAria (BD Biosciences)を用いた。hmAG1, hmKO2, tagBFP 及び hdKeimaRedは、FITC filter (530/30 nm)を備えたblue laser (488 nm)により検出した。PE filter (585/42 nm)を備えたgreen laser (561 nm)、Pacific Blue filter (450/40 nm)を備えたviolet laser (405 nm)、及びQdot 605 filter (610/20 nm)を備えたviolet laserにより、それぞれ分析した。死細胞及びデブリは、前方及び側方光散乱シグナルにより除外した。翻訳効率の測定においては、EGFPの強度及びtagRFPの強度は、EGFPまたはtagRFPによりトランスフェクトされた細胞のデータセットから得られたspectral matrix（参考文献［５］）に基づいて補正した。翻訳効率は、補正したEGFPシグナルの平均強度を、補正したtagRFPシグナルの平均強度で割って得られた値により定義した。

[0092] ［イメージングサイトメトリー］

レポーター蛍光蛋白質をＣ末端側で核局在化シグナルＭ９に融合し、共導入した細胞を明確化した。３つのmRNAを導入した２４時間後、IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare)を用いて、細胞の明視野像及び蛍光画像を得た。hmAG1、hmKO2、tagBFPの蛍光シグナルは、FITC filterを備えた青色レーザー、DsRed filterを備えた緑色レーザー、DAPI filterを備えたＵＶレーザーでそれぞれ測定した。得られた画像は、Cell Profiler （参考文献［２］）を用いて解析した。まず、三つの蛍光チャネルの平均イメージにおいて、核を識別した。次いで、フローサイトメトリーと同様に、各ピクセル毎に、hmKO2

シグナル及びtagBFPシグナルを、hmAG1シグナルで割った。そして幾何平均率をそれぞれの核について得た。画像は、ImageJ （アメリカ国立衛生研究所（NIH）製）を用いて編集した。

[0093] ［実施例１　miRNA応答性レポーターmRNAによる、既知の細胞株の一次元分離］

１種もしくは２種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる、既知の細胞株の一次元分離を行った。結果を図３に示す。図３（ａ）は、本実施例において用いた、インビトロ合成されたmiRNA応答性レポーターmRNAの模式図である。紙面左手５’末端から紙面右手の３’末端の向きに、ＡＲＣＡ（キャップ構造アナログ），miRNA標的配列、蛍光蛋白質をコードする遺伝子、ポリＡテイルが位置する。ＡＲＣＡとmiRNA標的配列、miRNA標的配列と開始コドンの間はそれぞれ、約２０塩基離れるように設計した。

[0094] 図３（ｂ）は、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを３種の細胞株にそれぞれ導入した場合の翻訳効率を比較して示すグラフである。マーカー遺伝子としては、いずれもEGFPをコードする遺伝子を用い、miRNA標的配列は、miR-21-5p、miR-24-3p、miR-203aをそれぞれ用いた。３種のmiRNA応答性レポーターmRNA（α(miR-21-5p)-EGFP（配列番号1）、α(miR-24-3p)-EGFP（配列番号3）、α(miR-203a)-EGFP（配列番号5））は、それぞれ、１００ｎｇを、100 ngのコントロールtagRFP mRNA（配列番号24)とともに、HeLa, 293FT 、MCF-7細胞に直接、共導入した。翻訳効率は、共導入の２４時間後のフローサイトメトリー測定で、EGFPの平均強度を、tagRFPの平均強度で割ることにより決定した。各グラフのカラムの上部の数値は、それぞれの細胞株間の翻訳効率の倍率を示す。エラーバーは、平均±標準偏差（ｎ＝３）を示す。

[0095] 図３（ｃ）は、miR-21-5p応答性EGFP mRNAと、コントロールhmKO2 mRNA（配列番号22）とを共導入したHeLa細胞、293FT細胞について、共導入の２４時間後の測定結果を示すドットプロットである。また、図３（ｆ）は同じmRNAをHeLa細胞と293FT細胞との混合物に共導入した２４時間後の測定結果を示すドットプロットである。Accuri C6 フローサートメーターを用いて測定した

場合の、独立に３回の試験を行い、代表的な結果を示した。miRNA活性の相違を反映する蛍光強度比から、２種の細胞株が明らかに分離されたことが示される。

[0096] 図３（ｄ）は、miR-24-3p応答性EGFP mRNAと、miR-203a応答性hmKO2 mRNA（配列番号6）とを共導入したHeLa細胞、MFC-7細胞について、共導入の２４時間後の測定結果を示すドットプロットである。また、図３（ｈ）は同じmRNAを、HeLa細胞とMFC-7細胞との混合物に共導入した２４時間後の測定結果を示すドットプロットである。図３（b）を参照すると、これらのmiRNAは、二つの細胞株で、活性がわずかに及び逆向きに異なっていることがわかる。図３（ｄ）、（ｈ）を参照すると、このようなわずかな活性の差を用いて、２種類の細胞株が明確に分離されていることがわかる。

[0097] 図３（ｅ）は、二つの蛍光シグナルの比率を示すヒストグラムである。HeLa細胞、MCF-7細胞、及びこれらの混合物に、各ヒストグラムに示されたmiRNA応答性レポーターmRNA／コントロールmRNA（EGFP mRNA（配列番号19）またはhmKO2 mRNA（配列番号２２））のセットを共導入した。2種のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入した細胞の蛍光比率の累積頻度は、一番下のカラムに示す。また、図３（ｇ）は、図３（ｃ）、図３（ｆ）のドットプロットにおける、二つの蛍光シグナルの比率を示すヒストグラムである。

[0098] ［実施例２　高次元空間での細胞分離］

３種もしくは４種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる細胞分離を行った。まず、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAである、α(miR-24-3p)-EGFP、α(miR-127-3p)-EGFP（配列番号7）、α(miR-17-5p)-EGFP（配列番号9）、α(miR-92a-3p)-EGFP（配列番号15）について、HeLa、293FT、MCF-7細胞における翻訳効率を測定した。結果を図４（ａ）（ｄ）に示す。各カラムの頂部の数値は、３種の細胞株のうち、２種についての翻訳効率の比率を示す。エラーバーはそれぞれ、平均値±標準偏差（ｎ＝３）を示す。

[0099] ３種のmiRNA応答性レポーターmRNA（α(miR-24-3p)-hmAG1（配列番号4）、α(miR-127-3p)-hmKO2（配列番号8）、α(miR-17-5p)-tagBFP（配列番号13）

）を用いた二次元分離を行った結果を図４（ｂ）に示す。３種の細胞株に、それぞれ独立に、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを共導入し、２４時間後に、FACSAriaで分析した。フローサイトメトリーのデータは、２つの比率についてプロットした。２つの比率は、hmKO2強度をhmAG1強度で割った値、及びtagBFP強度をhmAG1強度で割った値である。共導入されたHeLa細胞、293FT細胞、MCF-7細胞密度を平面上にプロットした。着色した密度プロットは、293FT細胞、HeLa細胞、及びMCF-7細胞の密度を、それぞれ、赤、緑、青のチャンネルで示した画像を重ね合わせ、そのネガ画像として作製した。

[0100] ３種の細胞を混合したサンプルについて、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた二次元分離を行った結果を図４（ｃ）に示す。フローサイトメトリーのデータは、２つの比率についてプロットした。

[0101] ４種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた三次元分離を行った。HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物のそれぞれに、4種のコントロールmRNAである、hmAG1 mRNA（配列番号21）、hmKO2 mRNA（配列番号22）、tagBFP mRNA（配列番号20）、hdKeimaRed mRNA（配列番号23）を共導入した。また、HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物のそれぞれに、4種のmiRNA応答性レポーターmRNAである、α(miR-24-3p)-hmAG1、α(miR-127-3p)-hmKO2、α(miR-92-3p)-tagBFP（配列番号17）、α(miR-17-5p)-hdKeimaRed（配列番号14）を共導入した。導入の24時間後にフローサイトメトリー分析を行った。４種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた三次元分離を行った結果を図４（ｅ）に示す。フローサイトメトリーによる測定後、３つの比率の幾何平均、すなわち、hmKO2強度をhmAG1強度で割った値、tagBFP強度をhmAG1強度で割った値、及びhdKeimaRed強度をhmAG1強度で割った値を計算して、プロットした。エラーバーは、それぞれの軸における、幾何平均±幾何標準偏差を示す(n=5900～7300)。

[0102] 細胞密度は、3つの軸に垂直な3つの平面にプロットし、hmKO2、tagBFP、hdKeimaRedの蛍光強度はそれぞれ、hmAG1の蛍光強度で割った。密度プロットは、図５に示す。図５は、3回の独立した実験のうち、代表的な結果である。図

５Ａ（ａ）、（ｂ）より、4種のコントロールmRNAを共導入した3種の細胞株は、いずれの平面のプロットを参照しても分離ができていないことがわかる。一方、図５（ｃ）より、4種のmiRNA応答性レポーターmRNAを共導入した3種の細胞株は、いずれの平面のドットプロットにおいても、明確に分離ができている。また、図５（ｄ）より、3種の細胞株の混合物においても、同様に分離が目視で確認できる。すなわち、細胞株混合物を、3種の細胞株に分離するような判別が可能になる。

[0103] miRNA標的配列を持たない、コントロールmRNAであるhmAG1 mRNA, hmKO2 mRNA、tagBFP mRNAをそれぞれ、2倍ずつ5段階に希釈して、様々な組み合わせでHeLa細胞に共導入した。46通りの独立した導入結果から得られる密度プロットを図４（ｆ）に示す。Set A は、4段階の２倍希釈から得られるドットプロットを含む群であり、Set Bは5段階の２倍希釈から得られるドットプロットを含む群である。詳細な導入条件は、表５Ａ、表５Ｂに示した。複数のコントロールmRNAを種々の濃度に希釈したこの実験は、細胞内でのmiRNA活性により生じうる種々のmiRNA応答性レポーターmRNAを示すものである。すなわち、理論的に、3種類のmiRNAに注目し、そのmiRNAの活性が、細胞ごとに2倍ずつ4段階異なると想定した（最大43=64種類の細胞種を想定できる）場合、3種類のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いることでこれらの細胞を最大37種類に分離することができることを示唆している。またmiRNAの活性が2倍ずつ5段階異なる場合でも、同じ方法で分離できることを示唆している（その場合は最大53=125種類の細胞種が想定でき、３種類のmiRNA応答性レポーターmRNAで61種類にまで分離できる）。

[0104]

[表5A]

Set	Dilution factor			hmKO2/hmAG1		tagBFP/hmAG1	
	hmAG1 (40 ng)	hmKO2 (10 ng)	tagBFP (200 ng)	mean	90% interval	mean	90% interval
A	1	1	1	1.574	2.245	2.965	1.973
A	1	1	2	1.442	2.280	1.401	2.008
A	1	1	4	1.660	2.593	0.787	1.975
A	1	1	8	1.603	2.377	0.383	1.937
A	1	2	1	0.929	1.940	2.806	1.886
A	1	2	2	0.878	2.426	1.386	1.953
A	1	2	4	0.952	2.304	0.753	2.007
A	1	2	8	0.897	2.235	0.365	1.987
A	1	4	1	0.472	2.787	2.825	2.047
A	1	4	2	0.469	2.382	1.447	2.057
A	1	4	4	0.517	2.737	0.793	1.966
A	1	4	8	0.459	2.197	0.341	1.995
A	1	8	1	0.277	2.710	2.968	1.971
A	1	8	2	0.298	3.082	1.545	2.088
A	1	8	4	0.272	3.230	0.710	2.019
A	1	8	8	0.284	3.086	0.389	2.045
A	1	1	1	9.564	2.687	15.421	2.587
A	1	1	2	9.031	2.431	7.598	2.502
A	1	1	4	10.309	2.433	4.166	2.415
A	1	1	8	9.847	2.328	2.012	2.268
A	8	2	1	6.004	2.009	15.804	3.018
A	8	2	2	5.903	2.027	7.718	3.157
A	8	2	4	5.581	2.071	3.819	2.898
A	8	2	8	5.832	2.078	2.093	2.396
A	8	4	1	3.380	2.131	15.611	3.558
A	8	4	2	3.166	1.987	8.567	2.789
A	8	4	4	3.244	2.051	4.150	2.758
A	8	4	8	3.219	1.951	2.196	2.360
A	8	8	1	1.709	2.336	16.277	2.502
A	8	8	2	1.648	2.164	8.270	2.441
A	8	8	4	1.720	2.145	4.311	2.393
A	8	8	8	1.881	2.247	2.196	2.532
A	2	1	8	2.897	1.663	0.614	2.026
A	2	8	1	0.543	2.981	4.638	2.142

[表5B]

Set	Dilution factor			hmKO2/hmAG1		tagBFP/hmAG1	
	hmAG1 (40 ng)	hmKO2 (10 ng)	tagBFP (200 ng)	mean	90% interval	mean	90% interval
A	4	1	8	5.279	1.723	1.092	2.057
A	4	2	8	3.291	1.736	1.203	2.139
A	4	8	1	1.020	2.603	9.637	2.382
A	4	8	2	0.992	2.511	4.675	2.360
B	1	1	16	1.742	1.657	0.199	2.062
B	1	16	1	0.193	5.100	2.857	2.129
B	1	16	16	0.203	4.997	0.219	2.162
B	16	1	16	16.047	2.784	1.610	2.336
B	16	16	1	2.006	2.553	29.087	4.669
B	16	1	1	15.916	2.640	25.754	3.660
B	4	16	1	0.636	4.540	8.858	2.585
B	4	1	16	5.799	1.675	0.631	2.042

*mean: geometric mean

*90% interval: fold-change

[0105] ［実施例３　miRNA標的配列の挿入と翻訳効率］

レポーターmiRNA応答性レポーターmRNAにおける、miRNA標的配列の位置について調べた。miR-21-5pの標的部位である、miR-21-5pの完全相補配列が、５’UTRに１つ存在するmiRNA応答性レポーターmRNA（α(miR-21-5p)-EGFP（配列番号1））と、miR-21-5pの完全相補配列が、３’UTRに４つ存在するmiRNA応答性レポーターmRNA（EGFP-4xα(4xmiR-21-5p)（配列番号2））とを調製し、これらについて翻訳効率を調べた。同様にして、miR17-5pの標的部位である、miR-17-5pの完全相補配列が、５’UTRに１つ存在するmiRNA応答性レポーターmRNA（α(miR-17-5p)-EGFP（配列番号9））と、miR-17-5pの完全相補配列が、３’UTRに４つ存在するmiRNA応答性レポーターmRNA（EGFP-4xα(4xmiR-17-5p)（配列番号10））とを調製し、これらについて翻訳効率を調べた。レポーターmRNAが応答するmiRNAに対する阻害剤(inhibitor)の存在下で各レポーターmRNAの翻訳効率を測定した。miR-1 に対する阻害剤をネガティブコントロールとして使用した。阻害剤の濃度は、2 pmolとした。エラーバー

はそれぞれ、平均値±標準偏差（ｎ＝２）を示す。結果を図６に示す。

[0106] ［実施例４　miRNA応答性レポーターmRNAのmiRNAインヒビターとしての活性］

市販のmiRNA阻害剤とmiRNA応答性レポーターmRNAの違いを検証する実験を行った。市販のmiRNA阻害剤あるいは、miR-17-5p応答性レポーターmRNA （α(miR-17-5p)-CBRLuc（配列番号33）；ルシフェラーゼ遺伝子のため蛍光は示さない）の存在下で、同じmiR-17-5p に応答する α(miR-17-5p)-EGFPの、HeLa細胞中での翻訳効率を測定した。miR-1 に対する阻害剤、miR-1に応答するルシフェラーゼmRNA（α(miR-1)-CBRLuc（配列番号32））をネガティブコントロールとして使用した。結果を図７（ａ）に示す。エラーバーはそれぞれ、平均値±標準偏差（ｎ＝３）を示す。この結果より、miRNA応答性レポーターmRNAは、miRNAインヒビターとして機能することはほとんどないことがわかる。

[0107] 他の6種類のmiRNAに応答するレポーターmRNA（ルシフェラーゼ）（α(miR-21-5p)-CBRluc ： 配列番号34、α(miR-92a-3p)-CBRluc ： 配列番号35、α(miR-24-3p)-CBRluc ： 配列番号36、α(miR-127b-3p)-CBRluc ： 配列番号37、α(miR-16-5p)-CBRluc ： 配列番号38、α(miR-203a)-CBRluc ： 配列番号39）がmiRNA阻害剤としては働かないことを確認した。

それぞれのmiRNAの活性は、そのmiRNAに応答するEGFP レポーターmRNAで測定した。このとき、miR-1（ネガティブコントロール）または、同じmiRNAに応答するルシフェラーゼレポーターmRNAを導入した。3回の試験結果を図７（ｂ）に示す。

[0108] ［実施例５　３種の細胞株におけるmiRNA応答性レポーターmRNAの翻訳効率］

３種の細胞株に、それぞれ、20種のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入し、翻訳効率の比率を調べた。図８は、3種の細胞株における、これら20種のmiRNA応答性レポーターmRNAの翻訳効率を示すグラフである。（ａ）は、HeLaと293FTの比較、（ｂ）は、293FTとMCF-7との比較、（ｃ）は、MCF-7とHeLaと比較を示す。エラーバーはそれぞれ、平均値±標準偏差（ｎ＝３）を示す。本

結果で得られた翻訳効率の値を用いて、この値で構成されるベクトルを考えた場合の座標における細胞間の距離を算出して、他の実施例で使用したmiRNA応答性レポーターmRNAの組み合わせを選択した。

[0109] ［実施例６　２種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる一次元分離］

実施例１と同様に２種のmiRNA応答性レポーターmRNAによる、2種の細胞株の蛍光強度比率に基づく一次元分離を行った。図９に一連の結果を示す。あるmiRNA応答性レポーターmRNAによる翻訳効率、すなわちmiRNA活性が2倍以下である2種の細胞株においても、293FTとHeLaの分離、もしくは、293FTとMCF-7の分離が可能であったことを示す。エラーバーはそれぞれ、平均値±標準偏差（ｎ＝３）を示す。

[0110] 293FT細胞とHeLa細胞における、miR-24-3p、miR-17-5pの活性を調べるために翻訳効率を測定した。測定には、α(miR-24-3p)-EGFP、α(miR-17-5p)-EGFPを用いた。結果を図９（ａ）に示す。各カラムの頂部の数値は、翻訳効率の比率を示す。293FTとHeLa、及びこれらの混合物に、α(miR-24-3p)-EGFP、α(miR-17-5p)-hmKO2（配列番号12）を共導入し、導入の24時間後にフローサイトメトリー分析を行った。コントロールmRNAとしては、EGFP、hmKO2を用いた。図９（ｂ）にドットプロットの結果を示す。293FT細胞とHeLa細胞が、異なる帯状プロットとして、判別されていることがわかる。また、図９（ｇ）に、293FTとHeLaとの混合物についての同様のドットプロットを示す。これらの結果から、混合物について測定した場合でも、それぞれの細胞が分離して観察できることがわかる。図９（ｃ）にシグナル比率のヒストグラムを示す。それぞれの細胞株に、各ヒストグラムに示されたmiRNA応答性レポーターmRNA／コントロールmRNAのセットを共導入した。フローサイトメトリーで測定した2種の蛍光シグナル比を計算し、プロットした。2種のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入した細胞の累積頻度は、図９（ｃ）の一番下のカラムに示す。

[0111] 同様に、293FT細胞とMCF-7細胞における、miR-17-5p、miR-127-3pの活性を調べるために翻訳効率を測定した。測定には、α(miR-17-5p)-EGFP、α(miR-127-3p)-EGFPを用いた。結果を図９（ｄ）に示す。各カラムの頂部の数値は

、翻訳効率の比率を示す。293FTとMCF-7、及びこれらの混合物に、α(miR-17-5p)-EGFP、α(miR-127-3p)-hmKO2を共導入し、導入の24時間後にフローサイトメトリー分析を行った。コントロールmRNAとしては、EGFP、hmKO2を用いた。図９（ｅ）にドットプロットの結果を示す。293FT細胞とMCF-7細胞が、異なる帯状プロットとして、判別されていることがわかる。また、図９（ｈ）に、293FTとMCF-7との混合物についての同様のドットプロットを示す。これらの結果から、混合物について測定した場合でも、それぞれの細胞が分離して観察できることがわかる。図９（ｆ）にシグナル比率のヒストグラムを示す。それぞれの細胞株に、各ヒストグラムに示されたmiRNA応答性レポーターmRNA／コントロールmRNAのセットを共導入した。フローサイトメトリーで測定した2種の蛍光シグナル比を計算し、プロットした。2種のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入した細胞の累積頻度は、図９（ｆ）の一番下のカラムに示す。

[0112] ［実施例７　レポーター蛍光蛋白質が核局在化シグナルに連結した３種のmiRNA応答性レポーターmRNAの共導入］

HeLa、293FT、MCF-7細胞に、核局在化蛍光蛋白質を発現する3種のmiRNA応答性レポーターmRNAである、40 ngのα(miR-24-3p)-hmAG1-M9（配列番号25）、10 ngのα(miR-127-3p)-hmKO2-M9（配列番号26)、200 ngのα(miR-17-5p)-tagBFP-M9（配列番号27)を共導入した。導入の24時間後にイメージングサイトメトリー分析を実施した。図１０（ａ）は、導入した細胞の蛍光画像を示す。図中、は100 μmを示す。hmKO2, hmAG1、tagBFPはそれぞれ、赤、緑、青のチャンネルで示した。図１０（ａ）から、核により、強度のばらつきがあることがわかる。図１０（ｂ）は、図１０（ａ）と同一の対象について測定したデータを、二つの比率を用いて疑似カラー処理した結果を示す。共導入された細胞の核を抜きだし、それぞれのピクセルにおける蛍光強度について分析した。hmKO2の蛍光シグナルを、hmAG1の蛍光シグナルで割った比率、及びtagBFPの蛍光シグナルを、hmAG1の蛍光シグナルで割った比率をそれぞれ、１０－０．２５～１００．７５と、１０－０．５～１００．５の範囲を０～

１に正規化して、紫色、緑色で示した。図１０（ｃ）は、これらの比についての密度プロットを示す。

[0113] ［実施例８　フローサイトメトリー及びイメージングサイトメトリーによる、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた二次元分離］

HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物のそれぞれに、３種のコントロールmRNA、hmAG1、hmKO2、tagBFPを共導入した。また、HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物のそれぞれに、レポーター蛍光蛋白質が核局在化シグナルに連結した3種のコントロールmRNA、hmAG1-M9（配列番号28）、hmKO2-M9（配列番号29）、tagBFP-M9（配列番号30）を共導入した。同様に、HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物のそれぞれに、３種のmiRNA応答性レポーターmRNAである、α(miR-24-3p)-hmAG1、α(miR-127-3p)-hmKO2、α(miR-92-3p)-tagBFPを共導入した。同様に、HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物のそれぞれに、レポーター蛍光蛋白質が核局在化シグナルに連結した3種のmiRNA応答性レポーターmRNAである、α(miR-24-3p)-hmAG1-M9、α(miR-127-3p)-hmKO2-M9、α(miR-92-3p)-tagBFP-M9を共導入した。これらを導入の24時間後に、フローサイトメトリー分析及び、イメージングサイトメトリー分析を実施した。3回の独立した実験のうち、代表的な結果を図１１に示す。

[0114] ３種のコントロールmRNAを導入した、HeLa細胞、293FT細胞、MCF-7細胞、及びこれらの混合物の、フローサイトメトリー分析結果を図１１（ａ）に、イメージングサイトメトリー結果を、図１１（ｃ）に示す。また、レポーター蛍光蛋白質が核局在化シグナルに連結した3種のコントロールmRNAを共導入した、HeLa細胞、293FT細胞、MCF-7細胞、及びこれらの混合物の、フローサイトメトリー分析結果を図１１（ｅ）に、イメージングサイトメトリー結果を、図１１（ｇ）に示す。いずれの結果からも、細胞の分離ができていないことがわかる。

[0115] ３種のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入した、HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物の、フローサイトメトリー分析結果を図１１（ｂ）に、イメージングサイトメトリー結果を、図１１（ｄ）に示す。また、レポーター蛍

光蛋白質が核局在化シグナルに連結した3種のmiRNA応答性レポーターmRNAを共導入した、HeLa、293FT、MCF-7、及びこれらの混合物の、フローサイトメトリー分析結果を図１１（ｆ）に、イメージングサイトメトリー結果を、図１１（ｈ）に示す。3種のmiRNA応答性レポーターmRNAを導入した場合、フローサイトメトリーでも、イメージングサイトメトリーでも、同様に3種の細胞の分離が可能になった。混合物においても、独立したプロット群が認められることから、3種の細胞の分離が可能であることがわかる。さらに、レポーター蛍光蛋白質が核局在化シグナルに連 結した3種のmiRNA応答性レポーターmRNAを用いた場合にも、同様の結果が得られた。

[0116] ［実施例９　miRNA応答性レポーターmRNAを用いた線維芽細胞株の分離］

由来の異なる細胞株だけでなく、同一の細胞株の状態の違いを識別する実験を行った。ここでは、代表的なヒト正常細胞として、IMR-90 に注目した。IMR-90は静止状態から TGF刺激で平滑筋方向に分化することが知られている。IMR-90で発現が確認されており、かつCAUを含まないmiRNAを67種類選び、hmAG1をレポーター蛋白質として発現するmiRNA応答レポーターmRNAのライブラリーを作製した（配列番号77～143）。これをそれぞれ、IMR-90にコントロールhmKO2 mRNAとともに導入して、フローサイトメトリー解析を行った。

[0117] 次いで、1次スクリーニングしてIMR-90で活性な、26のmiRNA 応答 mRNAを得た。結果を図１２Ａ（ａ）に示す。図１２Ａ（ａ）中、平均蛍光比率（ＦＬ２／ＦＬ１）が 0.199 以上のものを活性ありと判断し（コントロールのmiRNAに応答しないmRNAでは 0.198）、26 の miRNA 中、類似度の高い２種類を省略した２４の miRNA 応答 mRNAを抽出した。

[0118] さらに筋分化に関連する２のmiRNAに対するmiRNA応答レポーターmRNAを作製した（配列番号144、145）。これらに加えて、前項で抽出した２４のmRNAと、前項では活性が観察されなかったmRNAのうち、TGFシグナルや筋分化に関連の高いmiRNAに応答する６のmRNAを合わせた、合計32 mRNAについて、IMR-90に対するTGF-β1刺激の前後で活性が変化したmiRNAを探索する2 次スクリーニングを実施した。IMR-90は2日間飢餓状態においた後、10ng/mL のTGF-β1

で刺激した。翌日mRNAを導入し、さらに翌日フローサイトメトリー解析を行った。これら合計32種類のmiRNAを探索した結果を、図１２Ａ（ｂ）に示す。図１２Ａ（ｂ）中、最も活性が高かったmiRNA応答mRNA（α(miR-145-5p)-hmAG1）（配列番号117）を次の実験で用いた。

[0119] イメージングサイトメトリーは以下の通りに行った。TGF刺激あり、なしのIMR-90をmiRNA応答mRNA（α(miR-145-5p)-hmAG1とhmKO2のペア）と抗αSMA抗体で同時に染色した。

分化誘導、およびmRNA導入後のIMR-90の免疫染色は以下の方法で行った。mRNA共導入の1日後、培地と等量のCytofix Fixation Buffer (BD Biosciences) を加え、37°Cで10分間静置して、細胞を固定した。次いで、Pharmingen Stain Buffer (FBS, BD Biosciences) で洗浄後、Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) 中で氷上30分静置して、細胞膜の透過処理を行った。洗浄後、Blocking One（ナカライテスク）中で氷上30分静置した。10% Blocking Oneを含むPharmingen Stain Buffer (FBS) を用いて 200倍希釈した抗αSMA抗体で、細胞を室温30分間染色した。洗浄後、Hoechist 33342 (Life Technologies) で染色した。染色後の細胞は IN Cell Analyzer 6000 で解析した。

[0120] 細胞内因子に対するフローサイトメトリーは以下の通りに行った。分化誘導、およびmRNA導入後のIMR-90を培養プレートから剥離させ、上記のCytofix Fixation BufferおよびPhosflow Perm Buffer IIIを用いて、説明書の指示に従って細胞を固定、膜透過させた。

膜透過後の細胞を、上記と同様に、Blocking One で細胞をブロッキングした後、100倍希釈した抗αSMA抗体を用いて、室温30分間染色した。染色後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリー解析を行った。

[0121] フローサイトメトリー解析結果を図１２Ａ（ｃ）に密度プロットで示した。図１２Ａ（ｃ）の結果より、α(145-5p)-hmAG1を用いることで同一の細胞の分化状態の差を判別することができた。図１２Ｂ（ｄ）に同様の実験結果をヒストグラムで示した。ここではコントロールのmRNAペアを導入した結果を実線及び一点鎖線で示した。従来技術である抗体染色法の場合には、細胞

を固定する必要があり、ヒストグラムに示されるように分布の幅が広く、重なり部分も多かった。一方、本発明の方法では生細胞をそのまま使用することができ、分布の幅が狭く、十分な判別が可能であることが示された。

[0122] 同様の実験を核局在するレポーター蛋白質を用いて行い、イメージングサイトメトリーを実施した。結果を図１２Ｃ（ｆ）に示す。ここでは、画像解析を行って、ピクセルあたりの蛍光比率(hmKO2/hmAG1）を計算し、写真上で緑色で示した。抗体からの蛍光強度はマゼンタで示した。図１２Ｂ（ｅ）に同様の実験結果をヒストグラムで示した。ここでもコントロールのmRNAペアを導入した結果を実線及び一点鎖線で示した。

[0123] 図１２Ｂ（ｅ）、図１２Ｃ（ｆ）の結果から、本発明のmRNAを用いた場合、TGF-β1刺激があった場合と無かった場合では、核に局在した蛋白質の量比が異なることが示された。そして、この結果は、図１２Ｂ（ｄ）に示したフローサイトメトリー解析で得られた結果と良く合致していることがわかった。

[0124] さらに、miRNA応答mRNAのレポーター蛋白質の組み合わせを変えて、α(miR-145-5p)-hmKO2とhmAG1のペアを用いて同様の解析を行った。イメージングサイトメトリーの結果を図１７（ａ）へ、およびフローサイトメトリーの結果を図１７（ｂ）に示す。その結果、上記のα(miR-145-5p)-hmAG1とhmKO2のペアを用いた場合同様に、TGF-β1の添加により、筋分化させることで、SMA陽性細胞におけるmiR-145-5pの発現が高くなり、対応するレポーター蛋白質の発現が減少することが確認された。

以上より、レポーター蛋白質の種類に依存せず、生細胞を判別が可能であることが示された。

[0125] ［実施例１０ miRNA応答性レポーターmRNAを用いたprimary culture (NHLF）の細胞集団の判別］

同じ67 miRNAライブラリーを使って、株化細胞ではなく、ヒト正常肺線維芽細胞の初代培養細胞(NHLF)の集団内のmiRNA 活性を調べた。図１３（ａ）に、細胞を選別する（細胞の混合具合を明らかにする）mRNAの探索戦略を示

す。第一スクリーニングではmiRNAの活性を検出して67 miRNAから8 miRNAを選別した。第二スクリーニングでは 8 miRNA とレポーター蛋白質を組み合わせて、56セットのレポーター mRNAを探索した。

[0126] IMR-90 と同じ67種類のmiRNA応答レポーターmRNAのライブラリーを使用して、ヒト正常肺線維芽細胞の初代培養細胞（NHLF）におけるmiRNA活性を探索した。結果を図１３Ａ（ｂ）に示す。ここでは特に、mRNAを導入された細胞集団がつくる蛍光比率のピーク幅（90% interval）を解析し、その幅が広い8つのmiRNA（miR-16-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-143-3p, let-7i-5p）を選んだ。

[0127] 図１４（ａ）、（ｂ）は、第一スクリーニングの結果を細胞株（IMR-90）と初代培養細胞（NHLF）で比較した結果を示す。いずれも６７種類のmiRNA応答レポーターmRNAについての結果である。図１４（ａ）は、蛍光比率の比較、つまりピークの場所の比較であり、（ｂ）は 90% interval の比較、つまりピークの幅の比較である。どちらも2回のスクリーニング実験の平均値と標準偏差をエラーバーとして表示した。図１４（ａ）、（ｂ）から、miRNA 活性の平均値は株化されたIMR-90と同様だったが、miRNA 活性は細胞集団内でより広く分布しており、より不均質な集団であることが示された。

[0128] 図１３（ｃ）に第二スクリーニング用の組み合わせ表を示す。１～８の番号は8種類のmiRNAを、この実験では、順に、miR-16-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-143-3p, let-7i-5pを示す。表の行(h), 列(i), 各升目の2桁の数字（j,k）はそれぞれ hmAG1, hmKO2, tagBFP, hdKeimaRedが応答するmiRNAの番号を示す。この表に従うと、どのmiRNAの2 つの組み合わせについても、全てのレポーター蛋白質の組み合わせが網羅されることがわかる。

[0129] 次いで、これらのmiRNA活性の相関関係を得た。各miRNAの組み合わせについて、そのmiRNAに応答するレポーターmRNAのペア（配列番号114、81、115、102、80、111、83、116、157～181）をNHLFに導入したとき、細胞集団がつくる蛍光比率のピーク幅（90% interval）を解析した。以下の6種類の組み合わ

せで得られた値の平均値を求めた。たとえば、miR-143-3p とmiR-21-5pの場合、

（Ａ） α(miR-143-3p)-hmAG1（配列番号114） + α(miR-21-5p)-hmK02（配列番号159)

（Ｂ） α(miR-143-3p)-hmAG1 + α(miR-21-5p)-tagBFP（配列番号168)

（Ｃ） α(miR-143-3p)-hmAG1 + α(miR-21-5p)-hdKeimaRed（配列番号176)

（Ｄ） α(miR-21-5p)-hmAG1（配列番号81） + α(miR-143-3p)-hmK02（配列番号163)

（Ｅ） α(miR-21-5p)-hmAG1 + α(miR-143-3p)-tagBFP（配列番号172)

（Ｆ） α(miR-21-5p)-hmAG1 + α(miR-143-3p)-hdKeimaRed（配列番号180)

このピーク幅は、コントロール mRNAを導入したときに、同様の解析で求めたピーク幅

に対する相対値として下記表６に表される。

[0130] [表6]

relative 90% interval

	miR-143-3p	miR-21-5p	let-7i-5p	miR-27a-3p	miR-16-5p	miR-20a-5p	miR-17-5p	miR-106a-5p
miR-143-3p		2.77	1.90	1.87	2.17	2.32	2.22	2.34
miR-21-5p			1.38	1.43	1.53	1.59	1.84	1.76
let-7i-5p				1.12	1.24	1.42	1.49	1.52
miR-27a-3p					1.18	1.41	1.37	1.43
miR-16-5p						1.19	1.21	1.18
miR-20a-5p							0.96	0.91
miR-17-5p								0.97
miR-106a-5p								

[0131] この表から、対象の細胞集団にある、miRNA間の機能的な関係性を見いだせることがわかる。たとえば、miR-143-3p と miR-21-5p の組み合わせなど、値の大きなmiRNAの間には、その機能に負の相関がある。すなわちこの場合、miR-143-3pの活性が高い細胞では、miR-21-5p の活性は低く、miRNA-143-3pの活性が低い細胞ではmiR-21-5pの活性は低い。また、値の小さなmiRNAの組み合わせには、その機能に正の相関がある。実際、miR-17 precursor family を形成する miR-17, miR-20a, miR-106a には活性においても高い正の相関を示すことがわかった。

[0132] なぜ、miRNA活性の関係性がわかるのかについて、図１５を用いて説明する。図１５は、ある細胞群が同じ量のmRNAを取り込んだと仮定したとき、細胞群で2 つのmiRNA活性の分布がある場合、想定される結果を模式的に示す図である。図１５（ａ）は、2 つのmiRNA活性が正に相関する場合、蛍光比率のピークは細くなることを示す。図１５（ｂ）は、2つのmiRNA活性が負に相関する場合、蛍光比率のピークは広くなることを示す。図１５（ｃ）は、2 つのmiRNA活性が相関しない場合、中間的な幅のピークができることを示す。

[0133] 図１３の（ｄ）は、miRNA活性に負の相関がみられたあるいは相関が見られなかった3つのmiRNAに応答するレポーターmRNA（α(miR-106a-5p)-hmAG1（配列番号116），α(miR-21-5p)-hmKO2（配列番号159），α(miR-143-3p)-tagBFP）を用いて、NHLFを分離解析した結果を示す。mRNAを導入した細胞集団を蛍光比率の密度分布で示した。

[0134] 図１３の（ｅ）は、miRNA活性に正の相関がみられた3つのmiRNAに応答するレポーターmRNA（α(miR-20a-5p)-hmAG1（配列番号111），α(miR-17-5p)-hmKO2（配列番号12），α(miR-106a-5p)-tagBFP（配列番号171））を用いて、NHLFを分離解析した結果を示す。mRNA を導入した細胞集団を蛍光比率の密度分布で示した。

[0135] 図１３（ｄ）、（ｅ）から実証されるように、対象が同じ細胞集団の場合であっても、このような正の相関性の高い miRNA に対する mRNA セットを使うと、細胞は極めて均一な集団として表示される（ｆ）が、そうではない miRN

A セットを使うと、細胞の異質性が観察された（ｅ）。したがって、所望の細胞の判別の目的に応じて、使用するmiRNA応答性mRNAを選択することができる。例えばこの場合、NHLFを所望の細胞と考え、NHLFとそれ以外の細胞を判別する場合には正の相関性の高い miRNA に対する mRNA セットを用いて、所望の細胞をより広がりの狭い（特異的な）細胞集団とすることができ、多様性に富んだNHLFを、所望の細胞を含む細胞の母集団と考え、ここから所望の細胞を分離分別したい場合には、負の相関性の高い miRNA に対する mRNA セットを用いて、幅広く分布された細胞のうちの所望の一部分を採取することができる。

[0136] ［実施例１１　miRNA応答性レポーターmRNAを用いたIMR-90の細胞集団の判別］

NHLFと同様の第二スクリーニングを株化された線維芽細胞であるIMR-90についても実施した。この実験では、図１３（Ｃ）で示されるmiRNAを表す番号１～８を、順に、miR-16-5p, miR-17-5p, miR-125b-5p, miR-93-5p, miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-145-5p, miR-26a-5pとした。各miRNAの組み合わせについて、そのmiRNAに応答するレポーターmRNAのペア（配列番号117、100、125、80、157、166、174、83、167、158、175、111、161、170、178、110、116、162、171、179、146～156）をIMR-90に導入したとき、細胞集団がつくる蛍光比率のピーク幅（90% interval）を解析し、コントロール mRNAを導入したときに、同様の解析で求めたピーク幅に対する相対値として下記表７に表される。

[0137]

[表7]

relative 90% interval

	miR-145-5p	miR-125b-5p	miR-26a-5p	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-20a-5p	miR-93-5p	miR-106a-5p
miR-145-5p		0.87	0.93	1.16	1.32	1.24	1.06	1.26
miR-125b-5p			0.88	1.13	1.16	1.13	1.06	1.18
miR-26a-5p				1.26	1.28	1.39	1.25	1.39
miR-16-5p					1.11	1.08	1.03	1.02
miR-17-5p						0.87	0.89	0.93
miR-20a-5p							0.76	0.82
miR-93-5p								0.77
miR-106a-5p								

[0138] 図１６は、第二スクリーニングの結果をもとに選んだ、4種類のmiRNA応答mRNA(α(miR-16-5p)-hmAG1（配列番号80），α(miR-26a-5p)-hmKO2（配列番号148），α(miR-17-5p)-tagBFP（配列番号167），α(miR-125b-5p)-hdKeimaRed（配列番号153）をIMR-90に共導入した場合の結果を三次元の密度プロットとして示した。図中に示されるＡ、およびＢの矢印で示されるように、IMR-90が２つの細胞グループに分離されることがわかった。

[0139] ［参考文献］

［１］Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA.
Warren L., Manos PD., Ahfeldt T., Loh YH., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal PK., Smith ZD., Meissner A., Daley GQ., Brack AS., Collins JJ., Cowan C., Schlaeger TM., Rossi DJ.
Cell Stem Cell, 7(5):618-30, 2010

［２］Improved structure, function and compatibility for CellProfiler

: modular high-throughput image analysis software.
Kamentsky L., Jones TR., Fraser A., Bray MA., Logan DJ., Madden KL., Ljosa V., Rueden C., Eliceiri KW., Carpenter AE.
Bioinformatics, 27(8):1179-80, 2011

[３] Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs.
Endo K., Stapleton JA., Hayashi K., Saito H., Inoue T.
Nucleic Acids Res, 41(13):e135, 2013

[４] LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging.
Daigle N., Ellenberg J.Nat Methods, 4(8):633-6, 2007

[５] New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data.
Tung JW., Parks DR., Moore WA., Herzenberg LA., Herzenberg LA.
Clin Immunol, 110(3):277-83, 2004

[６] MicroRNA profiling reveals two distinct p53-related human pluripotent stem
cell states.
Neveu P., Kye MJ., Qi S., Buchholz DE., Clegg DO., Sahin M., Park IH., Kim KS., Daley GQ., Kornblum HI., Shraiman BI., Kosik KS.
Cell Stem Cell, 7(6):671-81, 2010

請求の範囲

[請求項1] 以下の工程を含む、２種以上の細胞を含む細胞群からmiRNAの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法；

（１）指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結したマーカー遺伝子を含むmRNAを細胞群に導入する工程、および

（２）当該マーカー遺伝子の翻訳量を指標として、細胞種を判別する工程。

[請求項2] 前記工程（１）が、指標となるmiRNAの標的配列およびマーカー遺伝子が共に異なる２以上のmRNAを同時に細胞に導入する工程である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞種であり、前記工程（２）が、当該マーカー遺伝子の翻訳量が多い細胞種を判別する工程である、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記所望の細胞種が、指標となるmiRNAの発現量が多い細胞種であり、前記工程（２）が、当該マーカー遺伝子の翻訳量が少ない細胞種を判別する工程である、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 前記miRNAの標的配列が、マーカー遺伝子の５’側に連結されている、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。

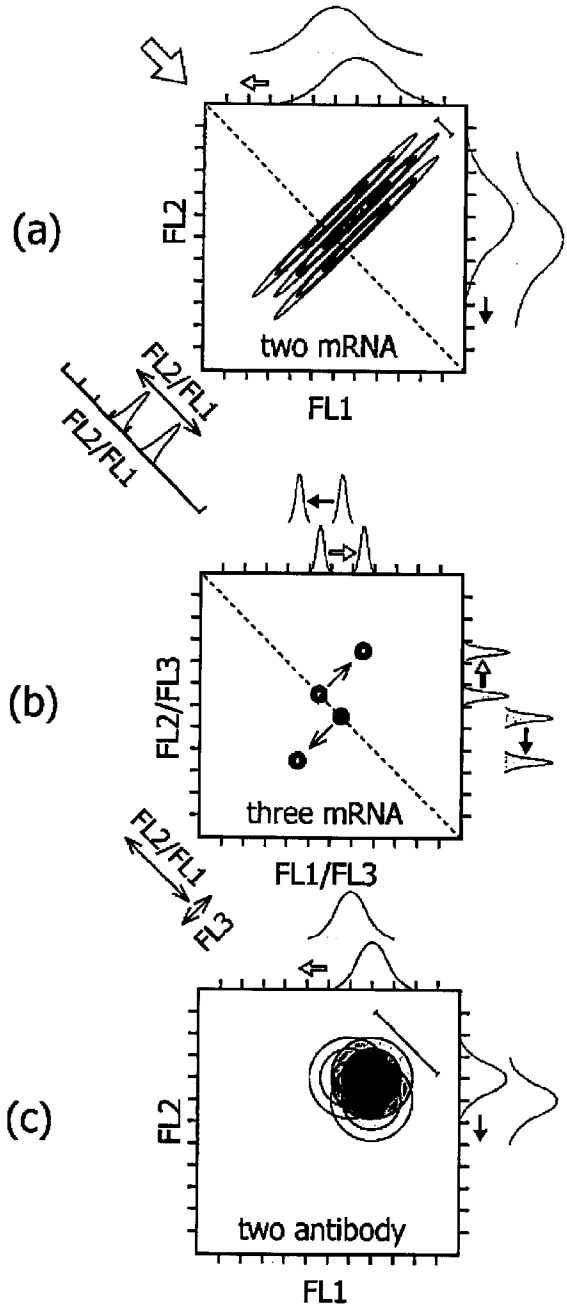
[請求項6] 前記判別が、フローサイトメーターを用いて行われる、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] 前記判別が、イメージアナライザーを用いて行われる、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。

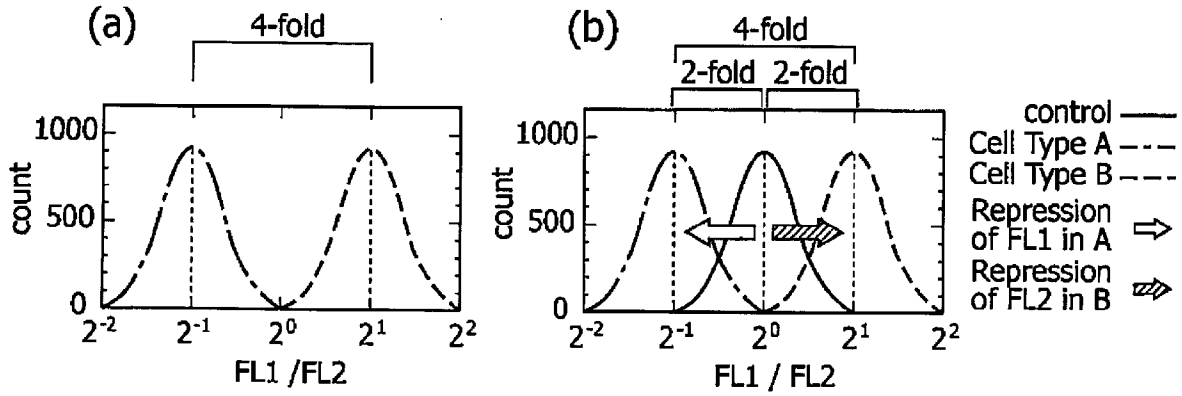
[請求項8] 前記工程（１）の前に、指標となるmiRNAをスクリーニングする工程をさらに含む、請求項１～８のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 指標となるmiRNAの標的配列と機能的に連結したマーカー遺伝子を含むmRNAを含んでなる細胞判別キット。

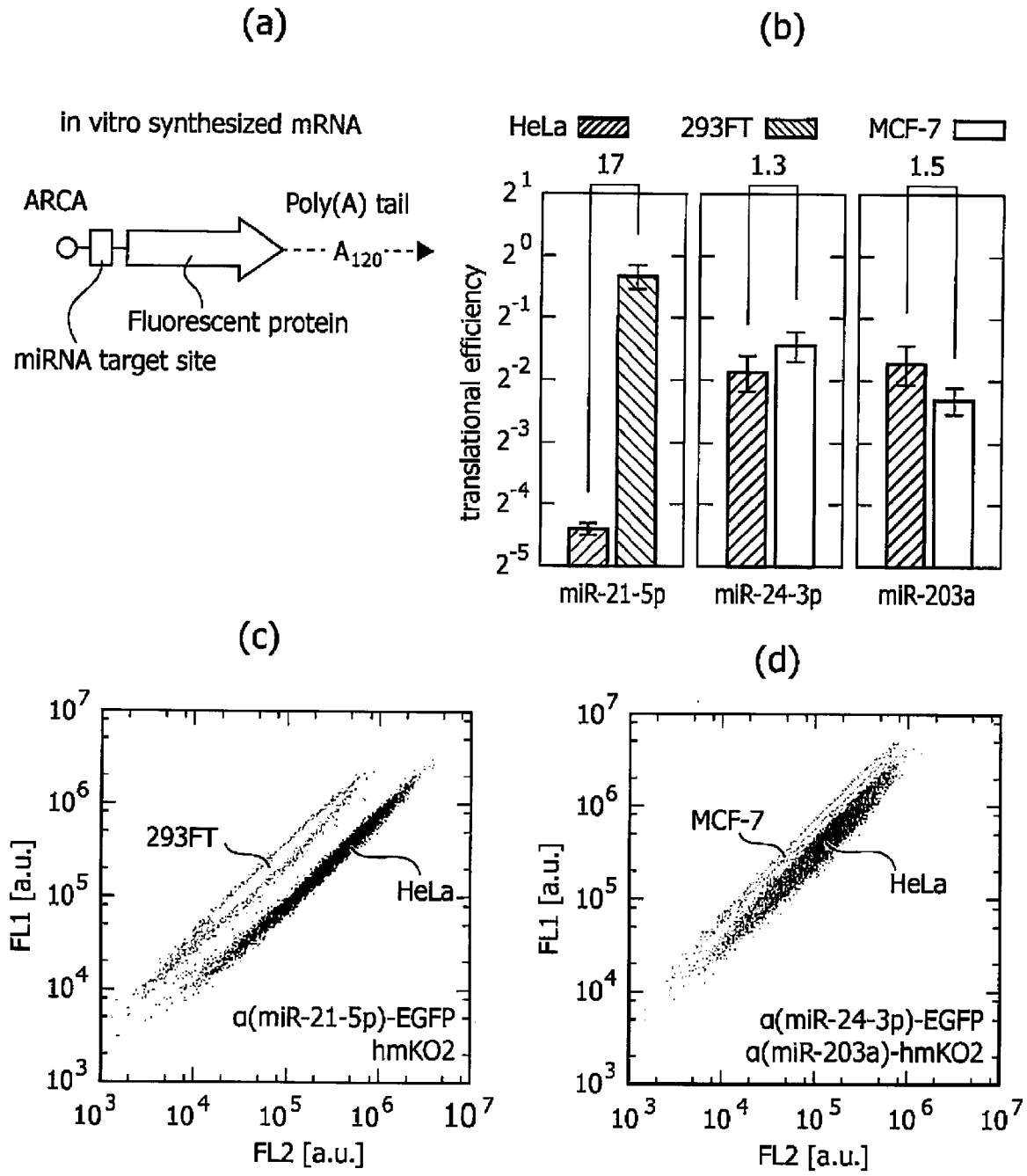
[図1]


(a)
FL2
two mRNA
FL1
FL2/FL1
FL2/FL1
(b)
FL2/FL3
three mRNA
FL1/FL3
FL2/FL1
FL3
(c)
FL2
two antibody
FL1

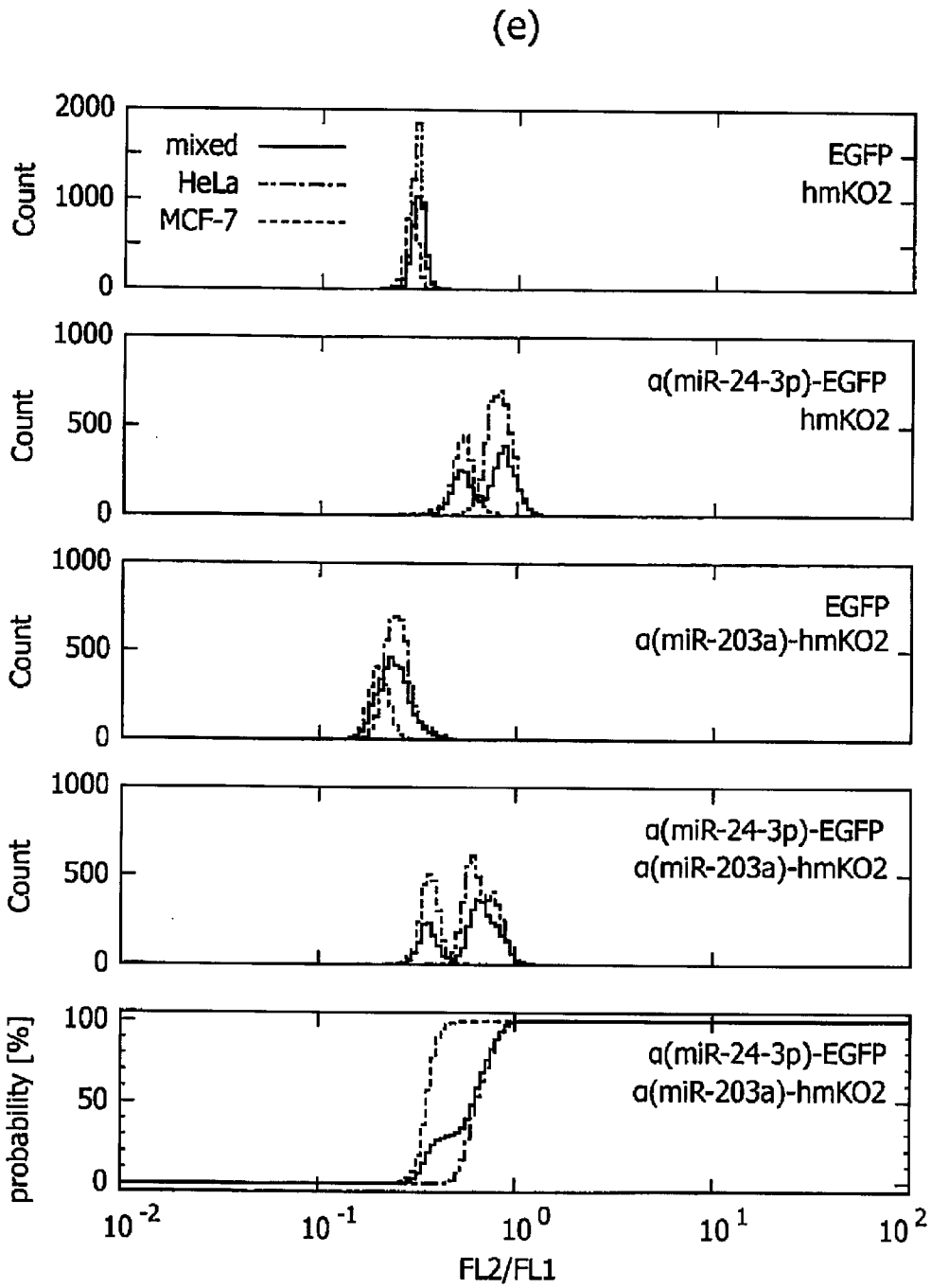
[図2]


(a)
4-fold
1000
500
0
count
2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1} 2^{2}
FL1 /FL2
(b)
4-fold
2-fold 2-fold
1000
500
0
count
2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1} 2^{2}
FL1 / FL2
control
Cell Type A
Cell Type B
Repression of FL1 in A
Repression of FL2 in B

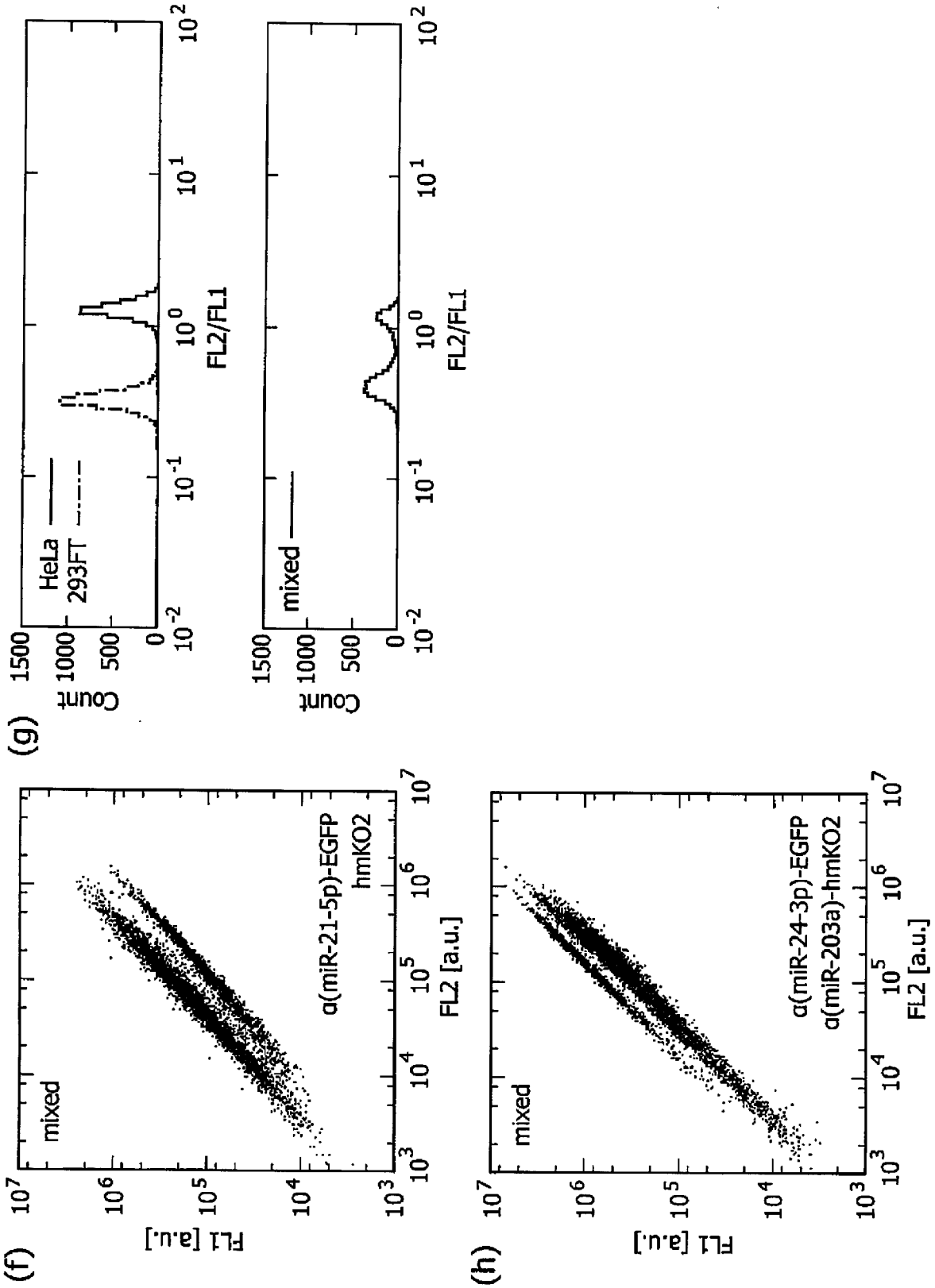
[図3A]


(a)
in vitro synthesized mRNA
ARCA
Poly(A) tail
A_{120}
Fluorescent protein
miRNA target site
(b)
HeLa
293FT
MCF-7
17
1.3
1.5
translational efficiency
2^{1}
2^{0}
2^{-1}
2^{-2}
2^{-3}
2^{-4}
2^{-5}
miR-21-5p
miR-24-3p
miR-203a
(c)
FL1 [a.u.]
293FT
HeLa
α(miR-21-5p)-EGFP
hmKO2
FL2 [a.u.]
(d)
FL1 [a.u.]
MCF-7
HeLa
α(miR-24-3p)-EGFP
α(miR-203a)-hmKO2
FL2 [a.u.]

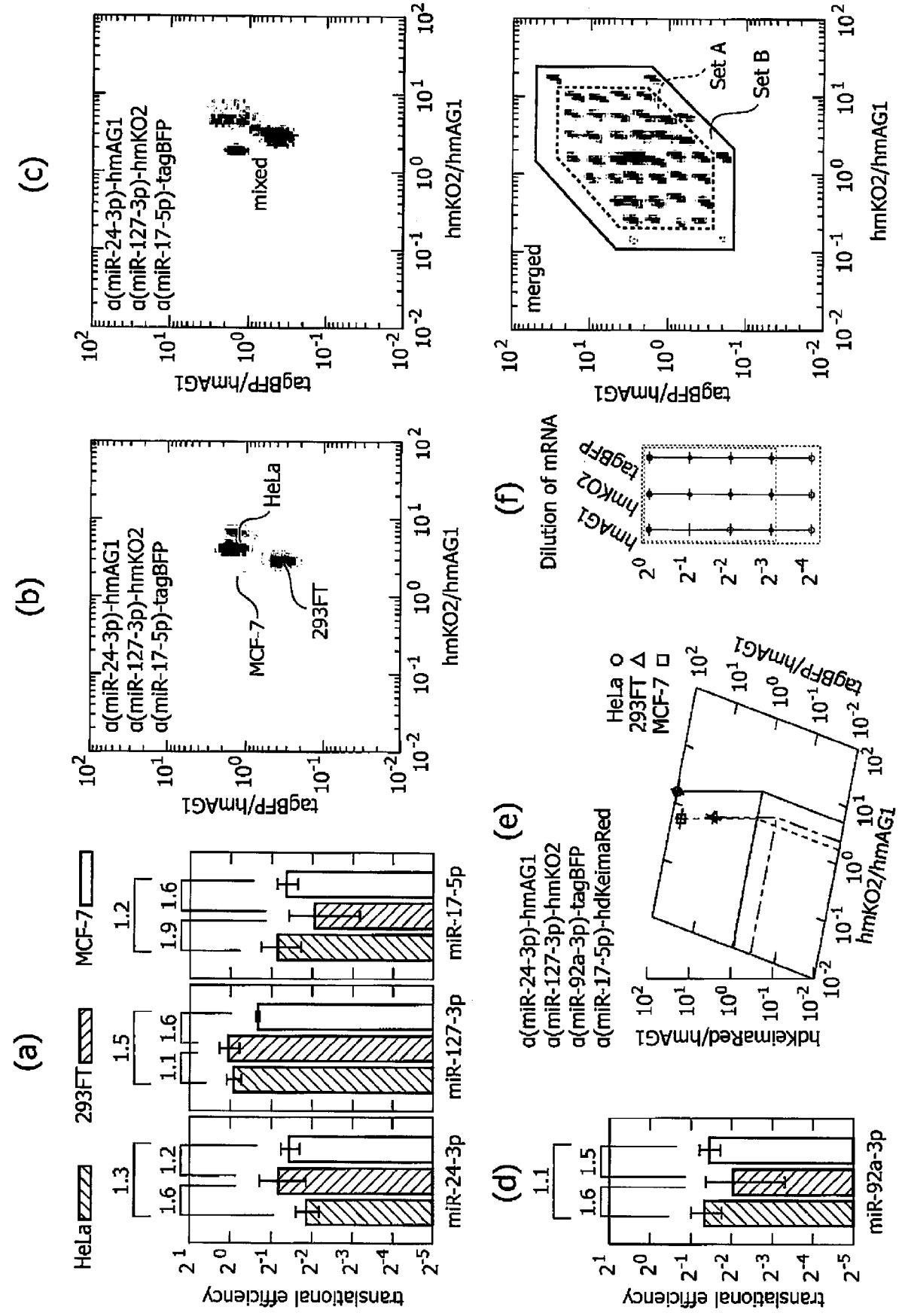
[図3B]


(e)
2000
1000
0
Count
mixed
HeLa
MCF-7
EGFP
hmKO2
1000
500
0
Count
α(miR-24-3p)-EGFP
hmKO2
1000
500
0
Count
EGFP
α(miR-203a)-hmKO2
1000
500
0
Count
α(miR-24-3p)-EGFP
α(miR-203a)-hmKO2
100
50
0
probability [%]
α(miR-24-3p)-EGFP
α(miR-203a)-hmKO2
10 -2
10 -1
10 0
10 1
10 2
FL2/FL1

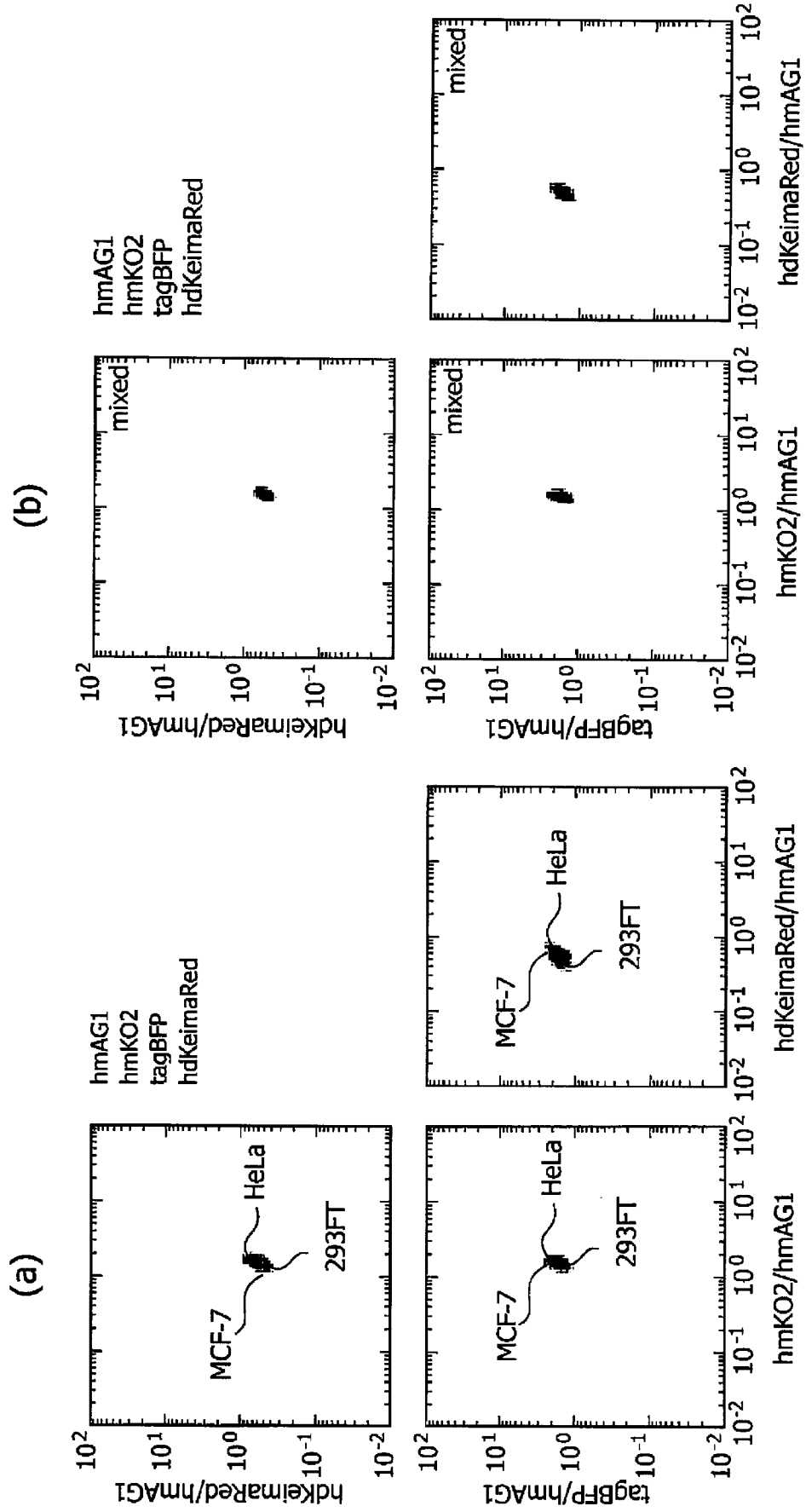
[図3C]


(g)
HeLa
293FT
mixed
Count
FL2/FL1
(f)
mixed
α(miR-21-5p)-EGFP
hmKO2
FL1 [a.u.]
FL2 [a.u.]
(h)
mixed
α(miR-24-3p)-EGFP
α(miR-203a)-hmKO2
FL1 [a.u.]
FL2 [a.u.]

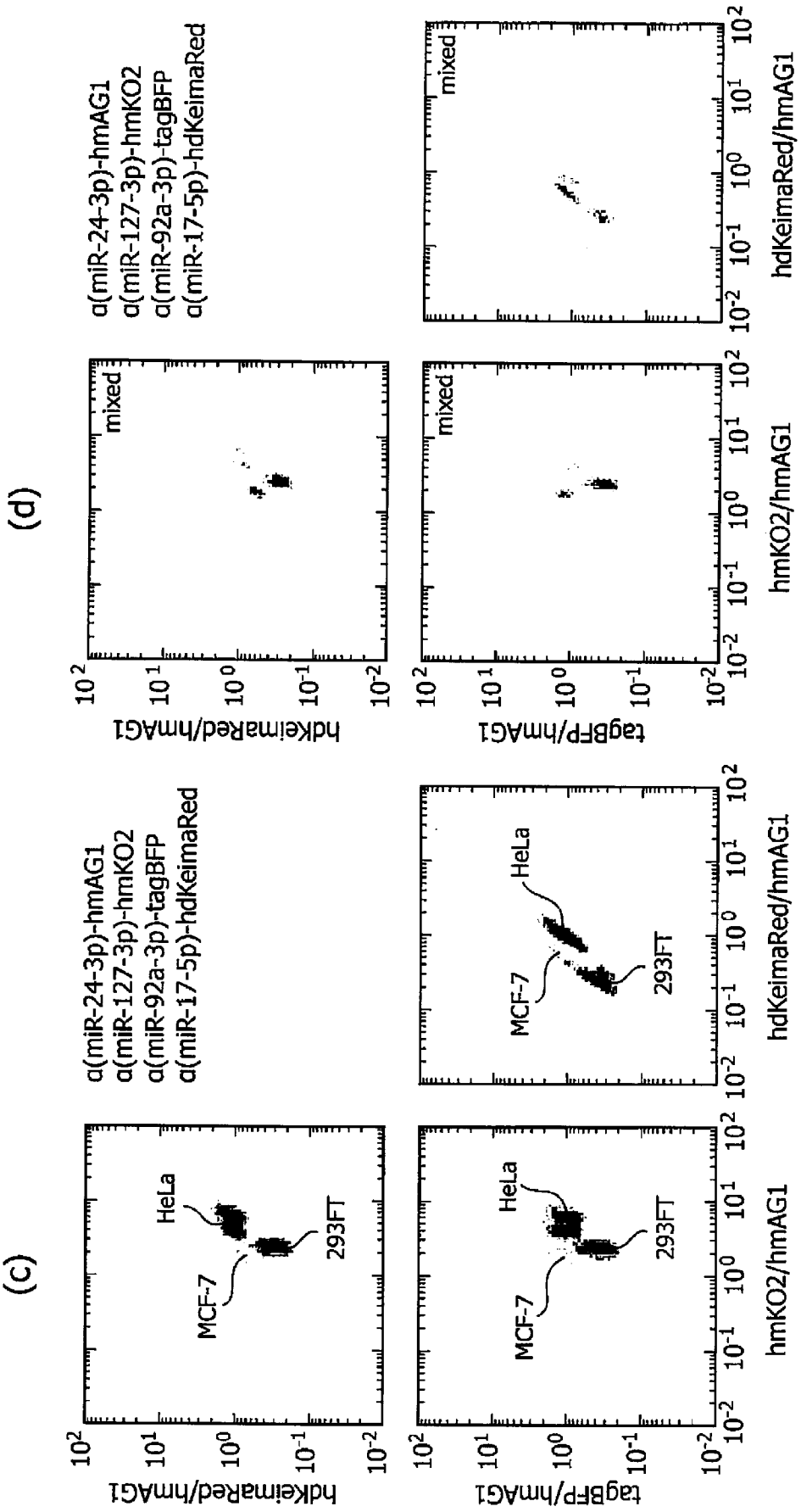
[図4]


(a)
HeLa
293FT
MCF-7
translational efficiency
miR-24-3p
miR-127-3p
miR-17-5p
(b)
a(miR-24-3p)-hmAG1
a(miR-127-3p)-hmKO2
a(miR-17-5p)-tagBFP
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1
HeLa
MCF-7
293FT
(c)
a(miR-24-3p)-hmAG1
a(miR-127-3p)-hmKO2
a(miR-17-5p)-tagBFP
mixed
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1
(d)
translational efficiency
miR-92a-3p
(e)
a(miR-24-3p)-hmAG1
a(miR-127-3p)-hmKO2
a(miR-92a-3p)-tagBFP
a(miR-17-5p)-hdKeimaRed
HeLa
293FT
MCF-7
hdkeimaRed/hmAG1
hmKO2/hmAG1
tagBFP/hmAG1
(f)
Dilution of mRNA
hmAG1
hmKO2
tagBFP
merged
Set A
Set B
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1

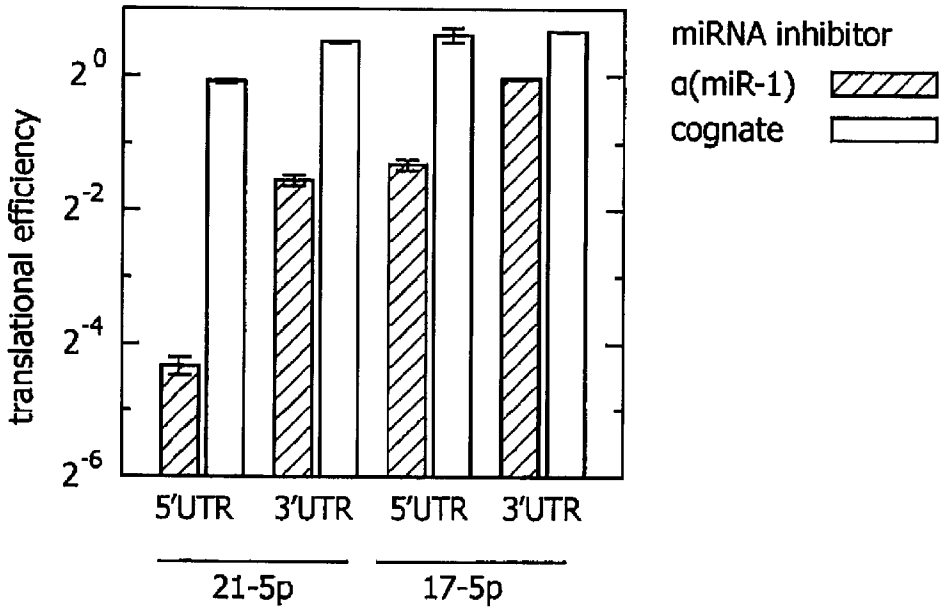
[図5A]


(a)
(b)
hmAG1
hmKO2
tagBFP
hdKeimaRed
MCF-7
HeLa
293FT
mixed
hdKeimaRed/hmAG1
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1
hdKeimaRed/hmAG1

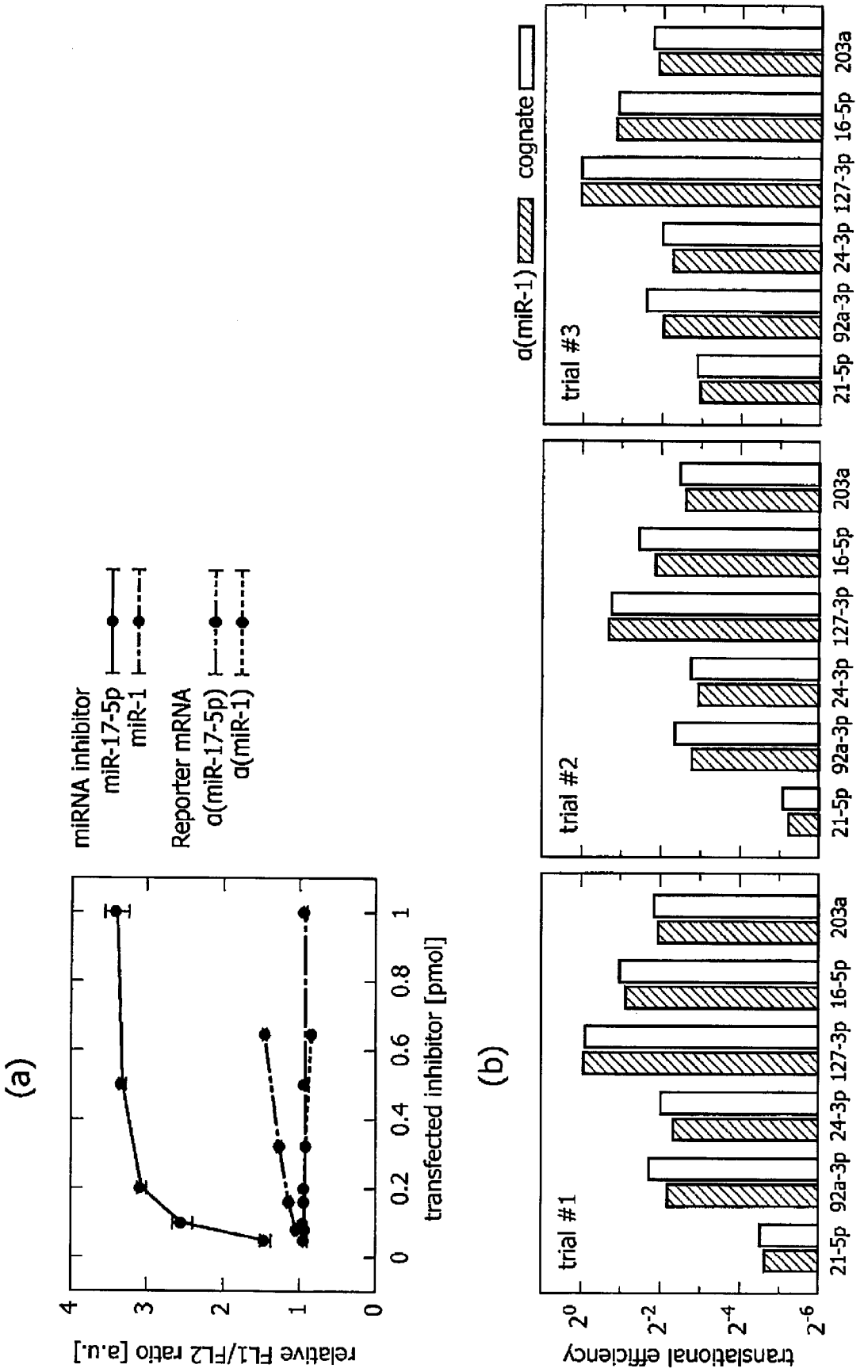
[図5B]


(c)
(d)
a(miR-24-3p)-hmAG1
a(miR-127-3p)-hmKO2
a(miR-92a-3p)-tagBFP
a(miR-17-5p)-hdKeimaRed
HeLa
MCF-7
293FT
mixed
hdKeimaRed/hmAG1
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1
hdKeimaRed/hmAG1

[図6]

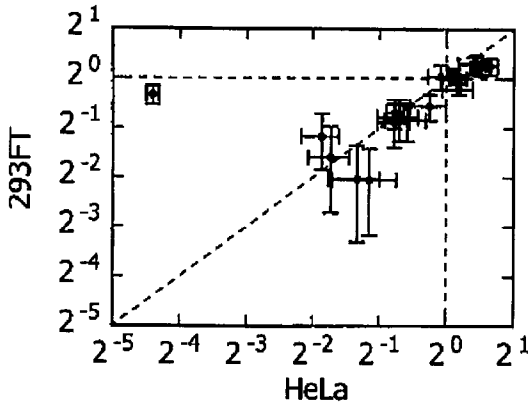

translational efficiency
2^{0}
2^{-2}
2^{-4}
2^{-6}
5'UTR
3'UTR
5'UTR
3'UTR
21-5p
17-5p
miRNA inhibitor
α(miR-1)
cognate

[図7]

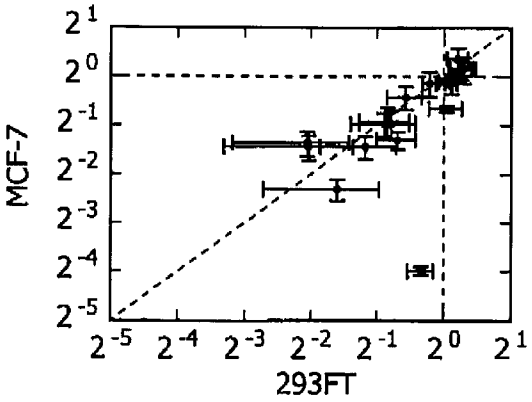

(a)
miRNA inhibitor
miR-17-5p
miR-1
Reporter mRNA
a(miR-17-5p)
a(miR-1)
relative FL1/FL2 ratio [a.u.]
transfected inhibitor [pmol]
(b)
a(miR-1)
cognate
trial #1
trial #2
trial #3
translational efficiency
21-5p
92a-3p
24-3p
127-3p
16-5p
203a

[図8]

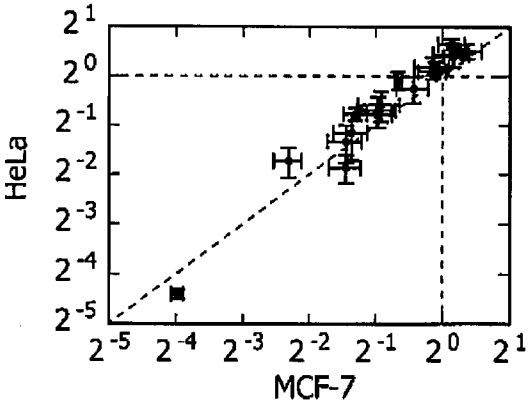
(a)


293FT
HeLa
2^{1} 2^{0} 2^{-1} 2^{-2} 2^{-3} 2^{-4} 2^{-5}
2^{-5} 2^{-4} 2^{-3} 2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1}

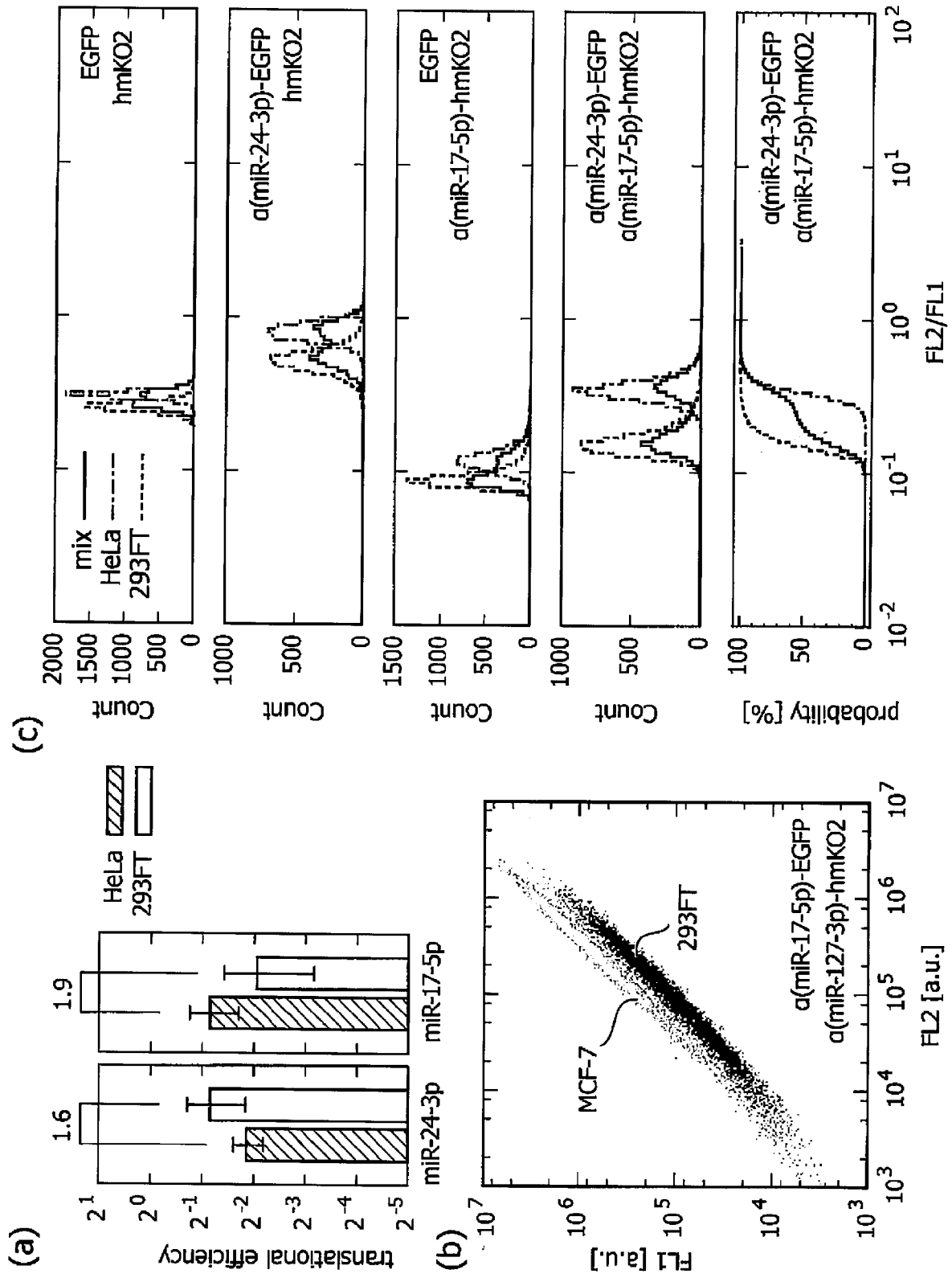
(b)


MCF-7
293FT
2^{1} 2^{0} 2^{-1} 2^{-2} 2^{-3} 2^{-4} 2^{-5}
2^{-5} 2^{-4} 2^{-3} 2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1}

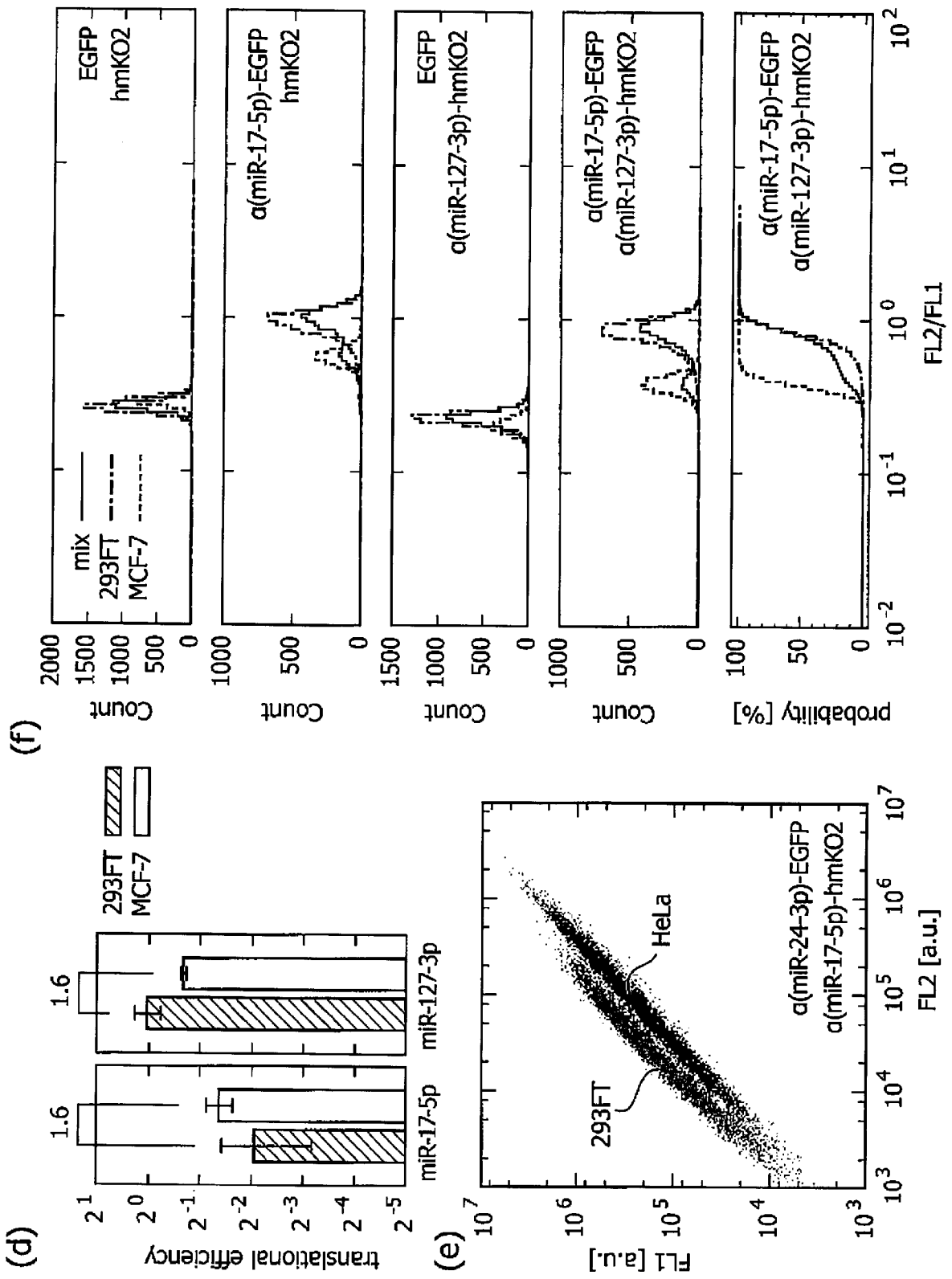
(c)


HeLa
MCF-7
2^{1} 2^{0} 2^{-1} 2^{-2} 2^{-3} 2^{-4} 2^{-5}
2^{-5} 2^{-4} 2^{-3} 2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1}

[図9A]

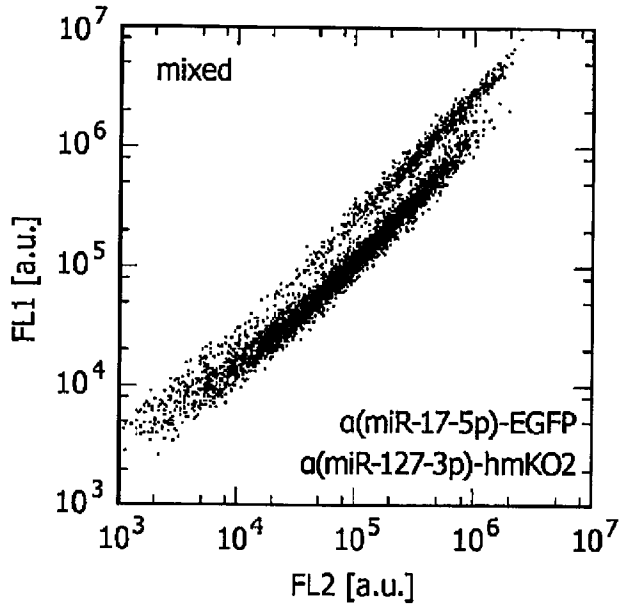

(a)
translational efficiency
HeLa
293FT
1.6
1.9
miR-24-3p
miR-17-5p
(b)
FL1 [a.u.]
FL2 [a.u.]
MCF-7
293FT
a(miR-17-5p)-EGFP
a(miR-127-3p)-hmKO2
(c)
Count
probability [%]
FL2/FL1
mix
HeLa
293FT
EGFP
hmKO2
a(miR-24-3p)-EGFP
hmKO2
EGFP
a(miR-17-5p)-hmKO2
a(miR-24-3p)-EGFP
a(miR-17-5p)-hmKO2
a(miR-24-3p)-EGFP
a(miR-17-5p)-hmKO2

[図9B]

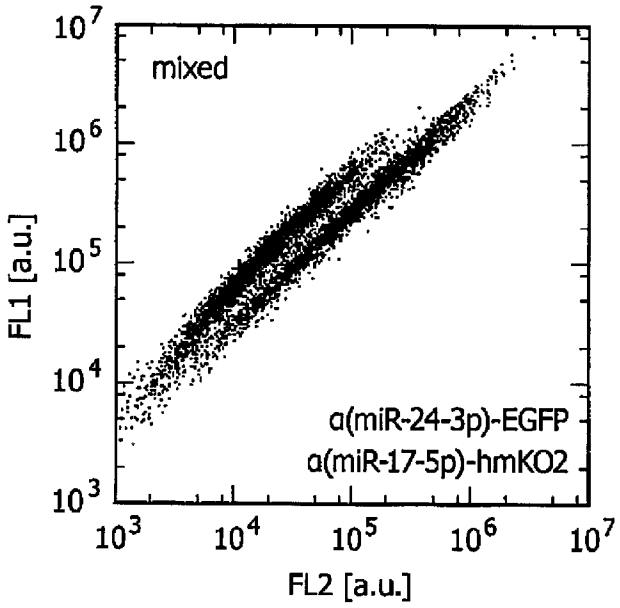

(d)
translational efficiency
1.6
1.6
293FT
MCF-7
miR-17-5p
miR-127-3p
(e)
FL1 [a.u.]
FL2 [a.u.]
293FT
HeLa
α(miR-24-3p)-EGFP
α(miR-17-5p)-hmKO2
(f)
Count
probability [%]
FL2/FL1
mix
293FT
MCF-7
EGFP
hmKO2
α(miR-17-5p)-EGFP
hmKO2
EGFP
α(miR-127-3p)-hmKO2
α(miR-17-5p)-EGFP
α(miR-127-3p)-hmKO2

[図9C]

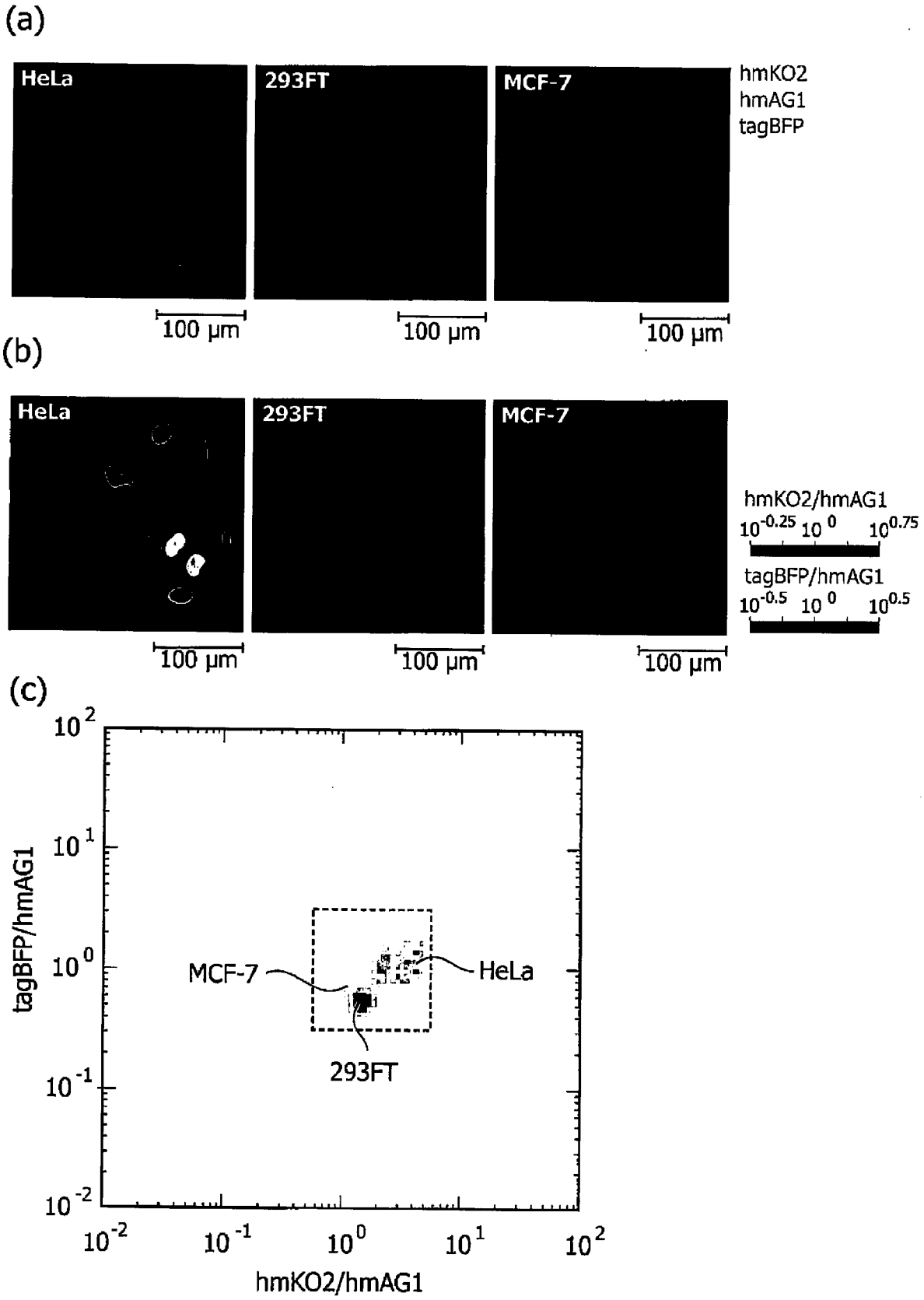
(g)


mixed
α(miR-17-5p)-EGFP
α(miR-127-3p)-hmKO2
FL1 [a.u.]
FL2 [a.u.]
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7

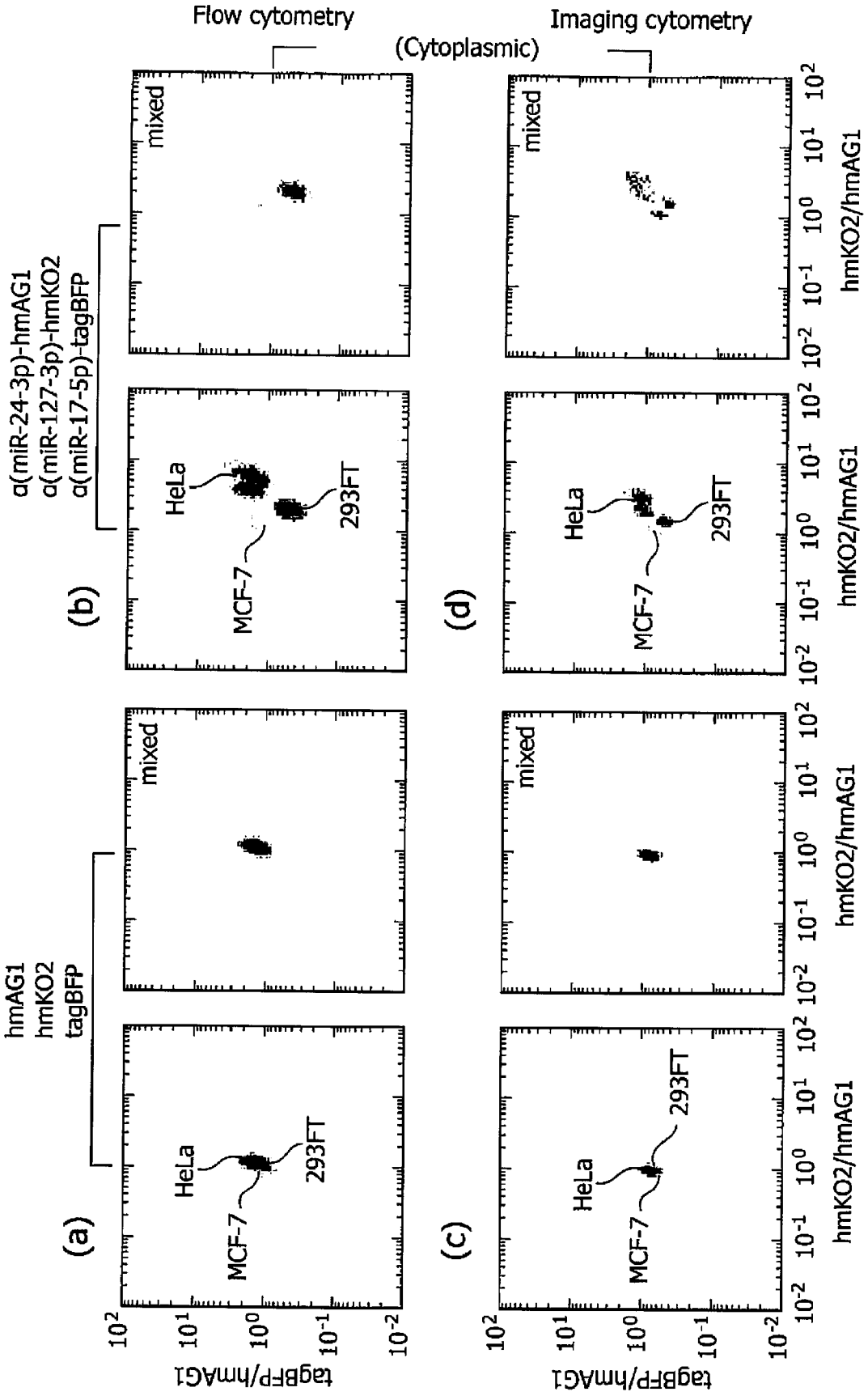
(h)


mixed
α(miR-24-3p)-EGFP
α(miR-17-5p)-hmKO2
FL1 [a.u.]
FL2 [a.u.]
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7

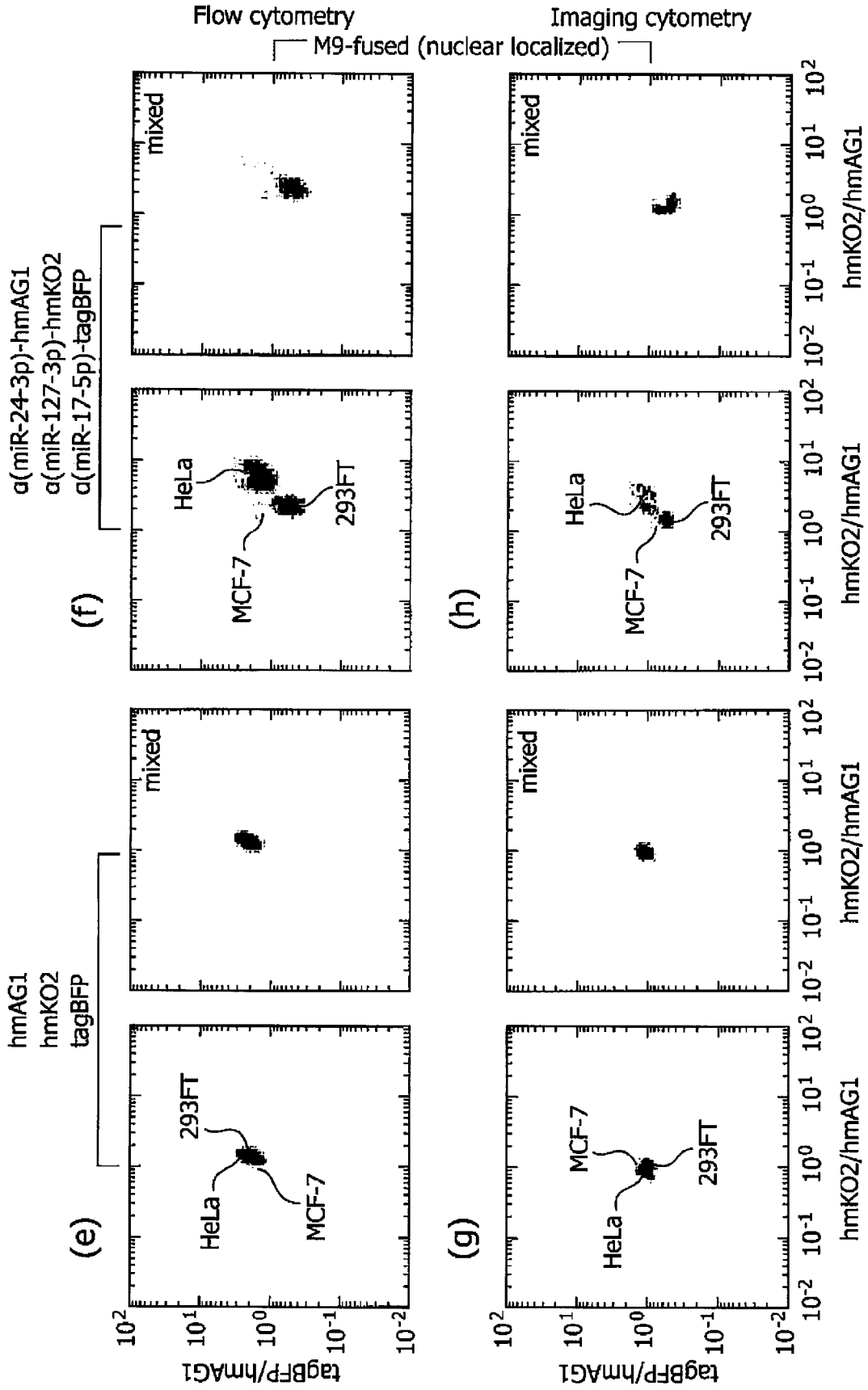
[図10]


(a)
HeLa
293FT
MCF-7
hmKO2
hmAG1
tagBFP
100 μm
100 μm
100 μm
(b)
HeLa
293FT
MCF-7
hmKO2/hmAG1
10^-0.25 10^0 10^0.75
tagBFP/hmAG1
10^-0.5 10^0 10^0.5
100 μm
100 μm
100 μm
(c)
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1
MCF-7
HeLa
293FT
10^2
10^1
10^0
10^-1
10^-2

[図11A]

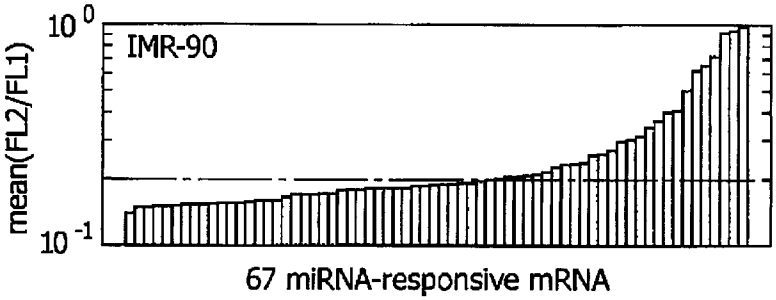

Flow cytometry
Imaging cytometry
(Cytoplasmic)
hmAG1
hmKO2
tagBFP
α(miR-24-3p)-hmAG1
α(miR-127-3p)-hmKO2
α(miR-17-5p)-tagBFP
(a)
(b)
(c)
(d)
mixed
HeLa
MCF-7
293FT
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1

[図11B]

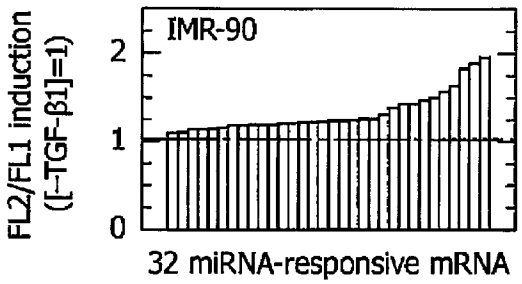

Flow cytometry
Imaging cytometry
M9-fused (nuclear localized)
a(miR-24-3p)-hmAG1
a(miR-127-3p)-hmKO2
a(miR-17-5p)-tagBFP
hmAG1
hmKO2
tagBFP
(e)
(f)
(g)
(h)
mixed
HeLa
MCF-7
293FT
tagBFP/hmAG1
hmKO2/hmAG1

[図12A]

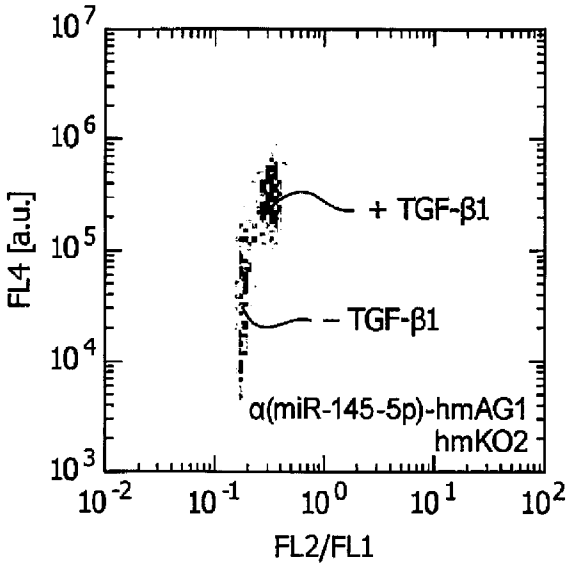
(a)


IMR-90
mean(FL2/FL1)
10^0
10^{-1}
67 miRNA-responsive mRNA

(b)

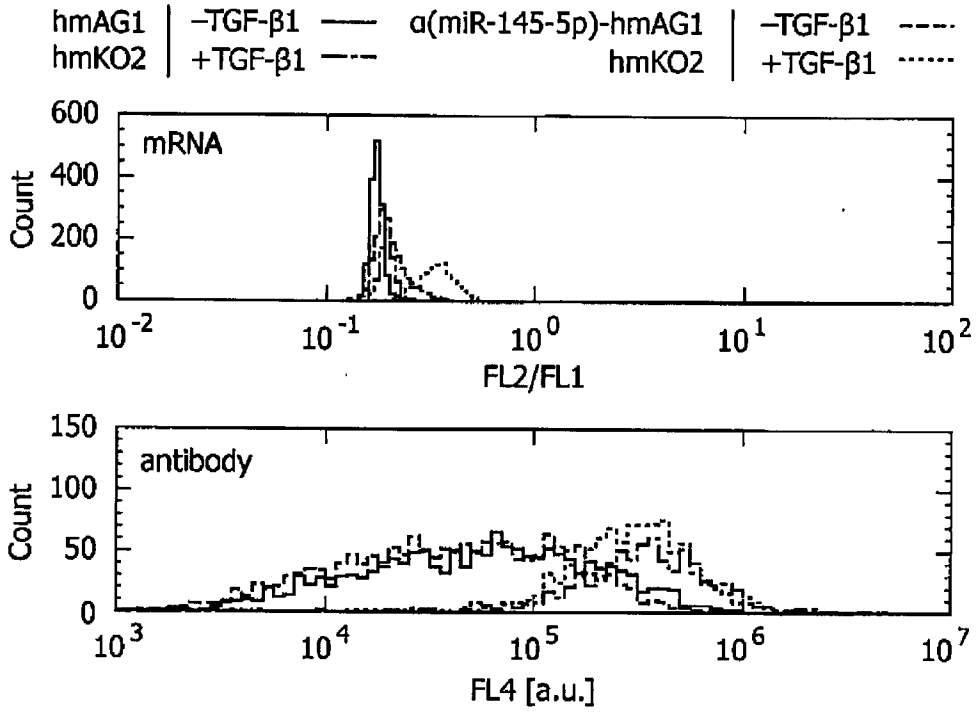

IMR-90
FL2/FL1 induction
([-TGF-β1]=1)
2
1
0
32 miRNA-responsive mRNA

(c)

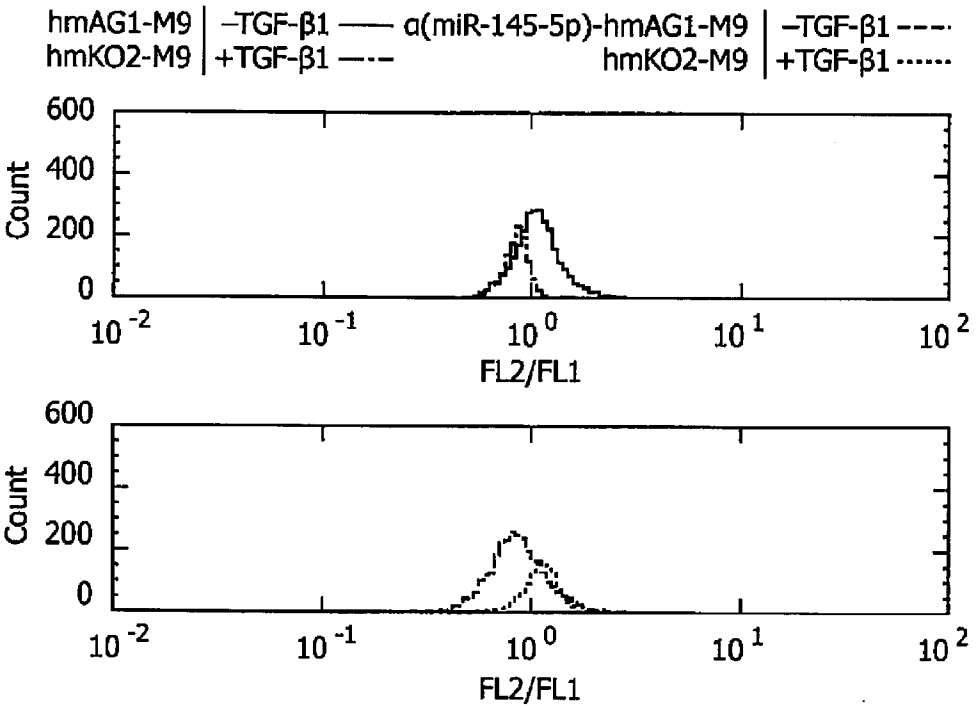

FL4 [a.u.]
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
+ TGF-β1
– TGF-β1
α(miR-145-5p)-hmAG1
hmKO2
10^{-2}
10^{-1}
10^0
10^1
10^2
FL2/FL1

[図12B]

(d)

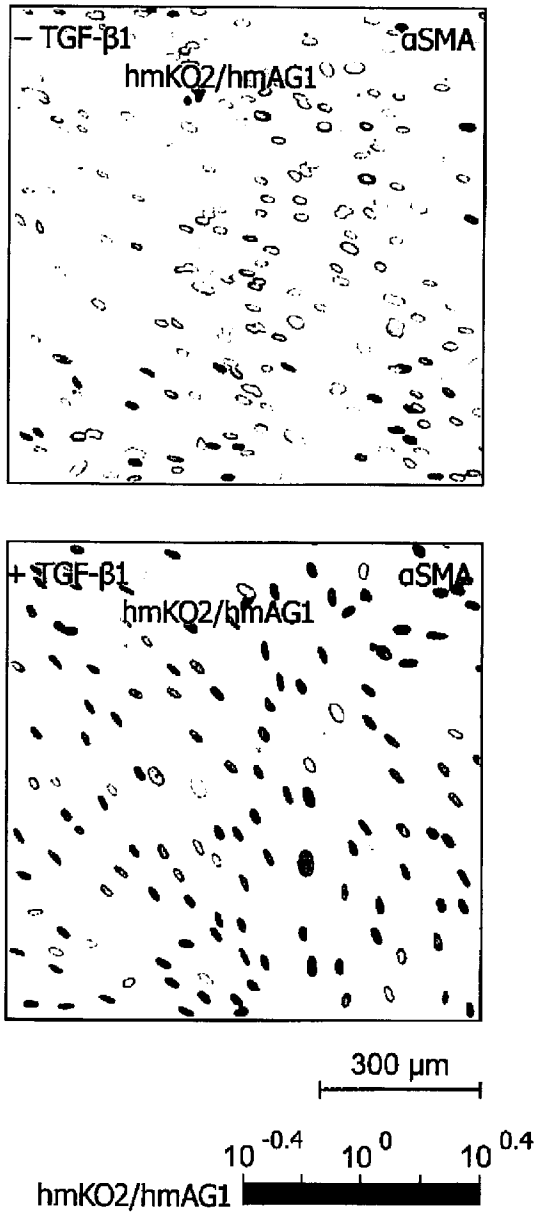

hmAG1
hmKO2
–TGF-β1
+TGF-β1
α(miR-145-5p)-hmAG1
hmKO2
–TGF-β1
+TGF-β1
mRNA
Count
600
400
200
0
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
FL2/FL1
antibody
Count
150
100
50
0
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
FL4 [a.u.]

(e)

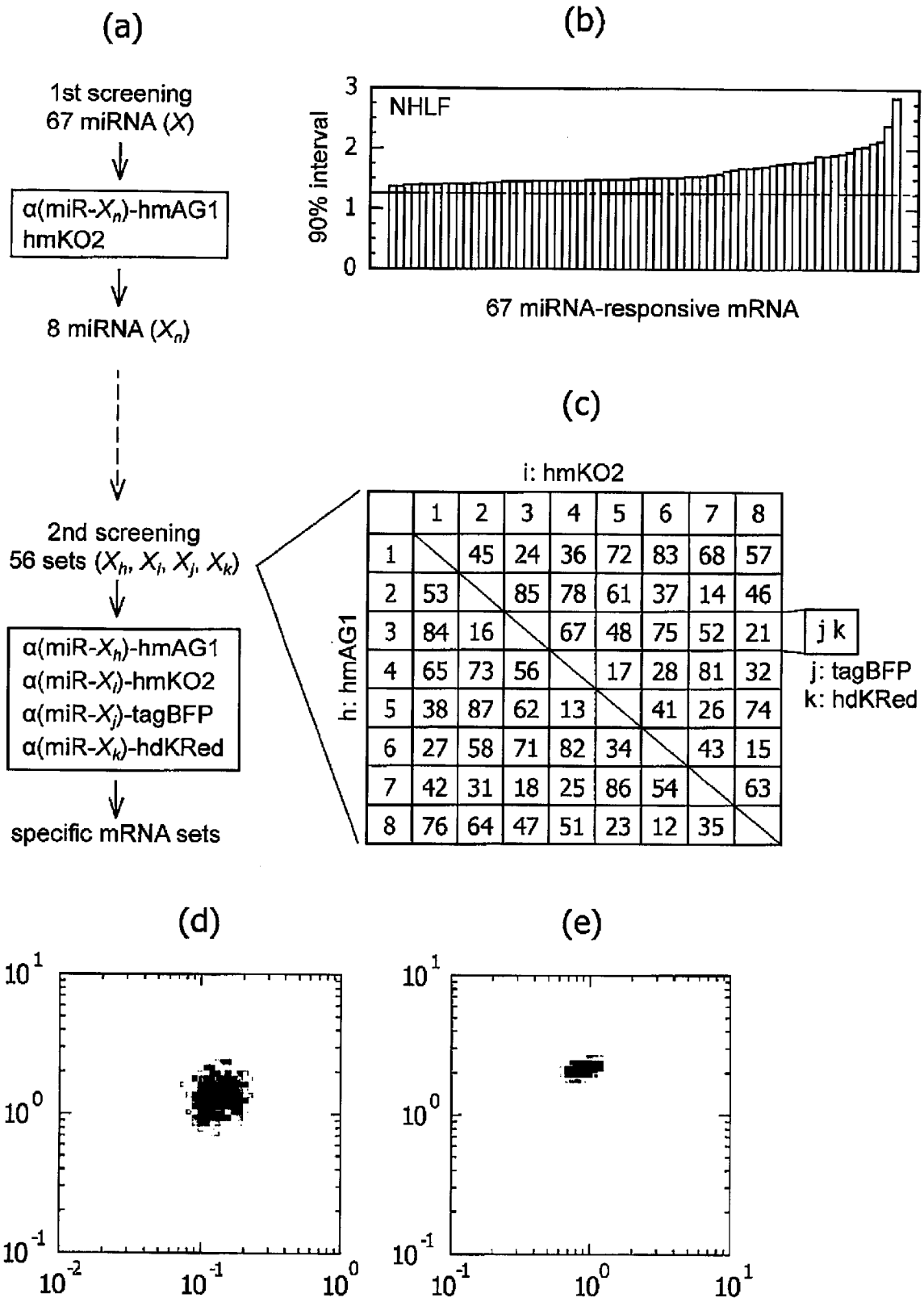

hmAG1-M9
hmKO2-M9
–TGF-β1
+TGF-β1
α(miR-145-5p)-hmAG1-M9
hmKO2-M9
–TGF-β1
+TGF-β1
Count
600
400
200
0
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
FL2/FL1
Count
600
400
200
0
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
FL2/FL1

[図12C]

(f)

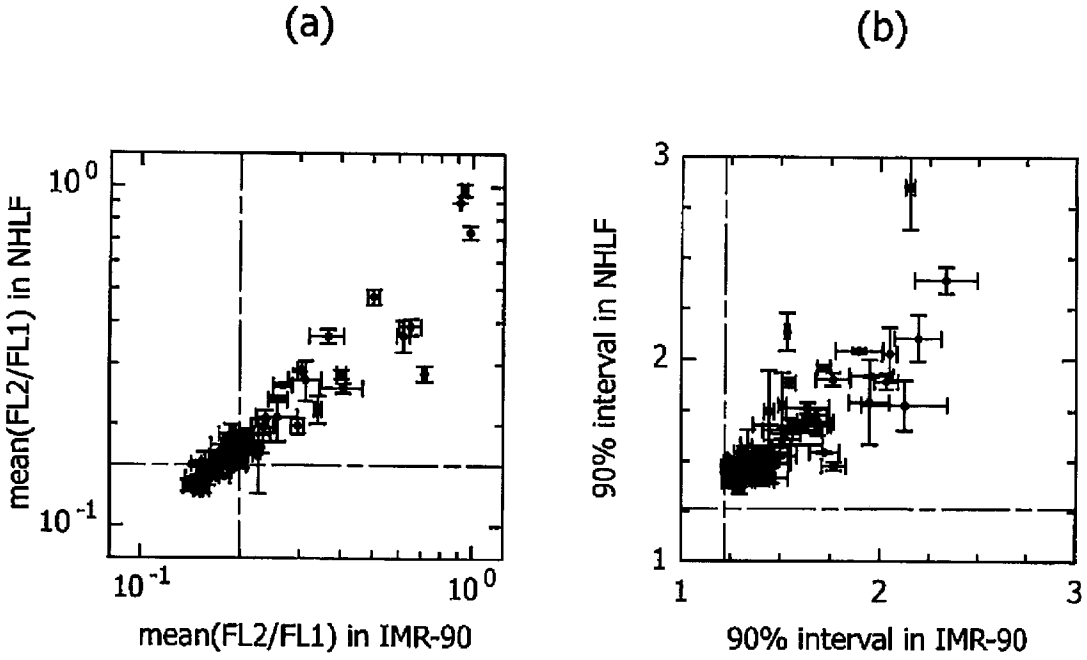

– TGF-β1
αSMA
hmKO2/hmAG1
+ TGF-β1
αSMA
hmKO2/hmAG1
300 μm
10 -0.4
10 0
10 0.4
hmKO2/hmAG1

[図13]

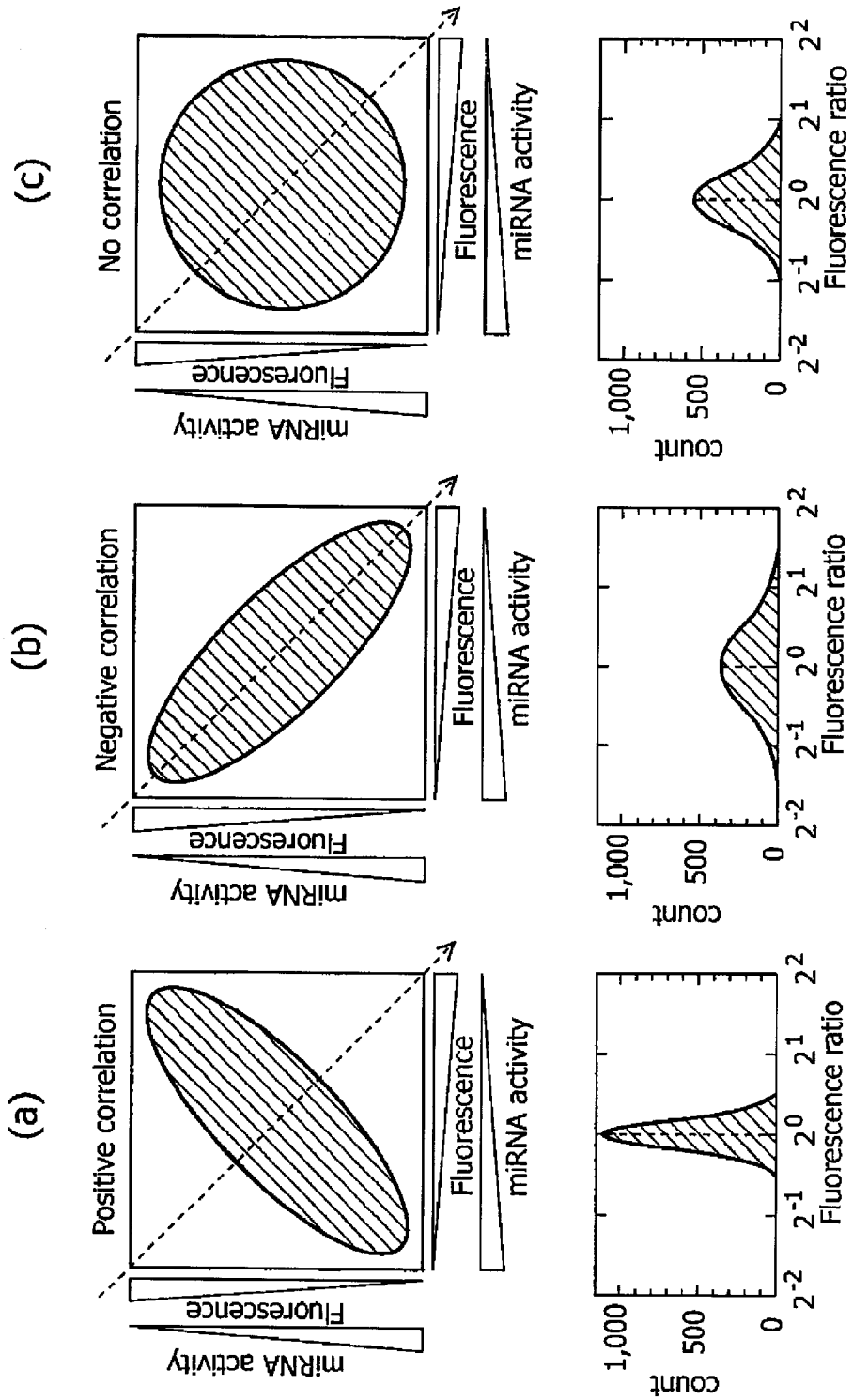


	1	2	3	4	5	6	7	8
1		45	24	36	72	83	68	57
2	53		85	78	61	37	14	46
3	84	16		67	48	75	52	21
4	65	73	56		17	28	81	32
5	38	87	62	13		41	26	74
6	27	58	71	82	34		43	15
7	42	31	18	25	86	54		63
8	76	64	47	51	23	12	35	

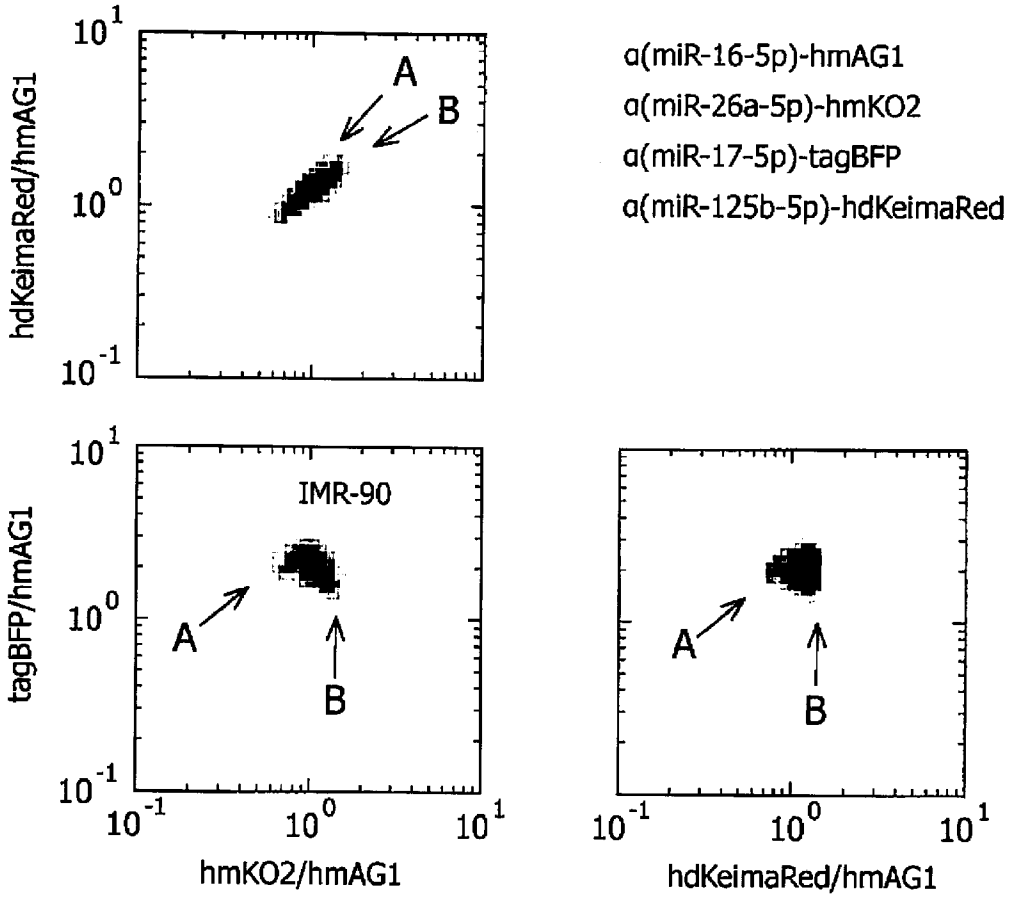
[図14]


(a)
(b)
mean(FL2/FL1) in NHLF
mean(FL2/FL1) in IMR-90
90% interval in NHLF
90% interval in IMR-90

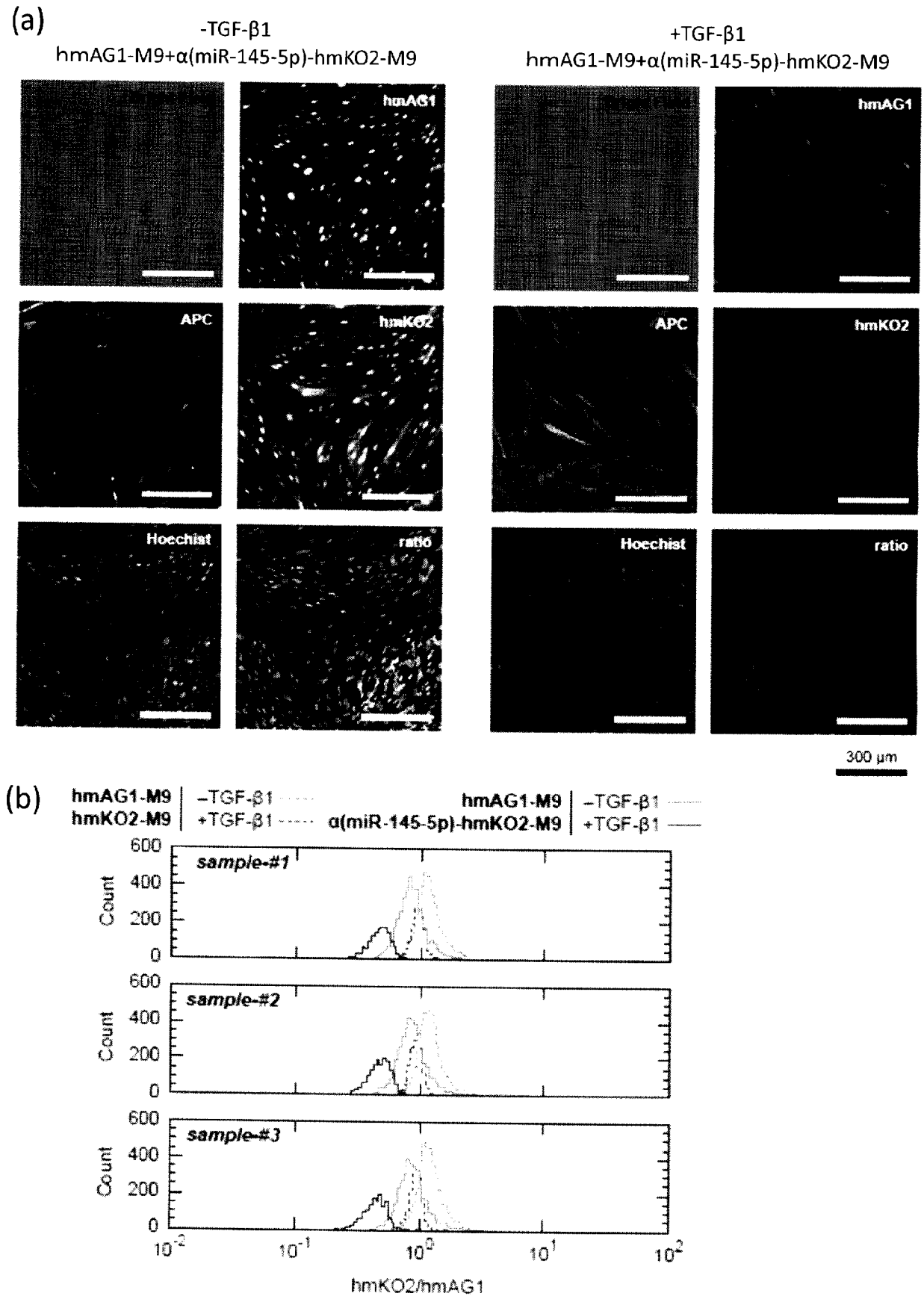
[図15]


(a)
Positive correlation
miRNA activity
Fluorescence
Fluorescence
miRNA activity
count
1,000
500
0
2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1} 2^{2}
Fluorescence ratio
(b)
Negative correlation
miRNA activity
Fluorescence
Fluorescence
miRNA activity
count
1,000
500
0
2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1} 2^{2}
Fluorescence ratio
(c)
No correlation
miRNA activity
Fluorescence
Fluorescence
miRNA activity
count
1,000
500
0
2^{-2} 2^{-1} 2^{0} 2^{1} 2^{2}
Fluorescence ratio

[図16]


hdKeimaRed/hmAG1
A
B
α(miR-16-5p)-hmAG1
α(miR-26a-5p)-hmKO2
α(miR-17-5p)-tagBFP
α(miR-125b-5p)-hdKeimaRed
tagBFP/hmAG1
IMR-90
A
B
hmKO2/hmAG1
A
B
hdKeimaRed/hmAG1

[図17]


(a)
-TGF-β1
hmAG1-M9+α(miR-145-5p)-hmKO2-M9
+TGF-β1
hmAG1-M9+α(miR-145-5p)-hmKO2-M9
hmAG1
APC
hmKO2
Hoechist
ratio
300 μm
(b)
hmAG1-M9 –TGF-β1
hmKO2-M9 +TGF-β1
hmAG1-M9 –TGF-β1
α(miR-145-5p)-hmKO2-M9 +TGF-β1
sample-#1
sample-#2
sample-#3
Count
600
400
200
0
10-2
10-1
100
101
102
hmKO2/hmAG1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/050467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/04(2006.01)i, *C12N15/00*(2006.01)n, *C12N15/09*(2006.01)n

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)
C12Q1/04, C12N15/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nikolaos PAPOUTSIDAKIS et al., MicroRNAs and the Heart: Small Things Do Matter, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2013, Vol.13, p.216-230	1-9
A	Takayuki MIZUTANI, "MicroRNAs in a variety of life phenomena", Fukuoka Acta Medica, 2009, 100, 8, pages 265 to 273	1-9
T	Kenji MIKI et al., "Efficient detection and purification of cells by synthetic microRNA switches", Regenerative Medicine, 01 February 2015 (01.02.2015), vol.14, page 188	1-9

☐ 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
"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
18 March 2015 (18.03.15)	14 April 2015 (14.04.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０５０４６７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/04(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/04, C12N15/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	Nikolaos PAPOUTSIDAKIS et al., MicroRNAs and the Heart: Small Things Do Matter, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2013, Vol.13, p.216-230	1-9
A	水谷隆之, microRNAが関与する多彩な生命現象, 福岡医誌, 2009, 100, 8, p.265-273	1-9

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１８．０３．２０１５	１４．０４．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３３３６
松浦　安紀子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
T	三木健嗣　他, Efficient detection and purification of cells by synthetic microRNA switches, 再生医療, 2015.02.01, 第１４巻, 第１８８頁	1-9