



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103189511 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201180043814.8

(22)申请日 2011.06.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103189511 A

(43)申请公布日 2013.07.03

(30)优先权数据

2010-158192 2010.07.12 JP

2010-158193 2010.07.12 JP

2010-158194 2010.07.12 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.03.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2011/064846 2011.06.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/008301 JA 2012.01.19

(73)专利权人 国立大学法人鸟取大学

地址 日本鸟取县鸟取市湖山町南4丁目101
番地

(72)发明人 三浦典正

(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

代理人 龚敏

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2006.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

(56)对比文件

CN 101333524 A,2008.12.31,

WO 2006112239 A1,2006.10.26,

Norimasa Miura等.A noncoding RNA gene

on chromosome 10p15.3 may function

upstream of hTERT.《BMC Molecular

Biology》.2009,第10卷(第5期),1-16.

审查员 高巍

权利要求书2页 说明书41页

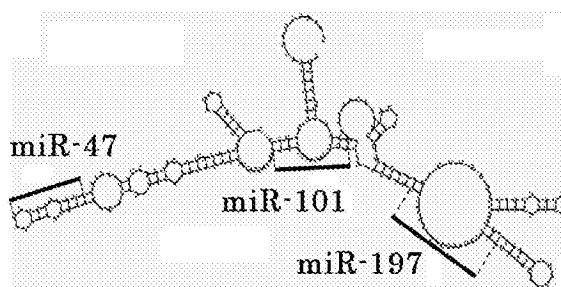
序列表20页 附图49页

(54)发明名称

利用siRNA导入的新型hiPSC制作法

(57)摘要

本发明明确多能干细胞诱导的新的化合物;明确新型的抗恶性肿瘤物质。本发明提供一种多能干细胞诱导剂,其含有选自由如下单链或双链的多核苷酸组成的组中的一种以上的单链或双链的多核苷酸,a)单链或双链的多核苷酸,其包含序列号1的碱基序列或相对于该碱基序列1~3个碱基缺失、被置换或者加成后的碱基序列;b)单链或双链的多核苷酸,其包含序列号2的碱基序列或相对于该碱基序列1~3个碱基缺失、被置换或者加成后的碱基序列;和c)单链或双链的多核苷酸,其包含序列号3的碱基序列或相对于该碱基序列1~3个碱基缺失、被置换或者加成后的碱基序列,并且将细胞向多能干细胞诱导。



1. 一种Oct3/4的表达量增加的细胞的生产方法,其中,包括将双链的RNA链导入细胞的步骤,所述双链的RNA链通过由序列号1的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号4的碱基序列构成的多核苷酸构成。

2. 根据权利要求1所述的生产方法,其特征在于:所述双链的多核苷酸为siRNA。

3. 双链的RNA链在Oct3/4表达调节剂的制造中的用途,

所述双链的RNA链通过由序列号1的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号4的碱基序列构成的多核苷酸构成。

4. 一种Oct3/4的表达量增加的细胞,其通过权利要求1或2所述的生产方法得到。

5. 一种siRNA,其特征在于:通过由序列号1的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号4的碱基序列构成的多核苷酸构成。

6. 一种载体,其特征在于:包含由与序列号1的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸、以及由与序列号4的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸。

7. 一种Oct3/4的表达量增加的细胞的生产方法,其特征在于:其中包括将权利要求6所述的载体导入细胞的步骤。

8. 一种siRNA,其特征在于:通过由序列号2的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号19的碱基序列构成的多核苷酸构成。

9. 一种载体,其特征在于:包含由与序列号2的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸、以及由与序列号19的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸。

10. 一种将来自人肾脏的正常细胞诱导成未分化状态的方法,其含有将双链的RNA链导入细胞的步骤,

所述双链的RNA链通过由序列号3的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号20的碱基序列构成的多核苷酸构成。

11. 双链的RNA链在未分化细胞标记表达调节剂的制造中的用途,

所述双链的RNA链通过由序列号3的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号20的碱基序列构成的多核苷酸构成,并且调节来自人肾脏的正常细胞中的未分化细胞标记的表达。

12. 双链的RNA链在正常细胞的p53表达促进剂的制造中的用途,

所述双链的RNA链通过由序列号3的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号20的碱基序列构成的多核苷酸构成,并且促进来自人肾脏的正常细胞中的p53的表达量。

13. 一种未分化细胞的生产方法,其特征在于,包括将双链的RNA链导入来自人肾脏的正常细胞的步骤,

所述双链的RNA链通过由序列号3的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号20的碱基序列构成的多核苷酸构成。

14. 混合物在恶性肿瘤的治疗药的制造中的用途,所述混合物是如下的双链的RNA链的混合物:通过由序列号1的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号4的碱基序列构成的多核苷酸构成的双链的RNA链;通过由序列号2的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号19的碱基序列构成的多核苷酸构成的双链的RNA链;以及通过由序列号3的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号20的碱基序列构成的多核苷酸构成的双链的RNA链。

15. 一种siRNA,其特征在于:通过由序列号3的碱基序列构成的多核苷酸、以及由序列号20的碱基序列构成的多核苷酸构成。

16. 一种载体, 其特征在于: 包含由与序列号3的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸、以及由与序列号20的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸。

利用siRNA导入的新型hiPSC制作法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及新型的小RNA(small RNA)、多能干细胞诱导剂、恶性肿瘤治疗药或多能干细胞等。

【背景技术】

[0002] iPS细胞的制作技术,是在近年来的医疗行业特别受瞩目的领域。作为代表的iPS细胞的制作技术,可以列举:专利文献1中记载的方法。该文献中记载了:通过将4个基因(Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc)导入细胞,制作iPS细胞。从开发该技术开始,与iPS细胞相关的研究成果的报告数快速增加。例如,专利文献2中记载了:通过将3个基因(Oct3/4、Klf4、Sox2)和1个miRNA(hsa-miR-372等)导入细胞,制作iPS细胞。非专利文献1中记载了:在导入上述4个或3个基因的情况下,如果缺损使iPS化的细胞的p53基因,则iPS细胞的制作效率上升。非专利文献2中记载了:通过导入pre-miRNA的团簇(miR-302a~miR-302d),由癌细胞制作iPS细胞。

[0003] 另一方面,制药会社近年来特别投入资金的领域是癌领域。癌的机理复杂且不明明确的方面多,与其他疾病相比,有效的治疗药少。因此,期待开发该领域的新型的治疗药。本申请发明人在非专利文献3中报道了可以采用hTERT mRNA作为癌的生物标记。另外,非专利文献4中报道了:hTERT mRNA的表达与RGM249mRNA相关,通过针对RGM249mRNA的shRNA或siRNA,hTERT mRNA的表达量减少。

[0004] 【现有技术文献】

[0005] 【专利文献】

[0006] 【专利文献1】国际公开第2007/069666号

[0007] 【专利文献2】国际公开第2009/075119号

[0008] 【非专利文献】

[0009] 【非专利文献1】‘Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway.’ Hong et al., Nature. 2009 Aug 27; 460(7259): 1132-5. Epub 2009 Aug 9.

[0010] 【非专利文献2】‘Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state.’ Lin et al., RNA. 2008 Oct; 14(10): 2115-24. Epub 2008 Aug 28.

[0011] 【非专利文献3】‘A novel biomarker TERT mRNA is applicable for early detection of hepatoma.’ Miura et al., BMC Gastroenterol. 2010 May 18; 10: 46.

[0012] 【非专利文献4】‘A noncoding RNA gene on chromosome 10p15.3 may function upstream of hTERT.’ Miura et al., BMC Mol Biol. 2009 Feb 2; 10: 5.

【发明内容】

[0013] 【发明所要解决的课题】

[0014] 然而,上述文献记载的现有技术有以下方面具有改善的余地。

[0015] 在上述文献中,iPS细胞的制作方法慢慢地不断明确,但为了更有效地开发更高品质的iPS细胞,需要明确新的制作方法,并且不断积累关于iPS细胞的信息。

[0016] 关于各文献,专利文献1中,使用作为癌原基因的c-Myc,因此,暗藏iPS细胞发生癌化的风险。专利文献2中,没有使用c-Myc,但将3个基因和1个miRNA导入细胞的步骤复杂,不能说是高效的制作方法。非专利文献1中,没有使用c-Myc,但缺损作为癌抑制基因的p53基因,因此,担负细胞的癌化和不稳定化等风险。非专利文献2提到:使用miR-302的团簇,但miR-302是以肿瘤抑制因子即PTEN(染色体10上缺失的磷酸酶与张力蛋白同源物;phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome10)作为目标的miRNA(Poliseno et al.,Sci Signal.2010Apr13;3(117):ra29)。因此,担负细胞的癌化的风险。

[0017] 另一方面,上述文献中,恶性肿瘤的机理慢慢明确,但仅仅这样的程度还不能说充分,为了制定新型的医药品或治疗战略方案,需要明确新的抗恶性肿瘤物质,并且不断积累关于恶性肿瘤的信息。

[0018] 非专利文献3以及4中记载了:hTERT mRNA与癌形成有关;和通过针对RGM249mRNA的shRNA或siRNA,hTERT mRNA减少,但对癌具有治疗效果的物质还不明确。

[0019] 本发明是鉴于上述情况而完成的,其目的在于,提供诱导多能干细胞的新型的化合物。或者,其目的在于,提供未分化细胞标记表达调节剂。另外的目的在于,提供多能干细胞的p53表达促进剂。另外,其他目的在于,提供新型的恶性肿瘤治疗药。另外,其他目的在于,提供新型的多能干细胞。

[0020] 【用于解决课题的方法】

[0021] 根据本发明,提供一种多能干细胞诱导剂,其含有包含序列号1、2、3、8或44~47中的1个以上碱基序列的单链或双链的多核苷酸,并且将细胞向多能干细胞诱导。

[0022] 该多能干细胞诱导剂,含有在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该多能干细胞诱导剂,则能够将细胞向多能干细胞诱导。

[0023] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞诱导剂,其含有包含序列号1、2、3、8或44~47中的1个以上碱基序列的小RNA,并且将细胞向多能干细胞诱导。

[0024] 该多能干细胞诱导剂,含有在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导的小RNA。因此,如果使用该多能干细胞诱导剂,则能够将细胞向多能干细胞诱导。

[0025] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞诱导剂,其含有:包含相对于将包含序列号7的碱基序列的RNA链用RNA内切酶III(Dicer)进行处理而得到的RNA链互补的碱基序列的单链或双链的多核苷酸,并且将细胞向多能干细胞诱导。

[0026] 该多能干细胞诱导剂,含有在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该多能干细胞诱导剂,则能够将细胞向多能干细胞诱导。

[0027] 另外,根据本发明,提供一种未分化细胞标记表达调节剂,其含有包含序列号1、2、3或8的碱基序列的单链或双链的多核苷酸,并且调节未分化细胞标记的表达。

[0028] 该未分化细胞标记表达调节剂,含有在下述实施例中证实促进或抑制细胞内的未分化细胞标记的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该未分化细胞标记表达调节剂,则

能够调节细胞内的未分化细胞标记的表达量。

[0029] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞的p53表达促进剂,其含有包含序列号1、2、3、8或44~47中的1个以上碱基序列的单链或双链的多核苷酸,并且促进多能干细胞中的p53的表达量。

[0030] 该p53表达促进剂,含有在下述实施例中证实促进多能干细胞中的p53的表达量的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该p53表达促进剂,则能够促进多能干细胞中的p53的表达量。

[0031] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞的生产方法,其中,包括:将包含序列号1、2或3的碱基序列的单链或双链的多核苷酸导入细胞的步骤。

[0032] 该生产方法,在下述实施例中证实能够利用于制作多能干细胞。因此,如果使用该生产方法,则能够生产多能干细胞。

[0033] 另外,根据本发明,提供一种恶性肿瘤的治疗药,其含有包含序列号1、2、3、8或44~47中的1个以上碱基序列的单链或双链的多核苷酸。

[0034] 该恶性肿瘤的治疗药,含有在下述实施例中证实抑制恶性肿瘤的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该恶性肿瘤的治疗药,则能够进行恶性肿瘤的治疗。

[0035] 另外,根据本发明,提供一种siRNA,其含有包含序列号1、2或3的碱基序列的单链或双链的多核苷酸。

[0036] 该siRNA含有在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞中的p53的表达量或抑制恶性肿瘤的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该siRNA,则能够将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞的p53的表达量或进行恶性肿瘤的治疗。

[0037] 另外,根据本发明,提供一种载体,其含有包含与序列号1的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。或者提供一种载体,其含有包含与序列号2的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。或者提供一种载体,其含有包含与序列号3的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。或者提供一种载体,其含有包含与序列号8的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。或者提供一种载体,其含有包含与序列号44~47中的1个以上碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。

[0038] 如果利用这些载体,则能够表达包含序列号1、2、3、8或44~47中的1个以上碱基序列的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用这些载体,则能够将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞的p53的表达量或进行恶性肿瘤的治疗。

[0039] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞诱导剂,其含有相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的单链或双链的多核苷酸,并且将细胞向多能干细胞诱导。

[0040] 该多能干细胞诱导剂,含有在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该多能干细胞诱导剂,则能够将细胞向多能干细胞诱导。

[0041] 另外,根据本发明,提供一种shRNA,其含有包含序列号8的碱基序列的单链或双链的多核苷酸。

[0042] 该shRNA含有在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞中的p53的表达量或抑制恶性肿瘤的单链或双链的多核苷酸。

因此,如果使用该shRNA,则能够将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞的p53的表达量或进行恶性肿瘤的治疗。

[0043] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞诱导用、未分化细胞标记表达调节用、多能干细胞的p53表达促进用或恶性肿瘤的治疗用的试剂盒(Kit),其含有包含序列号1、2、3、8或44~47中的1个以上碱基序列的多核苷酸。

[0044] 如果利用该试剂盒,则能够简便地使用在下述实施例中证实将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞中的p53的表达量或抑制恶性肿瘤的单链或双链的多核苷酸。因此,如果使用该试剂盒,则能够将细胞向多能干细胞诱导、调节未分化细胞标记的表达量、促进多能干细胞的p53的表达量或进行恶性肿瘤的治疗。

[0045] 需要说明的是,在上述任意一项的多能干细胞诱导剂、未分化细胞标记表达调节剂、p53表达促进剂、多能干细胞的的生产方法、恶性肿瘤的治疗药、siRNA、载体、shRNA以及试剂盒中,序列号1~3、8或44~47中的1个以上碱基序列中的1~3个碱基可以缺失、被置换或者加成。或者,序列号4~6或9的碱基序列中的1~5个碱基可以缺失、被置换或者加成。或者,序列号7的碱基序列中的1~4个碱基可以缺失、被置换或者加成。

[0046] 另外,根据本发明,提供一种多能干细胞,其是来自哺乳动物的细胞的多能干细胞,与HPS0002:253G1株相比,内在性的p53的表达量增大。该多能干细胞由于p53的表达量多,因此,难以产生恶性瘤化。

[0047] **【发明效果】**

[0048] 根据本发明,得到诱导多能干细胞的新型的化合物。或者,得到调节未分化细胞标记的表达的新型的化合物。或者,得到多能干细胞的p53表达促进剂。或者,得到新型的恶性肿瘤治疗药。或者,得到新型的的多能干细胞。

【附图说明】

[0049] 图1A是表示RGM249的二级结构的图。

[0050] 图1B是表示RGM249shRNA和RGM249m-1shRNA的二级结构的图。

[0051] 图1C是考察RGM249shRNA皮下注射后的肿瘤体积的变化的结果。

[0052] 图1D是皮下注射RGM249shRNA质粒等时的、肿瘤体积的目视的观察结果。

[0053] 图2A是在从皮下注射RGM249shRNA质粒等35日后,考察肿瘤中表达的基因的表达抑制效果的结果。

[0054] 图2B是在从静脉注射RGM249shRNA质粒等28日后,考察肿瘤中表达的基因的表达抑制效果的结果。

[0055] 图3A是表示与RGM249mRNA、和内部的3个miRNA相当的部位的结果。

[0056] 图3B是表示3个miRNA的二级结构的图。

[0057] 图3C是比较3个miRNA与3个siRNA的反义链的序列的结果。

[0058] 图3D是考察将3个siRNA向HMV-I转染后的、癌细胞增殖的抑制效果的结果。

[0059] 图3E是从将3个siRNA混合物同时转染而成的HMV-I中进行RNA提取、考察miR-47、miR-101、miR-197的表达水平的结果。

[0060] 图3F是对于与癌、多分化能、干细胞性相关的基因、评价由3个siRNA混合物产生的转染子的转录表达谱的结果。

- [0061] 图4是考察由3个siRNA混合物+DDS的皮下给药产生的、HMV-I细胞的增殖性的抑制的结果。
- [0062] 图5A是表示进行评价的肿瘤的某个部分的图。
- [0063] 图5B是评价由3个siRNA混合物引起的、miR-47、miR-101、miR-197各自的表达抑制效果的结果。
- [0064] 图5C是通过显微镜观察用siRNA处理后的肿瘤的照片。
- [0065] 图5D是考察将3个siRNA混合物给药的情况下的肿瘤、分化、多能性的相关基因的转录水平的结果。
- [0066] 图6A是将miR-197siRNA转染成293FT细胞后、通过显微镜观察的照片。
- [0067] 图6B是表示hsa-mir-520d的二级结构的图。
- [0068] 图6C是通过显微镜在免疫组织化学上观察将miR-197siRNA转染而成的293FT细胞的照片。
- [0069] 图6D是通过病毒载体使hsa-mir-520d转染HT1080细胞,并强制表达后,在免疫组织科学的试验中观察未分化标记的表达量的结果。
- [0070] 图6E是通过病毒载体使hsa-mir-520d转染T98G细胞,并强制表达后,在免疫组织科学的试验中观察未分化标记的表达量的结果。
- [0071] 图6F是通过病毒载体使hsa-mir-520d转染PK-45p细胞,并强制表达后,在免疫组织科学的试验中观察未分化标记的表达量的结果。
- [0072] 图7A是考察使用miR-197siRNA和hsa-mir-520制作的iPS细胞中的各种基因的转录量的结果。
- [0073] 图7B是通过两步实时RT-qPCR(n=5)评价hiPSC和293FT细胞中的miRNA-197和hsa-mir-520d的、miRNA表达水平的相关性的结果。
- [0074] 图8A是显微镜评价向293FT细胞中的has-mir-520d的病毒导入后出现的浮游细胞群落的结果。
- [0075] 图8B是基于免疫细胞化学确认520d-293FT的干性化转换的结果。
- [0076] 图8C是考察520d-293FT的GFP阳性和NANOG阳性状态的结果。
- [0077] 图9A是用RT-PCR考察细胞的p53、hTERT等的表达量的结果。
- [0078] 图9B是通过免疫印迹考察细胞的p53、hTERT等的表达量的结果。
- [0079] 图9C是考察细胞的miRNA的表达量的结果。
- [0080] 图9D是考察has-mir-520d的过量表达时的细胞的miRNA的表达量的结果。
- [0081] 图10A是293FT、模拟-293FT、520d-293FT的细胞周期分析的结果。
- [0082] 图10B是考察293FT、模拟-293FT、520d-293FT中的DNMT1、HDAC、Sin3A、MBD3的表达量比的结果。
- [0083] 图11A是考察520d-HLF的形态学的变化的结果。
- [0084] 图11B是考察520d-HLF中的各种mRNA的表达量比的结果。
- [0085] 图11C是考察模拟-HLF、520d-HLF的浸润的性质的结果。
- [0086] 图11D是通过免疫印迹考察HLF、模拟-HLF、520d-HLF中的各种蛋白质的表达量的结果。
- [0087] 图12A是模拟-HLF、520d-HLF的细胞周期分析的结果。

- [0088] 图12B是考察HLF、hiPSC、520d-HLF中的各种mRNA的表达量比的结果。
- [0089] 图13是考察HLF、模拟-HLF、520d-HLF中的DNMT1、HDAC、Sin3A、MBD3的表达量比的结果。
- [0090] 图14A是表示肿瘤形成的照片。
- [0091] 图14B是表示白色结节的照片。
- [0092] 图14C是表示向正常肝组织转换的照片。
- [0093] 图14D是表示腺瘤样增生的照片。
- [0094] 图14E是表示生成的畸胎瘤和肝组织的照片。
- [0095] 图15是考察520d-HLF的分化的结果。
- [0096] 图16是将520d-HLF进行骨分化诱导的结果。
- [0097] 图17是考察转染has-mir-520d病毒的Huh7的形态学的变化等的结果。
- [0098] 图18是考察转染has-mir-520d病毒的T98G的形态学的变化等的结果。
- [0099] 图19是考察转染has-mir-520d病毒的PK-9的形态学的变化等的结果。
- [0100] 图20是考察转染has-mir-520d病毒的HT1080的形态学的变化等的结果。
- [0101] 图21是在siRNA生成病毒转染后的HNV-1中实施MTT试验的结果。
- [0102] 图22是在siRNA生成病毒转染后的HNV-1的荧光显微镜照片和增殖曲线。
- [0103] 图23是在siRNA生成病毒转染后的HNV-1中实施群落形成试验的结果。

【具体实施方式】

[0104] 以下,对本发明的实施方式详细地进行说明。需要说明的是,关于同样的内容,为了避免重复的烦杂,省略适当说明。

[0105] (1)包含序列号1的碱基序列的多核苷酸

[0106] 本发明的一个实施方式为包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示将细胞向多能干细胞诱导。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。

[0107] 另外,该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示:促进或抑制未分化细胞标记的表达、促进多能干细胞中的p53的表达量或对恶性肿瘤的抑制有效。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0108] 其他的实施方式为一种多能干细胞诱导剂,其含有包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,并且将细胞向多能干细胞诱导。在此,包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该多能干细胞诱导剂能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0109] 其他的实施方式为一种未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药,其含有包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。在此,包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该未分化

细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,这些能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,这些能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,这些能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0110] 其他的实施方式为一种siRNA或miRNA,其含有包含序列号1的碱基序列的多核苷酸。在此,包含序列号1的碱基序列的多核苷酸所具有的效果,与上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果同样。因此,该siRNA或miRNA能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0111] 其他的实施方式为一种载体,其含有包含与序列号1的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。该载体能够优选用于表达或生产上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。因此,该载体能够用于与上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0112] 另外,该载体还可以包含与序列号4的碱基序列互补的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含序列号1的碱基序列的多核苷酸、能够形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有包含序列号1的碱基序列的多核苷酸的siRNA、miRNA或shRNA。

[0113] 上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,还可以包含序列号4的碱基序列。该情况下,可以认为上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸发挥的、RNAi或miRNA的作用效率上升。可以认为这是由于,通过序列号1的碱基序列与序列号4的碱基序列形成碱基对,容易引入到RISC中。另外,上述的单链或多链为单链的情况下,能够得到shRNA的结构。另外,包含序列号4的碱基序列的情况下,可以认为使上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸更加稳定。另外,可以认为上述包含序列号1的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,即使包含由序列号1的碱基序列构成的RNA链的互补链也得到同样的效果。

[0114] 需要说明的是,包含序列号1、序列号2以及序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,可以分别含有下述实施例中记载的miR-47siRNA、miR-101siRNA、miR-197siRNA的引导链。这3个siRNA是相对于由RGM249mRNA生成的miRNA发挥RNAi而设计的,可以启示在阻碍从RGM249mRNA开始的级联的方面功能相通。因此,可以认为如果将这3个siRNA导入细胞,则发挥类似的效果。这可以认为,关于包含序列号1、序列号2以及序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸也同样,如果将这些多核苷酸导入细胞,则发挥类似的效果。

[0115] (2)包含序列号2的碱基序列的多核苷酸

[0116] 其他的实施方式为包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示将细胞向多能干细胞诱导。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。

[0117] 另外,该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示促进或抑制未分化细胞标记的表达、促进多能干细胞中的p53的表达量或对恶性肿瘤的抑制有效。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于

恶性肿瘤的治疗。

[0118] 其他的实施方式为一种多能干细胞诱导剂,其含有包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,并且将细胞向多能干细胞诱导。在此,包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该多能干细胞诱导剂能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0119] 其他的实施方式为一种未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药,其含有包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。在此,包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,这些能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,这些能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,这些能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0120] 其他的实施方式为一种siRNA或miRNA,其含有包含序列号2的碱基序列的多核苷酸。在此,包含序列号2的碱基序列的多核苷酸所具有的效果,与上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果相同。因此,该siRNA或miRNA能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0121] 其他的实施方式为一种载体,其含有包含与序列号2的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。该载体能够优选用于表达或生产上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。因此,该载体能够用于与上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0122] 另外,该载体还可以包含与序列号5的碱基序列互补的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含序列号2的碱基序列的多核苷酸、能够形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有包含序列号2的碱基序列的多核苷酸的siRNA、miRNA或shRNA。

[0123] 上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸还可以包含序列号5的碱基序列。该情况下,可以认为上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所发挥的、RNAi或miRNA的作用效率上升。可以认为这是由于,通过序列号2的碱基序列与序列号5的碱基序列形成碱基对,容易引入到RISC中。另外,上述的单链或多链为单链的情况下,能够得到shRNA的结构。另外,包含序列号5的碱基序列的情况下,可以认为使上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸更加稳定。另外,可以认为上述包含序列号2的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,即使包含由序列号2的碱基序列构成的RNA链的互补链也得到同样的效果。

[0124] (3)包含序列号3的碱基序列的多核苷酸

[0125] 其他的实施方式为包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示将细胞向多能干细胞诱导。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。

[0126] 另外,该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示促进或抑制未分化细胞标记的表达、促进多能干细胞中的p53的表达量或对恶性肿瘤的抑制有效。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0127] 其他的实施方式为一种多能干细胞诱导剂,其含有包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,并且将细胞向多能干细胞诱导。在此,包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该多能干细胞诱导剂能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0128] 其他的实施方式为一种未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药,其含有包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。在此,包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,这些能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,这些能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,这些能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0129] 其他的实施方式为一种siRNA或miRNA,其含有包含序列号3的碱基序列的多核苷酸。在此,包含序列号3的碱基序列的多核苷酸所具有的效果,与上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果相同。因此,该siRNA或miRNA能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0130] 其他的实施方式为一种载体,其含有包含与序列号3的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。该载体能够优选用于表达或生产上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。因此,该载体能够用于与上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0131] 另外,该载体还可以包含与序列号6的碱基序列互补的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含序列号3的碱基序列的多核苷酸能够形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有包含序列号3的碱基序列的多核苷酸的siRNA、miRNA或shRNA。

[0132] 上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸还可以包含序列号6的碱基序列。该情况下,可以认为上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所发挥的、RNAi或miRNA的作用效率上升。可以认为这是由于,通过序列号3的碱基序列与序列号6的碱基序列形成碱基对,容易引入到RISC中。另外,上述单链或多链为单链的情况下,能够得到shRNA的结构。另外,包含序列号6的碱基序列的情况下,可以认为使上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸更加稳定。另外,可以认为上述包含序列号3的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,即使包含由序列号3的碱基序列构成的RNA链的互补链也得到同样的效果。

[0133] (4)与序列号7的碱基序列关联的多核苷酸

[0134] 其他的实施方式为一种单链或多链的多核苷酸,其包含相对于将包含序列号7的碱基序列的RNA链用RNA内切酶Ⅲ进行处理而得到的RNA链互补的碱基序列(以下,也有时称为“RNA内切酶Ⅲ处理(Dicer processing)后的互补的碱基序列”)。上述RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列包括下述实施例中记载的miR-47siRNA、miR-101siRNA、miR-197siRNA中的任意一种的引导链的碱基序列。引导链是可以认为赋予miR-47siRNA等的功能特征的部位。

[0135] 另外,该miR-47siRNA等在下述实施例中启示将细胞向多能干细胞诱导、促进或抑制未分化细胞标记的表达、促进多能干细胞中的p53的表达量或对恶性肿瘤的抑制有效。因此,包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,可以认为同样地能够将细胞向多能干细胞诱导、促进或抑制未分化细胞标记的表达、促进多能干细胞中的p53的表达量或进行恶性肿瘤的抑制。

[0136] 其他的实施方式为一种多能干细胞诱导剂,其含有包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,将细胞向多能干细胞诱导。在此,包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该多能干细胞诱导剂能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0137] 其他的实施方式为一种未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药,其含有包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。在此,包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,这些能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,这些能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,这些能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0138] 其他的实施方式为一种siRNA或miRNA,其含有包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的多核苷酸。在此,包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的多核苷酸所具有的效果,与上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果同样。因此,该siRNA或miRNA能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该siRNA或miRNA能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0139] 其他的实施方式为一种载体,其含有包含与RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。该载体能够优选用于表达或生产上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。因此,该载体能够用于与上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0140] 另外,该载体还可以包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的多核苷酸、能够

形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的多核苷酸的siRNA、miRNA或shRNA。

[0141] 上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,还可以包含由RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列构成的RNA链的互补链。该情况下,可以认为上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所发挥的、RNAi或miRNA的作用效率上升。可以认为这是由于,通过RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列、与由RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列构成的RNA链的互补链形成碱基对,容易引入到RISC中。另外,上述单链或多链为单链的情况下,能够得到shRNA的结构。另外,可以认为在包含由RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列构成的RNA链的互补链的情况下,使上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸更加稳定。

[0142] 其他的实施方式为一种单链或双链的多核苷酸,其相对于包含选自序列号11、12以及13组成的组中的一种以上的碱基序列的RNA链、具有RNAi作用。包含该一种以上的碱基序列的RNA链在下述实施例中证实是将包含序列号7的碱基序列的RNA链用RNA内切酶Ⅲ进行处理而得到的RNA链。因此,具有与上述包含RNA内切酶Ⅲ处理后的互补的碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的作用效果,并且能够用于同样的用途。

[0143] (5)包含序列号8的碱基序列的多核苷酸

[0144] 其他的实施方式为包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示,通过阻碍从RGM249mRNA开始的级联,将细胞向多能干细胞诱导。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。

[0145] 另外,该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示对恶性肿瘤的抑制有效。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0146] 其他的实施方式为一种多能干细胞诱导剂,含有包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,将细胞向多能干细胞诱导。在此,包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该多能干细胞诱导剂能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0147] 其他的实施方式为一种未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药,其含有包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。在此,包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,这些能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,这些能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,这些能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0148] 其他的实施方式为一种shRNA,含有包含序列号8的碱基序列的多核苷酸。在此,包含序列号8的碱基序列的多核苷酸所具有的效果,与上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果同样。因此,该shRNA能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该shRNA能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该shRNA能够优选用于

促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该shRNA能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0149] 其他的实施方式为一种载体,其含有包含与序列号8的碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。该载体能够优选用于表达或生产上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。因此,该载体能够用于与上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0150] 另外,该载体还可以包含与序列号9的碱基序列互补的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含序列号8的碱基序列的多核苷酸、能够形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有包含序列号8的碱基序列的多核苷酸的siRNA、miRNA、shRNA。

[0151] 上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,还可以包含序列号9的碱基序列。该情况下,可以认为上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所发挥的、RNAi或miRNA的作用效率上升。可以认为这是由于,通过序列号8的碱基序列与序列号9的碱基序列形成碱基对,容易引入到RISC中。另外,上述单链或多链为单链的情况下,能够得到shRNA的结构。另外,可以认为包含序列号9的碱基序列的情况下,使上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸更加稳定。另外,可以认为包含上述序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,即使包含由序列号8的碱基序列构成的RNA链的互补链也得到同样的效果。

[0152] 上述包含序列号8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,可以为包含序列号10的碱基序列的单链的多核苷酸。该情况下,能够作为相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的shRNA优选使用。

[0153] (6)与序列号7的碱基序列关联的多核苷酸

[0154] 其他的实施方式为一种单链或双链的多核苷酸,其相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用。该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示,通过阻碍从RGM249mRNA开始的级联,将细胞向多能干细胞诱导。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。

[0155] 另外,该单链或多链的多核苷酸在下述实施例中启示对恶性肿瘤的抑制有效。因此,该单链或多链的多核苷酸能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0156] 其他的实施方式为一种多能干细胞诱导剂,其含有相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的单链或双链的多核苷酸,将细胞向多能干细胞诱导。在此,相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的单链或双链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该多能干细胞诱导剂能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该多能干细胞诱导剂能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0157] 其他的实施方式为一种未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药,其含有相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的单链或双链的多核苷酸。在此,相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的单链

或双链的多核苷酸所具有的效果如上所述。因此,该未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,这些能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,这些能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,这些能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0158] 其他的实施方式为一种shRNA,其含有相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸。在此,相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸所具有的效果,与上述相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的单链或双链的多核苷酸所具有的效果同样。因此,该shRNA能够优选用于将细胞向多能干细胞诱导。或者,该shRNA能够优选用于调节未分化细胞标记的表达。或者,该shRNA能够优选用于促进多能干细胞的p53的表达量。或者,该shRNA能够优选用于恶性肿瘤的治疗。

[0159] 其他的实施方式为一种载体,其包含与将相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸进行编码的碱基序列互补的碱基序列。该载体能够优选用于表达或生产上述相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸。因此,该载体能够用于与上述相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0160] 另外,该载体还可以包含将相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸进行编码的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸、能够形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有相对于包含序列号7的碱基序列的RNA链具有RNAi作用的多核苷酸的siRNA、miRNA、shRNA。

[0161] (7)与序列号41等的碱基序列关联的多核苷酸

[0162] 其他的实施方式为一种单链或多链的多核苷酸,其包含序列号41或44~47中的1个以上碱基序列。在下述实施例中启示,该单链或多链的多核苷酸,能够与如上所述的包含序列号1、2、3或8的碱基序列的单链或多链的多核苷酸所具有的效果发挥同样的效果。因此,能够用于多能干细胞诱导剂、未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂、恶性肿瘤的治疗药、siRNA(或miRNA)或者shRNA(或pre-miRNA)或载体的用途。需要说明的是,包含序列号41的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,还可以包含其互补链、或包含序列号42的碱基序列的多核苷酸。另外,包含序列号41的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,可以为包含序列号43的碱基序列的单链的多核苷酸。另外,包含序列号44~47的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,还可以包含其互补链、或分别包含序列号48~51的碱基序列的多核苷酸。另外,包含序列号44~47的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,可以为分别包含序列号52~55或者分别包含56~59的碱基序列的单链或多链的多核苷酸。

[0163] 其他的实施方式为一种载体,其含有包含与序列号41或44~47中的1个以上碱基序列互补的碱基序列的多核苷酸。该载体能够优选用于表达或生产上述包含序列号41或44~47中的1个以上碱基序列的单链或多链的多核苷酸。因此,该载体能够用于与包含序列号41或44~47中的1个以上碱基序列的单链或多链的多核苷酸同样的用途(多能干细胞诱导剂、治疗药等)。

[0164] 另外,该载体还可以包含与序列号42或48~51中的1个以上碱基序列互补的碱基序列。该情况下,能够优选用于表达或生产相对于包含序列号41或44~47中的1个以上碱基

序列的多核苷酸、能够形成碱基对的多核苷酸。另外,能够优选用于表达或生产含有包含序列号41或44~47中的1个以上碱基序列的多核苷酸的siRNA、miRNA、pre-miRNA或shRNA。

[0165] (8)导入实施方式相关的多核苷酸的细胞

[0166] 其他的实施方式为导入上述任意一种单链或多链的多核苷酸或上述任意一种载体的细胞。该细胞诱导多能性,因此,能够作为再生医疗等的医疗材料和研究材料优选使用。

[0167] 另外,该细胞由于不具有外来性的c-Myc,而表达内在性的p53,因此,恶性肿瘤化的风险低。该p53的表达量,例如,相对于hiPSC的HPS0002:253G1株的p53表达量为1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、3.0、4.0、5.0、10、100或1000倍,但不限于这些。另外,该表达量可以为在此例示的任意2个值的范围内。另外,p53的表达量的测定方法,从测定精度以及简便性的方面出发,优选为实时PCR。关于详细的测定条件,可以使用下述实施例中的实时PCR的测定条件。

[0168] (9)多能干细胞及其生产方法

[0169] 其他的实施方式为一种多能干细胞的生产方法,其中,包括将上述任意一种单链或多链的多核苷酸导入细胞的步骤。或者,一种多能干细胞的生产方法,其中,包括将上述任意一种载体导入细胞的步骤。只要适当地使用该方法,则能够生产多能干细胞。需要说明的是,多核苷酸或载体向细胞中的导入以及培养方法,可以根据本技术领域中公知的方法进行。向细胞中的导入,例如,可以使用磷酸钙法、脂质转染法、电穿孔法、使用病毒(腺病毒、逆转录病毒、HIV等)的方法或显微注射等[改订第4版新基因工程手册,羊土社(2003):152-179.]。另外,利用耐药性和细胞分选仪等,可以仅选择导入的细胞。培养基例如可以使用灵长类ES细胞用培养基(COSMO BIO有限公司制)或通常的人细胞用的培养基(例如,DMEM或RPMI基质的培养基)等。通常,在确立ES细胞时多数情况下与饲养细胞共同培养,本实施方式的多能干细胞即使不存在饲养细胞也能够确立。饲养细胞例如可以从欧洲细胞培养物收藏中心(European Collection of Cell Cultures)获得。另外,本实施方式的多能干细胞均能够在选自F-12HAM[DMEM(15mM HEPES+1mM丙酮酸钠+吡哆醇+NaHCO₃+5mM-谷氨酰胺)],RPMI-1640+L-谷氨酰胺,DMEM+高葡萄糖+L-谷氨酰胺+0.1mM NEAA以及REPROSTEM(REPROCell公司):bFGF3-10ng/ml组成的组中的一种以上的培养基中、37℃、5%CO₂、10%FBS的条件下培养。因此,也成功克服所谓的iPS细胞所具有的培养上的困难性。

[0170] 其他的实施方式为通过上述生产方法得到的多能干细胞。或者是与HPS0002:253G1株相比内在性的p53的表达量增大的多能干细胞。或者是上述任意一种单链或多链的多核苷酸的表达量增大的多能干细胞。这些细胞由于表达内在性的p53,因此,恶性肿瘤化的风险低。

[0171] (10)与实施方式中的多核苷酸关联的序列

[0172] 在此,上述序列号1~10以及41~59的碱基序列只要为一定程度,则可以接受变异。可以认为包含具有这样的变异的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,与包含野生型的碱基序列的单链或多链的多核苷酸具有同样的效果。包含变异型的碱基序列的多核苷酸可以人工地制作,该情况下,也可以称为包含改变型的碱基序列的多核苷酸。

[0173] 需要说明的是,在RNAi和miRNA等用途中使用的情况下,序列号4~6、9、42、48~51以及56~59的碱基序列的变异,即使比序列号1~3、8、41、44~47以及52~55的碱基序列的

变异大,其功能也难以产生变动。这是由于,序列号1~3、8、41、44~47以及52~55的碱基序列是赋予RNAi和miRNA等的功能特征的重要的序列,另一方面,序列号4~6、9、42、48~51以及56~59的碱基序列为辅助的序列。

[0174] 另外,上述序列号1~10以及41~59的碱基序列也可以为各自的碱基序列的1个或者多个碱基缺失、被置换或者加成后的碱基序列。可以认为包含这样的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,与包含野生型的碱基序列的单链或多链的多核苷酸具有同样的效果。在此,上述“1个或者多个”优选为10个以下,更优选为5个以下,更优选为4个以下,更优选为3个以下,更优选为2个以下,进一步优选为1个。这是由于,上述“1个或者多个”越少,具有越接近野生型的特性。需要说明的是,上述“加成”中包括插入的概念。

[0175] 另外,上述序列号1~10以及41~59的碱基序列,可以为相对于各自的碱基序列具有80%以上的相同性的碱基序列。可以认为包含这样的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,与包含野生型的碱基序列的单链或多链的多核苷酸具有同样的效果。在此,上述“80%以上”优选为85%以上,更优选为90%以上,更优选为95%以上,更优选为96%以上,更优选为97%以上,进一步优选为98%以上,最优选为99%以上。这是由于,上述“80%以上”越大,具有越接近野生型的特性。

[0176] 另外,上述序列号1~10以及41~59的碱基序列,可以是相对于由与各自的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸、在严格的条件下进行杂化的多核苷酸。可以认为包含这样的碱基序列的单链或多链的多核苷酸,与包含野生型的碱基序列的单链或多链的多核苷酸具有同样的效果。

[0177] 本说明书中,“相同性”是根据本技术领域中公知的方法计算2个或者多个之间的碱基序列的同一碱基数的比例而得到的。在计算比例前,排列进行比较的碱基序列组的碱基序列,在需要使同一比例最大的情况下在碱基序列的一部分中引入间隙。另外,是指在最佳排列的状态下同一碱基数相对于包括进行重叠的碱基的全部碱基的比例。用于排列的方法、比例的计算方法以及与此相关的计算机程序,在本技术领域一直以来被熟知,可以使用一般的序列分析程序(例如,GENETYX、GeneChip序列分析等)进行测定。

[0178] 本说明书中,“严格的条件”可以为如下条件,例如包括:(1)用于清洗的低离子强度和高温度,例如在50℃下,使用0.015M的氯化钠/0.0015M的柠檬酸钠/0.1%的十二烷基硫酸钠;(2)在杂化中使用甲酰胺等改性剂、例如在42℃下,使用50%(vol/vol)甲酰胺和0.1%牛血清白蛋白/0.1%聚蔗糖/0.1%聚乙烯基吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液(pH6.5)以及750mM的氯化钠、75mM柠檬酸钠;或(3)在42℃下50%甲酰胺、5×SSC(0.75M的NaCl、0.075M的柠檬酸钠)、50mM的磷酸钠(pH6.8)、0.1%的焦磷酸钠、5×Denhardt's溶液、超声波处理鲑鱼精DNA(50μg/ml)、0.1%SDS、以及10%的葡聚糖硫酸、和在42℃下在0.2×SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中的清洗,以及用55℃的甲酰胺、接着用55℃下的包含EDTA的0.1×SSC严格的清洗。另外,中等程度的严格的条件的例子为如下条件:在包含20%甲酰胺、5×SSC、50mM磷酸钠(pH7.6)、5×Denhardt's溶液、10%葡聚糖硫酸以及20mg/ml的变性剪切鲑鱼精DNA的溶液中,在37℃下潜伏一夜,接着在1×SSC中37~50℃下进行过滤器的清洗。需要说明的是,杂化反应的严格性,对于本领域技术人员而言能够容易地确定,通常,依赖于探针长、清洗温度以及盐浓度。通常,长的探针为了进行适当的退火需要高温,短的探针需要低温。另外,通常,严格性与盐浓度成反比。

[0179] 通常已知,在基因工程和生命工程的领域,多核苷酸中的碱基即使发生一定程度的变异或缺失等,也保有与野生型同样的功能。另外已知,关于2个多核苷酸之间的碱基的错配,也允许一定程度。下述实施例中,实际上存在多核苷酸中的碱基的缺失和错配。例如,即使在RGM249shRNA中缺失1个碱基,也观察到恶性肿瘤抑制效果(图1B、图1D)。由此启示:即使发生一定程度的缺失等,也保有与野生型同样的功能。观察miR-47siRNA的序列时,在引导链与过客链之间存在3个错配(图3B)。观察miR-101siRNA的序列时,在引导链与过客链之间存在1个错配(图3B)。在miR-47与miR-47siRNA的引导链之间存在3个错配(图3C)。由这些启示:即使双链具有一定程度错配,也产生RNAi或miRNA的功能。

[0180] (11)与实施方式中的多核苷酸关联的其他特征

[0181] 本说明书中,“多能干细胞”具有多能性,是能够向各种细胞中分化的细胞。例如,在国际公开第2007/069666号、文献[Hong et al., Nature. 2009Aug27; 460(7259):1132-5. Epub2009Aug9.]中记载了生产方法和特性的例子。另外,多能干细胞只要是本领域技术人员就能够认识,包括例如与作为人的人工多能干细胞的hiPSC(HPS0002253G1)相比将任意一种未分化标记同程度或其以上进行表达的细胞。

[0182] 本说明书中,“未分化细胞标记”是由未分化的细胞特异性地表达的DNA链、RNA链或蛋白质等化合物的总称。例如,可以列举:Klf4、c-Myc、Oct4、Sox2、PROM1、Nanog、SSEA-1、ALP、eRas、Esg1、Ecat1、Fgf4、Gdf3、REX-1等。也有时称为多能干细胞标记。

[0183] 本说明书中,“RNAi”是通过siRNA(短干扰RNA; short interfering RNA)或shRNA(短发夹RNA; short hairpin RNA)、短链或长链的单链或多链RNA等,抑制目标基因和mRNA等的功能的现象。通常,该抑制是序列特异性的,在各种生物物种中存在。使用siRNA时的、典型的哺乳类中的RNAi的机理如下。首先,将siRNA导入细胞内时,引起siRNA的单链化,之后,形成RISC(RNA诱导沉默复合体; RNA-induced Silencing Complex)。RISC以引入的单链RNA作为引导分子,识别具有与该单链RNA互补性高的序列的目标RNA链。目标RNA链通过RISC内的AGO2,在siRNA的中心部分被切断。之后,分解被切断的目标RNA链。以上为典型的机理,此外,以生物体内的miRNA作为目标进行抑制的例子,在文献[Krützfeldt et al., Nucleic Acids Res. 2007; 35(9):2885-92. Epub2007Apr16.]中记载。需要说明的是,本说明书中,“具有RNAi作用的分子”为能够引起RNAi作用的分子,例如,包括siRNA、shRNA等。

[0184] 本说明书中,“siRNA”是引起RNAi的双链的多核苷酸。通常,siRNA的双链可以分为引导链和过客链(Passenger strand),引导链引入到RISC中。引入到RISC中的引导链用于识别目标RNA。在RNAi研究中主要使用人工制作的RNAi,也已知在生物体内内在地存在的RNAi。

[0185] 本说明书中,“miRNA(microRNA)”是具有与siRNA类似的功能的多核苷酸,已知进行目标RNA链的翻译抑制或分解。pre-miRNA是miRNA的前体。miRNA与siRNA的差别,通常在于生成途径和详细的机理。在生物体内的miRNA的典型的生成途径如下。首先,从miRNA基因作为长的pri-miRNA(primary miRNA)进行转录。该pri-miRNA中,包括之后成为miRNA的序列,该部分采用发夹结构。Drosha切断该发夹结构的根本。切割出的发夹被称为pre-miRNA。该pre-miRNA通过Exportin-5搬运至细胞质。接着,在细胞质中,通过RNA内切酶III切断pre-miRNA,实现双链的miRNA,其进一步单链化,形成RISC。该单链RNA作为引导分子起作用,识别目标RNA链,进行切断或翻译抑制。以上为典型的miRNA的生成途径。需要说明的是,本说

说明书中,“具有miRNA作用的分子”是能够引起miRNA作用的分子,例如,包括miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA等。

[0186] 本说明书中,“shRNA”是能够形成折叠成发夹状的结构(发夹状结构)的单链的多核苷酸,具有诱导RNAi的功能。形成与pre-miRNA类似的结构,通常在细胞内通过RNA内切酶Ⅲ被切断,切掉siRNA。已知通过该siRNA发生目标RNA的切断。

[0187] 本说明书中,“小RNA”是指比较小的RNA,例如,可以列举:siRNA、miRNA、shRNA、pre-miRNA、单链或多链的低分子RNA等,但不限于这些。碱基数例如为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、40、50、60、70、80、90或100个碱基,但不限于这些。另外,该碱基数可以是在此例示的任意2个值的范围内。

[0188] 本说明书中,“RNA内切酶Ⅲ(Dicer)”包括具有切断siRNA和miRNA等的前体、并且切掉siRNA和miRNA等的功能的酶。例如,能够将dsRNA向siRNA引导,将pre-miRNA向miRNA引导,将shRNA向siRNA引导。另外已知,RNA内切酶Ⅲ具有上述以外的几个功能。

[0189] 上述单链或多链可以为单链或双链。该情况下,能够利用siRNA、miRNA、shRNA或反义RNA的机理。

[0190] 上述单链或多链的多核苷酸可以分别使用任意一种,也可以并用二种以上。这样的情况下,能够作为多能干细胞诱导剂、未分化细胞标记表达调节剂、多能干细胞的p53表达促进剂或恶性肿瘤的治疗药优选使用。需要说明的是,并用二种以上时的并用比例没有特别限定。

[0191] 上述单链或多链的多核苷酸可以具有RNAi作用。该情况下,通过RNAi作用能够分解作为目标的RNA链。

[0192] 上述单链或多链的多核苷酸可以为小RNA。该情况下,产生干扰素应答等不利的现象的风险低。干扰素应答,通常作为细胞通过感知双链RNA(dsRNA)而达到抗病毒状态的现象已知。报道有:在将长链的dsRNA导入细胞中的情况下,dsRNA应答性蛋白激酶(PKR)发生活性化,诱导干扰素反应(Gil et al.,Apoptosis.2000Apr;5(2):107-14.)。其结果,诱导非特异的基因表达的抑制和凋亡。

[0193] 上述单链或多链的多核苷酸,例如为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200或500个核苷酸,但不限于这些。该数可以是在此例示的任意2个值的范围内。该数如果为15以上,则相对于目标的多核苷酸能够精度更高地键合的可能性提高。另外,该数如果为100以下,则产生干扰素应答等不利的现象的风险降低。可以认为核苷酸数越少,该现象越难以发生。

[0194] 上述单链或多链的多核苷酸为单链的情况下,可以为shRNA,双链的情况下,可以为siRNA。该情况下,通过RNAi作用能够分解目标RNA链。另外,由于形成碱基对,因此,容易引入到RISC中,有效地产生RNAi(Martinez et al.,Cell.2002 Sep 6;110(5):563-74.)。另外,双链的情况下,也可以为miRNA。该情况下,通过miRNA作用能够抑制目标RNA链。另外,也可以为单链中不具有shRNA这样的发夹结构的情况。文献[Hohjoh et al.,FEBS Lett.2002 Jun 19;521(1-3):195-9.]中记载了,通过这样的结构也发挥目标RNA链的表达抑制。

[0195] 另外,上述shRNA可以由35个以上的核苷酸构成。如果为35以上,则在shRNA中能够精度良好地形成特有的发夹状结构的可能性提高。另外,上述shRNA可以由100以下的核苷

酸构成。如果为100以下,则产生干扰素应答等不利的现象的风险降低。但是,通常,结构以及功能与shRNA类似的pre-miRNA中的大多数具有约100个核苷酸或其以上的长度,可以认为shRNA的长度不一定为100个核苷酸以下,也能够作为shRNA发挥作用。另外,文献[Lin et al., RNA. 2008 Oct; 14(10): 2115-24. Epub 2008 Aug 28.]中启示:人工地键合4个pre-miRNA的大分子也能够发挥作用。因此,该数只要能够作为shRNA发挥作用,则没有限定,例如为35、36、37、38、39、40、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200或500个核苷酸。另外,该数可以是在此例示的任意2个值的范围内。另外,由于同样的理由,pre-miRNA也可以具有与shRNA同程度的数的核苷酸。

[0196] 另外,上述siRNA或miRNA的引导链可以由15以上的核苷酸构成。如果为15以上,则能够相对于目标的多核苷酸精度良好地键合的可能性提高。另外,这些引导链可以由40以下的核苷酸构成。如果为40以下,则产生干扰素应答等不利的现象的风险降低。该数例如为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35或40个核苷酸,但限定于这些。另外,该数可以是在此例示的任意2个值的范围内。

[0197] 上述单链或多链的多核苷酸、shRNA、siRNA、miRNA以及pre-miRNA,可以包含由1~5核苷酸构成的突出端(overhang)。该情况下,可以认为RNAi的效率上升。该数例如为5、4、3、2或1核苷酸,但限定于这些。另外,该数可以是在此例示的任意2个值的范围内。

[0198] 作为上述载体,可以使用来自大肠菌的质粒(例如pBR322、pBR325、pUC12、pUC13),来自枯草杆菌的质粒(例如pUB110、pTP5、pC194),来自酵母的质粒(例如pSH19、pSH15),λ噬菌体等噬菌体,来自HIV、腺病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、杆状病毒等病毒的载体,pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo、pSUPER(OligoEngine公司)、BLOCK-it Inducible H1 RNAi Entry Vector(Invitrogen公司)、pRNATin-H1.4/Lenti(GenScript公司,美国新泽西州)等。

[0199] 上述多能干细胞诱导剂,可以具有将体细胞向多能干细胞诱导的功能。该情况下,能够由体细胞制作多能干细胞。本说明书中“体细胞”为不包括生殖细胞的其他细胞,包括来自皮肤的细胞、成纤维细胞等。体细胞通常多能性被限定或消失。本说明书中,“多能干细胞诱导剂”是具有使细胞接近多能干细胞这样的具有多能性的细胞的作用的物质。本说明书中,“重排”是使细胞接近多能干细胞这样的具有多能性的细胞的作用。

[0200] 上述多能干细胞诱导剂,可以为将恶性肿瘤细胞向多能干细胞诱导的诱导剂。该情况下,能够由恶性肿瘤细胞制作多能干细胞。本说明书中,“恶性肿瘤”包括通过正常的细胞突然引起变异、继续增殖而引起的疾病。另外包括恶性肿瘤、肉瘤。已知恶性肿瘤从全身所有的脏器和组织产生,并且恶性肿瘤细胞增殖时,发生结块,侵入周围的正常的组织并破坏。癌包括例如肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胰癌、肾癌、肾上腺癌、胆管癌、乳腺癌、大肠癌、小肠癌、子宫颈癌、子宫体癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌、尿道癌、肾盂癌、阴茎癌、睾丸癌、脑癌、中枢神经系统的癌、末梢神经系统的癌、头颈部癌(口腔癌、咽癌、喉癌、鼻腔/鼻窦癌、唾液腺癌、甲状腺癌等)、胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、皮肤癌、黑素瘤、甲状腺癌、唾液腺癌、血液癌或恶性淋巴瘤等。

[0201] 上述多能干细胞诱导剂,可以为将选自肝癌、胰癌、纤维肉瘤、多形性成胶质细胞瘤、黑素瘤组成的组中的一种以上的恶性肿瘤的细胞向多能干细胞诱导的诱导剂。该情况下,能够由这些恶性肿瘤细胞制作多能干细胞。至今几乎还没有报道将恶性肿瘤细胞向

多能干细胞诱导,可以期待作为新的革新性的恶性肿瘤的治疗方法。

[0202] 上述多能干细胞可以表达内在性的p53。该情况下,可以认为难以发生恶性肿瘤化。需要说明的是,p53的表达量,优选与对照试样(例如,p53基因敲除细胞、正常细胞或来自这些的试样等)相比显著地高表达。说明书中,“显著地”,例如使用t检验(Student's t test)评价对照组与被检组之间的统计学的显著差别,包括 $p < 0.05$ 。本说明书中,“对照组”是置于与被检组不同的条件下的试样,本技术领域,可以用通常使用的范围内的概念表示。

[0203] p53通常是分类为恶性肿瘤抑制基因的基因,在DNA发生损伤时被活性化,已知诱导细胞分裂的停止和损伤的修复的功能。另一方面,报道了使p53进行基因敲除和基因敲落时,iPS细胞的制作效率上升(Zhao et al.,Cell Stem Cell.2008 Nov 6;3(5):475-9.、Hong et al.,Nature.2009Aug27;460(7259):1132-5.Epub 2009 Aug 9.)。这些表示:利用p53的恶性肿瘤抑制和iPS细胞制作的效率化处于折衷的关系。另外,报道了缺损p53的ES细胞的染色体不稳定,和相对于分化诱导具有抵抗性(Lin et al.,Nat Cell Biol.2005 Feb;7(2):165-71.Epub 2004 Dec 26.)。这是指,在分化诱导后残存未分化细胞的可能性高。因此,可以认为在再生医疗中,在移植缺损p53的细胞时,恶性肿瘤形成的风险提高。因此,由该方面可知,p53对于细胞而言是重要的分子。

[0204] 本说明书中,“内在性”表示被检物质来自于细胞的内部的机理而存在。例如,在细胞内正常地表达的蛋白质,只限于该表达的蛋白质,包括在内在性中。

[0205] 上述未分化细胞标记表达调节剂中,未分化细胞标记可以为选自由Klf4、c-Myc、Oct4、Sox2、PROM1组成的组中的一种以上的未分化细胞标记。未分化细胞标记和各种蛋白质,可以使用RT-PCR(逆转录聚合酶链反应,Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)等公知的方法检测。RT-PCR是将RNA链在铸模中进行逆转录,相对于所生成的cDNA进行PCR的方法。需要说明的是,总RNA可以从细胞中使用硫氰酸胍法、市售的试剂盒进行提取。细胞可以从Invitrogen公司、三光纯药株式会社、Takara Bio公司等购入。另外,未分化细胞标记和各种蛋白质也可以与实时PCR组合进行检测。这样的方法被称为实时RT-PCR。实时PCR是通过PCR实时监测增宽的核酸的方法。例如,可以根据文献[由原理熟知的实时PCR实验指导,羊土社,2007/12]中记载的顺序进行。作为上述监测的方法,可以列举:嵌入法、杂化法、LUX(Light Upon eXtension)法等。嵌入法的典型的方法为如下方法:SYBR®Green I等荧光物质进入双链的核酸,利用通过激发光的照射进行发光的特性,测定核酸量。由于荧光的强度与核酸的量成比例地增强,因此,通过测定荧光强度,可以得到核酸的增宽的量。另外,在使用实时PCR的定量方法中,大致分为绝对定量法和相对定量法这两种定量方法,可以适当使用这些方法。

[0206] 本说明书中,“表达调节剂”包括能够使目标蛋白质或mRNA的表达量增加或减少的物质。在此,增加或减少的量,与对照细胞相比,优选具有显著差别。

[0207] 上述恶性肿瘤的治疗药,还可以包含DDS(药物传递系统;Drug Delivery System)。该情况下,可以将多核苷酸有效地导入细胞内。作为DDS,包括明胶水凝胶或缺端胶原。本说明书中,“明胶水凝胶”为以明胶作为原料的水凝胶,可以作为DDS使用。明胶水凝胶的生物体适合性、生物体吸收性优良。本说明书中,“缺端胶原”是以缺端胶原作为原料的DDS。向细胞中的导入效率 and 安全性优良。缺端胶原通常是将胶原蛋白中包含的端肽进行酶

分解而得到的,因此,难以诱发免疫反应。

[0208] 上述恶性肿瘤的治疗药中,恶性肿瘤可以为选自肝癌、肺癌、胰癌、纤维肉瘤、多形性成胶质细胞瘤、黑素瘤组成的组中的一种以上的恶性肿瘤。该情况下,能够治疗这些恶性肿瘤。特别是这些恶性肿瘤均没有革新的治疗方法,因此,上述恶性肿瘤的治疗药为有前途的治疗药。

[0209] 本说明书中,“肝癌”包括通过肝脏的细胞继续增殖而引起的疾病。能够生成肝癌的肝细胞包括胆管、门静脉这样的血管的细胞、树状细胞或肝细胞。另外,包括原发性肝癌和转移性肝癌。已知原发性肝癌大多数为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)。

[0210] 本说明书中,“肺癌”包括在气管、支气管、肺泡的上皮细胞等中产生的恶性肿瘤,在病理学上,可以分类成腺癌、扁平上皮癌、大细胞癌、小细胞癌。关于进展形式和治疗反应性等,小细胞癌与其他癌不同,因此,腺癌、扁平上皮癌以及大细胞癌总称为非小细胞癌。也有良性肿瘤和圆柱种等小细胞癌以及非小细胞癌中不包括的少数的肿瘤。

[0211] 本说明书中,“胰癌”包括从胰脏中产生的恶性肿瘤。胰脏由产生胰液的腺泡、运输胰液的胰管以及作为内分泌腺的胰腺胰岛等构成。癌从任何一种组织中均能够产生。例如,可以列举:浸润性胰管癌、胰内分泌肿瘤、胰管内乳头粘液性肿瘤、粘液性囊性肿瘤、腺泡细胞癌、浆液性囊性腺癌等。

[0212] 本说明书中,“肉瘤”包括在来自骨、软骨、脂肪、肌肉、血管等的非上皮性细胞的结合组织细胞中产生的恶性肿瘤。例如,可以列举:纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、皮肤纤维肉瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、淋巴管肉瘤、滑膜肉瘤、泡状软部肉瘤、骨外性软骨肉瘤、骨外性骨肉瘤、恶性末梢神经鞘肿瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、颗粒球肉瘤、尤因肉瘤、骨原发的纤维肉瘤、恶性骨巨细胞肿瘤、骨原发的脂肪肉瘤、骨原发的血管肉瘤等。

[0213] 本说明书中,“胶质瘤”包括从神经胶质细胞上产生的恶性肿瘤。例如,可以列举:星状胶质细胞类肿瘤、少突胶质细胞瘤(oligodendroglial tumor)、上皮性肿瘤、脉络丛肿瘤、多形性成胶质细胞瘤等。

[0214] 本说明书中,“黑素瘤”包括来自在皮肤、眼窝内组织、口腔粘膜上皮等上产生的黑素细胞的恶性肿瘤。例如,可以列举:恶性雀斑样痣黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、结节型黑素瘤、末端雀斑样痣黑素瘤等。

[0215] 说明书中,“多核苷酸”包括由核苷酸或者碱基、或它们的等价物多个键合的形态构成的物质。核苷酸以及碱基包括DNA碱基或RNA碱基。上述等价物例如包括:DNA碱基或RNA碱基接受甲基化等化学修饰的物质、或核苷酸类似物。核苷酸类似物包括非天然的核苷酸。“DNA链”表示DNA碱基或它们的等价物2个以上连结的形态。“RNA链”表示RNA碱基或它们的等价物2个以上连结的形态。“碱基序列”是构成多核苷酸的核苷酸或其等价物的序列。通常,碱基序列能够通过A(腺嘌呤)、G(鸟嘌呤)、C(胞嘧啶)、T(胸腺嘧啶)表示。另外,T与U(尿嘧啶)可以根据用途,互相交替读取。例如,在作为代表的数据库的NCBI参考序列(Reference Sequence)中,表示DNA链以及RNA链的碱基序列时使用A、G、C、T。需要说明的是,多核苷酸可以使用DNA/RNA合成装置合成。此外,也可以从DNA碱基或RNA碱基合成的受托会社(例如,Invitrogen公司、Takara Bio公司等)购入。另外,siRNA、miRNA、shRNA、pre-miRNA或将这些进行编码的载体的合成也能够委托各制造商。

[0216] 在这样的siRNA等的设计中,可以使用Stealth RNAi designer(Invitrogen公司)和siDirect2.0(Naito et al., BMC Bioinformatics, 2009 Nov 30;10:392.)等。RNAi作用或miRNA作用的确认,可以通过利用实时RT-PCR的RNA链表达量的定量进行。或者,可以通过利用印迹杂交的RNA链表达量的分析、和利用蛋白质印迹的蛋白量的分析、表达型的观察等方法进行。利用实时RT-PCR的方法特别有效。

[0217] 本说明书中,“互补链”是相对于1个多核苷酸、能够进行杂化的互补性高的其他多核苷酸。本说明书中,“杂化”是指在多个多核苷酸之间,通过碱基间的氢键等能够形成碱基对的性质。碱基对能够以Watson-Crick型碱基对、Hoogsteen型碱基对或任意的其他序列特异的形式产生。2个单链杂化的状态被称为双链。另外,“互补的”包括:例如相对于1个多核苷酸、在T与A对应、C与G对应的形式下其他多核苷酸能够发生杂化的形态。

[0218] 本说明书中,“治疗”是指能够发挥被检者的疾病或伴随疾病的1个以上症状的、预防或症状改善效果。

[0219] 本说明书中,“被检者”包括人或者其他哺乳动物(例如,小鼠、小鼠、兔子、牛、猴子、猩猩、猪、马、绵羊、山羊、狗、猫、土拨鼠、仓小鼠等)。优选为小鼠、小鼠、猴子、猩猩或人,特别优选为人。这是由于,如果是人,则能够在人的疾病的治疗、人用的治疗药或诊断药的开发等中利用上述单链或多链的多核苷酸。另外,小鼠、小鼠、猴子以及猩猩作为世界上研究用的模型动物广泛使用,已经明确多种特性,因此,对于这些生物,通过考察上述单链或多链的多核苷酸的药效药理,得到用于开发更优良的治疗药等特别有用的信息。

[0220] 另外,在使用上述单链或多链的多核苷酸作为治疗药的情况下,也可以单独给药,但通常与DDS或药理学上可接受的1个或其以上的载体一起混合,优选作为通过在制剂学的技术领域中熟知的任意的制造方法制造的医药制剂提供。另外,也可以不直接使用上述单链或多链的多核苷酸,将上述单链或多链的多核苷酸的前体给药。

[0221] 另外,将上述单链或多链的多核苷酸向生物体给药时的给药途径,优选使用治疗时最有效的给药途径,可以列举:口服给药或口腔内、呼吸道内、直肠内、皮下、肌肉内、腹腔内、眼内或静脉内等非口服给药,可以全身或局部地给药。给药途径可以优选非口服给药。也可以如下述实施例所示为皮下或静脉内给药。该情况下,单链或多链的多核苷酸到达患部的效率高。

[0222] 作为其他给药形态,可以列举:胶囊剂、片剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、注射剂、栓剂、喷雾剂、软膏、胶带剂等。作为适于口服给药的制剂,可以列举:乳剂、糖浆剂、胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂等。乳剂以及糖浆剂这样的液体制备物,可以使用水、蔗糖、山梨糖醇、果糖等糖类、聚乙二醇、丙二醇等二醇类、芝麻油、橄榄油、大豆油等油类、对羟基苯甲酸酯类等防腐剂、草莓香料、薄荷香料等香料类等作为添加剂制造。另外,胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂等,可以使用乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇等赋形剂、淀粉、藻酸钠等崩解剂、硬脂酸镁、滑石粉等润滑剂、聚乙烯醇、羟丙基纤维素、明胶等粘合剂、脂肪酸酯等表面活性剂、甘油等增塑剂等作为添加剂制造。

[0223] 作为适于非口服给药的制剂,可以列举:注射剂、栓剂、喷雾剂等。作为注射用的水溶液,例如可以列举:包含生理盐水、葡萄糖和其他辅助药、例如含有D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠等的张液,也可以与适当的溶解助剂、例如醇、具体而言乙醇、多元醇、例如丙二醇、聚乙二醇、非离子性表面活性剂、例如聚山梨醇酯80(TM)、HCO-50并用。栓剂可

以使用可可脂、氢化脂肪或碳酸等载体制备。另外,喷雾剂可以使用如下载体等来制备,所述载体,使含有上述单链或多链的多核苷酸的任意一种药剂、或者不刺激接受者的口腔以及呼吸道粘膜、并且含有上述单链或多链的多核苷酸的任意一种药剂作为微细的粒子分散,从而使吸收变容易。作为该载体,具体而言可以例示乳糖、甘油等。根据含有上述单链或多链的多核苷酸的任意一种药剂、和所使用的载体的性质,能够实现进行气溶胶、干粉等的制剂化。另外,这些非口服剂中,也可以添加在口服剂中作为添加剂例示的成分。

[0224] 另外,上述治疗药或预防药,可以与缓冲剂(例如,磷酸盐缓冲液、乙酸钠缓冲液)、无痛化剂(例如,氯化苄烷铵、盐酸普鲁卡因等)、稳定剂(例如,人血清白蛋白、聚乙二醇等)、保存剂(例如,苄基醇、苯酚等)、抗氧化剂等配合。制备的注射液通常填充到适当的安瓿中。这样得到的制剂安全且低毒性,因此,例如,可以向人和哺乳动物(例如,小鼠、小鼠、兔子、羊、猪、牛、猫、狗、猴子等)给药。

[0225] 另外,给药方法可以根据被检者的年龄、症状、对象脏器等适当选择。作为包含含有上述单链或多链的多核苷酸的任意一种药剂的医药组合物的给药量,例如,可以体重每1kg每次在0.0001mg至1000mg的范围内选择。或者,例如,可以每个被检者在0.001~100000mg/body的范围内选择给药量,但并不一定限于这些数值。体重每1kg的给药量例如为0.0001、0.01、1、50、100、250、500或1000mg。该给药量可以是在此例示的任意2个值的范围内。给药量根据目标治疗效果、给药方法、治疗期间、年龄、体重等而不同。给药量、给药方法根据被检者的体重和年龄、症状等发生变动,但只要是本领域技术人员,则能够适当选择。另外,也可以通过与适当的化学疗法药并用进行给药。

[0226] 上述单链或多链的多核苷酸,通过抑制恶性细胞等效果,在畜产中也能在用于辅助动物的生长的添加剂等中使用。

[0227] 另外,本发明的其他的实施方式为一种试药或试剂盒,其含有上述单链或多链的多核苷酸。该试药或试剂盒,通过上述单链或多链的多核苷酸所具有的效果,可以作为研究用的试药或者试剂盒或医疗用的试剂盒使用。例如,可以作为iPS细胞制作用、人工脏器制作用、恶性肿瘤细胞抑制用、未分化标记表达调节用或p53表达细胞制作用的添加物、辅助物质使用。另外,在试剂盒中可以包含:记载使用上述单链或多链的多核苷酸时的使用方法或者使用例的指南、记载该指南的所在的文字或各种缓冲液。

[0228] 以上,阐述了本发明的实施方式,但这些为本发明的例示,也可以采用上述以外的各种构成。另外,也可以组合采用上述实施方式中记载的构成。

[0229] 【实施例】

[0230] 以下,通过实施例对本发明进一步进行说明,但本发明不限于这些。

[0231] <实施例1:RGM249shRNA向小鼠的给药、和抗癌作用的评价>

[0232] (1-1)RGM249shRNA的制作

[0233] 根据Stealth RNAi designer(Invitrogen,美国加州),设计RGM249shRNA的序列,使用BLOCK-it Inducible H1RNAi Entry Vector(Invitrogen,美国加州),制作生成RGM249shRNA的载体(RGM249shRNA质粒)。该RGM249shRNA是以在生物体内诱导针对RGM249mRNA的RNAi的方式进行设计的小RNA。

[0234] 在此,RGM249mRNA的碱基序列为

[0235] 5'-GGAAAACUAAAUGAGAGAAUGGGUGUCCAAGAGGACAAGUUCAUGCACCCGGUGAUGAGAGUU

UGAUUGCAGAAUAAGGCUAGACAAAGGGAAGCUGAACAUAGACCAAAGCCAUGUGACAUCGUAUGAUCCUCGAAUCUCACAGUAUCUAUGUAUCUAUAAUCAGAUACAUCCCUAGACUUUCCAGGAAUUCUGGUACUUCACGAGGAUGUGAGAAGACUCUGAACAAAAUAAUACACUGCUCGUG-3' (序列号7)。在RGM249shRNA质粒内的上链中,将RGM249shRNA进行编码的序列为5'-CACCGCAGAATAAGGCTAGACAAAGCGAACTTTGTCTAGCCTTATTC TGC-3' (序列号11)。在下链中,与上述上链形成双链的序列为5'-AAAAGCAGAATAAGGCTAGACA AAGTTCGCTTTGTCTAGCCTTATTCTGC-3' (序列号12)。图1A中示出了RGM249mRNA的二级结构、和RGM249shRNA的靶部位。

[0236] RGM249shRNA的碱基序列为

[0237] 5'-GCAGAAUAAGGCUAGACAAAGUUCGCUUUGUCUAGCCUUAUUCUGCGGUG-3' (序列号10)。可以认为从质粒转录后形成发夹状结构(图1B)。图中的下划线部为能够形成氢键的部分。在RGM249shRNA的碱基序列中,与RGM249mRNA的一部分互补的序列为5'-CUUUGUCUAGCCUUAUUC UGC-3' (序列号8)。可以认为与该序列号8相当的部分,与RGM249shRNA的碱基序列中的5'-GCAGAAUAAGGCUAGACAAAG-3' (序列号9)形成氢键,形成发夹状结构。可以认为在通过RGM249shRNA诱导RNAi时,与该序列号8相当的部分相对于RGM249mRNA发生杂化。UUCG与环部分相当。可以认为GGUG成为突出端。

[0238] 另外,制作表达RGM249shRNA的胸腺嘧啶中的1个缺损的RGM249m-1 shRNA的载体(RGM249m-1 shRNA质粒)。在RGM249m-1 shRNA质粒内的上链中,对RGM249m-1 shRNA进行编码的序列为

[0239] 5'-CACCGCAGAATAAGGCTAGACAAAGCGAACTTTGTCTAGCCTTATTCTGC-3' (序列号13)。下链中,与上述上链形成双链的序列为5'-AAAAGCAGAATAAGGCTGACAAAGTTCGCTTTGTCTAGCCTTA TTCTGC-3' (序列号14)。对照中使用LacZ shRNA。

[0240] RGM249m-1 shRNA的碱基序列为5'-GCAGAAUAAGGCUAGACAAAGUUCGCUUUGUCUAGCCUUAU UCUGCGGUG-3' (序列号15)。序列号15的碱基序列与序列号10的碱基序列的不同点在于,从序列号10的5末端开始第14个A缺失。与RGM249mRNA一部分互补的序列,与上述RGM249shRNA的情况相同。

[0241] (1-2)RGM249shRNA的肿瘤抑制效果

[0242] 在胸腺缺损小鼠的右侧腹部,通过皮下注射接种HLF细胞。另外,在该小鼠的右侧腹部,每5日皮下注射RGM249shRNA质粒+DDS、RGM249m-1 shRNA质粒+DDS或LacZ shRNA质粒+DDS。在DDS每1mg中混合数 μg ~数十 μg 的生理活性物质,对小鼠20~30g进行该皮下注射。考察此时的肿瘤体积的变化(图1C)。其结果,从给药开始21日后,与LacZ shRNA组比较,观察到利用RGM249shRNA组的显著的肿瘤抑制效果。需要说明的是,作为DDS(药物传递系统; Drug Delivery System),使用阳离子化明胶水凝胶(MedGel公司制)。质粒与DDS,根据制造商的实验报告以各100nM进行混合。在图表中示出标准误差。数据(n=5)通过曼-惠特尼进行分析($P<0.01$)。另外,从最初给药开始4周后,RGM249shRNA组,与RGM249m-1 shRNA组和LacZ shRNA组比较,显著地显示出了肿瘤抑制效果($P=0.034$ 、 $P=0.021$)。

[0243] 图1D的3个照片是将上述各种质粒进行皮下注射时的、肿瘤体积的目视的观察结果。从皮下注射开始约28日后,RGM249shRNA组平均示出了80%的抑制效果。另外,RGM249m-1 shRNA组平均将肿瘤体积抑制为小于50%。

[0244] (1-3)通过RGM249shRNA给药的mRNA表达的抑制效果

[0245] (1-3-1)皮下给药

[0246] 另外,从皮下注射开始35日后,考察在肿瘤中表达的基因的表达抑制效果(图2A)。使用mirVana miRNA分离试剂盒从细胞中提取miRNA后,使用Mir-X™miRNA qRT-PCR SYBR®试剂盒,考察miRNA的表达量。其结果,将RGM249shRNA质粒+DDS或RGM249m-1shRNA质粒+DDS进行给药的情况下,RGM249mRNA以及hTERT mRNA的表达水平,与LacZ shRNA比较,显著降低(RGM249mRNA与hTERTmRNA的P值分别为 $P=0.036$ 、 $P=0.025$)。这些数据通过曼-惠特尼进行分析。黑色方块表示RGM249的表达,白色方块表示hTERT mRNA的表达。

[0247] (1-3-2)尾静脉给药

[0248] 另一方面,将上述各种质粒向尾静脉进行静脉注射的情况下,在28日后考察肿瘤中表达的基因的表达抑制效果(图2B)。DDS中使用缺端胶原(AteLoGene™)(Jo, J., Yamamoto et al., J Nanosci Nanotechnol 6, 2853-2859 (2006)., Takeshita et al., Mol Ther 18, 181-187 (2010).)。质粒与DDS根据制造商的实验报告以各100μM进行混合。其结果,将RGM249shRNA质粒+DDS给药的情况下,RGM249mRNA以及hTERT mRNA的表达水平,与LacZ shRNA比较显著降低。这些数据通过曼-惠特尼进行分析($P<0.05$)。黑色方块表示RGM249的表达,白色方块表示hTERT mRNA的表达。如上,RGM249shRNA组中的RGM249mRNA和hTERT mRNA的表达,与LacZ shRNA组比较,两者均显著抑制(各自 $P=0.049$ 、 0.046)。

[0249] (1-4)通过RGM249shRNA给药的癌转移抑制效果

[0250] 另外,从静脉注射开始28日后,目视观察肝脏内外的结节。在仅HLF细胞的组(未示数据)和LacZ shRNA组中,目视观察到癌结节。另外,通过显微镜观察时,在所有小鼠的肝脏或肺中,转移性的病灶观察到1只小鼠向左肾中转移。

[0251] 目视进行观察,结果确认,在RGM249shRNA组中,仅1只小鼠在肝脏中存在结节(表1)。另外确认,仅1只小鼠在肾脏中具有结节。其结果示出,RGM249shRNA组与其他组比较,抑制肿瘤形成和转移。即,RGM249shRNA组通过静脉注射给药时抑制腹腔内的发癌。其意味着,以人特异性的RGM249mRNA作为目标,治疗了注入进来的来自人的肿瘤。

[0252] 【表1】

	肝内结节	肝外结节	总计
[0253] LacZ shRNA	3	5	8
RGM249-m1 shRNA	3	5	8
RGM249 shRNA	1	1	2

[0254] 由以上的结果示出,通过RNAi作用分解RGM249mRNA时,对癌抑制和肿瘤减少、hTERT mRNA的减少以及癌的转移抑制有效。由此认为,由于某些机理RGM249mRNA对癌产生影响。另外,RGM249m-1shRNA与RGM249shRNA相比,效果略微变差,但具有发挥癌的抑制效果等、与RGM249shRNA类似的效果。接着,考察通过由RGM249mRNA生成的miRNA、和由针对该miRNA的siRNA对癌带来的影响。

[0255] <实施例2:由3个siRNA产生的癌细胞增殖抑制、和对未分化标记的影响的评价>

[0256] (2-1)miR-47siRNA、miR-101siRNA、miR-197siRNA的结构

[0257] 将RGM249与pRNAT-U6.1/neo载体(GenScript USA公司,美国新泽西州)连结。使用RNA内切酶Ⅲ(Genlantis公司,美国加利福尼亚州),消化通过T7RNA聚合酶生成的RGM249mRNA。通过mirVANA miRNA分离试剂盒(日本Ambion公司,日本东京)将miRNA分级,利用使用人抗Ago2微珠的miRNA分离试剂盒(和光纯药工业株式会社,日本东京)进行精制。另外,由于存在小RNA与Ago2没有结合的可能性,因此,不使用抗Ago2进行精制。使用miRCAT-microRNA克隆试剂盒(Integrated DNA Technologies公司,美国爱荷华州),克隆消化后的小RNAs,使用TOPO载体(Invitrogen公司,美国加利福尼亚州),进行序列测定。另外,预测二次结构(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)。使用miRBas,研究小RNAs的序列相同性。以上的结果,得到miR-47、miR-101、miR-197这3个miRNA。将作为miRNA前体基因的RGM249mRNA、和与内部的3个miRNA相当的部分示于图3A。

[0258] miR-47的碱基序列为5'-CUCACCCGGUGAUGAGAGUUUGAUU-3'(序列号16)、miR-101的碱基序列为5'-AACAUAGACCAAAGCCAUGUG-3'(序列号17)、miR-197的碱基序列为5'-GUACUUCACGAGGAUGUG-3'(序列号18)。

[0259] 在制作生成针对上述3个miRNA的siRNA的结构(shRNA)的情况下,使用pRNATin-H1.4/Lenti。另外,使用Invitrogen公司的siRNA designer,合成3个siRNA(miR-47siRNA、miR-101siRNA、miR-197siRNA)。将各siRNA的推测二级结构示于图3B。miR-47siRNA的碱基序列的有义链为5'-CUCACCCGGUGAUGAGAGUUUGA-3'(序列号4),反义链为5'-AAUCAAAACUCUCACCGGGUGAG-3'(序列号1)。miR-101siRNA的碱基序列的有义链为5'-AACAUAGACCAAAGCCAUGUGUU-3'(序列号19),反义链为5'-CACAUGGCUUUGGUCAUGUU-3'(序列号2)。miR-101siRNA的有义链在3'末端,胸腺嘧啶突出2个碱基。除去这2个碱基的序列为5'-AACAUAGACCAAAGCCAUGUG-3'(序列号5)。miR-197siRNA的碱基序列的有义链为5'-GUACUUCACGAGGAUGUGUU-3'(序列号20),反义链为5'-CACAUCCUCGUGAAGUAC-3'(序列号3)。miR-197siRNA的有义链在3'末端,胸腺嘧啶突出2个碱基。除去这2个碱基的序列为5'-GUACUUCACGAGGAUGUG-3'(序列号6)。另外,将3个miRNA与3个siRNA的反义链的序列比较示于图3C。

[0260] (2-2)细胞增殖的抑制效果

[0261] 将miR-47siRNA、miR-101siRNA、miR-197siRNA或它们的混合物(3个siRNA混合物)各50nM向表达高水平的RGM249的HMV-I转染。转染中使用FuGene试剂盒(Roche公司制)。收集从转染开始经过24小时后的转染子。

[0262] 测定细胞数,结果,与用DDS处理后的对照细胞比较,在单独使用各种siRNA的情况下,观察到若干的癌细胞增殖的抑制效果(图3D)。另外,将3个siRNA混合物转染的情况下,观察到癌细胞增殖的显著的抑制效果。这可以认为是由于,3个siRNA协同地发挥作用。另一方面,将siRNA2个组合使用的情况下,未观察到同等的效果。这可以认为,通过2个难以产生协同效果,而是每1个的浓度降低,减弱癌细胞增殖的抑制效果。

[0263] 由该结果强烈启示:阻碍3个miRNA时,具有癌细胞的增殖抑制效果。该结果与实施例1也不矛盾,可以认为RGM249mRNA分解成3个miRNA,这3个miRNA参与癌的机理在生物体内起作用。可以认为,通过上述3个siRNA阻断该机理,发挥癌细胞的增殖抑制效果。

[0264] (2-3)由siRNA引起的miRNA表达水平的变化

[0265] 上述(2-2)中,从将3个siRNA混合物同时转染而成的HMV-I中进行RNA提取,考察

miR-47、miR-101、miR-197的表达水平(图3E)。

[0266] (2-4)由siRNA引起的未分化标记量的变化

[0267] 关于与癌(hTERT、c-Myc、p53)、多分化能(Oct4、Sox2、Klf4)、干细胞性(PROM1)相关的基因,评价转染子的转录表达谱(图3F)。在使用3个siRNA混合物的情况下,随着由3个siRNA混合物进行的处理,Oct4、Sox2、hTERT、p53基因上调,c-Myc和Klf4基因下调。另一方面,未观察到对PROM1的影响。另外,miR-47siRNA将Oct3/4以及hTERT基因上调,将c-Myc以及Klf4基因下调。图3D中的*表示将mRNA的表达与β-肌动蛋白mRNA比较时具有显著差别。

[0268] 由以上的结果可以认为,通过使用miR-47siRNA,未分化标记(Oct3/4)的表达上调,因此,HMV-I转换成未分化状态,或者至少诱导成未分化状态。另外,作为癌基因的c-Myc下调,因此,可以认为诱导成未分化状态的细胞处于抑制癌化的状态。

[0269] 另外,在使用3个siRNA混合物的情况下,2个未分化标记(Oct3/4、Sox2)的表达上调。c-Myc与使用miR-47siRNA的情况同样地下调。另外,作为癌抑制基因的p53上调。即,可以认为诱导成未分化状态的细胞,从c-Myc以及p53的两个方面出发,处于抑制癌化的状态。

[0270] 由以上的结果启示,3个miRNA参与癌和分化的机理。另外启示,3个siRNA具有癌抑制和癌细胞的重排的功能。接着,通过将siRNA向小鼠给药,关于癌抑制和癌细胞的重排,更加详细地进行考察。

[0271] <实施例3:3个siRNA混合物向小鼠的给药、和抗癌作用的评价>

[0272] (3-1)siRNA的皮下给药

[0273] 3个siRNA混合物+DDS的皮下给药,与仅DDS的对照给药相比,示出了HMV-I细胞的增殖性的抑制(Kruskal-Wallis试验中, $P<0.01$, $n=5$)(图4)。该试验中使用胸腺缺损小鼠。DDS使用缺端胶原(AteloGene™)。3个siRNA混合物和DDS,根据制造商的实验报告以各100μM进行混合。图4中的上部所示的照片是将不包含RNA的缺端胶原(模拟)进行皮下注射时的照片。下部所示的照片是将3个siRNA混合物+DDS进行皮下注射时的照片。*表示不包含RNA的情况与包含siRNA的情况之间存在显著差别($P<0.01$)。另外,对照小鼠在肺(15.8 ± 1.9 结节)和腹腔内(0.8 ± 0.6 结节)显示出多个结节(表2)。在腹腔内以及腹腔外观察到几个转移性的病灶,也观察到皮下浸润。

[0274] 【表2】

[0275] a)在接种了HMV-1的小鼠中siRNA的转移性抑制作用

[0276]

转移	模拟 平均±S.E. (范围)	3 miRNAs (s.c.) 平均±S.E. (范围)	P值
肺	15.8 ± 1.9 (10-20)	2.0 ± 0.4 (0-3)	0.008
腹腔	0.8 ± 0.6 (0-5)	0	N.S.
后腹膜	1.2 ± 1.0 (0-1)	0	N.S.
肝	0	0	N.S.
皮下浸润	0.2 ± 0.2 (1-3)	0	0.005

[0277] (3-2)siRNA的静脉给药

[0278] 将HLF细胞向胸腺缺损小鼠给药后从1周后,每周静脉注射3个siRNA混合物+DDS。

每个小鼠注射包含 1×10^7 细胞的200 μ l。DDS使用缺端胶原(Atelogene™)。3个siRNA混合物和DDS根据制造商的实验报告以各100 μ M进行混合。28日后屠杀该动物,进行肝内肿瘤和腹腔内转移的试验(表3)。其结果,3个siRNA混合物+DDS的静脉给药,显著诱导HMV-1细胞的抗转移能($P < 0.05$ 、肺和肝脏各自)。在肝脏和肺中几乎未见转移,仅1只小鼠观察到向腹腔内的转移。

[0279] 【表3】

[0280] b)在全身性地传递HMV-1的小鼠中siRNA的转移性抑制作用

[0281]

转移	no RNAs 平均 $\pm$ S.E. (范围)	3 siRNA for miRNAs (i.v.) 平均 $\pm$ S.E. (范围)	P值
肺	2.0 ± 0.5 (0-3)	0 ± 0 (0 for all)	0.018
腹腔	3.8 ± 1.5 (0-8)	0.2 ± 0.2 (0-1)	0.044
肝	5.2 ± 2.2 (0-13)	0 ± 0 (0 for all)	0.005

[0282] 由以上的结果示出。通过将3个siRNA混合物向小鼠给药,能够显著抑制癌的增殖和转移。

[0283] <实施例4:3个siRNA混合物向小鼠的给药、和未分化标记的表达水平的评价>

[0284] (4-1)肿瘤中的miRNA和mRNA的表达水平的评价方法

[0285] 使用用siRNA处理后的肿瘤,如下进行miR-47、miR-101、miR-197的表达水平的评价。关于miRNA的表达量,在使用mirVana miRNA分离试剂盒从细胞或组织中提取miRNA后,使用Mir-X™ miRNA qRT-PCR SYBR®试剂盒进行考察。由此,确认由siRNA产生的miRNA的表达抑制效果以及miRNA的表达量的变化。

[0286] 将用于定量mRNA的引物的序列示于表4。免疫印迹法使用i-Blot凝胶转录系统进行。抗体(抗hTERT抗体、抗p53抗体、抗c-Myc抗体、抗Oct4抗体、抗PROM1抗体)稀释成1:500倍,抗 β 肌动蛋白抗体稀释成1:1000倍。使用LAS-4000,在1分钟以内检测化学发光信号。

[0287] 【表4】

[0288]

引物	序列	序列号
Oct4	5' - CGGAAAGAGAAAGCGAACCA -3'	21
	5' - CGGACCACATCCTTCTCCAG -3'	22
NANOG	5' - CAGAAGGCCTCAGCACCTAC -3'	23
	5' - ACTGGATGTTCTGGGTCTGG -3'	24
Sox2	5' - CAAGATGCACAACTCGGAGA -3'	25
	5' - CGGGGCCCGGTATTTATAATC -3'	26
Klf4	5' - AAAGTGACCCCTCCTCCAGGT -3'	27
	5' - TGCTTTGCTCCAGGAACCTT -3'	28
hTERT	5' - GTGCACCAACATCTACAAGATCC -3'	29
	5' - GTTCTTCCAAACTTGCTGATG -3'	30
c-Myc	5' - GCCAGAGGAGGAACGAGCTA -3'	31
	5' - TGGACGGACAGGATGTATGC -3'	32
p53	5' - GCTTCGAGATGTTCCGAGAG -3'	33
	5' - TTATGGCGGGAGGTAGACTG -3'	34
PROM1	5' - TGGCAACGTAGTGAATCAGG -3'	35
	5' - ACAGGAAGGGAGGGAGTCAT -3'	36
CD44	5' - AAGGTGGAGCAAAACACAACC -3'	37
	5' - GCTTTTCTTCTGCCACAC -3'	38
RGM249	5' - TGGTACTTCACGAGGATGTGA -3'	39
	5' - CCTGCCTCCTGAGTCTTCTG -3'	40

[0289] (4-1-1)皮下给药

[0290] 通过由皮下进行的异种移植,证实3个miRNA的抑制效果。上述异种移植通过将 1×10^7 个HMV-I细胞向右侧腹部接种来确立。能够感知的肿瘤从接种7日后可以确认。10只小鼠随机分为2组,将3个siRNA混合物(100 μ M)(n=5)或等量的DDS(n=5)进行给药。将3个siRNA混合物转染后的细胞,在体外抑制增殖。5周后,为了分析肿瘤,屠杀小鼠。肿瘤体积通过体积= $\pi/6 \times$ 横宽 $\times$ 纵宽 $\times$ 高度的式子进行评价。

[0291] (4-1-2)尾静脉给药

[0292] 在用siRNA混合物(400 μ M)或DDS进行处理1周前,将HMV-I细胞(1×10^7 细胞)在胸腺缺损小鼠的尾静脉注射。siRNA混合物或DDS每周给药,在5周后考察肿瘤体积或转移。所有小鼠通过日本协会认证实验室动物保健批准的设备(Japanese Association for Accreditation for Laboratory Animal Care-approved facilities)保管以及饲养。动物实验以及操作严格地遵守联邦机构动物保健和使用委员会指南(federal Institutional Animal Care and Use Committee guidelines)。

[0293] 如图5A所示,划分肿瘤对各部分别进行评价。1为表面、2为内部、3为中央部分。需要说明的是,由于肿瘤脆弱,因此,划分方法是大致进行的。

[0294] (4-2)肿瘤中的miRNA的表达水平的评价结果

[0295] 进行肿瘤内的RNA的定量化以及高再现性的序列测定,评价由3个siRNA混合物引

起的miR-47、miR-101、miR-197各自的表达抑制效果,将其结果示于图5B。数据使用Kruskal-Wallis试验(n=5)进行分析。*表示相对于DDS处理后的肿瘤在miRNA表达水平上存在显著差别(P<0.01)。观察到3个miRNA的量随着将3个siRNA混合物给药而减少的倾向。

[0296] (4-3)苏木精-伊红染色

[0297] 关于由上述(4-1-2)得到的肿瘤,将利用显微镜的考察结果(HE(苏木精-伊红染色);×400)示于图5C。上部表示对照,下部表示用siRNA处理后的肿瘤。用siRNA处理后的肿瘤在HMV-I细胞中减少,伴随通过纤维化进行的置换,肿瘤发生坏死,抑制新血管新生。

[0298] (4-4)肿瘤中的未分化标记的表达水平的评价结果

[0299] 关于由上述(4-1-2)得到的肿瘤,将对肿瘤、分化、多能性的相关基因的转录水平进行试验的结果示于图5D(*:P<0.05;*:P<0.01)。可以认为Oct4、Klf4、p53、hTERT、PROM1、Sox2与多能性、肿瘤形成或癌干细胞性相关。使用 $2^{-\Delta\Delta}$ 法,比较 β -肌动蛋白mRNA的表达。图5D中,Cntl表示对照(仅DDS),3mix表示3个siRNA混合物+DDS。其结果,3个siRNA混合物诱导p53以及Sox2的mRNA的上升。另一方面,hTERT、PROM1、Oct3/4、Klf4减少。

[0300] 由以上的结果示出,通过将3个siRNA混合物向小鼠给药,3个miRNA下调,作为未分化标记的Sox2和作为癌抑制基因的p53上调。接着,利用免疫组织科学的试验,对癌细胞的重排更加详细地考察。

[0301] <实施例5:癌细胞的重排、和iPS细胞的评价>

[0302] (5-1)miRNA-197的抑制、和hsa-mir-520d的上调的评价

[0303] 使用FuGene试剂盒(Roche公司制),将miR-197siRNA转染成293FT细胞后,通过显微镜观察(图6A)。另外,使用病毒载体(pMIRNA1、System Bioscience:SBI公司制),使hsa-mir-520d(Accession:MI0003164)转染人的成纤维细胞(TIG-1-20)后,通过显微镜观察。该hsa-mir-520d是通过转染RGM249shRNA而被上调的miRNA(A noncoding RNA gene on chromosome10p15.3 may function upstream of hTERT. Miura et al., BMC Mol Biol. 2009Feb2;10:5.)。由上述病毒载体表达的hsa-mir-520d的碱基序列为

[0304] 5'-UCUCAAGCUGAGUCUACAAAGGGAAGCCCUUCUGUUGUCUAAAAGAAAAGAAAGUGCUUCUCU UUGGUGGGUACG GUUUGAGA-3'(序列号43)。将其推测二级结构示于图6B。该序列中,与引导链相当的序列为5'-UCUACAAAGGGAAGCCCUUCUG-3'(序列号41),与过客链相当的序列为5'-AAAGUGCUUCUCUUGGUGGGU-3'(序列号42)。

[0305] 关于miR-197siRNA与hsa-mir-520d的表达量,通过检测与各RNA链一起表达的GFP蛋白质来进行评价。图6A的上部为用miR-197siRNA处理后的细胞的照片(放大率:×40)。圆形细胞在培养基中出现后,转移至用于ES细胞的培养基(ReproCELL公司)进行观察。下部为用hsa-mir-520d处理后的细胞的照片(放大率:×100)。由上,可以确认miR-197siRNA和hsa-mir-520d的表达。这样,进行miRNA-197的抑制或hsa-mir-520d的上调。

[0306] (5-2)miR-197siRNA给药后的未分化标记的表达量的评价

[0307] 通过显微镜在免疫组织化学上观察将miR-197siRNA转染而成的293FT细胞(来自人胎儿肾脏的细胞株),将其结果示于图6C。图6C检测出作为未分化标记的Oct4和NANOG。上部(0hr)的3个是通过显微镜(放大率:×40)观察没有进行转染的293FT细胞的照片。左侧一列是实施体染色的结果,正中一列是实施利用抗Oct4抗体的罗丹明染色的结果,右侧一列是实施利用抗NANOG抗体的罗丹明染色的结果。细胞的染色进行各1周。

[0308] 正中(24hr)的3个是在将未分化状态的细胞用miR-197siRNA诱导后24小时后、通过显微镜在免疫组织化学上观察的照片。下部(48hr)的3个是在48小时后同样地通过显微镜在免疫组织化学上观察的照片。其结果,Oct4(正中一列,放大率:×100)与NANOG(右侧一列、放大率:×200)较强表达。

[0309] 由以上的结果可以认为,用miR-197siRNA处理后的293FT细胞表达Oct4或NANOG,因此,被重排,发生iPS细胞化。另外,其效率也良好,能够由 10^6 细胞制作约20~100的iPS细胞。该293FT细胞通常具有在ES细胞和iPS细胞中观察到的细胞形状。另外,在培养基中7日后也保持未分化状态。iPS细胞化后的293FT细胞能够在ES细胞用培养液中培养,但在一般培养用的培养液中也能够充分培养。不需要饲养细胞,培养面的涂布可以为胶原蛋白也可以为基质胶。

[0310] (5-3)hsa-mir-520d给药后的未分化标记的表达量的评价

[0311] 通过病毒载体(pMIRNA1、System Bioscience;SBI公司制)使hsa-mir-520d转染各种癌细胞,进行强制表达。之后,通过与上述免疫组织科学的试验同样的方法,观察未分化标记的表达量。将其结果示于图6D、图6E、图6F。所使用的癌细胞为HT1080细胞(人纤维肉瘤细胞株)、T98G细胞(人胶质瘤细胞株)、PK-45p细胞(来自人胰腺的细胞株)、HMF-I细胞(来自人恶性黑素瘤的细胞株)、HLF细胞(来自人肝癌的细胞株)。另外,在HMF-I细胞以及HLF细胞中,表达作为未分化标记的Oct4或NANOG。

[0312] 以上的结果可以认为,用hsa-mir-520d处理后的癌细胞发生重排,进行iPS细胞化。需要说明的是,强制表达该hsa-mir-520d的癌细胞,通常,具有在ES细胞和iPS细胞中观察到的细胞形状。

[0313] (5-4)所生成的iPS细胞的各种基因表达量的评价以及与hiPSC的比较将如上所述生成的iPS细胞中的各种基因的转录量示于图7A。用miR-197siRNA处理后的293FT细胞以及hsa-mir-520d过量表达的293FT细胞中的各种基因的转录量相同。图7A是将这2个细胞的转录量相对于hiPSC(HPS0002253G1)(‘Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors.’Okita et al.,Nat Protoc5,418-428(2010).)的表达量进行比较的结果。转录水平通过一步实时RT-qPCR进行考察。图中,将hiPSC的表达量作为0表示。上部是在293FT细胞用的培养基中使293FT细胞被转染或感染48小时后的转录量。下部是之后2周在用于ES细胞的培养基中保持时的转录量。

[0314] 在使其转染或感染后48小时后,Oct4、p53、RGM249mRNA与hiPSC相比,以高水平表达。之后2周、在用于ES细胞的培养基中保持后,仅RGM249mRNA以高水平表达。其他基因在2周后与hiPSC几乎为相同水平的表达量。

[0315] 将hiPSC和293FT细胞中的miRNA-197和hsa-mir-520d的、miRNA表达水平的相关性用两步实时RT-qPCR(n=5)进行评价,将其结果示于图7B。左侧刻度表示hsa-mir-520d的表达量。从左开始为hiPSC、过量表达hsa-mir-520d的293FT细胞、用miR-197siRNA处理后的293FT细胞、293FT细胞。另外,右侧刻度表示miRNA-197的表达量。由此,确认转染子中的miRNA-197抑制和mir-520d过量表达。

[0316] 由左侧的板可知,所生成的iPS细胞的hsa-mir-520d的表达量与hiPSC类似。另一方面,在293FT细胞中,hsa-mir-520d的表达量显著下调。由右侧的板可知,所生成的iPS细胞使miRNA-197与hiPSC大致相同地较弱表达。另一方面,293FT细胞中,将miRNA-197与其他

细胞比较多10倍地表达。

[0317] <实施例6:关于hsa-mir-520d的实验方法和结果>

[0318] (6-1)细胞

[0319] 为了评价在体外和在体内的hsa-mir-520d表达的效果,使用多种细胞株和慢病毒载体。作为人肾小球膜细胞株的293FT由日本Invitrogen公司(日本东京)提供,在添加有10%FBS、0.1mM MEM非必需氨基酸溶液、2mM L-谷氨酸盐以及1%盘尼西林/链霉素的达尔伯克改良伊格尔培养基中培养。从美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection)购入具有强力的RGM249表达的人未成熟或未分化肝细胞株(HLF)和具有RGM249的弱表达的高分化肝癌细胞株(Huh7),在添加有10%FBS以及1%盘尼西林/链霉素的RPMI培养基中培养。为了保持通过病毒处理进行转化后的细胞的未分化状态,在具有5ng/ml的bFGF-2的ReproStem培养基(ReproCell公司、日本东京)中,培养细胞。人诱导多能干细胞(HPS0001、HPS0002)由理研生物资源中心的细胞库(Riken Bioresource Center Cell Bank)提供。

[0320] (6-2)慢病毒载体制作以及转染

[0321] 将pMIRNA1-mir-520d/GFP(20 μ g)(System Biosciences公司,美国Mountain View)和作为模拟(mock)载体的pCDH(20 μ g)分别向(每个10cm培养板 5×10^6 细胞的)293FT细胞转染。为了回收上清液中的病毒粒子,以4 $^{\circ}$ C、120分钟、170000x g离心后,回收病毒颗粒,使用Lenti-XTM(商标)qRT-PCR滴定试剂盒(Clontech公司,美国加利福尼亚州),进行滴度测定。为了使慢病毒转染293FT或HLF细胞,每个10cm培养板使用100万个病毒。使用隐形RNAi设计工具(Stealth RNAi designer)(<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)设计作为阳性对照使用的RGM249miRNA-197siRNA,使用FuGENE HD转染试剂(Roche Diagnostics公司,瑞士巴塞尔),将50nM的合成寡核苷酸向293FT细胞转染。另外确认,520d-HLF细胞向成骨细胞分化诱导,因此,在通常的RPMI1640培养基中添加2M的pormorphamine,将该细胞处理一周。

[0322] (6-3)免疫不全小鼠和在体内试验方法

[0323] 回收慢病毒转染后的HLF,向各小鼠的腹腔内以及皮下(右侧腹部)每1只小鼠接种 5×10^7 个HLF细胞。注入体积为200 μ l。对6周龄的免疫不全小鼠(KSN/Slc)(清水实验材料株式会社,日本京都)通常喂食4周。通过腹腔内注射100mg/kg的耐波他,麻醉KSN/Slc小鼠,为了解剖以及组织学的检查进行屠杀。使用向皮下的异种移植,证实hsa-mir-520d的抑制效果。体积评价使用以下的式子确定:体积= $\pi/6 \times$ 宽度 $\times$ 长度 $\times$ 高度。所有动物由日本实验动物管理公认协会承认设备保管以及饲养。关于动物的研究和操作,严格地遵守国际动物实验委员会的指导原则。

[0324] (6-4)RT-PCR

[0325] 使用mirVana miRNA分离试剂盒(Ambion公司,美国Austin),从培养细胞或进行匀浆后的小鼠组织中提取包含小RNA级分的总RNA。根据制造商的手册(Clontech公司)使用Mir-X(商标)miRNA qRT-PCR SYBR(注册商标)试剂盒(Clontech公司,美国Mountain View),由此,实施成熟型miRNAs的定量。使用U6小核RNA作为内部对照。使用一步RT-PCR试剂盒(日本QIAGEN公司,日本东京),将总RNA(50ng/ μ l)进行逆转录以及扩增。PCR分析和数据收集分析使用LineGene(东洋纺,日本名古屋)实施。使用标准曲线方法($2^{-\Delta\Delta}$ 法),确定样

品的表达水平。相对于作为内部对照的 β -肌动蛋白,使所有数据(不包括hTERT的数据)标准化。关于hTERT的推测,本发明人根据以前开发的定量方法通过拷贝数来进行。通过序列测定,确认该RNA定量具有高再现性。使用Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR试剂盒(Takara Bio公司,日本东京),将miRNA(25ng/ μ l)定量。为了确认由siRNA引起的抑制,评价miRNA表达变化。将mRNA或miRNA定量用的引物序列示于表4。使显著差别以*: $P<0.05$ 、**: $P<0.01$ 的方式示出。

[0326] (6-5)免疫印迹

[0327] 使用20 μ g/ μ l的蛋白质和i-Blot凝胶转录系统进行免疫印迹分析。根据制造商的手册,将抗 β -肌动蛋白抗体以外的抗体(抗hTERT抗体、抗p53抗体、抗Oct4抗体、抗DICER1抗体、抗AID抗体、抗Alb抗体以及抗GFAP抗体)稀释成1:500倍,将抗 β -肌动蛋白抗体稀释成1:1000倍。使用LAS-4000(富士胶卷,日本东京),检测出化学发光信号在1分钟以内。

[0328] (6-6)免疫细胞化学

[0329] 根据制造商(R&D Systems公司,美国明尼阿波利斯)的手册,使用多能干细胞标记(抗Oct3/4抗体以及抗NANOG抗体)以及胚性干细胞标记抗体板(Embryonic Stem Cell Marker Antibody Panel),实施免疫组织化学的检查。使293FT细胞以及HLF细胞中转染或感染针对miRNA-197的siRNA或者包含has-mir-520d的慢病毒粒子。回收浮游的转染子(即,转染后的细胞),转移至显微镜观察用的新的培养板或免疫染色用载玻片室。Huh7中,为了免疫细胞化学检查对293FT和HLF进行同一处理。

[0330] (6-7)免疫组织化学

[0331] 为了进行免疫组织化学分析,通过常规方法对在4%多聚甲醛中固定的肝脏组织标本进行处理。该试验中使用的单克隆抗体如下:抗白蛋白抗体(Sigma公司,美国圣路易斯)、抗AFP抗体(Sigma公司)以及抗GFAP抗体(Sigma公司)。作为阴性对照,省略一次抗体来进行染色步骤。关于表达的程度,病理专家进行评价。

[0332] (6-8)细胞周期分析

[0333] 为了进行细胞周期分析,将单一细胞混悬物用冷却后的PBS进行一次清洗。之后通过平稳地振摇试管使细胞颗粒分散,滴加ddH₂O中的3.7%福尔马林进行固定。将细胞在-20℃下培养至少一夜。固定后,使用冷却后的PBS,将细胞进行二次清洗,除去EtOH。之后,将细胞在含有100U/ml的RNaseA的PBS中以 1×10^6 细胞/ml进行再混悬,在37℃下培养50分钟。直接加入50 μ g/ml的碘化丙啶,避光在冰上培养40分钟。通过装载有EXP032ADC分析软件的流式细胞仪(EPICS ALTRA;Beckman Coulter公司),分析DNA含量。关于DNA含量,在将pMIRNA1-mir-520d/GFP克隆转染后,通过约20000次事件进行评价。通过Moflo XDP细胞分选仪(EPICS ALTRA、Beckman Coulter公司)分选(挑选)GFP阳性细胞。

[0334] (6-9)组织学的检查

[0335] 在具备亮视野成像功能的解剖显微镜下或肉眼下检查以及计测肿瘤体积以及向肺、肝脏、腹腔内和后腹膜腔中的转移癌。组织样品在10%缓冲福尔马林溶液中固定一夜,用PBS清洗,向70%乙醇中转移。之后,包埋于石蜡中,切成薄片,使用苏木精-伊红染色。

[0336] (6-10)细胞中的荧光检测

[0337] 为了评价通过慢病毒mir-520d表达载体的感染效率,检测绿色荧光表达。

[0338] (6-11)统计分析

[0339] 使用具有1个观察变量、并将 $P < 0.05$ 视为显著的Mann-Whitney U试验,在3个组(对照组、模拟(mock)组以及mir-520d组)之间进行比较。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

[0340] (6-12)结果

[0341] (6-12-1)利用向293FT细胞中的has-mir-520d的病毒感染的体外试验

[0342] 显微镜评价表达系的变化。图8A表示向293FT细胞中的has-mir-520d的病毒导入后出现的浮游细胞群落。将GFP阳性浮游细胞(图8A(a))在ES细胞用的不含有饲养细胞的培养基中培养,用延时模式观察具有GFP表达的转染子的增殖过程(图8A(c))。has-mir-520d病毒感染后的293FT细胞,在24小时以内形成片状的层。基于免疫细胞化学(图8B)确认干性化转换。GFP阳性细胞通过抗Oct4抗体被强力地染色。从3日到1周后,细胞生长成更大的群落,保持NANOG阳性状态(图8C)。通过RT-PCR、免疫印迹以及定量的miRNA RT-PCR,评价转染子的基因表达。

[0343] 与利用人诱导多能干细胞(hiPSCs)或RGM249miRNA197siRNA的转染子进行比较时,has-mir-520d发生过量表达的293FT(520d-293FT),使p53与GM249强力转录地上调,使Oct4与hTERT更弱地表达。与293FT比较时,p53、RGM249以及Oct4更强地上被调,但hTERT以相同水平表达(图9A)。与人诱导多能干细胞(hiPSCs)比较时,处于浮游状态的520d-293FT中,p53与Oct4更强地转录地进行上调。同等地表达hTERT。与293FT(第0日)比较时,p53和Oct4更强地上调,但hTERT以相同水平表达(图9B)。Dicer1被上调,这启示,在520d成熟的过程中需要Dicer1。另外,在确认520d-293FT中has-mir-520d的过量表达、以及利用RGM249miRNA-197siRNA的转染子中的RGM249miRNA-197的抑制后,RGM249miRNA-197表达与hiPSC中的表达同等。通过使用2种寡核苷酸进行处理,将293FT细胞显著地向具有hiPSC水平的miRNA表达的细胞诱导(图9C)。has-mir-520d的过量表达产生RGM249miRNA-197的下调(图9D)。在Has-mir-520d的病毒感染后,293FT在培养基中的胶粘性细胞或者浮游性细胞的任意一种中,稳定地表达mir-520d。病毒感染效率使用GFP阳性细胞分选来确定,结果为99.2%以上(数据未示出)。这也启示,这些为能够适于体内用的材料。根据细胞周期分析,与293FT以及模拟病毒感染293FT(模拟-293FT)进行比较,520d-293FT的G0期增加,S期减少(图10A)。520d-293FT细胞中的表观标记(HDAC:组蛋白去乙酰化酶、Sin3A以及MBD3:甲基-CpG结合域蛋白质3),在与模拟-293FT比较的情况下,以高水平显著地保持($P < 0.01$)。但是,DNMT1(DNA(胞嘧啶-5-)-甲基转移酶)与293FT或模拟-293FT中为相同程度(图10B)。

[0344] (6-12-2)利用向HLF细胞中的has-mir-520d病毒感染的体外试验

[0345] 将接受has-mir-520d表达载体的HLF细胞(以下也有时称为“520d-HLF”)向每10cm板中20~50个新型细胞群落转换。在图11A(左上图)中示出形态学的变化。这些细胞表达GFP(右上)以及多能性标记(右下)。其中,Oct4以及NANOG转录性地被上调。作为对照,RGM249、CD44、Alb以及p53显著被下调(**: $P < 0.01$;图11B)。在浸润试验中,多能标记阳性细胞的大部分不能通过纤连蛋白膜(每个6孔板 $5\mu\text{g}/\text{ml}$)进行移动。作为对照,模拟-HLF细胞能够容易地移动(图11C)。免疫印迹显示出Oct4以及p53的上调。在has-mir-520d表达HLF(520d-HLF)细胞中,抑制DICER1(图11D)。与模拟-HLF细胞比较的情况下,在520d-HLF细胞中,甲基化标记(HDAC、Sin3A以及MBD3)以显著低的水平维持($P < 0.01$)(图11B)。根据细胞周期分析,与模拟-HLF比较,显示出了520d-HLF细胞的S期增加,G0期减少(图12A)。将稳定地表达mir-520d的10个克隆的HLF细胞在ES用培养基中培养1个月,然后,与HLF比较,520d-

HLF细胞中的hTERT以及白蛋白(A1b)下调。520d-HLF细胞中的、Oct4以及p53上调。癌干细胞标记(PROM1:CD133),在HLF、hiPSC、520d-HLF细胞之间无显著差别(图12B)。CD44表达显著减少($P<0.01$)(未示出数据)。另外,检查证实利用mir-520d的Huh7细胞(高分化肝癌细胞株)中的多能性诱导。在小且圆的细胞群落中的Oct4以及NANOG表达,与利用模拟载体的诱导比较,进一步上升。另外,通过2 μ M的purdormorphamine添加,将520d-HLF细胞向具有ALP、SPP1以及IBSP的上调的成骨细胞诱导。

[0346] 图13是用于研究HLF细胞的情况下的初期化水平的图表。与293FT细胞共同点仅在于AID、DNMT1的表达水平,293FT中,HDAC、Sin3A、MBD3显著提高表达,相对于此,HLF中这些表达显著降低。

[0347] (6-12-3)利用感染has-mir-520d病毒的HLF细胞的体内试验

[0348] 通过has-mir-520d的慢病毒表达载体或模拟载体,感染HLF细胞,然后,将该细胞(5×10^7 细胞)向免疫不全小鼠(KSN/Slc)的腹腔内间隙注射。注入了表达has-mir-520d的HLF细胞的小鼠组的75%,沿着腹腔内或注射针的刺入部分,形成肿瘤(图14A)。作为对照,100%的模拟感染组,在腹腔内或肝脏中形成白色结节(通过HE染色(x40)在组织学上未分化肝癌细胞)(图14B)。12.5%(1/8)的小鼠组中的520d-HLF细胞,(具有肝细胞索、中心静脉、胆管(右图;白箭头),在内部部分地具有腺瘤样增生(图14D)(从右侧第2个图))向正常肝组织转换(图14C、下图:HE染色组织标本)。37.5%(3/8)的HLF细胞转化成由具有表皮的类皮囊胞、汗腺(左图;白箭头)(图14A、图14D以及图14C上图;HE染色组织标本)以及皮脂腺(从左侧第2个;白箭头)构成的畸胎瘤。所生成的畸胎瘤和肝组织表达GFP蛋白质(图14E)(左图:HE以及右图:GFP)。通过免疫组织化学染色确认肝组织中的几乎全部肝细胞较强地表达人白蛋白。作为肝星状细胞(HSC)/肌成纤维细胞(MFs)的标记的、胶质纤维性酸性蛋白质(GFAP)以及甲胎蛋白(AFP)较弱地表达。这启示,在1个月期间520d-HLF细胞向未成熟肝组织分化。50%(4/8)没有全部形成肿瘤以及特定组织。

[0349] (6-12-4)感染has-mir-520d病毒的HLF细胞的分化

[0350] 另外,通过免疫组织化学的分析,能够使用未分化的肝脏组织的标记确认构成肝组织的肝细胞、胆管、静脉、星状细胞等的存在(图15)。通过骨分化诱导,得到骨桥蛋白(Osteopontin)、涎蛋白(sialoprotein)阳性的成骨细胞,因此,能够转化成可以向内/中/外胚层分化的间叶性干细胞(MSC)。(图16)。

[0351] (6-12-5)感染has-mir-520d病毒的各种恶性肿瘤细胞的评价

[0352] 图17是对高分化型肝癌(Huh7)细胞进行评价的结果。肝癌细胞中,不论分化度如何,均能够同等地变化成多能性标记强阳性。图18是对多形性成胶质细胞瘤(T98G)细胞进行评价的结果。在未分化脑癌中也发生干性诱导,在体内没有形成肿瘤而移植到正常组织中。图19是对胰癌(PK-9)细胞进行评价的结果。胰癌中也观察到干性诱导。图20对纤维肉瘤(HT1080)细胞进行评价的结果。将作为非上皮性恶性肿瘤的肉瘤细胞(HT1080)进行干性诱导,从而能够向脂肪细胞分化。

[0353] <实施例7:与hsa-mir-192siRNA等相关的实验方法和结果>

[0354] (7-1)细胞

[0355] HMV-I(人恶性黑色素瘤)

[0356] T98G(人神经成胶质细胞瘤)

[0357] HT1080(人纤维芽肉瘤)

[0358] Pk-45(人肝癌)

[0359] (7-2)研究的miRNA

[0360] 【表5】

[0361]

miRNA的名称	成熟序列	序列号
hsa-mir-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	60

[0362]

hsa-mir-196a-1	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	61
hsa-mir-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAG	62
has-mir-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGUC	63

[0363] (7-3)shRNA

[0364] 将相对于表5的miRNA的shRNA(hsa-mir-192shRNA、hsa-mir-196a-1shRNA、hsa-mir-423-3p shRNA、has-mir-222shRNA)进行编码的载体,由GenScript corp.,(美国新泽西州)购入。该载体是在pRNATin-H1.4/Lenti(GenScript公司)中引入对上述shRNA进行编码的碱基序列的载体(以下,也有时称为“siRNA生成病毒”)。导入细胞后,表达shRNA、能够进一步生成siRNA。

[0365] (7-4)siRNA

[0366] 针对表5的miRNA的siRNA(hsa-mir-192siRNA、hsa-mir-196a-1siRNA、hsa-mir-423-3p siRNA、has-mir-222siRNA),通过Stealth RNAi designer(Invitrogen公司)获得。将序列示于表6。确认这些siRNA具有细胞增殖抑制等效果后,通过验证上述(7-3)的shRNA中是否观察到细胞增殖抑制等效果的流程进行实验。

[0367] 【表6】

[0368]

siRNA 的名称		序列	序列号
hsa-mir-192 siRNA	正义链	CTGACCTATGAATTGACAGCCTTTTCCTGTC	56
	反义链	GGCTGTCAATTCATAGGTCAGCCTGTCTC	52
hsa-mir-196a-1 siRNA	正义链	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGTTTTCCTGTCT	57
	反义链	CCAACAACATGAAACTACCTACCTGTCTC	53
hsa-mir-423-3p siRNA	正义链	AGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGTTTTCCTGT	58
	反义链	CTGAGGGGCTCAGACCGAGCTCCTGTCTC	54
has-mir-222 siRNA	正义链	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTCTTTTCCT	59
	反义链	GAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTCCTGTCT	55

[0369] 需要说明的是,在hsa-mir-192siRNA、hsa-mir-196a-1siRNA、hsa-mir-423-3p siRNA、has-mir-222siRNA(hsa-mir-192siRNA等)的反义链中,将相对于表5的miRNA的序列处于互补的关系的部分的序列示于表7。可以认为该互补的部分在RNAi或miRNA的作用中是特别重要的部分。另外,还同时示出与该部分互补的有义链的序列。

[0370] 【表7】

[0371]

siRNA 的名称	序列 (部分)	序列号
-----------	---------	-----

[0372]

hsa-mir-192 siRNA	正义链	CTGACCTATGAATTGACAGCC	48
	反义链	GGCTGTCAATTCATAGGTCAG	44
hsa-mir-196a-1 siRNA	正义链	TAGGTAGTTTTCATGTTGTTGG	49
	反义链	CCAACAACATGAAACTACCTA	45
hsa-mir-423-3p siRNA	正义链	AGCTCGGTCTGAGGCCCTCAG	50
	反义链	CTGAGGGGCCTCAGACCGAGCT	46
has-mir-222 siRNA	正义链	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC	51
	反义链	GAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCT	47

[0373] (7-5)慢病毒向细胞中的感染(infection)

[0374] 关于向细胞中的感染,首先,将慢病毒载体(pRNATin-H1.4/Lenti)向293FT或293H细胞中转染,回收上清液,通过基因实验设备中的超离心机,以27000rpm离心2小时,回收病毒,将颗粒在PBS中溶解,研究滴度后,在-80度下保存。使用该病毒,基于滴度,使细胞感染各50 μ l。另外,在3种siRNA(hsa-mir-196a-1siRNA/has-mir-423-3p siRNA/has-mir-222siRNA)共感染或4种siRNA(hsa-mir-192siRNA/has-mir-196a-1siRNA/has-mir-423-3p siRNA/has-mir-222siRNA)共感染中,以一种病毒粒子有效地起作用的滴度进行感染。

[0375] (7-6)RNA的提取

[0376] 使用mirVanaTMmiRNA分离试剂盒(Ambion,美国德克萨斯州),提取miRNA、总RNA。在清洗后的细胞中添加Trizol试剂(Life Technologies Carlsbad,美国加利福尼亚州),培养3分钟后添加Trizol试剂的1/5量的氯仿(NIPPON GENE株式会社,日本东京)。振摇15秒后,以14000rpm进行离心15分钟。加入所得到的上清液的1/10量的100%乙醇,倒转数次进行混和,装入离心柱中,以10000g离心15秒。为了清洗柱,加入700 μ l的miRNA清洗液1,以10000g离心15秒。进一步加入500 μ l的清洗液2/3,同样地进行离心。反复该作业2次,加入100 μ l预先加热至95度的RNase、DNase游离水,同样地进行离心,另外,将该过程反复2次。之后,真空浓缩40分钟,使用其中的2 μ l,使用NanoDrop(Biomedical Science,日本东京)测定浓度。

[0377] (7-7)实时RT-PCR

[0378] 为了考察RGM249、hTERT、Sox2、p53、c-Myc、Oct4、PR0M1这7种表达,使用QIAGEN一步RT-PCR试剂盒(Qiagen,日本东京)。以GAPDH、 β -肌动蛋白作为对照。所研究的基因使用多能性相关标记、未分化标记以及分化标记、端粒酶相关基因。

[0379] (7-8)蛋白质提取

[0380] 将用PBS(-)清洗后的细胞进行胰岛素处理后,回收微量离心管中,加入包含蛋白分解酶抑制剂Complete、Mini(Roche日本公司,日本东京)的细胞裂解缓冲液(SIGMA,日本东京)22 μ l,得到蛋白质提取液。使用NanoDrop,将其中的2 μ l用于浓度测定。

[0381] (7-9)免疫印迹分析

[0382] 使用iBlot™干印记系统(Invitrogen,日本东京),将电泳后的凝胶以半干状态转录成薄膜。之后,使用WesternBreeze®immunodetection试剂盒(Invitrogen,日本东京),进行成块30分钟、冲洗5分钟×2、一次抗体60分钟、清洗5分钟×4、二次抗体30分钟、清洗5分钟×4、冲洗2分钟×2。另外,在薄膜中添加2.5ml化学发光剂(chemiluminescent agent),5分钟后,通过基因实验设备的Las-1000plus(FUJIFILM,日本神奈川)进行检测。

[0383] (7-10)细胞周期分析

[0384] 将 1×10^6 个细胞清洗后,进行胰岛素处理,在15ml试管中回收。之后,加入95%乙醇5ml,固定一夜。第二天,加入 $1 \mu\text{g/ml}$ 的RNase1ml,在37度下培养1小时后,加入 $5 \mu\text{l}$ 的PI,在30分钟以上、4度、遮光下通过基因实验设备的EPICSALTRA(Beckman coulter,日本东京)进行分析。

[0385] (7-11)MTT试验

[0386] 将用PBS(-)清洗后的细胞进行胰岛素处理,然后,在96孔板上接种 1×10^6 个细胞各 $100 \mu\text{l}$ 。使用Promega公司的CellTiter96®非放射性细胞增殖检测试剂盒,研究细胞增殖能力。

[0387] (7-12)群落形成试验

[0388] 使用软蒸机,研究引起转化的细胞的基础依存性以及肿瘤形成能。在60mm盘子中装入底层琼脂(0.5-0.6%)2-3ml,发生一定固化后,以顶层琼脂(0.4%)形成多层。另外,在该盘子中接种细胞,培养1-2周之后,对细胞计数。

[0389] (7-13)miRNA的定量

[0390] 使用Takara(日本东京)公司的mir-x miRNA定量试剂盒进行定量。基于指定的实验报告实施。

[0391] (7-14)病毒载体向基因组中引入的研究

[0392] 感染效率基于慢病毒载体的信息进行评价。关于GFP表达,通过荧光显微镜使感染可视化来判定,由感染细胞的一部分提取DNA或RNA,通过PCR扩增后,通过电泳可视化,评价新毒素的导入、miRNA的导入。没有施行向基因组中的引入部位的研究。

[0393] (7-15)实验结果

[0394] (7-15-1)siRNA生成慢病毒感染后的HMV-1中的MTT试验

[0395] 将感染各siRNA生成病毒的HMV-1中的MTT试验进行3天(图21)。在3种siRNA(hsa-mir-196a-1siRNA/has-mir-423-3p siRNA/has-mir-222siRNA)共感染或4种siRNA(hsa-mir-192siRNA/has-mir-196a-1siRNA/has-mir-423-3psiRNA/has-mir-222siRNA)共感染细胞中,确认显著的增殖抑制。将统计学的显著差别用 $*(p < 0.05)$ 表示(曼-惠特尼检验, Mann-Whitney test)。

[0396] (7-15-2)在siRNA生成慢病毒感染2周后的HMV-1的荧光显微镜照片和增殖曲线

[0397] 利用各siRNA生成病毒感染的导入阻碍miRNA表达。另外示出了表示细胞的增殖抑制的经时的变化(图22)。图中的顶板是用于1周后的模拟与hsa-mir-196a-1/hsa-mir-423-3p/hsa-mir-222中的GFP检测的荧光显微镜照片。图中的底板是病毒感染后的HMV-1的增殖曲线。与对照、模拟、hsa-mir-192、hsa-mir-196a-1siRNA、hsa-mir-222siRNA进行比较,在3种siRNA(hsa-mir-196a-1siRNA/has-mir-423-3p siRNA/has-mir-222siRNA)共感染或4种siRNA(hsa-mir-192siRNA/has-mir-196a-1siRNA/has-mir-423-3p siRNA/has-mir-

222siRNA)共感染中,观察到显著的增殖抑制,感染细胞在3周以内达到凋亡。

[0398] (7-15-3)HMV-1的siRNA生成慢病毒感染中的群落形成试验

[0399] 使针对miRNA的siRNA在所生成的病毒载体中感染,在导入有siRNA的HMV-1中,为了评价肿瘤形成能,使用软蒸机,进行群落形成试验(图23)。对照中,形成多个群落,相对于此,在hsa-mir-192单独导入、4种(has-mir-192/-196a-1/-423-3p/-222)miRNA的共表达中,显著地抑制群落形成能。在针对hsa-mir-192的siRNA中,中途确认群落形成,之后,增殖停止,直接引起细胞的断片化,从而达到凋亡。另外,在4种(has-mir-192/-196a-1/-423-3p/-222)的共感染中没有形成群落。

[0400] 以上的实施例中的各种材料以及操作方法,只要没有特别记载,则如下进行。

[0401] • antagomir的合成

[0402] antagomir(以miRNA为目标的小RNA)的设计和合成委托给Invitrogen公司(Stealth RNAi designer(<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)) and GenScript公司(pRNATin-H1.4/Lenti,pRNAT-T6.1/neo).shRNA-generating载体,使用BLOCK-it Inducible H1RNAi Entry Vector(Invitrogen公司,美国加利福尼亚州),根据实验报告来制作。

[0403] • 细胞株

[0404] HLF细胞株和HMV-I细胞株分别从美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection)和日本东北大学(Tohoku University)购入,在添加有10%FBS和1%盘尼西林/链霉素的RPMI培养基中培养。在antagomir处理的情况下,将HMV-I细胞与50nM的antagomir一起培养。

[0405] • RNAi

[0406] 使用FuGene HD转染试剂(Roche Diagnostic GmbH),在HLF或HMV-I细胞上转染50nM siRNA、对照的寡核苷酸或空的载体。RNA内切酶III(Dicer enzyme)从Genlantis购入,根据实验报告使用。3个miRNA通过用RNA内切酶III消化、再用miRCAT-microRNA克隆试剂盒(Integrated DNA Technologies)进行克隆而得到。免疫不全小鼠从Charles river购入CAnN Cg-Foxn1BALB/c-nu,从SHIMIZU Laboratory Supplies Co.,Ltd.购入KSN/Slc。

[0407] • RNA的分离和miRNA的定量

[0408] 总RNA、小RNA级分,从培养细胞或匀浆后的小鼠组织中,使用mirVana miRNA分离试剂盒(Ambion)进行提取。miRNA的成熟化的定量,使用Mir-XTM miRNA qRT-PCR SYBR[®]试剂盒(Takara Bio公司),根据说明书进行。使用U6小核RNA作为内部对照。

[0409] • mRNA的实时PCR

[0410] 对于总RNA,使用一步RT-PCR试剂盒(QIAGEN)使其逆转录以及增宽。PCR和数据收集分析使用LineGene(TOYOBO)进行。关于样品的表达水平,使用标准曲线方法($2^{-\Delta\Delta}$ 法)来确定。将所有数据(不包括hTERT以及RGM249的数据)相对于作为内部对照的 β -肌动蛋白进行标准化。关于hTERT以及RGM249的推测,根据本发明人以前开发的定量方法,通过拷贝数进行。对于mRNA,以50ng/ μ l进行试验,关于小RNA以100ng/ μ l进行试验。

[0411] • 免疫印迹

[0412] 使用i-Blot凝胶转录系统(Invitrogen公司),进行免疫印迹分析。使用根据制造商的手册的稀释率,使用相对于目标生物标记基因的各自的抗体。对20 μ g的细胞提取物进

行试验。

[0413] • 关于肿瘤形成以及转移的实验

[0414] 基于鸟取大学动物实验委员会中承认的方案,实施动物实验。如实验方法部分所记载,实施肿瘤细胞接种、验尸以及组织学的分析。从接种7日后,在小鼠的尾静脉或右侧腹部的皮下,将siRNA或shRNA(100 μ M)以每周一次的节奏进行利用短抑制寡核苷酸的处理4~5周。摘出肿瘤进行计量。将肿瘤体积以及肺、肝脏、腹腔内以及腹腔外(postperitoneal)转移癌在具备亮视野成像功能的解剖显微镜下或肉眼下进行检查以及计测。组织样品在10%缓冲福尔马林溶液中固定一夜,用PBS清洗,向70%乙醇中转移。之后,在石蜡中包埋,切出薄片,使用苏木精-伊红染色。为了评价在转移步骤的后期阶段中的antagomir的效果,通过胸腺缺损小鼠的尾静脉或皮下移植肿瘤细胞。接着,在肿瘤细胞移植7日后,在同域性的实验中使用,以相同的用量和频率开始antagomir治疗。在静脉内给药的情况下通过全身性转移,或者在皮下接种的情况下通过肝脏转移或者腹腔内转移,小鼠在第30日达到濒死的状态,使其安乐死。

[0415] • 毒性的评价

[0416] 将胸腺缺损小鼠分为每1组5只,将PBS+DDS或50 μ M的antagomir以每周一次的节奏经过4~5周静脉给药6次。体重以每2周1次的节奏进行测定。使小鼠在最后的给药后6日安乐死,收集组织。将全血的一定分量收集在用EDTA处理后的试管中。通过离心分离除去血球细胞,得到血浆。使用奥林巴斯公司制造的Bioanalyzer,分析样品,测定血液的生化值。关于所有可能的病理状态,检查肺或肝脏的切片。

[0417] • 向人正常细胞的诱导

[0418] 通过转染针对miRNA-47、-101、-197的siRNA,293FT细胞向人正常细胞诱导。之后,使用RT-PCR和免疫印迹法评价相关基因的表达的变化。

[0419] • 免疫组织化学试验

[0420] 根据制造商(R&D Systems,美国明尼阿波利斯)的手册,使用未分化标记(抗Oct-4抗体)以及胚性干细胞标记抗体板(Embryonic Stem Cell Marker Antibody Panel),实施免疫组织化学检查。使细胞上转染或感染针对miRNA-197的siRNA。回收浮游的转染子,转移至显微镜观察用的新的培养板或免疫染色用载玻片室。

[0421] • hiPSC(人类诱导多能干细胞,Human-induced pluripotent stem cells)作为人工多能干细胞的hiPSC(HPS0002253G1)由理研生物资源中心的细胞库('Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.' Nakagawa M et al.,Nat Biotechnol26,101-106(2008))提供。

[0422] • 培养条件

[0423] 导入miR-197siRNA或hsa-mir-520d制作的多能干细胞,可以在ES细胞用培养液中培养,也能够选自由F-12HAM[DMEM(15mM HEPES+1mM丙酮酸钠+吡哆醇+NaHCO₃+5mM L-谷氨酰胺)、RPMI-1640+L-谷氨酰胺,DMEM+高葡萄糖+L-谷氨酰胺+0.1mM NEAA以及REPROSTEM(REPROCell公司):bFGF3-10ng/ml组成的组中的一种以上的培养基中,在37℃、5%CO₂、10%FBS的条件下培养。

[0424] • 流式细胞术

[0425] 使用将与miRNA-197对应的siRNA转染后的293FT细胞,对通过胰岛素进行分离解

吸后的细胞实行流式细胞术。将单一细胞混悬物用冷却后的PBS进行一次清洗。之后通过平稳地振摇试管使细胞颗粒分散,滴加ddH₂O中的冷却70%EtOH进行固定。将细胞在-20℃下培养至少一夜。固定后,使用冷却后的PBS,将细胞进行二次清洗,除去EtOH。之后,将细胞在含有100U/ml的RNaseA的PBS中以 1×10^6 细胞/ml进行再混悬,在37℃下培养50分钟。直接加入50μg/ml的碘化丙啶,避光在冰上培养40分钟。通过流式细胞仪(EPICS ALTRA, Beckman Coulter公司),分析DNA含量。为了评价再程序化后的细胞的表达,通过装载有EXP032ADC分析软件的流式细胞仪,转染siRNA-197后,通过约20000次事件对iPS细胞进行评价。关于使用GFP表达细胞或者PE阳性细胞的流式细胞术的精制,在病毒转导过程的结束24小时后,使(保持未分化状态培养2周后的)293FT细胞或HLF细胞在添加有5%FCS的磷酸缓冲液(PBS)中再混悬。在PE化合抗碱性磷酸酶(ALP)抗体中,将细胞染色后,使用Moflo XDP(Beckman Coulter公司、California、美国),对GFP阳性细胞或PE阳性细胞进行分取以及分析。使用氩激光器(488nm、100mW),关于前向散射、侧向散射以及PE以及GFP荧光,对 1×10^8 细胞进行分析。作为检测器,关于GFP使用FL1,关于PE使用FL2。

[0426] • 头盖内注入方法

[0427] 使用戊巴比妥钠(50mg/kg、腹腔内注射),麻醉免疫不全小鼠,配置在定位固定装置中。在外科手术中,使用加热板,将动物的体温保持在37℃。露出头盖,在左线条体的上方制作小规模的开头。将通过聚乙烯的管与10μl的汉密尔顿注射器连结的30G的注射针用于细胞移植用。将注射针在左线条体处定位地插入(距前囟A(前方)0.5mm、L(侧方)2.0mm、D(深度)2.5mm),压力注射5μl的细胞混悬物(10^8 细胞/μl)。注射后,将该注射针缓慢拔出,使用齿科用胶合剂,覆盖头盖的孔。使用6-0聚丙烯缝线(Prolene)缝合切开部。从外科手术恢复后,将动物放回到原来的饲养笼中。

[0428] <结果的考察>

[0429] 基于以上的结果进行考察。实施例的结果显示,RGM249shRNA具有恶性肿瘤的增殖抑制、恶性肿瘤的转移抑制、细胞内RGM249mRNA量的抑制或细胞内hTERT mRNA量的抑制的效果。另外显示,3个siRNA具有恶性肿瘤的增殖抑制、恶性肿瘤的转移抑制、细胞内的3个miRNA量的抑制、未分化标记的上调、p53的上调或正常细胞或者恶性肿瘤细胞的重排的效果。显示hsa-mir-520d具有未分化标记的上调、p53的上调或正常细胞或者恶性肿瘤细胞的重排、恶性肿瘤的增殖抑制等效果。另外,对于hsa-mir-192siRNA等也观察到类似的效果。在小鼠中观察到的恶性肿瘤的抑制可以认为恶性肿瘤细胞的重排是主要原因之一。另外,不仅是未分化型而且高分化型肝癌细胞,也成为Oct4阳性并且NANOG阳性细胞,观察到不是由分化型引起的干性化效果。需要说明的是,在遮断从RGM249mRNA开始的级联的方面,RGM249shRNA和3个siRNA的功能共同,可以认为该功能与上述恶性肿瘤的抑制和恶性肿瘤细胞的重排等效果相关。可以认为hsa-mir-520d此时上调。由上可以认为,RGM249shRNA、3个siRNA、hsa-mir-520d、hsa-mir-192siRNA等均能够优选用于恶性肿瘤治疗。

[0430] 另外可以认为,这些小RNA能够作为在体内外将细胞向多能干细胞诱导的诱导剂、或用于生产多能干细胞的试药优选使用。特别是在不使用癌基因的方面、能够重排恶性肿瘤细胞的方面、通过单剂能够重排的方面、产生p53的上调的方面或培养时不需要饲养细胞的方面,可以认为具有比以往的为了生产多能干细胞而研究的化合物更优良的特性。

[0431] 特别是关于恶性肿瘤细胞的重排,是世界上几乎没有研究成果的领域,暗示了今

后的恶性肿瘤治疗的新的可能性。另外,关于p53,报道了其基因敲除和基因敲落使iPS细胞的制作效率上升(Zhao et al., Cell Stem Cell. 2008 Nov 6; 3(5):475-9.、Hong et al., Nature. 2009 Aug 27; 460(7259):1132-5. Epub 2009 Aug 9.),因此,使用上述小RNA得到的多能干细胞使p53上调的令人惊奇的结果。另外可以认为,由于p53表达,因此该多能干细胞难以发生恶性肿瘤化。

[0432] 需要说明的是,在导入后持续未分化保持环境的情况下,发生导入有上述小RNA的细胞的肿瘤化,在生物体内难以产生肿瘤。因此,优选在细胞中导入小RNA后在1周以内用于治疗。

[0433] 另外,RGM249shRNA、3个siRNA、hsa-mir-520d分别由发夹状结构的单链、双链、pre-miRNA样结构的单链构成。这启示:siRNA或miRNA发挥作用时的二级结构也不一定被固定,能够允许一定程度的范围。

[0434] 需要说明的是,可以认为,上述实施例中,3个siRNA、hsa-mir-520d或hsa-mir-192siRNA等,将目标RNA链通过RNAi或miRNA的作用而抑制。但是,假设其他机理也发挥作用,如果使用3个siRNA的有义链(序列号4、序列号5或序列号6)以及反义链(序列号1、序列号2或序列号3)、hsa-mir-520d(序列号43)或hsa-mir-192siRNA等(序列号44等),则得到如上所述的效果。另外,即使与在此未示出的目标RNA链反应也同样。

[0435] 以上,基于实施例对本发明进行说明。该实施例只是例示,本领域技术人员可以理解能够进行各种变形例,另外,这样的变形例也在本发明的范围内。

序列表(SEQUENCE LISTING)

<110> 国立大学法人鸟取大学

<120> 利用siRNA导入的新型hiPSC制作法

<130> 0331TTR-P

<150> JP 2010-158192

<151> 2010-07-12

<150> JP 2010-158193

<151> 2010-07-12

<150> JP 2010-158194

<151> 2010-07-12

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> miR-47 siRNA的反义链

<400> 1

aaucaaacuc ucaccgggug ag

22

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> miR-101 siRNA的反义链

<400> 2

cacauggcuu uggucauguu

20

<210> 3

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> miR-197 siRNA的反义链

<400> 3

cacauccucg ugaaguac

18

<210> 4

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> miR-47 siRNA的正义链

<400> 4

cucacccggu gaugagaguu uga

23

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> miR-101 siRNA的一部分正义链

<400> 5	
aacaugacca aagcccaugu g	21
<210> 6	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> miR-197 siRNA的一部分正义链	
<400> 6	
guacuucacg aggaugug	18
<210> 7	
<211> 249	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 7	
ggaaaacuaa aaugagagaa ugggugucca agaggacaag uucaugcuca cccggugaug	60
agaguugau ugcagaauaa ggcuagacaa aggggaagcug aacaugacca aagccaugug	120
acaucguaug auccucgaau cucacaguau cuauguaucu auaaucagau acaucccuag	180
acuuuccagg aaucucggua cuucacgagg augugagaag acucugaaca aaauaaauaca	240
cugcucgug	249
<210> 8	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	

<223> 一部分RGM249 shRNA

<400> 8

cuuugucuag ccuuauucug c

21

<210> 9

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 一部分RGM249 shRNA

<400> 9

gcagaauaag gcuagacaaa g

21

<210> 10

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> RGM249 shRNA

<400> 10

gcagaauaag gcuagacaaa guucgcuuug ucuagccuua uucugcggug

50

<210> 11

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> RGM249 shRNA质粒的一部分上链

<400> 11

caccgcagaa uaaggcuaga caaagcgaac uuugucuagc cuuauucugc	50
<210> 12	
<211> 50	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> RGM249 shRNA plasmid质粒的一部分下链	
<400> 12	
aaaagcagaa uaaggcuaga caaaguucgc uuugucuagc cuuauucugc	50
<210> 13	
<211> 49	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> RGM249m-1 shRNA质粒的一部分上链	
<400> 13	
caccgcagaa uaaggcuaga caaagcgaac uuugucagcc uuauucugc	49
<210> 14	
<211> 49	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> RGM249m-1 shRNA质粒的一部分下链	
<400> 14	
aaaagcagaa uaaggcugac aaaguucgcu uugucuagcc uuauucugc	49

<210>	15	
<211>	49	
<212>	RNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	RGM249m-1 shRNA	
<400>	15	
	gcagaauaag gcugacaaaag uucgcuuugu cuagccuuau ucugcggug	49
<210>	16	
<211>	25	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	16	
	cucacccggu gaugagaguu ugauu	25
<210>	17	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	17	
	aacaugacca aagccaugug	20
<210>	18	
<211>	18	
<212>	RNA	
<213>	智人	
<400>	18	
	guacuucacg aggaugug	18

<210>	19	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	miR-101 siRNA的正义链	
<400>	19	
	aacaugacca aagcccaugu guu	23
<210>	20	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	miR-197 siRNA的正义链	
<400>	20	
	guacuucacg aggauguguu	20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	引物	
<400>	21	
	cggaaagaga aagcgaacca	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 22

cggaccacat ccttctccag

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 23

cagaaggcct cagcacctac

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 24

actggatgtt ctgggtcttg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 25

caagatgcac aactcggaga

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 26

cggggccggt atttataatc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 27

aaactgaccc tcctccaggt

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 28

tgctttgctc caggaacttt	20
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
gtgcaccaac atctacaaga tcc	23
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> 引物	
<400> 30	
gttcttccaa acttgctgat g	21
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> 引物	
<400> 31	
gccagaggag gaacgagcta	20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 32

tggacggaca ggatgtatgc

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 33

gcttcgagat gttccgagag

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 34

ttatggcggg aggttagactg

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 35

tggcaacgta gtgactcagg

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 36

acaggaaggg agggagtcac

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 37

aaggtggagc aaacacaacc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 38

gcttttttctt ctgcccacac

20

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 39

tggtacttca cgaggatgtg a

21

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> 引物

<400> 40

cctgcctcct gagtcttctg

20

<210> 41

<211> 23

<212> RNA

<213> 智人

<400> 41

ucuacaaagg gaagccuuu cug

23

<210> 42

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 42

aaagugcuuc ucuuuggugg gu

22

<210> 43

<211> 87

<212> RNA

<213> 智人

<400> 43

ucucaagcug ugagucuaca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa aagaaagugc

60

uucucuuugg ugguuuacgg uuugaga

87

<210> 44

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-192 siRNA的一部分反义链

<400> 44

ggcugucaau uc auagguca g

21

<210> 45

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-196a-1 siRNA的一部分反义链

<400> 45	
ccaacaacau gaaacuaccu a	21
<210> 46	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> hsa-mir-423-3p siRNA的一部分反义链	
<400> 46	
cugaggggcc ucagaccgag cu	22
<210> 47	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> has-mir-222 siRNA的一部分反义链	
<400> 47	
gagacccagu agccagaugu agcu	24
<210> 48	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> hsa-mir-192 siRNA的一部分正义链	
<400> 48	
cugaccuaug aaugacagc c	21

<210> 49

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-196a-1 siRNA的一部分正义链

<400> 49

uagguaguuu cauguuguug g

21

<210> 50

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-423-3p siRNA的一部分正义链

<400> 50

agcucggucu gaggccccuc ag

22

<210> 51

<211> 24

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> has-mir-222 siRNA的一部分正义链

<400> 51

agcuacaucu ggcuacuggg ucuc

24

<210> 52

<211> 29

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-192 siRNA的反义链

<400> 52

ggcugucaau uc au agguca gccugucuc

29

<210> 53

<211> 29

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-196a-1 siRNA的反义链

<400> 53

ccaacaacau gaaacuaccu accugucuc

29

<210> 54

<211> 30

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-423-3p siRNA的反义链

<400> 54

cugaggggcc ucagaccgag cuccugucuc

30

<210> 55

<211> 32

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> has-mir-222 siRNA的反义链

<400> 55

gagacccagu agccagaugu agcuccuguc uc

32

<210> 56

<211> 33

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-192 siRNA的正义链

<400> 56

cugaccuaug aauugacagc cuuuuccugu cuc

33

<210> 57

<211> 33

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-196a-1 siRNA的正义链

<400> 57

uagguaguuu cauguuguug guuuuccugu cuc

33

<210> 58

<211> 34

<212> RNA

<213> 人工合成

<220>

<223> hsa-mir-423-3p siRNA的正义链

<400> 58	
agcucggucu gaggccccuc aguuuuuccug ucuc	34
<210> 59	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> has-mir-222 siRNA的正义链	
<400> 59	
agcuacaucu ggcuacuggg ucucuuuuucc ugucuc	36
<210> 60	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 60	
cugaccuaug aaugacagc c	21
<210> 61	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 61	
uagguaguuu cauguuguug gg	22
<210> 62	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人	

<400> 62

agcucggucu gaggccccuc agu

23

<210> 63

<211> 24

<212> RNA

<213> 智人

<400> 63

agcuacaucu ggcuacuggg ucuc

24

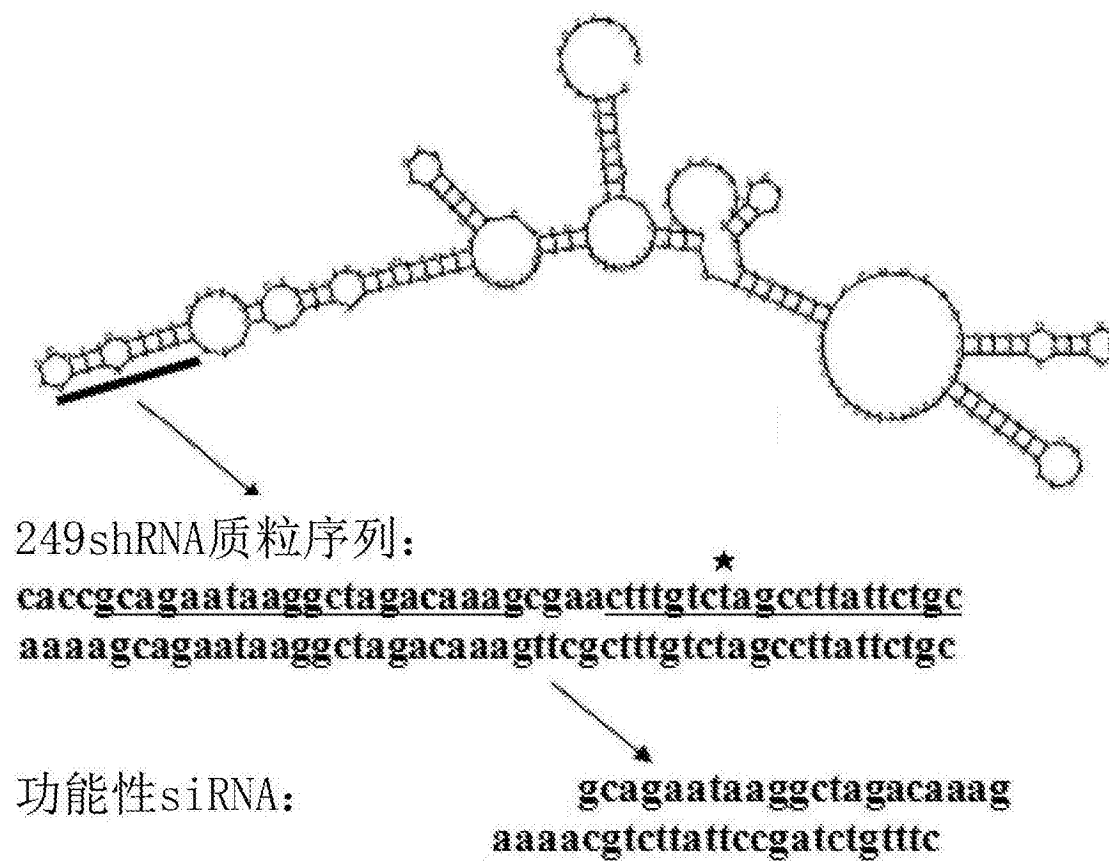
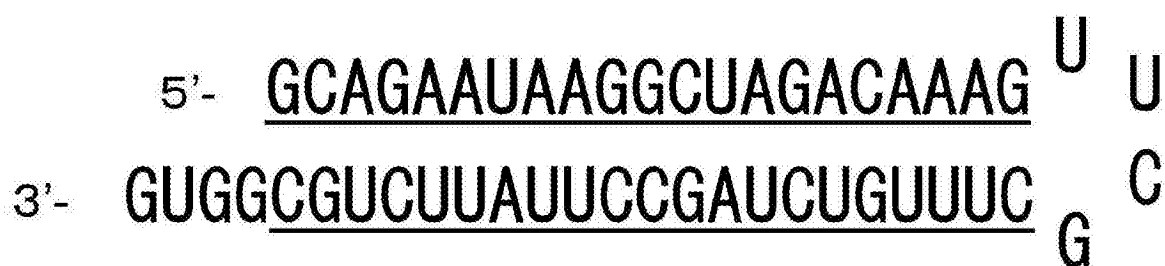


图1A

■ RGM249 shRNA的推测二级结构



■ RGM249m-1 shRNA的推测二级结构

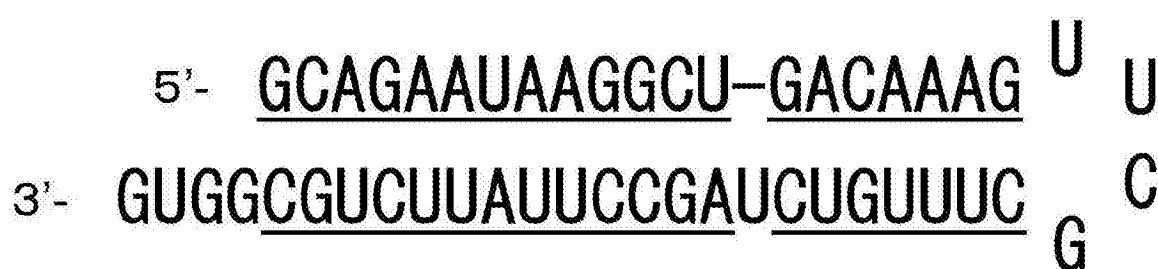


图1B

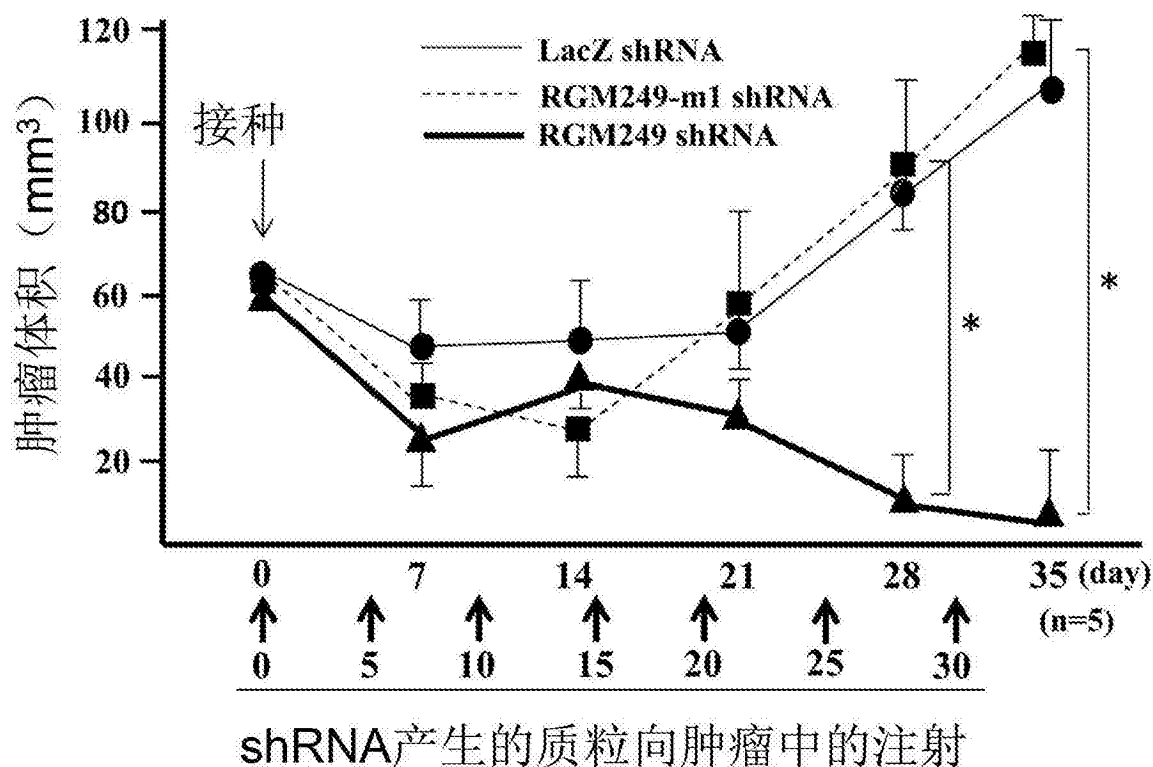
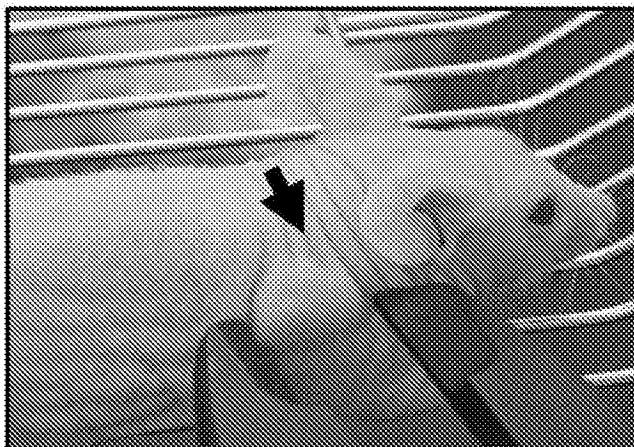


图1C

LacZ RNA



**RGM249-m1
shRNA**



**RGM249
shRNA**

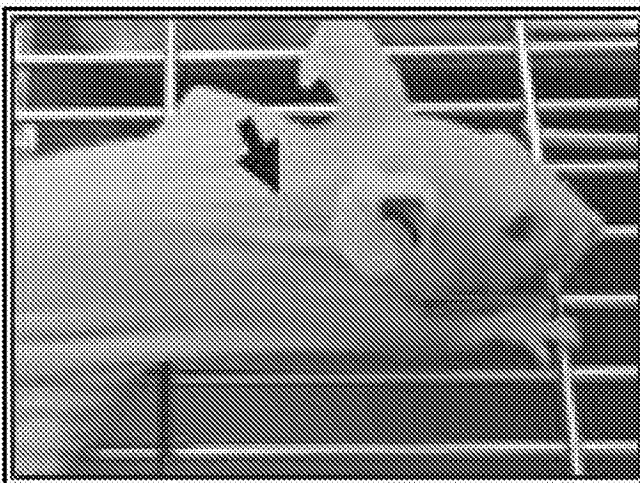


图1D

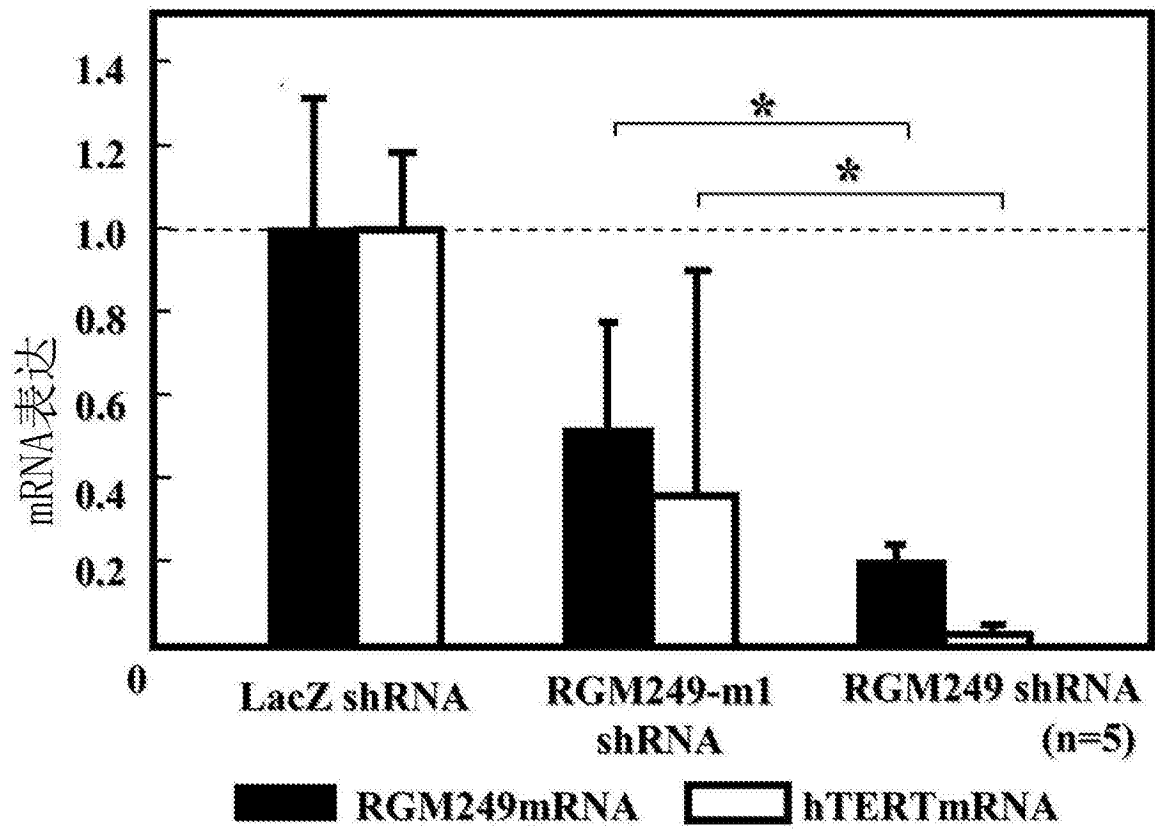


图2A

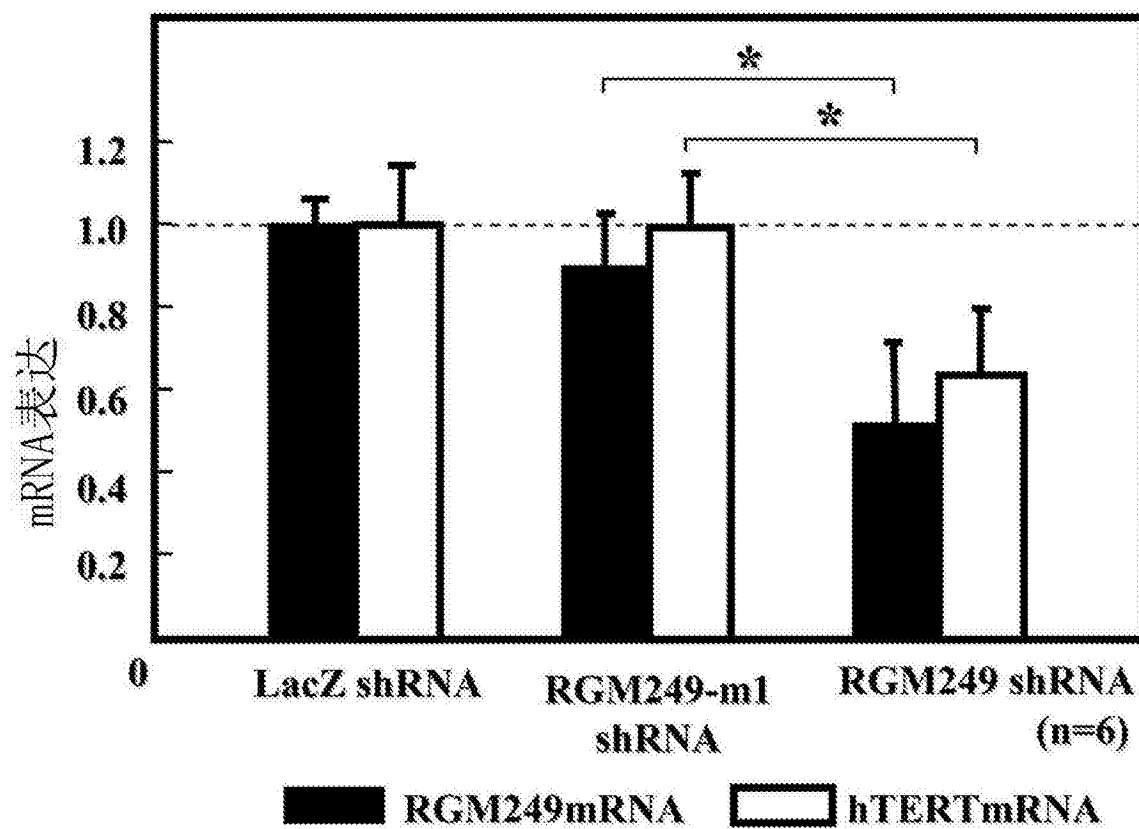


图2B

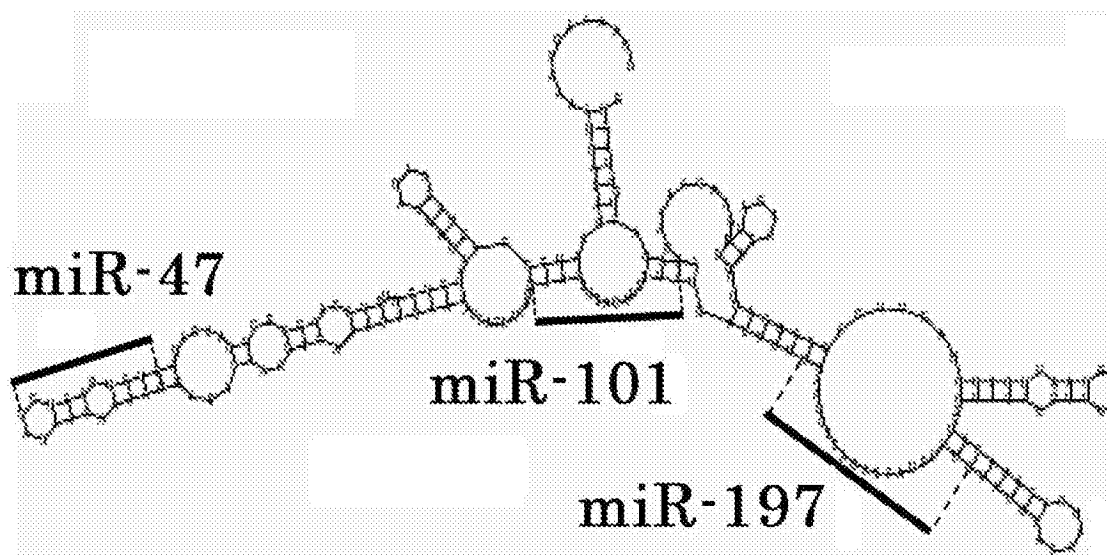


图3A

■miR-47 siRNA的推测二级结构

5'- CUCACCCGGUGAUGAGAGUUUGA - 3'
3'- GAGUGGGCC---ACUCUCAAAACUAA - 5'

■miR-101 siRNA的推测二级结构

5'- AACAUGACCAAAGCCCAUGUGUU - 3'
3'- UUGUACUGGUUUCGG-UACAC - 5'

■miR-197 siRNA的推测二级结构

5'- GUACUUCACGAGGAUGUGUU - 3'
3'- CAUGAAGUGCUCUACAC - 5'

图3B

■ miR-47 与miR-47 siRNA（反义链）的序列比较

5' - CUCACCCGGUGAUGAGAGUUUGAUU - 3'
3' - GAGUGGGCC --- ACUCUCAAACUAA - 5'

■ miR-101与miR-101 siRNA（反义链）的序列比较

5' - AACAUGACCAAAGCCAUGUG - 3'
3' - UUGUACUGGUUUCGGUACAC - 5'

■ miR-197与miR-197siRNA（反义链）的序列比较

5' - GUACUUCACGAGGAUGUG - 3'
3' - CAUGAAGUGCUCCUACAC - 5'

※上链表示miR-、下链表示siRNA

图3C

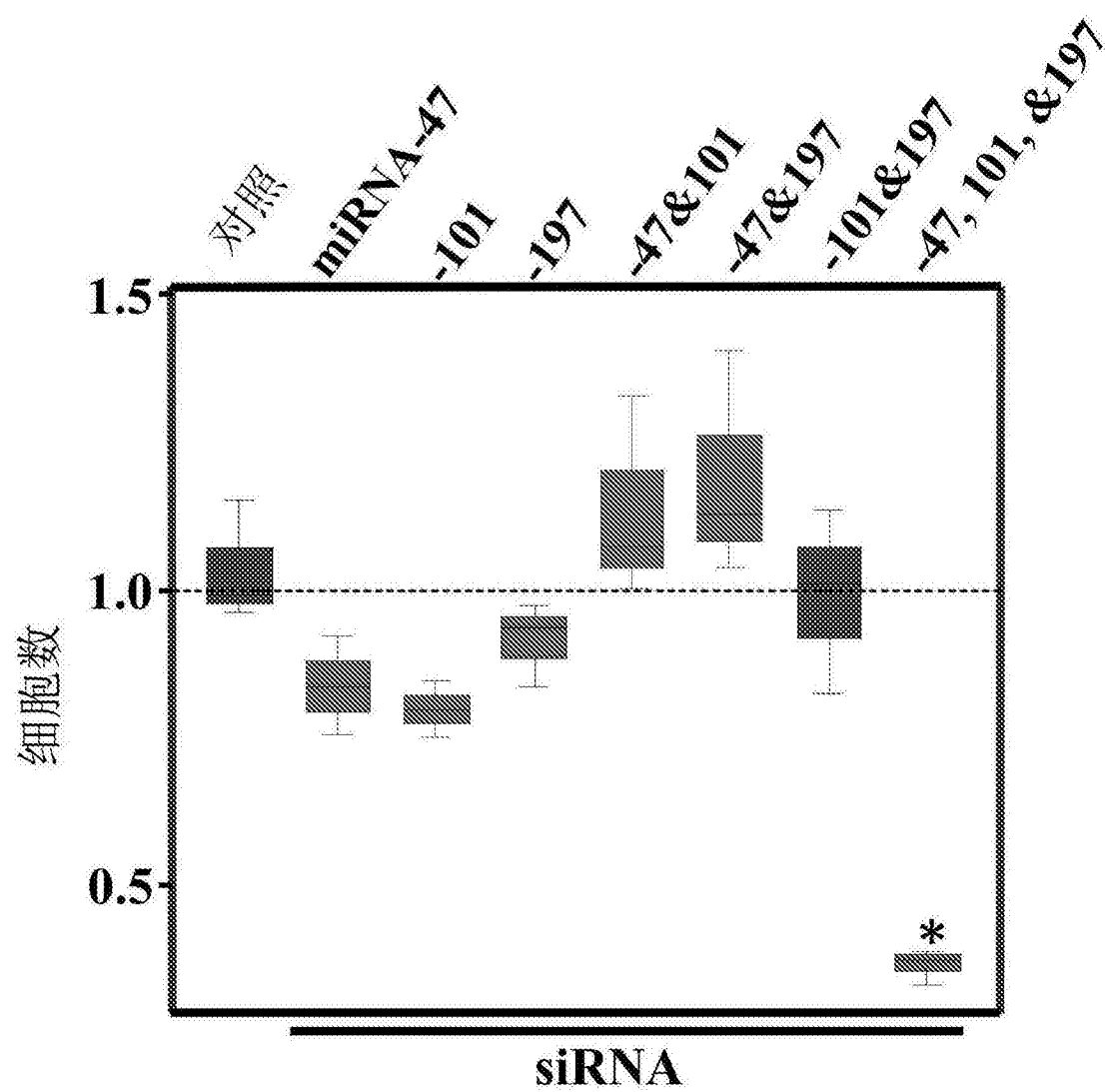


图3D

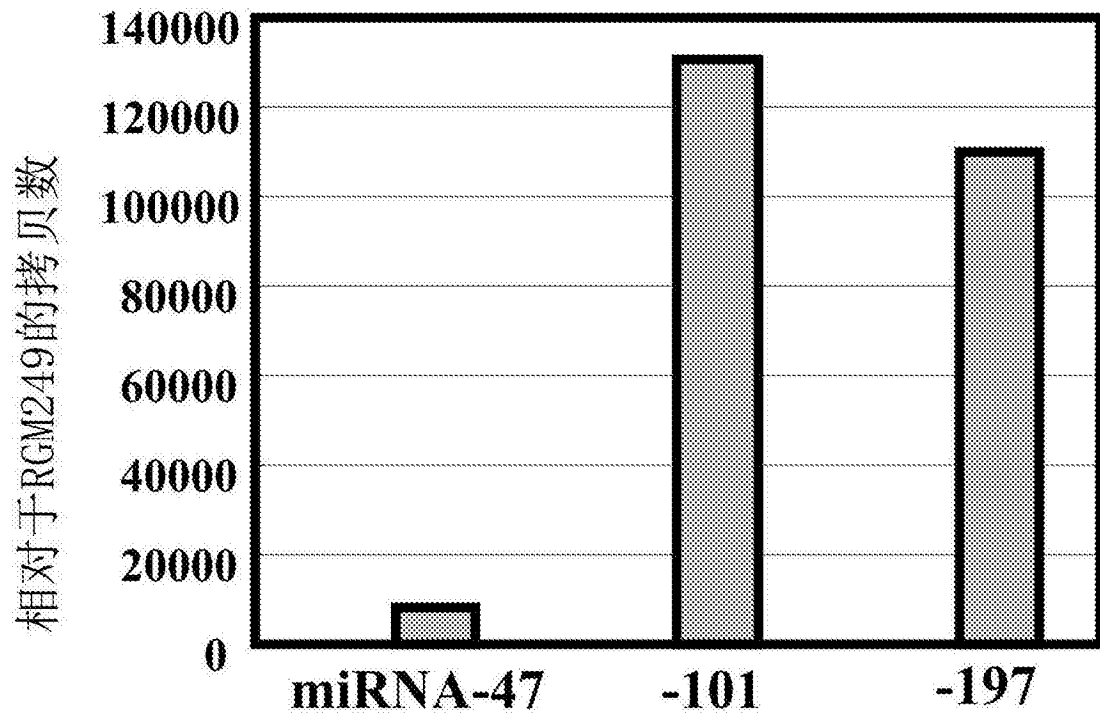


图3E

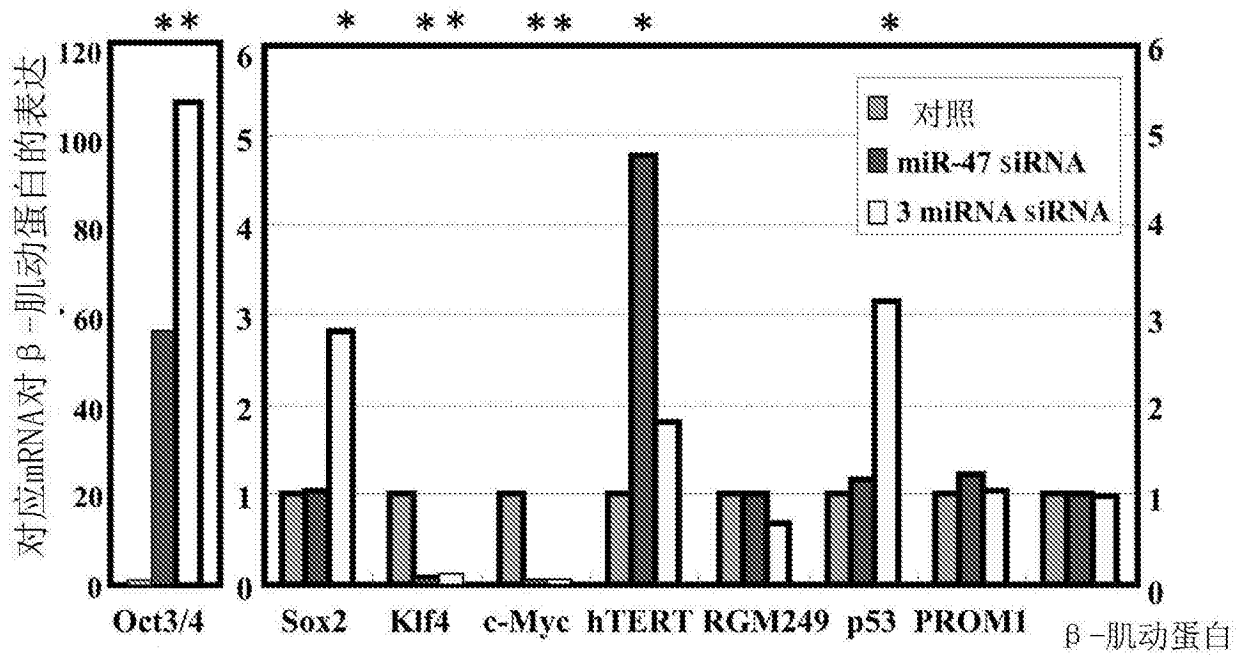


图3F

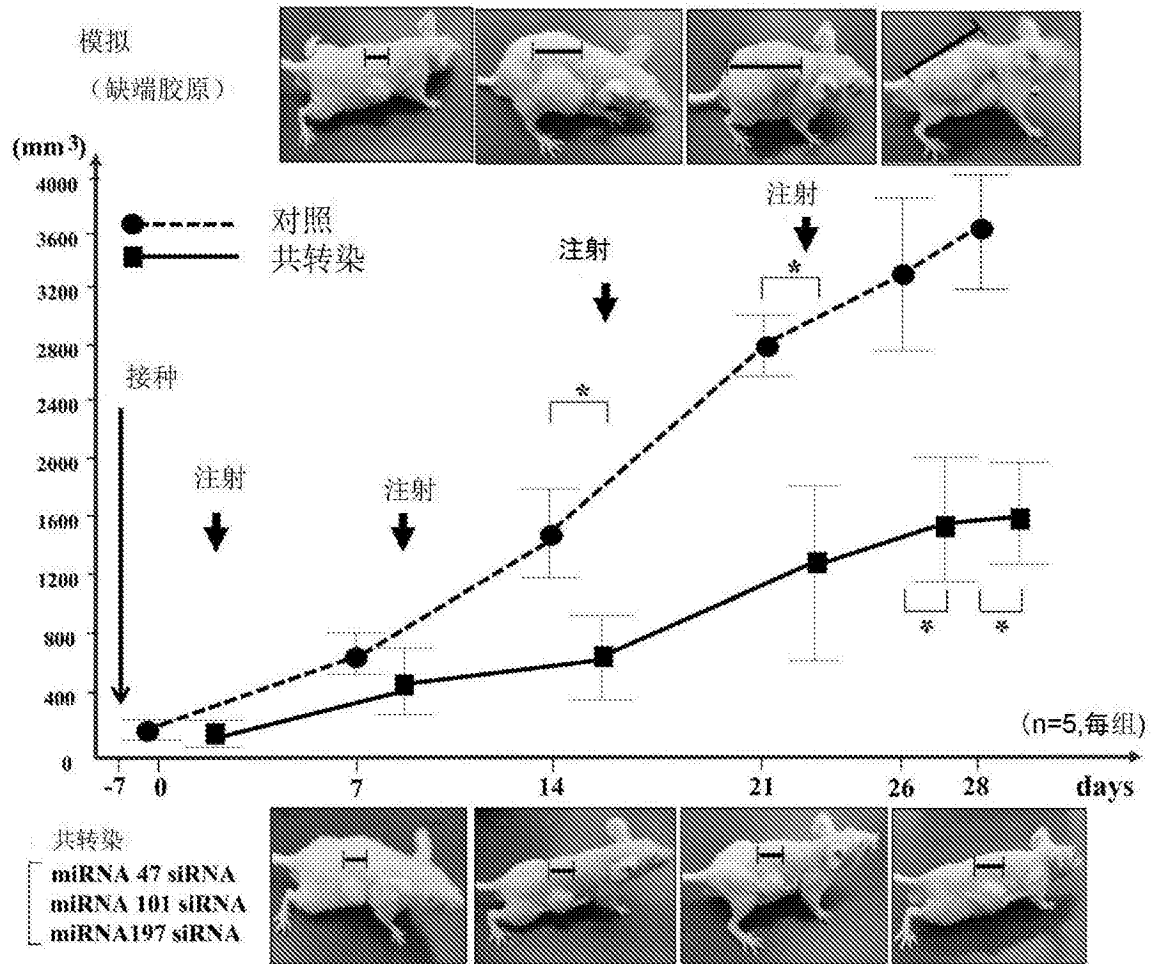


图4

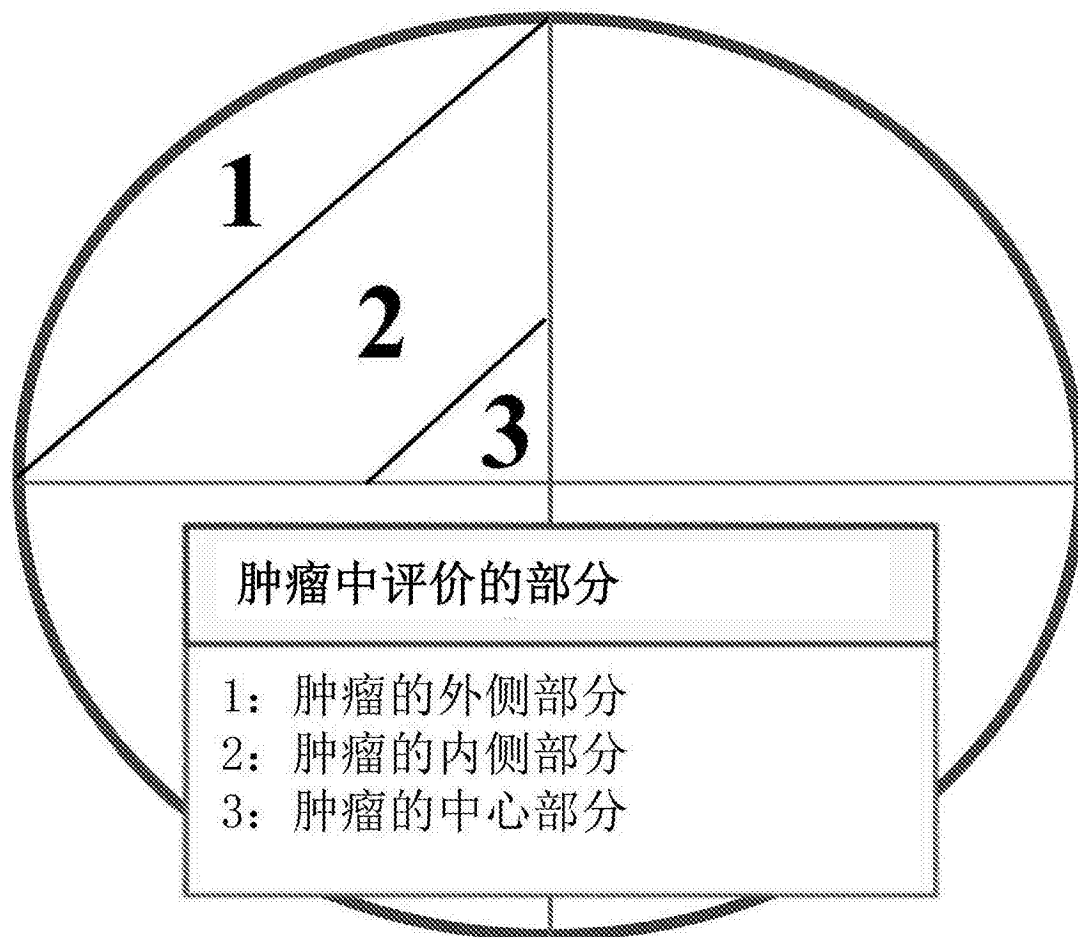


图5A

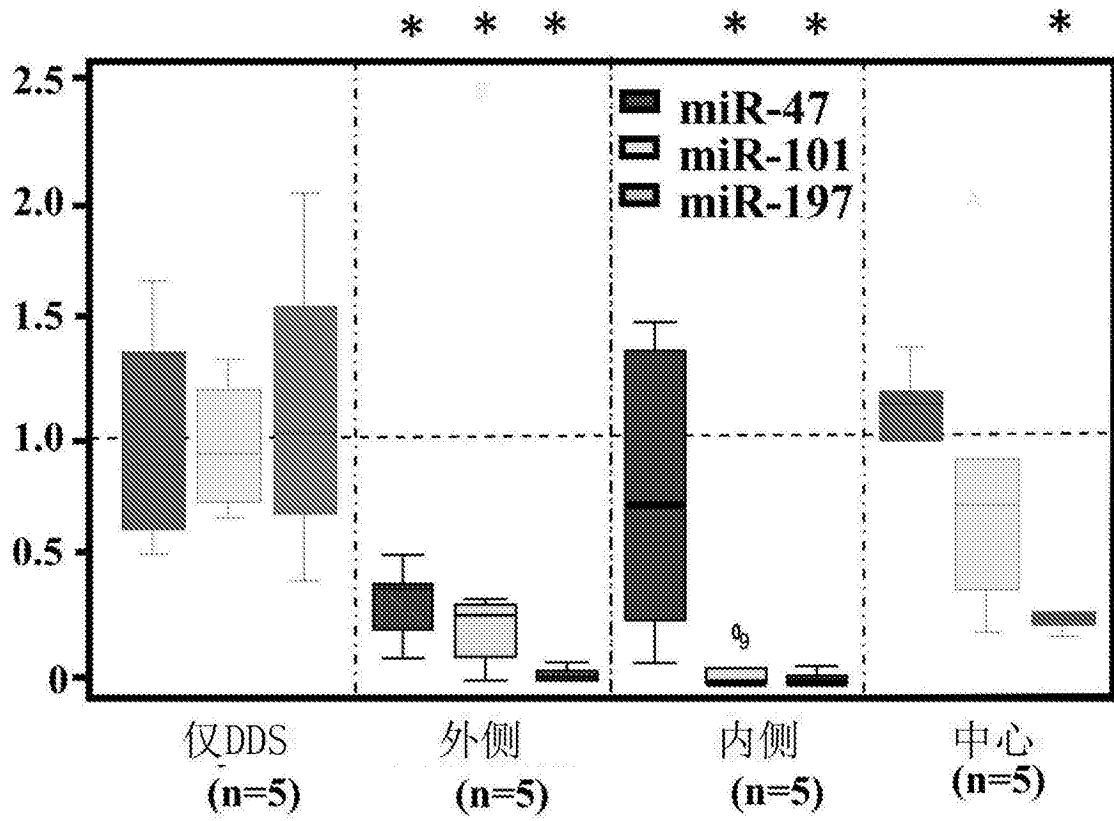
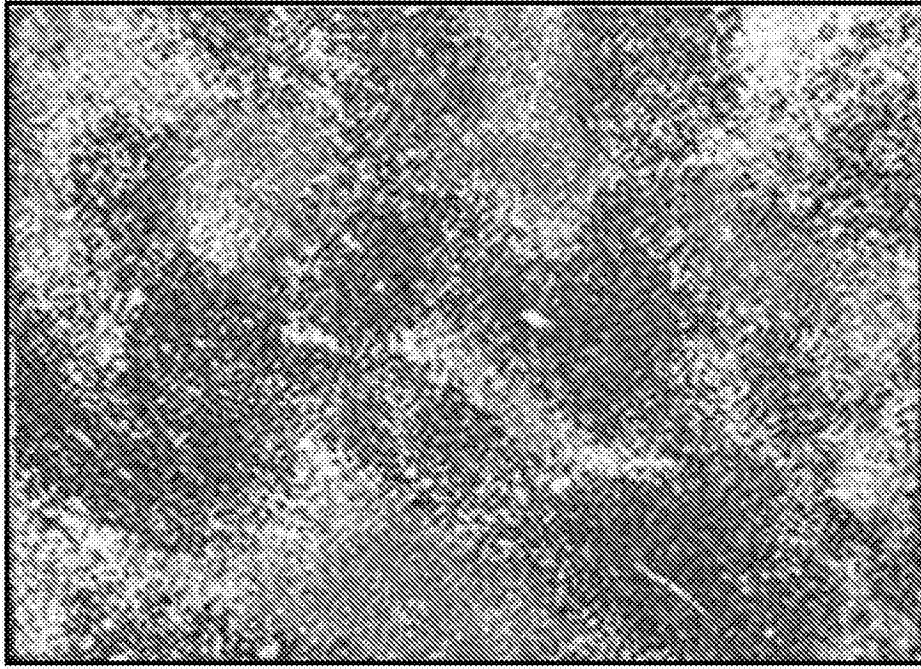


图5B



HE染色(x200)

图5C

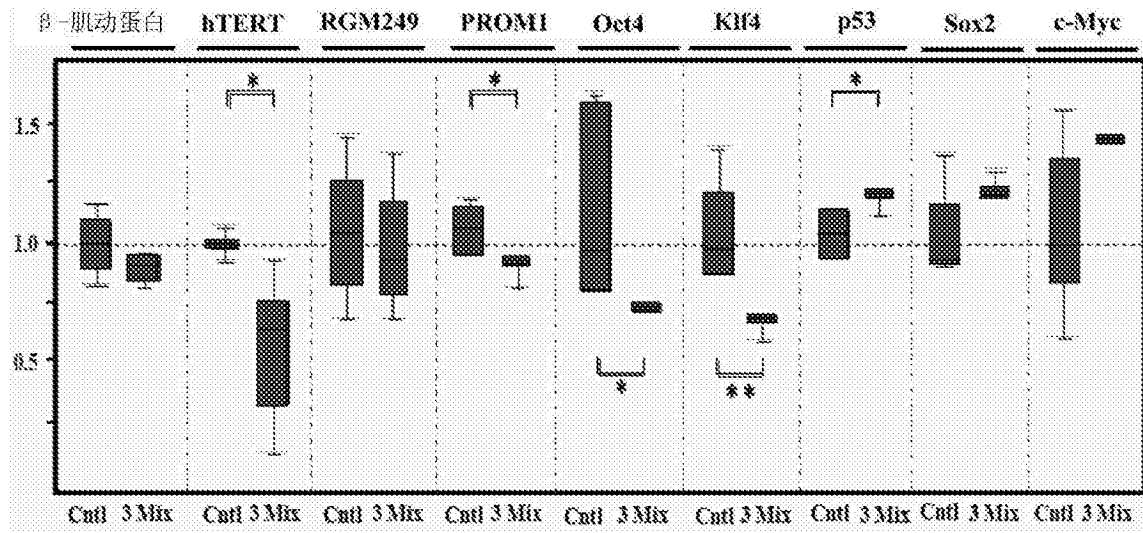
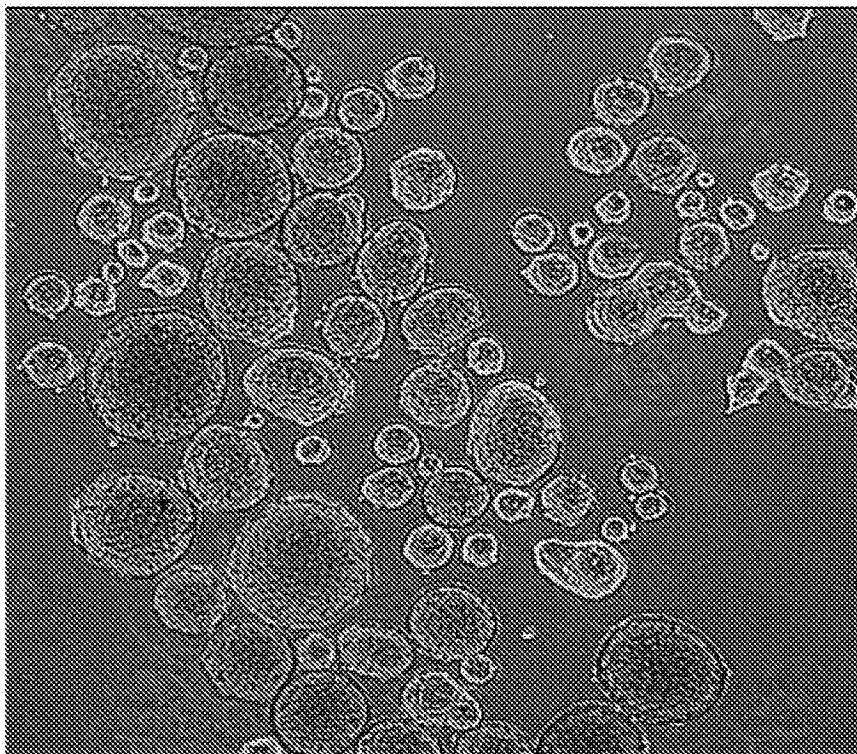


图5D

× 40



× 100

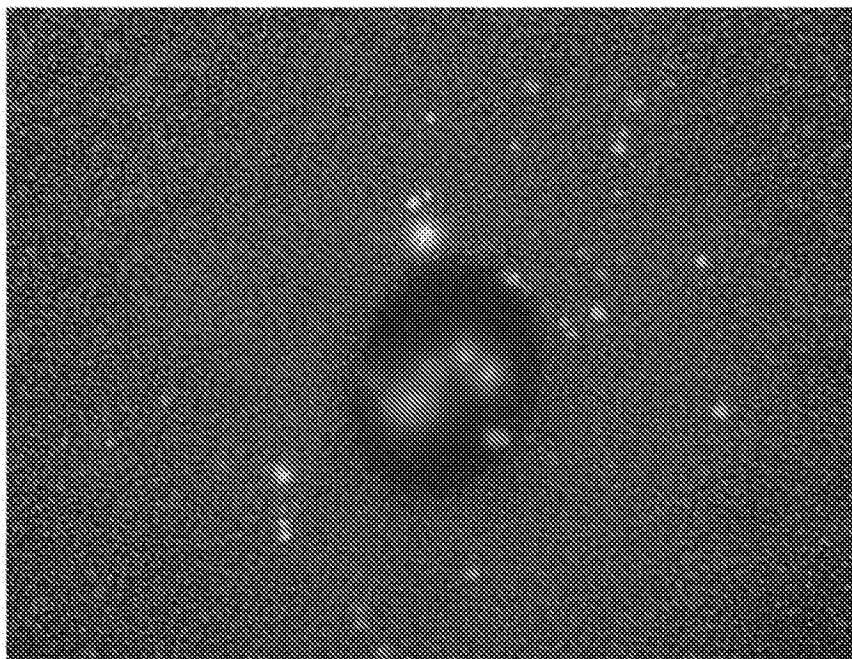


图6A

■ hsa-mir-520d的推测二级结构

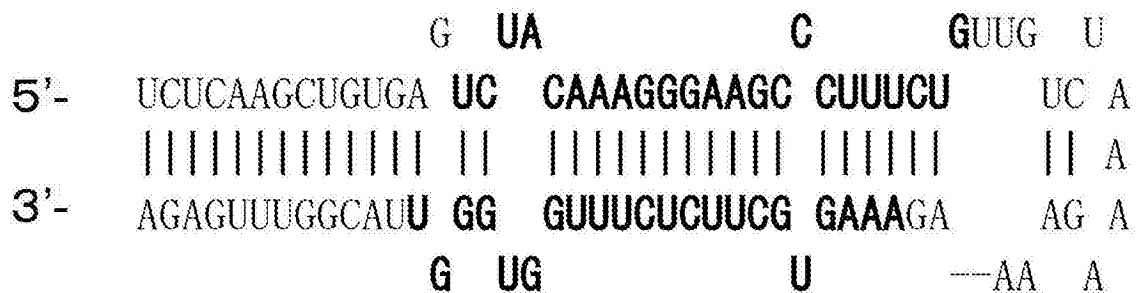


图6B

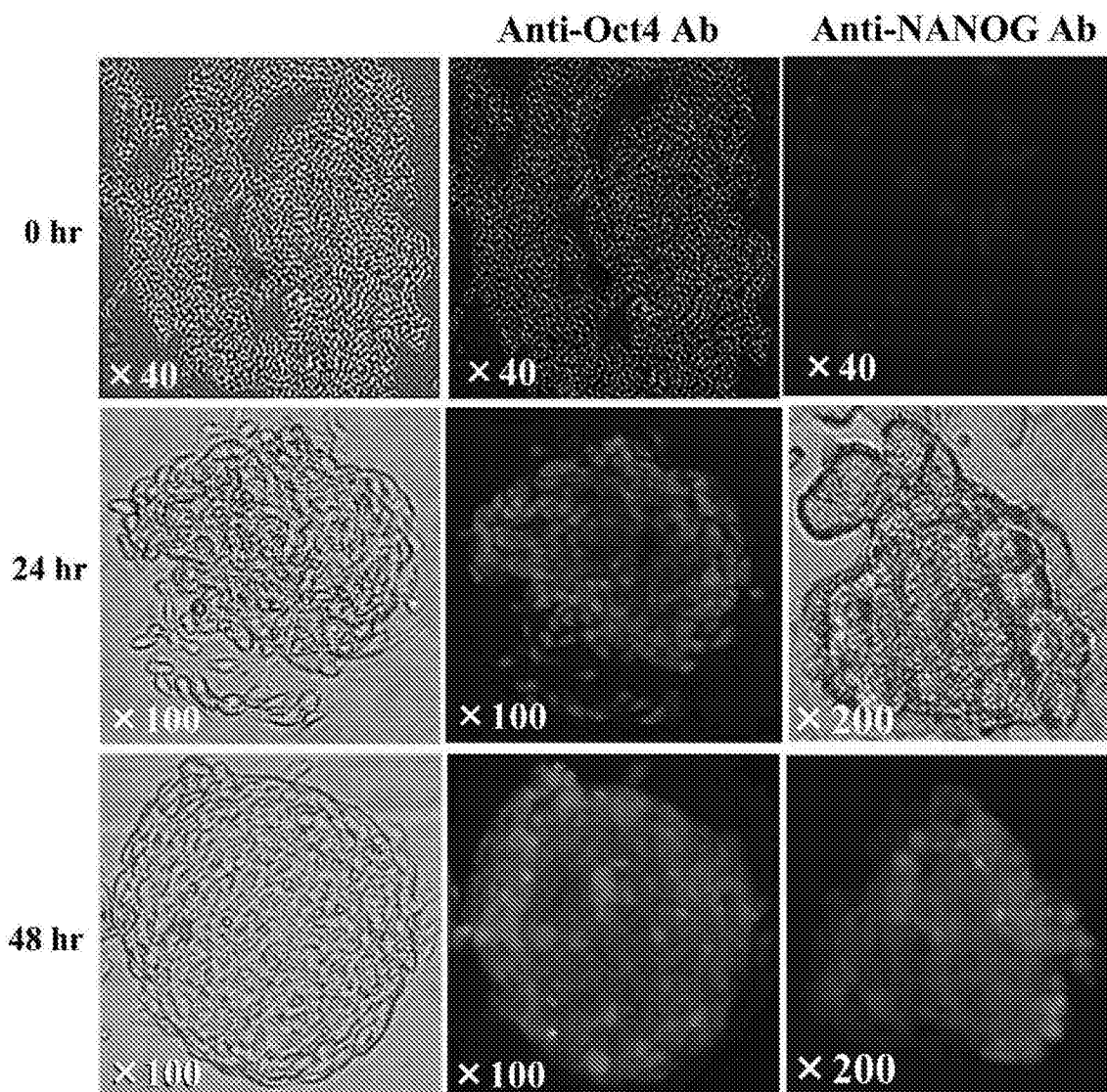


图6C

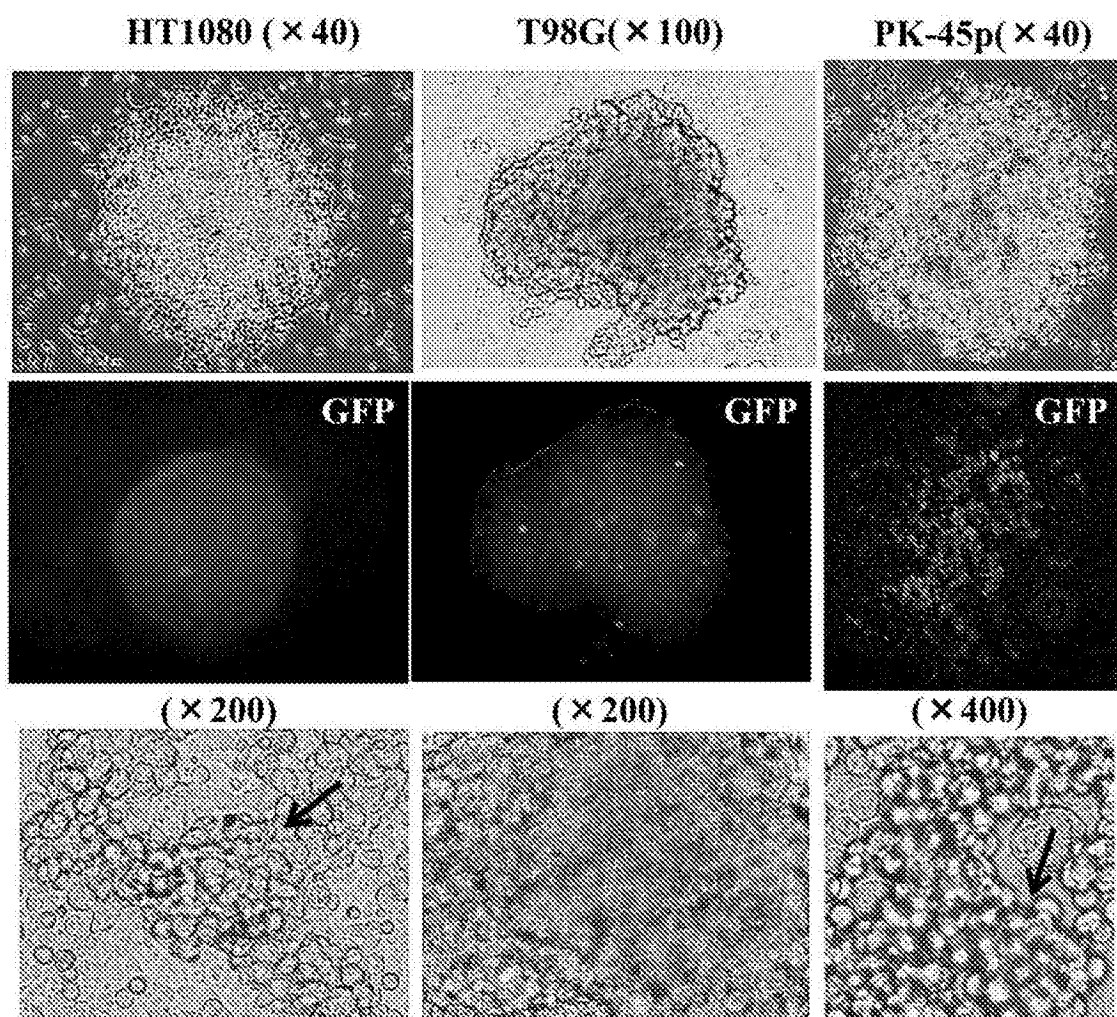


图6D

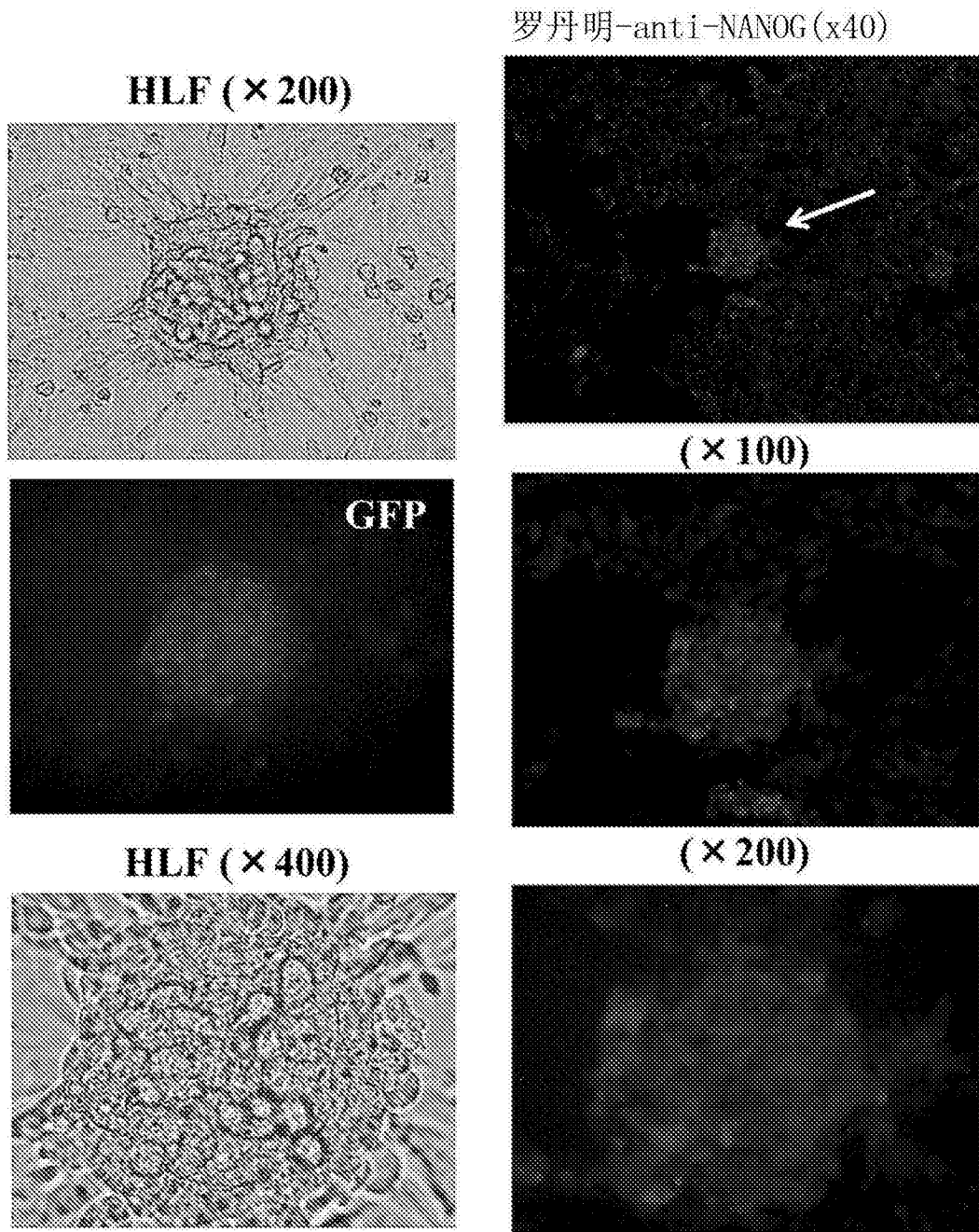


图6E

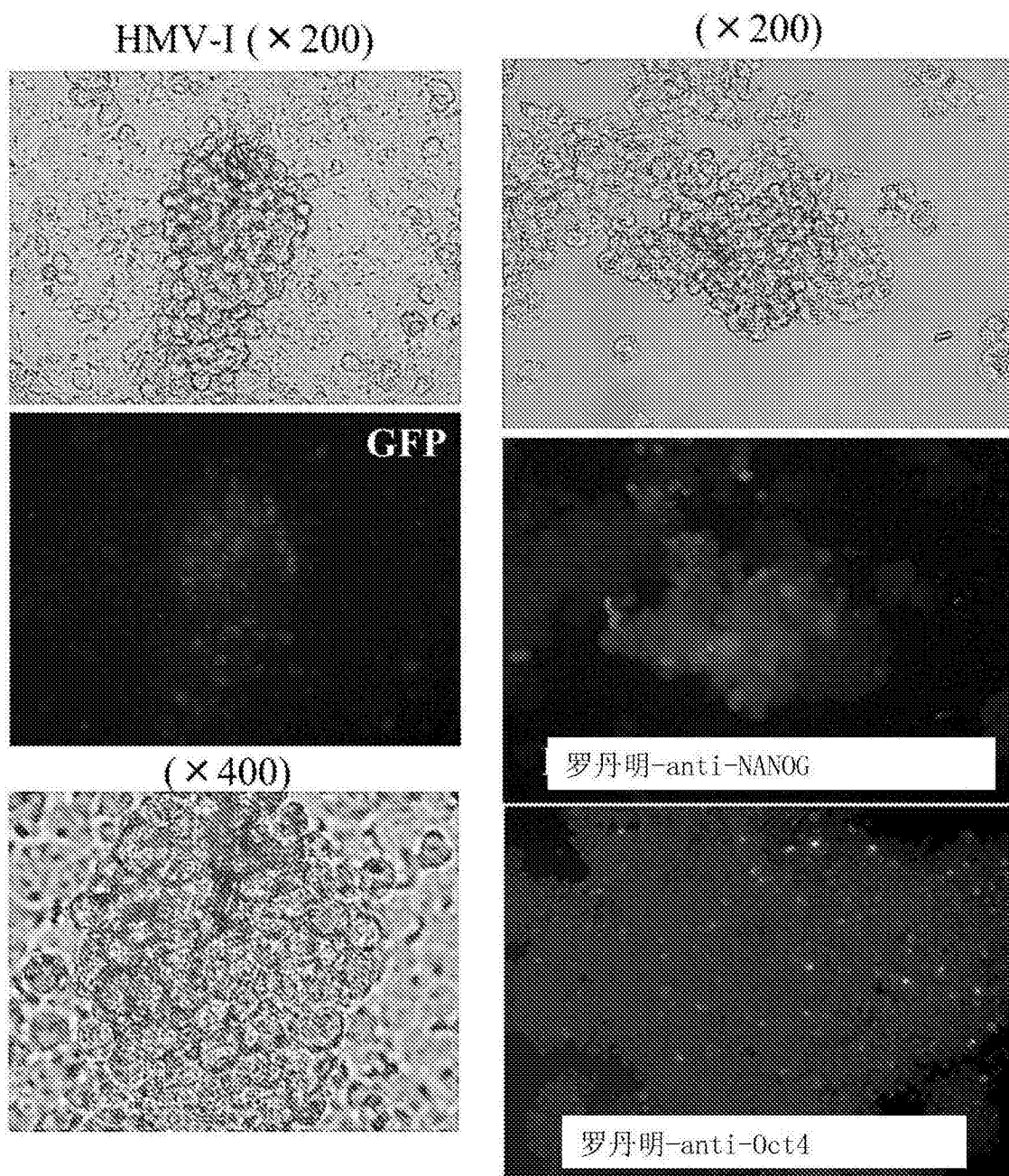


图6F

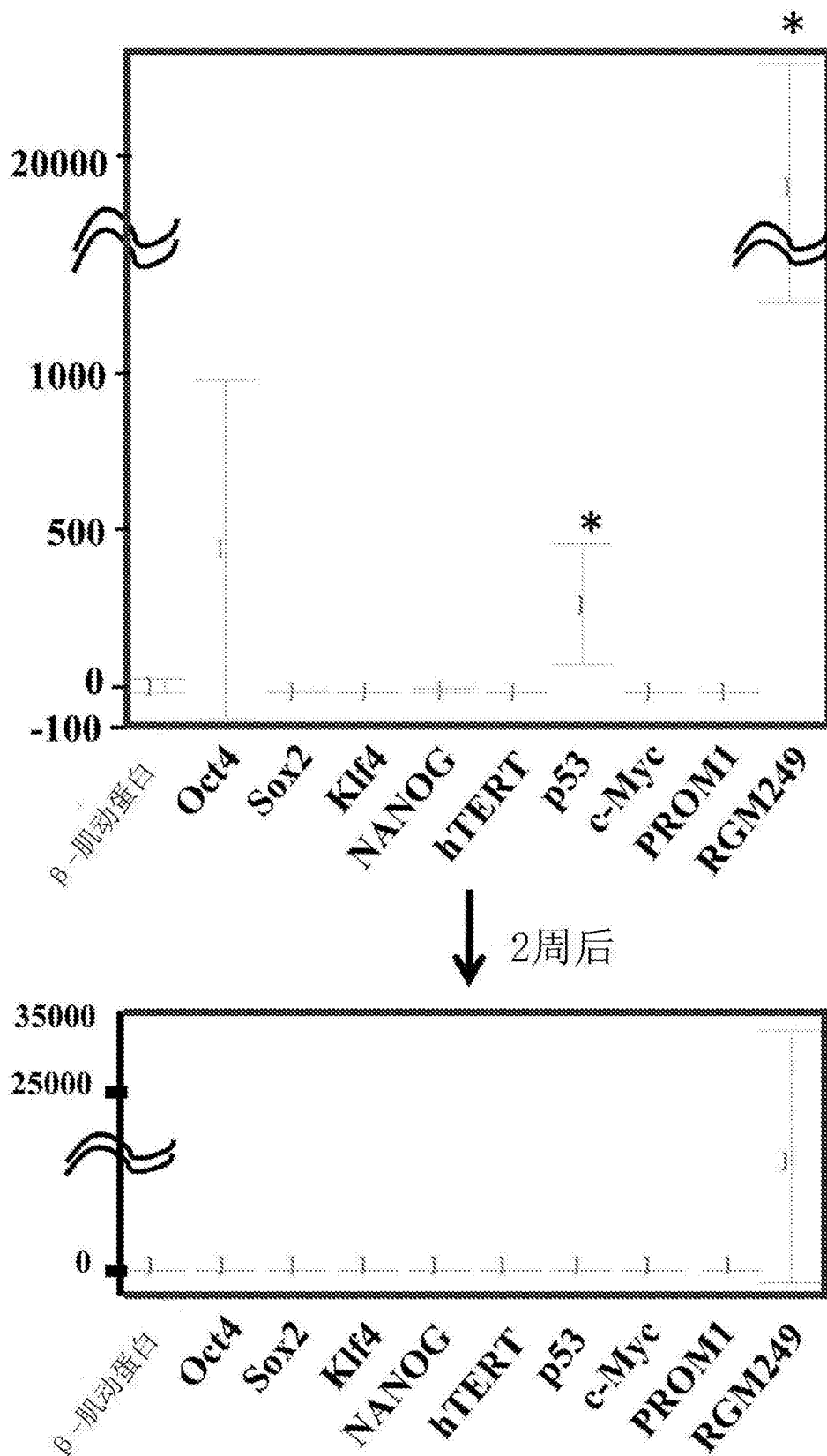


图7A

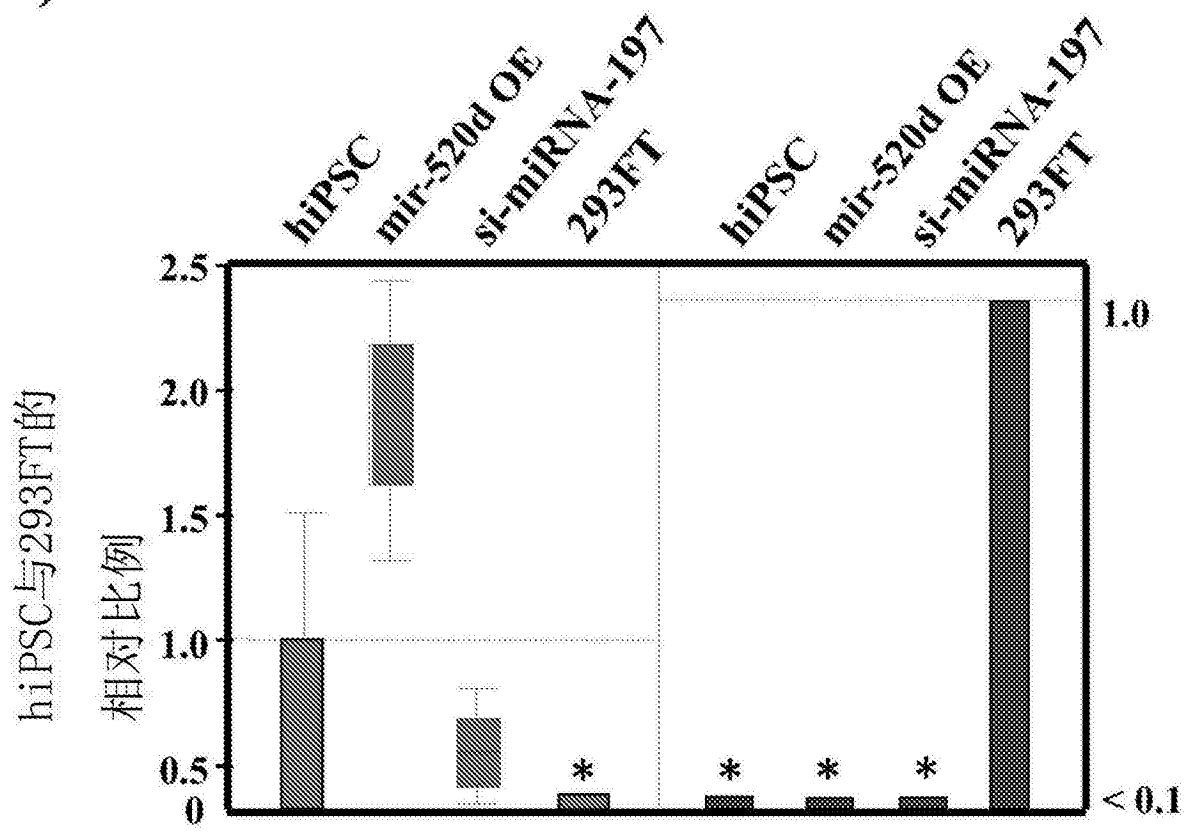
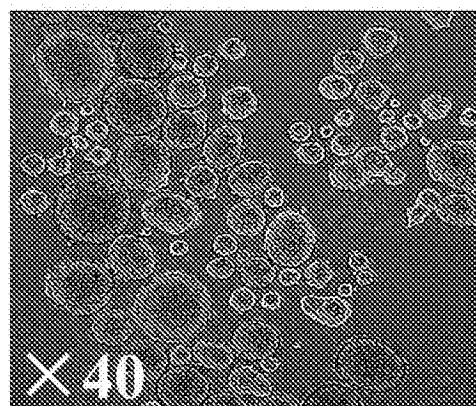


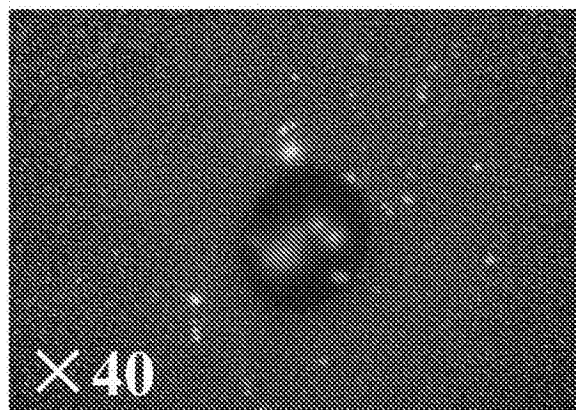
图7B

293FT细胞的形态变化

(a) 基因导入后



(b) GFP表达确认



(c) 增殖形态

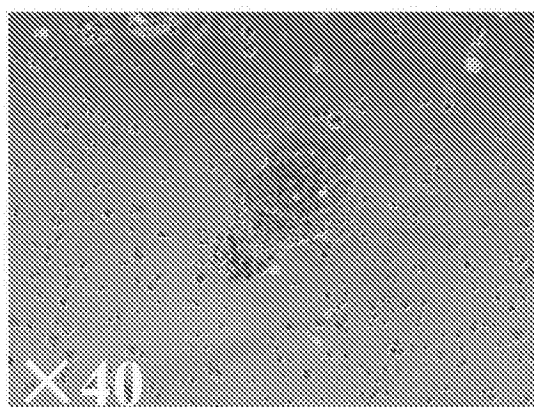


图8A

iPS样细胞的免疫染色：Oct4为强阳性

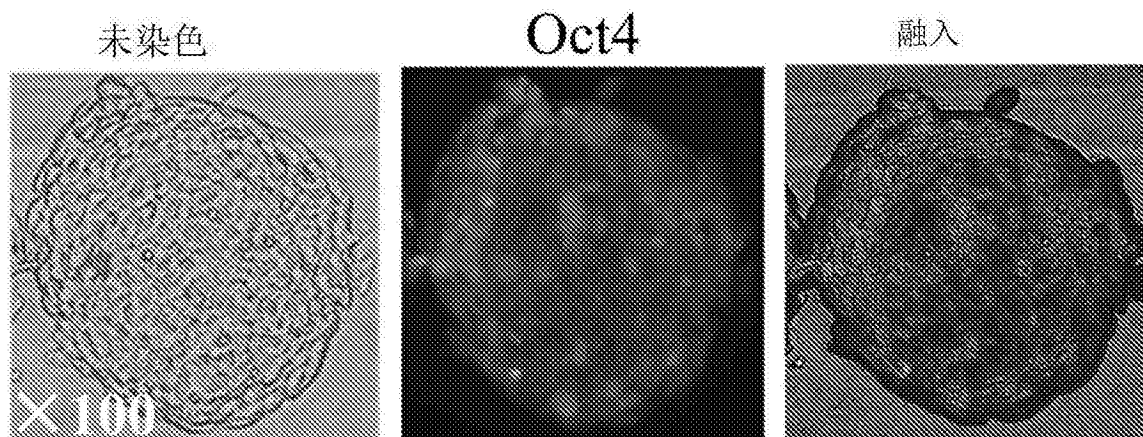


图8B

iPS样细胞中的GFP阳性并且NANOG免疫染色：NANOG为强阳性

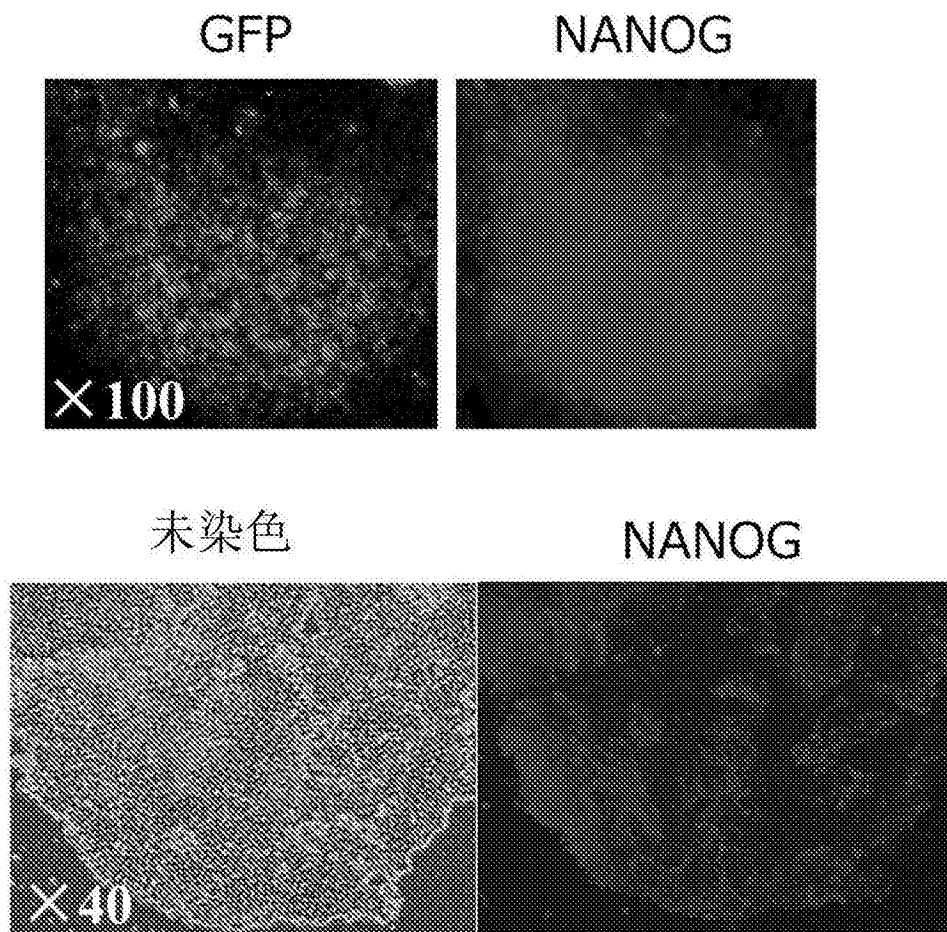
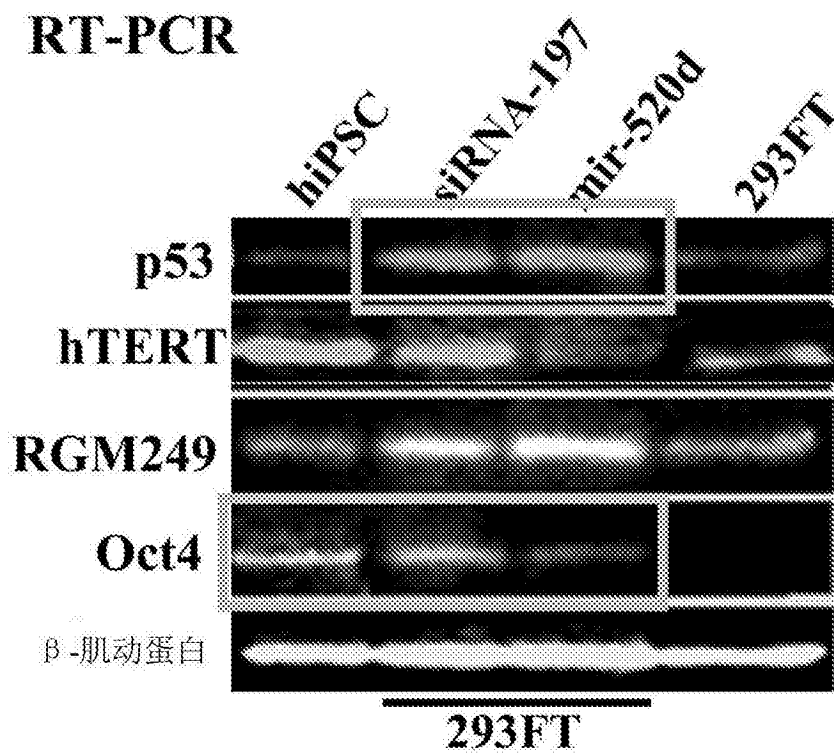


图8C



(与山中研究团队等的hiPSC的比较)

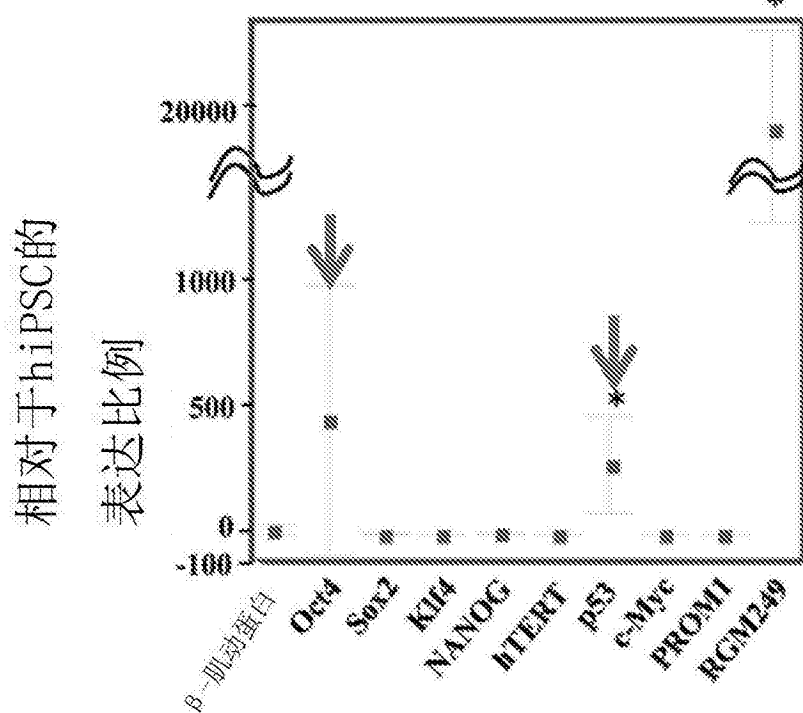


图9A

免疫印迹

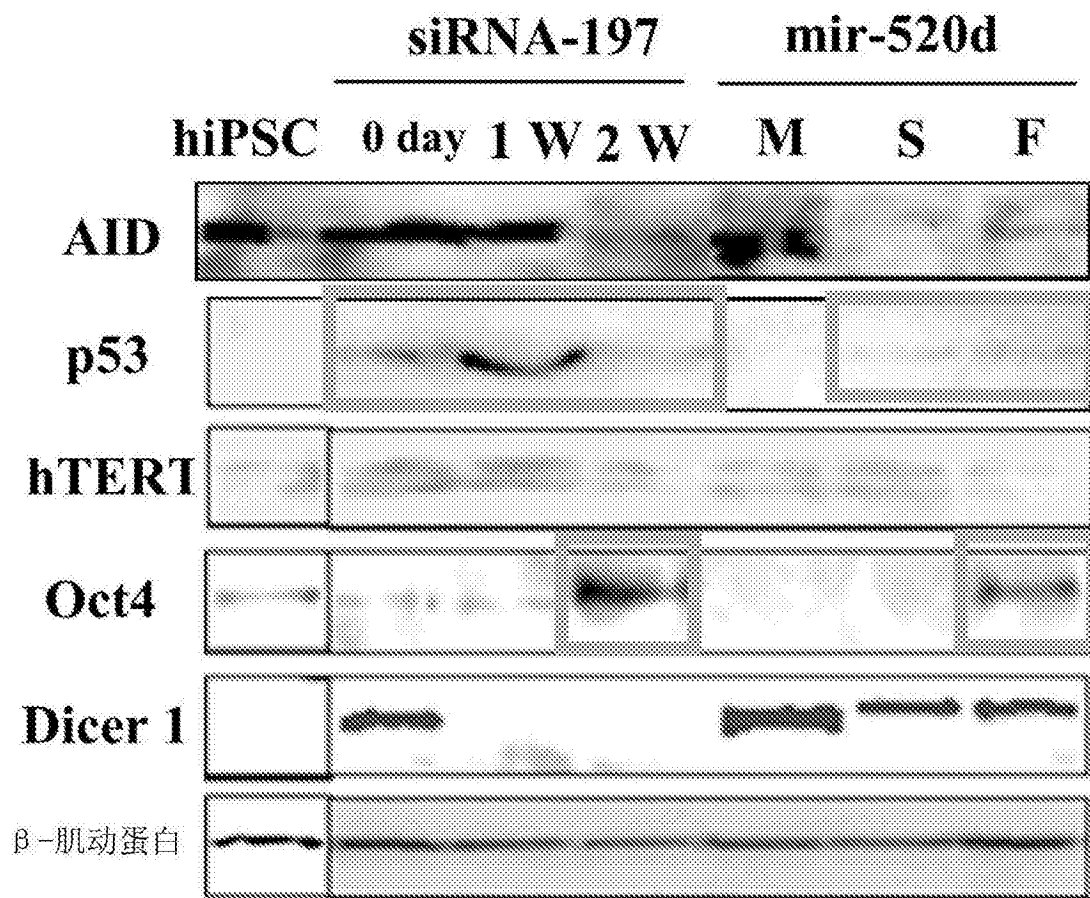


图9B

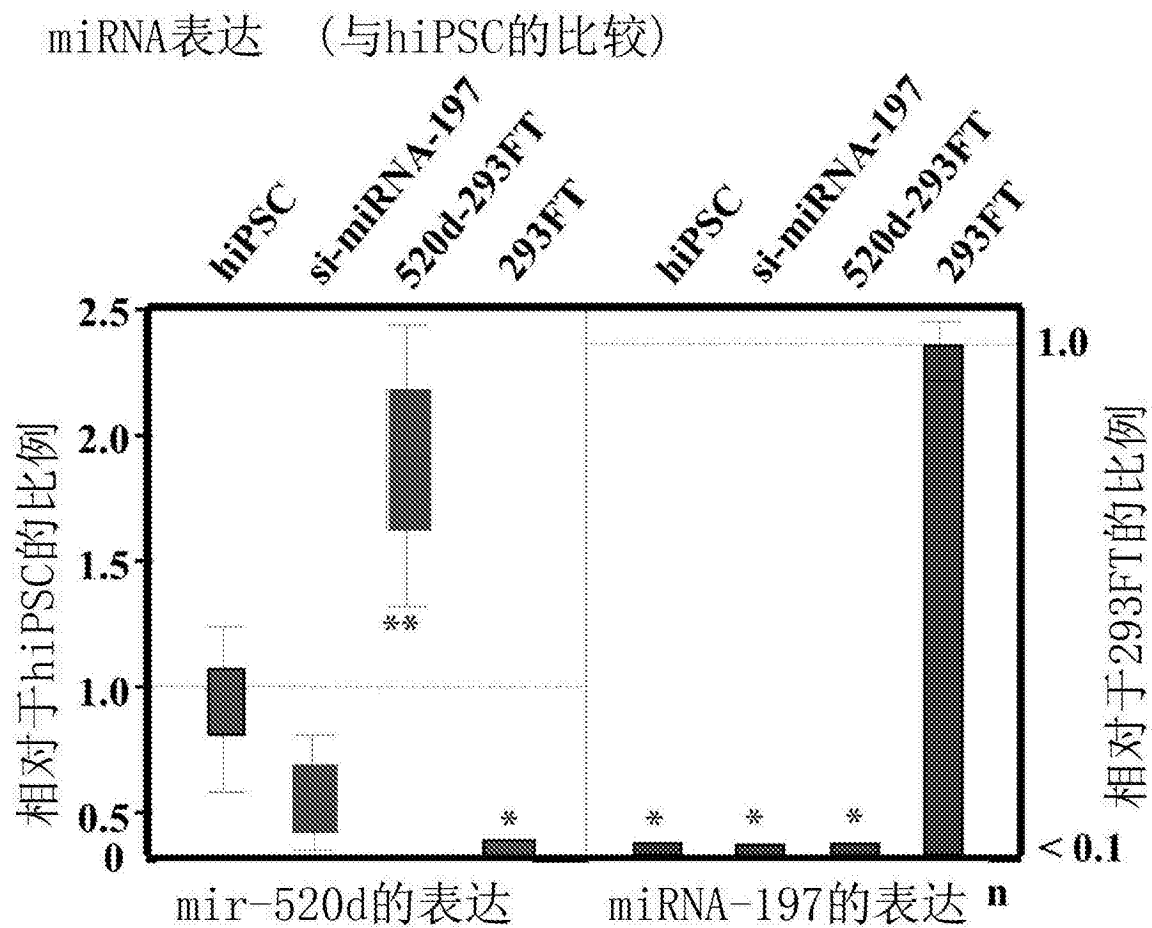


图9C

mir-520d的表达

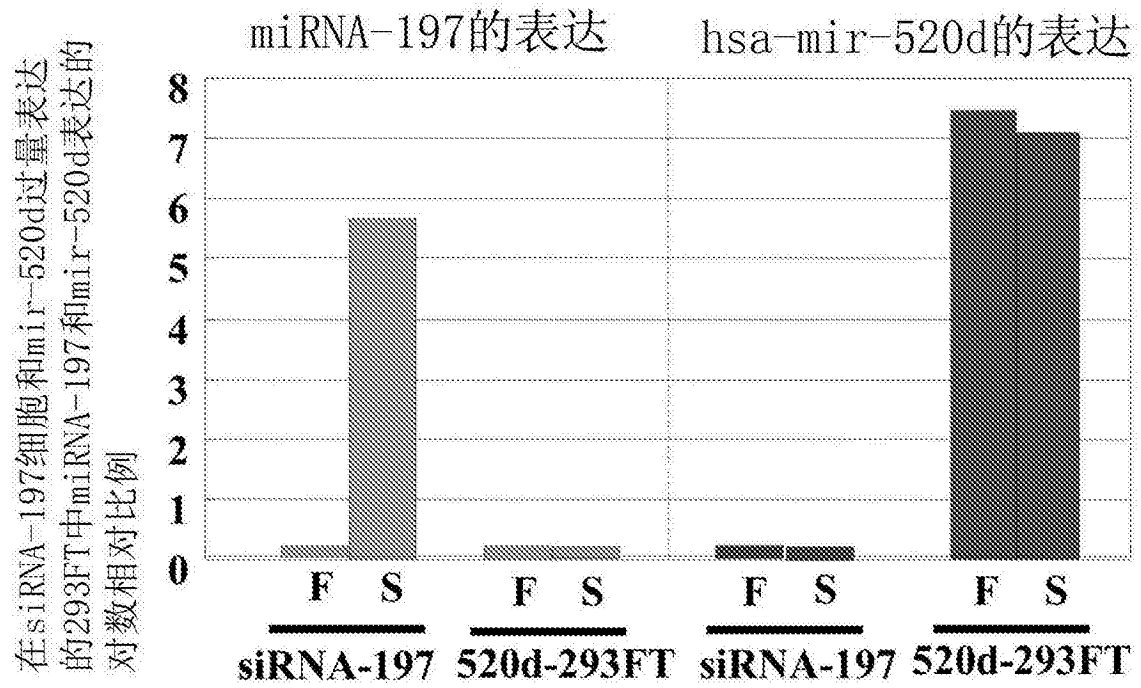


图9D

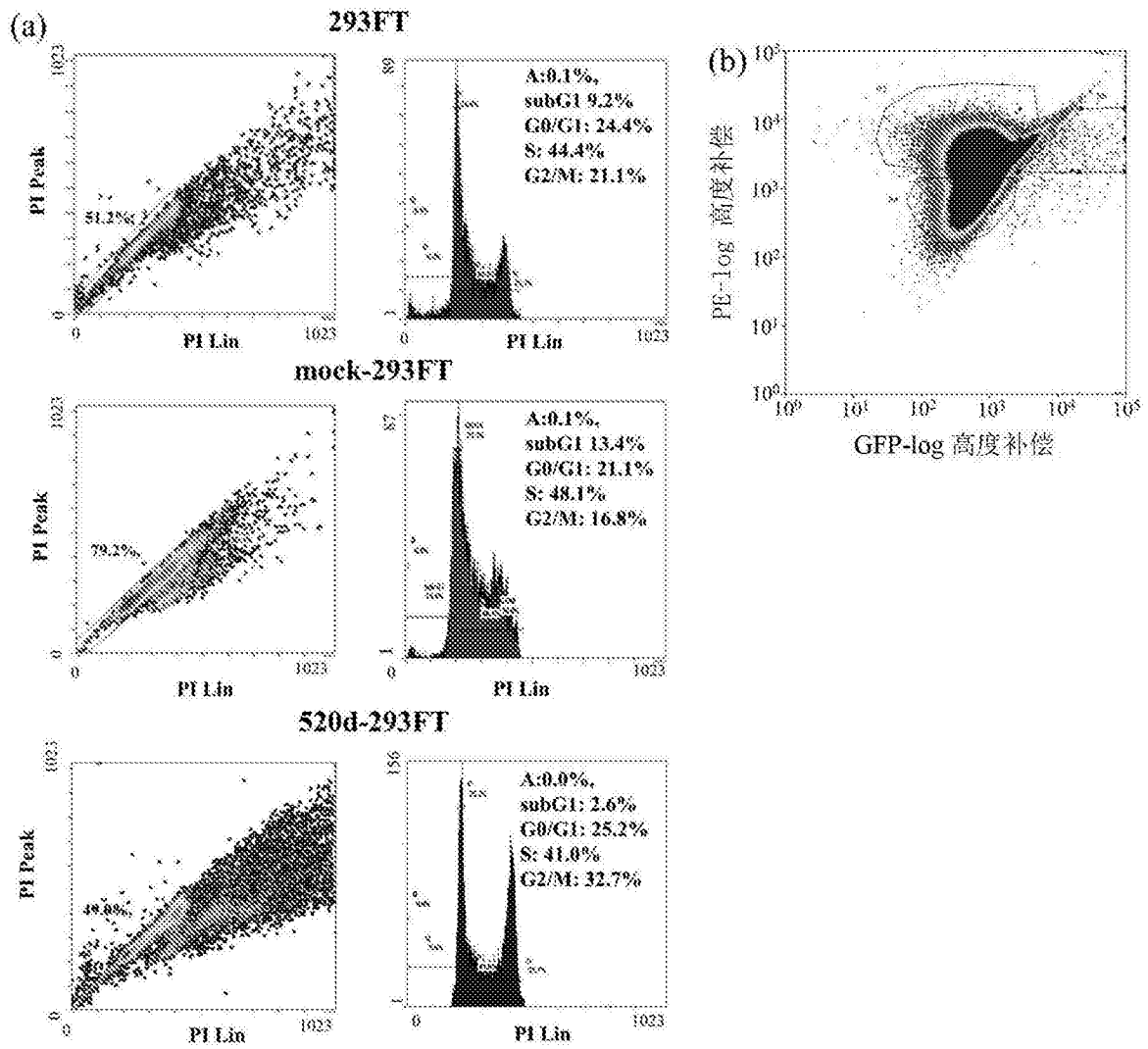


图10A

初期化水平的研究

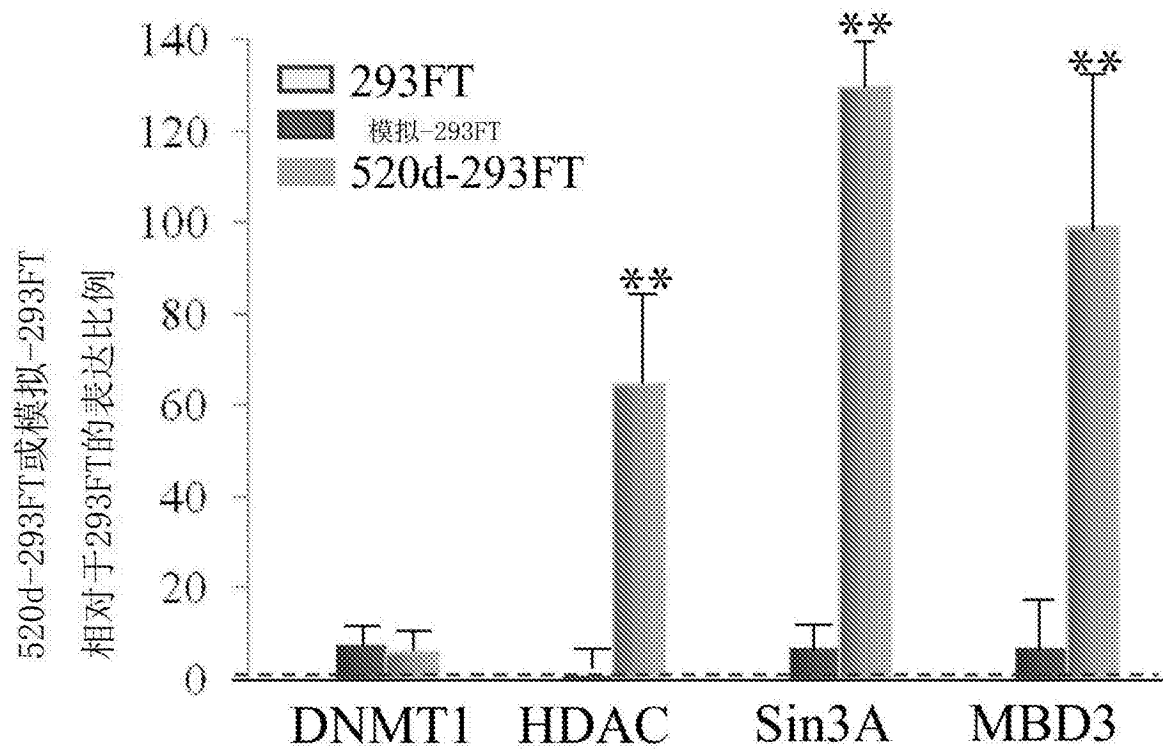


图10B

形态和向导入后的多能性标记阳性细胞的变化

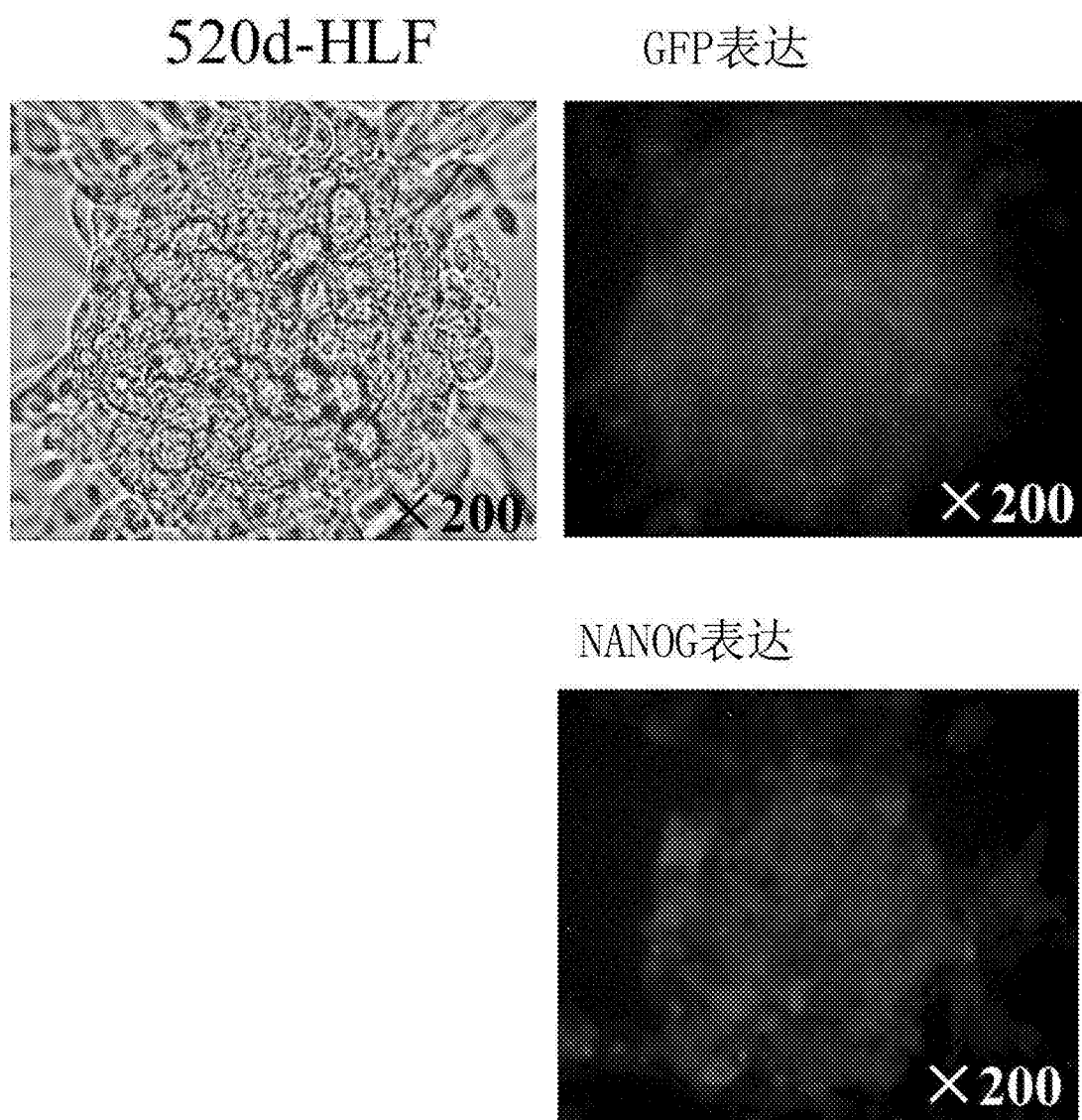


图11A

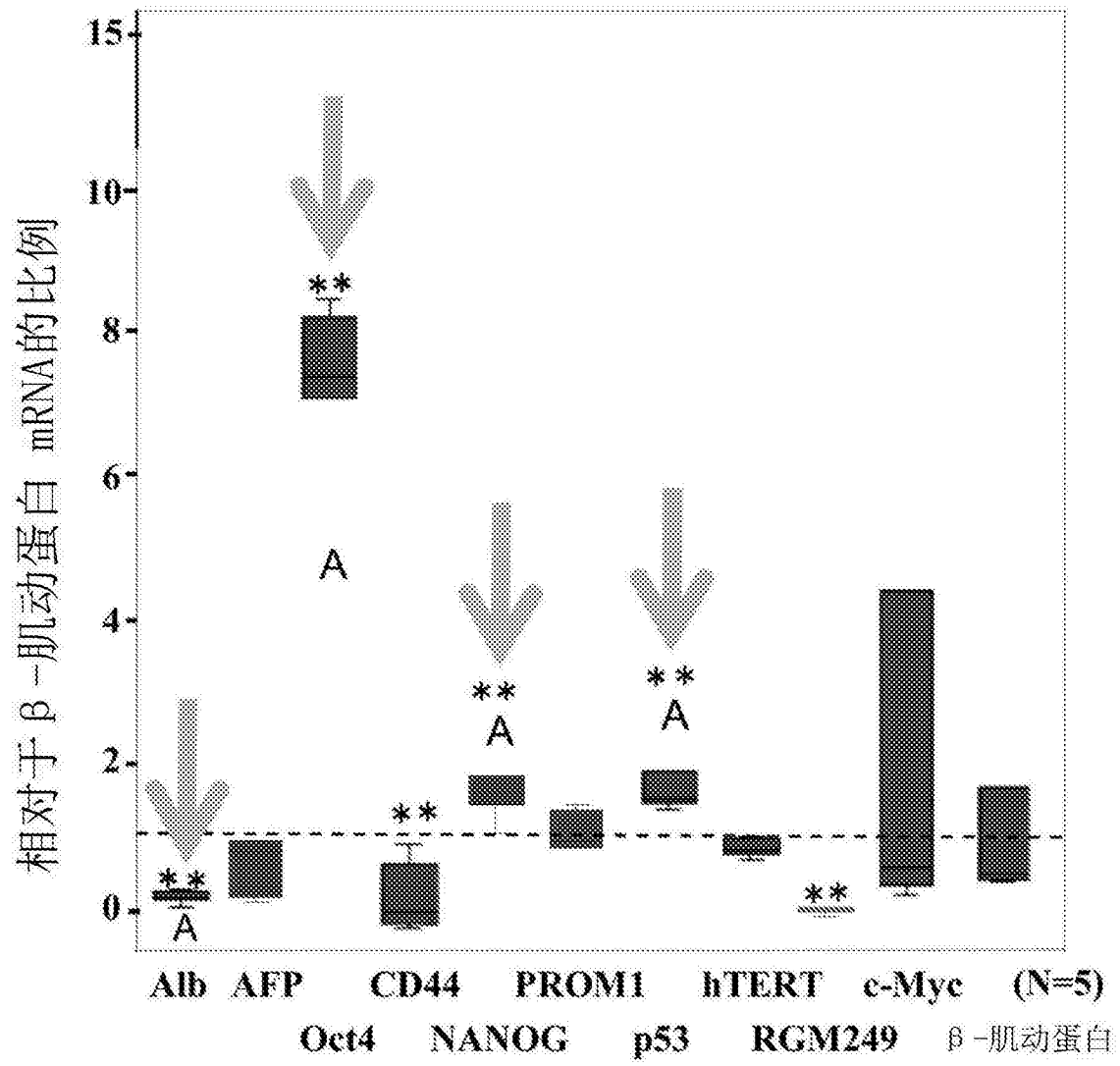
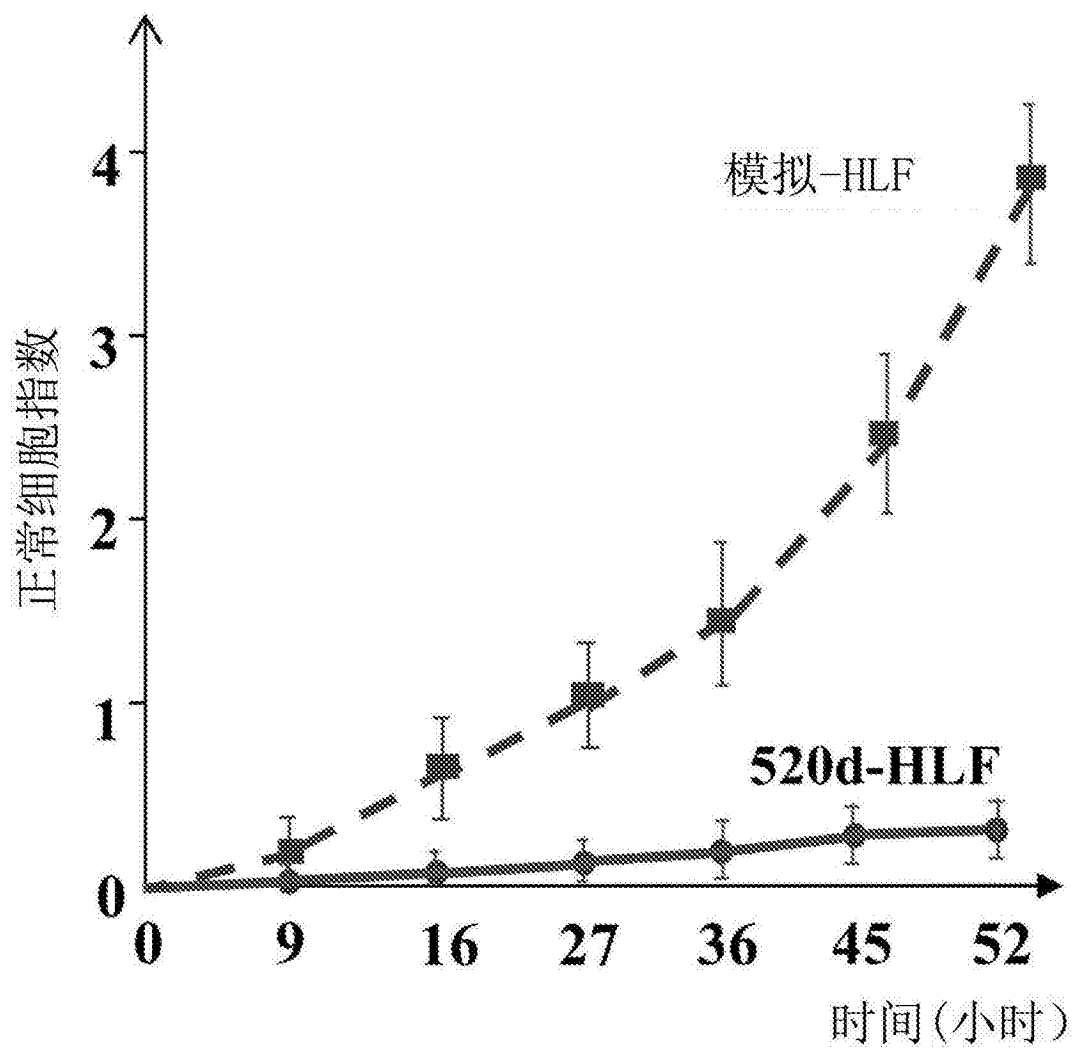


图11B

迁移试验



导入细胞失去浸润的性质

图11C

免疫印迹

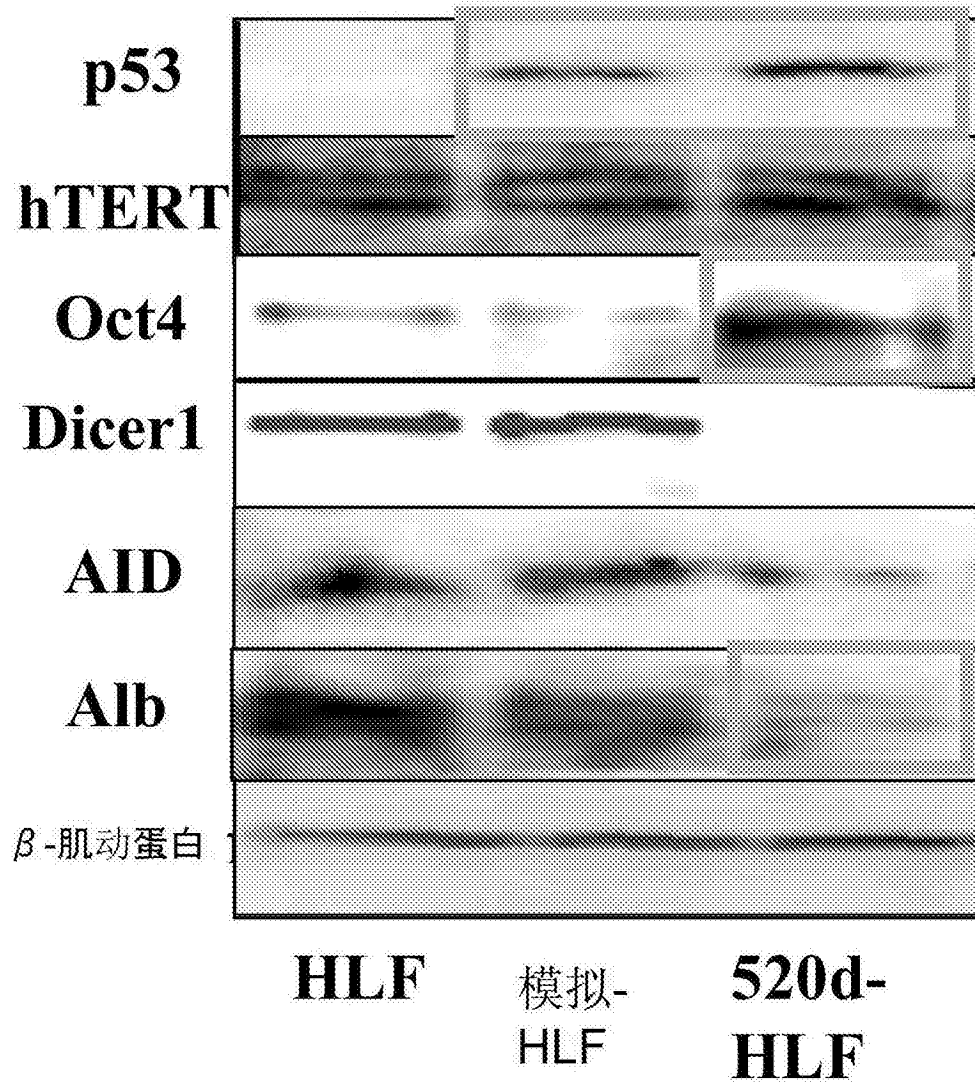
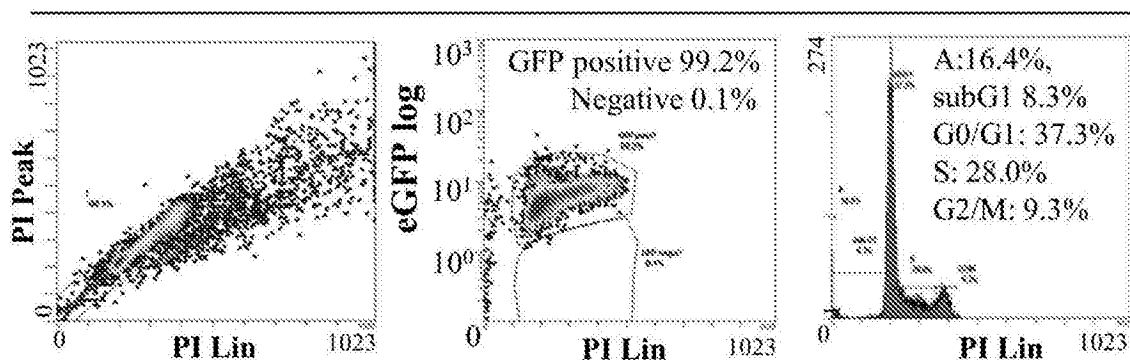


图11D

表示从包含凋亡细胞的杂细胞群体向具有一定规律增殖方向的细胞群体转化。

模拟-HLF



520d-HLF

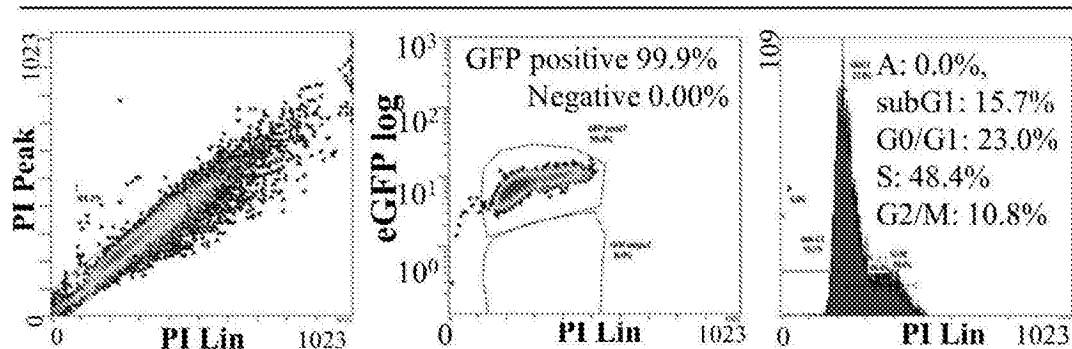
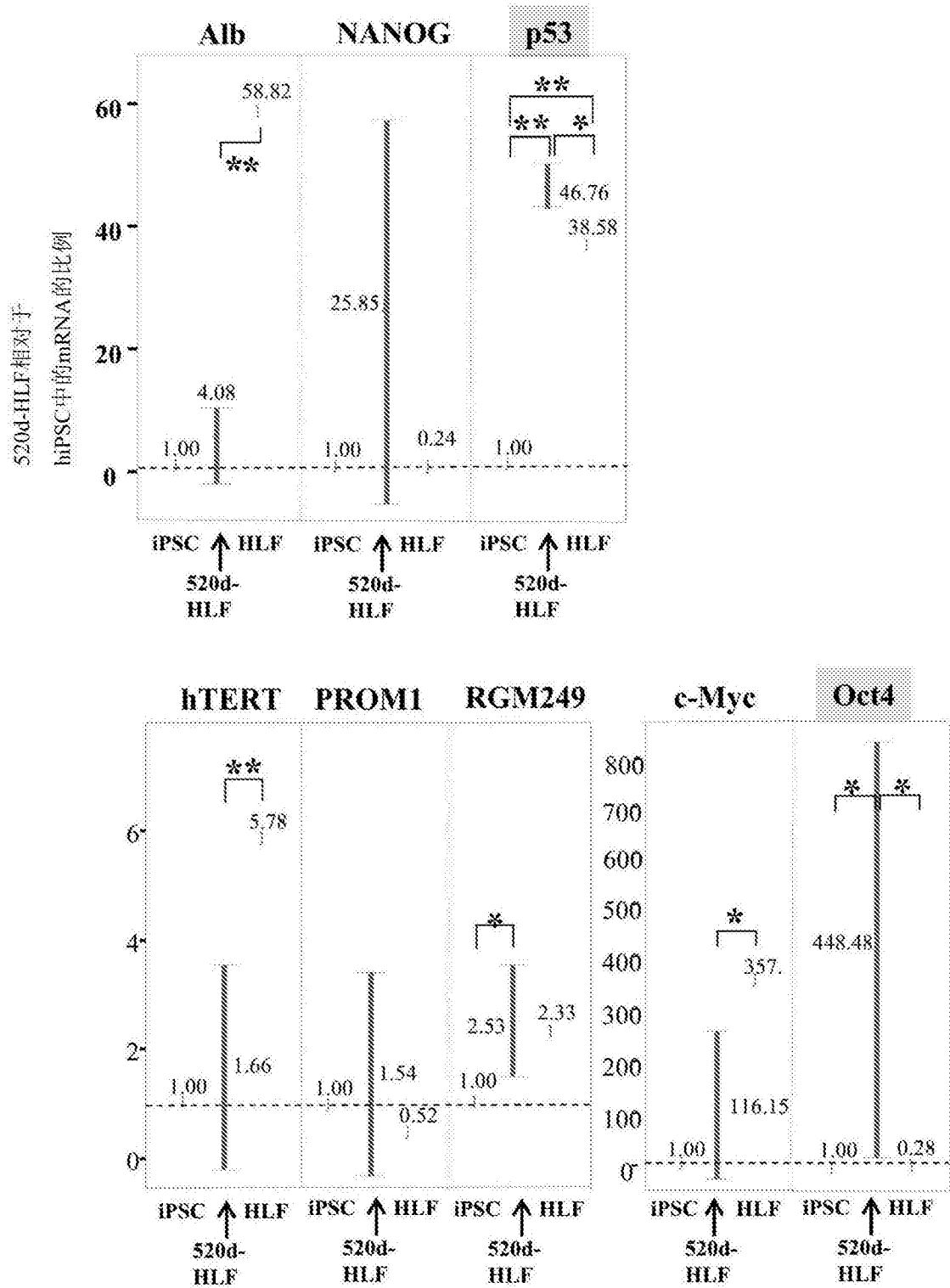


图12A



由肝癌细胞制作的干性化细胞与以往的iPS比较，
p53强阳性，Oct4强阳性。

图12B

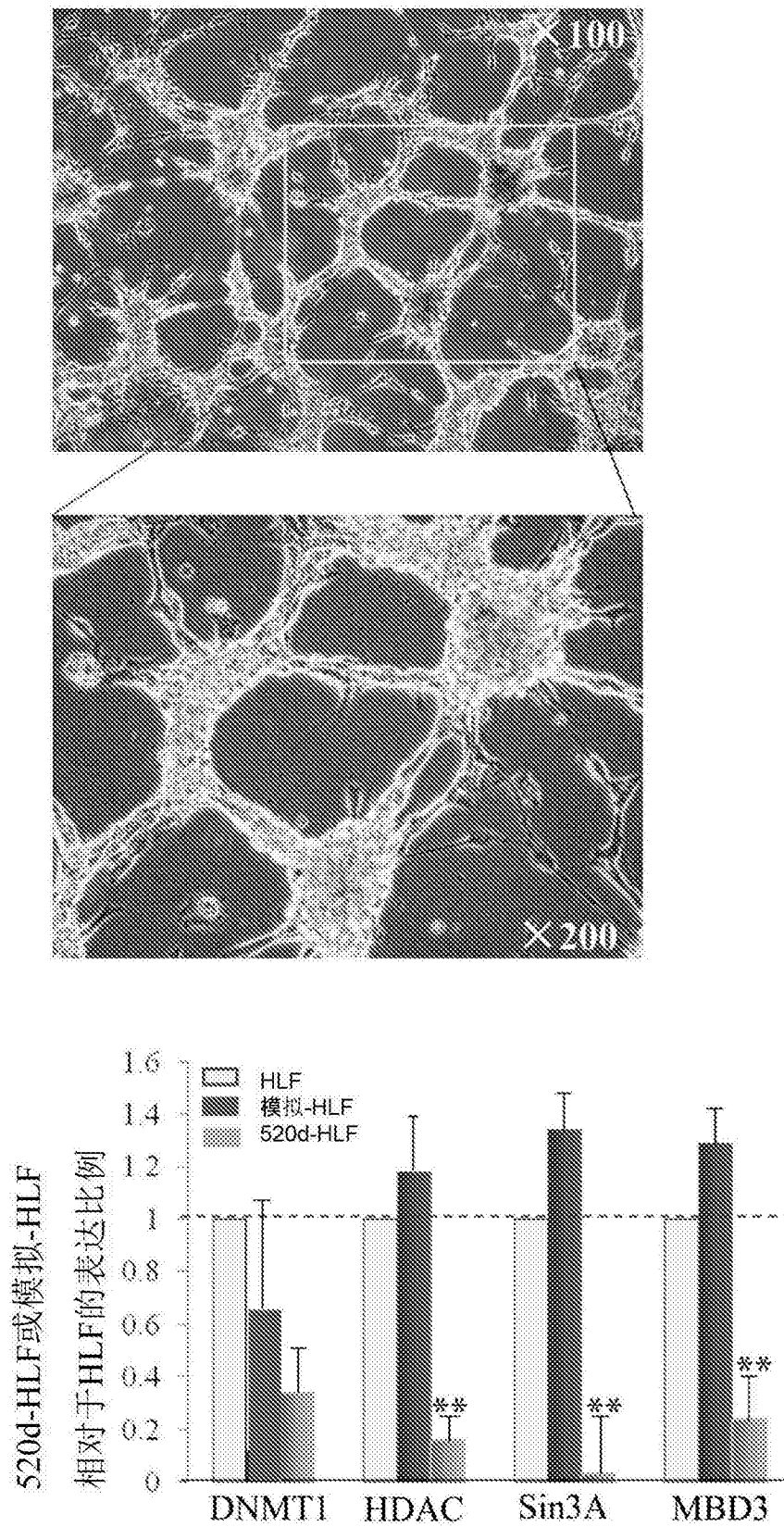


图13

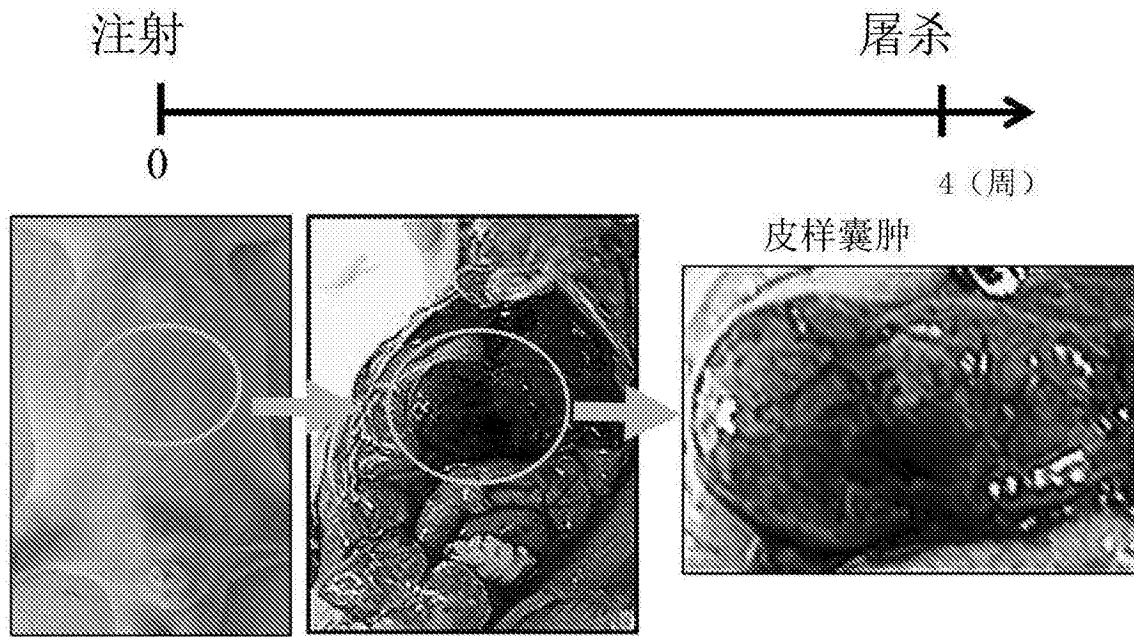
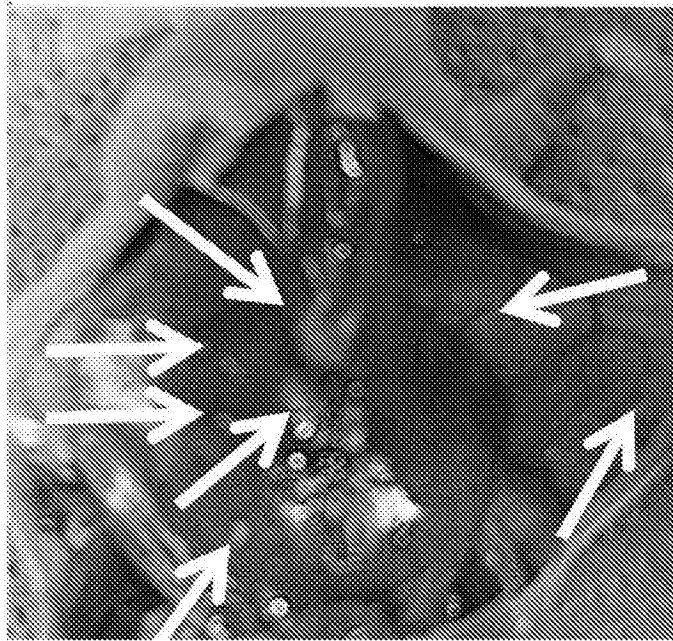


图14A



HE染色(x40)

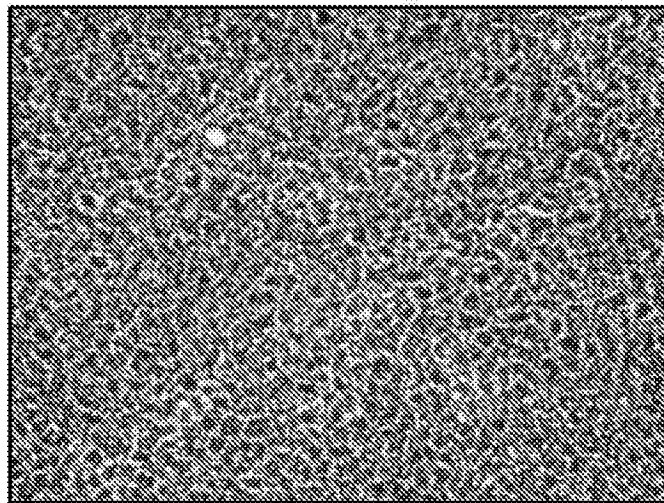


图14B

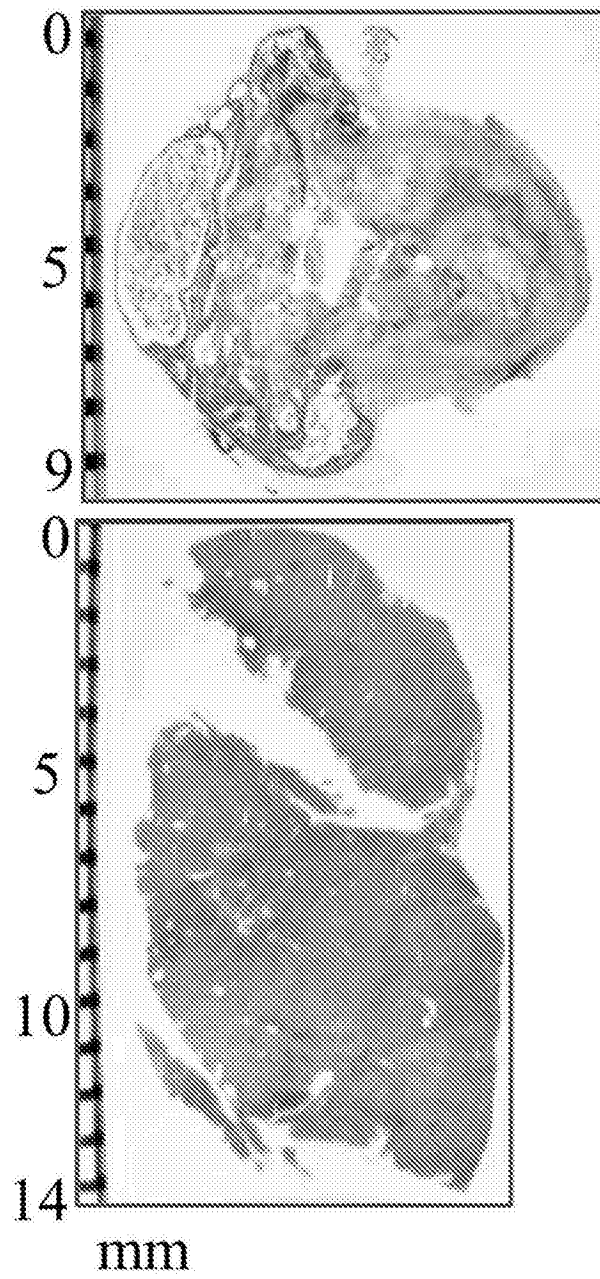
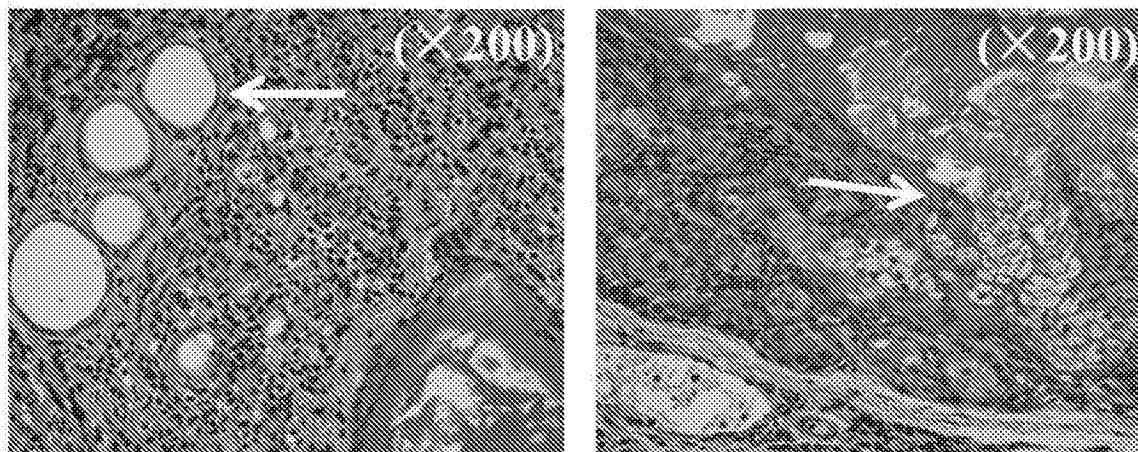


图14C

皮样囊肿



肝组织

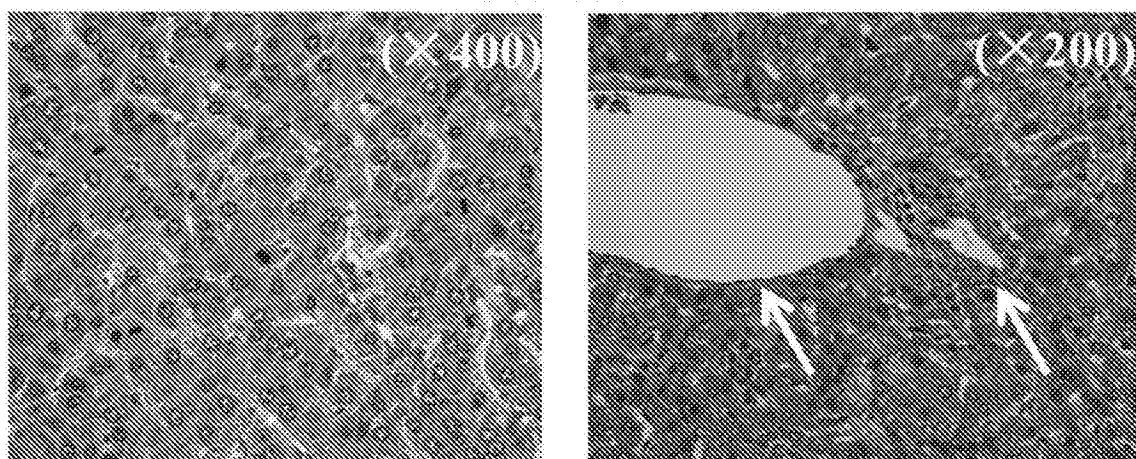
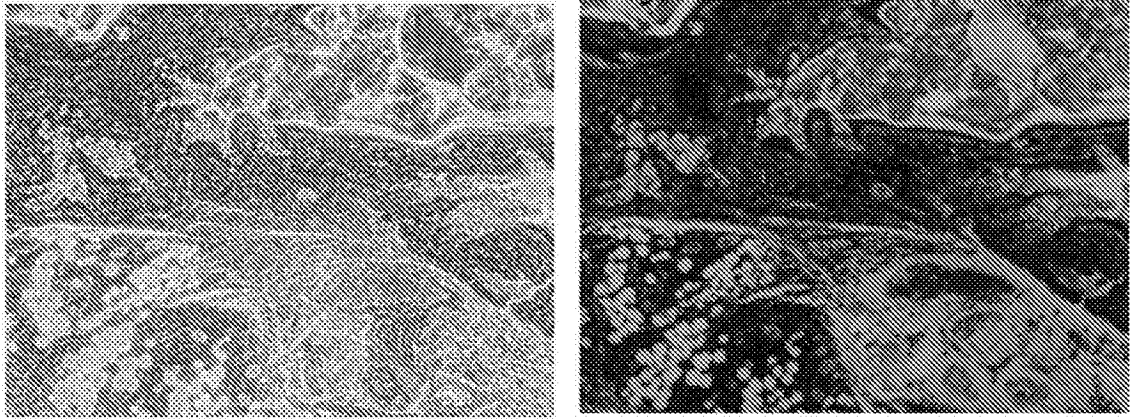


图14D

皮样囊肿



肝组织

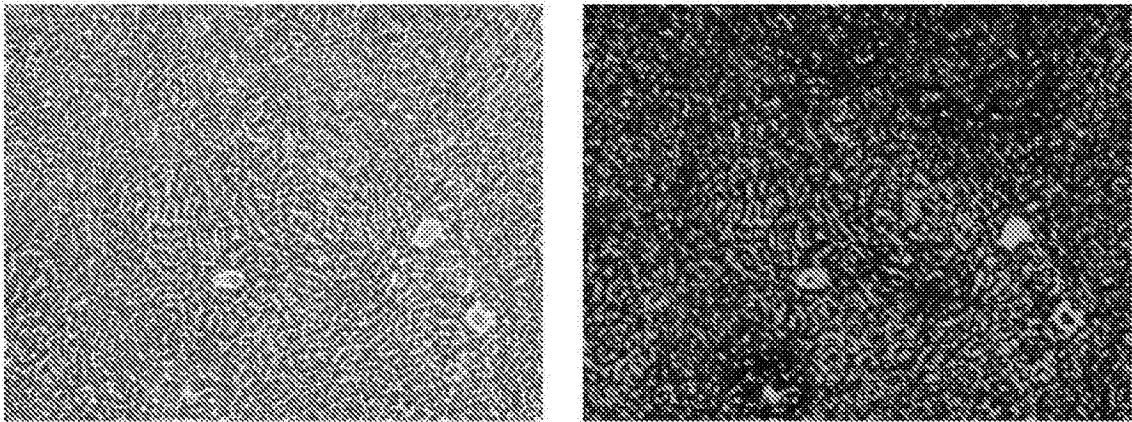
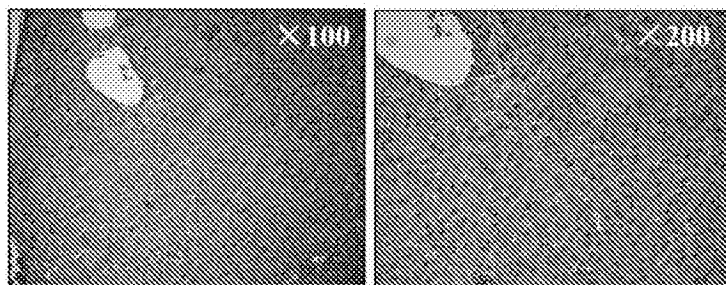


图14E

在xerograft模型中由520d-HLF细胞产生的肝组织的免疫组织化学分析

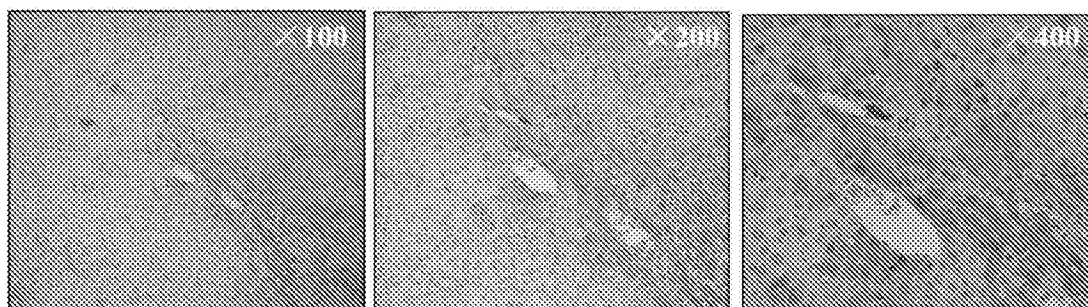
(a) 抗hAlb抗体



(a) 在xerograft模型中由520d-HLF细胞产生的肝组织的肝细胞中人白蛋白表达强。(b-c) 在肝细胞和星形细胞的细胞质中人AFP或GFAP表达弱。由于能够观察到血管病变中的交叉反应，因此，在人蛋白质中细胞质信号是特异性的。

(b) 抗hAFP抗体

肝细胞的胚胎标记



(c) 抗hGFAP抗体

肝细胞的胚胎标记

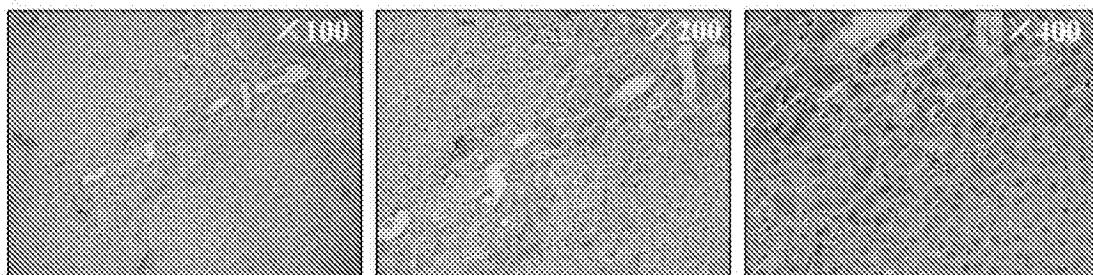


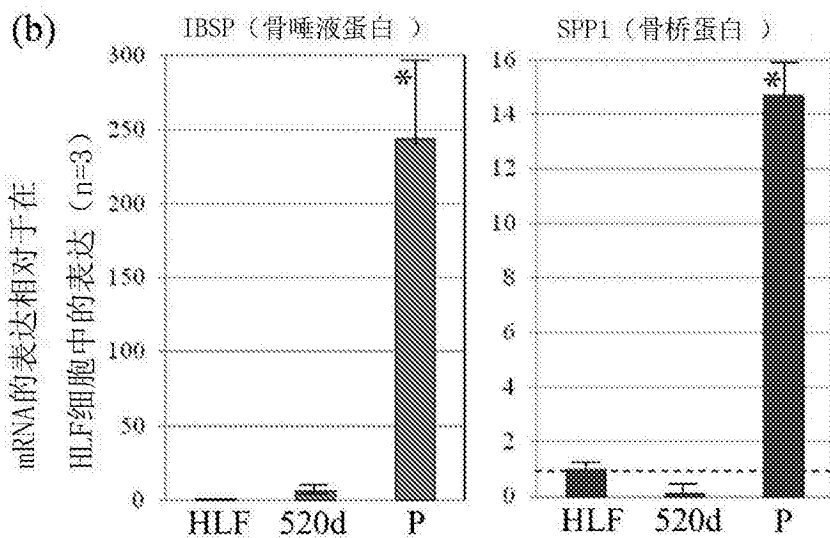
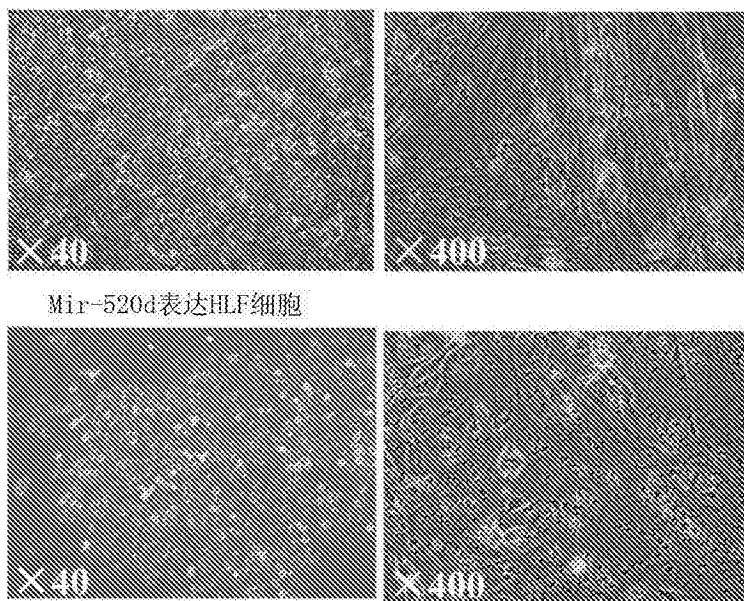
图15

从520d-HLF细胞向造骨细胞 的分化诱导

在 (a) 形态上和 (b) 转录上诱导
从520d-HLF细胞向造骨细胞的分化

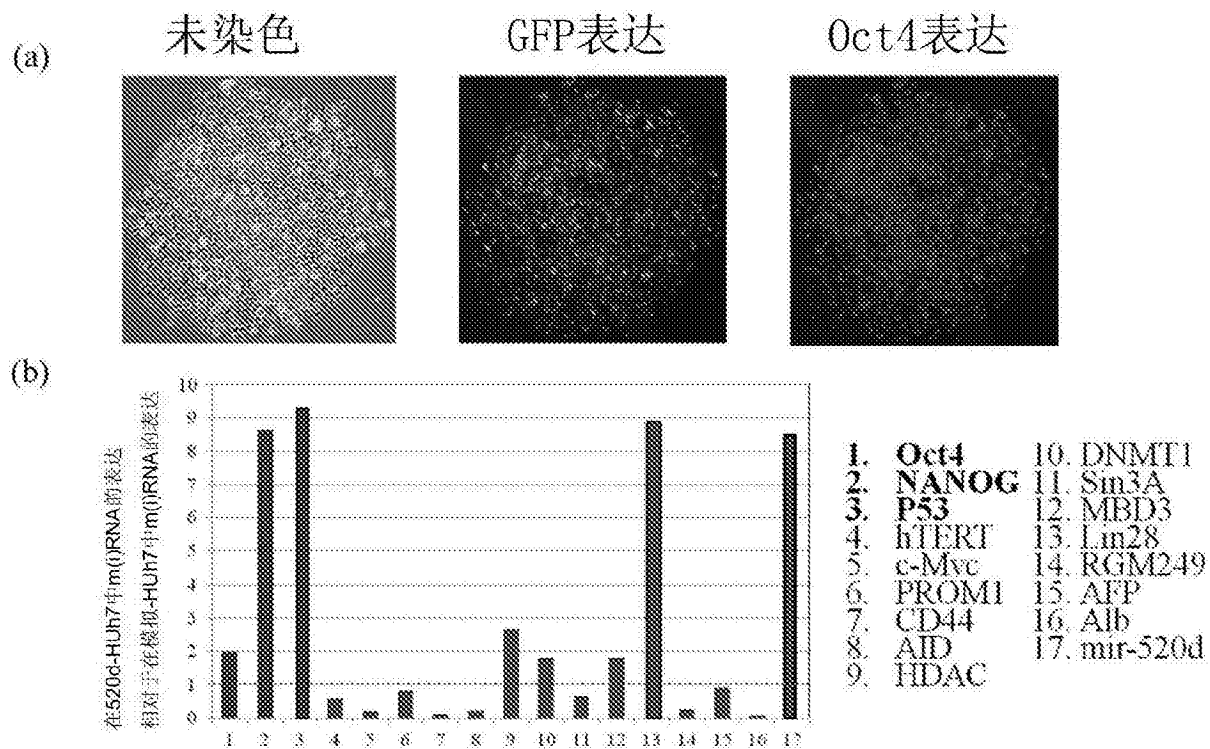
(a) Mir-520d表达HLF细胞

(用2 μ M的Purmorphamine处理一周)



520d: 520d-HLF, P: Purmorphamine-treated 520d-HLF, *:P<0.01

图16



(a) 在高度分化的肝癌细胞株(Huh7)中通过mir-520d多能性的诱导。在12天内总共1500000份病毒转录后, 出现由小且圆的细胞构成的群落(左)。通过与HLF中进行的免疫组织化学相同的方法确认GFP(中)和Oct4(右)表达。(b) 在Huh7中与520d表达一起检测平均基因表达(n=5)。多能性标记基因和p53被上调。Alb、c-Myc、AID和RGM249被下调。

图17

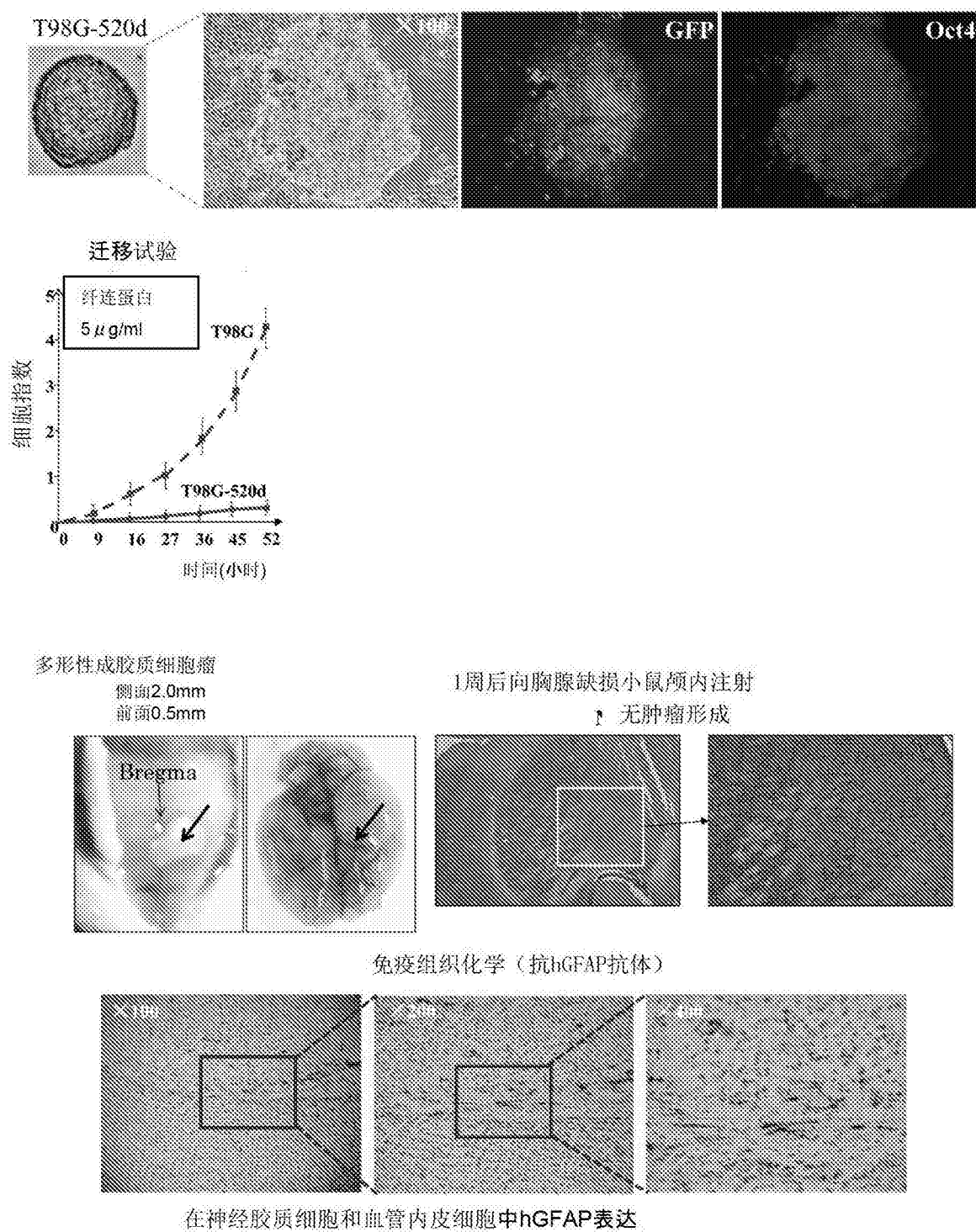


图18

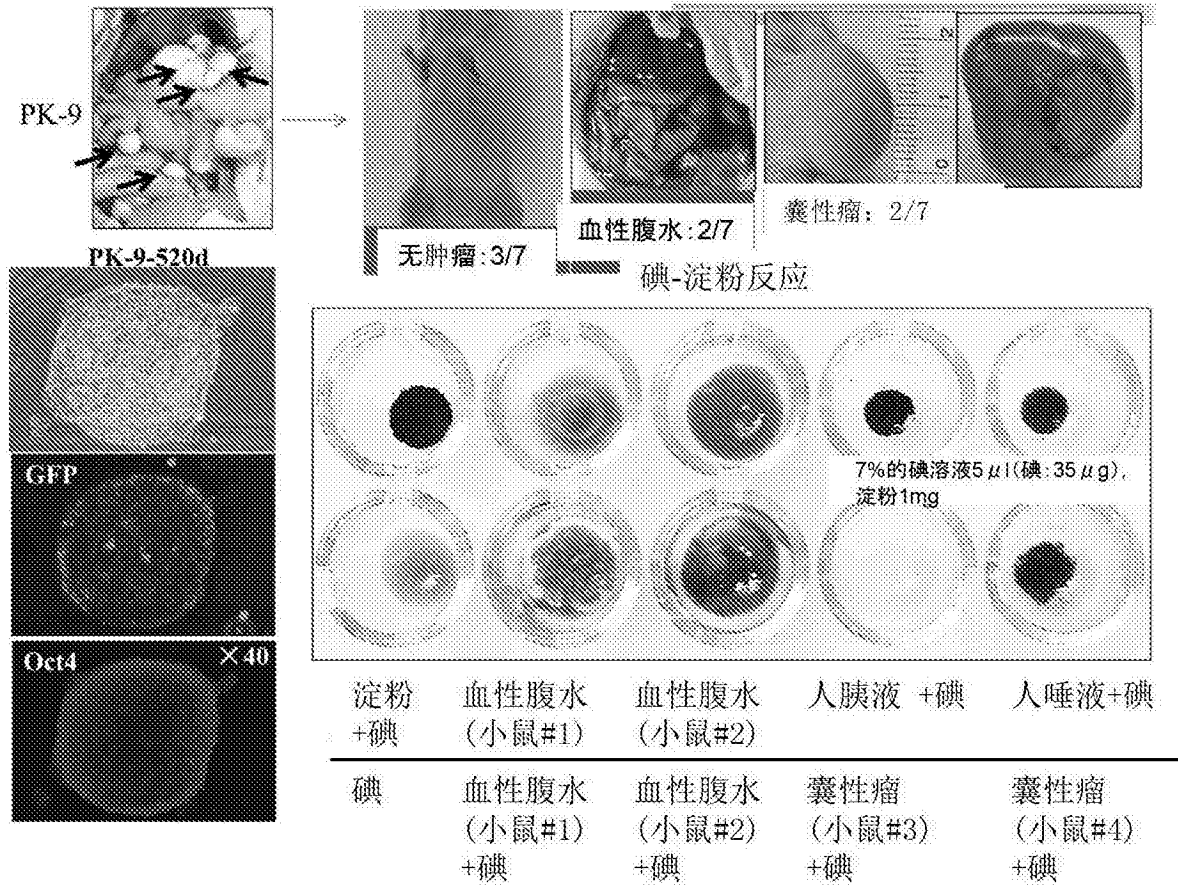
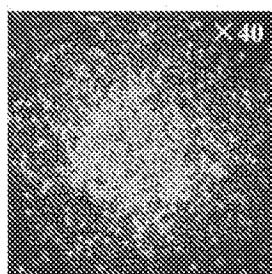


图19

纤维肉瘤

脂肪细胞的诱导



油红O染色 (+)
HT1080-520d

油红O染色 (-)
HT1080-520d

1周后
Triglytazone (-)

1周后
Triglytazone (+)

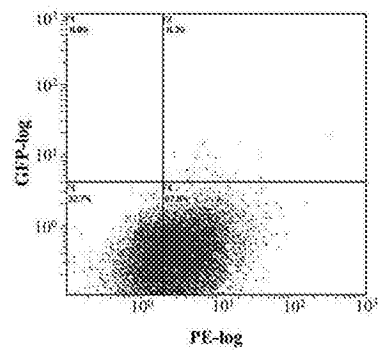
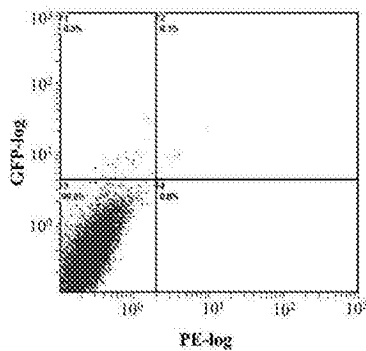
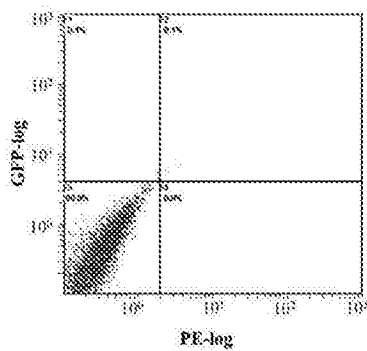
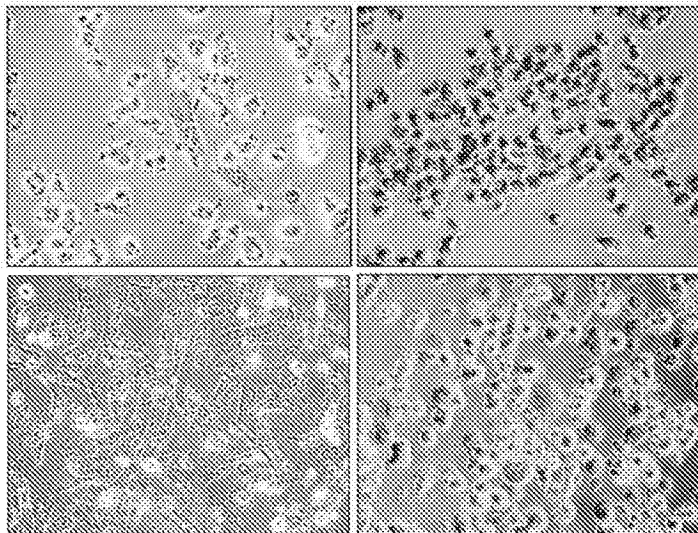


图20

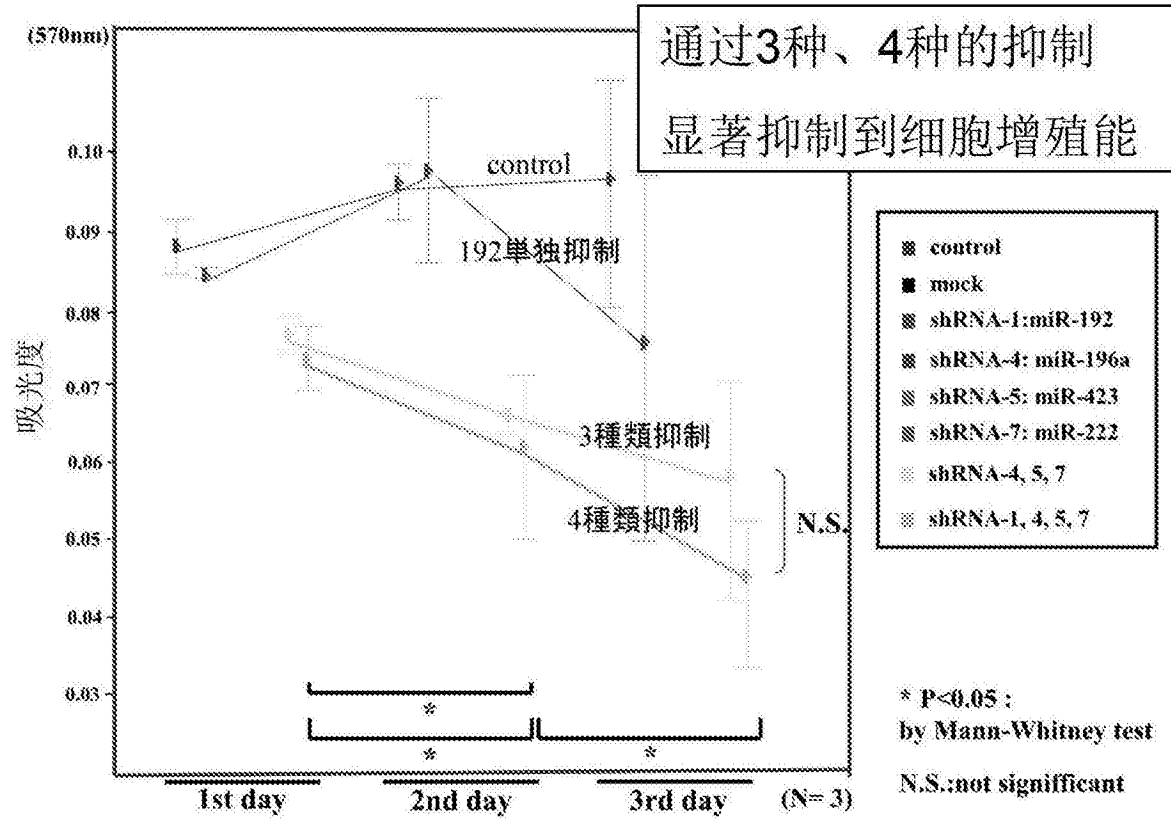


图21

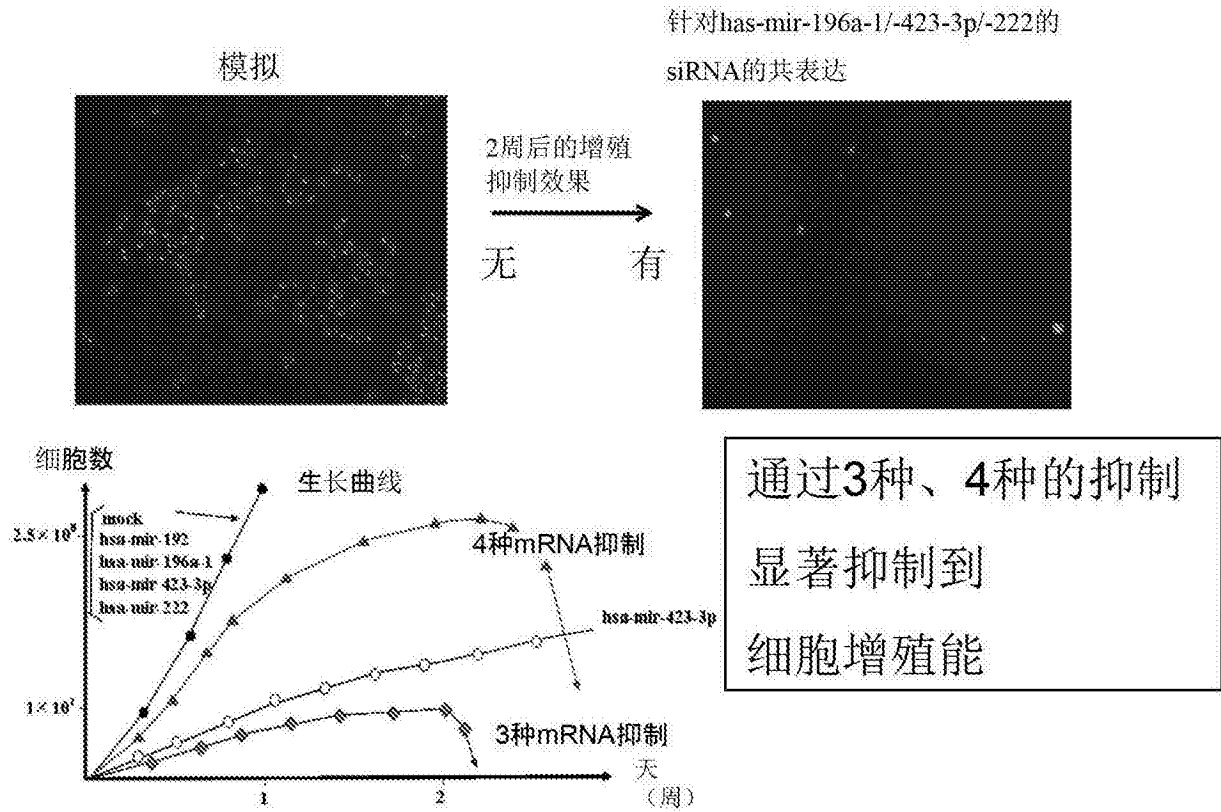


图22

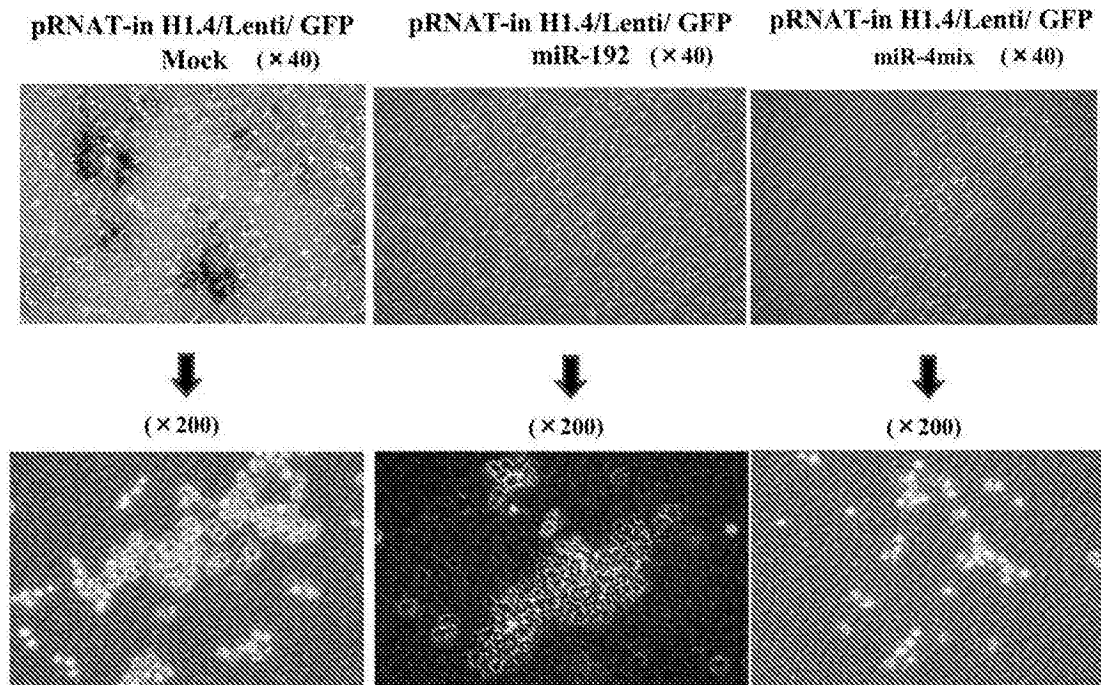


图23