(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5401460号
(P5401460)
(45)発行日　平成26年1月29日(2014.1.29)　(24)登録日　平成25年11月1日(2013.11.1)

(51)Int.Cl.			F I		
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
A61K	45/00	(2006.01)	A61K	45/00	
A61P	35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61K	31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088	

請求項の数 2　(全 74 頁)

(21)出願番号　特願2010-524221 (P2010-524221)
(86)(22)出願日　平成20年9月8日 (2008.9.8)
(65)公表番号　特表2010-538610 (P2010-538610A)
(43)公表日　平成22年12月16日 (2010.12.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/075565
(87)国際公開番号　WO2009/033140
(87)国際公開日　平成21年3月12日 (2009.3.12)
審査請求日　平成23年9月7日 (2011.9.7)
(31)優先権主張番号　60/967,663
(32)優先日　平成19年9月6日 (2007.9.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　593172050
ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ・リサーチ・ファウンデイション
THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
アメリカ合衆国オハイオ州４３２０１，コロンバス，ノース・ハイ・ストリート　１５２４
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト卵巣癌中のマイクロＲＮＡシグネチャー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における、卵巣癌または卵巣癌を発病する危険性の検出を補助する方法であって、
前記対象からの試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップを含み、ここで、少なくとも１つのｍｉＲが、ｍｉＲ－２０５、ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－１８２からなる群から選択され、
正常試料と比較した１つもしくは複数のｍｉＲの発現の差が、卵巣類内膜癌を示している、前記方法。
【請求項２】
さらに２またはそれ以上のｍｉＲの発現レベルを組み合わせる、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２００７年９月６日出願の米国仮特許出願第６０／９６７，６６３号の利益を主張し、この開示は、参照することにより本明細書に明示的に組み込まれる。
政府援助
【０００２】
本発明は、全体的または部分的に、国立癌研究所助成番号－－－－－－－－－－からの助成金により補助された。政府は、本発明においてある特定の権利を有する。

【０００３】
本発明は、概して、分子生物学の分野に関する。より具体的には、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡまたはｍｉＲ）分子を含む方法および組成物に関する。ｍｉＲＮＡアレイ等、分析のため、または分析用ツールとしてｍｉＲＮＡを単離、標識化、調製するための方法および組成物が記載される。さらに、診断、治療および予後診断におけるｍｉＲＮＡに応用できる。
【背景技術】
【０００４】
上皮性卵巣癌は、最も一般的な婦人科悪性腫瘍であり、また世界中の女性において６番目に一般的な癌であり、年間ほぼ１２５，０００件の死亡（１）をもたらしている極めて侵攻性の自然史を伴う。検出および細胞傷害性療法の発展にもかかわらず、進行卵巣癌に罹患した患者のうち最初の診断後５年間生存するのはわずか３０％のみである（２）。この疾患の高い死亡率は、主に、卵巣癌の７０％超が後期段階の診断であることに起因する。事実、卵巣癌がその初期段階で診断された場合、すなわちまだ器官に限局されている場合、５年生存率は９０％を超える。残念ながら、この初期段階で診断されるのは、すべての卵巣癌のわずか１９％である。確かに、この幾分不良な予後は、（ｉ）この疾患のその早期発症における潜行性の無症候的性質、（ｉｉ）早期検出のための確実で低侵襲的な方法の欠如、および（ｉｉｉ）化学療法に対する腫瘍の耐性に起因する。ヒト卵巣癌の大部分が、卵巣表面上皮（ＯＳＥ）から派生する上皮性卵巣癌（ＯＥＣ）に代表される（３）。
【０００５】
卵巣腺癌は、４つの主要な組織学的亜型である、漿液性、粘液性、類内膜および明細胞として生じるが、漿液性が最も一般的である。現在のデータでは、これらの組織型が異なる形態学的および分子遺伝学的変化に関連していることが示されている（４）が、亜型のそれぞれがどのように発生するかを決定するためには、卵巣癌を促進する分子機構のさらなる研究が必要である。
【０００６】
過去５年間にわたり、発現プロファイリング技術が大幅に改善され、これにより癌疫学および臨床的に応用できるバイオマーカーに対する知識が広がった（５、６）。しかしながら、これらの技術により、新たなバイオマーカーのほとんどに、診断、薬剤開発、および個人に合わせた治療への使用の可能性が与えられたが、今のところ、この新生組織形成の起源における詳細な機構に対する洞察はほとんど提供されておらず、したがって、卵巣腫瘍形成が、新規またはまだ十分特性決定されていない経路を介して生じている可能性を示唆している。
【０００７】
マイクロＲＮＡと呼ばれる微小なノンコーディングＲＮＡの新たなクラスが最近発見され、大部分は、標的ｍＲＮＡの３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）への部分的配列ホモロジーを介して結合し、翻訳のブロックおよび／またはｍＲＮＡ分解をもたらすことにより（７）、転写後レベルでの遺伝子発現を制御することが示されている。マイクロＲＮＡは、７０～１００ｎｔのヘアピンｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ前駆体から切断された１９～２５ｎｔの長さの分子である。該前駆体は、細胞質ＲＮａｓｅ　ＩＩＩ　Ｄｉｃｅｒにより約２２ｎｔのｍｉＲＮＡ二本鎖に切断されるが、一時的な二本鎖の１つの鎖（ｍｉＲＮＡ＊）が分解し、一方、成熟ｍｉＲＮＡとして機能する他方の鎖は、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）に組み込まれ、アンチセンス配列を含有する標的ｍＲＮＡの選択を促進する。
【０００８】
いくつかの研究は、ｍｉＲＮＡが分化、細胞増殖および細胞死等の必須プロセスにおいて重要な役割を担っていることを実証している（８、９）。
【０００９】
さらに、癌においては、ｍｉＲＮＡが異常発現または変異することが示されており、ｍｉＲＮＡが制御する標的に依存して、それらが新規のクラスの腫瘍遺伝子または腫瘍抑制遺伝子としての役割を担う可能性があることを示唆しており、肺癌において下方制御された

ｌｅｔ－７は、ＲＡＳ（１０）を抑制し、白血病において削除または下方制御されたＨＭＧＡ２（１１、１２）ｍｉｒ－１５およびｍｉｒ－１６は、ＢＣＬ２（１３）を抑制し、ｍｉｒ－１７－５ｐおよびｍｉｒ－２０ａは、癌原遺伝子ｃ－Ｍｙｃ（１４）により生じる細胞死および増殖のバランスを制御する。

【００１０】

明らかな証拠により、ｍｉＲＮＡポリシストロンｍｉｒ－１７～９２は、リンパ腫および肺癌（１５）における腫瘍遺伝子として機能し、ｍｉｒ－３７２およびｍｉｒ－３７３は、ｐ５３経路を麻痺させることにより、精巣生殖細胞腫瘍における新規な腫瘍遺伝子であり（１６）、Ｂ細胞リンパ腫および充実性腫瘍に過剰発現したｍｉＲ－１５５は、遺伝子導入マウスの生体内モデルにおいて、Ｂ細胞悪性腫瘍の発達につながる（１７）ことが示されている。

マイクロＲＮＡマイクロアレイ技術は、正常試料と腫瘍試料との間で特異的に発現したマイクロＲＮＡを認識するため（１８～２０）、また明確な臨床病理学的特徴および疾患の結果と関連したｍｉＲＮＡ発現シグネチャーを特定するため（２１、２２）の強力なツールとして使用されている。また、いくつかの研究は、異常なマイクロＲＮＡ発現につながる分子機構を調査しており、マイクロＲＮＡ遺伝子におけるゲノム異常の存在を特定している（２１、２３、２４）。より最近では、いくつかの証拠が、ゲノムＤＮＡメチル化パターンの変化として、マイクロＲＮＡ遺伝子が後成的機構によっても制御され得ることを示しており、ｍｉＲ－１２７（２５）およびｍｉＲ－１２４ａ（２６）はＣｐＧアイランドの過剰メチル化により転写的に不活性化され、一方肺癌において、ｌｅｔ－７ａ－３の過剰発現はＤＮＡ低メチル化に起因するようである（２７）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｃａｎｎｉｓｔｒａ ＳＡ. Ｃａｎｃｅｒ ｏｆ ｔｈｅ ｏｖａｒｙ. Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２００４；３５１：２５１９－２９.

【非特許文献２】Ｇｒｅｅｎｌｅｅ ＲＴ, Ｈｉｌｌ－Ｈａｒｍｏｎ ＭＢ, Ｍｕｒｒａｙ Ｔ ａｎｄ Ｔｈｕｎ Ｍ. Ｃａｎｃｅｒ ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ, ２００１. ＣＡ Ｃａｎｃｅｒ Ｊ. Ｃｌｉｎ. ２００１；５１：１５－３６.

【非特許文献３】Ｆｅｅｌｅｙ ＫＭ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ Ｍ. Ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ ｌｅｓｉｏｎｓ ｏｆ ｏｖａｒｉａｎ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｍａｌｉｇｎａｎｃｙ. Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２００１；３８：８７－９５.

【非特許文献４】Ｂｅｌｌ ＤＡ. Ｏｒｉｇｉｎｓ ａｎｄ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ｏｆ ｏｖａｒｉａｎ ｃａｎｃｅｒ. Ｍｏｄ Ｐａｔｈｏｌ ２００５；１８ Ｓｕｐｐｌ ２：Ｓ１９－３２.

【非特許文献５】Ｓｃｈｗａｒｔｚ ＤＲ, Ｋａｒｄｉａ ＳＬ, Ｓｈｅｄｄｅｎ ＫＡ ｅｔ ａｌ. Ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｏｖａｒｉａｎ ｃａｎｃｅｒ ｒｅｆｌｅｃｔｓ ｂｏｔｈ ｍｏｒｐｈｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｂｅｈａｖｉｏｒ, ｄｉｓｔｉｎｇｕｉｓｈｉｎｇ ｃｌｅａｒ ｃｅｌｌ ｆｒｏｍ ｏｔｈｅｒ ｐｏｏｒ－ｐｒｏｇｎｏｓｉｓ ｏｖａｒｉａｎ ｃａｒｃｉｎｏｍａｓ. Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００２；６２：４７２２－９.

【非特許文献６】Ｄｅ Ｃｅｃｃｏ Ｌ, Ｍａｒｃｈｉｏｎｎｉ Ｌ, Ｇａｒｉｂｏｌｄｉ Ｍ ｅｔ ａｌ. Ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ａｄｖａｎｃｅｄ ｏｖａｒｉａｎ ｃａｎｃｅｒ: ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｓｉｇｎａｔｕｒｅ ｉｎｖｏｌｖｉｎｇ Ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ ２. Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２００４；２３：８１７１－８３.

【非特許文献７】Ｈｅ Ｌ, Ｈａｎｎｏｎ ＧＪ. ＭｉｃｒｏＲＮＡｓ: ｓｍａｌｌ ＲＮＡｓ ｗｉｔｈ ａ ｂｉｇ ｒｏｌｅ ｉｎ ｇｅｎｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ. Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ ２００４；５：５２２－３１.

【非特許文献８】Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. Curr Opin Genet Dev 2005 ;5: 563−8.
【非特許文献９】Zamore PD, Haley B. Ribo−gnome: the big world of small RNAs. Science 2005;309:1519−24.
【非特許文献１０】Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let−7 microRNA family. Cell 2005;120:635−47.
【非特許文献１１】Mayr C, Hemann MT, Bartel D. Disrupting the pairing between let−7 and HMGA2 enhances oncogenic transformation. Science 2007;315:1576−9.
【非特許文献１２】Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let−7 represses the HMGA2 oncogene. Genes Dev. 2007;21: 1025−30.
【非特許文献１３】Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR−15 and miR−16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:13944−9.
【非特許文献１４】O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c−Myc−regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005;435:839−43.
【非特許文献１５】He L, Thomson JM, Hemann MT et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature 2005 ;435: 828−33.
【非特許文献１６】Voorhoeve PM, Ie Sage C, Schrier M et al. A genetic screen implicates miRNA− 372 and miRNA−373 as Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. Cell 2006;124:1169− 81.
【非特許文献１７】Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y et al. Pre−B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high−grade lymphoma in E(mu)−miR155 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:7024−9.
【非特許文献１８】Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. Cancer Res. 2005;65:7065−70.
【非特許文献１９】Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006;6:857−66.
【非特許文献２０】Esquela−Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs − microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:259−69.
【非特許文献２１】Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic

lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2005;353:1793−801.
【非特許文献２２】Yanaihara N, Caplen N, Bowman E et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006;9:189−98.
【非特許文献２３】Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. Oncogene 2006;25:6202−10.
【非特許文献２４】Zhang L, Huang J, Yang N et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:9136−41.
【非特許文献２５】Saito Y, Liang G, Egger G et al. Specific activation of microRNA−127 with downregulation of the proto−oncogene BCL6 by chromatin−modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell 2006;9:435−43.
【非特許文献２６】Lujambio A, Ropero S, Ballestar E et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. Cancer Res 2007;67: 1424−9.
【非特許文献２７】Brueckner B, Stresemann C, Kuner R et al. The human let−7a−3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. Cancer Res 2007;67:1419−23.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

卵巣癌の治療に対する相当な研究にもかかわらず、卵巣癌はいまだに効果的診断および処置が困難であり、患者に見られる死亡率は、疾患の診断、処置および予防の改善が必要であることを示している。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

本発明は、部分的に、正常な対照細胞と相対的に卵巣癌細胞に特異的に発現したｍｉＲＮＡの、卵巣癌特異的シグネチャーに基づく。

したがって、本発明は、対象が卵巣癌を有している、または発病する危険性があるかどうかを診断する方法を包含し、該方法は対象からの試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップを含み、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルと相対的な試験試料中のｍｉＲのレベルの変化は、対象が卵巣癌を有している、または発病する危険性があることを示している。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

特許または出願ファイルは、カラーで作成された１つもしくは複数の図面および／または１つもしくは複数の写真を含み得る。カラーの図面（複数を含む）および／または写真（複数を含む）を備える本特許または特許出願公開の複写は、要求に応じて、また必要な料金の支払いをもって米国特許商標庁により提供される。

【図１−１】卵巣癌および正常卵巣組織のクラスタ分析を示す図である。図１Ａは、チッ

プにスポットされた全ヒトｍｉＲＮＡに基づく卵巣癌からの正常組織の分離を示す、階層的クラスタ分析により生成されたツリーである。

【図１－２】卵巣癌および正常卵巣組織のクラスタ分析を示す図である。図１Ｂは、正常な卵巣に対して腫瘍において最も大幅に下方調整されたマイクロＲＮＡのいくつかを示す図である。図１Ｃは、正常な卵巣に対して腫瘍において最も大幅に上方調整された４つのマイクロＲＮＡを示す図である。

【図２Ａ】ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１２５ｂ１、ｍｉＲ－１４５のプローブによる、ヒト卵巣癌のノーザンブロット分析を示す図である。ヒト卵巣細胞株上のｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１２５ｂ１およびｍｉＲ－１４５の評価である。５Ｓプローブを、異なるレーンの発現レベルの正規化に使用した。

【図２Ｂ】正常試料と比較したｍｉＲ－１４０の下方調整を検証するためのリアルタイムＰＣＲを示す図である。

【図３Ａ】正常組織と比較した、異なる卵巣癌組織型（漿液性、類内膜、および明細胞）を特徴付けるマイクロＲＮＡシグネチャーを示すベン図である（図３Ａ、ｍｉＲの上方調整）。

【図３Ｂ】正常組織と比較した、異なる卵巣癌組織型（漿液性、類内膜、および明細胞）を特徴付けるマイクロＲＮＡシグネチャーを示すベン図である（図３Ｂ、下方調整）。

【図４】図４Ａは、漿液性および類内膜腫瘍におけるｍｉＲ－２２２マイクロアレイデータ発現のｔ－試験グラフを示す図である。　図４Ｂは、最も小さい組の試料に対するノーザンブロットによる検証を示す図である。

【図５－１】脱メチル化剤５’－ＡＺＡによる処置前および処置後の、ＯＶＣＡＲ３細胞株の発現パターンを示す図である。　図５Ａは、マイクロアレイプロファイリングから得られた、特異的に発現した最も有意なｍｉＲを報告している表である。　図５Ｂは、階層的クラスタツリーを示す図である。

【図５－２】脱メチル化剤５’－ＡＺＡによる処置前および処置後の、ＯＶＣＡＲ３細胞株の発現パターンを示す図である。　図５Ｃは、ｍｉＲ発現レベルのグラフ表示として報告されている、５つの最も有意に誘引されたｍｉＲの上方調整を検証するリアルタイムＰＣＲを示す図である（各バーは、３回の技術的な繰り返しの平均から得られた独立した実験である）。

【図５－３】脱メチル化剤５’－ＡＺＡによる処置前および処置後の、ＯＶＣＡＲ３細胞株の発現パターンを示す図である。　図５Ｄは、ＥｔＢｒゲル染色で正規化された、処置後のｍｉＲ－２１の上方調整を示すノーザンブロットを示す図である。

【図６Ａ】図８－表１において報告されるｍｉＲシグネチャーによる、癌であるか正常組織であるかの各試料の確率（０．０から１．０）のグラフを示したＰＡＭ分析を示す図であり、２９個のｍｉＲのより小さい組、つまり４個の上方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１）ならびに２５個の下方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ　１が中でも最も有意である）が、８９％の分類率で正常試料と腫瘍試料とを区別していることを説明している。

【図６Ｂ】図８－表１において報告されるｍｉＲシグネチャーによる、癌であるか正常組織であるかの各試料の確率（０．０から１．０）のグラフを示したＰＡＭ分析を示す図であり、２９個のｍｉＲのより小さい組、つまり４個の上方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１）ならびに２５個の下方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ　１が中でも最も有意である）が、８９％の分類率で正常試料と腫瘍試料とを区別していることを説明している。

【図７－１】ヒト卵巣癌および２つの正常組織のパネルに対するノーザンブロッティング（図７Ａ）を示す図であり、ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－２０３は、ＣｐＧアイランドに関連しており、ＣｐＧアイランドに埋没したｍｉＲ－２０３は８７５ｂｐの長さであり、ｍｉＲ－２１は成熟配列の２ｋｂ上流のＣｐＧアイランドで特徴付けられ（図７Ｂ）、一

方ｍｉＲ－２０５は、その成熟形態の２Ｋｂ上流にわたる領域においていかなるＣｐＧアイランドも示していない。
【図７－２】ヒト卵巣癌および２つの正常組織のパネルに対するノーザンブロッティング（図７Ａ）を示す図であり、ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－２０３は、ＣｐＧアイランドに関連しており、ＣｐＧアイランドに埋没したｍｉＲ－２０３は８７５ｂｐの長さであり、ｍｉＲ－２１は成熟配列の２ｋｂ上流のＣｐＧアイランドで特徴付けられ（図７Ｂ）、一方ｍｉＲ－２０５は、その成熟形態の２Ｋｂ上流にわたる領域においていかなるＣｐＧアイランドも示していない。
【図７－３】ヒト卵巣癌および２つの正常組織のパネルに対するノーザンブロッティング（図７Ａ）を示す図であり、ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－２０３は、ＣｐＧアイランドに関連しており、ＣｐＧアイランドに埋没したｍｉＲ－２０３は８７５ｂｐの長さであり、ｍｉＲ－２１は成熟配列の２ｋｂ上流のＣｐＧアイランドで特徴付けられ（図７Ｂ）、一方ｍｉＲ－２０５は、その成熟形態の２Ｋｂ上流にわたる領域においていかなるＣｐＧアイランドも示していない。
【図８】図８（表１）腫瘍試料と正常試料との間の特異的に発現したマイクロＲＮＡのＰＡＭ分析。ＳＡＭ分析により発見された３９個のｍｉＲのうち、２９個のｍｉＲ、つまり４個の上方調整されたｍｉＲおよび２５個の下方調整されたｍｉＲが、８９％の分類率で正常試料および腫瘍試料を分類することができた。上方調整された４個のｍｉＲは、Ｚｈａｎｇら、２００５年により行われたゲノム研究で、増幅されることが判明しており、Ｚｈａｎｇ研究においては、下方調整されたｍｉＲ中、２５個のうち１０個が削除されたことが判明し、４個は不一致で、１１個は、いかなる複製損失または増幅をも示さない。
【図９】図９（表２）正常卵巣組織に対し腫瘍試料において特異的に発現したｍｉＲを示す図である。腫瘍と正常組織の間での特異的に発現したマイクロＲＮＡのＳＡＭ分析は、１０個のマイクロＲＮＡが上方調整され、２９個が下方調整されたことを示している（ｑ－値＜１％および倍率変化＞３）。上方調整された１０個のｍｉＲのうち６個は、Ｚｈａｎｇら、２００５年により行われたゲノム研究で、増幅されることが判明しており、４個はいかなる複製損失または増幅をも示さず、Ｚｈａｎｇ研究においては、下方調整されたｍｉＲ中、２９個のうち１２個は削除されたことが判明し、６個は不一致で、１１個はいかなる複製損失または増幅をも示さない。
【図１０－１】図１０（表３）正常組織と比較した異なる組織学的亜型のＳＡＭ分析を示す図である。
【図１０－２】図１０（表３）正常組織と比較した異なる組織学的亜型のＳＡＭ分析を示す図である。
【図１０－３】図１０（表３）正常組織と比較した異なる組織学的亜型のＳＡＭ分析を示す図である。
【図１０－４】図１０（表３）正常組織と比較した異なる組織学的亜型のＳＡＭ分析を示す図である。
【図１１】図１１（表４）対として比較した異なる組織型の腫瘍のｍｉＲＮＡ発現のＳＡＭ分析を示す図である。
【図１２】図１２（表５）ＥＯＣ臨床病理学的特徴に関連したマイクロＲＮＡを同定するＳＡＭ分析を示す図である。
【図１３】図１３（表６）我々の分析から得られた最も有意なマイクロＲＮＡの、検証済みの、また重要な予測標的をまとめた表である。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
具体的な態様において、対象が卵巣癌を有している、または発病する危険性があるかどうかを診断する方法が本明細書で提供され、該方法は、対象からの試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップを含む。対照試料中の対応するｍｉＲのレベルと相対的な試験試料中の前記ｍｉＲのレベルの変化は、対象が卵巣癌を有している、または発病する危険性があることを示している。

【００１６】
別の具体的な態様において、ｍｉＲ発現と卵巣癌との間の相関関係または卵巣癌の素因を特定するステップを含む方法が本明細書で提供され、該方法は、（ａ）疾患または病状を有する、または有する疑いのある対象から単離されたｍｉＲを標識化するステップと、（ｂ）ｍｉＲをｍｉＲアレイにハイブリダイズするステップと、（ｃ）アレイへのｍｉＲハイブリダイゼーションを決定するステップと、（ｄ）参照と比較して、疾患または病状を表す、試料中に特異的に発現したｍｉＲを特定するステップとを含む。
【００１７】
具体的な態様において、特異的に発現したｍｉＲを特定するステップが、前記試料のｍｉＲプロファイルを生成するステップと、ｍｉＲプロファイルを評価して、前記試料中のｍｉＲが正常試料と比較して特異的に発現しているかどうかを決定するステップとを含む方法が、本明細書で提供される。ある特定の実施形態において、ｍｉＲプロファイルは、表１に示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択される。また、ある特定の実施形態において、ｍｉＲプロファイルは、図３Ａまたは図３Ｂに示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択される。
【００１８】
具体的な態様において、卵巣癌は、明細胞癌、漿液性癌または卵巣類内膜癌のうちの１つもしくは複数の癌である。具体的な態様において、該ｍｉＲプロファイルは、表３に示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択され、それにより卵巣癌細胞が正常細胞から区別される。また、ある特定の実施形態において、該ｍｉＲプロファイルは、表４に示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択され、それにより卵巣癌細胞が、漿液性、非漿液性類内膜、非類内膜、明細胞、非明細胞、低分化および非低分化のうちの組織型により区別される。
【００１９】
具体的な実施形態において、該ｍｉＲプロファイルは、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃ、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ　１からなる群から選択される少なくとも１つのｍｉＲを含み、正常試料と比較したｍｉＲＮＡの１つもしくは複数の発現の差は、卵巣癌を示している。また、ある特定の実施形態において、該ｍｉＲプロファイルは、少なくともｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃ、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ１を含み、正常試料と比較したｍｉＲの１つもしくは複数の発現の差は、卵巣癌を示している。
【００２０】
具体的な態様において、正常試料と比較したｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃもしくはｍｉＲ－１４１の発現の増加、および／またはｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５もしくはｍｉＲ－１２５ｂ１の発現の減少が卵巣癌を示している方法が、本明細書で提供される。
【００２１】
具体的な態様において、該ｍｉＲプロファイルが、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１からなる群から選択される少なくとも１つのｍｉＲＮＡを含み、正常試料と比較したｍｉＲＮＡの１つもしくは複数の発現の差が漿液性卵巣癌を示している方法が、本明細書で提供される。
【００２２】
具体的な態様において、該ｍｉＲプロファイルが、ｍｉＲ－２０５、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－１８２、ｍｉＲ－２００ｂおよびｍｉＲ－１４１からなる群から選択される少なくとも１つのｍｉＲＮＡを含み、正常試料と比較したｍｉＲＮＡの１つもしくは複数の発現の差は、卵巣類内膜癌を示している方法が、本明細書で提供される。
【００２３】
具体的な態様において、漿液性、類内膜、明細胞および／または低分化卵巣癌の卵巣癌組織型の間を区別するステップを含む方法が、本明細書で提供される。ある特定の実施形態

において、該ｍｉＲプロファイルは、図３Ａまたは図３Ｂに示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択され、漿液性卵巣癌を示している。ある特定の他の実施形態において、該ｍｉＲプロファイルは、図３Ａまたは図３Ｂに示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択され、卵巣類内膜癌を示している。ある特定の他の実施形態において、該ｍｉＲプロファイルは、図３Ａまたは図３Ｂに示されるｍｉＲのうちの１つもしくは複数から選択され、明細胞卵巣癌を示している。

【００２４】

具体的な態様において、卵巣癌細胞の増殖を阻害する方法が本明細書で提供され、該方法は、ｉ）表３に示される群から選択される１つもしくは複数のｍｉＲの発現もしくは活性を阻害する１つもしくは複数の薬剤を細胞内に導入するステップと、ｉｉ）　ｍｉＲの１つもしくは複数の標的遺伝子の発現を高める１つもしくは複数の薬剤を細胞内に導入する、もしくは、ｉ）およびｉｉ）の１つもしくは複数の薬剤の組合せを細胞内に導入するステップと、該１つもしくは複数の薬剤が、ｍｉＲの発現または活性を阻害する、ｍｉＲの１つもしくは複数の標的遺伝子の発現もしくは活性を高める、またはそれらの組合せをもたらす条件下で細胞を維持し、それにより卵巣癌細胞の増殖を阻害するステップとを含む。具体的な実施形態において、該細胞は、ヒト細胞である。

【００２５】

具体的な態様において、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１の発現は、上方制御され、共通推定標的として、卵巣癌において下方調整される腫瘍抑制因子ＢＡＰｌ、ＢＲＣＡｌ関連タンパク質を有する方法が本明細書で提供される。

【００２６】

具体的な態様において、正常組織と比較して、卵巣癌細胞におけるｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－２０５、ｍｉＲ－３０－５ｐおよびｍｉＲ－３０ｃのうちの１つもしくは複数のレベルを調節するための方法が本明細書で提供され、該方法は、有効量の脱メチル化剤を投与するステップを含む。具体的な実施形態において、該レベルは、５－アザ－２’－デオキシシチジン脱メチル化処置後に増加する。

【００２７】

具体的な態様において、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３、ｍｉＲ－１４６、ｍｉＲ－２０５、ｍｉＲ－３０－５ｐおよびｍｉＲ－３０ｃのうちの１つもしくは複数の発現を変化させるための方法が本明細書で提供され、該方法は、それらの過剰発現を担うＤＮＡ低メチル化機構を制御するステップを含む。

【００２８】

該少なくとも１つのｍｉＲは、当業者に周知の様々な技術を使用して測定することができる。一実施形態において、該少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、ノーザンブロット分析を使用して測定される。別の実施形態において、試験試料中の該少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルより低い。また、別の実施形態において、試験試料中の該少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルより高くなり得る。

【００２９】

また、本発明は、対象の１つもしくは複数の予後診断マーカーに関連した癌を診断する方法を提供し、該方法は、対象からの癌試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップを含み、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルと相対的な試験試料中の該少なくとも１つのｍｉＲのレベルの変化は、対象が１つもしくは複数の予後診断マーカーに関連した癌を有していることを示している。一実施形態において、該少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対象から得られた試験試料からＲＮＡを逆転写して、１組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供し、該標的オリゴデオキシヌクレオチドを、ｍｉＲ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料から生成したハイブリダイゼーションプロファイルと比較することによ

り測定される。少なくとも１つのｍｉＲの信号の変化は、対象がそのような癌を有している、または発病する危険性があることを示している。

【００３０】

また、本発明は、対象の癌を処置する方法を包含し、対照試料から生成された信号に相対的な少なくとも１つのｍｉＲの信号が、脱制御（例えば下方制御、上方制御）される。

【００３１】

また、本発明は、対象から得られた試験試料からＲＮＡを逆転写して、１組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供し、該標的オリゴデオキシヌクレオチドを、ｍｉＲ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料から生成されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較することにより、対象が、対象内の１つもしくは複数の有害予後診断マーカーに関連した癌を有している、または発病する危険性があるかどうかを診断する方法を包含する。信号の変化は、対象が癌を有している、または発病する危険性があることを示している。

【００３２】

また、本発明は、対照細胞と相対的に対象の癌細胞の少なくとも１つのｍｉＲが下方制御または上方制御されている、癌を有する対象の癌を治療する方法を包含する。該少なくとも１つのｍｉＲが癌細胞内で下方制御されている場合、該方法は、対象の癌細胞の増殖が阻害されるように、有効量の少なくとも１つの単離ｍｉＲを対象に投与するステップを含む。該少なくとも１つのｍｉＲが癌細胞内で上方制御されている場合、該方法は、対象の癌細胞の増殖が阻害されるように、有効量の前記少なくとも１つのｍｉＲの発現を阻害するための少なくとも１つの化合物を対象に投与するステップを含む。

【００３３】

関連した実施形態において、本発明は、対象の癌を治療する方法を提供し、該方法は、対照細胞と相対的に、癌細胞内の少なくとも１つのｍｉＲの量を決定するステップと、癌細胞内の発現したｍｉＲの量を、癌細胞内の発現したｍｉＲの量が対照細胞内の発現したｍｉＲの量よりも少ない場合、有効量の少なくとも１つの単離ｍｉＲを対象に投与すること、または、癌細胞内の発現したｍｉＲの量が対照細胞内の発現したｍｉＲの量よりも多い場合、対象の癌細胞の増殖が阻害されるように、有効量の該少なくとも１つのｍｉＲの発現を阻害するための少なくとも１つの化合物を対象に投与することにより、変化させるステップと、を含む。

【００３４】

本発明は、さらに、少なくとも１つの単離ｍｉＲおよび薬学的に許容される担体を含む、癌を治療するための薬学的組成物を提供する。薬学的組成物の具体的な実施形態において、少なくとも１つの単離ｍｉＲは、好適な対照細胞と相対的に癌細胞において下方制御されているｍｉＲに対応する。

【００３５】

別の具体的な実施形態において、薬学的組成物は、少なくとも１つのｍｉＲ発現阻害剤化合物および薬学的に許容される担体を含む。また、具体的な実施形態において、薬学的組成物は、好適な対照細胞と相対的に癌細胞において下方制御および／または上方制御されているｍｉＲに特異的な、少なくとも１つのｍｉＲ発現阻害剤化合物を含む。

【００３６】

一実施形態において、本発明は、抗癌剤を同定する方法を提供し、該方法は、試験薬剤を細胞に提供するステップと、癌細胞における減少した発現レベルに関連する少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップとを含み、好適な対照細胞と相対的な該細胞におけるｍｉＲのレベルの増加は、試験薬剤が抗癌剤であることを示している。

【００３７】

また、本発明は、抗癌剤を同定する方法を提供し、該方法は、試験薬剤を細胞に提供するステップと、癌細胞における増加した発現レベルに関連する少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップとを含み、好適な対照細胞と相対的な該細胞におけるｍｉＲのレ

ベルの減少は、試験薬剤が抗癌剤であることを示している。

【００３８】

具体的な実施形態において、少なくとも１つのｍｉＲは、表３に示される群から選択される。具体的な実施形態において、該ｍｉＲは、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－２００ｃ、およびｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５、およびｍｉＲ－１２５ｂ１からなる群から選択される。

【００３９】

具体的な態様において、ｍｉＲＮＡの同定もまた本明細書で提供され、その発現は、組織型、リンパ管および器官浸潤、ならびに卵巣表面の関与等の、特定の卵巣癌の生物病理学的特徴と相関する。

【００４０】

別の具体的な態様において、正常組織と比較して卵巣癌において上方調節されたｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３、およびｍｉＲ－２０５のレベルは、ＯＶＣＡＲ３細胞の５－アザ－２’－デオキシシチジン脱メチル化処置の後に大幅に増加したことが本明細書で開示される。

【００４１】

また、別の具体的な態様において、過剰発現を担うＤＮＡ低メチル化機構を制御することにより、これらのｍｉＲの発現を変化させるための方法が開示される。

【００４２】

添付の図面に照らして読めば、以下の好ましい実施形態の詳細な説明から、本発明の様々な目的および利点が当業者に明らかとなる。

図面の簡単な説明

【００４３】

特許または出願ファイルは、カラーで作成された１つもしくは複数の図面および／または１つもしくは複数の写真を含み得る。カラーの図面（複数を含む）および／または写真（複数を含む）を備える本特許または特許出願公開の複写は、要求に応じて、また必要な料金の支払いをもって米国特許商標庁により提供される。

【００４４】

図１Ａ－１Ｃ：卵巣癌および正常卵巣組織のクラスタ分析を示す図である。

【００４５】

図１Ａ：チップにスポットされた全ヒトｍｉＲＮＡに基づく卵巣癌からの正常組織の分離を示す、階層的クラスタ分析により生成されたツリーである。

【００４６】

図１Ｂ：正常な卵巣に対して腫瘍において最も大幅に下方調整されたマイクロＲＮＡのいくつかを示す図である。

【００４７】

図１Ｃ：正常な卵巣に対して腫瘍において最も大幅に上方調整された４つのマイクロＲＮＡを示す図である。

【００４８】

図２Ａ：ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１２５ｂ１、ｍｉＲ－１４５のプローブによる、ヒト卵巣癌のノーザンブロット分析を示す図である。ヒト卵巣細胞株上のｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１２５ｂ１およびｍｉＲ－１４５の評価である。５Ｓプローブを、異なるレーンの発現レベルの正規化に使用した。

【００４９】

図２Ｂ：正常試料と比較したｍｉＲ－１４０の下方調整を検証するためのリアルタイムＰＣＲを示す図である。

【００５０】

図３Ａおよび３Ｂ：正常組織と比較した、異なる卵巣癌組織型（漿液性、類内膜、および明細胞）を特徴付けるマイクロＲＮＡシグネチャーを示すベン図である（図３Ａ、ｍｉＲの上方調整；図３Ｂ、下方調整）。

【００５１】
図４Ａ：漿液性および類内膜腫瘍におけるｍｉＲ－２２２マイクロアレイデータ発現のｔ－試験グラフを示す図である。
【００５２】
図４Ｂ：最も小さい組の試料に対するノーザンブロットによる検証を示す図である。
【００５３】
図５Ａ－５Ｄ：脱メチル化剤５’－ＡＺＡによる処置前および処置後の、ＯＶＣＡＲ３細胞株の発現パターンを示す図である。
【００５４】
図５Ａ：マイクロアレイプロファイリングから得られた、特異的に発現した最も有意なｍｉＲを報告している表である。
【００５５】
図５Ｂ：階層的クラスタツリーを示す図である。
【００５６】
図５Ｃ：ｍｉＲ発現レベルのグラフ表示として報告されている、５つの最も有意に誘引されたｍｉＲの上方調整を検証するリアルタイムＰＣＲを示す図である（各バーは、３回の技術的な繰り返しの平均から得られた独立した実験である）。
【００５７】
図５Ｄ：ＥｔＢｒゲル染色で正規化された、処置後のｍｉＲ－２１の上方調整を示すノーザンブロットを示す図である。
【００５８】
図６Ａおよび６Ｂ：図８－表１において報告されるｍｉＲシグネチャーによる、癌であるか正常組織であるかの各試料の確率（０．０から１．０）のグラフを示したＰＡＭ分析を示す図であり、２９個のｍｉＲのより小さい組、つまり４個の上方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１）ならびに２５個の下方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ　１が中でも最も有意である）が、８９％の分類率で正常試料と腫瘍試料とを区別していることを説明している。
【００５９】
図７Ａおよび７Ｂ：ヒト卵巣癌および２つの正常組織のパネルに対するノーザンブロッティング（図７Ａ）を示す図であり、ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－２０３は、ＣｐＧアイランドに関連しており、ＣｐＧアイランドに埋没したｍｉＲ－２０３は８７５ｂｐの長さであり、ｍｉＲ－２１は成熟配列の２ｋｂ上流のＣｐＧアイランドで特徴付けられ（図７Ｂ）、一方ｍｉＲ－２０５は、その成熟形態の２Ｋｂ上流にわたる領域においていかなるＣｐＧアイランドも示していない。
【００６０】
図８：表１．腫瘍試料と正常試料との間の特異的に発現したマイクロＲＮＡのＰＡＭ分析。ＳＡＭ分析により発見された３９個のｍｉＲのうち、２９個のｍｉＲ、つまり４個の上方調整されたｍｉＲおよび２５個の下方調整されたｍｉＲが、８９％の分類率で正常試料および腫瘍試料を分類することができた。上方調整された４個のｍｉＲは、Ｚｈａｎｇら、２００５年により行われたゲノム研究で、増幅されることが判明しており、Ｚｈａｎｇ研究においては、下方調整されたｍｉＲ中、２５個のうち１０個が削除されたことが判明し、４個は不一致で、１１個は、いかなる複製損失または増幅をも示さない。
【００６１】
図９－表２：正常卵巣組織に対し腫瘍試料において特異的に発現したｍｉＲを示す図である。腫瘍と正常組織の間での特異的に発現したマイクロＲＮＡのＳＡＭ分析は、１０個のマイクロＲＮＡが上方調整され、２９個が下方調整されたことを示している（ｑ－値＜１％および倍率変化＞３）。上方調整された１０個のｍｉＲのうち６個は、Ｚｈａｎｇら、２００５年により行われたゲノム研究で、増幅されることが判明しており、４個はいかなる複製損失または増幅をも示さず、Ｚｈａｎｇ研究においては、下方調整されたｍｉＲ中

、２９個のうち１２個は削除されたことが判明し、６個は不一致で、１１個はいかなる複製損失または増幅をも示さない。

【００６２】

図１０－表３：正常組織と比較した異なる組織学的亜型のＳＡＭ分析を示す図である。

【００６３】

図１１－表４：対として比較した異なる組織型の腫瘍のｍｉＲＮＡ発現のＳＡＭ分析を示す図である。

【００６４】

図１２－表５：ＥＯＣ臨床病理学的特徴に関連したマイクロＲＮＡを同定するＳＡＭ分析を示す図である。

【００６５】

図１３－表６：我々の分析から得られた最も有意なマイクロＲＮＡの、検証済みの、また重要な予測標的をまとめた表である。

好ましい実施形態の詳細な説明

【００６６】

本発明は、ｍｉＲＮＡの調製および特性決定に関する組成物および方法、ならびに治療、予後診断、および診断用途へのｍｉＲＮＡの使用を目的とする。

【００６７】

本明細書において交換可能に使用される、「ｍｉＲ」、「マイクロＲＮＡ」、「ｍｉＲ」、または「ｍｉＲＮＡ」は、ｍｉＲ遺伝子からの未プロセシングまたはプロセシング後のＲＮＡ転写物を指す。ｍｉＲはタンパク質に翻訳されないため、「ｍｉＲ」という用語はタンパク質を含まない。プロセシングされなかったｍｉＲ遺伝子転写物は、「ｍｉＲ前駆体」とも呼ばれ、典型的には約７０～１００ヌクレオチドの長さのＲＮＡ転写物を含む。ｍｉＲ前駆体はまた、ＲＮＡｓｅ（例えば、Ｄｉｃｅｒ、Ａｒｇｏｎａｕｔ、またはＲＮＡｓｅ　ＩＩ（例えばＥ．ｃｏｌｉ　ＲＮＡｓｅ　ＩＩＩ等））による消化により、活性な１９～２５ヌクレオチドＲＮＡ分子にプロセシングされ得る。この活性な１９～２５ヌクレオチドＲＮＡ分子はまた、「プロセシング済」ｍｉＲ遺伝子転写物または「成熟」ｍｉＲＮＡとも呼ばれる。本明細書において使用される「ｍｉＲ」という用語は、成熟ｍｉＲ、ｐｒｅ－ｍｉＲ、ｐｒｉ－ｍｉＲ、またはｍｉＲ種配列を含む、ｍｉＲ－オリゴヌクレオチドの１つもしくは複数を含み得ることを理解されたい。ある特定の実施形態において、様々なｍｉＲ核酸の混合物もまた使用することができる。また、ある特定の実施形態において、該ｍｉＲは、送達を高めるように修飾され得る。

【００６８】

ｍｉＲＮＡ（ｍｉＲ）情報は、ｈｔｔｐ：／ｍｉｃｒｏｒｎａ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ／でｍｉＲＮＡのレジストリを維持しているＳａｎｇｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅから入手可能である。ｍｉＲＢａｓｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅデータベースは、ヌクレオチド配列および様々な源から発行されたｍｉＲＮＡの注釈を含む。ｍｉＲＢａｓｅ　Ｒｅｇｉｓｔｒｙは、発行前に、新規ｍｉＲＮＡの従来の命名法に適合する、新規なｍｉＲＮＡ遺伝子に対する一意の名称を提供する。また、ｍｉＲＢａｓｅ　Ｔａｒｇｅｔｓは、動物における前提となるｍｉＲＮＡ標的の源である。

【００６９】

活性な１９～２５ヌクレオチドＲＮＡ分子は、（例えば、無傷細胞または細胞溶解物を使用して）自然プロセシング経路を介して、または、（例えば、単離Ｄｉｃｅｒ、Ａｒｇｏｎａｕｔ、もしくはＲＮＡｓｅ　ＩＩＩ等の単離プロセシング酵素を使用して）合成プロセシング経路によりｍｉＲ前駆体から得ることができる。活性な１９～２５ヌクレオチドＲＮＡ分子はまた、ｍｉＲ前駆体からプロセシングされることなく、生物学的または化学的合成により直接生成することができることを理解されたい。

【００７０】

本発明は、対象が癌を有している、または発病する危険性があるかどうかを診断する方法を包含し、該方法は対象からの試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定する

ステップと、試験試料中のｍｉＲのレベルを、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルと比較するステップとを含む。本明細書において使用される「対象」は、乳癌を有する、または有する疑いのある任意の哺乳動物であり得る。具体的な実施形態において、該対象は、癌を有する、または有する疑いのあるヒトである。

【００７１】

少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対象から得られる生物学的試料の細胞において測定することができる。例えば、従来の生検技術により、関連した卵巣癌を有する疑いのある対象から、組織試料を取り出すことができる。別の実施例において、対象から血液試料を取り出すことができ、標準的技術により、ＤＮＡ抽出のために白血球を単離することができる。血液または組織試料は、放射線治療、化学治療またはその他の治療処置の前に対象から得ることが好ましい。対応する対照組織または血液試料は、対照の非罹患組織から、正常なヒト個人もしくは正常個人の集団から、または対象の試料中の大多数の細胞に対応する培養細胞から得ることができる。次いで、対象の試料からの細胞中の所与のｍｉＲ遺伝子から生成されたｍｉＲのレベルを対照試料の細胞からの対応するｍｉＲレベルと比較することができるように、対照組織または血液試料を対象からの試料とともに処理することができる。

【００７２】

対照試料中の対応するｍｉＲのレベルと相対的な、対象から得られた試料中のｍｉＲのレベルの変化（すなわち増加または減少）は、対象の癌の存在を示している。一実施形態において、試験試料中の該少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルより高い（すなわち、ｍｉＲの発現が「上方制御」されている）。本明細書において使用されるように、対象からの細胞試料または組織試料中のｍｉＲの量が対照細胞または対照組織試料中のｍｉＲの量よりも多い場合、ｍｉＲの発現は「上方制御」されている。別の実施形態において、試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルより低い（すなわち、ｍｉＲの発現が「下方制御」されている）。本明細書において使用されるように、対象からの細胞または組織試料中の遺伝子から生成されたｍｉＲの量が対照細胞または組織試料中の同じ遺伝子から生成された量よりも少ない場合、ｍｉＲ遺伝子の発現は「下方制御」されている。対照および正常試料中の相対的ｍｉＲ遺伝子発現は、１つもしくは複数のＲＮＡ発現標準に対して決定することができる。該標準は、例えば、ゼロｍｉＲ遺伝子発現レベル、標準細胞株中のｍｉＲ遺伝子発現レベル、または正常ヒト対照の集団に対して事前に得られているｍｉＲ遺伝子発現の平均レベルを含み得る。

【００７３】

試料中のｍｉＲのレベルは、生物学的試料のＲＮＡ発現レベルを検出するための好適な任意の技術を使用して測定することができる。生物学的試料からの細胞中のＲＮＡ発現レベルを決定するための好適な技術（例えば、ノーザンブロット分析、ＲＴ－ＰＣＲ、ｉｎｓｉｔｕハイブリダイゼーション等）は、当業者には周知である。具体的な実施形態において、少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、ノーザンブロット分析を使用して検出される。例えば、全細胞ＲＮＡは、核酸抽出緩衝液の存在下での均質化、次いで遠心分離により細胞から精製することができる。核酸は沈殿し、ＤＮａｓｅでの処理および沈降法によりＤＮＡが除去される。次いで、ＲＮＡ分子は、標準的技法に従いアガロースゲル上でのゲル電気泳動により分離され、ニトロセルロースフィルタに移される。次いでＲＮＡは、加熱によりフィルタ上に固定される。特定のＲＮＡの検出および定量化は、問題のＲＮＡと相補的な、適切に標識化されたＤＮＡまたはＲＮＡプローブを使用して達成される。例えば、参照することによりその全開示内容が組み込まれる、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ， Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．， ｅｄｓ．， ２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ， １９８９， Ｃｈａｐｔｅｒ ７を参照されたい。

【００７４】

所与のｍｉＲのノーザンブロットハイブリダイゼーションに好適なプローブは、所与のｍｉＲの核酸配列から生成することができる。標識化ＤＮＡおよびＲＮＡプローブの調整、ならびにそれらの標的ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションの条件は、参照によりその開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ： Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ, Ｊ． Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．, ｅｄｓ．, ２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ, １９８９, Ｃｈａｐｔｅｒｓ １０ ａｎｄ １１に記載されている。

【００７５】

例として、核酸プローブは、例えば^{3}Ｈ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{14}Ｃ、もしくは^{35}Ｓ等の放射性核種、重金属、または、標識化されたリガンド（例えば、ビオチン、アビジンまたは抗体）、蛍光分子、化学発光分子、酵素等に対する特定の結合対メンバーとして機能することができるリガンドで標識化することができる。

【００７６】

プローブは、参照することによりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｒｉｇｂｙ ｅｔ ａｌ． （１９７７）, Ｊ． ＭｏＩ． Ｂｉｏｌ． １１３：２３７－２５１のニックトランスレーション法により、またはＦｉｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ． （１９８３）, Ａｎａｌ． Ｂｉｏｃｈｅｍ． １３２：６－１３のランダムプライミング法により、高い比活性度まで標識化することができる。後者は、一本鎖ＤＮＡまたはＲＮＡ鋳型からの高い比活性度の^{32}Ｐ標識化プローブの合成に最適な方法である。例えば、ニックトランスレーション法によって、事前に存在するヌクレオチドを高放射性ヌクレオチドと置き換えることにより、10^{8}ｃｐｍ／マイクログラムを優に超える比活性度を有する^{32}Ｐ標識化核酸を調製することができる。

次いで、ハイブリダイズしたフィルターを写真用フィルムに露光することにより、ハイブリダイゼーションのオートラジオグラフィー検出を行うことができる。ハイブリダイズされたフィルタで露光された写真用フィルムのデンシトメトリックスキャンにより、ｍｉＲ遺伝子転写レベルの正確な測定を行うことができる。別の手法を用いて、コンピュータ画像化システム、例えばＡｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）から入手可能なＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ ４００－Ｂ ２Ｄ Ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｅｒにより、ｍｉＲ遺伝子レベルを定量化することができる。

【００７７】

ＤＮＡまたはＲＮＡプローブの放射性核種標識化が実用的でない場合、ランダムプライマー法を使用して、類似体、例えばｄＴＴＰ類似体５－（Ｎ－（Ｎ－ビオチニル－ε－アミノカプロイル）－３－アミノアリル）デオキシウリジン三リン酸を、プローブ分子に組み込むことができる。ビオチニル化プローブオリゴヌクレオチドは、蛍光染料または呈色反応を生成する酵素に結合したアビジン、ストレプトアビジン、および抗体（例えば抗ビオチン抗体）等のビオチン結合タンパク質との反応により検出することができる。

【００７８】

ノーザン法およびその他のＲＮＡハイブリダイゼーション技術に加えて、ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションの技術を使用してＲＮＡ転写のレベルの決定を達成することができる。この技術は、ノーザンブロッティング技術よりも必要とする細胞が少なく、顕微鏡カバースリップ上に全細胞を堆積させること、および放射性またはその他の標識化された核酸（例えばｃＤＮＡまたはＲＮＡ）プローブを含有する溶液で、細胞の核酸成分をプローブすることを含む。この技術は、対象からの組織生検試料の分析に特に適している。ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション技術の実践は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる米国特許第５，４２７，９１６号により詳細に記載されている。所与のｍｉＲのｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーションに好適なプローブは、核酸配列から生成することができる。

【００７９】

また、ｍｉＲ遺伝子転写物の逆転写、次いでポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）による逆転写された転写物の増幅により、細胞中のｍｉＲ遺伝子転写物の相対数を決定することができる。ｍｉＲ遺伝子転写物のレベルは、内標準物質、例えば同じ試料に存在する「ハウスキーピング」遺伝子からのｍＲＮＡのレベルと比較して定量化することができる。内標準物質としての使用に好適な「ハウスキーピング」遺伝子は、例えば、ミオシンまたはグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｇ３ＰＤＨ）を含む。定量的ＲＴ－ＰＣＲのための諸方法およびそれらの変化形は、当技術分野の範囲内である。

【００８０】

いくつかの場合において、試料中の複数の異なるｍｉＲの発現レベルを同時に決定することが望ましい場合がある。別の場合において、癌と相関するすべての既知のｍｉＲ遺伝子の転写物の発現レベルを決定することが望ましい場合がある。何百ものｍｉＲ遺伝子の癌特異的発現レベルを評価することは、時間がかかり、また大量の全ＲＮＡ（各ノーザンブロットに対し少なくとも２０μｇ）、および放射性同位体が必要なオートラジオグラフィー技術を必要とする。

【００８１】

これらの制限を克服するために、１組のｍｉＲ遺伝子に特異的な１組のプローブオリゴデオキシヌクレオチドを含有するマイクロチップ形式（すなわちマイクロアレイ）のオリゴライブラリを構築することができる。そのようなマイクロアレイを使用して、ＲＮＡを逆転写して１組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを生成し、それらをマイクロアレイ上のプローブオリゴデオキシヌクレオチドにハイブリダイズさせてハイブリダイゼーションまたは発現プロファイルを生成することにより、生物学的試料中の複数のマイクロＲＮＡの発現レベルを決定することができる。次いで、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを対照試料のハイブリダイゼーションプロファイルと比較して、どのマイクロＲＮＡが癌における変化した発現レベルを有するかを決定することができる。

【００８２】

本明細書で使用される場合、「プローブオリゴヌクレオチド」または「プローブオリゴデオキシヌクレオチド」は、標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを指す。

【００８３】

「標的オリゴヌクレオチド」または「標的オリゴデオキシヌクレオチド」は、（例えばハイブリダイゼーションにより）検出されるべき分子を指す。

【００８４】

「ｍｉＲ特異的プローブオリゴヌクレオチド」または「ｍｉＲに特異的なプローブオリゴヌクレオチド」は、特定のｍｉＲにハイブリダイズする、または特定のｍｉＲの逆転写物にハイブリダイズするように選択される配列を有するプローブオリゴヌクレオチドを意味する。

【００８５】

特定の試料の「発現プロファイル」または「ハイブリダイゼーションプロファイル」は、本質的に試料の状態のフィンガープリントであり、２つの状態が同様に発現した任意の特定遺伝子を有し得るが、いくつかの遺伝子の評価は、同時に、細胞の状態に一意の遺伝子発現プロファイルの生成を可能とする。すなわち、正常細胞を癌細胞から区別することができ、癌細胞内で、異なる予後状態（良好または不良な長期的生存の見通し）を決定することができる。異なる状態の癌細胞の発現プロファイルを比較することにより、これらの状態のそれぞれにおいてどの遺伝子が重要か（遺伝子の上方および下方制御の両方を含む）に関する情報が得られる。

【００８６】

異なる予後結果となる差次的発現と同様に、癌細胞または正常細胞中に特異的に発現した配列の同定により、この情報をさまざまな様式で使用することができる。例として、（例えば化学療法薬が特定の患者において長期予後を改善するように作用するかどうかを決定するために）特定の治療計画を評価することができる。

同様に、患者試料を既知の発現プロファイルと比較することにより、診断を行う、または確認することができる。さらに、これらの遺伝子発現プロファイル（または個々の遺伝子）により、癌発現プロファイルを抑制する、または不良予後プロファイルをより良好な予後プロファイルに変換する薬剤候補をスクリーニングすることができる。

【００８７】

したがって、本発明は、対象が癌を有している、または発病する危険性があるかどうかを診断する方法を提供し、該方法は、対象から得られた試験試料からのＲＮＡを逆転写して、１組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供するステップと、該標的オリゴデオキシヌクレオチドを、ｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供するステップと、該試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料から生成されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較するステップとを含み、少なくとも１つのｍｉＲＮＡの信号の変化は、対象が癌を有している、または発病する危険性があることを示している。

【００８８】

一実施形態において、該マイクロアレイは、ヒトｍｉＲＮｏｍｅの実質的部分に対するｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含む。

【００８９】

該マイクロアレイは、既知のｍｉＲＮＡ配列から生成された遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブから調製することができる。該アレイは、各ｍｉＲＮＡに対し、１つは活性な成熟配列を含有し、他方はｍｉＲＮＡの前駆体に特異的である、２つの異なるオリゴヌクレオチドプローブを含有してもよく、該アレイはまた、ハイブリダイゼーションの厳密性条件のための対照として機能し得る対照、例えばヒト相同分子種と数塩基分しか違わない１つもしくは複数のマウス配列を含有してもよい。また、両方の種からのｔＲＮＡをマイクロチップ上にプリントし、特定のハイブリダイゼーションの、内部の比較的安定な陽性対照を提供することができる。また、非特異的ハイブリダイゼーションの１つもしくは複数の適切な対照をマイクロチップ上に含めてもよい。この目的のために、配列は、任意の既知のｍｉＲＮＡとのいかなるホモロジーも存在しないことを基準として選択される。

【００９０】

該マイクロアレイは、当技術分野で知られた技術を使用して製造することができる。例として、適切な長さ、例えば４０ヌクレオチドのプローブオリゴヌクレオチドは、Ｃ６位で５’－アミン改質され、市販のマイクロアレイシステム、例えばＧｅｎｅＭａｃｈｉｎｅ　ＯｍｎｉＧｒｉｄ（商標）１００　ＭｉｃｒｏａｒｒａｙｅｒおよびＡｍｅｒｓｈａｍ　ＣｏｄｅＬｉｎｋ（商標）活性化スライド等を使用してプリントされる。標的ＲＮＡに対応する標識化ｃＤＮＡオリゴマーは、標的ＲＮＡを標識化プライマーで逆転写することにより調製される。第１の鎖合成の後、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドは、変性してＲＮＡ鋳型を分解する。次いで、このように調製された標識化標的ｃＤＮＡは、例えば６Ｘ　ＳＳＰＥ／３０％ホルムアミドで２５℃で１８時間、次いで０．７５Ｘ　ＴＮＴ中３７℃で４０分洗浄等のハイブリダイズ条件下で、マイクロアレイチップにハイブリダイズされる。固定されたプローブＤＮＡが試料中の相補的標的ｃＤＮＡを認識するアレイ上の部分で、ハイブリダイゼーションが生じる。標識化標的ｃＤＮＡは、アレイ上の結合が生じる正確な位置をマークし、自動検出および定量化を可能とする。出力は、ハイブリダイゼーションイベントのリストからなり、特定のｃＤＮＡ配列の相対存在量を示し、したがって患者試料中の対応する相補的ｍｉＲの相対存在量を示す。一実施形態によれば、該標識化ｃＤＮＡオリゴマーは、ビオチン標識化プライマーから調製されたビオチン標識化ｃＤＮＡである。次いで、該マイクロアレイは、例えばＳｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－Ａｌｅｘａ６４７複合体を使用したビオチン含有転写物の直接検出により処理され、従来のスキャン方法を利用してスキャンされる。該アレイ上の各スポットの画像強度は、患者試料中の対応するｍｉＲの存在量に比例する。

【００９１】

該アレイの使用は、ｍｉＲＮＡ発現検出にとっていくつかの利点を有する。第１に、１時点で同じ試料から数百遺伝子の広範囲の発現を同定することができる。第２に、オリゴヌクレオチドの慎重な設計により、成熟分子および前駆体分子の両方の発現を同定することができる。第３に、ノーザンブロット分析と比較して、チップは少量のＲＮＡを必要とし、２．５μｇの全ＲＮＡを使用して再現可能な結果を提供する。比較的限られた数のｍｉＲＮＡ（種毎に数百個）により、それぞれの種に対し異なるオリゴヌクレオチドプローブを備える、いくつかの種に共通のマイクロアレイの構築が可能となる。そのようなツールは、様々な条件下での、それぞれの既知のｍｉＲに対する種を超えた発現の分析を可能とする。

【００９２】

特定のｍｉＲの定量的発現レベル検定の使用に加え、ｍｉＲＮｏｍｅの実質的部分に対応する、好ましくはｍｉＲＮｏｍｅ全体に対応するｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含有するマイクロチップを使用して、ｍｉＲ発現パターンの分析のために、ｍｉＲ遺伝子発現プロファイリングを行うことができる。異なるｍｉＲシグネチャーは、確立された疾患マーカーと関連付けることができ、または直接疾患状態に関連付けることができる。

【００９３】

本明細書に記載される発現プロファイリング法によれば、癌を有する疑いのある対象の試料からの全ＲＮＡは、定量的に逆転写されて、試料中のＲＮＡに相補的な１組の標識化標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供する。次いで、標的オリゴデオキシヌクレオチドは、ｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズされ、試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供する。その結果、試料中のｍｉＲＮＡの発現パターンを表す、試料のハイブリダイゼーションプロファイルが得られる。該ハイブリダイゼーションプロファイルは、試料からの標的オリゴデオキシヌクレオチドの、マイクロアレイ中のｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドに対する結合からの信号を含む。該プロファイルは、結合の存在または不在（信号対ゼロ信号）として記録され得る。より好適には、記録されるプロファイルは、各ハイブリダイゼーションからの信号の強度を含む。該プロファイルは、正常、すなわち非癌性の対照試料から生成されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較される。信号の変化は、対象における癌の存在を示している。

【００９４】

ｍｉＲ遺伝子発現を測定するためのその他の技術もまた、当技術分野の範囲内であり、ＲＮＡ転写および分解の割合を測定するための様々な技術が含まれる。

【００９５】

本発明はまた、１つもしくは複数の予後診断マーカーに関連した癌を診断する方法を提供し、該方法は、対象からの癌試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップと、癌試験試料中の該少なくとも１つのｍｉＲのレベルを、対照試料中の対応するｍｉＲのレベルと比較するステップとを含む。対照試料と相対的な試験試料中の少なくとも１つのｍｉＲＮＡの信号の変化（例えば、増加、減少等）は、対象が１つもしくは複数の予後診断マーカーに関連した癌を有している、または発病する危険性があることを示している。

【００９６】

該癌は、悪い（すなわち不良な）予後に関連したマーカー、または良い（すなわち良好な）予後に関連したマーカーを含む、１つもしくは複数の予後診断マーカーまたは特性と関連し得る。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される方法を使用して診断される癌は、１つもしくは複数の悪い予後特性と関連する。

【００９７】

これらの予後診断マーカーのそれぞれと関連した癌細胞において発現が変化した特定のマイクロＲＮＡが、本明細書に記載される。一実施形態において、該少なくとも１つのｍｉＲのレベルは、対象から得られた試験試料からのＲＮＡを逆転写して、１組の標的オリゴ

デオキシヌクレオチドを提供し、標的オリゴデオキシヌクレオチドを、ｍｉＲＮＡ特異的プローブオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイにハイブリダイズさせて、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、試験試料のハイブリダイゼーションプロファイルを、対照試料から生成されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較することにより測定される。

【００９８】

いかなる一理論にも束縛されることを望まないが、細胞内の１つもしくは複数のｍｉＲのレベルの変化が、これらのｍｉＲの１つもしくは複数の意図される標的の脱制御をもたらす可能性があり、よって癌の形成へとつながり得ると考えられる。

【００９９】

したがって、（例えば、ＣＬＬ細胞において上方制御されたｍｉＲのレベルを低下させることにより、または癌細胞において下方制御されたｍｉＲのレベルを増加させることにより）ｍｉＲのレベルを変化させることは、癌の治療を成功させる可能性がある。癌細胞において脱制御されるｍｉＲＮＡの推定遺伝子の標的の例が、本明細書に記載される。

【０１００】

したがって、本発明は、対象における癌を治療する方法を包含し、少なくとも１つのｍｉＲは、対象の癌細胞において脱制御（例えば下方制御、上方制御等）されている。該少なくとも１つの単離ｍｉＲが癌細胞において下方制御されている場合、該方法は、対象の癌細胞の増殖が阻害されるように、有効量の該少なくとも１つの単離ｍｉＲを投与するステップを含む。該少なくとも１つの単離ｍｉＲが癌細胞において上方制御されている場合、該方法は、癌細胞の増殖が阻害されるように、有効量の該少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子の発現を阻害するための化合物（本明細書においてはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物と呼ばれる）を対象に投与するステップを含む。

【０１０１】

「治療する」、「治療すること」および「治療」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば癌などの疾患または病状に関連した症状を改善することを指し、疾患症状の発症を予防もしくは遅延させること、および／または疾患もしくは病状の症状の重症度もしくは頻度を低下させることを含む。本明細書において、「対象」および「個人」という用語は、哺乳動物等の動物を含むように定義され、霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、ネズミ、またはその他のウシ科、ヒツジ科、ウマ科、イヌ科、ネコ科、げっ歯類、もしくはネズミ科の種を含む。好ましい実施形態において、該動物は、ヒトである。

【０１０２】

本明細書において使用される場合、単離ｍｉＲの「有効量」は、癌に罹患した対象における癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量である。当業者は、対象の大きさおよび体重、疾患の浸透度、対象の年齢、健康および性別、投与経路、ならびに投与が局所性か全身性か等の因子を考慮することにより、所与の対象に投与されるべきｍｉＲの有効量を容易に決定することができる。

【０１０３】

例えば、単離ｍｉＲの有効量は、治療される対象の近似的または推定体重に基づくことができる。そのような有効量は、本明細書に記載のように、非経口または経腸的に投与されることが好ましい。例えば、対象に投与される単離ｍｉＲの有効量は、約５～３０００マイクログラム／体重ｋｇの範囲であるか、約７００～１０００マイクログラム／体重ｋｇの範囲であるか、または約１０００マイクログラム／体重ｋｇを超えることができる。

【０１０４】

また、当業者は、所与の対象への単離ｍｉＲの投与に適切な投薬計画を容易に決定することができる。例えば、ｍｉＲは、（例えば、単回投与または単回沈着等として）対象に１回投与することができる。代替として、ｍｉＲは、約３日間から約２８日間、より具体的には約７日間から約１０日間、対象に１日１回または２回投与することができる。具体的な投薬計画において、ｍｉＲは、７日間、１日１回投与される。投薬計画が複数の投与を

含む場合、対象に投与されるｍｉＲの有効量は、全投薬計画にわたり投与されるｍｉＲの総量を含み得ることが理解される。

【０１０５】

本明細書において使用される「単離」ｍｉＲは、人間の介入により合成された、もしくは自然の状態から変化した、もしくは除去されたものである。例えば、合成ｍｉＲ、またはその自然の状態の共存物質から部分的または完全に分離されたｍｉＲが、「単離」されたとみなされる。単離ｍｉＲは、実質的に精製された形態で存在し得るか、またはｍｉＲが送達されている細胞に存在し得る。したがって、細胞に意図的に送達された、または細胞中に発現したｍｉＲが、「単離」ｍｉＲとみなされる。ｍｉＲ前駆体分子から細胞内で生成されたｍｉＲもまた、「単離」された分子とみなされる。

【０１０６】

単離ｍｉＲは、いくつかの標準的技術を使用して得ることができる。例えば、該ｍｉＲは、当技術分野において知られた方法を使用して化学的に合成または組み換えにより生成することができる。一実施形態において、ｍｉＲは、適切に保護されたリボヌクレオシドホスホロアミダイトおよび従来のＤＮＡ／ＲＮＡ合成装置を使用して化学的に合成される。合成ＲＮＡ分子または合成試薬の販売供給業者は、例えば、Ｐｒｏｌｉｇｏ社（Ｈａｍｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社（Ｌａｆａｙｅｔｔｅ、ＣＯ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ社（Ｐｅｒｂｉｏ Ｓｃｉｅｎｃｅ社の一部、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）、Ｇｌｅｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社（Ｓｔｅｒｌｉｎｇ、ＶＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）、ＣｈｅｍＧｅｎｅｓ社（Ａｓｈｌａｎｄ、ＭＡ、Ｕ．Ｓ．Ａ．）およびＣｒｕａｃｈｅｍ社（Ｇｌａｓｇｏｗ、ＵＫ）を含む。

【０１０７】

代替として、該ｍｉＲは、任意の好適なプロモーターを使用して、組み換え環状または線状ＤＮＡプラスミドから発現させることができる。プラスミドからのＲＮＡの発現に好適なプロモーターは、例えば、Ｕ６もしくはＨｌ ＲＮＡ ｐｏｌ ＩＩＩプロモーター配列、またはサイトメガロウイルスプロモーターを含む。その他の好適なプロモーターの選択は、当技術分野の範囲内である。本発明の組み換えプラスミドはまた、癌細胞内の該ｍｉＲの発現のための誘導プロモーターまたは制御可能なプロモーターを含むことができる。

【０１０８】

組み換えプラスミドから発現した該ｍｉＲは、標準的技術により、培養細胞発現系から単離することができる。組み替えプラスミドから発現させた該ｍｉＲはまた、癌細胞に送達することができ、また癌細胞中で直接発現させることができる。癌細胞に該ｍｉＲを送達するための組み換えプラスミドの使用は、以下でより詳細に説明する。

【０１０９】

該ｍｉＲは、別個の組み換えプラスミドから発現させることができ、または同じ組み換えプラスミドから発現させることができる。一実施形態において、該ｍｉＲは、単一プラスミドからのＲＮＡ前駆体分子として発現され、癌細胞内に既存のプロセシングシステムを含むがこれらに限定されない好適なプロセシングシステムにより、前駆体分子が機能的ｍｉＲにプロセシングされる。その他の好適なプロセシングシステムは、例えば、ｉｎ ｖｉｔｒｏショウジョウバエ細胞溶解物システム（例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｔｕｓｃｈｌらによる米国特許公開第２００２／００８６３５６号に記載のもの等）および大腸菌ＲＮＡｓｅ ＩＩＩシステム（例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｙａｎｇらによる米国特許公開第２００４／００１４１１３号に記載のもの等）を含む。

【０１１０】

該ｍｉＲの発現に好適なプラスミドの選択、該ｍｉＲを発現させるために該プラスミドに核酸配列を挿入するための方法、および組み替えプラスミドを対象となる細胞に送達する方法の選択は、当技術分野の範囲内である。例えば、参照によりその全開示内容が本明細

書に組み込まれる、Ｚｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ９：１３２７－１３３３；Ｔｕｓｃｈｌ（２００２），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２０：４４６－４４８；Ｂｒｕｍｍｅｌｋａｍｐ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９６：５５０－５５３；Ｍｉｙａｇｉｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：４９７－５００；Ｐａｄｄｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１６：９４８－９５８；Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：５００－５０５；およびＰａｕｌ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：５０５－５０８を参照されたい。

【０１１１】

一実施形態において、該ｍｉＲを発現するプラスミドは、ＣＭＶ中間体早期プロモーターの制御下でｍｉＲ前駆体ＲＮＡをコード化する配列を含む。本明細書において使用される、プロモーターの「制御下」とは、プロモーターがｍｉＲコード配列の転写を開始することができるように、ｍｉＲをコード化する核酸配列がプロモーターの３’に位置することを意味する。

【０１１２】

該ｍｉＲはまた、組み換えウイルスベクターから発現させることもできる。該ｍｉＲは、２つの別個の組み換えウイルスベクターから、または同じウイルスベクターから発現させることができることが企図される。該組み換えウイルスベクターから発現したＲＮＡは、標準的技術を使用して培養細胞発現系から単離することができ、または、癌細胞中に直接発現させることができる。癌細胞に該ｍｉＲを送達するための組み換えウイルスベクターの使用は、以下でより詳細に説明する。

【０１１３】

本発明の組み換えウイルスベクターは、該ｍｉＲをコード化する配列、および該ＲＮＡ配列を発現させるための任意の好適なプロモーターを含む。好適なプロモーターは、例えば、Ｕ６もしくはＨｌ ＲＮＡ ｐｏｌ ＩＩＩプロモーター配列、またはサイトメガロウイルスプロモーターを含む。その他の好適なプロモーターの選択は、当技術分野の範囲内である。本発明の組み換えウイルスベクターはまた、癌細胞内の該ｍｉＲの発現のための誘導プロモーターまたは制御可能なプロモーターを含むことができる。

【０１１４】

該ｍｉＲのコード配列を受容することができる任意のウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（ＡＶ）由来のベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レトロウイルス（例えばレンチウイルス（ＬＶ）、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス等）、ヘルペスウイルス等を使用することができる。ウイルスベクターの指向性は、外膜タンパク質もしくはその他のウイルスからのその他の表面抗原によるベクターの偽型化により、または異なるウイルスカプシドタンパク質を置換することにより、必要に応じて変更することができる。

【０１１５】

例えば、本発明のレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）、狂犬病、エボラ、モコラ等からの表面タンパク質で偽型化され得る。本発明のＡＡＶベクターは、異なるカプシドタンパク質血清型を発現するように該ベクターを操作することにより、異なる細胞を標的とするように作製できる。例えば、血清型２ゲノムに血清型２カプシドを発現するＡＡＶベクターは、ＡＡＶ２／２と呼ばれる。ＡＡＶ２／２ベクターにおける血清型２カプシド遺伝子は、血清型５カプシド遺伝子により置き換えられ、ＡＡＶ ２／５ベクターを生成し得る。異なるカプシドタンパク質血清型を発現するＡＡＶベクターを構築するための技術は、当技術分野の範囲内であり、例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚ，Ｊ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７６：７９１－８０１を参照されたい。

【０１１６】

本発明における使用に好適な組み換えウイルスベクターの選択、ＲＮＡを発現させるため

に核酸配列を該ベクターに挿入するための方法、該ウイルスベクターを対象となる細胞に送達するための方法、および発現したＲＮＡ生成物の回収は、当技術分野の範囲内である。例えば、参照することによりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｄｏｒｎｂｕｒｇ（１９９５），Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐ．２：３０１－３１０；Ｅｇｌｉｔｉｓ（１９８８），Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６０８－６１４；Ｍｉｌｌｅｒ（１９９０），Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐ．１：５－１４；およびＡｎｄｅｒｓｏｎ（１９９８），Ｎａｔｕｒｅ ３９２：２５－３０を参照されたい。

【０１１７】

特に好適なウイルスベクターは、ＡＶおよびＡＡＶから得られるものである。該ｍｉＲを発現させるための好適なＡＶベクター、組み換えＡＶベクターを構築するための方法、および該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｘｉａ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２０：１００６－１０１０に記載されている。該ｍｉＲを表現させるための好適なＡＡＶベクター、組み換えＡＡＶベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８７），Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６１：３０９６－３１０１；Ｆｉｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｊ．Ｖｉｒｏｌ，７０：５２０－５３２；Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８９），Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：３８２２－３８２６；米国特許第５，２５２，４７９号；米国特許第５，１３９，９４１号；国際特許出願第ＷＯ９４／１３７８８号；および国際特許出願第ＷＯ９３／２４６４１号に記載されている。一実施例において、該ｍｉＲは、ＣＭＶ中間体早期プロモーターを含む単一組み換えＡＡＶベクターから発現される。

【０１１８】

ある特定の実施形態において、本発明の組み換えＡＡＶウイルスベクターは、ヒトＵ６ＲＮＡプロモーターの制御下でポリＴ終止配列と操作可能に接続したｍｉＲ前駆体ＲＮＡをコード化する核酸配列を含む。本明細書で使用される、「ポリＴ終止配列と操作可能に接続した」とは、センスまたはアンチセンス鎖をコード化する核酸配列が５’方向のポリＴ終止シグナルのすぐ隣にあることを意味する。該ベクターからの該ｍｉＲの配列の転写中、ポリＴ終止シグナルは、転写を終止するように機能する。

【０１１９】

本発明の治療方法の他の実施形態において、ｍｉＲ発現を阻害する有効量少なくとも１種の化合物を対象に投与することもできる。本明細書において使用される、「ｍｉＲ発現を阻害する」とは、治療後の活性な成熟した形態のｍｉＲの生成が、治療前に生成された量より少ないことを意味する。当業者は、例えば、診断方法に関して上述したｍｉＲ転写レベルを決定するための技術を使用して、癌細胞においてｍｉＲ発現が阻害されているかどうかを容易に決定することができる。阻害は、遺伝子発現のレベルで（すなわち、ｍｉＲをコード化するｍｉＲ遺伝子の転写を阻害することにより）、またはプロセシングのレベルで（すなわち、ｍｉＲ前駆体の成熟した活性なｍｉＲへのプロセシングを阻害することにより）生じ得る。

【０１２０】

本明細書において使用される場合、ｍｉＲ発現を阻害する化合物の「有効量」は、癌関連染色体特性に関連した癌を患う対象における癌細胞の増殖を阻害するのに十分な量である。当業者は、対象の大きさおよび体重、疾患の浸透度、対象の年齢、健康および性別、投与経路、ならびに投与が局所性か全身性か等の因子を考慮することにより、所与の対象に投与されるべきｍｉＲ発現阻害化合物の有効量を容易に決定することができる。

【０１２１】

例えば、発現阻害化合物の有効量は、治療される対象の近似的または推定体重に基づくことができる。そのような有効量は、本明細書に記載のように、とりわけ非経口または経腸的に投与される。例えば、対象に投与される発現阻害化合物の有効量は、約５～３０００マイクログラム／体重ｋｇの範囲であるか、約７００～１０００マイクログラム／体重ｋ

ｇの範囲であるか、または約１０００マイクログラム／体重ｋｇを超えることができる。

【０１２２】

また、当業者は、所与の対象へｍｉＲ発現を阻害する化合物を投与するのに適切な投薬計画を容易に決定することができる。例えば、発現阻害化合物は、（例えば、単回投与または単回沈着等として）対象に１回投与することができる。代替として、発現阻害化合物は、約３日間から約２８日間、より好ましくは約７日間から約１０日間、対象に１日１回または２回投与することができる。具体的な投薬計画において、発現阻害化合物は、７日間、１日１回投与される。投薬計画が複数の投与を含む場合、対象に投与される発現阻害化合物の有効量は、全投薬計画にわたり投与される化合物の総量を含み得ることが理解される。

【０１２３】

ｍｉＲ遺伝子発現を阻害するための好適な化合物は、二本鎖ＲＮＡ（例えば、低分子もしくは小分子の干渉ＲＮＡつまり「ｓｉＲＮＡ」等）、アンチセンス核酸、およびリボザイム等の酵素ＲＮＡ分子を含む。これらの化合物のそれぞれは、所与のｍｉＲに標的化され、標的ｍｉＲを破壊する、または、標的ｍｉＲの破壊を誘引することができる。

【０１２４】

例えば、所与のｍｉＲ遺伝子の発現は、該ｍｉＲの少なくとも一部と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％または１００％の配列ホモロジーを有する、単離二本ＲＮＡ（「ｄｓＲＮＡ」）分子によるｍｉＲ遺伝子のＲＮＡ干渉を誘引することにより阻害され得る。具体的な実施形態において、該ｄｓＲＮＡ分子は、「低分子もしくは小分子の干渉ＲＮＡ」つまり「ｓｉＲＮＡ」である。

【０１２５】

本発明の方法において有用なｓｉＲＮＡは、約１７ヌクレオチドから約２９ヌクレオチドの長さの、好ましくは約１９から約２５ヌクレオチドの長さの、低分子二本鎖ＲＮＡを含む。該ｓｉＲＮＡは、標準的なワトソン－クリック塩基対相互作用により互いにアニールされた（以降「塩基対化された」）、センスＲＮＡ鎖および相補的なアンチセンスＲＮＡ鎖を含む。該センス鎖は、標的ｍｉＲ内に含有される核酸配列と実質的に同一の核酸配列を含む。

【０１２６】

本明細書において使用される場合、標的ｍＲＮＡ内に含有される標的配列と「実質的に同一の」ｓｉＲＮＡ中の核酸配列は、該標的配列と同一の、または１つもしくは２つの核酸だけ該標的配列と異なる核酸配列である。該ｓｉＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、２つの相補的な一本鎖ＲＮＡ分子を含み得るか、または２つの相補的部分が塩基対化され、一本鎖「ヘアピン」領域により共有結合している単一分子を含み得る。

【０１２７】

該ｓｉＲＮＡはまた、１つもしくは複数のヌクレオチドの追加、削除、置換および／または改変により、自然発生ＲＮＡとは異なる改変ＲＮＡであってもよい。そのような改変は、該ｓｉＲＮＡの末端（複数を含む）もしくは該ｓｉＲＮＡの１つもしくは複数の内部ヌクレオチド等への非ヌクレオチド物質の追加、または該ｓｉＲＮＡをヌクレアーゼ分解に耐性化させる改質、または該ｓｉＲＮＡ内の１つもしくは複数のヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドとの置換を含み得る。

【０１２８】

また、該ｓｉＲＮＡの１つまたは両方の鎖は、３’オーバーハングを含んでもよい。本明細書において使用される「３’オーバーハング」は、二本のＲＮＡ鎖の３’－末端から延長した少なくとも１つの不対ヌクレオチドを指す。したがって、ある特定の実施形態において、該ｓｉＲＮＡは、１から約６ヌクレオチド（リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む）の長さ、１から約５ヌクレオチドの長さ、１から約４ヌクレオチドの長さ、または約２から約４ヌクレオチドの長さの少なくとも１つの３’オーバーハングを含む。ある特定の実施形態において、該ｓｉＲＮＡの両方の鎖に３’オーバーハングが存在し、２ヌクレオチドの長さである。例えば、該ｓｉＲＮＡの各鎖は、ジチミジル酸（

「ＴＴ」）またはジウリジル酸（「ｕｕ」）の３’オーバーハングを含み得る。

【０１２９】

該ｓｉＲＮＡは、化学的もしくは生物学的に生成することができ、または単離ｍｉＲに関して上述したように、組み換えプラスミドもしくはウイルスベクターから発現させることができる。ｄｓＲＮＡまたはｓｉＲＮＡ分子を生成および試験するための例示的方法は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｇｅｗｉｒｔｚによる米国特許出願公開第２００２／０１７３４７８号、およびＲｅｉｃｈらによる米国特許出願公開第２００４／００１８１７６号に記載されている。

【０１３０】

また、所与のｍｉＲ遺伝子の発現は、アンチセンス核酸により阻害され得る。本明細書において使用される「アンチセンス核酸」は、標的ＲＮＡの活性を改変する、ＲＮＡ－ＲＮＡまたはＲＮＡ－ＤＮＡまたはＲＮＡ－ペプチド核酸相互作用により標的ＲＮＡに結合する核酸分子を指す。本発明の方法における使用に好適なアンチセンス核酸は、一般にｍｉＲ中の連続核酸配列と相補的な核酸配列を含む一本鎖核酸（例えばＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡキメラ、ＰＮＡ等）である。アンチセンス核酸は、ｍｉＲ中の連続核酸配列と５０～１００％相補的、７５～１００％相補的、または９５～１００％相補的な核酸配列を含み得る。該ｍｉＲの核酸配列は、本明細書に提供される。いかなる理論にも束縛されることを望まないが、アンチセンス核酸は、ｍｉＲ／アンチセンス核酸二本鎖を分解するＲＮａｓｅ　Ｈまたは別の細胞ヌクレアーゼを活性化すると考えられている。

【０１３１】

また、アンチセンス核酸は、標的特異性、ヌクレアーゼ耐性、送達、または分子の有効性に関連したその他の特性を高めるための、核酸骨格または糖および塩基部分（もしくはそれらの同等物）への改質も含有し得る。そのような改質は、コレステロール部分、アクリジン等の二本鎖インターカレータ（ｄｕｐｌｅｘ　ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｏｒ）、または１つもしくは複数のヌクレアーゼ耐性基を含む。

【０１３２】

アンチセンス核酸は、化学的もしくは生物学的に生成することができ、または単離ｍｉＲに関して上述したように、組み換えプラスミドもしくはウイルスベクターから発現させることができる。生成または試験のための例示的な方法は、当技術分野の範囲内であり、例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｓｔｅｉｎ　ａｎｄ　Ｃｈｅｎｇ　（１９９３），　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６１：１００４およびＷｏｏｌｆ　らによる米国特許第５，８４９，９０２号を参照されたい。

【０１３３】

また、所与のｍｉＲ遺伝子の発現は、酵素核酸により阻害され得る。本明細書において使用される「酵素核酸」は、ｍｉＲの連続核酸配列との相補性を有する基質結合領域を含み、ｍｉＲを特異的に切断することができる核酸を指す。酵素核酸基質結合領域は、例えば、ｍｉＲ中の連続核酸配列と５０～１００％相補的、７５～１００％相補的、または９５～１００％相補的な核酸配列であってもよい。酵素核酸はまた、塩基、糖、および／またはホスフェート基において改質を含むことができる。本発明の方法における使用のための例示的酵素核酸は、リボザイムである。

【０１３４】

酵素核酸は、化学的もしくは生物学的に生成することができ、または単離ｍｉＲに関して上述したように、組み換えプラスミドもしくはウイルスベクターから発現させることができる。ｄｓＲＮＡまたはｓｉＲＮＡ分子を生成および試験するための例示的方法は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｗｅｒｎｅｒ　ａｎｄ　Ｕｈｌｅｎｂｅｃｋ　（１９９５），　Ｎｕｃｌ．　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　２３：２０９２－９６；　Ｈａｍｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．　（１９９９），　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　ａｎｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｖ．　９：２５－３１；およびＣｅｃｈらによる米国特許第４，９８７，０７１号に記載されている。

【０１３５】

少なくとも１つのｍｉＲ、またはｍｉＲ発現を阻害するための少なくとも１つの化合物は、癌関連染色体特性に関連した癌を有する対象の癌細胞の増殖を阻害する。本明細書において使用される「癌細胞の増殖を阻害する」とは、癌細胞を殺す、または癌細胞の増殖を永久もしくは一時的に阻むもしくは遅速化させることを意味する。対象の癌細胞の増殖数が、ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物の投与後に一定を維持した、または減少した場合に、癌細胞の増殖が阻害されたと推断することができる。また、癌細胞の絶対数は増加したが、腫瘍の増殖速度が減少した場合に、癌細胞の増殖が阻害されたと推断することができる。

【０１３６】

対象の体内の癌細胞の数は、直接測定により、または原発腫瘤もしくは転移性腫瘤の大きさからの推定により決定することができる。例えば、対象における癌細胞の数は、免疫組織学的方法、フローサイトメトリー、または癌細胞の特徴的表面マーカーを検出するように設計されたその他の技術により、測定することができる。

【０１３７】

ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物は、これらの化合物を対象の癌細胞に送達するのに好適な任意の手段により対象に投与することができる。例えば、ｍｉＲまたはｍｉＲ発現阻害化合物は、これらの化合物、またはこれらの化合物をコード化する配列を含む核酸を対象の細胞に導入するのに好適な方法により投与することができる。一実施形態において、癌細胞には、少なくとも１つのｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物をコード化するプラスミドまたはウイルスベクトルが導入される。

【０１３８】

真核細胞に対する導入方法は当技術分野において周知であり、例えば、細胞の核または前核中への核酸の直接注入；電気穿孔法；リポソーム輸送または親油性物質により媒介される輸送；受容体媒介核酸送達、バイオバリスティック（ｂｉｏｂａｌｌｉｓｔｉｃ）つまり粒子加速；リン酸カルシウム沈殿、およびウイルスベクターにより媒介される導入を含む。

【０１３９】

例えば、細胞には、リポソーム輸送化合物、例えばＤＯＴＡＰ（Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－アンモニウムメチルサルフェート、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ社）またはその等価物、例えばＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ等を導入することができる。使用される核酸の量は、本発明の実践には重要ではないが、０．１～１００マイクログラムの核酸／10^5細胞で、許容される結果を得ることができる。例えば、10^5細胞あたりＤＯＴＡＰ３マイクログラム中約０．５マイクログラムのプラスミドベクターの比率を使用することができる。

【０１４０】

また、ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物は、任意の好適な経腸または非経口投与経路により、対象に投与することができる。本発明の方法に好適な経腸投与経路は、例えば、経口送達、直腸送達、または鼻内送達を含む。好適な非経口投与経路は、例えば、血管内投与（例えば、静脈内ボーラス注射、静脈内注入、動脈内ボーラス注射、動脈内注入、および脈管へのカテーテル点滴等）；組織周囲および内部注射（例えば、腫瘍周囲注射および腫瘍内注射、網膜内注射、または網膜下注射）；（例えば、浸透圧ポンプによる）皮下注入を含む皮下注射または沈積；例えば、カテーテルまたはその他の留置デバイス（例えば、網膜ペレット（ｒｅｔｉｎａｌ　ｐｅｌｌｅｔ）、または坐薬、または多孔質、非多孔質もしくはゼラチン状材料を含むインプラント）による、対象となる組織への直接適用；ならびに吸入を含む。特に好適な投与経路は、患者への注射、注入および静脈内投与である。

【０１４１】

本発明の方法において、ｍｉＲまたはｍｉＲ発現阻害化合物は、送達試薬と組み合わせた裸のＲＮＡとして、またはｍｉＲもしくは発現阻害化合物を発現させる配列を含む核酸（例えば、組み換えプラスミドまたはウイルスベクター）として、対象に投与することがで

きる。好適な送達試薬は、例えば、Ｍｉｒｕｓ　Ｔｒａｎｓｉｔ　ＴＫＯ親油性試薬；リポフェクチン；リポフェクタミン；セルフェクチン；ポリカチオン（例えばポリリシン）、およびリポソームを含む。

【０１４２】

該ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物を発現させる配列を含む組み換えプラスミドおよびウイルスベクター、ならびにそのようなプラスミドおよびベクターを癌細胞に送達するための技術が、本明細書で説明される。

【０１４３】

具体的な実施形態において、ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコード化する配列を含む核酸）を対象に送達するためにリポソームが使用される。リポソームはまた、ｓまたは核酸の血液半減期を増加させることができる。本発明における使用に好適なリポソームは、一般に中性または負に帯電したリン脂質およびコレステロール等のステロールを含む、標準的な小胞形成脂質から形成することができる。脂質の選択は、一般に、所望の脂質の大きさおよびリポソームの血液流中の半減期等の因子を考慮することにより導出される。例えば、参照することによりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｓｚｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．（１９８０），Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｅｎｇ．９：４６７；ならびに米国特許第４，２３５，８７１号、第４，５０１，７２８号、第４，８３７，０２８号、および第５，０１９，３６９号に記載のように、リポソームを調製するための様々な方法が知られている。

【０１４４】

本発明の方法における使用のためのリポソームは、リポソームを癌細胞に標的化させる配位子分子を含むことができる。腫瘍細胞抗原に結合するモノクローナル抗体等の、癌細胞に高頻度で見られる受容体に結合する配位子が好ましい。

【０１４５】

また、本発明の方法における使用のためのリポソームは、単核マクロファージ系（「ＭＭＳ」）および細網内皮系（「ＲＥＳ」）による一掃を避けるために改質されてもよい。そのような改質リポソームは、表面上にある、またはリポソーム構造に組み込まれたオプソニン化阻害部分を有する。特に好ましい実施形態において、本発明のリポソームは、オプソニン化阻害部分および配位子の両方を備えることができる。

【０１４６】

本発明のリポソームの調製における使用のためのオプソニン化阻害部分は、典型的には、リポソーム膜に結合した大型の親水性ポリマーである。本明細書において使用される場合、オプソニン化阻害部分は、例えば、脂溶性アンカーの膜自体へのインターカレーションにより、または膜脂質の活性基への直接的な結合により化学的または物理的に膜に結合したとき、リポソーム膜に「結合」する。これらのオプソニン化阻害親水性ポリマーは、例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、米国特許第４，９２０，０１６号に記載のように、ＭＭＳおよびＲＥＳによるリポソームの摂取を大幅に減少させる保護表面層を形成する。

【０１４７】

リポソームを改質するのに好適なオプソニン化阻害部分は、好ましくは、約５００から約４０，０００ダルトン、より好ましくは約２，０００から約２０，０００ダルトンの数平均分子量を有する、水溶性ポリマーである。そのようなポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）またはポリプロピレングリコール（ＰＰＧ）誘導体；例えば、メトキシＰＥＧまたはＰＰＧ、およびステアリン酸ＰＥＧまたはＰＰＧ；合成ポリマー、例えば、ポリアクリルアミドまたはポリＮ－ビニルピロリドン；直鎖、分岐鎖、またはデンドリマー状ポリアミドアミン；ポリアクリル酸；ポリアルコール、例えば、カルボン酸基またはアミノ基が化学的に結合したポリビニルアルコールおよびポリキシリトール、ならびにガングリオシド、例えば、ガングリオシドＧＭｌを含む。ＰＥＧ、メトキシＰＥＧ、もしくはメトキシＰＰＧのコポリマー、またはそれらの誘導体もまた好適である。さらに、オプソニン化阻害ポリマーは、ＰＥＧと、ポリアミノ酸、多糖類、ポリアミドアミン、ポリエチ

レンアミン、またはポリヌクレオチドとのブロックコポリマーであってもよい。オプソニン化阻害ポリマーはまた、アミノ酸もしくはカルボン酸を含有する天然多糖類、例えば、ガラクツロン酸、グルクロン酸、マンヌロン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、ノイラミン酸、アルギン酸、カラギーナン等；アミノ化多糖類もしくはオリゴ糖類（直鎖もしくは分岐鎖）；または、例えば、炭酸の誘導体と反応した結果カルボン酸基を有するカルボキシル化多糖類またはオリゴ糖類であってもよい。好ましくは、オプソニン化阻害部分は、ＰＥＧ、ＰＰＧ、またはそれらの誘導体である。ＰＥＧまたはＰＥＧ誘導体で改質されたリポソームは、「ＰＥＧ化リポソーム」と呼ばれる場合がある。

【０１４８】

オプソニン化阻害部分は、数多くの周知の技術のうちの任意の１つにより、リポソーム膜に結合され得る。例えば、ＰＥＧのＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルは、ホスファチジル－エタノールアミン脂溶性アンカーに結合し、次いで膜に結合し得る。同様に、Ｎａ（ＣＮ）BH_3、および６０℃の３０：１２の比率のテトラヒドロフランおよび水等の溶媒混合物を使用した還元的アミノ化により、デキストランポリマーをステアリルアミン脂溶性アンカーで誘導体化することができる。

【０１４９】

オプソニン化阻害部分で改質されたリポソームは、未改質リポソームよりも非常に長く循環に留まる。このため、そのようなリポソームは、「ステルス」リポシームと呼ばれることがある。ステルスリポソームは、多孔質または「漏れやすい」微小血管系により（栄養物などが）供給される組織中に蓄積することが知られている。したがって、そのような微小血管系の欠陥により特徴付けられる組織、例えば、充実性腫瘍は、これらのリポソームを効率的に蓄積する。Ｇａｂｉｚｏｎ，ｅｔ ａｌ．（１９８８），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．ＳｃＬ，Ｕ．Ｓ．Ａ．，１８：６９４９－５３を参照されたい。さらに、ＲＥＳによる摂取の低減は、肝臓および脾臓におけるリポソームの著しい蓄積を防止することにより、ステルスリポソームの毒性を低下させる。したがって、オプソニン化阻害部分で改質されたリポソームは、該ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコード化する配列を含む核酸）を腫瘍細胞に送達するのに特に適している。

【０１５０】

該ｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物は、対象に投与する前に、当技術分野で知られた技術に従い、「薬剤」とも呼ばれることもある薬学的組成物として製剤化され得る。したがって、本発明は、癌を治療するための薬学的組成物を包含する。一実施形態において、薬学的組成物は、該少なくとも１つの単離ｍｉＲおよび薬学的に許容される担体を含む。具体的な実施形態において、該少なくとも１つのｍｉＲは、好適な対照細胞と相対的に癌細胞において発現レベルが低下したｍｉＲに対応する。

【０１５１】

別の実施形態において、本発明の薬学的組成物は、少なくとも１つのｍｉＲ発現阻害化合物を含む。具体的な実施形態において、該少なくとも１つのｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物は、ｍｉＲ遺伝子の発現が対照細胞よりも癌細胞において大きいｍｉＲ遺伝子に特異的である。

【０１５２】

本発明の薬学的組成物は、少なくとも無菌で発熱物質を含まないことを特徴とする。本明細書において使用される「薬学的製剤」は、ヒトおよび家畜への使用のための製剤を含む。本発明の薬学的組成物を調製するための方法は、例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み込まれる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，１７ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．（１９８５）に記載されるように、当技術分野の範囲内である。

【０１５３】

本発明の薬学的製剤は、薬学的に許容される担体と混合された、少なくとも１つのｍｉＲ

もしくはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（もしくはそれらをコード化する配列を含む少なくとも１つの核酸）（例えば０．１から９０重量％）、またはその生理学的に許容される塩を含む。本発明の薬学的製剤はまた、リポソームおよび薬学的に許容される担体によりカプセル化される、少なくとも１つのｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコード化する配列を含む少なくとも１つの核酸）を含む。

【０１５４】

特に好適な薬学的に許容される担体は、水、緩衝水、生理食塩水、０．４％食塩水、０．３％グリシン、ヒアルロン酸等である。

【０１５５】

具体的な実施形態において、本発明の薬学的組成物は、ヌクレアーゼによる分解に耐性を有する、少なくとも１つのｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害剤化合物（またはそれらをコード化する配列を含む少なくとも１つの核酸）を含む。当業者は、例えば、２’位で改質される１つもしくは複数のリボヌクレオチドをｍｉＲに組み込むことにより、ヌクレアーゼ耐性核酸を容易に合成することができる。好適な２’改質リボヌクレオチドは、フルオロ、アミノ、アルキル、アルコキシ、およびＯ－アリルにより２’位で改質されたものを含む。

【０１５６】

本発明の薬学的組成物はまた、従来の薬学的賦形剤および／または添加剤を含むことができる。好適な薬学的賦形剤は、安定剤、酸化防止剤、浸透圧調整剤、緩衝剤、およびｐＨ調整剤を含む。好適な添加剤は、例えば、生理学的に生体適合性の緩衝剤（例えば、トロメタミン塩酸塩等）、キラント（例えばＤＴＰＡもしくはＤＴＰＡ－ビスアミド等）またはカルシウムキレート錯体（例えばカルシウムＤＴＰＡ、ＣａＮａＤＴＰＡ－ビスアミド等）の添加、あるいは、任意選択で、カルシウムまたはカルシウム塩（例えば、塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウムもしくは乳酸カルシウム等）の添加を含む。本発明の薬学的組成物は、液体形態で包装することができ、または凍結乾燥することができる。

【０１５７】

本発明の固体の薬学的組成物には、例えば、医薬品グレードのマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルカム、セルロース、ブドウ糖、蔗糖、炭酸マグネシウム等の、従来非毒性で固体の薬学的に許容される担体を使用することができる。

【０１５８】

例えば、経口投与用の固体の薬学的組成物は、上に列挙した担体および賦形剤のいずれか、ならびに、１０～９５％、好ましくは２５％～７５％の、該少なくとも１つのｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコード化する配列を含む少なくとも１つの核酸）を含むことができる。エアロゾル（吸入）投与用の薬学的組成物は、上述のようなリポソームにカプセル化された、０．０１～２０重量％、好ましくは１％～１０重量％の当該少なくとも１つのｍｉＲまたはｍｉＲ遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコード化する配列を含む少なくとも１つの核酸）、ならびに噴射ガスを含むことができる。所望により、例えば鼻腔内送達のためのレシチン等、担体もまた含めることができる。

【０１５９】

また、本発明は、抗癌剤を同定する方法を包含し、該方法は、試験薬剤を細胞に提供するステップと、該細胞における少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップとを含む。一実施形態において、当該方法は、試験薬剤を細胞に提供するステップと、癌細胞における低下した発現レベルに関連する少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップとを含む。好適な対照細胞と相対的な、該細胞におけるｍｉＲのレベルの増加は、試験薬剤が抗癌剤であることを示している。

【０１６０】

他の実施形態において、当該方法は、試験薬剤を細胞に提供するステップと、癌細胞における増加した発現レベルに関連する少なくとも１つのｍｉＲのレベルを測定するステップ

とを含む。好適な対照細胞と相対的な、該細胞におけるｍｉＲのレベルの低下は、試験薬剤が抗癌剤であることを示している。

【０１６１】

好適な薬剤は、薬物（例えば小分子、ペプチド等）、および生物学的巨大分子（例えばタンパク質、核酸等）を含むが、これらに限定されない。該薬剤は、組み換えにより、合成的に生成することができ、または、天然源から単離（すなわち精製）されてもよい。細胞にそのような薬剤を提供するための様々な方法（例えば導入）が、当技術分野において周知であり、そのような方法のいくつかは上に記載されている。少なくとも１つのｍｉＲの発現を検出するための方法（例えばノーザンブロッティング、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ＲＴ－ＰＣＲ、発現プロファイリング）もまた、当技術分野において周知である。

【０１６２】

ここで以下の非制限的な実施例により本発明を例示するが、以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を例示することを意図しており、そのように指定されない限りは、特許請求の範囲において定義されるような本発明の範囲を制限するように解釈されるべきではない。

【実施例】

【０１６３】

実施例

【０１６４】

ここに、大規模な組の正常卵巣組織および腫瘍卵巣組織における、ゲノム全体のｍｉＲＮＡ発現プロファイリングの結果を示す。ここでは、卵巣癌特異的ｍｉＲＮＡシグネチャーの存在を示す。また、マイクロＲＮＡ遺伝子の改変されたメチル化が、その異常な発現を担う可能な後成的機構として同定される。

【０１６５】

材料および方法

【０１６６】

卵巣癌試料および細胞株

【０１６７】

全部で８４個の急速冷凍された正常卵巣組織および悪性卵巣組織が、ＧＯＧ　Ｔｉｓｓｕｅｓ　Ｂａｎｋ、Ｃｏｌｕｍｂｕｓ　Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ、Ｃｏｌｕｍｂｕｓ　（ＯＨ、ＵＳＡ）で収集された。マイクロアレイ分析用に使用された組織のコレクションは、１５個の正常卵巣組織切片、および６９個の悪性組織を含み、これはすべて上皮性卵巣癌であり、漿液性癌３１個（そのうち２９個は乳頭状を示した）、類内膜癌８個、明細胞癌４個、低分化癌９個、および粘液性癌１個を含んでいた。卵巣癌細胞株ＩＧＲＯＶ１は、元々Ｄｒ．　Ｂｅｒｎａｒｄ　（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｇｕｓｔａｖｅ　Ｒｏｕｓｓｙ、Ｖｉｌｌｅｊｕｆ、Ｆｒａｎｃｅ）により未治療の患者の中分化卵巣癌から得られたものであり、ＯＡＷ－４２はＤｒ．　Ｕｌｒｉｃｈ　Ｕ．　（Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｏｂｓｔｅｔｒｉｃｓ　ａｎｄ　Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｙ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　ＵＩｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）から得、ＯＶＣＡＲ３、ＯＶＣＡＲ８およびＳＫ－ＯＶ３はＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから購入した。すべての細胞株は、１０％（ｖ／ｖ）ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）、３ｍＭＬ－グルタミンおよび１００　Ｕ／ｍｌペニシリン／ストレプトマイシンを添加した、ＲＰＭＩ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）内で維持した。

【０１６８】

ｍｉＲＮＡマイクロアレイハイブリダイゼーションおよび定量化

【０１６９】

メーカーの使用説明書に従い、Ｔｒｉｚｏｌ　（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を用いて全ＲＮＡ単離を行った。ＲＮＡの標識化およびマイクロＲＮＡマイク

ロアレイチップへのハイブリダイゼーションは、以前説明したように（２８）、各試料からの５μｇの全ＲＮＡを使用して行った。ハイブリダイゼーションは、４回スポットされた４６０個の成熟マイクロＲＮＡ（ホモサピエンス２３５個、ハツカネズミ２２２個、シロイヌナズナ３個）に対するプローブを含有する、我々のマイクロＲＮＡマイクロアレイ（Ｏｈｉｏ Ｓｔａｔｅ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ、バージョン２．０）上で行った。多くの場合、所与の成熟マイクロＲＮＡに対し、２つ以上のプローブセットが存在する。さらに、ほとんどの前駆体マイクロＲＮＡに対応する４組のプローブが存在する。ハイブリダイゼーション信号は、Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－Ａｌｅｘａ６４７複合体で検出し、スキャンされた画像（Ａｘｏｎ ４０００Ｂ）はＧｅｎｅｐｉｘ ６．０ソフトウェア（Ａｘｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）を使用して定量化した。

【０１７０】

マイクロＲＮＡマイクロアレイデータのコンピュータ分析

【０１７１】

マイクロアレイ画像は、ＧＥＮＥＰＩＸ ＰＲＯを使用して分析した。各ｍｉＲＮＡの２つのスポットの平均値をバックグラウンド除去し、正規化し、さらなる分析に供した。Ｒｉｃｈａｒｄ Ｓｉｍｏｎ ＆ Ａｍｙ Ｐｅｎｇ Ｌａｍ（２９）により開発されたＢＲＢ ＡｒｒａｙＴｏｏｌｓを使用して、卵巣マイクロアレイデータのグローバル中央値正規化を行った。その後の統計分析の前に、非存在コール（ａｂｓｅｎｔ ｃａｌｌ）は４．５を閾値とした。このレベルは、実験で検出される平均最低強度レベルである。ｍｉＲＮＡの命名は、Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｓｅｒ （ｇｅｎｏｍｅ．ｕｃｓｃ．ｅｄｕ）およびＳａｎｇｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ （ｍｉｃｒｏｒｎａ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／）のｍｉＲＮＡデータベースに従い、矛盾する場合はｍｉＲＮＡデータベースに従った。特異的に発現したｍｉＲＮＡは、Ｔｕｓｈｅｒ， Ｔｉｂｓｈｉｒａｎｉ ａｎｄ Ｃｈｕ（３０）の最近の論文に基づき、Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｌａｂｓで開発された方法、マイクロアレイの有意性分析（ＳＡＭ）内のｔ検定手順を使用して同定した。

【０１７２】

また、ｍｉＲＮＡシグネチャーを同定するために、Ｔｉｂｓｈｉｒａｎｉ， Ｈａｓｔｉｅ， Ｎａｒａｓｉｍｈａｎ ａｎｄ Ｃｈｕ（３１）による「最短収縮重心法（ｎｅａｒｅｓｔ ｓｈｒｕｎｋｅｎ ｃｅｎｔｒｏｉｄ ｍｅｔｈｏｄ）」により遺伝子発現データから試料分類を行うＰＡＭを適用した。

【０１７３】

ノーザンブロッティング

【０１７４】

前述したようにノーザンブロット分析を行った。ＲＮＡ試料（各１０μｇ）を、１５％ポリアクリルアミド、７Ｍ尿素標準プレキャストゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）上に展開し、Ｈｙｂｏｎｄ－Ｎ＋膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ社、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）に転写した。ＵＬＴＲＡｈｙｂ－Ｏｌｉｇｏハイブリダイゼーション緩衝液（Ａｍｂｉｏｎ社、Ａｕｓｔｉｎ、ＴＸ）中で１６時間、３７０℃でハイブリダイゼーションを行った。膜を３７０℃で２×ＳＳＰＥおよび０．５％ ＳＤＳで２回洗浄した。

【０１７５】

プローブとして使用したオリゴヌクレオチドは、以下の成熟マイクロＲＮＡの配列（参照することにより本明細書に完全に組み込まれるｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／Ｓｏｆｔｗａｒｅ／Ｒｆａｍ／ｍｉｒｎａ／のｍｉＲ Ｒｅｇｉｓｔｒｙ）に対しアンチセンスであった：

ｍｉＲ－２００ａ： ５′－ ＡＣＡ ＴＣＧ ＴＴＡ ＣＣＡ ＧＡＣ ＡＧＴ ＧＴＴ Ａ －３′［配列番号：９２］；

ｍｉＲ－１４１： ５′－ ＣＣＡ ＴＣＴ ＴＴＡ ＣＣＡ ＧＡＣ ＡＧＴ ＧＴＴ Ａ － ３′［配列番号：９３］；

ｍｉＲ－１９９ａ：　５′－　ＧＡＡ　ＣＡＧ　ＧＴＡ　ＧＴＣ　ＴＧＡ　ＡＣＡ　ＣＴＧ　ＧＧ　－３′［配列番号：９４］；
ｍｉＲ－１２５ｂ１：５′ＴＣＡ　ＣＡＡ　ＧＴＴ　ＡＧＧ　ＧＴＣ　ＴＣＡ　ＧＧＧ　Ａ　－３′［配列番号：９５］；
ｍｉＲ－１４５：　５′－　ＡＡＧ　ＧＧＡ　ＴＴＣ　ＣＴＧ　ＧＧＡ　ＡＡＡ　ＣＴＧ　ＧＡＣ　－３′［配列番号：９６］；
ｍｉＲ－２２２：　５′－　ＧＡＧ　ＡＣＣ　ＣＡＧ　ＴＡＧ　ＣＣＡ　ＧＡＴ　ＧＴＡ　ＧＣＴ　－３′［配列番号：９７］；
ｍｉＲ－２１：５′－　ＴＣＡ　ＡＣＡ　ＴＣＡ　ＧＴＣ　ＴＧＡ　ＴＡＡ　ＧＣＴ　Ａ　－３′［配列番号：９８］。

【０１７６】
５Ｓ　ＲＮＡまたはＥｔＢｒゲルを正規化に使用した。ポリヌクレオチドキナーゼ（Ｒｏｃｈｅ社）を使用して、各プローブ２００ｎｇを１００μＣｉ　［γ－３２Ｐ］－ＡＴＰで末端標識化した。

再ハイブリダイゼーションの前に、ブロットを沸騰した０．１％　ＳＤＳ中で１０分間ストリップした。

【０１７７】
リアルタイムＰＣＲ

【０１７８】
シングルチューブＴａｑＭａｎ　ＭｉｃｒｏＲＮＡ　Ａｓｓａｙｓを使用して、メーカー（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）の使用説明書に従い、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ機器上で成熟マイクロＲＮＡを検出および定量化した。
１８Ｓ　ｒＲＮＡで正規化を行った。テンプレート不含対照およびＲＴマイナス対照を含むすべてのＲＴ反応を、ＧｅｎｅＡｍｐ　ＰＣＲ　９７００　Ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）で行なった。

遺伝子発現レベルは、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　７９００ＨＴ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ検出システム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を使用して定量化した。テンプレート不含対照を含む比較リアルタイムＰＣＲは、３回行った。相対的発現は、比較Ｃｔ法を用いて計算した。

【０１７９】
脱メチル化実験

【０１８０】
ＯＶＣＡＲ３細胞を、１０μＭ　５’アザ－２’デオキシシチジン（５`－ＡＺＡ、Ｓｉｇｍａ社）による処置の４８時間前に、低密度で播種した。２４時間の処置後、細胞を回収し、全ＲＮＡをＴｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を用いて単離した。未処置細胞およびＡＺＡ処置細胞の両方に対し３試料を用いて、マイクロアレイプロファイリングによりｍｉＲ発現を評価した。

特異的に発現したマイクロＲＮＡを、ランダム係数モデルによる一変量２クラスのＴ－検定を使用して同定した。

【０１８１】
結果

【０１８２】
マイクロＲＮＡ発現シグネチャーは正常卵巣から卵巣癌組織を区別する。

【０１８３】
数多くの研究（１９）によりすでに検証されているカスタムマイクロアレイプラットフォームを使用して、異なる患者からの不均一の組の卵巣組織に対するマイクロＲＮＡ発現プロファイルを評価した。この組は、正常卵巣試料１５個、卵巣悪性腫瘍６９個、および卵巣癌細胞株５個の、計８９個の生物学的に独立した試料を含んだ。各腫瘍試料は、単一の検体から得た（データ省略）。

【０１８４】
チップ上にスポットされたすべてのヒトマイクロＲＮＡに基づく教師なし階層的クラスタ化は、正常組織および悪性組織により表される２つの主要なグループでの試料の明確な区別を有するツリーを生成した（図１）。
【０１８５】
癌細胞に対し正常組織を区別するマイクロＲＮＡを同定するために、我々はＳＡＭおよびＰＡＭツールを使用したが、２種類のクラス予測分析から得られた結果は、概して重複していた。正常組織と癌組織との間のＳＡＭ比較では、特異的に発現した３９個のｍｉＲＮＡ（ｑ－値＜１％および倍率変化＞３）が同定されたが、１０個が腫瘍において上方調整され、残りは下方調整されていた（一覧は図９－表２に報告されている）。
【０１８６】
図６Ａおよび６ＢのＰＡＭ分析は、図８－表１において報告されるｍｉＲシグネチャーによる、各試料が癌であるか正常組織であるかの確率（０．０から１．０）のグラフ表示を示しており、より小さい組の２９個のｍｉＲ、つまり４個の上方調整ｍｉＲ（ｍｉＲ－２００ａ、－２００ｂ、－２００ｃおよび－１４１）ならびに２５個の下方調整ｍｉＲ（ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ１が中でも最も有意である）が、８９％の分類率で正常組織と腫瘍とを区別していることを説明している。
【０１８７】
マイクロアレイ分析で得られた結果を確認するために、我々は
いくつかの特異的に発現したマイクロＲＮＡに対し、ノーザンブロット（図２Ａ）またはリアルタイムＰＣＲ（図２Ｂ）を行った。我々は、卵巣癌において最も有意に上方調整されたｍｉＲ－２００ａおよびｍｉＲ－１４１、ならびに最も有意に下方調整されたマイクロＲＮＡ：ｍｉＲ－１９９ａ、ｍｉＲ－１４０、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１２５ｂ１の発現を分析した。すべての実験で、マイクロアレイ分析により得られた結果が確認された。
【０１８８】
生体病理学的特徴およびマイクロＲＮＡ発現
【０１８９】
上皮性卵巣癌が、異なる形態学的および分子遺伝学的変化により特徴付けられる異なる組織学的亜型として発生することを考慮して、我々は、マイクロＲＮＡ発現プロファイルが卵巣癌の異なる組織型において異なるかどうかを評価するために、それらのそれぞれのマイクロＲＮＡプロファイルを、正常組織と比較することにした。ＳＡＭ分析から得られた完全な一覧を図１０－表３に報告し、図３Ａおよび３Ｂにベン図として要約を示す。
【０１９０】
正常組織に対し腫瘍において最も有意に上方調整された４個のマイクロＲＮＡのうちの二（２）個（図３Ａ）、ｍｉＲ－２００ａおよびｍｉＲ－２００ｃは、考慮された３つすべての組織型（漿液性、類内膜、および明細胞）において上方調整されており、一方ｍｉＲ－２００ｂおよびｍｉＲ－１４１の上方調整は、類内膜および漿液性の組織型で共通している。
【０１９１】
さらに、類内膜組織型は、３個の追加のマイクロＲＮＡ、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３およびｍｉＲ－２０５の上方調整も示している。ｍｉＲ－１２５ｂ１、ｍｉＲ－１９９ａおよびｍｉＲ－１４０を含む１９個のｍｉＲは、正常組織と比較して検査された３つの組織型すべてにおいて下方調整され（図３Ｂ）、一方４個は、異なるシグネチャーのそれぞれの一対の分析において共通しており、例えば、ｍｉＲ－１４５は、漿液性癌および明細胞癌の両方において下方調整され、ｍｉＲ－２２２は、類内膜癌および明細胞癌の両方において下方調整されている。
【０１９２】
「混合」または「低分化」として分類された腫瘍を考慮して、我々は、第１のグループが

、例えば、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１８１の過剰発現を類内膜癌と共有し、ｍｉＲ－２１４の下方調整を漿液性と共有する、異なる組織型の特徴を有するシグネチャーを明らかとしており、一方「低分化」腫瘍は極めて異なるパターンのマイクロＲＮＡ発現（図１０－表３）を有することを発見した。

【０１９３】

次いで、我々は、図１１－表４に報告される対の腫瘍の異なる群のｍｉＲＮＡ発現を比較し、特に、２つの最も数の多い組織型癌、漿液性癌および類内膜癌を比較した。漿液性癌と比較して類内膜癌において特異的に発現したマイクロＲＮＡを考慮すると、ｍｉＲ－２１２が上方調整され、ｍｉＲ－３０２ｂ＊およびｍｉＲ－２２２　（図４ＡのマイクロアレイデータのＴ－検定分析、ｐ＜０．０５）が、マイクロＲＮＡのうち、最も有意に下方調整されたことが判明した。

【０１９４】

図４Ｂにおいて、小規模の試料の組に対するノーザンブロットは、類内膜癌と比較した漿液性癌におけるｍｉＲ－２２２過剰発現を検証している。次いで、我々は、腫瘍検体に関連したその他の臨床病理学的特徴に焦点を当てた。患者の年齢に関しては有意に特異的に発現したｍｉＲは発見されなかったが、リンパ腺－脈管浸潤、卵巣表面、管、子宮、および骨盤腹膜の関与（図１２－表５）等、その他の腫瘍特性はｍｉＲ発現に影響するようであった。

【０１９５】

疾患の異なる悪性度または段階に関連したｍｉＲが存在するかどうかを調査するために、我々は、すべての腫瘍または最も数の多い漿液性組織型のみを考慮して比較分析を行ったが、特異的に発現した有意なマイクロＲＮＡを少しも得なかった。

【０１９６】

様々なシグネチャーのｍｉＲＮＡメンバーの確認済みまたは潜在的な標的

【０１９７】

「ｄｉａｎａ．ｐｃｂｉ．ｕｐｅｎｎ．ｅｄｕ／ｔａｒｂａｓｅ」におけるＤｉａｎａＴａｒｂａｓｅを使用して、我々は、我々の分析から得られた最も有意なｍｉＲＮＡの確認済みの標的を検索し、いくつかの興味深いデータを得た。例えば、ＥＲＢＢ２およびＥＲＢＢ３受容体は、ｍｉＲ－１２５（３２）により標的とされ；卵巣癌において下方調整されたｍｉＲ－１０１は、癌原遺伝子ＭＹＣＮ（３３）を標的とすることが示されている。次いで我々は、「ｄｉａｎａ．ｐｃｂｉ．ｕｐｅｎｎ．ｅｄｕ／ｍｉＲＧｅｎ」データベースを使用してそれらの潜在的標的を分析し、これらの分子のいくつかに対し、卵巣癌における発現レベルを評価した。例えば、４つの最も有意に上方調整されたマイクロＲＮＡ、ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ－２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１はすべて、共通推定標的として、卵巣癌において下方調整されている腫瘍抑制因子ＢＡＰｌ、ＢＲＣＡｌ－関連タンパク質を有する。得られた情報を、図１３－表６に要約する。

【０１９８】

ｍｉＲ発現の後成的制御

【０１９９】

異常ＤＮＡメチル化パターンもまたヒト卵巣癌を特徴付けるマイクロＲＮＡ発現の変化に寄与し得るかどうかを評価するために、我々は、脱メチル化剤５－アザ－２’－デオキシシチジンによる処置の前後に、卵巣細胞株ＯＶＣＡＲ３のｍｉＲプロファイリングを分析した。マイクロアレイデータの分析では、１１個のヒトマイクロＲＮＡが特異的に発現し、９個が上方調整、２個が下方調整され（各一変量試験の有意性閾値：ｐ＜０．００１）、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３、ｍｉＲ－１４６ｂ、ｍｉＲ－２０５、ｍｉＲ－３０－５ｐおよびｍｉＲ－３０ｃが、処置の際に最も有意に誘引される（特異的に発現したｍｉＲは図５Ａに列挙し、一方得られた階層的クラスタツリーは図５Ｂに報告する）ことが示された。

【０２００】

該５つの最も有意に誘引されたｍｉＲの上方調整を検証するためのリアルタイムＰＣＲは

、ｍｉＲ発現レベルのグラフ表示（図５Ｃ）として図５Ｃおよび５Ｄに説明し、ｍｉＲ－２１はまた、ノーザンブロット（図５Ｄ）により検証した。

【０２０１】

興味深いことに、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３およびｍｉＲ－２０５は、正常組織と比較して、卵巣癌において過剰発現しており（図９－表２におけるＳＡＭ分析ならびに図３Ａおよび３Ｂにおけるベン図を参照）、脱メチル化処置後のこれらのｍｉＲ遺伝子の再活性化は、低メチル化がｉｎ　ｖｉｖｏでのその過剰発現を担う機構である可能性があることを示唆している。我々は、ヒト卵巣癌および２つの正常組織のパネルに対するノーザンブロッティング（図７Ａ）を行い、処置の際に誘引された最も有意なｍｉＲであるｍｉＲ－２１の過剰発現を確認した。さらに、ＣｐＧ　Ｉｓｌａｎｄ　Ｓｅａｒｃｈｅｒ　Ｐｒｏｇｒａｍ（３４）を使用して、我々は、ｍｉＲ－２１およびｍｉＲ－２０３がＣｐＧアイランドに関連し、ＣｐＧアイランドに埋没したｍｉＲ－２０３は８７５ｂｐの長さであり、ｍｉＲ－２１は成熟配列の２ｋｂ上流のＣｐＧアイランドで特徴付けられ（図７Ｂ）、一方ｍｉＲ－２０５は、その成熟形態の２Ｋｂ上流にわたる領域においていかなるＣｐＧアイランドも示していないことを検証した。

【０２０２】

考察

【０２０３】

ここでの実施例において、ヒト卵巣癌においてマイクロＲＮＡが異常に発現することを示す。全体的なマイクロＲＮＡ発現は、正常組織と癌組織を明確に区別し、ヒト卵巣癌において変化し、またこの新生物の発達に関与し得るいくつかのマイクロＲＮＡを同定することができる。

【０２０４】

我々が発見した最も有意に上方調整された４つすべてのマイクロＲＮＡ、同じファミリーに属するｍｉＲ－２００ａおよびｍｉＲ－１４１；ｍｉＲ－２００ｂ（ｍｉＲ－２００ａの同じ領域、ｃｈｒ．ｌｐ３６．３３に存在）；ならびにｍｉＲ－２００ｃ（ｍｉＲ－１４１の同じ領域、ｃｈｒ．１２ｐｌ３．３１に存在）は、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２４）によりゲノムレベルで得られた結果に一致し、それらの上方調整を促す機構がマイクロＲＮＡ遺伝子の増幅である可能性を示唆している。

【０２０５】

興味深いことに、これらすべてのｍｉＲは、共通推定標的、つまり腫瘍抑制因子ＢＡＰｌ、ＢＲＣＡ１－関連タンパク質を有する（２４）。卵巣癌発癌における脱分化の根本的機構として発見され提案された（３５）、ＧＡＴＡ因子の発現の変化もまた、マイクロＲＮＡの脱制御により促される可能性がある。特に、卵巣腫瘍の８５％において核から損失または排除されるＧＡＴＡ６は、ｍｉＲ－２００ａにより制御され得、卵巣癌細胞株の大部分において存在しないＧＡＴ　Ａ４は、ｍｉＲ－２００ｂにより標的とされ得る（図１２－表５）。

【０２０６】

下方調整された遺伝子のうち、特に、我々は乳癌においても変化するｍｉＲ－１２５ｂ１およびｍｉＲ－１４５（１８）；肝細胞癌等のその他の腫瘍において下方調整されることが最近示されたｍｉｒ－１９９ａ（３６）；卵巣癌において削除されるｍｉＲ－１４０（２４）を発見した。

【０２０７】

興味深いことに、ｍｉＲ－１４０は、確かに卵巣癌においてしばしば削除されることの多い脆弱領域であるｃｈｒ．６ｑ２２に存在し、ｃ－ＳＲＫ、ＭＭＰ１３およびＦＧＦ２等の重要な分子を標的とすることが予測される。

【０２０８】

これらの実施例において利用可能な正常対照が全正常卵巣で代表されても、我々のデータは、ヒト卵巣癌において変化し、この悪性疾患の生物学に関与し得るいくつかのマイクロＲＮＡを同定することができる。実際に、異なる組織型の卵巣癌（漿液性、類内膜、明細

胞および混合）を正常組織と比較することにより得られるｍｉＲＮＡシグネチャーはほとんどの場合重複しているが、それらはまた、「組織型特異的」であるように見えるいくつかのマイクロＲＮＡを明らかとし、例えば、類内膜腫瘍は、４つの最も有意に上方調整されたｍｉＲ（ｍｉＲ－２００ａ、ｍｉＲ２００ｂ、ｍｉＲ－２００ｃおよびｍｉＲ－１４１）をその他の腫瘍と共有しているが、数多くの充実性腫瘍において誤って制御され（１８、３７、３８）、また異なる細胞系において抗アポトーシス的役割を果たす（３９、４０）ことが知られているｍｉＲ－２１、およびｍｉＲ－２０５およびｍｉＲ－１８２の過剰発現もまた示している。

【０２０９】

類内膜腫瘍はまた、その他のクラスの腫瘍と比較していくつかのマイクロＲＮＡの下方調整を示し、例えば、ｍｉＲ－２２２が、ｃ－Ｋｉｔ（４１）を標的とし、癌に関与し（４２－４４）、酸欠乏状態（４５）において下方調整されることをすでに示している。

【０２１０】

これらの差は、現在ＥＯＣが同一の治療方針で治療されているとしても、異なる組織型が生物学的および病原的に異なるＥＯＣの存在を表すことを裏付けている。最近では、マイクロアレイ分析により、異なる組織型（漿液性、粘液性、類内膜および明細胞）が、おそらく源の器官（それぞれ卵管、結腸粘膜および類内膜膜）の遺伝子発現パターンを反映して、異なる経路の変化を示すことが確認されている（４６）。

【０２１１】

とりわけ、特異的に発現したマイクロＲＮＡの多くは、組織型に依存して特異的に活性化された経路に関与した分子を標的とすることが予測されている。例えば、漿液性癌において下方調整されたｍｉＲ－２１２は、推定標的として、この卵巣癌の亜型において過剰発現したＷＴ１を有する（４７）。ｍｉＲ－２１２の別の推定標的はＢＲＣＡｌであり、遺伝性の卵巣癌において変異したこの分子は、最近、散発性上皮性卵巣癌（ＯＥＣ）の病因にも関与することが判明しており、後成的変化に起因する遺伝子機能の損失がより一般に観察されている（４８）。ＢＲＣＡｌ発現の減少は、１つもしくは複数のマイクロＲＮＡの過剰発現により決定することができる。

【０２１２】

類内膜と比較して漿液性組織型において上方調整されたｍｉＲ－２９９－５ｐおよびｍｉＲ－１３５ｂは、それぞれ、類内膜癌において過剰発現したＤＬＫｌ（デルタ様１）およびＭＳＸ２（ｍｓｈホメオボックス２）を標的とすると考えられる（４７）。他の腫瘍と比較して、明細胞癌は、それぞれ、２つの推定標的ＲＢＰ４（レチノール結合タンパク質４）およびＳＬＣ４０Ａ１（溶質担体４０－鉄－制御輸送体、メンバー１）とは反対の（４６）、ｍｉＲ－３０－５ｐおよびｍｉＲ－２０ａの発現レベルを示す。正常組織と比較して、明細胞癌はまた、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－１９ａおよびｍｉＲ－１９ｂのより低い発現を示し、これはクラスター１７～９２（削除されていることがＺｈａｎｇらによりすでに検証されている）の下方調整の可能性を示唆している。Ｅ２Ｆ１およびｃ－Ｍｙｃにより媒介される複雑な制御に関与するこのクラスターは、最近Ｂ細胞リンパ腫（１５）において示唆されているように、推定癌原遺伝子、または腫瘍抑制因子の二重の性質を有すると思われ、例えば、肝細胞癌では、ｍｉＲ－１７－９２クラスターをコード化する遺伝子座（１３ｑ３１）でＬＯＨが報告されている（４９）。卵巣癌では、少なくとも明細胞組織型において、このクラスターは腫瘍抑制因子の役割を果たすこともできる。本明細書に示すデータは、確かに、ＥＯＣの亜型の発達につながる分化のプロセスにおいてマイクロＲＮＡが制御の役割を有し得ることを示唆している。

【０２１３】

興味深いことに、低分化癌は、マイクロＲＮＡ発現の極めて異なるパターンを有し、正常卵巣と比較して、いくつかのマイクロＲＮＡの上方調整を示している。より興味深いことに、それらの１つであるｍｉＲ－３７３は、最近、精巣生殖細胞腫瘍における推定癌原遺伝子として説明されている（１６）。

【０２１４】

腫瘍の段階または悪性度に関連して有意に特異的に発現したマイクロＲＮＡがないことは、我々の試料の組のほとんどが、この種の新生物の後期の診断を考慮して予測されるように、進行期の腫瘍で代表される事実により説明することができるが、試料の異なるグループ間での大きさの差は、統計分析の限界を示していた可能性がある。あるいは、マイクロＲＮＡは、ヒト卵巣癌の進行ではなく発症に重要となり得る。

【０２１５】

我々の分析の結果、多数のｍｉＲが過剰発現したが、Ｚｈａｎｇ研究においては増幅されたとは報告されておらず、また下方調整されているが削除されてはおらず、後成的制御機構の関与は、実際にヒトＥＯＣにおけるマイクロＲＮＡ発現に対する役割を果たし得る。

【０２１６】

確かに、卵巣細胞株の脱メチル化処置後に誘引された最も有意なマイクロＲＮＡのうち、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２０３およびｍｉＲ－２０５が卵巣癌において上方調整されることが判明した。さらに、ｍｉＲ－２０３およびｍｉＲ－２１は、ＣｐＧアイランドに関連し（ｍｉＲ－２０３はＣｐＧアイランドに埋没し、一方ｍｉＲ－２１はその成熟配列の２　ｋｂ上流にＣｐＧアイランドを有する）、これは脱メチル化がこれらのマイクロＲＮＡ遺伝子の再活性化につながるという考えを支持している。とりわけ、ｍｉＲ－２１は、いくつかのヒト腫瘍において上方調整されること、また異なる細胞モデルにおいて抗アポトーシス的役割を有することがすでに説明されている。ここで、これらのデータは、ＤＮＡ低メチル化が、潜在的に発癌性のｍｉＲのｉｎ　ｖｉｖｏ過剰発現を担う後成的機構である可能性があることを示している。

【０２１７】

発明者らが知る限り、これは、正常卵巣に対し癌において、また異なる亜型の腫瘍において特異的に発現したｍｉＲの同定を焦点とした、ヒトＥＯＣにおける完全ｍｉＲ発現プロファイリングを説明する最初の報告である。ここでのデータは、発病に対し、また異なる組織型の卵巣癌の発症に対しマイクロＲＮＡが果たす重要な役割を示し、変化したＤＮＡメチル化を、ゲノム変異に影響されないマイクロＲＮＡの異常発現を担う可能な後成的機構として同定している。

【０２１８】

特許法の条項に従い、本発明の原理および作用様式を、その好ましい実施形態で説明し例示してきた。しかしながら、本発明は、その精神または範囲から逸脱せずに、具体的に説明され例示されたものとは異なる様式で実践され得ることを理解されたい。

【０２１９】

ｍｉＲ遺伝子データベース

【０２２０】

対象となるｍｉＲＮＡは、公開データベースに列挙されている。ある特定の好ましい実施形態において、公開データベースは、命名および学名の割当てのために、また記録およびワールドワイドウェブによるオンライン検索用のデータベースへの配列の登録のためにｍｉＲＮＡ配列が提出される、Ｓａｎｇｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｈｔｔｐ：／／ｍｉｃｒｏｒｎａ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ／により提供される中央保管所であってもよい。一般に、Ｓａｎｇｅｒ　ＩｎｓｔｉｔｕｔｅによりｍｉＲＮＡの配列に関し収集されたデータは、種、源、対応する遺伝子配列、および遺伝子位置（染色体の座標）、ならびに完全転写産物および成熟した完全処理ｍｉＲＮＡ（５’末端リン酸基を有するｍｉＲＮＡ）の配列を含む。別のデータベースは、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　ｔｈｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｌｉｂｒａｒｙ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅにより管理されるＮａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　（ＮＣＢＩ）ウェブサイトからアクセス可能なＧｅｎＢａｎｋデータベースであってもよい。これらのデータベースは、参照により本明細書にすべて組み込まれる。

【表１】

図８－表１

CV コンフュージョンマトリックス(閾値=3.23866)

真＼予測	癌	N	クラスエラー率
癌	63	8	0.112676056
N	1	14	0.066666667
誤判別エラー		= 0.11	

microRNAs	癌スコア	N スコ	
Hsa-mir-200c	0.1152	-0.5454	
Hsa-mir-200a	0.1059	-0.5012	一致
Hsa-mir-199a	-0.098	0.4637	不一致
Hsa-mir-143	-0.0946	0.4479	Zhang 研究において変化なし
Hsa-mir-199b	-0.0887	0.4197	
Hsa-mir-141	0.0874	-0.4138	
Hsa-mir-145	-0.0734	0.3473	
Hsa-mir-147	-0.0679	0.3212	
Hsa-mir-133a	-0.0671	0.3176	
Hsa-mir-101	-0.0616	0.2917	
Hsa-mir-214	-0.0607	0.2873	
Hsa-mir-100	-0.0535	0.2533	
Hsa-mir-140	-0.0523	0.2474	
Hsa-mir-126	-0.0501	0.2371	
Hsa-mir-224	-0.0485	0.2294	
Hsa-mir-9	-0.0481	0.2277	
Hsa-mir-105	-0.0461	0.2184	
Hsa-mir-99a	-0.037	0.1753	
Hsa-mir-125a	-0.0315	0.1489	
Hsa-mir-211	-0.0248	0.1174	
Hsa-mir-127	-0.0232	0.11	
Hsa-mir-200b	0.0179	-0.0847	
Hsa-mir-125b-1	-0.0177	0.0837	
Hsa-let-7c	-0.0152	0.0719	
Hsa-let-7d	-0.0138	0.0654	
Hsa-mir-124a	-0.0121	0.0574	
Hsa-mir-374	-0.0119	0.0563	
Hsa-let-7a	-0.0113	0.0533	
Hsa-mir-134	-0.0014	0.0068	

【表２】

図９ - 表２

マイクロ RNA 上方調節

	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-200a	6.029559054	5.900228959
miR-141	5.282215009	6.676969496
hsa-miR-200c	5.072214667	8.522477676
hsa-mir-200b	3.833075725	3.305192114
hsa-miR-302b*	2.735468464	7.576624548
hsa-miR-182	2.474388072	4.629588641
has-mir-325	2.427712097	3.582141857
has-mir-373	2.368832731	3.10378255
hsa-mir-203	2.106735098	3.924966016
hsa-mir-205	1.912402407	3.913918092

マイクロ RNA 下方調節

	スコア(d)	1/倍率変化
hsa-mir-199a	-6.660234251	0.149170383
hsa-mir-199b	-6.411673443	0.158503458
hsa-mir-143	-6.25941986	0.208966195
hsa-mir-127	-6.239314997	0.36263205
hsa-mir-140	-6.141381353	0.284933473
hsa-mir-9	-6.109935294	0.213902307
hsa-mir-133a	-5.997775401	0.201323582
hsa-mir-105	-5.971698987	0.256386384
hsa-mir-101	-5.951436701	0.140368004
hsa-mir-224	-5.92099781	0.221057654
hsa-mir-126	-5.818430779	0.194310151
hsa-mir-100	-5.768583066	0.217155847
hsa-mir-147	-5.743104574	0.225260363
hsa-mir-204	-5.642915363	0.135983578
hsa-mir-214	-5.63781891	0.226868132
hsa-mir-99a	-5.61022158	0.29031027
hsa-mir-211	-5.52630143	0.151341246
hsa-mir-145	-5.522715864	0.268284181
hsa-let-7d	-5.353956412	0.292557531
hsa-mir-124a	-5.308572049	0.30918176
hsa-mir-125a	-5.275370888	0.285112062
hsa-let-7c	-5.155238667	0.313348909
hsa-let-7a	-5.043893498	0.346201662
hsa-mir-29c	-4.992819698	0.284842858
hsa-mir-195	-4.880474865	0.333200438
hsa-mir-125b	-4.706809872	0.319219655
hsa-mir-374	-4.625938802	0.260209699
hsa-miR-302b	-4.540380253	0.26329528
hsa-miR-29a	-4.538932739	0.330079052

一致

不一致

Zhang 研究において変化なし

【表３】

図１０－表３

漿液性対正常

q値 =0, 倍率変化 >3

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	4.874822	9.316226469
hsa-mir-141	4.105882	6.297820292
hsa-mir-200a	5.22409	6.21082388
hsa-mir-200b	3.028617	3.354261291

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-137	-4.79547	0.148869513
hsa-mir-101	-4.20173	0.156683391
hsa-mir-199a	-4.95379	0.157135174
hsa-mir-211	-3.6933	0.159546591
hsa-mir-204	-4.35187	0.160197536
hsa-mir-199b	-4.77294	0.169477272
hsa-mir-101-1	-4.61299	0.205344813
hsa-mir-126	-4.31991	0.205709452
hsa-mir-224	-4.51103	0.210351178
hsa-mir-214	-4.4747	0.211015924
hsa-mir-143	-4.66151	0.225560787
hsa-mir-133a	-4.27006	0.22613586
hsa-mir-147	-4.19961	0.244193755
hsa-mir-34c	-3.49226	0.244581699
hsa-mir-100	-4.031	0.244948271
hsa-mir-302c	-2.7653	0.263419845
hsa-mir-374	-3.44084	0.264221816
hsa-mir-9	-4.22971	0.271871858
hsa-mir-101	-4.10703	0.281023282
hsa-mir-125a	-3.96362	0.284404726
hsa-mir-195	-4.22039	0.288096703
hsa-mir-29c	-3.81131	0.289651915
hsa-mir-105	-4.22771	0.290067186
hsa-mir-145	-4.16437	0.291445115
hsa-let-7d	-3.95134	0.300703735
hsa-mir-302b	-3.13456	0.30356362
hsa-mir-9*	-3.40033	0.307833212
hsa-mir-216	-2.98653	0.309688574
hsa-mir-99a	-4.06488	0.311194043
hsa-mir-140	-5.02723	0.313106918
hsa-mir-125b-1	-3.54736	0.314166789
hsa-mir-215	-3.62675	0.315298054
hsa-let-7c	-3.8424	0.31529976
hsa-mir-181a*	-3.69974	0.319272615
hsa-mir-124a	-3.80122	0.320240298
hsa-mir-28	-2.56159	0.33142251
hsa-let-7d	-3.80275	0.332028327
hsa-mir-29a	-3.46281	0.333446637
hsa-mir-133b	-2.68467	0.333883896

【表４】

図１０続き - 表３続き

類内膜対正常

q 値...=0, 倍率変化 ...>3

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	5.602789	11.35184732	4.285621	5.169317934
hsa-mir-141	6.66868	8.134845605	3.175124	4.632327322
hsa-mir-200a	5.873119	5.577590602	2.847984	5.089229918
hsa-mir-205	4.091189	4.268810393	2.74905	3.473502434
hsa-mir-21	3.308304	3.933420772	2.685224	2.25107383
hsa-mir-182	3.336352	3.755931307	2.318534	2.000271165
hsa-mir-200b	3.822882	3.58677048	2.264066	2.501721471
			2.25371	2.455112892
			2.231062	2.385770368
			2.200151	3.904843321
			2.167726	2.263162617
			1.998298	2.69462407
			1.898917	2.611066113
			1.893946	2.183311521

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-302c	-4.5238	0.057739797
hsa-mir-140	-4.32451	0.122075074
hsa-mir-101	-4.28657	0.132249108
hsa-mir-9	-4.06022	0.165300935
hsa-mir-147	-5.31115	0.170117845
hsa-mir-302b	-3.40316	0.177459541
hsa-mir-9*	-3.96329	0.177591359
hsa-mir-133a	-4.81939	0.1833621
hsa-mir-137	-2.7233	0.18888881
hsa-mir-299-5p	-4.39191	0.192261887
hsa-mir-105	-4.82847	0.202341368
hsa-mir-199b	-4.4869	0.209194024
hsa-mir-199a	-4.52646	0.210975698
hsa-mir-124a	-4.58559	0.214502778
hsa-mir-100	-4.17774	0.21482284
hsa-mir-211	-2.41054	0.240456539
hsa-mir-224	-3.8354	0.242984707
hsa-mir-143	-4.79084	0.249925609
hsa-mir-126	-3.76437	0.250497146
hsa-mir-1	-3.88978	0.271896204
hsa-mir-7-2	-2.91243	0.280749401
hsa-mir-302a	-2.203	0.289793304
hsa-mir-99a	-3.7768	0.294318696
hsa-mir-216	-1.97425	0.311440033
hsa-mir-125b-1	-3.72135	0.313838284
hsa-let-7d	-3.92129	0.314438715
hsa-let-7f	-4.38303	0.317245972
hsa-mir-139	-2.99323	0.32021126
hsa-mir-125a	-3.54416	0.321469706
hsa-mir-193	-3.35024	0.3275396
hsa-mir-144	-2.56969	0.32905162
hsa-mir-222	-2.70438	0.330732291
hsa-mir-323	-5.14298	0.335905205
hsa-mir-134	-4.3392	0.336555522
hsa-mir-370	-3.40042	0.339804603

【表５】

図１０続き - 表３続き

明細胞対正常

q 値 =0, 倍率変化 >3

陽性遺伝子	遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	3.727262	8.735679382	
hsa-mir-200a	4.251752	3.777659435	

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-133a	-2.93133	0.088082129
hsa-mir-140	-2.97299	0.121810358
hsa-mir-301	-2.39538	0.123963114
hsa-mir-137	-2.27518	0.14653595
hsa-mir-1	-2.33148	0.147859091
hsa-mir-9	-2.96241	0.148568071
hsa-mir-101	-3.2276	0.166648407
hsa-mir-100	-3.83532	0.168061777
hsa-mir-9*	-2.83792	0.174089614
hsa-mir-199b	-3.67083	0.178632358
hsa-mir-105	-3.64152	0.196628255
hsa-mir-98	-3.50536	0.205661462
hsa-mir-302a	-2.1459	0.211204706
hsa-mir-199a	-3.56433	0.212611204
hsa-mir-126	-3.07167	0.22443264
hsa-mir-125a	-3.94158	0.22469509
hsa-mir-143	-3.8477	0.229220021
hsa-mir-19b	-2.84997	0.231739108
hsa-mir-125b-1	-3.97578	0.232452007
hsa-mir-29a	-2.55383	0.236887361
hsa-mir-147	-3.22581	0.237154001
hsa-mir-29c	-2.28388	0.243218229
hsa-mir-222	-2.5152	0.244824885
hsa-mir-99a	-3.2997	0.25237176
hsa-mir-224	-3.01436	0.252667402
hsa-mir-29b	-2.32129	0.25626224
hsa-mir-18a	-1.87174	0.261229849
hsa-mir-144	-2.11054	0.263378089
hsa-mir-100	-3.22544	0.275300179
hsa-mir-154	-2.4006	0.278357698
hsa-mir-302b	-1.87776	0.282435823
hsa-mir-29b	-2.36214	0.284442159
hsa-mir-125b	-3.37335	0.285579607
hsa-let-7d	-3.39786	0.285816741
hsa-let-7c	-3.1888	0.295568469
hsa-mir-145	-3.61294	0.297295886
hsa-mir-181a*	-1.97299	0.29770489
hsa-mir-19b	-2.24934	0.300862177
hsa-mir-153	-2.10042	0.300931686
hsa-let-7d	-2.98829	0.332705239

混合対正常

q 値 =0, 倍率変化 3

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	4.94136514	13.03477954
mir-182	4.75314464	8.234584867
mir-141	6.52792749	8.114549554
hsa-mir-200a	8.59775165	6.749192792
hsa-mir-205	3.15296179	6.612809032
mir-203	3.95187923	6.023471984
hsa-mir-200b	4.21752758	4.559403288
hsa-mir-302b*	2.97964866	3.793211487
hsa-mir-337	2.7911355	3.476209352

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-1	-2.9664742	0.104268828
hsa-mir-140	-3.2747728	0.106318579
hsa-mir-199a	-4.3900871	0.130723644
hsa-mir-137	-2.1620126	0.160523671
hsa-mir-214	-5.0278438	0.160582932
hsa-mir-145	-5.3314714	0.174664643
hsa-mir-143	-4.5203659	0.179176097
hsa-mir-199b	-3.7977335	0.180079351
hsa-mir-133a	-2.2671953	0.193349456
hsa-mir-9	-2.5636558	0.195399985
hsa-mir-101	-2.0553425	0.223886714
hsa-mir-9*	-3.1686816	0.243634991
hsa-mir-100	-2.8720969	0.258813665
hsa-mir-147	-3.2823363	0.264405641
hsa-mir-126	-2.5427505	0.273636302
hsa-mir-29c	-1.996995	0.287851362
hsa-mir-134	-4.3148185	0.293654878
hsa-mir-34c	-2.1549977	0.29946464
hsa-mir-10b	-2.9384249	0.303075071
hsa-mir-125a	-3.2480671	0.305281943
hsa-mir-224	-2.5926058	0.305719697
hsa-mir-105	-2.6330954	0.316376728
hsa-mir-181a*	-1.862744	0.321375183

【表６】

図１０続き - 表３続き

低分化対正常

q 値 !=0, 倍率変化 !>2

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-325	4.285621	5.169317934
hsa-mir-22	3.175124	4.632327322
hsa-miR-302c	2.847984	5.089229918
hsa-miR-299-5p	2.74905	3.473502434
hsa-miR-373*	2.685224	2.25107383
hsa-miR-196b	2.318534	2.000271165
hsa-miR-194	2.264066	2.501721471
hsa-mir-373	2.25371	2.455112892
hsa-miR-324-3p	2.231062	2.385770368
hsa-miR-302b*	2.200151	3.904843321
hsa-mir-222	2.167726	2.263162617
hsa-miR-105	1.998298	2.69462407
hsa-miR-124a	1.898917	2.611066113
hsa-miR-1	1.893946	2.183311521

【表７】

図１１－表４

漿液性対類内膜

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-302b*	2.1162067	4.562238026
hsa-miR-325	1.957964	2.804324646
hsa-miR-299-5p	1.9831227	2.733850997
hsa-miR-222	2.0673155	2.519055674
hsa-miR-324-3p	2.012373	2.40273827
hsa-miR-196b	2.222754	1.951149725
hsa-miR-135b	2.087203	1.817543895

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-212	-2.533951	0.455394471
hsa-miR-150	-2.4778111	0.531181718

漿液性対非漿液性

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-302b*	1.8856931	2.387166664
hsa-miR-22	1.8760835	2.289141433
hsa-mir-373	1.9671527	2.026991587

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-148b	-1.9350385	0.473389
hsa-miR-211	-1.5246626	0.380840675

低分化(PD)対非 PD

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-9	-1.667661896	0.30496814
hsa-mir-18	-1.573399409	0.275779483

類内膜対非類内膜

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-212	2.432924647	2.073840527

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-22	-1.656798515	0.204982703
hsa-miR-302b*	-2.041611412	0.248819032
hsa-miR-299-5p	-2.034194437	0.341389128
hsa-mir-325	-2.065466938	0.357016955
hsa-miR-194	-1.727883478	0.378903888
hsa-miR-101	-1.785001084	0.379589721
hsa-mir-373	-1.696286422	0.387321213
hsa-miR-324-3p	-1.977704757	0.424134141
hsa-mir-222	-1.783218284	0.42620566

明細胞対非明細胞

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-30a-5p	2.567858911	3.180690498
hsa-miR-29b	2.548556062	2.674746178
hsa-miR-30e-5p	2.090920369	2.632760423

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-20a	-2.08649871	0.408227411

【表８】

図１２－表５

リンパ脈管浸潤

遺伝子名	陰性遺伝子 スコア(d)	倍率変化	q－値(%)
hsa-mir-144	-1.96	0.215959317	0
hsa-mir-216	-1.33255	0.41718005	0

卵巣表面の関与

遺伝子名	陽性遺伝子 スコア(d)	倍率変化	q－値(%)
hsa-mir-101	2.018272	2.243033058	0
hsa-miR-182*	1.561247	2.065541993	0
hsa-mir-22	1.401532	2.457950079	0
hsa-miR-133a	1.381055	3.450487913	0

管の関与

遺伝子名	陰性遺伝子 スコア(d)	倍率変化	q－値(%)
hsa-mir-137	-1.9090693	0.37256783	0
hsa-mir-101	-1.7469971	0.390419388	0
hsa-mir-215	-1.4178719	0.324648273	0
hsa-mir-211	-1.1978493	0.407288227	0

骨盤腹膜

遺伝子名	陽性遺伝子 スコア(d)	倍率変化	q－値(%)
hsa-miR-302c	1.150474	2.293373976	0

子宮の関与

遺伝子名	陽性遺伝子 スコア(d)	倍率変化	q－値(%)
hsa-mir-133a-2	1.27588177	3.266174858	0
hsa-mir-143	1.91132897	2.362716504	0
hsa-mir-145	1.82832273	2.282302908	0
hsa-mir-1	1.57556619	2.278201035	0
hsa-mir-147	0.99659977	2.115494772	0
hsa-miR-126	1.36023908	2.08659655	0

【表９】

図１３－表６

卵巣癌における miR 上方調節	確認された標的	卵巣癌における発現	推定標的	卵巣癌における発現
miR-200a			BAP1	下方
			PDCD4	その他の腫瘍において下方
			GATA6	下方
			VCAM-1	下方
miR-200b			BAP1	下方
			GATA4	下方
			FN1 (フィブロネクチン 1)	下方
miR-200c			BAP1	下方
			FN1 (フィブロネクチン 1)	下方
miR-141	CLOCK(Kiriakidou M.ら、2004 年)		BAP1	下方
卵巣癌における miR 下方調節				
miR-140	HDAC4 (Tuddenham L.ら、2006 年)	上方	c-SRK	上方
			MMP13	上方
			FGF2	上方
miR-199a			CCNL1	上方(その他の腫瘍型)
miR-199b	LAMC2 (Kiriakidou M.ら、2004 年)	上方(その他の癌)		
miR-145	FLJ21308 (Kiriakidou M.ら、2004		COX-2(卵巣癌において、化学療法に対する耐性と予後不良に強く関連する)	
miR-143	ERK5 (Esau ら、2004 年)	上方(その他の癌)		上方
miR-125a	ERBB2, ERBB3 (Scott ら、2007 年)	上方		
miR-125b	ERBB2, ERBB3 (Scott ら、2007 年)	上方		
miR-101	Enx-1 (Lewis ら、2003 年)		COX-2	上方
	NYCN (Lewis ら、2003 年)	上方		
miR-212			WT1, BRCA1	
miR-222	c-KIT (Felli ら、2005 年)	低グレード OSC と比較して高グレードではより高い		

【表１０】

受託番号	ID	配列	配列 ID 番号
MIMAT0000682	hsa-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	1
MIMAT0000318	hsa-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	2
MIMAT0000617	hsa-miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA	3
MIMAT0000432	hsa-miR-141	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG	4
MIMAT0000714	hsa-miR-302b*	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC	5
MIMAT0000259	hsa-mir-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	6
MIMAT0000771	hsa-miR-325	CCUAGUAGGUGUCCAGUAAGUGU	7
MIMAT0000726	hsa-miR-373	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU	8
MIMAT0000264	hsa-miR-203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	9
MIMAT0000266	hsa-miR-205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	10
MIMAT0000231	hsa-miR-199a	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	11
MIMAT0000263	hsa-miR-199b	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	12
MIMAT0000435	hsa-miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	13
MIMAT0004604	hsa-miR-127	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU	14
MIMAT0000431	hsa-miR-140	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	15
MIMAT0000441	hsa-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	16
MIMAT0000427	hsa-miR-133a	UUUGGUCCCCUUJCAACCAGCUG	17
MIMAT0000102	hsa-miR-105	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	18
MIMAT0000099	hsa-miR-101	UACAGUACUGUGAUAACUGAA	19
MIMAT0000281	hsa-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	20
MIMAT0000445	hsa-miR-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	21
MIMAT0000098	hsa-miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	22
MIMAT0000251	hsa-miR-147	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC	23
MIMAT0000265	hsa-miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	24
MIMAT0000271	hsa-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	25
MIMAT0000097	hsa-miR-99a	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	26
MIMAT0000268	hsa-miR-211	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCU	27
MIMAT0000437	hsa-miR-145	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU	28
MIMAT0000065	hsa-let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	29
MIMAT0000422	hsa-miR-124	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	30
MIMAT0000443	hsa-miR-125a	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	31
MIMAT0000064	hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	32
MIMAT0000062	hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	33
MIMAT0000681	hsa-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	34
MIMAT0000461	hsa-miR-195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	35
MIMAT0000423	hsa-miR-125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	36
MIMAT0000727	hsa-miR-374	UUAUAAUACAACCUGAUAAGUG	37
MIMAT0000715	hsa-miR-302b	UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUAG	38
MIMAT0000086	hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	39
MIMAT0000076	hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	40
MIMAT0000259	hsa-miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	41
MIMAT0000270	hsa-miR-181a*	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	42
MIMAT0000273	hsa-miR-216	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	43
MIMAT0000717	hsa-miR-302c	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	44

【表１１】

MIMAT0000688	hsa-miR-301a	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAGC	45
MIMAT0000096	hsa-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	46
MIMAT0000074	hsa-miR-19h	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	47
MIMAT0000I00	hsa-miR-29h	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	48
MIMAT0000072	hsa-miR-18a	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	49
MIMAT0000452	hsa-miR-154	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG	50
MIMAT0000073	hsa-miR-19a	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	51
MIMAT0000439	hsa-miR-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	52
MIMAT0000436	hsa-miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	53
MIMAT0000279	hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	54
MIMAT0000416	hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	55
MIMAT0000684	hsa-miR-302a	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA	56
MIMAT0000686	hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	57
MIMAT0000272	hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	58
MIMAT0000085	hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	59
MIMAT0000770	hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA	60
MIMAT0002890	hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCGUCCCACAUACAU	61
MIMAT0000252	hsa-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU	62
MIMAT0000250	hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	63
MIMAT0000722	hsa-miR-370	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	64
MIMAT0000429	hsa-miR-137	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	65
MIMAT0000442	hsa-miR-9*	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU	66
MIMAT0002809	hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUUCCAUAGGCU	67
MIMAT0000087	hsa-miR-30	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	68
MIMAT0000095	hsa-miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	69
MIMAT0000646	hsa-miR-155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	70
MIMAT0000738	hsa-miR-383	AGAUCAGAAGGUGAUUGUGGCU	71
MIMAT0000244	hsa-miR-30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	72
MIMAT0002819	hsa-miR-193b	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	73
MIMAT0002811	hsa-miR-202	AGAGGUAUAGGGCAUGGGAA	74
MIMAT0000447	hsa-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	75
MIMAT0004696	hsa-miR-323-5p	AGGUGGUCCGUGGCGCGUUCGC	76
MIMAT0004695	hsa-miR-337-5p	GAACGGCUUCAUACAGGAGUU	77
MIMAT0000254	hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	78
MIMAT0000077	hsa-miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	79
MIMAT0001080	hsa-miR-196b	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	80
MIMAT0000460	hsa-miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	81
MIMAT0000761	hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	82
MIMAT0000758	hsa-miR-135b	UAUGGCUUUUCAUUCCUAUGUGA	83
MIMAT0000269	hsa-miR-212	UAACAGIJCUCCAGUCACGGCC	84
MIMAT0000451	hsa-miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	85
MIMAT0000759	hsa-miR-148b	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	86
MIMAT0000692	hsa-miR-30e	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG	87
MIMAT0000075	hsa-miR-20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	88
MIMAT0000256	hsa-miR-181a	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	89

【表１２】

MIMAT0000449	hsa-miR-146a	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU	90
MIMAT0004614	hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	91

【０２２１】
参考文献
【０２２２】
上述の参考文献および以下の参考文献は、それらが例示的手順または本明細書に記載される手順を補足するその他の詳細を提供する範囲内において、参照することにより本明細書に明確に組み込まれる。

1. Cannistra SA. Cancer of the ovary. N Engl J Med 2004;351:2519−29.
2. Greenlee RT, Hill−Harmon MB, Murray T and Thun M. Cancer statistics, 2001. CA Cancer J. Clin. 2001;51:15−36.
3. Feeley KM and Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. Histopathology 2001;38:87−95.
4. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. Mod Pathol 2005;18 Suppl 2:S19−32.
5. Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA et al. Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor−prognosis ovarian carcinomas. Cancer Res 2002;62:4722−9.
6. De Cecco L, Marchionni L, Gariboldi M et al. Gene expression profiling of advanced ovarian cancer: characterization of a molecular signature involving Fibroblast Growth Factor 2. Oncogene 2004;23:8171−83.
7. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Rev Genet 2004;5:522−31.
8. Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. Curr Opin Genet Dev 2005 ;5: 563−8.
9. Zamore PD, Haley B. Ribo−gnome: the big world of small RNAs. Science 2005;309:1519−24.
10. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let−7 microRNA family. Cell 2005;120:635−47.
11. Mayr C, Hemann MT, Bartel D. Disrupting the pairing between let−7 and HMGA2 enhances oncogenic transformation. Science 2007;315:1576−9.
12. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let−7 represses the HMGA2 oncogene. Genes Dev. 2007;21: 1025−30.
13. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR−15 and miR−16 induce apoptosis by t

argeting BCL2. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:13944−9.
14. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c−Myc−regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005;435:839−43.
15. He L, Thomson JM, Hemann MT et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature 2005 ;435: 828−33.
16. Voorhoeve PM, Ie Sage C, Schrier M et al. A genetic screen implicates miRNA−372 and miRNA−373 as Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. Cell 2006;124:1169− 81.
17. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y et al. Pre−B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high−grade lymphoma in E(mu)−miR155 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:7024−9.
18. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. Cancer Res. 2005;65:7065−70.
19. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006;6:857−66.
20. Esquela−Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs − microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:259−69.
21. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2005;353:1793−801.
22. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 2006;9:189−98.
23. Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. Oncogene 2006;25:6202−10.
24. Zhang L, Huang J, Yang N et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:9136−41.
25. Saito Y, Liang G, Egger G et al. Specific activation of microRNA−127 with downregulation of the proto−oncogene BCL6 by chromatin−modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell 2006;9:435−43.
26. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E et al. Genetic unmasking of an epigenetica

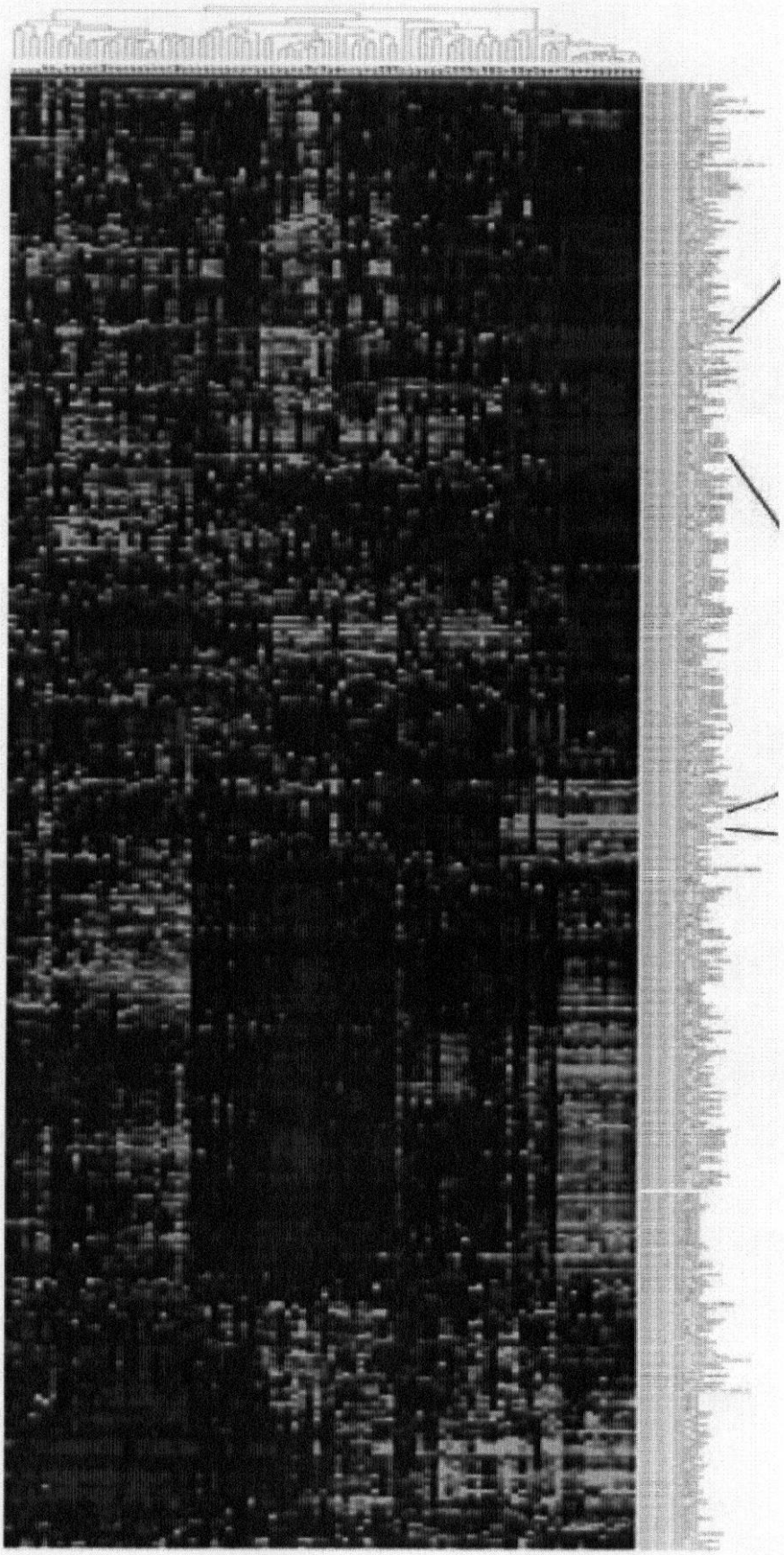
lly silenced microRNA in human cancer cells. Cancer Res 2007;67: 1424−9.
27. Brueckner B, Stresemann C, Kuner R et al. The human let−7a−3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. Cancer Res 2007;67:1419−23.
28. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome−wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:9740−4.
29. Wright GW, Simon RM. A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. Bioinformatics. 2003;19:2448−55.
30. Tusher VG, Tibshirani R and Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:5116−21.
31. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:6567−6572.
32. Scott GK, Goga A, Bhaumik D et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro−RNA miR−125a or miR−125b. J Biol Chem 2007;282: 1479−86.
33. Lewis BP, Shih IH, Jones−Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. Cell 2003;l 15:787−98.
34. Takai D, Jones PA. The CpG island searcher: a new WWW resource. In Silico Biol 2003;3:325−40.
35. Capo−chichi CD, Roland IH, Vandervee r L et al. Anomalous expression of epithelial differentiation−determining GATA factors in ovarian tumorigenesis. Cancer Res 2003;63:4967−77.
36. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non−tumorous tissues. Oncogene. 2006;25:2537−45.
37. Roldo C, Missaglia E, Hagan JP et al. MicroRNA expression abnormalities in p

ancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. J Clin Oncol 2006;24:4677-84.
38. Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:2257-61.
39. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res 2005;65:6029-33.
40. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPMl). J Biol Chem 2007;282: 14328-36.
41. Felli N, Fontana L, Pelosi E et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:18081-6.
42. He H, Jazdzewski K, Li W et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:19075-80.
43. Pallante P, Visone R, Ferracin M et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. Endocr Relat Cancer 2006; 13:497-508.
44. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. Int J Cancer 2007;120:1046-54.
45. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. Cancer Res 2006;66: 10843-8.
46. Marquez RT, Baggerly KA, Patterson AP et al. Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium and colon. Clin Cancer Res 2005;ll:6116-26.
47. Shedden KA, Kshirsagar MP, Schwartz DR et al. Histologic type, organ of origin, and Wnt pathway status: effect on gene expression in ovarian and uterine carcinomas. Clin Cancer Res 2005;ll:2123-31.

48. Thrall M, Gallion HH, Kryshio R et al. BRCA1 expression in a large series of sporadic ovarian carcinomas: a Gynecologic Oncology Group study. Int J Gynecol Cancer 2006;16 Suppl 1:166-71.
49. Lin YW, Sheu JC, Liu LY et al. Loss of heterozygosity at chromosome 13q in hepatocellular carcinoma: identification of three independent regions. Eur J Cancer 1999;35:1730-4.

【図１－１】

図１Ａ



【図１－２】

図１Ｂ

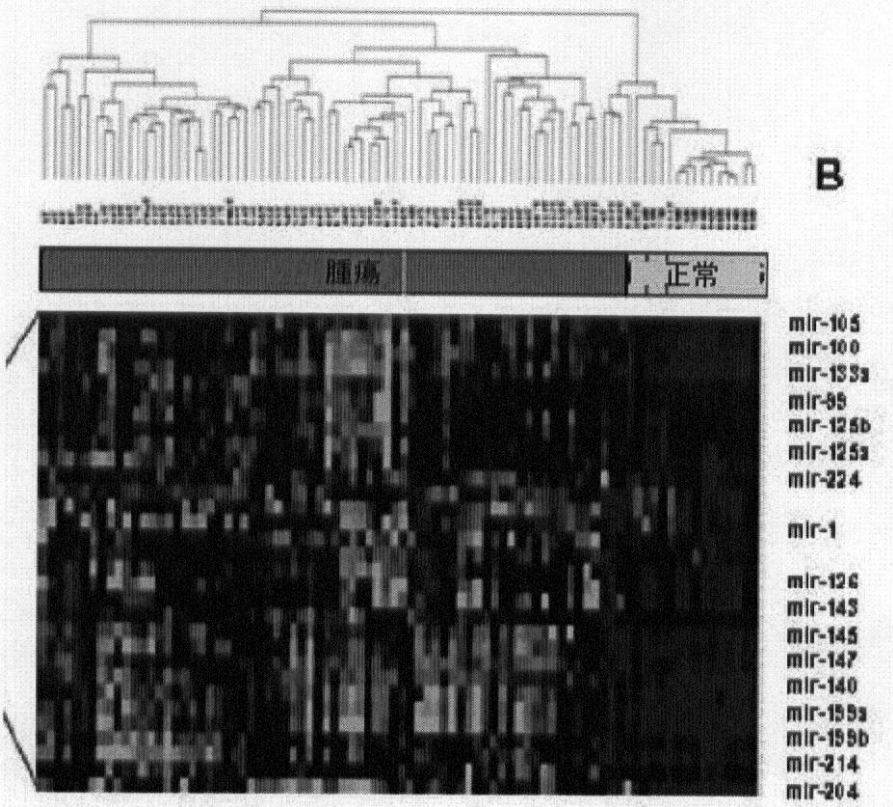
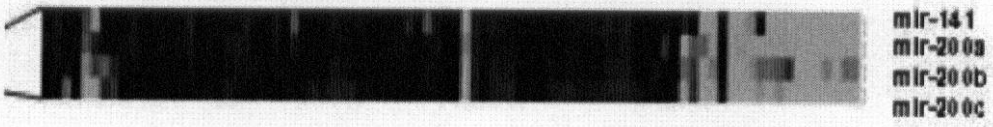
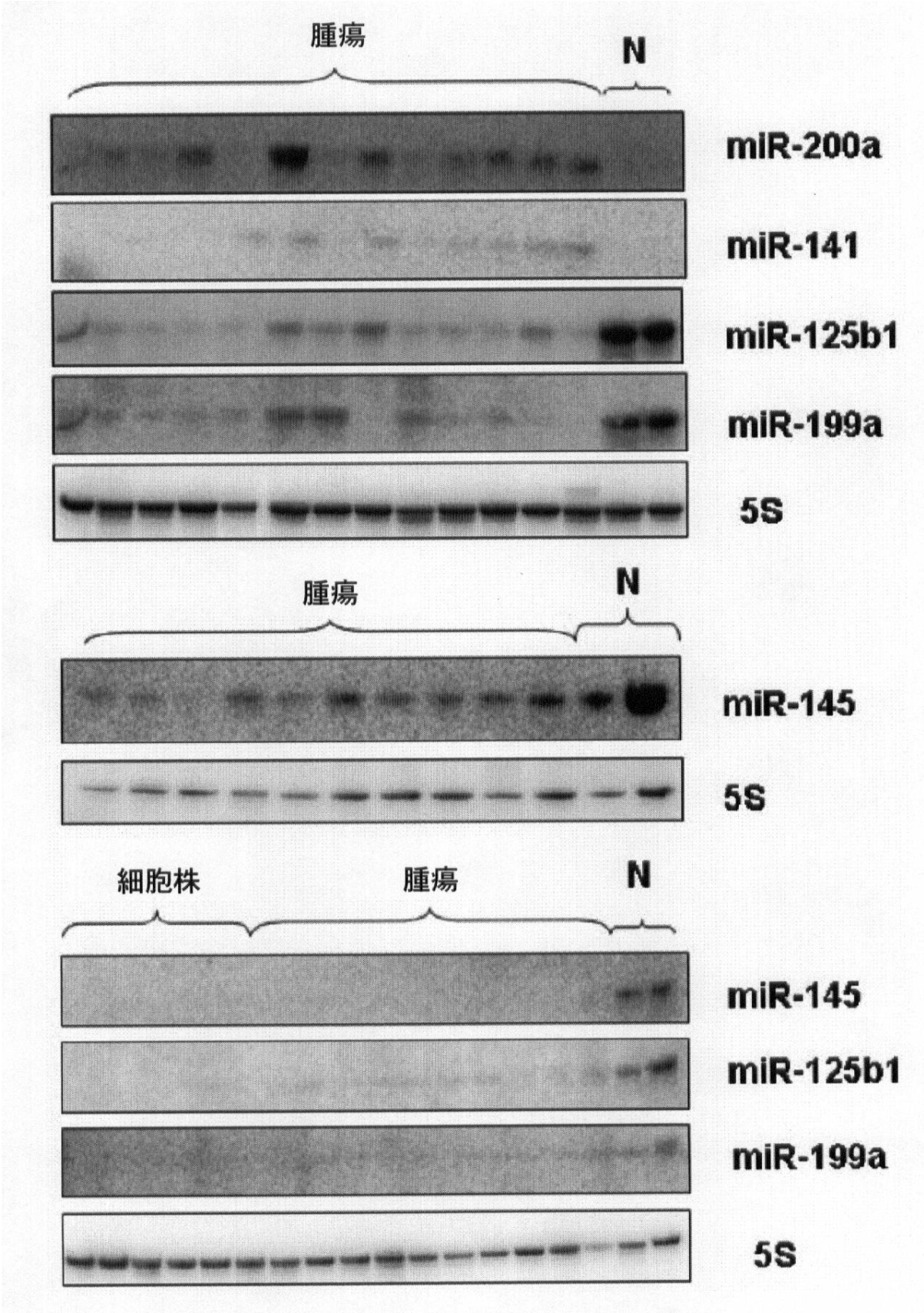

B
腫瘍
正常
mir-105
mir-100
mir-133a
mir-99
mir-125b
mir-125a
mir-224
mir-1
mir-126
mir-143
mir-145
mir-147
mir-140
mir-155a
mir-155b
mir-214
mir-204

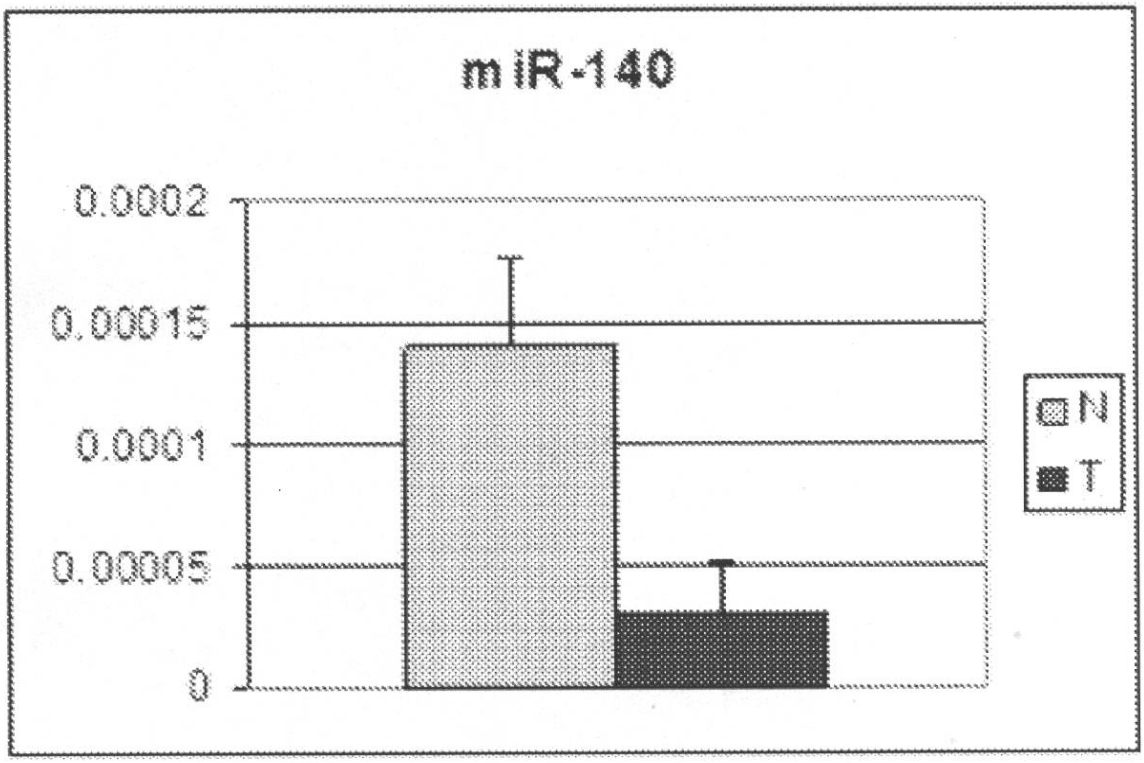
図１Ｃ


mir-141
mir-200a
mir-200b
mir-200c

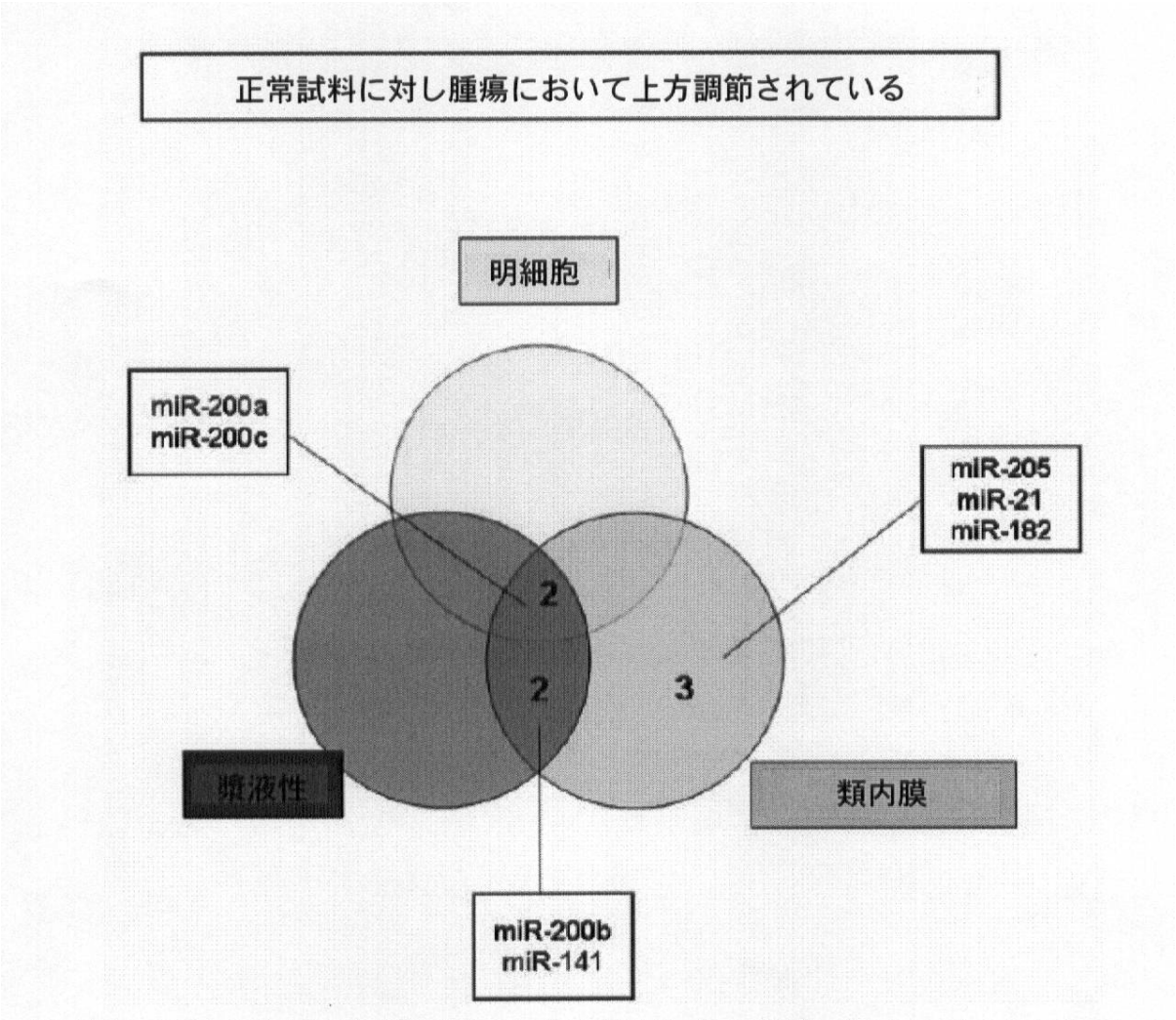
【図２Ａ】


腫瘍
N
miR-200a
miR-141
miR-125b1
miR-199a
5S
腫瘍
N
miR-145
5S
細胞株
腫瘍
N
miR-145
miR-125b1
miR-199a
5S

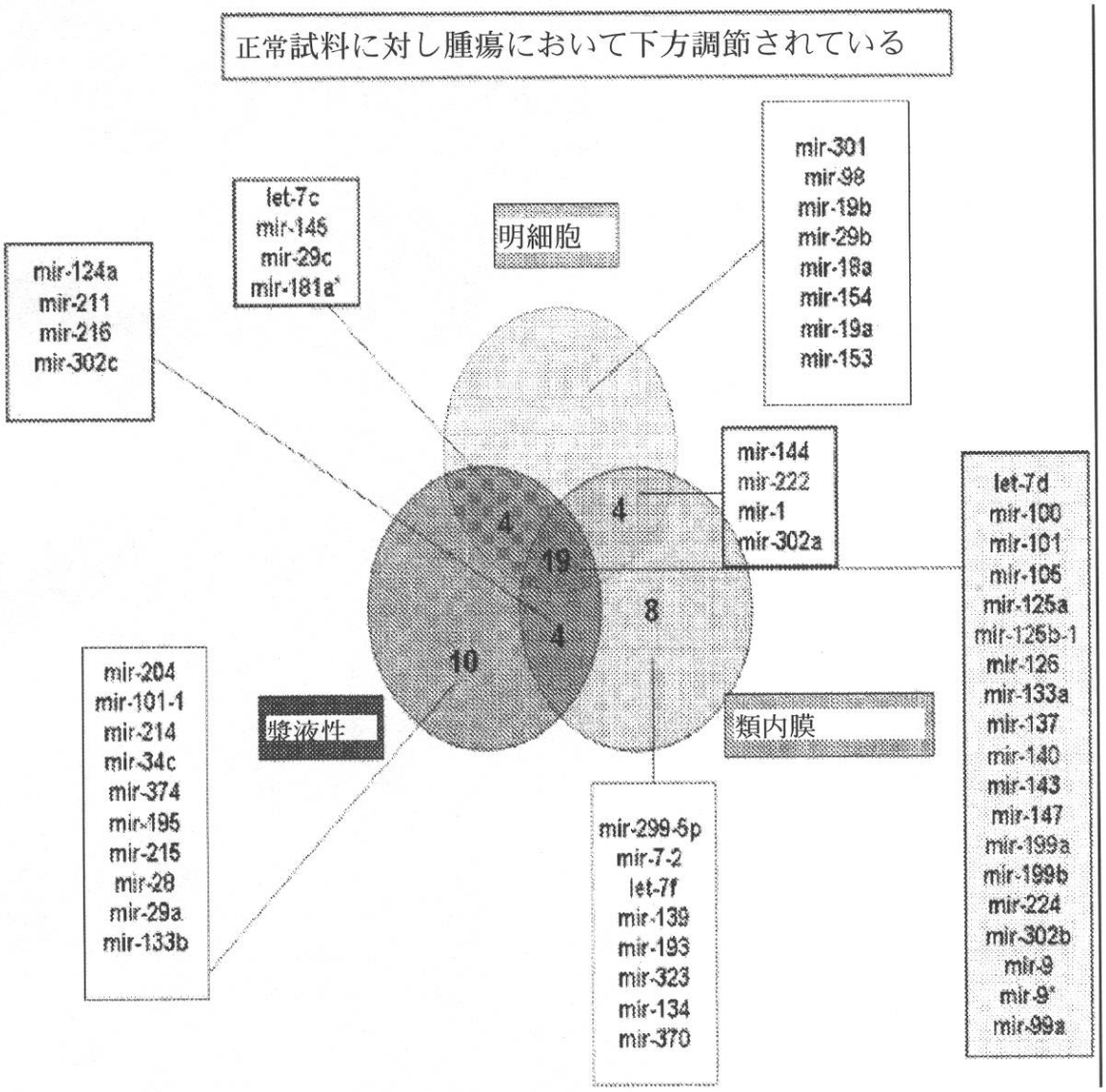
【図２Ｂ】


miR-140
0.0002
0.00015
0.0001
0.00005
0
N
T

【図３Ａ】


正常試料に対し腫瘍において上方調節されている
明細胞
miR-200a
miR-200c
miR-205
miR-21
miR-182
2
2
3
漿液性
類内膜
miR-200b
miR-141

【図３Ｂ】


正常試料に対し腫瘍において下方調節されている
明細胞
mir-301
mir-98
mir-19b
mir-29b
mir-18a
mir-154
mir-19a
mir-153
let-7c
mir-145
mir-29c
mir-181a*
mir-124a
mir-211
mir-216
mir-302c
mir-144
mir-222
mir-1
mir-302a
let-7d
mir-100
mir-101
mir-105
mir-125a
mir-125b-1
mir-126
mir-133a
mir-137
mir-140
mir-143
mir-147
mir-199a
mir-199b
mir-224
mir-302b
mir-9
mir-9*
mir-99a
4
19
4
4
8
10
mir-204
mir-101-1
mir-214
mir-34c
mir-374
mir-195
mir-215
mir-28
mir-29a
mir-133b
漿液性
類内膜
mir-299-5p
mir-7-2
let-7f
mir-139
mir-193
mir-323
mir-134
mir-370

【図４】

図４Ａ

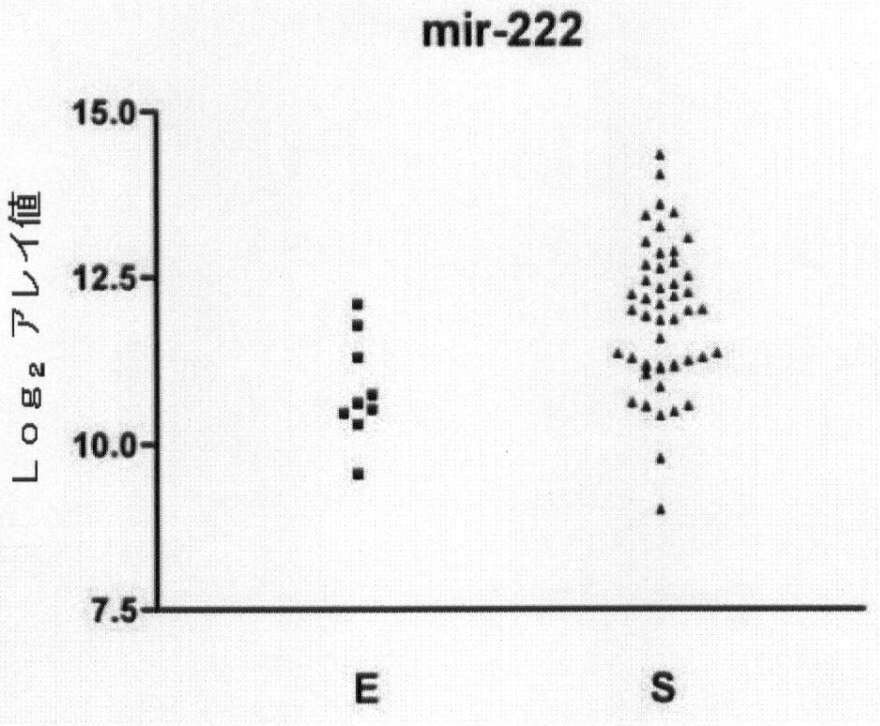
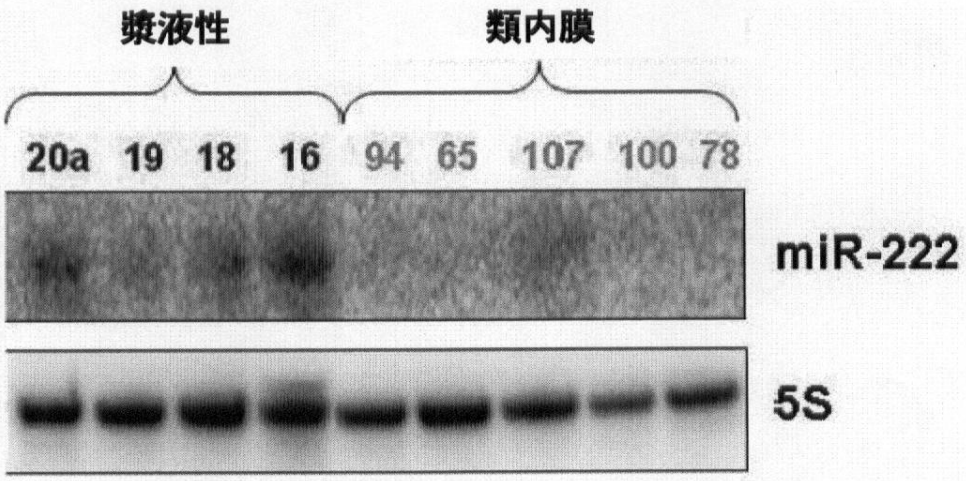

mir-222
15.0
12.5
10.0
7.5
Ｌｏｇ₂アレイ値
E
S

図４Ｂ


漿液性
類内膜
20a 19 18 16 94 65 107 100 78
miR-222
5S

【図５－１】

図５Ａ

miR 名称	FDR	幾何平均比率 ＡＺＡ／ＮＴ
hsa-mir-21	0.002013	4.277
hsa-mir-203	0.0067368	3.826
hsa-mir-146b	0.0095114	2.968
hsa-mir-205	0.0121302	2.877
hsa-miR-30a-5p	0.0160979	2.047
hsa-miR-96	0.0161969	0.476
hsa-mir-155	0.018638	1.784
hsa-mir-383	0.018638	0.474
hsa-miR-30c	0.018638	2.286
hsa-mir-193b	0.018638	2.09
hsa-mir-202	0.018638	1.782

図５Ｂ

【図５－２】

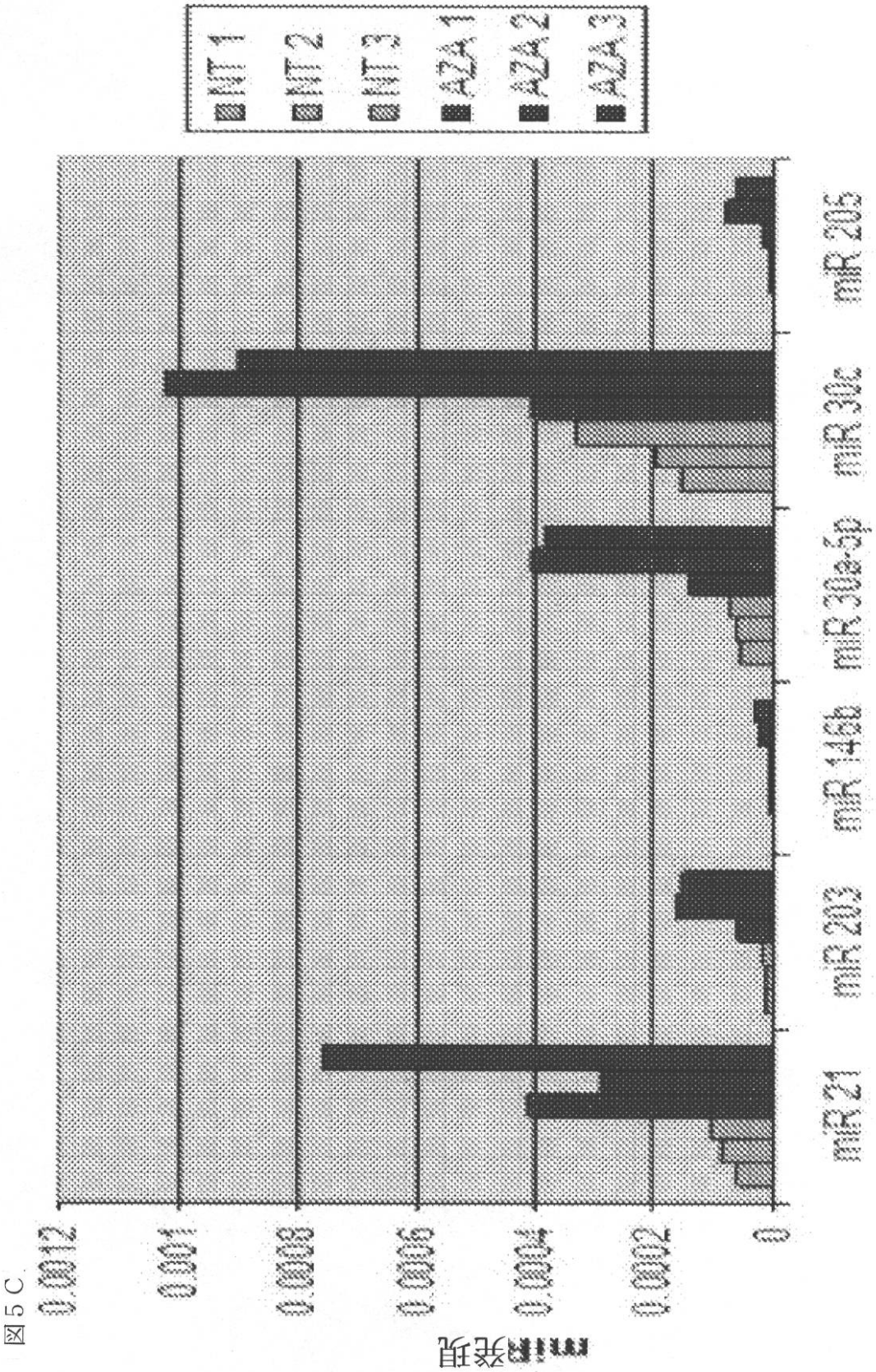
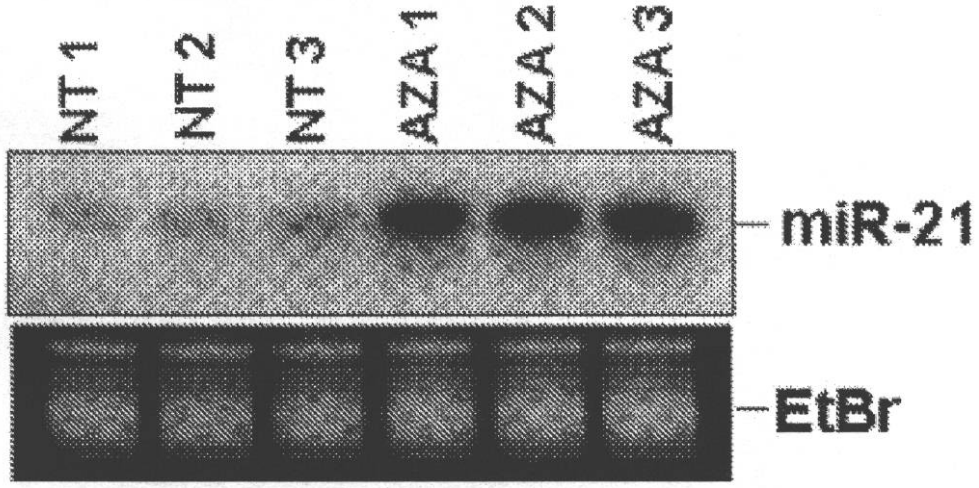

NT 1
NT 2
NT 3
AZA 1
AZA 2
AZA 3
miR発現
0.0012
0.001
0.0008
0.0006
0.0004
0.0002
0
miR 21
miR 203
miR 146b
miR 30a-5p
miR 30c
miR 205

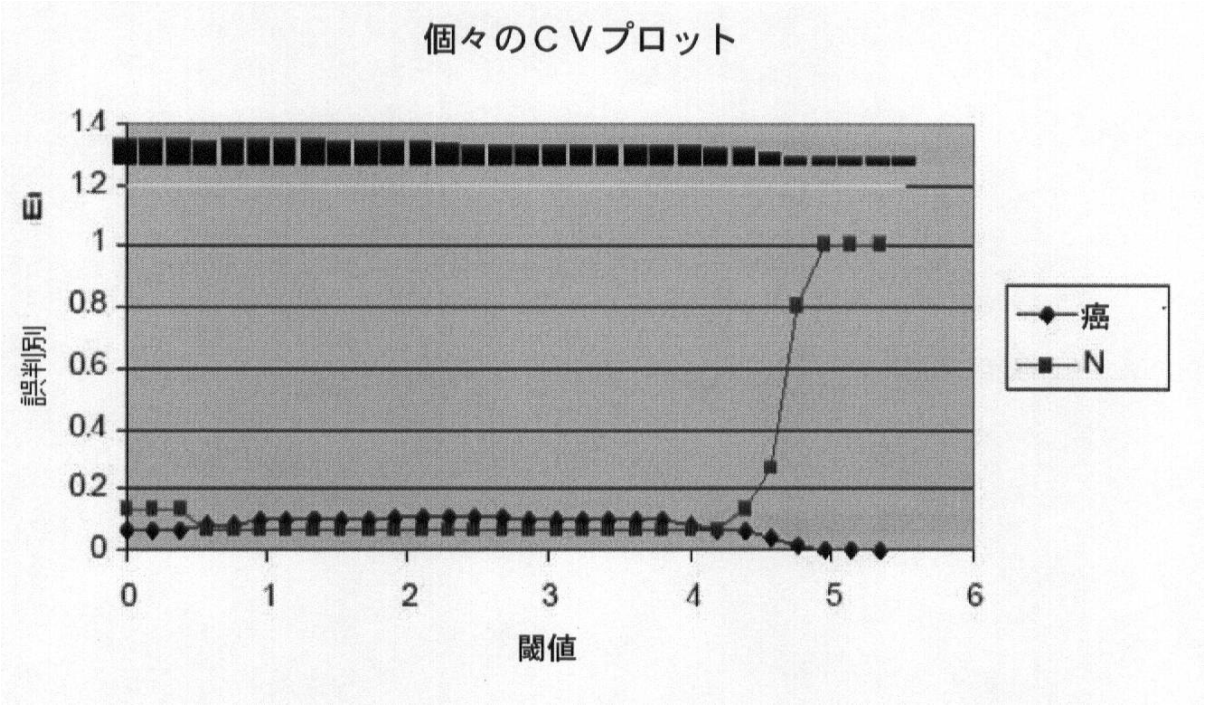
図５Ｃ

【図５－３】

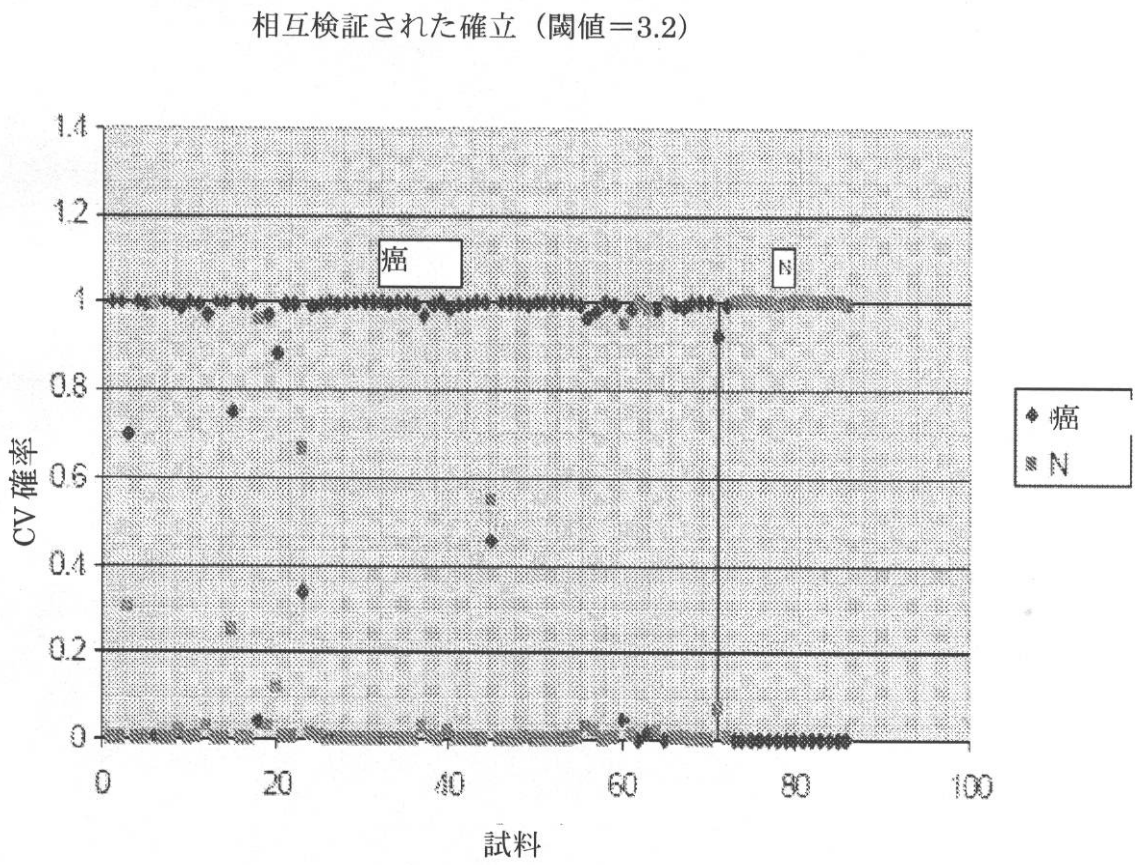
図５Ｄ


NT 1
NT 2
NT 3
AZA 1
AZA 2
AZA 3
miR-21
EtBr

【図６Ａ】


個々のＣＶプロット
誤判別
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
1
2
3
4
5
6
閾値
癌
N

【図６Ｂ】


相互検証された確立（閾値＝3.2）
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CV確率
癌
N
0
20
40
60
80
100
試料
癌
N

【図７－１】

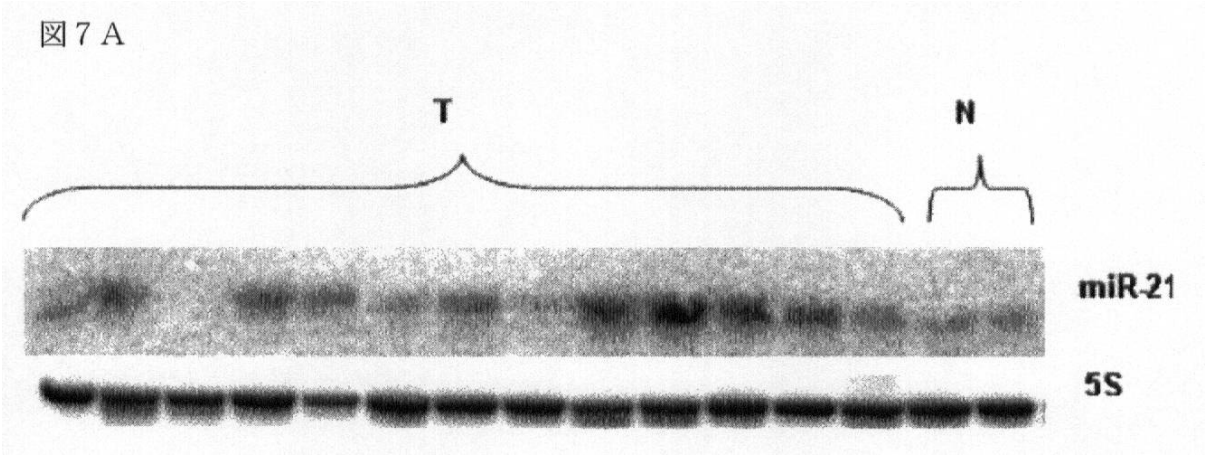
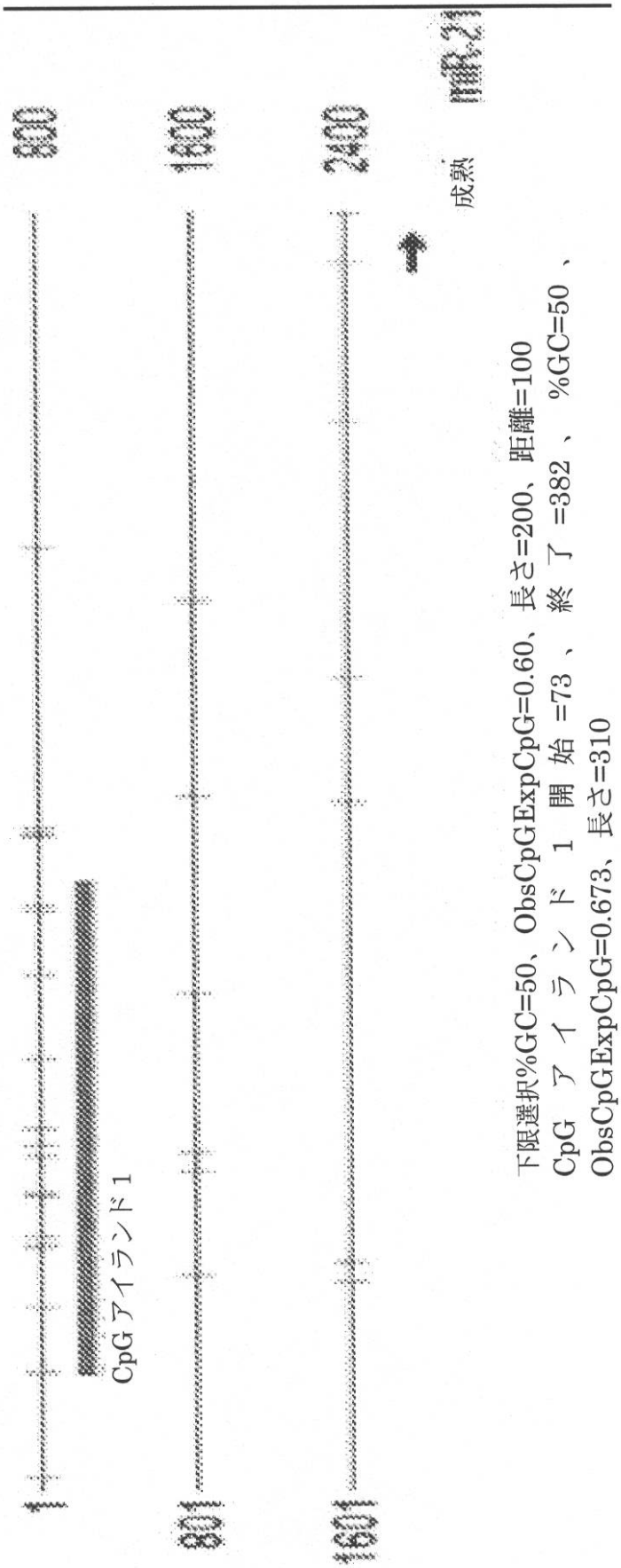


図７Ａ
T
N
miR-21
5S

【図７－２】

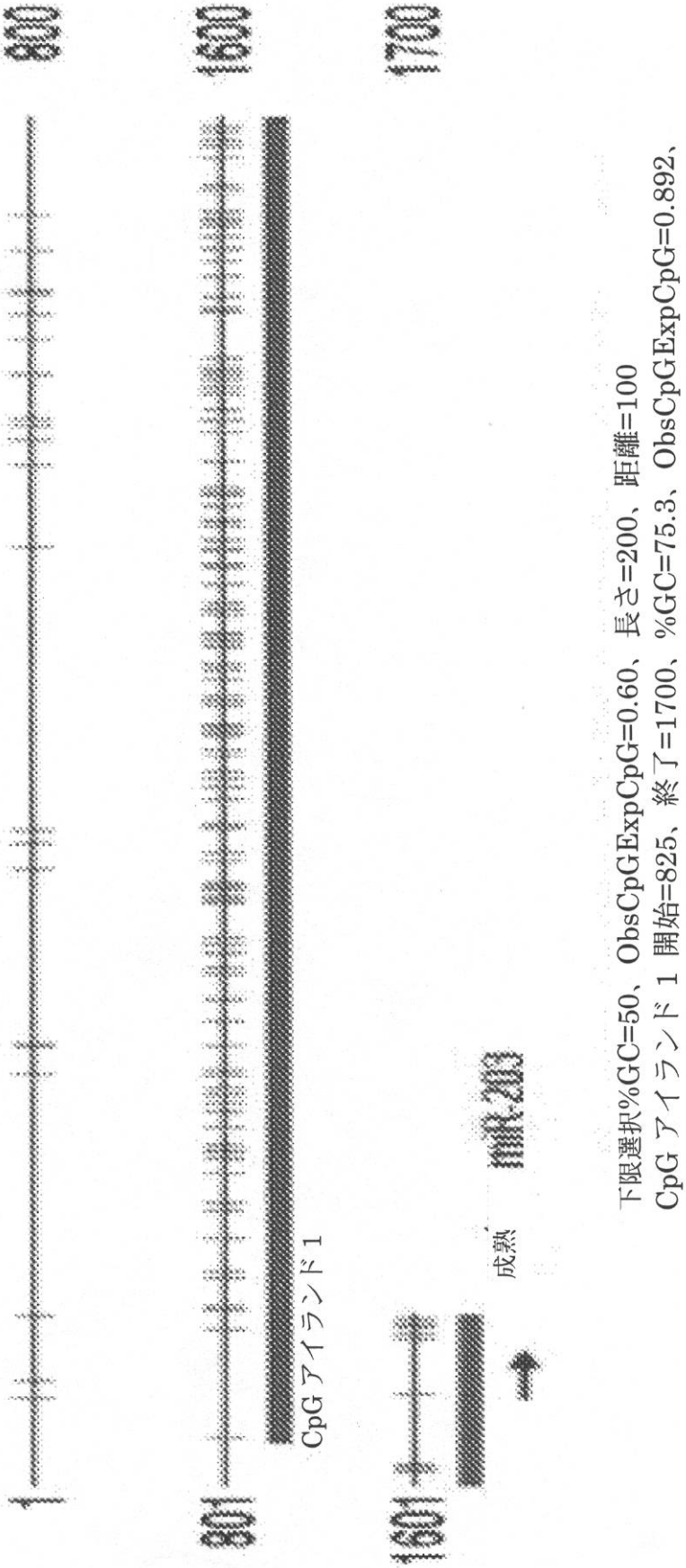
図７Ｂ



下限選択%GC=50、ObsCpGExpCpG=0.60、長さ=200、距離=100
CpG アイランド 1 開始 =73 、 終了 =382 、 %GC=50 、
ObsCpGExpCpG=0.673、長さ=310

【図７－３】

図７Ｂ続き



下限選択%GC=50、ObsCpGExpCpG=0.60、長さ=200、距離=100
CpG アイランド１ 開始=825、終了=1700、%GC=75.3、ObsCpGExpCpG=0.892、
長さ=876

【図８】

図８ - 表１

CV コンフュージョンマトリックス(閾値=3.23866)

真＼予測	癌	N	クラスエラー率
癌	63	8	0.112676056
N	1	14	0.066666667
誤判別エラー			= 0.11

microRNAs	癌スコア	N スコ	
Hsa-mir-200c	0.1152	-0.5454	
Hsa-mir-200a	0.1059	-0.5012	一致
Hsa-mir-199a	-0.098	0.4637	不一致
Hsa-mir-143	-0.0946	0.4479	Zhang 研究において変化なし
Hsa-mir-199b	-0.0887	0.4197	
Hsa-mir-141	0.0874	-0.4138	
Hsa-mir-145	-0.0734	0.3473	
Hsa-mir-147	-0.0679	0.3212	
Hsa-mir-133a	-0.0671	0.3176	
Hsa-mir-101	-0.0616	0.2917	
Hsa-mir-214	-0.0607	0.2873	
Hsa-mir-100	-0.0535	0.2533	
Hsa-mir-140	-0.0523	0.2474	
Hsa-mir-126	-0.0501	0.2371	
Hsa-mir-224	-0.0485	0.2294	
Hsa-mir-9	-0.0481	0.2277	
Hsa-mir-105	-0.0461	0.2184	
Hsa-mir-99a	-0.037	0.1753	
Hsa-mir-125a	-0.0315	0.1489	
Hsa-mir-211	-0.0248	0.1174	
Hsa-mir-127	-0.0232	0.11	
Hsa-mir-200b	0.0179	-0.0847	
Hsa-mir-125b-1	-0.0177	0.0837	
Hsa-let-7c	-0.0152	0.0719	
Hsa-let-7d	-0.0138	0.0654	
Hsa-mir-124a	-0.0121	0.0574	
Hsa-mir-374	-0.0119	0.0563	
Hsa-let-7a	-0.0113	0.0533	
Hsa-mir-134	-0.0014	0.0068	

【図９】

図９ - 表２

マイクロ RNA 上方調節

	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-200a	6.029559054	5.909228959
miR-141	5.282215009	6.676969496
hsa-miR-200c	5.072214667	8.522477876
hsa-mir-200b	3.833075725	3.305192114
hsa-miR-302b*	2.735468464	7.576624548
hsa-miR-182	2.474388072	4.629588641
has-mir-325	2.427712097	3.582141857
has-mir-373	2.366832731	3.10378255
hsa-mir-203	2.106735098	3.924966016
hsa-mir-205	1.912402407	3.913918092

マイクロ RNA 下方調節

	スコア(d)	1/倍率変化
hsa-mir-199a	-6.660234251	0.149170383
hsa-mir-199b	-6.411673443	0.158503458
hsa-mir-143	-6.25941986	0.208966195
hsa-mir-127	-6.239314997	0.36263205
hsa-mir-140	-6.141381353	0.284933473
hsa-mir-9	-6.109935294	0.213902307
hsa-mir-133a	-5.997775401	0.201323582
hsa-mir-105	-5.971698987	0.256386384
hsa-mir-101	-5.951436701	0.140368004
hsa-mir-224	-5.92099781	0.221057654
hsa-mir-126	-5.818430779	0.194310151
hsa-mir-100	-5.768583066	0.217155847
hsa-mir-147	-5.743104574	0.225260363
hsa-mir-204	-5.642915363	0.135983578
hsa-mir-214	-5.63781891	0.226868132
hsa-mir-99a	-5.61022158	0.29031027
hsa-mir-211	-5.52630143	0.151341246
hsa-mir-145	-5.522715864	0.268284181
hsa-let-7d	-5.353956412	0.292557531
hsa-mir-124a	-5.308572049	0.30918176
hsa-mir-125a	-5.275376888	0.285112002
hsa-let-7c	-5.155238667	0.313348909
hsa-let-7a	-5.043893498	0.346201662
hsa-mir-29c	-4.992819698	0.284842858
hsa-mir-195	-4.880474865	0.333200438
hsa-mir-125b	-4.706809872	0.319219655
hsa-mir-374	-4.625938802	0.260209699
hsa-miR-302b	-4.540380253	0.26329528
hsa-miR-29a	-4.538932739	0.330079052

一致
不一致
Zhang 研究において変化なし

【図１０－１】

図１０－表３

漿液性対正常

q値 =0, 倍率変化 >3

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	4.874822	9.316226469
hsa-mir-141	4.105882	6.297820292
hsa-mir-200a	5.22409	6.21082388
hsa-mir-200b	3.028617	3.354261291

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-137	-4.79547	0.148869513
hsa-mir-101	-4.20173	0.156683391
hsa-mir-199a	-4.95379	0.157135174
hsa-mir-211	-3.6933	0.159546591
hsa-mir-204	-4.35187	0.160197536
hsa-mir-199b	-4.77294	0.169477272
hsa-mir-101-1	-4.61299	0.205344813
hsa-mir-126	-4.31991	0.205709452
hsa-mir-224	-4.51103	0.210351178
hsa-mir-214	-4.4747	0.211015924
hsa-mir-143	-4.66151	0.225560787
hsa-mir-133a	-4.27006	0.22613586
hsa-mir-147	-4.19961	0.244193755
hsa-mir-34c	-3.49226	0.244581699
hsa-mir-100	-4.031	0.244948271
hsa-mir-302c	-2.7653	0.263419845
hsa-mir-374	-3.44084	0.264221816
hsa-mir-9	-4.22971	0.271871858
hsa-mir-101	-4.10703	0.281023282
hsa-mir-125a	-3.96362	0.284404726
hsa-mir-195	-4.22039	0.288096703
hsa-mir-29c	-3.81131	0.289651915
hsa-mir-105	-4.22771	0.290067186
hsa-mir-145	-4.16437	0.291445115
hsa-let-7d	-3.95134	0.300703735
hsa-mir-302b	-3.13456	0.30356362
hsa-mir-9*	-3.40033	0.307833212
hsa-mir-216	-2.98653	0.309688574
hsa-mir-99a	-4.06488	0.311194043
hsa-mir-140	-5.02723	0.313106918
hsa-mir-125b-1	-3.54736	0.314166789
hsa-mir-215	-3.62675	0.315298054
hsa-let-7c	-3.8424	0.31529976
hsa-mir-181a*	-3.69974	0.319272615
hsa-mir-124a	-3.80122	0.320240298
hsa-mir-28	-2.56159	0.33142251
hsa-let-7d	-3.80275	0.332028327
hsa-mir-29a	-3.46281	0.333446637
hsa-mir-133b	-2.68467	0.333883896

【図１０－２】

図１０続き - 表３続き

類内膜対正常

q 値[illegible]=0, 倍率変化[illegible]>3

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	5.602789	11.35184732	4.285621	5.169317934
hsa-mir-141	6.66868	8.134845605	3.175124	4.632327322
hsa-mir-200a	5.873119	5.577590602	2.847984	5.089229918
hsa-mir-205	4.091189	4.268810393	2.74905	3.473502434
hsa-mir-21	3.308304	3.933420772	2.685224	2.25107383
hsa-mir-182	3.336352	3.755931307	2.318534	2.000271165
hsa-mir-200b	3.822882	3.58677048	2.264066	2.501721471
			2.25371	2.455112892
			2.231062	2.385770368
			2.200151	3.904843321
			2.167726	2.263162617
			1.998298	2.69462407
			1.898917	2.611066113
			1.893946	2.183311521

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-302c	-4.5238	0.057739797
hsa-mir-140	-4.32451	0.122075074
hsa-mir-101	-4.28657	0.132249108
hsa-mir-9	-4.06022	0.165300935
hsa-mir-147	-5.31115	0.170117845
hsa-mir-302b	-3.40316	0.177459541
hsa-mir-9*	-3.96329	0.177591359
hsa-mir-133a	-4.81939	0.1833621
hsa-mir-137	-2.7233	0.18888881
hsa-mir-299-5p	-4.39191	0.192261887
hsa-mir-105	-4.82847	0.202341368
hsa-mir-199b	-4.4869	0.209194024
hsa-mir-199a	-4.52646	0.210975698
hsa-mir-124a	-4.58559	0.214502778
hsa-mir-100	-4.17774	0.21482284
hsa-mir-211	-2.41054	0.240456539
hsa-mir-224	-3.8354	0.242984707
hsa-mir-143	-4.79084	0.249925609
hsa-mir-126	-3.76437	0.250497146
hsa-mir-1	-3.88978	0.271896204
hsa-mir-7-2	-2.91243	0.280749401
hsa-mir-302a	-2.203	0.289793304
hsa-mir-99a	-3.7768	0.294318696
hsa-mir-216	-1.97425	0.311440033
hsa-mir-125b-1	-3.72135	0.313838284
hsa-let-7d	-3.92129	0.314438715
hsa-let-7f	-4.38303	0.317245972
hsa-mir-139	-2.99323	0.32021126
hsa-mir-125a	-3.54416	0.321469706
hsa-mir-193	-3.35024	0.3275396
hsa-mir-144	-2.56969	0.32905162
hsa-mir-222	-2.70438	0.330732291
hsa-mir-323	-5.14298	0.335905205
hsa-mir-134	-4.3392	0.336555522
hsa-mir-370	-3.40042	0.339804603

【図１０－３】

図１０続き - 表３続き

明細胞対正常

q 値 =0, 倍率変化 >3

陽性遺伝子	倍率変化 遺伝子名	スコア(d)
hsa-mir-200c	3.727262	8.735679382
hsa-mir-200a	4.251752	3.777659435

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-133a	-2.93133	0.088082129
hsa-mir-140	-2.97299	0.121810358
hsa-mir-301	-2.39538	0.123963114
hsa-mir-137	-2.27518	0.14653595
hsa-mir-1	-2.33148	0.147859091
hsa-mir-9	-2.96241	0.148568071
hsa-mir-101	-3.2276	0.166648407
hsa-mir-100	-3.83532	0.168061777
hsa-mir-9*	-2.83792	0.174089614
hsa-mir-199b	-3.67083	0.178632358
hsa-mir-105	-3.64152	0.196628255
hsa-mir-98	-3.50536	0.205661462
hsa-mir-302a	-2.1459	0.211204706
hsa-mir-199a	-3.56433	0.212611204
hsa-mir-126	-3.07167	0.22443264
hsa-mir-125a	-3.94158	0.22469509
hsa-mir-143	-3.8477	0.229220021
hsa-mir-19b	-2.84997	0.231739108
hsa-mir-125b-1	-3.97578	0.232452007
hsa-mir-29a	-2.55383	0.236887361
hsa-mir-147	-3.22581	0.237154001
hsa-mir-29c	-2.28388	0.243218229
hsa-mir-222	-2.5152	0.244824885
hsa-mir-99a	-3.2997	0.25237176
hsa-mir-224	-3.01436	0.252667402
hsa-mir-29b	-2.32129	0.25626224
hsa-mir-18a	-1.87174	0.261229849
hsa-mir-144	-2.11054	0.263378089
hsa-mir-100	-3.22544	0.275300179
hsa-mir-154	-2.4006	0.278357698
hsa-mir-302b	-1.87776	0.282435823
hsa-mir-29b	-2.36214	0.284442159
hsa-mir-125b	-3.37335	0.285579607
hsa-let-7d	-3.39786	0.285816741
hsa-let-7c	-3.1888	0.295568469
hsa-mir-145	-3.61294	0.297295886
hsa-mir-181a*	-1.97299	0.29770489
hsa-mir-19b	-2.24934	0.300862177
hsa-mir-153	-2.10042	0.300931686
hsa-let-7d	-2.98829	0.332705239

混合対正常

q 値 =0, 倍率変化 3

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-200c	4.94136514	13.03477954
mir-182	4.75314464	8.234584867
mir-141	6.52792749	8.114549554
hsa-mir-200a	8.59775165	6.749192792
hsa-mir-205	3.15296179	6.612809032
mir-203	3.95187923	6.023471984
hsa-mir-200b	4.21752758	4.559403288
hsa-mir-302b*	2.97964866	3.793211487
hsa-mir-337	2.7911355	3.476209352

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-1	-2.9664742	0.104268828
hsa-mir-140	-3.2747728	0.106318579
hsa-mir-199a	-4.3900871	0.130723644
hsa-mir-137	-2.1620126	0.160523671
hsa-mir-214	-5.0278438	0.160582932
hsa-mir-145	-5.3314714	0.174664643
hsa-mir-143	-4.5203659	0.179176097
hsa-mir-199b	-3.7977335	0.180079351
hsa-mir-133a	-2.2671953	0.193349456
hsa-mir-9	-2.5636558	0.195399985
hsa-mir-101	-2.0553425	0.223886714
hsa-mir-9*	-3.1686816	0.243634991
hsa-mir-100	-2.8720969	0.258813665
hsa-mir-147	-3.2823363	0.264405641
hsa-mir-126	-2.5427505	0.273636302
hsa-mir-29c	-1.996995	0.287851362
hsa-mir-134	-4.3148185	0.293654878
hsa-mir-34c	-2.1549977	0.29946464
hsa-mir-10b	-2.9384249	0.303075071
hsa-mir-125a	-3.2480671	0.305281943
hsa-mir-224	-2.5926058	0.305719697
hsa-mir-105	-2.6330954	0.316376728
hsa-mir-181a*	-1.862744	0.321375183

【図１０－４】

図１０続き - 表３続き

低分化対正常

q 値 =0, 倍率変化 >2

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-325	4.285621	5.169317934
hsa-mir-22	3.175124	4.632327322
hsa-miR-302c	2.847984	5.089229918
hsa-miR-299-5p	2.74905	3.473502434
hsa-miR-373*	2.685224	2.25107383
hsa-miR-196b	2.318534	2.000271165
hsa-miR-194	2.264066	2.501721471
hsa-mir-373	2.25371	2.455112892
hsa-miR-324-3p	2.231062	2.385770368
hsa-miR-302b*	2.200151	3.904843321
hsa-mir-222	2.167726	2.263162617
hsa-miR-105	1.998298	2.69462407
hsa-miR-124a	1.898917	2.611066113
hsa-miR-1	1.893946	2.183311521

【図１１】

図１１－表４

漿液性対類内膜

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-302b*	2.1162067	4.562238026
hsa-miR-325	1.957964	2.804324646
hsa-miR-299-5p	1.9831227	2.733850997
hsa-miR-222	2.0673155	2.519055674
hsa-miR-324-3p	2.012373	2.40273827
hsa-miR-196b	2.222754	1.951149725
hsa-miR-135b	2.087203	1.817543895

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-212	-2.533951	0.455394471
hsa-miR-150	-2.4778111	0.531181719

漿液性対非漿液性

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-302b*	1.8856931	2.387166664
hsa-miR-22	1.8760835	2.289141433
hsa-mir-373	1.9671527	2.026991587

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-148b	-1.9350385	0.473389
hsa-miR-211	-1.5246626	0.380840675

低分化(PD)対非 PD

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-mir-9	-1.667661896	0.30496814
hsa-mir-18	-1.573399409	0.275779483

類内膜対非類内膜

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-212	2.432924647	2.073840527

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-22	-1.656798515	0.204982703
hsa-miR-302b*	-2.041611412	0.248819032
hsa-miR-299-5p	-2.034194437	0.341389128
hsa-mir-325	-2.065466938	0.357016955
hsa-miR-194	-1.727883478	0.378903888
hsa-miR-101	-1.785001084	0.379589721
hsa-mir-373	-1.696286422	0.387321213
hsa-miR-324-3p	-1.977704757	0.424134141
hsa-mir-222	-1.783218284	0.42620566

明細胞対非明細胞

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-30a-5p	2.567858911	3.180690498
hsa-miR-29b	2.548556062	2.674746178
hsa-miR-30e-5p	2.090920369	2.632760423

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化
hsa-miR-20a	-2.08649871	0.408227411

【図１２】

図１２－表５

リンパ脈管浸潤

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	q－値 (%)
hsa-mir-144	-1.96	0.215959317	0
hsa-mir-216	-1.33255	0.41718005	0

卵巣表面の関与

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	q－値 (%)
hsa-mir-101	2.018272	2.243033058	0
hsa-miR-182*	1.561247	2.065541993	0
hsa-mir-22	1.401532	2.457950079	0
hsa-miR-133a	1.381055	3.450487913	0

管の関与

陰性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	q－値 (%)
hsa-mir-137	-1.9090693	0.37256783	0
hsa-mir-101	-1.7469971	0.390419388	0
hsa-mir-215	-1.4178719	0.324648273	0
hsa-mir-211	-1.1978493	0.407288227	0

骨盤腹膜

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	q－値 (%)
hsa-miR-302c	1.150474	2.293373976	0

子宮の関与

陽性遺伝子

遺伝子名	スコア(d)	倍率変化	q－値 (%)
hsa-mir-133a-2	1.27588177	3.266174858	0
hsa-mir-143	1.91132897	2.362716504	0
hsa-mir-145	1.82832273	2.282302908	0
hsa-mir-1	1.57556619	2.278201035	0
hsa-mir-147	0.99659977	2.115494772	0
hsa-miR-126	1.36023908	2.08659655	0

【図１３】

図１３－表６

卵巣癌における miR 上方調節	確認された標的	卵巣癌における発現	推定標的	卵巣癌における発現
miR-200a			BAP1	下方
			PDCD4	その他の腫瘍において下方
			GATA6	下方
			VCAM-1	下方
miR-200b			BAP1	下方
			GATA4	下方
			FN1 (フィブロネクチン 1)	下方
miR-200c			BAP1	下方
			FN1 (フィブロネクチン 1)	下方
miR-141	CLOCK(Kiriakidou M.ら、2004 年)		BAP1	下方
卵巣癌における miR 下方調節				
miR-140	HDAC4 (Tuddenham L.ら、2006 年)	上方	c-SRK	上方
			MMP13	上方
			FGF2	上方
miR-199a			CCNL1	上方(その他の腫瘍型)
miR-199b	LAMC2 (Kiriakidou M.ら、2004 年)	上方(その他の癌)		
miR-145	FLJ21308 (Kiriakidou M.ら、2004		COX-2(卵巣癌において、化学療法に対する耐性と予後不良に強く関連する)	
miR-143	ERK5 (Esau ら、2004 年)	上方(その他の癌)		上方
miR-125a	ERBB2, ERBB3 (Scott ら、2007 年)	上方		
miR-125b	ERBB2, ERBB3 (Scott ら、2007 年)	上方		
miR-101	Enx-1 (Lewis ら、2003 年)		COX-2	上方
	NYCN (Lewis ら、2003 年)	上方		
miR-212			WT1, BRCA1	
miR-222	c-KIT (Felli ら、2005 年)	低グレード OSC と比較して高グレードではより高い		

フロントページの続き

(74)代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 クロース，カルロ・エム
アメリカ合衆国オハイオ州４３２２１，コロンブス，ケンブリッジ・ブールバード ２１４０

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Modern Pathology; 96th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology,Vol.20,No.Suppl.2(Feb.2007)p.197A(Abstract#897)
病理と臨床,Vol.24,No.2(2006)p.167-172
Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR); 98th Annual Meeting of the AACR,Vol.48(Apr.2007)Abstract#4514
PNAS,Vol.103,No.24(2006)p.9136-9141

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／６８
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）