

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-533503

(P2010-533503A)

(43) 公表日 平成22年10月28日(2010.10.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-517192 (P2010-517192)	(71) 出願人	308032460 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ コロラド, ア ボディー コ ーポレート アメリカ合衆国 コロラド 80203, デンバー, グラント ストリート 1 800, 8ティーエイチ フロアー
(86) (22) 出願日	平成20年7月18日 (2008.7.18)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85) 翻訳文提出日	平成22年3月11日 (2010.3.11)	(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/070508	(72) 発明者	ポート, ジョナサン デイビッド アメリカ合衆国, コロラド州 80120 , デンバー, サウス スティール ストリ ート 2970
(87) 国際公開番号	W02009/012468		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成21年1月22日 (2009.1.22)		
(31) 優先権主張番号	60/950, 565		
(32) 優先日	平成19年7月18日 (2007.7.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ヒト非不全心とヒト不全心との対比におけるマイクロRNAの差次的発現

(57) 【要約】

本発明は、心不全の治療における新規のバイオマーカー及び治療標的としての特定の miRNA を開示する。これらの特定の miRNA の模倣物又はインヒビターを投与することにより、被験者において心不全を治療又は予防する方法が開示される。1つ又は複数の miRNA の発現レベルを測定することにより、被験者において心不全を診断又は予後予測する方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者において心不全を診断又は予後予測する方法であって、

a．前記被験者からの生体試料における1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを測定することと、

b．前記生体試料における1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを、標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較することと、

を含み、

前記標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較した前記生体試料における少なくとも1つ又は複数のmiRNAの発現レベルの差が、心不全の診断又は予後の指標となる、方法。

10

【請求項2】

前記1つ又は複数のmiRNAが、hsa-miR-542-5p(配列番号1)、hsa-miR-125b(配列番号2)、hsa-miR-197(配列番号3)、hsa-miR-195(配列番号4)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-139(配列番号6)、hsa-miR-100(配列番号7)、hsa-miR-483(配列番号8)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-23a(配列番号10)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(配列番号16)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、hsa-miR-199a(配列番号25)、hsa-miR-181b(配列番号26)、hsa-miR-20a(配列番号27)、hsa-let-7c(配列番号28)、hsa-miR-484(配列番号29)、hsa-miR-26b(配列番号30)、hsa-let-7d(配列番号31)、hsa-miR-10b(配列番号32)、hsa-miR-382(配列番号33)、hsa-miR-92b(配列番号48)、hsa-let-7b(配列番号49)、hsa-let-7e(配列番号50)、及びhsa-let-7g(配列番号51)から選択される、請求項1に記載の方法。

20

30

【請求項3】

前記1つ又は複数のmiRNAが、hsa-miR-125b(配列番号2)、hsa-miR-195(配列番号4)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-100(配列番号7)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、及びhsa-miR-199a(配列番号25)から選択される、請求項2に記載の方法。

40

【請求項4】

前記1つ又は複数のmiRNAが、hsa-miR-195(配列番号4)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-100(配列番号7)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、及びhsa-miR-422b(配列番号16)から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

c．前記標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較した前記生体試料

50

における1つ又は複数のmiRNAのレベルに基づき、心不全のタイプを診断すること、をさらに含み、

前記1つ又は複数のmiRNAのレベルが、虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の診断の指標となる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記1つ又は複数のmiRNAが、hsa-miR-125b(配列番号2)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(配列番号16)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、及びhsa-miR-199a(配列番号25)から選択される、請求項5に記載の方法。

10

【請求項7】

被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法であって、

治療有効量のmiRNA模倣物又はmiRNAインヒビターを、前記被験者の心臓細胞に投与すること、を含む、方法。

【請求項8】

前記miRNA模倣物又は前記miRNAインヒビターが、hsa-miR-542-5p(配列番号1)、hsa-miR-125b(配列番号2)、hsa-miR-197(配列番号3)、hsa-miR-195(配列番号4)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-139(配列番号6)、hsa-miR-100(配列番号7)、hsa-miR-483(配列番号8)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-23a(配列番号10)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(配列番号16)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、hsa-miR-199a(配列番号25)、hsa-miR-181b(配列番号26)、hsa-miR-20a(配列番号27)、hsa-let-7c(配列番号28)、hsa-miR-484(配列番号29)、hsa-miR-26b(配列番号30)、hsa-let-7d(配列番号31)、hsa-miR-10b(配列番号32)、hsa-miR-382(配列番号33)、hsa-miR-92b(配列番号48)、hsa-let-7b(配列番号49)、hsa-let-7e(配列番号50)、及びhsa-let-7g(配列番号51)からなる群から選択されるmiRNAの1つ又は複数の模倣物又はインヒビターである、請求項7に記載の方法。

20

30

40

【請求項9】

前記miRNA模倣物が、hsa-miR-197(配列番号3)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-139(配列番号6)、hsa-miR-483(配列番号8)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(配列番号16)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hsa-let-7a(

50

配列番号 22)、hsa-miR-1(配列番号 23)、hsa-miR-20a(配列番号 27)、hsa-let-7c(配列番号 28)、hsa-miR-484(配列番号 29)、hsa-let-7d(配列番号 31)、又はhsa-miR-10b(配列番号 32)の配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記miRNA模倣物が、hsa-miR-133b(配列番号 19)の配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記miRNAインヒビターが、hsa-miR-125b(配列番号 2)、hsa-miR-195(配列番号 4)、hsa-miR-100(配列番号 7)、hsa-miR-23a(配列番号 10)、hsa-miR-342(配列番号 14)、hsa-miR-28(配列番号 24)、hsa-miR-199a(配列番号 25)、hsa-miR-181b(配列番号 26)、hsa-miR-26b(配列番号 30)、又はhsa-miR-382(配列番号 33)と相補的な配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記miRNAインヒビターが、hsa-miR-100(配列番号 7)と相補的な配列を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記miRNAインヒビターがアンタゴmirである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記被験者に第 2 の心臓治療薬を投与することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記第 2 の心臓治療薬が、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、血管拡張薬、エンドセリン受容体拮抗薬、及びHDAC阻害薬からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 2 の心臓治療薬が、前記miRNA模倣物又は前記miRNAインヒビターと併用投与される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 2 の心臓治療薬が、前記miRNA模倣物又は前記miRNAインヒビターの前又は後に投与される、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 18】

被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法であって、

前記被験者に医薬組成物を投与することであって、前記医薬組成物が、少なくとも 1 つのmiRNA模倣物又は少なくとも 1 つのmiRNAインヒビターと、薬学的に許容可能な担体とを含む、こと、

を含む方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つのmiRNA模倣物又は前記少なくとも 1 つのmiRNAインヒビターが、hsa-miR-542-5p(配列番号 1)、hsa-miR-125b(配列番号 2)、hsa-miR-197(配列番号 3)、hsa-miR-195(配列番号 4)、hsa-miR-92a(配列番号 5)、hsa-miR-139(配列番号 6)、hsa-miR-100(配列番号 7)、hsa-miR-483(配列番号 8)、hsa-miR-22(配列番号 9)、hsa-miR-23a(配列番号 10)、hsa-miR-486(配列番号 11)、hsa-miR150(配列番号 12)、hsa-miR-30c(配列番号 13)、hsa-miR-342(配列番号 14)、hsa-miR-133a(配列番号 15)、hsa-miR-422b(配列番号 16)、hsa-miR-221(配列番号 17)、hsa-let-7f(配列番号 18)、hsa-miR-133b(配列番号 19)、hsa-miR-222(配列番号 20)、h

40

50

s a - m i R - 2 2 4 (配列番号 2 1)、h s a - l e t - 7 a (配列番号 2 2)、h s a - m i R - 1 (配列番号 2 3)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号 2 4)、h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号 2 5)、h s a - m i R - 1 8 1 b (配列番号 2 6)、h s a - m i R - 2 0 a (配列番号 2 7)、h s a - l e t - 7 c (配列番号 2 8)、h s a - m i R - 4 8 4 (配列番号 2 9)、h s a - m i R - 2 6 b (配列番号 3 0)、h s a - l e t - 7 d (配列番号 3 1)、h s a - m i R - 1 0 b (配列番号 3 2)、h s a - m i R - 3 8 2 (配列番号 3 3)、h s a - m i R - 9 2 b (配列番号 4 8)、h s a - l e t - 7 b (配列番号 4 9)、h s a - l e t - 7 e (配列番号 5 0)、及び h s a - l e t - 7 g (配列番号 5 1) からなる群から選択される m i R N A の 1 つ又は複数の模倣物又はインヒビターである、請求項 1 8 に記載の方法。

10

【請求項 2 0】

前記少なくとも 1 つの m i R N A 模倣物が、h s a - m i R - 1 9 7 (配列番号 3)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号 5)、h s a - m i R - 1 3 9 (配列番号 6)、h s a - m i R - 4 8 3 (配列番号 8)、h s a - m i R - 2 2 (配列番号 9)、h s a - m i R - 4 8 6 (配列番号 1 1)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号 1 2)、h s a - m i R - 3 0 c (配列番号 1 3)、h s a - m i R - 1 3 3 a (配列番号 1 5)、h s a - m i R - 4 2 2 b (配列番号 1 6)、h s a - m i R - 2 2 1 (配列番号 1 7)、h s a - l e t - 7 f (配列番号 1 8)、h s a - m i R - 1 3 3 b (配列番号 1 9)、h s a - m i R - 2 2 2 (配列番号 2 0)、h s a - m i R - 2 2 4 (配列番号 2 1)、h s a - l e t - 7 a (配列番号 2 2)、h s a - m i R - 1 (配列番号 2 3)、h s a - m i R - 2 0 a (配列番号 2 7)、h s a - l e t - 7 c (配列番号 2 8)、h s a - m i R - 4 8 4 (配列番号 2 9)、h s a - l e t - 7 d (配列番号 3 1)、又は h s a - m i R - 1 0 b (配列番号 3 2) の配列を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

20

【請求項 2 1】

前記少なくとも 1 つの m i R N A インヒビターが、h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号 2)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号 4)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号 7)、h s a - m i R - 2 3 a (配列番号 1 0)、h s a - m i R - 3 4 2 (配列番号 1 4)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号 2 4)、h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号 2 5)、h s a - m i R - 1 8 1 b (配列番号 2 6)、h s a - m i R - 2 6 b (配列番号 3 0)、又は h s a - m i R - 3 8 2 (配列番号 3 3) と相補的な配列を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

前記少なくとも 1 つの m i R N A インヒビターがアンタゴミルである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記医薬組成物が、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、血管拡張薬、エンドセリン受容体拮抗薬、及び H D A C 阻害薬のうちの 1 つ又は複数を含み、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞における胎児心臓遺伝子プログラム (F G P) の再活性化を調節する方法であって、
心臓細胞に 1 つ又は複数の m i R N A インヒビター又は m i R N A 模倣物を提供することを含み、前記 1 つ又は複数の m i R N A インヒビター又は m i R N A 模倣物が、前記胎児心臓遺伝子プログラムの少なくとも 1 つのマーカーの発現を調整する、方法。

40

【請求項 2 5】

前記 1 つ又は複数の m i R N A インヒビター又は m i R N A 模倣物が、h s a - m i R - 5 4 2 - 5 p (配列番号 1)、h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号 2)、h s a - m i R - 1 9 7 (配列番号 3)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号 4)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号 5)、h s a - m i R - 1 3 9 (配列番号 6)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号 7)、h s a - m i R - 4 8 3 (配列番号 8)、h s a - m i R - 2 2 (

50

配列番号 9)、hsa-miR-23a(配列番号10)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(配列番号16)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、hsa-miR-199a(配列番号25)、hsa-miR-181b(配列番号26)、hsa-miR-20a(配列番号27)、hsa-let-7c(配列番号28)、hsa-miR-484(配列番号29)、hsa-miR-26b(配列番号30)、hsa-let-7d(配列番号31)、hsa-miR-10b(配列番号32)、hsa-miR-382(配列番号33)、hsa-miR-92b(配列番号48)、hsa-let-7b(配列番号49)、hsa-let-7e(配列番号50)、及びhsa-let-7g(配列番号51)からなる群から選択されるmiRNAの模倣物又はインヒビターである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物が、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-100(配列番号7)、又はhsa-miR-133b(配列番号19)の模倣物又はインヒビターである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記胎児心臓遺伝子プログラムの少なくとも1つのマーカーが、MyHC、MyHC、ANF、BNP、SERCA2a、及び骨格筋-アクチンからなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

被験者において心不全の治療をモニタする方法であって、

- a. 第1の時点で前記被験者から第1の生体試料を採取することであって、前記第1の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始前である、ことと、
 - b. 第2の時点で前記被験者から第2の生体試料を採取することであって、前記第2の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始後である、ことと、
 - c. 前記第1の生体試料及び前記第2の生体試料を、miRNA配列解析、mRNA配列解析及び標的プロテオーム発現解析によって処理することと、
 - d. 前記第1の生体試料からのmiRNA、mRNA、及びタンパク質の発現データを、前記第2の生体試料からの発現データと比較して、前記薬物治療プロトコルの有効性の指標となる遺伝子発現パターンの変化を測定することと、
- を含む、方法。

【請求項29】

前記第1の時点と前記第2の時点との間隔が、約3~9ヶ月である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記mRNA解析が、Affymetrixプロトコルによって実施される、請求項28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

本願は、全体として参照により本明細書に援用される2007年7月18日出願の米国仮特許出願第60/950,565号の利益を主張する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

発明の背景

心不全は、心臓が十分な血液を拍出することができず、組織又は細胞の代謝に必要な栄養及び酸素が満たされない病態生理学的状態である。心不全は、多くの心疾患における主要な合併症である。40歳超の成人は、心不全を発症する生涯リスクが推定21%であり(Lloyd-Jones et al., 2002, Circulation 106, 3068-72)、いかなる癌合併形態と比べても入院期間をより長引かせる原因となる病態である(American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics-2003 Update)。

【 0 0 0 3 】

心不全は、多くの疾患過程の最後に共通する終末点を表す総称である。心不全の最も一般的な原因は冠動脈疾患であり、これは心筋梗塞(心発作)に至り得るもので、結果として心臓の細胞死を招くことが多い。このとき心臓は、代償するため、残りの生組織で同じ作業を行わなければならない。心筋梗塞がない場合に、慢性の閉塞性冠動脈疾患も心不全を引き起こし得る。弁膜症又は高血圧は、心臓の仕事量が増加することによって心不全に至り得る。心不全の原因となることが少ないものは、主として心筋が関わり、心筋症として分類される(この用語は、心不全のあらゆる原因を網羅して、より総称的に使用される)。これらの疾病のうち最も良く特徴付けられているのは、サルコメアの単一遺伝子病群であり、これは多くの場合に「肥大型心筋症」の表現型を生じる(実際には、多くの患者は肥大がなく、すなわち表現型の浸透度は様々であるため誤称である)。対照的に、「拡張型心筋症」の患者は全て、心室が拡張して壁が薄くなる。この病態の遺伝学はいまだ特徴付けられておらず、多因子性である可能性が高いが、多くの場合に非遺伝的原因(例えば、感染症、アルコール、化学療法剤)が大きく関与し得る。容易に特定可能な原因が分からない場合に用いられる診断は、特発性拡張型心筋症(概して除外診断)である。

10

20

【 0 0 0 4 】

心不全を発症すると、心臓に様々な病態生理学的変化が起こる。生体内における仕事量の増加に応じ、直接的な結果として、但し心筋細胞肥大(すなわち、細胞分裂がないなかでの細胞サイズの増加)による続発性の心臓サイズの増加(心肥大)がよく認められる。細胞及び分子レベルでは、心肥大は収縮タンパク質の発現増加及び様々なシグナル伝達経路の活性化によって特徴付けられるが、心不全の病態生理学におけるその役割は、依然として完全には理解されていない。

30

【 0 0 0 5 】

心不全に対する現行の治療としては、薬理学的方法、補助人工心臓(VAD)などの装置、心臓再同期療法(CRT)、及び心臓移植が挙げられる。薬理学的手法としては、限定はされないが、強心薬(すなわち、心収縮能を増加させる化合物)、神経液性遮断薬(neurohumoral blocker)(例えば、遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬)、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、及び血管拡張薬の使用が挙げられる。しかしながら、このような薬剤のいずれも、単用するにしろ、又は併用するにしろ、完全には有効でない。移植の利用可能性は極めて限られており、且つ心不全を患う人の多くは健康状態が悪いため、外科手術の対象としては不適當であることが多い。このような理由から、特に先進国世界において、心不全は依然として罹病率及び死亡率の主な原因である。加えて、上記に指摘されるとおり、心不全の正確な病因を決定することは困難であるといつてよく、より特異的な治療法の開発を妨げる要因となっている。加えて、分子レベルにおける診断技術が一般的に欠如している。従って、当該技術分野では、心不全の治療に向けて、さらなる診断マーカー及び新規治療手法を開発するための薬理学的標的を開発する必要がある。加えて、当該技術分野では、心不全の重症度及びその治療に対する反応の評価技術について、現行のものも、及びいまだ記載がなされていないものも、改良する必要がある。本発明は、とりわけ前述の必要性に対処する。

40

【 0 0 0 6 】

心肥大及びそれが心不全に進行する可能性は、高血圧症、虚血性心疾患、弁膜症、及び内分泌障害を含む様々な心血管疾患に対する共通の病理学的反応である。心肥大は心筋(

50

心筋層)の肥厚を指し、その結果、血流の遮断及び/又は心機能(拡張期弛緩)の低下が生じ得る。心肥大は、正常な生理学的過程(厳密な運動)か、或いは、高血圧症、弁狭窄症若しくは弁閉鎖不全症、虚血、又は代謝疾患などの病態生理学的過程のいずれかの帰結として心臓が負荷を受けるときに起こり得る;二次的には、心肥大はプログラム細胞死(アポトーシス)及び/又は組織壊死を伴うことが多くある。心臓細胞はほとんどが分裂不可能であることから、細胞は代償しようとしてより大きくなる;最初のうちは、この代償は有用であるが、過度に肥大すると次第に他の様々な病態生理学的なカスケードを活性化し、結果として進行性心機能不全を生じ、最終的には非代償性心不全に至り得る。心肥大は、高血圧などの他の心疾患リスク要因に追加される独立したリスク要因であり得るため、高血圧が治療されても、肥大は退縮することも、又はしないこともある。従って、心肥大の直接的な治療があれば有益であろう。

10

【0007】

マイクロRNA(miRNA)は、調節RNAのなかの近年発見されたクラスであり、遺伝子発現を転写後調節する。miRNAは、約18~25ヌクレオチド長の、進化的に保存された低分子の非コードRNA分子である。miRNAは特定の「標的」mRNAと塩基対を形成し、そうすることによって翻訳を阻害したり、又はmRNA分解を促進したりする(Bartel, 2004 Cell, 116, 281-297)。

【0008】

miRNAは、生体の発生に関与することが報告されている(Ambros, Cell 113: 673-676)。miRNAは、様々な組織において発現が異なる(Xu et al, 2003 Curr. Biol. 13:790-795; Landgraf et al, 2007 Cell 129: 1401-14)。miRNAはまた、ウイルス感染過程に関与すること(Pfeffer et al., 2004 Science 304: 734-736)、及び腫瘍形成に関連すること(Calin, et al., 2004 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 2999-3004; Calin et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(24): 15524-15529)も報告されている。心臓においては特定のmiRNAが高い存在量で発現するものの、様々な心疾患におけるこのようなmiRNAの役割は、依然として定義されていない。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

本発明は、被験者において心不全を診断又は予後予測する(prognose)方法を提供する。一実施形態において、本方法は、被験者からの生体試料における1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを測定することと、前記生体試料における1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを、標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較することとを含み、ここで、前記標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較した前記生体試料における少なくとも1つ又は複数のmiRNAの発現レベルの差が、心不全の診断又は予後の指標となる。

30

【0010】

別の実施形態において、心不全を診断又は予後予測する方法に用いられる1つ又は複数のmiRNAは、hsa-miR-542-5p(配列番号1)、hsa-miR-125b(配列番号2)、hsa-miR-197(配列番号3)、hsa-miR-195(配列番号4)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-139(配列番号6)、hsa-miR-100(配列番号7)、hsa-miR-483(配列番号8)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-23a(配列番号10)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(miR-378としても公知;配列番号16)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hs

40

50

a - l e t - 7 a (配列番号 2 2)、h s a - m i R - 1 (配列番号 2 3)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号 2 4)、h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号 2 5)、h s a - m i R - 1 8 1 b (配列番号 2 6)、h s a - m i R - 2 0 a (配列番号 2 7)、h s a - l e t - 7 c (配列番号 2 8)、h s a - m i R - 4 8 4 (配列番号 2 9)、h s a - m i R - 2 6 b (配列番号 3 0)、h s a - l e t - 7 d (配列番号 3 1)、h s a - m i R - 1 0 b (配列番号 3 2)、h s a - m i R - 3 8 2 (配列番号 3 3)、h s a - m i R - 9 2 b (配列番号 4 8)、h s a - l e t - 7 b (配列番号 4 9)、h s a - l e t - 7 e (配列番号 5 0)、及び h s a - l e t - 7 g (配列番号 5 1) から選択される。

【 0 0 1 1 】

別の実施形態において、心不全を診断又は予後予測する方法に用いられる1つ又は複数のmiRNAは、h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号 2)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号 4)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号 5)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号 7)、h s a - m i R - 2 2 (配列番号 9)、h s a - m i R - 4 8 6 (配列番号 1 1)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号 1 2)、h s a - m i R - 3 0 c (配列番号 1 3)、h s a - m i R - 3 4 2 (配列番号 1 4)、h s a - m i R - 1 3 3 a (配列番号 1 5)、h s a - m i R - 2 2 1 (配列番号 1 7)、h s a - l e t - 7 f (配列番号 1 8)、h s a - m i R - 1 3 3 b (配列番号 1 9)、h s a - m i R - 2 2 2 (配列番号 2 0)、h s a - l e t - 7 a (配列番号 2 2)、h s a - m i R - 1 (配列番号 2 3)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号 2 4)、及び h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号 2 5) から選択される。

【 0 0 1 2 】

好ましい実施形態において、心不全を診断又は予後予測する方法に用いられる1つ又は複数のmiRNAは、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号 4)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号 5)、h s a - m i R - 1 0 0 (配列番号 7)、h s a - m i R - 4 8 6 (配列番号 1 1)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号 1 2)、及び h s a - m i R - 4 2 2 b (m i R - 3 7 8 としても公知 ; 配列番号 1 6) から選択される。

【 0 0 1 3 】

本発明のさらに別の実施形態において、前記標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較した前記生体試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルに基づき、心不全のタイプが診断され、ここで1つ又は複数のmiRNAのレベルは、虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の診断の指標となる。好ましくは、虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の診断の指標となる1つ又は複数のmiRNAは、h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号 2)、h s a - m i R - 2 2 (配列番号 9)、h s a - m i R - 1 5 0 (配列番号 1 2)、h s a - m i R - 3 0 c (配列番号 1 3)、h s a - m i R - 3 4 2 (配列番号 1 4)、h s a - m i R - 1 3 3 a (配列番号 1 5)、h s a - m i R - 4 2 2 b (m i R - 3 7 8 としても公知 ; 配列番号 1 6)、h s a - l e t - 7 f (配列番号 1 8)、h s a - m i R - 1 3 3 b (配列番号 1 9)、h s a - m i R - 2 2 2 (配列番号 2 0)、h s a - l e t - 7 a (配列番号 2 2)、h s a - m i R - 1 (配列番号 2 3)、h s a - m i R - 2 8 (配列番号 2 4)、及び h s a - m i R - 1 9 9 a (配列番号 2 5) から選択される。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法も提供する。一実施形態において、本方法は、治療有効量のmiRNA模倣物又はmiRNAインヒビターを被験者の心臓細胞に投与することを含む。

【 0 0 1 5 】

別の実施形態において、心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法に用いられるmiRNA模倣物又はmiRNAインヒビターは、h s a - m i R - 5 4 2 - 5 p (配列番号 1)、h s a - m i R - 1 2 5 b (配列番号 2)、h s a - m i R - 1 9 7 (配列番号 3)、h s a - m i R - 1 9 5 (配列番号 4)、h s a - m i R - 9 2 a (配列番号 5)、h s a - m i R - 1 3 9 (配列番号 6)、h s a - m i R - 1

10

20

30

40

50

00 (配列番号7)、hsa-miR-483 (配列番号8)、hsa-miR-22 (配列番号9)、hsa-miR-23a (配列番号10)、hsa-miR-486 (配列番号11)、hsa-miR150 (配列番号12)、hsa-miR-30c (配列番号13)、hsa-miR-342 (配列番号14)、hsa-miR-133a (配列番号15)、hsa-miR-422b (miR-378としても公知; 配列番号16)、hsa-miR-221 (配列番号17)、hsa-let-7f (配列番号18)、hsa-miR-133b (配列番号19)、hsa-miR-222 (配列番号20)、hsa-miR-224 (配列番号21)、hsa-let-7a (配列番号22)、hsa-miR-1 (配列番号23)、hsa-miR-28 (配列番号24)、hsa-miR-199a (配列番号25)、hsa-miR-181b (配列番号26)、hsa-miR-20a (配列番号27)、hsa-let-7c (配列番号28)、hsa-miR-484 (配列番号29)、hsa-miR-26b (配列番号30)、hsa-let-7d (配列番号31)、hsa-miR-10b (配列番号32)、hsa-miR-382 (配列番号33)、hsa-miR-92b (配列番号48)、hsa-let-7b (配列番号49)、hsa-let-7e (配列番号50)、及びhsa-let-7g (配列番号51)からなる群から選択されるmiRNAの1つ又は複数の模倣物又はインヒビターである。別の実施形態において、本方法は、被験者に第2の心臓治療薬を投与することをさらに含む。第2の心臓治療薬としては、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、又は血管拡張薬を挙げることができる。

10

【0016】

20

本発明のさらに別の実施形態では、被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法は、被験者に医薬組成物を投与することを含み、ここで前記医薬組成物は、少なくとも1つのmiRNA模倣物又は少なくとも1つのmiRNAインヒビターと、薬学的に許容可能な担体とを含む。miRNA模倣物又はmiRNAインヒビターは、hsa-miR-542-5p (配列番号1)、hsa-miR-125b (配列番号2)、hsa-miR-197 (配列番号3)、hsa-miR-195 (配列番号4)、hsa-miR-92a (配列番号5)、hsa-miR-139 (配列番号6)、hsa-miR-100 (配列番号7)、hsa-miR-483 (配列番号8)、hsa-miR-22 (配列番号9)、hsa-miR-23a (配列番号10)、hsa-miR-486 (配列番号11)、hsa-miR150 (配列番号12)、hsa-miR-30c (配列番号13)、hsa-miR-342 (配列番号14)、hsa-miR-133a (配列番号15)、hsa-miR-422b (miR-378としても公知; 配列番号16)、hsa-miR-221 (配列番号17)、hsa-let-7f (配列番号18)、hsa-miR-133b (配列番号19)、hsa-miR-222 (配列番号20)、hsa-miR-224 (配列番号21)、hsa-let-7a (配列番号22)、hsa-miR-1 (配列番号23)、hsa-miR-28 (配列番号24)、hsa-miR-199a (配列番号25)、hsa-miR-181b (配列番号26)、hsa-miR-20a (配列番号27)、hsa-let-7c (配列番号28)、hsa-miR-484 (配列番号29)、hsa-miR-26b (配列番号30)、hsa-let-7d (配列番号31)、hsa-miR-10b (配列番号32)、hsa-miR-382 (配列番号33)、hsa-miR-92b (配列番号48)、hsa-let-7b (配列番号49)、hsa-let-7e (配列番号50)、又はhsa-let-7g (配列番号51)の模倣物又はインヒビターであってもよい。別の実施形態において、医薬組成物は、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、及び血管拡張薬のうちの1つ又は複数をさらに含む。

30

40

【0017】

本発明はまた、細胞における胎児心臓遺伝子プログラム (fetal cardiac gene program) (FGP) の再活性化を調節する方法も提供する。一実施形態において、本方法は、心臓細胞に1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物を提供することを含み、ここで1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物は、胎児心臓

50

遺伝子プログラムの少なくとも1つのマーカーの発現を調整する。1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物は、hsa-miR-542-5p(配列番号1)、hsa-miR-125b(配列番号2)、hsa-miR-197(配列番号3)、hsa-miR-195(配列番号4)、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-139(配列番号6)、hsa-miR-100(配列番号7)、hsa-miR-483(配列番号8)、hsa-miR-22(配列番号9)、hsa-miR-23a(配列番号10)、hsa-miR-486(配列番号11)、hsa-miR-150(配列番号12)、hsa-miR-30c(配列番号13)、hsa-miR-342(配列番号14)、hsa-miR-133a(配列番号15)、hsa-miR-422b(miR-378としても公知;配列番号16)、hsa-miR-221(配列番号17)、hsa-let-7f(配列番号18)、hsa-miR-133b(配列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、hsa-miR-199a(配列番号25)、hsa-miR-181b(配列番号26)、hsa-miR-20a(配列番号27)、hsa-let-7c(配列番号28)、hsa-miR-484(配列番号29)、hsa-miR-26b(配列番号30)、hsa-let-7d(配列番号31)、hsa-miR-10b(配列番号32)、hsa-miR-382(配列番号33)、hsa-miR-92b(配列番号48)、hsa-let-7b(配列番号49)、hsa-let-7e(配列番号50)、及びhsa-let-7g(配列番号51)からなる群から選択される1つ又は複数のmiRNAの模倣物又はインヒビターであってもよい。好ましい実施形態において、1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物は、hsa-miR-92a(配列番号5)、hsa-miR-100(配列番号7)、又はhsa-miR-133b(配列番号19)の模倣物又はインヒビターである。別の実施形態において、胎児心臓遺伝子プログラムの少なくとも1つのマーカーは、MyHC、MyHC、ANF、BNP、SERCA2a、及び骨格筋-アクチン(skeletal-actin)からなる群から選択される。

【0018】

本発明はまた、被験者において心不全の治療をモニタする方法も包含する。一実施形態において、本方法は、第1の時点で被験者から第1の生体試料を採取することであって、第1の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始前である、ことと;第2の時点で被験者から第2の生体試料を採取することであって、第2の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始後である、ことと;第1の生体試料及び第2の生体試料を、miRNA配列解析、mRNA配列解析及び標的プロテオーム発現解析によって処理することと;第1の生体試料からのmiRNA、mRNA、及びタンパク質の発現データを、第2の生体試料からの発現データと比較して、遺伝子発現パターンの変化を測定することであって、遺伝子発現の変化が薬物治療プロトコルの有効性の指標となる、こととを含む。別の実施形態において、第1の時点と第2の時点との間隔は、約3~9ヶ月である。別の実施形態において、mRNA解析は、Affymetrixプロトコルによって実施される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

図面の簡単な説明

【図1】(図1A)miRNAの相対的発現。非不全心(NF、n=6)と特発性拡張型心筋症の不全心(IDC、n=5)との対比。解析は、LC Sciences(Houston,TX)のSanger human miRBase 9.0対応miRNA発現アレイチップ、470個のmiRNAのデータセットで実施した。データは擬似温度尺度で表され、赤色が発現の増加を表し、緑色が発現の減少を表す。有意にアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされた(p<0.05)miRNAのみを示す。(図1B)miRNAの相対的発現。NF心と虚血性心筋症の不全心(ISC、n=5)との対比。解析は、LC Sciences(Houston,TX)のSanger human miRBase 9.0対応miRNA発現アレイチップ、470個のmiRNAの

データセットで実施した。データは擬似温度尺度で表され、赤色が発現の増加を表し、緑色が発現の減少を表す。有意にアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされた ($p < 0.05$) miRNAのみを示す。

【図2】ヒトの非不全心 (NF、 $n = 6$) と不全心 (IDC又はISCH、 $n = 5, 5$) との対比における相対的なmiRNA発現をグラフで表したものの。特定のmiRNAはいずれのタイプの不全心においてもアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされるのに対し、他のmiRNAは心不全のタイプによって発現が異なることに留意されたい。

【図3】差次的発現 (differential expression) が $p < 0.05$ に達したmiRNAのサブセットの相対的発現。

【図4】非不全 (NF)、特発性心筋症 (IDC) 又は虚血性心筋症 (ISC) の被験者から抽出されたRNAから、RT-PCRによって評価したときのmiRNA発現レベル。miRNA発現は、非不全心と不全心とで発現が変わらないmiR-24の発現に対して基準化した。統計解析はANOVAを用いて行った。

【図5】miR-92模倣物又はmiR-92インヒビターをトランスフェクトした新生仔ラット心室筋細胞における胎児遺伝子発現の変化。細胞は、トランスフェクション後24時間で 10^{-7} Mのイソプロテレノール (ISO; 黒色バー) により処置し、処置後48時間で回収した。遺伝子発現はRT-PCRによって計測した。結果は18S rRNA発現レベルに対して基準化し、1と定義した対照の模倣物又はインヒビター (1のライン) をトランスフェクト細胞と比較した。グラフは、3~4回の個別の実験の平均値を表す。

【図6】miR-100模倣物又はmiR-100インヒビターをトランスフェクトした新生仔ラット心室筋細胞における胎児遺伝子発現の変化。細胞は、トランスフェクション後24時間で 10^{-7} Mのイソプロテレノール (ISO; 黒色バー) により処置し、処置後48時間で回収した。遺伝子発現はRT-PCRによって計測した。結果は18S rRNA発現レベルに対して基準化し、1と定義した対照の模倣物又はインヒビター (1のライン) をトランスフェクト細胞と比較した。グラフは、3~4回の個別の実験の平均値を表す。

【図7】miR-133b模倣物又はmiR-133bインヒビターをトランスフェクトした新生仔ラット心室筋細胞における胎児遺伝子発現の変化。細胞は、トランスフェクション後24時間で 10^{-7} Mのイソプロテレノール (ISO; 黒色バー) により処置し、処置後48時間で回収した。遺伝子発現はRT-PCRによって計測した。結果は18S rRNA発現レベルに対して基準化し、1と定義した対照模倣物又はインヒビター (1のライン) をトランスフェクト細胞と比較した。グラフは、3~4回の個別の実験の平均値を表す。

【図8】模倣物miRNA又はインヒビターmiRNAをトランスフェクトしたときのmiRNAレベル。miR-92、miR-100及びmiR-133bの模倣物及びインヒビターを、新生仔ラット心室筋細胞にトランスフェクトした。各miRNAの発現レベルはRT-PCRによって評価した。

【図9】新生仔ラット心室筋細胞においてmiRNA-133bを過剰発現させるか、又はダウンレギュレーションすると、細胞肥大が調節される。細胞は、miR-133b模倣物 (下側パネル) 又はmiR-133bインヒビター (上側パネル) をトランスフェクトし、イソプロテレノール処置に供するか (右側パネル)、又はそれ以上の処置は行わなかった (左側パネル)。図は、抗アクチニン抗体による免疫蛍光を示す。

【図10】新生仔ラット心室筋細胞においてmiRNA-133bを過剰発現させるか、又はダウンレギュレーションすると、細胞肥大が調節される。細胞は、miR-133b模倣物又はmiR-133bインヒビターをトランスフェクトし、トランスフェクト細胞のサブセットをイソプロテレノールに曝露した (黒色バー)。細胞サイズはImage Jソフトウェアを使用して計測した。3つの異なる領域からの合計30個の細胞を計測した。

【図11】miRNAに基づく標的発見方法に向けた統合的な手法としての連続的遺伝子

10

20

30

40

50

発現解析 (serial analysis of gene expression: SAGE) の概略図。miRNA 配列解析、mRNA (Affymetrix) 配列解析、及び (標的) プロテオーム発現解析用の生体試料の提供には、心不全 (HF) 患者からの心内膜心筋生検が用いられる。

【図 1 2】 遮断薬で処置したヒト患者における miR - 133 の発現。 遮断薬で処置した患者からの試料に対して RT - PCR 解析を実施した。末期心不全 (A)、処置後 3 ヶ月 (B) 及び処置後 12 ヶ月 (C) において一連の生検を採取した。miR - 133 b (上のパネル) 及び miR - 133 a (下のパネル) の発現レベルは、miR - 370 (右のパネル) 及び低分子 RNA RNU66 (左のパネル) の発現に対して基準化した。患者 20、21、25 及び 34 は 遮断薬処置に反応したが、患者 103 はこの処置に反応しなかった。

10

【図 1 3】 遮断薬で処置したヒト患者における miR - 1 及び miR - 19 b の発現。 遮断薬で処置した患者からの試料に対して RT - PCR 解析を実施した。末期心不全 (A)、処置後 3 ヶ月 (B) 及び処置後 12 ヶ月 (C) において一連の生検を採取した。miR - 1 (上のパネル) 及び miR - 19 b (下のパネル) の発現レベルは、miR - 370 (右のパネル) 及び低分子 RNA RNU66 (左のパネル) の発現に対して基準化した。患者 20、21、25 及び 34 は 遮断薬処置に反応したが、患者 103 はこの処置に反応しなかった。

【図 1 4】 遮断薬で処置したヒト患者における miR - 30 d 及び miR - 92 a の発現。 遮断薬で処置した患者からの試料に対して RT - PCR 解析を実施した。末期心不全 (A)、処置後 3 ヶ月 (B) 及び処置後 12 ヶ月 (C) において一連の生検を採取した。miR - 30 d (上のパネル) 及び miR - 92 a (下のパネル) の発現レベルは、miR - 370 (右のパネル) 及び低分子 RNA RNU66 (左のパネル) の発現に対して基準化した。患者 20、21、25 及び 34 は 遮断薬処置に反応したが、患者 103 はこの処置に反応しなかった。

20

【図 1 5】 遮断薬で処置したヒト患者における miR - 208 b 及び miR - 499 の発現。 遮断薬で処置した患者からの試料に対して RT - PCR 解析を実施した。末期心不全 (A)、処置後 3 ヶ月 (B) 及び処置後 12 ヶ月 (C) において一連の生検を採取した。miR - 208 b (上のパネル) 及び miR - 499 (下のパネル) の発現レベルは、miR - 370 (右のパネル) 及び低分子 RNA RNU66 (左のパネル) の発現に対して基準化した。患者 20、21、25 及び 34 は 遮断薬処置に反応したが、患者 103 はこの処置に反応しなかった。

30

【図 1 6】 遮断薬で処置したヒト患者における miR - let - 7 g の発現。 遮断薬で処置した患者からの試料に対して RT - PCR 解析を実施した。末期心不全 (A)、処置後 3 ヶ月 (B) 及び処置後 12 ヶ月 (C) において一連の生検を採取した。miR - let - 7 g の発現レベルは、miR - 370 (右のパネル) 及び低分子 RNA RNU66 (左のパネル) の発現に対して基準化した。患者 20、21、25 及び 34 は 遮断薬処置に反応したが、患者 103 はこの処置に反応しなかった。

【図 1 7】 (図 1 7 A) miR - 92 a は PKC を標的とする。miR - 92 a 模倣物、miR - 92 a インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞のウエスタンブロット解析。PKC (n = 2) を探索したブロット。ローディング対照としてカルネキシン発現を用いた。(図 1 7 B) miR - 92 a は PDE1A を標的とする。miR - 92 a 模倣物、miR - 92 a インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞のウエスタンブロット解析。PDE1A (n = 1) を探索したブロット。ローディング対照としてカルネキシン発現を用いた。

40

【図 1 8】 (図 1 8 A) miR - 133 b はカルモジュリンを標的とする。miR - 133 b 模倣物、miR - 133 b インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞におけるカルモジュリンの mRNA 発現の RT - PCR 解析。カルモジュリン発現レベルは、18S リボソームサブユニットの発現レベルに対して基準化した。n = 3。(図 1 8 B) miR - 133 b はカルモジュリンを標的とする。カ

50

ルモジュリン 3' UTR に結合したルシフェラーゼコード領域を含む構築物と共に、miR-133b 模倣物、miR-133b インヒビター、又はスクランブル対照配列を共トランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞におけるルシフェラーゼ活性。n = 3。(図 18C) miR-133b はカルモジュリンを標的とする。miR-133b 模倣物、miR-133b インヒビター、又はスクランブル対照配列をトランスフェクトしたラット新生仔心筋細胞のカルモジュリンについてのウエスタンブロット解析。ローディング対照としてカルネキシン発現を用いた。n = 3。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

本発明は、ある部分、マイクロRNA (miRNA) の特定のサブセットの発現が、健康心と不全心とで異なるという発見に基づく。興味深いことに、あるmiRNAは、特発性拡張型心筋症又は虚血性心筋症などの特有のタイプの不全心においてアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされる。このような発現の異なるmiRNAは、新規の心不全バイオマーカー並びに心不全の有効な治療を開発するための標的を提供する。従って、本発明は、被験者において心不全を診断又は予後予測する方法を提供する。被験者において心不全を治療又は予防する方法も提供される。

【0021】

miRNAは、約18~約25ヌクレオチド長、特に約21~約22ヌクレオチド長の低分子の非コードRNAであり、それより大きい前駆体に由来する。miRNAは、標的mRNAの配列が完全に相補的であるときにはその分解を促進することによって、又はその配列がミスマッチを含むときには翻訳を阻害することによって、そのリプレッサーとして働く。

【0022】

miRNAは、RNAポリメラーゼII (pol II) 又はRNAポリメラーゼIII (pol III; Qi et al. (2006) Cellular & Molecular Immunology Vol. 3:411-419を参照) によって転写され、タンパク質コード遺伝子のイントロンか、又は複数の密接に関連するmiRNAをコードすることの多いポリシストロン性の転写産物からの個別のmiRNA遺伝子に由来し得る。RNA pol II又はpol IIIによるmiRNA遺伝子の転写によって初期転写産物が生じ、これは一次miRNA転写産物 (pri-miRNA) と称され、概して数千塩基長である。pri-miRNAは核内でRNaseのDroshaによるプロセッシングを受け、その結果、70~100ヌクレオチドのヘアピン形状の前駆体 (pre-miRNA) が生じる。ヘアピンpre-miRNAは、細胞質に輸送された後、さらにDicerによるプロセッシングを受けて二本鎖miRNAを産生する。次に、成熟miRNA鎖はRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれ、そこでその標的mRNAと、塩基対の相補性によって結合する。miRNAがmRNA標的と完全な塩基対を形成する比較的まれな例では、miRNAはmRNAの分解を促進する。より一般的には、miRNAは標的mRNAと不完全なヘテロ二本鎖を形成し、これがmRNAの翻訳に影響を与える。「シード」領域と称されるmiRNAの塩基2~8位にわたる5'部分は、標的認識に特に重要である (Krenz and Robbins (2004) J. Am. Coll. Cardiol, Vol. 44:2390-2397; Kiriazis and Kranias (2000) Annu. Rev. Physiol, Vol. 62:321-351)。シード配列は、標的配列の系統発生的保存と共に、現行の標的予測モデルの多くの基礎をなしている。

【0023】

本発明は、被験者から採取された生体試料中の特定のmiRNAの発現レベルを測定することにより、被験者において心不全を診断又は予後予測する方法を提供する。本明細書で使用されるとき、用語「心不全」は、広義に、心臓の血液拍出能力を低下させる任意の病態を指す。結果として、組織にうっ血及び浮腫が生じる。心不全は、冠動脈の血流が減少した結果として心筋層の収縮能が低下することによって引き起こされる場合が最も多い；しかしながら、心不全は、心臓弁の損傷、ビタミン欠乏、及び原発性心筋疾患を含む他

10

20

30

40

50

の多くの要因によっても起こり得る。

【 0 0 2 4 】

本発明の一実施形態において、本方法は、被験者からの生体試料における1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを測定することと；前記生体試料における1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを、標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較することを含み、ここで、前記標準試料における1つ又は複数のmiRNAのレベルと比較した前記生体試料における少なくとも1つ又は複数のmiRNAの発現レベルの差が、心不全の診断又は予後の指標となる。生体試料としては、限定はされないが、血液試料、血清試料、血漿試料、及び組織試料を挙げることができる。好ましい実施形態において、生体試料は心筋組織（例えば、心耳、心内膜心筋生検等）である。「標準試料」とは、疾患のない状態、特に、心不全又は任意の他の関連病態がない状態（すなわち、健常な状態）を代表する試料を指す。例として、標準試料は心筋組織などの生体試料であってもよく、診断又は予後の提供を受ける被験者と同様の年齢の健常被験者から採取される。標準試料は複合試料であってもよく、ここでは数人の健常被験者（すなわち、心不全の症状のない対照被験者）の生体試料から得られたデータが平均され、それによって複合試料が作成される。

10

【 0 0 2 5 】

試料中のmiRNAの発現レベルを測定する方法は、当業者に公知である。かかる方法としては、逆転写酵素PCR及びリアルタイムPCRなどのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術、ノーザンブロッティング、及びマイクロアレイ解析が挙げられる。本発明の別の実施形態において、本方法は、hsa-miR-542-5p（配列番号1）、hsa-miR-125b（配列番号2）、hsa-miR-197（配列番号3）、hsa-miR-195（配列番号4）、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-139（配列番号6）、hsa-miR-100（配列番号7）、hsa-miR-483（配列番号8）、hsa-miR-22（配列番号9）、hsa-miR-23a（配列番号10）、hsa-miR-486（配列番号11）、hsa-miR-150（配列番号12）、hsa-miR-30c（配列番号13）、hsa-miR-342（配列番号14）、hsa-miR-133a（配列番号15）、hsa-miR-422b（miR-378としても公知；配列番号16）、hsa-miR-221（配列番号17）、hsa-let-7f（配列番号18）、hsa-miR-133b（配列番号19）、hsa-miR-222（配列番号20）、hsa-miR-224（配列番号21）、hsa-let-7a（配列番号22）、hsa-miR-1（配列番号23）、hsa-miR-28（配列番号24）、hsa-miR-199a（配列番号25）、hsa-miR-181b（配列番号26）、hsa-miR-20a（配列番号27）、hsa-let-7c（配列番号28）、hsa-miR-484（配列番号29）、hsa-miR-26b（配列番号30）、hsa-let-7d（配列番号31）、hsa-miR-10b（配列番号32）、hsa-miR-382（配列番号33）、hsa-miR-92b（uauugcacucgucgccgccucc；配列番号48）、hsa-let-7b（ugagguaguagguuguguguu；配列番号49）、hsa-let-7e（ugagguaggaagguuguauguuu；配列番号50）、及びhsa-let-7g（ugagguaguaguuuguacaguu；配列番号51）からなる群から選択される1つ又は複数のmiRNAの発現レベルを測定することを含む。別の実施形態において、1つ又は複数のmiRNAは、hsa-miR-125b（配列番号2）、hsa-miR-195（配列番号4）、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-100（配列番号7）、hsa-miR-22（配列番号9）、hsa-miR-486（配列番号11）、hsa-miR-150（配列番号12）、hsa-miR-30c（配列番号13）、hsa-miR-342（配列番号14）、hsa-miR-133a（配列番号15）、hsa-miR-221（配列番号17）、hsa-let-7f（配列番号18）、hsa-miR-133b（配列番号19）、hsa-miR-222（配列番号20）、hsa-let

20

30

40

50

- 7 a (配列番号 22)、hsa-miR-1 (配列番号 23)、hsa-miR-28 (配列番号 24)、及び hsa-miR-199a (配列番号 25) から選択される。さらに別の実施形態において、1つ又は複数の miRNA は、hsa-miR-195 (配列番号 4)、hsa-miR-92a (配列番号 5)、hsa-miR-100 (配列番号 7)、hsa-miR-486 (配列番号 11)、hsa-miR-150 (配列番号 12)、及び hsa-miR-422b (miR-378 としても公知；配列番号 16) から選択される。

【0026】

本発明の別の実施形態において、本方法は、前記標準試料における1つ又は複数の miRNA のレベルと比較した前記生体試料における1つ又は複数の miRNA のレベルに基づき、心不全のタイプを診断することをさらに含み、ここで1つ又は複数の miRNA のレベルは、虚血性心筋症又は特発性拡張型心筋症の診断の指標となる。本明細書で使用されるとき、「特発性拡張型心筋症」(IDC)は、原因不明の収縮性障害を伴う、左心室、右心室、又は双方の心室の拡張として定義される。IDCは拡張型心筋症の一般的な形態であり、心不全の症状を生じる。IDCでは、顕性うっ血性心不全は認められることも、又は認められないこともあって、不整脈が一般的であり、及び予後は不良であることが多い。「虚血性心筋症」(ISC)は、本明細書で使用されるとき、多くの場合に冠動脈疾患が原因となって心筋層に十分な酸素が供給されないことにより心臓の筋肉が弱った患者を指す。ISCはうっ血性心不全の一般的な原因であり、この病態を有する患者は、心発作、アンギナ、又は不安定狭心症をかつて経験したことが考えられる。ISCは、米国で最もよく見られるタイプの心筋症である；およそ100人に1人がISCに罹患し、最も多くは中年から老年の男性である。

10

20

【0027】

IDC又はISCの診断に有用な1つ又は複数の miRNA としては、hsa-miR-125b (配列番号 2)、hsa-miR-22 (配列番号 9)、hsa-miR-150 (配列番号 12)；hsa-miR-30c (配列番号 13)、hsa-miR-342 (配列番号 14)、hsa-miR-133a (配列番号 15)、hsa-miR-422b (miR-378 としても公知；配列番号 16)；hsa-let-7f (配列番号 18)、hsa-miR-133b (配列番号 19)、hsa-miR-222 (配列番号 20)、hsa-let-7a (配列番号 22)、hsa-miR-1 (配列番号 23)、hsa-miR-28 (配列番号 24)、及び hsa-miR-199a (配列番号 25) が挙げられる。

30

【0028】

本発明はまた、被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法も提供する。一実施形態において、本方法は、治療有効量の miRNA 模倣物又は miRNA インヒビターを、被験者の心臓細胞に投与することを含む。「治療有効量」は、心不全の少なくとも1つの症状を寛解させるか、又は予防するのに十分な量である。心不全の症状としては、限定はされないが、呼吸困難、起坐呼吸、眩暈、錯乱、発汗、末梢性浮腫、腹水、肝腫大、疲労、悪心、心拍数の増加、及び肺水腫が挙げられる。

40

【0029】

別の実施形態において、本方法は、hsa-miR-542-5p (配列番号 1)、hsa-miR-125b (配列番号 2)、hsa-miR-197 (配列番号 3)、hsa-miR-195 (配列番号 4)、hsa-miR-92a (配列番号 5)、hsa-miR-139 (配列番号 6)、hsa-miR-100 (配列番号 7)、hsa-miR-483 (配列番号 8)、hsa-miR-22 (配列番号 9)、hsa-miR-23a (配列番号 10)、hsa-miR-486 (配列番号 11)、hsa-miR-150 (配列番号 12)、hsa-miR-30c (配列番号 13)、hsa-miR-342 (配列番号 14)、hsa-miR-133a (配列番号 15)、hsa-miR-422b (miR-378 としても公知；配列番号 16)、hsa-miR-221 (配列番号 17)、hsa-let-7f (配列番号 18)、hsa-miR-133b (配

50

列番号19)、hsa-miR-222(配列番号20)、hsa-miR-224(配列番号21)、hsa-let-7a(配列番号22)、hsa-miR-1(配列番号23)、hsa-miR-28(配列番号24)、hsa-miR-199a(配列番号25)、hsa-miR-181b(配列番号26)、hsa-miR-20a(配列番号27)、hsa-let-7c(配列番号28)、hsa-miR-484(配列番号29)、hsa-miR-26b(配列番号30)、hsa-let-7d(配列番号31)、hsa-miR-10b(配列番号32)、hsa-miR-382(配列番号33)、hsa-miR-92b(uauugcacucgucgccgcccucc;配列番号48)、hsa-let-7b(ugagguaguagguuguguguu;配列番号49)、hsa-let-7e(ugagguaggagguuguauguu;配列番号50)、及びhsa-let-7g(ugagguaguaguuuguaacagu;配列番号51)からなる群から選択されるmiRNAの1つ又は複数のmiRNA模倣物又はmiRNAインヒビターを投与することを含む。

10

【0030】

「miRNA模倣物」は、miRNAの発現及び/又は機能を増強させるために用いられる薬剤である。miRNA模倣物はまた、天然miRNAの機能を増強、補足、又は代替することもできる。一実施形態において、miRNA模倣物は、成熟miRNA配列を含むポリヌクレオチドであり得る。別の実施形態において、miRNA模倣物は、pri-miRNA又はpre-miRNA配列を含むポリヌクレオチドであり得る。miRNA模倣物は、ロックド核酸、ペプチド核酸などの化学修飾、2'-O-アルキル(例えば、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル)修飾、2'-フルオロ修飾、及び4'-チオ修飾などの糖修飾、並びに、1つ又は複数のホスホロチオエート結合、モルホリノ結合、又はホスホノカルボキシレート結合などの骨格修飾を含み得る。特定のmiRNA模倣物は、Dharmacon(Lafayette, CO)及びAmbion, Incなどの企業から市販されている。

20

【0031】

ある実施形態において、miRNA模倣物は、インビボでベクターから発現させてもよい。「ベクター」は、目的の核酸を細胞内部に送達するために用いることができる物質の組成物である。数々のベクターが当該技術分野において公知であり、限定はされないが、線状ポリヌクレオチド、イオン化合物又は両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミド、及びウイルスが挙げられる。従って、用語「ベクター」は、自己複製プラスミド又はウイルスを含む。ウイルスベクターの例としては、限定はされないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられる。発現構築物は生細胞中で複製させることができ、又は合成によって作製することもできる。本願の目的上、用語「発現構築物」、「発現ベクター」、及び「ベクター」は、本発明の適用を一般的で例示的な意味で示すために同義的に用いられ、本発明を限定する意図はない。

30

【0032】

一実施形態において、miRNA模倣物を発現させるための発現ベクターは、特定のmiRNAをコードするポリヌクレオチドと「作動可能に連結された」プロモーターを含む。語句「作動可能に連結された」又は「転写調節下にある」は、本明細書で使用されるとき、そのプロモーターがRNAポリメラーゼによる転写の開始及びポリヌクレオチドの発現を制御するのに、ポリヌクレオチドに対して正しい位置及び向きにあることを意味する。miRNAをコードするポリヌクレオチドは、一次マイクロRNA配列(pri-miRNA)、前駆体マイクロRNA配列(pre-miRNA)又は成熟miRNA配列をコードし得る。好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、hsa-miR-133b(配列番号19)の配列を含む。特定のmiRNAをコードするポリヌクレオチドは、約18~約2000ヌクレオチド長、約70~約200ヌクレオチド長、約20~約50ヌクレオチド長、又は約18~約25ヌクレオチド長であり得る。他の実施形態において、特定のmiRNAをコードするポリヌクレオチドは、イントロンをコードする核酸若しくはmRNAの非翻訳領域をコードする核酸又は非コードRNAに位置する。

40

50

【0033】

ある実施形態において、miRNA模倣物は、hsa-miR-197（配列番号3）、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-139（配列番号6）、hsa-miR-483（配列番号8）、hsa-miR-22（配列番号9）、hsa-miR-486（配列番号11）、hsa-miR-150（配列番号12）、hsa-miR-30c（配列番号13）、hsa-miR-133a（配列番号15）、hsa-miR-422b（miR-378としても公知；配列番号16）、hsa-miR-221（配列番号17）、hsa-let-7f（配列番号18）、hsa-miR-133b（配列番号19）、hsa-miR-222（配列番号20）、hsa-miR-224（配列番号21）、hsa-let-7a（配列番号22）、hsa-miR-1（配列番号23）、hsa-miR-20a（配列番号27）、hsa-let-7c（配列番号28）、hsa-miR-484（配列番号29）、hsa-let-7d（配列番号31）、又はhsa-miR-10b（配列番号32）の配列を含む。好ましい実施形態において、miRNA模倣物は、hsa-miR-133b（配列番号19）の配列を含む。

10

【0034】

「miRNAインヒビター」は、miRNA機能を配列特異的な形で阻害する薬剤である。一実施形態において、miRNAインヒビターはアンタゴmir（antagomir）である。「アンタゴmir」は、miRNA配列と少なくとも部分的に相補的な、化学修飾された一本鎖のリボヌクレオチドであり、Kruetzfeldt及び共同研究者ら（Kruetzfeldt et al. (2005) Nature, Vol. 438:685-689）によって初めて記載された。アンタゴmirは、1つ又は複数の修飾ヌクレオチド、例えば2'-O-メチル-糖修飾を含み得る。ある実施形態において、アンタゴmirは修飾ヌクレオチドのみを含む。アンタゴmirはまた、1つ又は複数のホスホロチオエート結合を含み、結果として部分的又は完全なホスホロチオエート骨格を作り得る。インピボでの送達及び安定性を促進するため、アンタゴmirはその3'末端でコレステロール部分と結合させてもよい。miRNAの阻害に好適なアンタゴmirは、約15～約50ヌクレオチド長、より好ましくは約18～約30ヌクレオチド長、及び最も好ましくは約20～約25ヌクレオチド長であり得る。「部分的に相補的な」とは、標的ポリヌクレオチド配列と少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%相補的な配列を指す。アンタゴmirは、成熟miRNA配列と少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%相補的であり得る。ある実施形態において、アンタゴmirは、成熟miRNA配列と100%相補的である。

20

30

【0035】

別の実施形態において、miRNAインヒビターは、成熟miRNA配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドからなり得る。ある実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの化学修飾を有する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の「ロックド核酸（locked nucleic acid）」からなり得る。「ロックド核酸」（LNA）は、リボース糖部分の2位と4位との炭素間に追加的な架橋を含む修飾リボヌクレオチドであり、結果としてLNAを含むオリゴヌクレオチドに熱的安定性の亢進をもたらす「ロックされた」コンホメーションを作る。或いは、アンチセンスオリゴヌクレオチドはペプチド核酸（PNA）を含んでもよく、これは糖リン酸骨格ではなく、ペプチドベースの骨格を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドが含み得る他の化学修飾としては、限定はされないが、2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル）修飾、2'-フルオロ修飾、及び4'チオ修飾などの糖修飾、並びに、1つ又は複数のホスホロチオエート結合、モルホリノ結合、又はホスホノカルボキシレート結合などの骨格修飾が挙げられる（例えば、米国特許第6,693,187号及び同第7,067,641号を参照、これらは全体として参照により本明細書に援用される）。ある実施形態において、好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'末

40

50

端及び3'末端の双方に2'-O-メトキシエチル修飾リボヌクレオチドを含み、少なくとも10個のデオキシリボヌクレオチドを中央に有する2'-O-メトキシエチル「ギャップマー (gapmer)」である。このような「ギャップマー」は、RNA標的のRNAase H依存性分解機序を開始させる能力を有する。安定性を亢進し、且つ効力を向上させるためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の修飾、例えば、全体として参照により本明細書に援用される米国特許第6,838,283号に記載されるものは、当該技術分野において公知であり、本発明の方法における使用に好適である。miRNAの活性を阻害するのに有用な好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約19~約25ヌクレオチド長である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、成熟miRNA配列と少なくとも部分的に相補的な、例えば成熟miRNA配列と少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%相補的な配列を含み得る。一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、成熟miRNA配列と100%相補的な配列を含む。

10

【0036】

ある実施形態において、miRNAインヒビターは、hsa-miR-125b (配列番号2)、hsa-miR-195 (配列番号4)、hsa-miR-100 (配列番号7)、hsa-miR-23a (配列番号10)、hsa-miR-342 (配列番号14)、hsa-miR-28 (配列番号24)、hsa-miR-199a (配列番号25)、hsa-miR-181b (配列番号26)、hsa-miR-26b (配列番号30)、又はhsa-miR-382 (配列番号33)と相補的な配列を含む。好ましい実施形態において、miRNAインヒビターは、hsa-miR-100 (配列番号7)と相補的な配列を含む。

20

【0037】

さらに別の実施形態において、miRNAインヒビターは、成熟miRNA配列と少なくとも部分的な配列同一性を有する阻害性RNA分子である。阻害性RNA分子は、二本鎖の低分子干渉RNA (siRNA)か、又はステム-ループ構造を含むショートヘアピンRNA分子 (shRNA)であり得る。阻害性RNA分子の二本鎖領域は、成熟miRNA配列と少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する配列を含み得る。ある実施形態において、阻害性RNA分子の二本鎖領域は、標的miRNA配列と100%の同一性を含み得る。阻害性RNA分子は、hsa-miR-125b (配列番号2)、hsa-miR-195 (配列番号4)、hsa-miR-100 (配列番号7)、hsa-miR-23a (配列番号10)、hsa-miR-342 (配列番号14)、hsa-miR-28 (配列番号24)、hsa-miR-199a (配列番号25)、hsa-miR-181b (配列番号26)、hsa-miR-26b (配列番号30)、又はhsa-miR-382 (配列番号33)と少なくとも部分的な配列同一性を有する配列を含み得る。

30

【0038】

miRNAインヒビターは、インピボで発現ベクターから産生してもよい。一実施形態において、miRNAインヒビターを発現させるための発現ベクターは、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結されたプロモーターを含み、ここで発現したアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、成熟miRNA配列と相補的である。別の実施形態において、miRNAインヒビターを発現させるための発現ベクターは、shRNA又はsiRNAをコードするポリヌクレオチドと作動可能に連結された1つ又は複数のプロモーターを含み、ここで発現したshRNA又はsiRNAは、成熟miRNA配列と同一の、又は実質的に同一の配列を含む。「実質的に同一」とは、標的ポリヌクレオチド配列と少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一の配列を指す。

40

【0039】

本発明の別の実施形態では、被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法は、被験者に第2の心臓治療薬を投与することをさらに含む

50

。心臓治療法は、心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態の1つ又は複数の症状を治療するために典型的に用いられる任意の治療薬を包含する。第2の心臓治療薬としては、限定なしに、いわゆる「遮断薬」、降圧薬、強心薬、抗血栓薬、血管拡張薬、ホルモン拮抗薬、変力作用薬、利尿薬、エンドセリン受容体拮抗薬、カルシウムチャンネル遮断薬、ホスホジエステラーゼ阻害薬、ACE阻害薬、アンジオテンシン2型拮抗薬及びサイトカイン遮断薬/阻害薬、HDAC阻害薬、並びにヒストンアセチル化転移酵素(HAT)モジュレーターを挙げることができる。一実施形態において、第2の心臓治療薬は、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、血管拡張薬、エンドセリン受容体拮抗薬、又はHDAC阻害薬である。

【0040】

「強心薬」は、筋収縮の力又はエネルギーを増加又は減少させる薬剤、特に、心筋収縮能の強度を増加させる薬物を指す。陽性強心薬としては、カルシウム；カルシウムセンシタイザーのレボシメンダン；強心配糖体のジゴキシン；カテコールアミン、例えば、ドーパミン、ドブタミン、ドベキサミン、エピネフリン、イソプロテレノール、及びノルエピネフリン；並びにホスホジエステラーゼ阻害薬、例えば、エノキシモン、ミルリノン、及びテオフィリンを挙げることができる。陰性強心薬としては、アドレナリン作動性遮断薬、例えば、ラベタロール及びカルベジロール；並びにカルシウムチャンネル遮断薬、例えば、ジルチアザム及びベラパミルが挙げられる。

10

【0041】

「神経液性遮断薬」とは、神経液性反応を遮断する薬物を指し、アドレナリン作動性遮断薬、例えば、ピソプロロール、カルベジロール、及びメトプロロール；並びにアンジオテンシン変換酵素阻害薬、例えば、エナラプリル、リシノプリル、ラミプリル、及びカプトプリルが挙げられる。

20

【0042】

「利尿薬」とは、体液貯留、並びに、足、下腿及び腹部の腫脹に処方される薬物を指す。利尿薬は、腎臓を促して血液からより多くのナトリウム及び水をろ過させる。体内の体液が少なくなると、心臓はより小さい仕事量で血液を拍出し、循環させることができる。加えて、利尿薬は、肺、足首、下腿及び他の体の一部における体液貯留を減少させることができる。利尿薬としては、例えば、フロセミド、ブメタニド、メトラゾン、スピロラクトン、及びエプレレノンが挙げられる。

30

【0043】

「アルドステロン拮抗薬」とは、ミネラルコルチコイド受容体にあるアルドステロンの作用に拮抗する薬物を指す。この薬物群は、慢性心不全を管理するための補助治療薬として、他の薬物と組み合わせて用いられることが多い。アルドステロン拮抗薬としては、例えば、スピロラクトン及びエプレレノンが挙げられる。

【0044】

「血管拡張薬」とは、血管を拡張する、すなわちその直径を増加させる薬物を指す。血管拡張薬としては、例えば、ヒドララジン、硝酸イソソルビド及び一硝酸イソソルビド、カプトプリル並びにより長時間持続性の薬剤、例えば、メタミン、パベリル(paveril)、ニトログリン及びペリトレートが挙げられる。

40

【0045】

エンドセリン(ET)は、21アミノ酸のペプチドであり、心不全の発症に関与すると思われる強力な生理学的及び病態生理学的作用を有する。ETの作用は、2つの細胞表面受容体クラスとの相互作用によって媒介される。A型受容体(ET-A)は血管収縮及び細胞成長に関連し、一方、B型受容体(ET-B)は内皮細胞媒介性の血管拡張及びアルドステロンなどの他の神経ホルモンの放出に関連する。ETの産生、又はその関連する細胞を刺激する能力のいずれかを阻害することのできる薬理作用剤は、当該技術分野において公知である。ETの産生の阻害には、活性ペプチドをその前駆体からプロセシングすることに関与する、エンドセリン変換酵素と称される酵素を遮断する薬剤の使用が関

50

わる。エンドセリン受容体拮抗薬（ERA）の非限定的な例としては、ボセンタン、エンラセンタン、アンプリセンタン、ダルセンタン、テゾセンタン、アトラセンタン、アボセンタン、クラゾセンタン、エドネンタン、シタクスセンタン、TBC 3711、BQ 123、及びBQ 788が挙げられる。

【0046】

第2の心臓治療薬は、被験者に対し、miRNA模倣物又はmiRNAインヒビターと（例えば同時に）併用投与されてもよい。或いは、第2の心臓治療薬は、miRNA模倣物又はmiRNAインヒビターの前又は後に投与されてもよい。miRNA模倣物又はmiRNAインヒビターの投与と第2の心臓治療薬の投与との間の時間間隔は、数分から数週間の範囲であり得る。ある実施形態において、2つの治療薬は、互いに12～24時間以内に、より好ましくは互いに約6～12時間以内に、及び最も好ましくは互いに約12時間以内に投与され得る。ある状況において、治療期間の大幅な延長が望ましいこともあるが、しかしながら、各投与の間に経過するのは、数日間（2、3、4、5、6又は7日間）から数週間（1、2、3、4、5、6、7又は8週間）である。

【0047】

本発明はまた、被験者において心不全又は心不全に関連した疾患若しくは病態を治療又は予防する方法も包含し、この方法は、被験者に医薬組成物を投与することを含み、ここで前記医薬組成物は、少なくとも1つのmiRNA模倣物又は少なくとも1つのmiRNAインヒビターと、薬学的に許容可能な担体とを含む。一実施形態において、少なくとも1つのmiRNA模倣物又は少なくとも1つのmiRNAインヒビターは、hsa-miR-542-5p（配列番号1）、hsa-miR-125b（配列番号2）、hsa-miR-197（配列番号3）、hsa-miR-195（配列番号4）、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-139（配列番号6）、hsa-miR-100（配列番号7）、hsa-miR-483（配列番号8）、hsa-miR-22（配列番号9）、hsa-miR-23a（配列番号10）、hsa-miR-486（配列番号11）、hsa-miR150（配列番号12）、hsa-miR-30c（配列番号13）、hsa-miR-342（配列番号14）、hsa-miR-133a（配列番号15）、hsa-miR-422b（miR-378としても公知；配列番号16）、hsa-miR-221（配列番号17）、hsa-let-7f（配列番号18）、hsa-miR-133b（配列番号19）、hsa-miR-222（配列番号20）、hsa-miR-224（配列番号21）、hsa-let-7a（配列番号22）、hsa-miR-1（配列番号23）、hsa-miR-28（配列番号24）、hsa-miR-199a（配列番号25）、hsa-miR-181b（配列番号26）、hsa-miR-20a（配列番号27）、hsa-let-7c（配列番号28）、hsa-miR-484（配列番号29）、hsa-miR-26b（配列番号30）、hsa-let-7d（配列番号31）、hsa-miR-10b（配列番号32）、hsa-miR-382（配列番号33）、hsa-miR-92b（uauugcacucgucgccgucucc；配列番号48）、hsa-let-7b（ugagguaguagguugugugguu；配列番号49）、hsa-let-7e（ugagguagguagguauaguuu；配列番号50）、及びhsa-let-7g（ugagguaguagguuuuguaacaguuu；配列番号51）からなる群から選択されるmiRNAの1つ又は複数の模倣物又はインヒビターである。本医薬組成物は、上記のとおり心不全の治療に典型的に処方される第2の心臓治療薬を含み得る。一実施形態において、本医薬組成物は、強心薬、神経液性遮断薬、アルドステロン拮抗薬、利尿薬、血管拡張薬、エンドセリン受容体拮抗薬、又はHDAC阻害薬のうちの1つ又は複数を含む。

【0048】

別の実施形態において、本医薬組成物は、少なくとも1つのmiRNA模倣物を含み、ここで前記miRNA模倣物は、hsa-miR-197（配列番号3）、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-139（配列番号6）、hsa-miR-

10

20

30

40

50

483 (配列番号8)、hsa-miR-22 (配列番号9)、hsa-miR-486 (配列番号11)、hsa-miR-150 (配列番号12)、hsa-miR-30c (配列番号13)、hsa-miR-133a (配列番号15)、hsa-miR-422b (miR-378としても公知; 配列番号16)、hsa-miR-221 (配列番号17)、hsa-let-7f (配列番号18)、hsa-miR-133b (配列番号19)、hsa-miR-222 (配列番号20)、hsa-miR-224 (配列番号21)、hsa-let-7a (配列番号22)、hsa-miR-1 (配列番号23)、hsa-miR-20a (配列番号27)、hsa-let-7c (配列番号28)、hsa-miR-484 (配列番号29)、hsa-let-7d (配列番号31)、又はhsa-miR-10b (配列番号32)の配列を含む。なお別の実施形態において、本医薬組成物は、少なくとも1つのmiRNAインヒビターを含み、ここで前記miRNAインヒビターは、hsa-miR-125b (配列番号2)、hsa-miR-195 (配列番号4)、hsa-miR-100 (配列番号7)、hsa-miR-23a (配列番号10)、hsa-miR-342 (配列番号14)、hsa-miR-28 (配列番号24)、hsa-miR-199a (配列番号25)、hsa-miR-181b (配列番号26)、hsa-miR-26b (配列番号30)、又はhsa-miR-382 (配列番号33)と相補的な配列を含む。

10

【0049】

本医薬組成物は、本明細書に記載されるいずれの使用についても、任意の好適な手段によって、例えば、錠剤、カプセル、顆粒又は粉末などの形態で経口的に；舌下に；頬側に；皮下、静脈内、筋内、又は嚢内注射又は注入技術によるなどして（例えば、無菌注射用の水溶性又は非水溶性の溶液又は懸濁液として）非経口的に；吸入スプレーなどによる鼻粘膜への投与を含め、経鼻的に；クリーム又は軟膏などの形態で局所的に；又は坐薬などの形態で経直腸的に；非毒性の薬学的に許容可能な担体又は希釈剤を含有する投薬単位製剤で投与することができる。本明細書で使用される「薬学的に許容可能な担体」とは、医薬品、例えばヒトへの投与に好適な医薬品の製剤化に使用することが許容される溶媒、緩衝液、溶液、分散媒、コーティング、抗細菌薬及び抗真菌薬、等張剤及び吸収遅延剤などを含む。

20

【0050】

miRNAインヒビター又はmiRNA模倣物を含む医薬組成物はまた、カテーテルシステム又は心臓に治療剤を送達するため冠動脈循環を隔離するシステムによって投与されてもよい。心臓及び冠血管系に治療剤を送達するための様々なカテーテルシステムが当該技術分野において公知である。本発明で使用するのに好適なカテーテルに基づく送達方法又は冠動脈の隔離方法のいくつかの非限定的な例は、米国特許第6,416,510号；米国特許第6,716,196号；米国特許第6,953,466号、国際公開第2005/082440号、国際公開第2006/089340号、米国特許出願公開第2007/0203445号、米国特許出願公開第2006/0148742号、及び米国特許出願公開第2007/0060907号に開示され、これらは全て、全体として参照により本明細書に援用される。miRNA模倣物又はmiRNAインヒビターは、例えば、即時放出又は持続放出に好適な形態で投与することができる。即時放出又は持続放出は、miRNA模倣物若しくはmiRNAインヒビターを含む好適な医薬組成物を使用することによって、又は、特に持続放出の場合には、皮下インプラント若しくは浸透圧ポンプなどの装置を使用することによって、実現することができる。

30

40

【0051】

コロイド分散システム、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに、水中油乳剤、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系が、miRNA模倣物又はmiRNAインヒビター用の送達媒体として用いられ得る。本発明の核酸を心臓組織及び骨格筋組織に送達するのに好適な市販の脂肪乳剤としては、Intralipid (登録商標)、Liposyn (登録商標)、Liposyn (登録商標) II、Liposyn (登録商標) III、Nutrilipid、及び他の同様の脂質乳剤が挙げられる。インビボでの送達媒

50

体として使用するのに好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。かかる系の調製及び使用は、当該技術分野において周知である。例示的製剤は、米国特許第5,981,505号；米国特許第6,217,900号；米国特許第6,383,512号；米国特許第5,783,565号；米国特許第7,202,227号；米国特許第6,379,965号；米国特許第6,127,170号；米国特許第5,837,533号；米国特許第6,747,014号；及び国際公開第03/093449号にも開示され、これらは全体として参照により本明細書に援用される。

【0052】

経口投与用の例示的組成物としては、例えば、パルク性を与えるための微結晶性セルロース、懸濁剤としてのアルギン酸又はアルギン酸ナトリウム、増粘剤としてのメチルセルロース、及び当該技術分野において公知のものなどの甘味料又は香味剤を含有し得る懸濁液；並びに、例えば、微結晶性セルロース、リン酸ニカルシウム、デンプン、ステアリン酸マグネシウム及び/又はラクトース及び/又は当該技術分野において公知のものなどの他の賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、希釈剤及び潤滑剤を含有し得る即時放出性錠剤が挙げられる。miRNA模倣物及びmiRNAインヒビターはまた、舌下投与及び/又は頬側投与によって口腔を介して送達することもできる。成形錠剤、圧縮錠剤又は凍結乾燥錠剤が、用いられ得る例示的形態である。例示的組成物としては、本化合物を、マンニトール、ラクトース、スクロース及び/又はシクロデキストリンなどの速溶性希釈剤と共に製剤化するものが挙げられる。かかる製剤のなかには、セルロース（アビセル）又はポリエチレングリコール（PEG）などの高分子量賦形剤も含まれ得る。かかる製剤はまた、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、カルボキシメチルセルロースナトリウム（SCMC）、無水マレイン酸コポリマー（例えば、Gantrez）などの粘膜付着を促進する賦形剤、及びポリアクリル酸コポリマー（例えばCarbopol 934）などの放出を制御するための薬剤も含むことができる。潤滑剤、流動促進剤、香料、着色剤及び安定剤も、製造及び使用を容易にするため添加され得る。

10

20

【0053】

経鼻エアロゾル又は吸入投与用の例示的組成物としては、例えば、ベンジルアルコール若しくは他の好適な防腐剤、バイオアベイラビリティを亢進するための吸収促進剤、及び/又は当該技術分野において公知のものなどの他の可溶化剤又は分散剤を含有し得る生理食塩水中の溶液が挙げられる。

30

【0054】

非経口投与用の例示的組成物としては、例えば、マンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リングル液、等張塩化ナトリウム溶液、又は他の好適な分散剤若しくは湿潤剤及び合成モノグリセリド若しくはジグリセリドを含む懸濁剤などの、非経口的に許容可能な非毒性の好適な希釈剤又は溶媒、並びに、オレイン酸を含む脂肪酸又はCremaphorを含有し得る注射用溶液又は懸濁液が挙げられる。

【0055】

直腸投与用の例示的組成物としては、例えば、カカオバター、合成グリセリドエステル又はポリエチレングリコールなどの、常温では固体だが、直腸腔内で液化及び/又は溶解して薬物を放出する好適な非刺激性賦形剤を含有し得る坐薬が挙げられる。局所投与用の例示的組成物としては、Plastibase（ポリエチレンでゲル化した鉱油）などの局所用担体が挙げられる。

40

【0056】

任意の特定の被験者についての具体的な用量レベル及び投薬頻度は、用いられる特定の化合物（例えば、特定のmiRNA模倣物又はmiRNAインヒビター）の活性、当該化合物の代謝安定性及び作用時間、被験者の人種、年齢、体重、全般的な健康状態、性別及び食生活、投与様式及び投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、並びに特定の病態の重症度を含む様々な要因によって異なってもよく、及び異なるであろうことは理解されるであろう。

50

【0057】

本発明はまた、細胞における胎児心臓遺伝子プログラム（FGP）の再活性化を調節する方法も企図する。一実施形態において、本方法は、心臓細胞に1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物を提供することを含み、ここで1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物は、胎児心臓遺伝子プログラムの少なくとも1つのマーカーの発現を調整する。用語「心臓細胞」とは、心筋細胞及び/又は心臓内皮細胞を指す。本発明の特定の実施形態に従えば、この用語は、心臓線維芽細胞及び/又は心臓内に存在する他の細胞型、例えば平滑筋細胞（例えば、心臓血管壁内の）、心臓神経のニューロン及びグリア細胞等を含む。胎児心臓遺伝子プログラム（FGP）の再活性化は、肥大心及び不全心に特有の特徴であり、心機能障害及び予後不良と相関がある（Kuwahara et al, 2003, EMBO J. 22 (23): 6310-6321）。FGPの活性化を反映してその発現が心不全で変化し、疾患の進行に悪影響を及ぼし得るマーカー遺伝子には、ミオシン重鎖（MyHC）、ミオシン重鎖（MyHC）、心房性ナトリウム利尿因子（ANF）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）、SERCA2a、及び骨格筋-アクチン（Sk-アクチン）がある。ある実施形態において、胎児心臓プログラムの少なくとも1つのマーカーの発現が調整され、ここで胎児心臓遺伝子プログラムの少なくとも1つのマーカーは、MyHC、MyHC、ANF、BNP、SERCA2a、及び骨格筋-アクチンからなる群から選択される。

10

【0058】

FGPの再活性化の調節に使用するのに好適なmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物としては、hsa-miR-542-5p（配列番号1）、hsa-miR-125b（配列番号2）、hsa-miR-197（配列番号3）、hsa-miR-195（配列番号4）、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-139（配列番号6）、hsa-miR-100（配列番号7）、hsa-miR-483（配列番号8）、hsa-miR-22（配列番号9）、hsa-miR-23a（配列番号10）、hsa-miR-486（配列番号11）、hsa-miR150（配列番号12）、hsa-miR-30c（配列番号13）、hsa-miR-342（配列番号14）、hsa-miR-133a（配列番号15）、hsa-miR-422b（miR-378としても公知；配列番号16）、hsa-miR-221（配列番号17）、hsa-let-7f（配列番号18）、hsa-miR-133b（配列番号19）、hsa-miR-222（配列番号20）、hsa-miR-224（配列番号21）、hsa-let-7a（配列番号22）、hsa-miR-1（配列番号23）、hsa-miR-28（配列番号24）、hsa-miR-199a（配列番号25）、hsa-miR-181b（配列番号26）、hsa-miR-20a（配列番号27）、hsa-let-7c（配列番号28）、hsa-miR-484（配列番号29）、hsa-miR-26b（配列番号30）、hsa-let-7d（配列番号31）、hsa-miR-10b（配列番号32）、hsa-miR-382（配列番号33）、hsa-miR-92b（uaugcaccucgucgccucc；配列番号48）、hsa-let-7b（ugagguaguagguugugguu；配列番号49）、hsa-let-7e（ugagguaggauguauguu；配列番号50）、及びhsa-let-7g（ugagguaguuguuacaguu；配列番号51）からなる群から選択されるmiRNAの1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物が挙げられる。一実施形態において、1つ又は複数のmiRNAインヒビター又はmiRNA模倣物は、hsa-miR-92a（配列番号5）、hsa-miR-100（配列番号7）、又はhsa-miR-133b（配列番号19）の模倣物又はインヒビターである。

20

30

40

【0059】

本発明はまた、被験者において心不全の治療をモニタする方法も企図する。一実施形態において、本方法は、第1の時点で被験者から第1の生体試料を採取することであって、第1の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始前である、ことと；第2の時点で被験者

50

から第2の生体試料を採取することであって、第2の時点が心不全の薬物治療プロトコルの開始後である、ことと；第1の生体試料及び第2の生体試料を、miRNA配列解析、mRNA配列解析及び標的プロテオーム発現解析によって処理することと；第1の生体試料からのmiRNA、mRNA、及びタンパク質の発現データを、第2の生体試料からの発現データと比較して、薬物治療プロトコルの有効性の指標となる遺伝子発現パターンの変化を測定すること、とを含む。第1の時点と第2の時点との間隔は、約3～約18ヶ月、約3～約12ヶ月、又は好ましくは約3～約9ヶ月であってもよい。薬物治療プロトコルの開始後いくつかの時点で、各患者から追加の生体試料が採取されてもよい。ある実施形態において、薬物治療プロトコルの開始後2つ以上の試料が採集される。他の実施形態において、薬物治療プロトコルの開始後3つ以上の試料が採集される。試料は、約3ヶ月毎、約6ヶ月毎、約9ヶ月毎、又は約12ヶ月毎に採集されてもよい。

10

【0060】

被験者の治療に用いられる薬物治療プロトコルは、ACE阻害薬（例えば、カプトプリル、リシノプリル等）、遮断薬（例えば、メトプロロール、カルベジロール）、アルドステロン拮抗薬、利尿薬（例えば、フロセミド、スピロラクトン、エプレレノン）、及びジゴキシンなどの、心不全を治療するための任意の標準的な薬物治療プロトコルであってもよい。薬物治療プロトコルはまた、本明細書に開示される1つ又は複数のmiRNA模倣物又はmiRNAインヒビターを投与することを含む治療方法のいずれであってもよい。薬物治療の投薬量又はタイプは、処置後の1つ又は複数の時点で得られた発現プロファイルデータに基づき調整され得る。本発明の方法は、特定の患者において心不全を治療するための特定の薬物治療レジメンの作成を可能とする。

20

【0061】

本発明は以下のさらなる実施例によってさらに説明され、この実施例は限定と見なされてはならない。本願全体を通じて引用される全ての参考文献、特許、及び公開された特許出願の内容、並びに図は、全体として参照により本明細書に援用される。

【実施例】

【0062】

実施例

実施例1. miRNAは、ヒトの不全心と非不全心とで発現が異なる。

アレイベースの技術を用いて、心臓由来のmiRNAの発現レベルを、ヒトの非不全(NF)心及び不全心由来のヒト心臓組織において比較した。不全心としては、特発性拡張型心筋症(IDC)及び虚血性心筋症(ISC)から生じたものを含んだ。470個のマイクロRNA(Sanger miRBase Release 9.0)のバイオインフォマティクス解析を使用して、非不全心と不全心との対比において発現の異なる多数のmiRNAを同定した。特定のmiRNAの発現の増加又は減少のいずれかによって、miRNA発現の固有の「フィンガープリント」が明らかとなった。これらのmiRNAが、心不全のバイオマーカー、並びに心不全の治療における新規治療標的となる。

30

【0063】

NF心とIDC心とのmiRNA発現の比較では、図1A及び図2に示されるとおり、22個のmiRNAについて発現の変化が認められ、そのうち6個はNF心と比較してIDC心において増加し(hsa-miR-125b、hsa-miR-195、hsa-miR-100、hsa-miR-181b、hsa-miR-23a、及びhsa-miR-382)、及びそのうち16個はNF心と比較してIDC心において減少した(hsa-miR-133a、hsa-miR-133b、hsa-miR-221、hsa-miR-197、hsa-miR-30c、hsa-miR-92、hsa-miR-22、hsa-miR-486、hsa-miR-542-5p、hsa-miR-139、hsa-miR-150、hsa-miR-10b、hsa-miR-483、hsa-miR-594、hsa-miR-422b(miR-378としても公知)、及びhsa-miR-20a)。対象となる成熟miRNAの配列は表1(下掲)に示され、これらはSanger miRBase ver. 9.2に基づいている。

40

50

【 0 0 6 4 】

NF心とISC心とのmiRNA発現の比較では、図1B及び図2に示されるとおり、22個のmiRNAについて発現の変化が認められ、そのうち6個はNF心と比較してISC心において増加し(hsa-miR-195、hsa-miR-100、hsa-miR-342、hsa-miR-28、hsa-miR-199a、及びhsa-miR-26b)、及びNF心と比較してそのうち16個はISC心において減少した(hsa-miR-92、hsa-miR-221、hsa-miR-486、hsa-miR-133a、hsa-miR-150、hsa-miR-422b(miR-378としても公知)、let-7f、let-7a、hsa-miR-1、hsa-miR-222、let-7c、hsa-miR-133b、hsa-miR-224、hsa-miR-484、hsa-miR-594、及びlet-7d)。選択された成熟miRNAの配列は表1(下掲)に示され、これらはSanger miRBase ver. 9.2に基づいている。

10

【 0 0 6 5 】

【表 1】

表1. miRNA配列			
Sanger ID	受託番号	成熟配列(5'から3'に)	番号
hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAG	配列番号1
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	配列番号2
hsa-miR-197	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCCACCCAGC	配列番号3
hsa-miR-195	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	配列番号4
hsa-miR-92a‡	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	配列番号5
hsa-miR-139	MIMAT0000250	UCUACAGUGCACGUGUCU	配列番号6
hsa-miR-100	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	配列番号7
hsa-miR-483	MIMAT0002173	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUUCU	配列番号8
hsa-miR-22	MIMAT0000077	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	配列番号9
hsa-miR23a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	配列番号10
hsa-miR486	MIMAT0002177	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	配列番号11
hsa-miR150	MIMAT0000451	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	配列番号12
hsa-miR-30c	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	配列番号13
hsa-miR-342	MIMAT0000753	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGUC	配列番号14
hsa-miR-133a	MIMAT0000427	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU	配列番号15
hsa-miR-422b†	MIMAT0000732	CUGGACUUGGAGUCAGAAGGCC	配列番号16
hsa-miR-221	MIMAT0000278	AGCUACAUGUCUGCUGGGUUUC	配列番号17
hsa-let-7f	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	配列番号18
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	UUGGUCCCCUUAACCAGCUA	配列番号19
hsa-miR-222	MIMAT0000279	AGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUC	配列番号20
hsa-miR-224	MIMAT0000281	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUA	配列番号21
hsa-let-7a	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	配列番号22
hsa-miR-1	MIMAT0000416	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA	配列番号23
hsa-miR-28	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	配列番号24
hsa-miR-199a	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	配列番号25
hsa-miR-181b	MIMAT0000257	ACAUAUCAUUGCUGUCGGUGGG	配列番号26
hsa-miR-20a	MIMAT0000075	UAAAGUGC UU AUAGUGCAGGUAG	配列番号27
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	配列番号28
hsa-miR-484	MIMAT0002174	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	配列番号29
hsa-miR-26b	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU	配列番号30
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU	配列番号31
hsa miR-594**	MI0003606		
hsa-miR-10b	MIMAT0000254	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU	配列番号32
hsa-miR-382	MIMAT0000737	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	配列番号33

** hsa-mir-594は、miRBaseにおける注釈付きtRNA遺伝子の断片である

† hsa-miR-422bは、Sanger miRBaseデータベースにおいて名前がmiR-378に変更されている(リリース11.0)

‡ hsa-miR-92は、Sanger miRBaseデータベースにおいて名前がmiR-92aに変更されている(リリース11.0)

【 0 0 6 6 】

図 3 は、NF 対 IDC 及び NF 対 ISC について、 $p < 0.05$ (対応のない t 検定) のヒト心臓 miR 発現データの比較を示す。3 個の miRNA の発現が、IDC 心において NF 心を上回って有意に増加し (hsa-miR-125b、hsa-miR-195 及び hsa-miR-100)、一方、6 個の miRNA の発現が、NF 心と比較して IDC 心において有意に減少した (hsa-miR-22、hsa-miR-92、hsa-miR-221、hsa-miR-486、hsa-miR-30c、及び hsa-m

10

20

30

40

50

i R - 1 3 3 a)。5 個の m i R N A の発現が、I S C 心において N F 心を上回って有意に増加し (h s a - m i R - 1 9 5、h s a - m i R - 1 0 0、h s a - m i R - 3 4 2、h s a - m i R - 2 8、及び h s a - m i R - 1 9 9 a)、一方、1 0 個の m i R N A の発現が、N F 心と比較して I S C 心において有意に減少した (h s a - m i R - 9 2、h s a - m i R - 2 2 1、h s a - m i R - 4 8 6、h s a - m i R - 1 3 3 a、h s a - m i R - 1 5 0、h s a - m i R - 4 2 2 b (m i R - 3 7 8 としても公知)、l e t - 7 f、l e t - 7 a、h s a - m i R - 1、及び h s a - m i R - 2 2 2)。

【 0 0 6 7 】

m i R N A 発現レベルを N F 心対 I D C 心と N F 心対 I S C 心との間で比較する複合解析の結果、調節が一致するいくつかの m i R N A、並びに心不全サブタイプ特異的な固有の形で調節される m i R N A が示された (図 2)。m i R N A の h s a - m i R - 9 2、h s a - m i R - 2 2 1、h s a - m i R - 4 8 6、h s a - m i R - 1 5 0 及び h s a - m i R - 4 2 2 b は、I D C 心及び I S C 心の双方において有意にダウンレギュレーションされ、一方、h s a - m i R - 1 9 5 及び h s a - m i R - 1 0 0 は、I D C 心及び I S C 心の双方においてアップレギュレーションされた。後者の結果は、ヒト不全 (I D C) 心において、並びに機械的又は遺伝的に誘発した病理学的肥大を伴うトランスジェニックマウスにおいても、m i R - 1 9 5 がアップレギュレーションされることを以前に示した Rooij et al, 2006 と一致している。

10

【 0 0 6 8 】

Sanger human miRBase 9.0 データセットから検出可能な m i R N A の各々の相対的発現の詳細な解析は、完全なデータセットから得た。全ての心臓が、(可能な 4 5 4 個のうち) 8 7 ~ 2 3 8 個の定量的に検出可能な m i R 転写産物を有した (データは示さず)。

20

【 0 0 6 9 】

具体的方法

マイクロRNA抽出：6 人の非不全 (N F) 患者、5 人の特発性拡張型心筋症 (I D C) 患者及び 5 人の虚血性心筋症 (I S C) 患者のヒト心臓の左心室から、m i R N A を抽出した。全ての患者は、5 0 ~ 6 5 歳の男性であった。心臓外植時、患者は、A C E 阻害薬、利尿薬、遮断薬、ジギタリス製剤、抗凝固剤、インスリン、作動薬、及び硝酸薬を含む様々な薬理作用剤を与えられていた。心エコー法により、心臓外植時における各患者の心仕事量を評価した。各群の駆出分画率は以下のとおりであった：N F : 6 4 ± 4 . 3 % ; I D C : 1 2 ± 3 . 1 % ; 及び I S C : 1 8 . 6 ± 3 . 5 (平均値 ± S E M)。抽出は mirVana (商標) キット (Ambion) を使用して、製造者の推奨に従い実施した。

30

【 0 0 7 0 】

配列解析：試料を LC Sciences, LLC, Houston, Texas に提出して microRNA Detection Microarray Service に供した。パイオインフォマティクス解析を用いて 4 7 0 個のマイクロRNA (Sanger miRBase Release 9.0) の相対的発現を同定した。この解析により、非不全 (N F) 心と不全 (I S C 及び / 又は I D C) 心との対比において様々な発現の異なる m i R N A が同定された。2 種類の不全心、特発性拡張型心筋症 (I D C) を有する患者に由来するもの、又は虚血性心筋症 (I S C) を有するものを調べた。N F 群では、6 つの心臓 (n = 6) を調べた。N F 心を I D C 心 (n = 5) と比較すると、図 1 A に示されるとおり、1 2 個の m i R N A について統計的に有意な変化 (p < 0 . 0 5、対応のない t 検定) が認められ、そのうち 3 個は増加し、そのうち 9 個は減少した。N F 心と I S C 心 (n = 5) との間で同様に解析すると、図 1 B に示されるとおり、1 6 個の m i R N A の発現の変化が明らかとなり、そのうち 5 個は増加し、そのうち 1 1 個は減少した。ヒト心臓における N F を I D C 又は I S C のいずれかと比較したときの m i R 発現のあらゆる有意な変化について、マイクロアレイによる平均した m i R 発現を図 2 に示す。

40

【 0 0 7 1 】

m i R N A R T - P C R : TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (A B I) を使用して、製造者の推奨に従い m i R N A の逆転写を実施した。簡潔には、5 n g の m i R N A を、d N T P、MultiScribe 逆転写酵素及び標的 m i R N A に特異的なプライマーと

50

組み合わせた。得られた cDNA は 15 倍希釈して PCR 反応に使用した。製造者 (Applied Biosystems) の推奨に従い PCR を実施した。簡潔には、cDNA を標的 miRNA に特異的な TaqMan アッセイと組み合わせ、ABI7300 を使用して PCR 反応を実施した。

【0072】

図 4 は、6 人の非不全 (NF) 患者、5 人の特発性心筋症 (IDC) 患者及び 5 人の虚血性心筋症 (ISC) 患者のヒト心臓における miRNA 発現の RT-PCR による検証を示す。miRNA-24 の発現レベルは変化しなかったため、データはこのマイクロ RNA に対して基準化した。IDC 不全心及び ISC 不全心における miR-92 及び miR-133b の発現が、NF 心と比較したとき有意に減少し、一方、miR-100 及び miR-195 の発現が、NF 心と比較したとき有意に増加した。

10

【0073】

miR-133a と miR-133b とは配列が極めて似ているため、miR-133a 又は miR-133b のインヒビター又は模倣物のいずれかを過剰発現させる実験を実施した。RT-PCR によって得られたデータから、検出が各 miR に特異的であったことの確認がとれた。従って、miR-133a の過剰発現は、miR-133b の存在量が増えることなく miR-133a の発現が増加したことを示した。逆の実験の結果からも、同程度の特異性を得た。

【0074】

実施例 2 . 胎児心臓遺伝子プログラムは、特定の miRNA を制御することによって調整することができる。

20

胎児心臓遺伝子プログラム (FGP) の再活性化は、肥大心及び不全心に特有の特徴であり、心機能障害及び予後不良と相関がある (Kawahara et al, 2003, EMBO J. 22 (23): 6310-6321)。その発現が FGP 活性化を示している心不全では変化し、疾患の進行に悪影響を及ぼし得る遺伝子には、心臓の β -ミオシン重鎖 (β -MyHC)、 α -ミオシン重鎖 (α -MyHC)、心房性ナトリウム利尿因子 (ANF)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、骨格筋 γ -アクチン (γ -Actin) 及びカルシウム ATP アーゼ (SERCA) がある。例えば、 β -アドレナリン作動性シグナル伝達は、拡張型心筋症の自然歴において重要な役割を果たすことが知られている。心臓が負荷を受ける間に β -アドレナリン作動性受容体 (β_1 -AR 及び β_2 -AR) が慢性的に活性化すると、最終的には、遺伝子発現の変化を含む機序によって不全心に害が及ぶ。新生仔ラット心室筋細胞において β_1 -AR をイソプロテレノール (β_1 -アドレナリン作動性受容体作動薬) で刺激すると、ヒト心臓胎児及び / 又は成人遺伝子プロモーターの相対的活性において「胎児 (fetal)」反応が生じ、この反応はヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の活性化を同時に伴うヒト及びラットの β -ミオシン重鎖 (β -MyHC) プロモーターと、ラット β -MyHC プロモーターとの抑制を含むことが、Sucharov et al., 2006 によって以前に示されている (Sucharov et al, 2006, A β_1 -adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction Am J Physiol Heart Circ Physiol 291: H1299-H1308)。また、miRNA の発現によって計測したとき、プロモーターの変化が内在性遺伝子発現の変化と相関することも以前に示されている。

30

【0075】

この実施例に記載された実験の目的は、 β_1 -アドレナリン作動性受容体の刺激の不在下及び存在下における、胎児遺伝子プログラムの活性化に対する特定の miRNA の発現又は阻害の効果を測定することであった。

40

【0076】

Amaxa の技術 (Amaxa AG, Cologne, 独国) を用いて、miRIDIAN (商標) マイクロ RNA 模倣物及びインヒビター (Dharmacon) を新生仔ラット心室筋細胞 (NRVM) にトランスフェクトした。使用した Dharmacon 模倣物及びインヒビターの製品番号は、以下のとおりである: hsa-miR-92 模倣物: C-00030-02; miR-92 の Sanger 配列の二本鎖 miRNA をベースとする; hsa-miR-92 インヒビター: I-300030-02、miR-92 の Sanger ベースの配列の一本鎖 miRNA をベースとする: u a u u g c a c u

50

u g u c c c g g c c u g u (配列番号 5) 。 h s a - m i R - 1 0 0 模倣物 : C-300036-01 ; m i R 1 0 0 の S a n g e r 配列の二本鎖 m i R N A をベースとする ; h s a - m i R - 1 0 0 インヒビター : I-300036-01 ; m i R - 1 0 0 の S a n g e r ベースの配列の一本鎖 m i R N A をベースとする : a a c c c g u a g a u c c g a a c u u g u g (配列番号 7) 。 h s a - m i R - 1 3 3 b 模倣物 : C-300199-01 ; m i R 1 3 3 b の S a n g e r 配列の二本鎖 m i R N A をベースとする ; h s a - m i R - 1 3 3 b インヒビター : I-300199-01 ; m i R 1 3 3 b の S a n g e r ベースの配列の一本鎖 m i R N A をベースとする : u u g g u c c c c u u c a a c c a g c u a (配列番号 1 9) 。

【 0 0 7 7 】

2 . 4 × 1 0 ⁶ 個の N R V M を心筋細胞に適切な Amaxa 溶液中に懸濁し、20 マイクロモルの模倣物又はインヒビターと加え合わせた。心筋細胞プログラムを用いて細胞を電気穿孔し、その結果、短鎖 RNA について 95 % のトランスフェクション効率を得られた。血清含有培地を細胞に添加した。24 時間後、その培地を無血清培地と交換した。トランスフェクション後 72 時間で細胞を回収した。トランスフェクション後 48 時間にわたり、細胞のサブセットを アドレナリン作動薬のイソプロテレノール (1 0 ⁻⁷ M) で処置した。

【 0 0 7 8 】

TRIzol (Invitrogen) を使用して回収した細胞から m R N A を抽出した。iScript (Bio-Rad) を使用して、本質的に製造者によって記載されるとおりにポリ A 含有 m R N A の c D N A を調製した。典型的には、0 . 1 n g の c D N A 、 1 2 . 5 n M の各プライマー及び Power Syber Green PCR Master Mix (ABI) を R T - P C R 反応に使用した。反応は、ABI7300 システムを使用して実施した。使用したプライマーは、表 2 (下掲) に示される。実施例 1 に記載されるとおり、m i R N A c D N A を合成し、ABI に従い R T - P C R 反応を実施した。

【 0 0 7 9 】

【 表 2 】

表2. RT-PCR反応に使用されたプライマー配列 全てのプライマーは、5'から3'方向に示される	
αMyHC F	CCTGTCCAGCAGAAAGAGC (配列番号34)
αMyHC R	CAGGCAAAGTCAAGCATTCATATTTATTGTG (配列番号35)
18S F	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG (配列番号36)
18S R	CTTTCGCTCTGGTCCGCTCTT (配列番号37)
BNP F	GGTGCTGCCCCAGATGATT (配列番号38)
BNP R	CTGGAGACTGGCTAGGACTTC (配列番号39)
SERCA F	GGCCAGATCGCGCTACA (配列番号40)
SERCA R	GGGCCAATTAGAGAGCAGGTTT (配列番号41)
Sk α-アクチン F	CCACCTACAACAGCATCATGAAGT (配列番号42)
Sk α-アクチン R	GACATGACGTTGTTGGCGTACA (配列番号43)
βMyHC F	CGCTCAGTCATGGCGGAT (配列番号44)
βMyHC R	GCCCCAAATGCAGCCAT (配列番号45)
ANF F	GCGAAGGTCAAGCTGCTT (配列番号46)
ANF R	CTGGGCTCCAATCCTGTCAAT (配列番号47)

【 0 0 8 0 】

上記のとおり、 アドレナリン作動性受容体を受容体作動薬イソプロテレノール (I S O) で刺激すると、胎児遺伝子プログラム (F G P) が活性化される。I S O の媒介による F G P の誘導は、成人遺伝子、 - ミオシン重鎖 (M y H C) 及び S E R C A の発現の抑制、並びに、胎児遺伝子、 B 型ナトリウム利尿ペプチド (B N P) 、心房性ナトリウム利尿因子 (A N F) 、骨格筋 - アクチン及び - ミオシン重鎖 (M y H C) のアッ

プレギュレーションを呈する。図5は、イソプロテレノールの不在下及び存在下でmiR-92模倣物又はmiR-92インヒビターをトランスフェクトした新生仔心筋細胞における胎児遺伝子プログラム(FGP)の発現を示す。模倣物及びインヒビターをスクランブルしたmiR(Dharmacon)を対照として使用した(それぞれ、Con-M及びCon-I)。模倣物又はインヒビター対照をトランスフェクトしたISO処置NRVMは、MyHC及びSERCAの発現の低下、並びに、ANF、BNP、骨格筋-アクチン、及びMyHCの発現の増加を示し、これらはFGPの活性化に特徴的である。

【0081】

miR-92は心不全でダウンレギュレーションされるため、本発明者は、miR-92を阻害(すなわち、miR-92インヒビターにより処置)すれば、胎児遺伝子プログラムを誘導する結果となり、及びmiR-92をアップレギュレーション(すなわち、miR-92模倣物により処置)すれば、胎児遺伝子プログラムの誘導が妨げられるという仮説を立てた。対照と比較したとき、miR-92模倣物をトランスフェクトした細胞では、ANF、BNP及び骨格筋-アクチンの発現の僅かな増加、並びにSercamRNAの減少が認められた(図5)。しかしながら、一般に、miR-92の阻害又はアップレギュレーションは、胎児又は成人遺伝子発現の調節に対して最小限の効果しか有しない。これらの結果は、心不全におけるmiR-92のダウンレギュレーションが、心不全表現型を調整する他の経路に参与し得ることを示唆している。

【0082】

図6は、イソプロテレノールの存在下及び不在下でmiR-100模倣物又はmiR-100インヒビターをトランスフェクトした新生仔心筋細胞における胎児遺伝子プログラム(FGP)の発現を示す。模倣物及びインヒビターをスクランブルしたmiR(それぞれ、Con-M及びCon-I、Dharmacon)を対照として使用した。心室筋細胞にmiR-100模倣物をトランスフェクトすると、結果として成人遺伝子MyHC及びSERCAの抑制、並びにISOの媒介による胎児遺伝子ANF及びMyHCのアップレギュレーションの亢進が生じた。興味深いことに、miR-100のダウンレギュレーションはISOの媒介によるMyHC及びSERCAの抑制を妨げたが、ISOによる胎児アイソフォームの誘導は妨げなかった(図6)ことから、miR-100の阻害によって、ISOの媒介による成人アイソフォームの抑制に参与する遺伝子の発現が特異的に調節されることが示唆される。

【0083】

図7は、イソプロテレノールの存在下又は不在下でmiR-133b模倣物又はmiR-133bインヒビターをトランスフェクトした新生仔心筋細胞における胎児遺伝子プログラム(FGP)の発現を示す。模倣物及びインヒビターをスクランブルしたmiR(Dharmacon)を対照として使用した(それぞれ、Con-M及びCon-I)。miR-133bを阻害した結果、対照(Con-I)と比較して、遺伝子の小さいながら全般的なアップレギュレーションが分析された。しかしながら、miR-133b模倣物をトランスフェクトすることによってmiR-133bをアップレギュレーションすると、ISOの媒介によるMyHC及びSERCAのダウンレギュレーション、ISOの媒介によるMyHCのアップレギュレーションが妨げられ、且つISOの媒介によるBNPのアップレギュレーションが低下した(図7)。miR-133bの過剰発現も、対照(Con-M)と比較して、骨格筋-アクチン及びMyHCが抑制される結果となり、BNP及びANFの発現に変化はなかった。これらの結果は、miR-133のアップレギュレーションが-アドレナリン作動性の肥大型遺伝子プログラム誘導(hypertrophic gene program)を阻止又は低減したことを実証したCare et al. (Nat Med (2007), Vol. 13(5):613-618)によって示されたものと同様の、胎児遺伝子プログラムの調節における重要な役割を、miR-133bの発現の変化が有することを示唆している。これらの知見は、miR-133ファミリーが心疾患における遺伝子発現の全般的な調節因子であり得ることを示唆している。

【0084】

10

20

30

40

50

miRNA 模倣物又はインヒビターの各々が、標的miRNAのそれぞれアップレギュレーション又はダウンレギュレーションを生じることを確認するため、miR-92、miR-100及びmiR-133bの模倣物及びインヒビターを上記のとおりNRVMにトランスフェクトした。各miRNAの発現レベルをRT-PCRによって試験した。結果は図8に示され、miRNA模倣物により結果として標的miRNAが過剰発現した一方、miRNAインヒビターは特定のmiRNAの発現を抑えたとともに、この変化したmiRNA発現レベルが72時間維持されることを示している。

【0085】

実施例3 . miR-133b及び細胞肥大

miR-133bを阻害すると、胎児アイソフォームであるBNP、 α -骨格アクチン及びANFの発現が誘導され、及びmiR-133bを過剰発現させると、胎児遺伝子プログラムのISO媒介活性化が遮断された(実施例2)ことから、細胞肥大に対するmiR-133bの過剰発現又は阻害の効果を試験した。NRVMに模倣物及びインヒビターを実施例2に記載されるとおりトランスフェクトし、抗 α -アクチニン抗体で染色した。一部の細胞はトランスフェクション後にイソプロテレノールで処置した。Harrison et al. (Molecular & Cellular Biology (2004) Vol. 24(24): 10636-10649) に従い免疫蛍光法を実施した。簡潔には、細胞をTBSTで洗浄し、10%ホルムアルデヒドで20分間固定した。細胞をTBSTで再び洗浄し、さらに30分間、0.1%Triton-Xと共にインキュベートした。次に細胞をTBST中1%BSAで1時間ブロックし、続いて1:500希釈の抗 α -アクチニン抗体と共に1時間インキュベートした。次に細胞を、1:1000希釈のAlexa 594抗マウス抗体及び2 μ g/mlのHoechst染料と共に1時間インキュベートした。デジタルカメラ(Zeiss AxioCam)及びZeiss AxioVision ver. 3.0.6.36イメージングソフトウェアを備えた蛍光顕微鏡(Nikon E800)により、拡大率40倍の画像を取得した。Image Jソフトウェアプログラム(NIH)を使用して、各条件下につき3つの異なる領域から30個の細胞の細胞表面積を定量した。

【0086】

図9及び図10に示されるとおり、miR-133bをダウンレギュレーションすると細胞サイズの増加が引き起こされ、一方、miR-133bを過剰発現させると、ISOの媒介による心筋細胞の細胞サイズの増加が劇的に低減した。これらの結果は、miR-133bが心筋細胞肥大の全般的な調節因子であり得るという見解をさらに支持するものである。

【0087】

実施例4 . miRに基づく標的発見に向けたSAGE手法

図11に表される概略図は、心不全の治療標的を同定するための連続的遺伝子発現解析(SAGE)の手法を説明する。心不全臨床試験に関連した心不全(HF)患者が、3つの異なる時点で選択的な心内膜心筋生検を受ける。第1の時点は遮断薬(BB)治療の開始前であり、その他の時点は治療開始後3ヶ月及び12ヶ月である。各患者からの各時点の生検は、miRNA配列解析、mRNA(Afflymetrix)配列解析、及び(標的)プロテオーム発現解析のために処理される。同じ試料からのmiRNA/mRNA/タンパク質発現の固有の組み合わせは、同時に、複数のレベルで遺伝子発現パターンの変化を調べる固有の機会となる。miRNA発現がmRNA発現に影響し、続いてそれがタンパク質発現に影響するため、これまでに定義されていない調節制御の制御ポイント間の関連を調べることができる。さらには、ある期間にわたる同じ患者からの試料を解析することで、個人間の遺伝的差異に関連する重要な問題が回避される。治療標的は、同じ患者からの遺伝子発現レベルを異なる時点で比較することによって同定され得る(例えば、治療後3ヶ月と治療前等)。遺伝子発現レベルはまた、臨床転帰とも関連し得る。

【0088】

実施例5 . 遮断薬治療で処置したヒト患者におけるmiRNA発現の変化

心不全におけるmiRNAの重要性をさらに例証するため、ヒト患者において遮断薬による処置前及び処置後にmiRNA発現を評価した。末期心不全(処置前)、遮断薬

10

20

30

40

50

治療による処置後3ヶ月、及び処置後12ヶ月において、5人の患者から一連の心生検を採取した。各患者の試料の各々に対してmiRNA配列解析を実施し、miR-1、miR-19b、miR-133b、miR-133a、miR-30d、miR-92a、miR-208b、miR-499、及びmiR-let-7gを含む、不全心でダウンレギュレーションされるいくつかのmiRNAについての発現レベルを測定した。miRNA配列解析で測定された発現レベルを、実施例1に記載されるとおりRT-PCRによって確認した。RT-PCRの結果が図12~16に示される。特定のmiRNAの発現レベルは、対照として使用したmiR-370(右のパネル)又は低分子RNA RNU66(左のパネル)のいずれかに対して基準化した。末期心不全(A)、処置後3ヶ月(B)及び処置後12ヶ月(C)において、miRNA発現を評価した。遮断薬治療に反応した4人の患者(20、21、25及び34)の処置後の試料において、miRNA発現がアップレギュレーションされた。処置に反応しなかった患者(患者103)から採取された試料では、特定のmiRNAのアップレギュレーションは認められなかった。この結果は、miRNAのサブセットの発現レベルが心不全の重症度と相関し、実施例4に記載されるとおり特定の薬物治療に対する患者の反応をモニターするためのバイオマーカーとして使用することができることを示している。薬物治療の投薬量又はタイプは、このようなmiRNAの1つ又は複数の発現レベルに基づき調整され得る。

10

【0089】

実施例6. プロテインキナーゼC、ホスホジエステラーゼ1A、及びカルモジュリンは、miR-92及びmiR-133の標的である。

20

Target Scan 4.2(target scanのウェブサイト入手可能)によるプロテインキナーゼC(PKC)及びホスホジエステラーゼ1A(PDE1A)のmRNAの3'UTR解析から、miR-92a(旧名miR-92)の標的部位である可能性が明らかとなった。miR-92aがこれらの2つのmRNAを標的とどうかを試験するため、miR-92aの過剰発現をもたらすmiR-92a模倣物、又はmiR-92aのダウンレギュレーションをもたらすmiR-92aインヒビターをラット新生仔心筋細胞にトランスフェクトした。細胞はトランスフェクション後72時間で回収し、ウエスタンブロットにより細胞溶解物を分析した。miR-92aインヒビターによるmiR-92aのダウンレギュレーションの結果、PKC(図17A)及びPDE1A(図17B)のタンパク質レベルがアップレギュレーションされた。miR-92a模倣物によるmiR-92aのアップレギュレーションの結果、PKC(図17A)及びPDE1A(図17B)の発現が抑制された。

30

【0090】

Target Scanにより、カルモジュリンのmRNAの3'UTRについて同様の解析を実施した。この解析から、miR-133bの標的部位である可能性が明らかとなった。miR-133bがカルモジュリンを標的とどうかを試験するため、miR-133b模倣物(miR-133bの過剰発現をもたらす)又はmiR-133bインヒビター(miR-133bのダウンレギュレーションをもたらす)をラット新生仔心筋細胞にトランスフェクトした。細胞はトランスフェクション後72時間で回収し、RT-PCRによりカルモジュリンのmRNA発現を分析した(図18A)。ウエスタンブロットによりカルモジュリンのタンパク質発現を分析した(図18C)。miR-133bインヒビターによるmiR-133bのダウンレギュレーションの結果、カルモジュリンのmRNA及びタンパク質レベルがアップレギュレーションされたが、一方、miR-133b模倣物によるmiR-133bのアップレギュレーションは、カルモジュリンの発現に対して最小限の効果しか有しなかった。

40

【0091】

miR-133bがカルモジュリン3'UTRに対して直接的な効果を有したかどうかを判定するため、miR-133b模倣物又はmiR-133bインヒビターと、ルシフェラーゼに結合させたカルモジュリン3'UTRを含有する構築物をラット新生仔心筋細胞に共トランスフェクトした(図18B)。ルシフェラーゼアッセイの結果から、mR

50

NA及びタンパク質の発現解析の知見が確認された。miR-133b模倣物をトランスフェクトしても、ルシフェラーゼレベルに有意な変化は生じなかった。しかしながら、miR-133bインヒビターをトランスフェクトした結果、ルシフェラーゼはアップレギュレーションされたことから、カルモジュリンがmiR-133bの直接的な標的であることが示される。

【0092】

まとめると、これらの結果は、PKC及びPDE1AがmiR-92aの標的であり、一方、カルモジュリンはmiR-133bの標的であることを示している。これらの標的の3つ全てが、心不全に至る心筋症の発症に関連している。

【0093】

記載された特定の方法論、プロトコル及び材料は異なってもよいため、本開示の発明はそれらに限定されないことが理解される。また、本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態を説明することを目的としているに過ぎず、本発明の範囲を限定する意図はないことも理解され、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものとする。

【0094】

当業者は、日常の範囲を超えた実験を用いなくとも、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態の多くの等価物を認識し得るか、又は確認することができるであろう。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【0095】

参考文献

- Lloyd-Jones, D. M. et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure : the Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068-72 (2002)
- American Heart Association. *Heart Disease and Stroke Statistics - 2003 Update*, American Heart Association, Dallas, Tex., 2003
- Bartel, 2004 *Cell*, 116, 281-297
- Ambros, 2003 *MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress and timing*. *Cell* 113: 673-676
- Xu et al., 2003 *The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism*. *Curr. Biol.* 13:790-795
- Landgraf et al, 2007 *A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing*. *Cell* 129: 1401-14
- Pfeffer, S. et al., 2004 *Identification of virus-encoded microRNAs*. *Science* 304: 734-736
- Calin, GA et al., 2004 *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2999-3004
- Calin GA et al., 2002 *Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(24): 15524-15529
- Care et al., 2007, *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy*, *Nature Med.* 13 (5):613- 618
- Cheng et al., 2007, *MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart*, *Am J. Pathol* 170: 1831-1840
- Sayed et al., 2007, *MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy*, *Circ. Res.* 100: 416-424
- Yang et al., 2007 *The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2*, *Nature Med.* 13 (4): 486-491
- van Rooij et al., 2007, *Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA*, *Science* 316:575-579

10

20

30

40

50

van Rooij et al., 2006, A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. PNAS 103:18255-18260

Pfeffer, S. et al., 2004 Identification of virus-encoded microRNAs. Science 304: 734-736

Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614 10619, 1996

Heller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150 2155, 1997

Hutvagner et al. 2004, Sequence specific inhibition of small RNA function, PLoS Biology 2(4): 0465-0475

Meister et al. 2004, Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing, RNA 10: 544-550

Kawahara et al., 2003, EMBO J. 22 (23): 6310-6321

Sucharov et al., 2006, A beta₁ -adrenergic receptor CaM kinase II-dependent pathway mediates cardiac myocyte fetal gene induction Am J Physiol Heart Circ Physiol 291: H1299-H1308

【 図 1 】

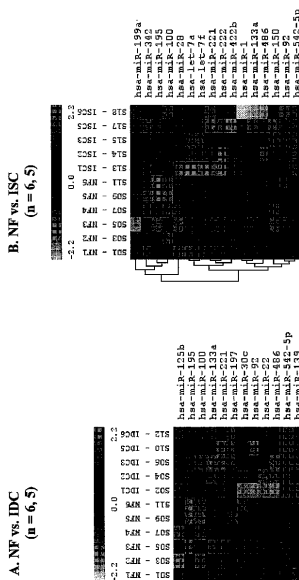
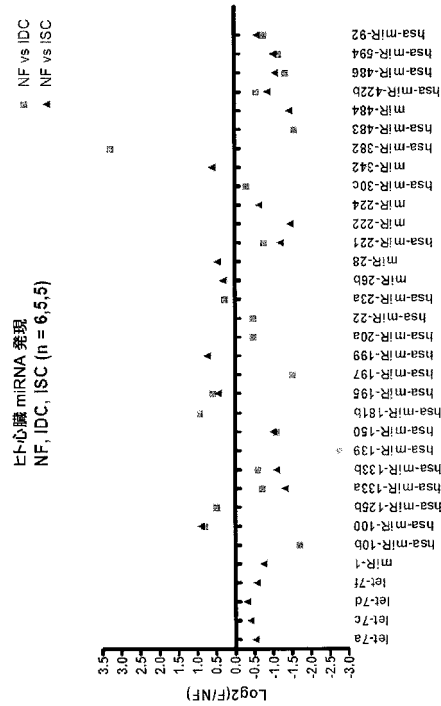
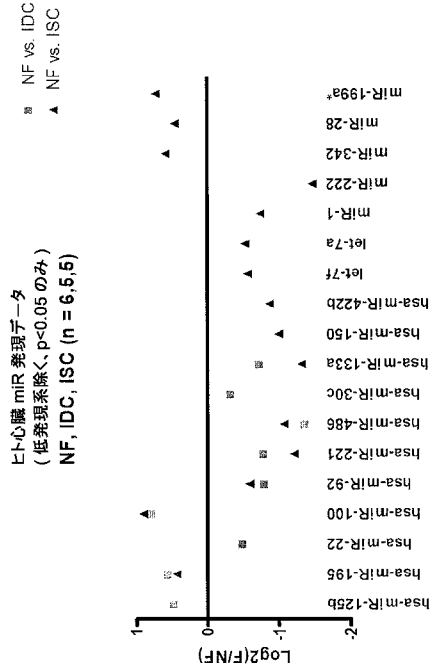


FIGURE 1

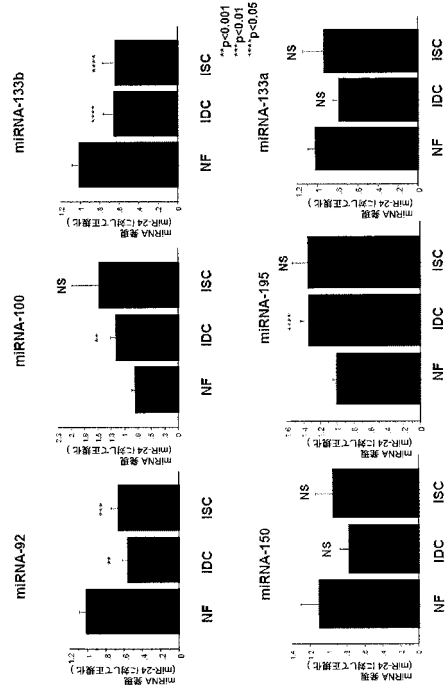
【 図 2 】



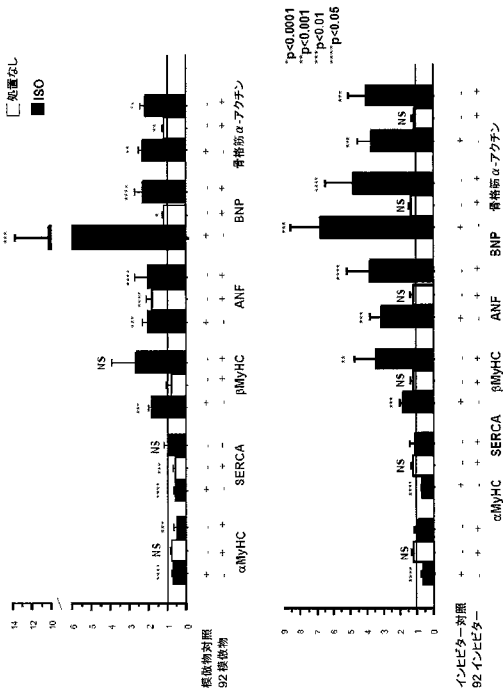
【図 3】



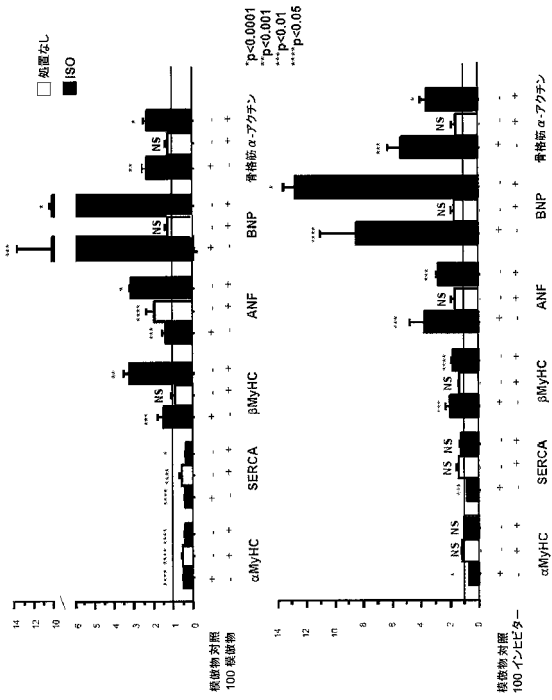
【図 4】



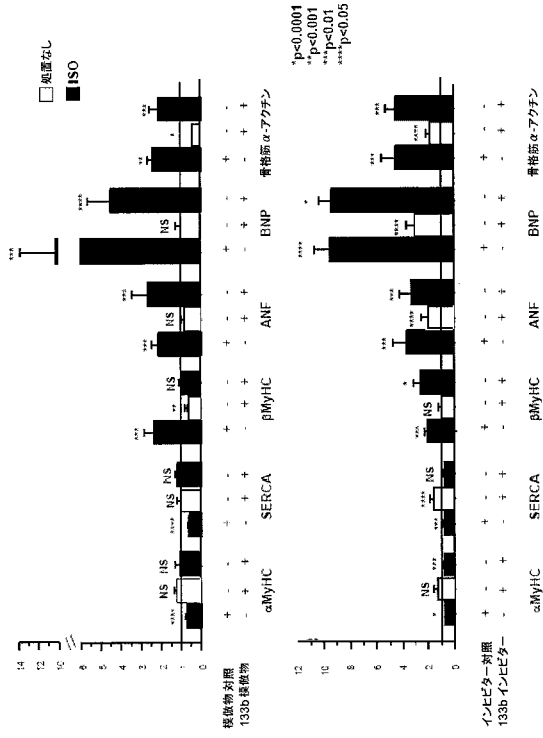
【図 5】



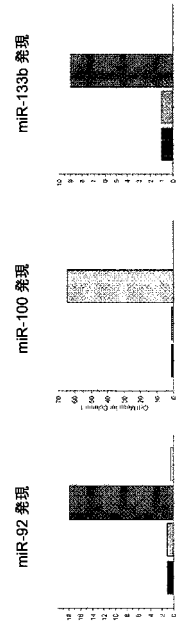
【図 6】



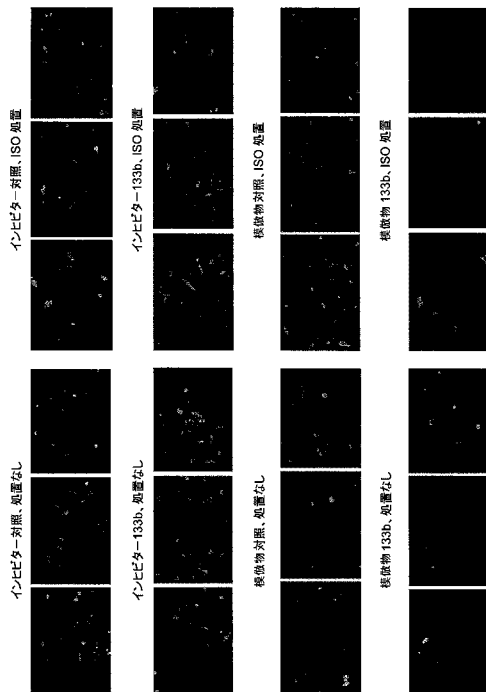
【 図 7 】



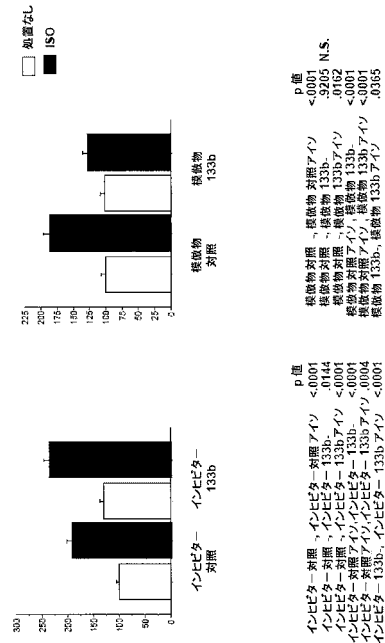
【 図 8 】



【 図 9 】

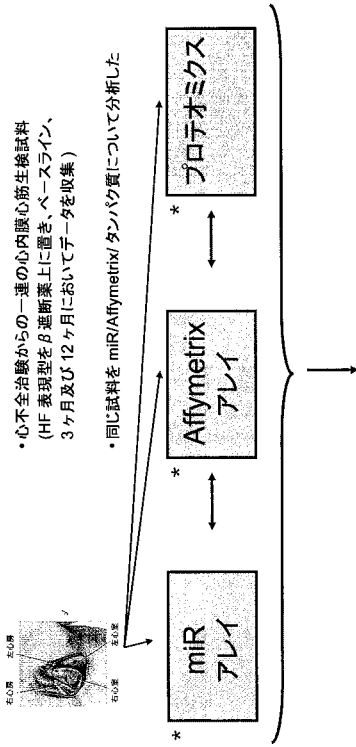


【 図 10 】



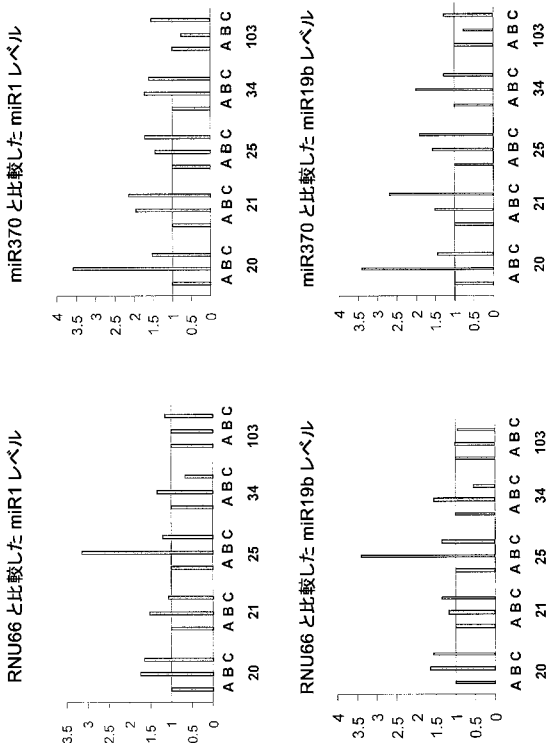
【 図 1 1 】

miR に基づく標的発見に向けた 統合的手法 (SAGE)

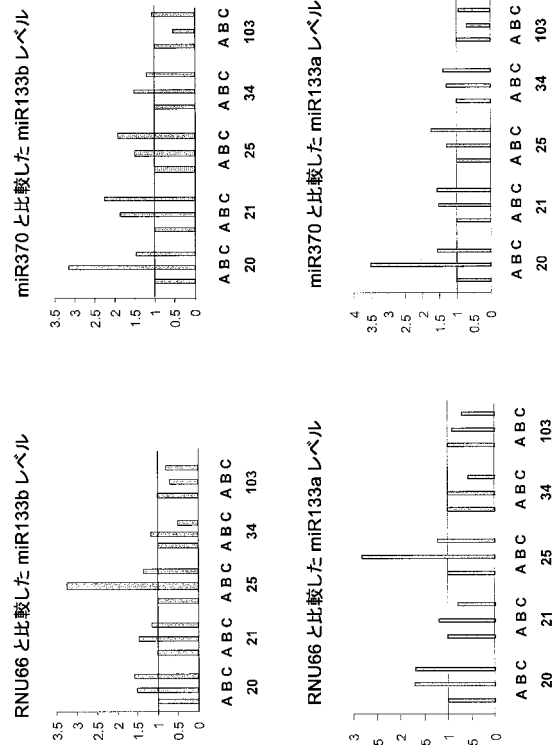


同じ患者からのある期間にわたる遺伝子発現パターンを統合する
完全に固有のデータセット； HF 表現型は逆

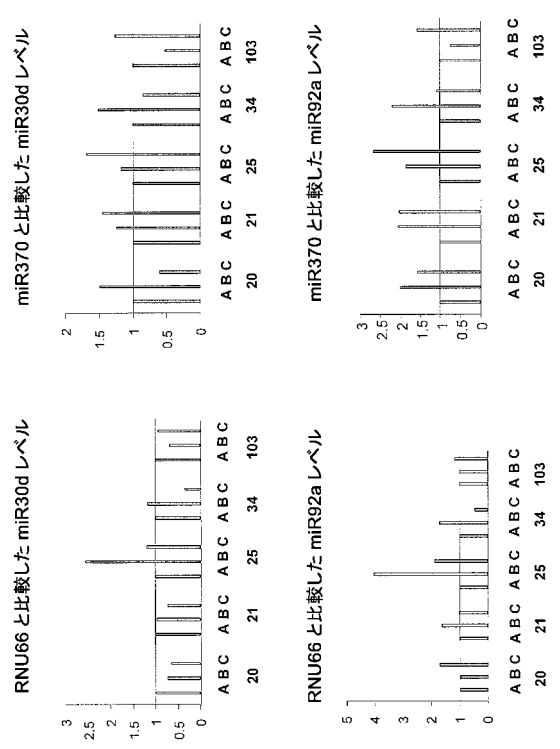
【 図 1 3 】



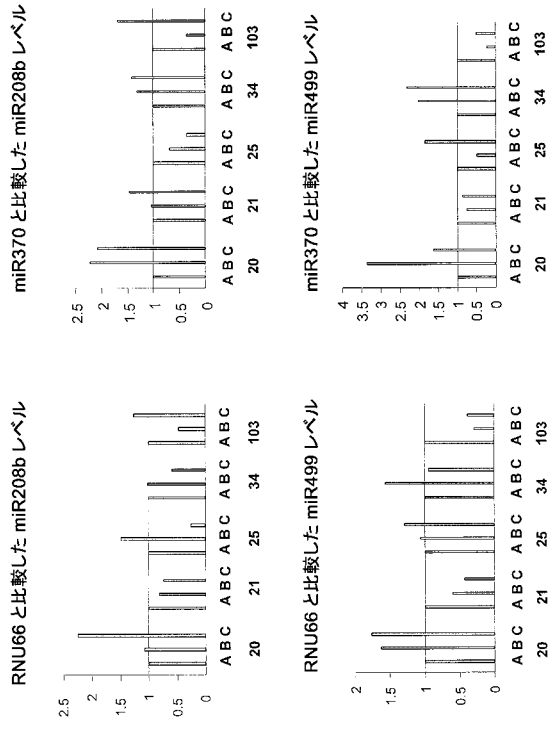
【 図 1 2 】



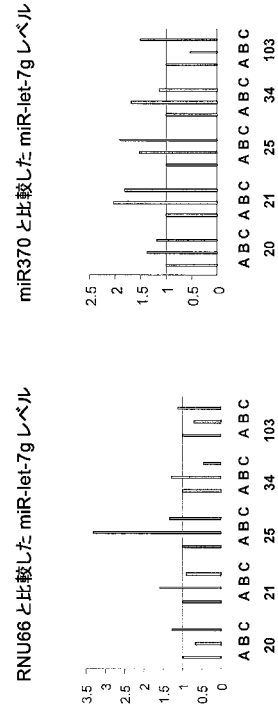
【 図 1 4 】



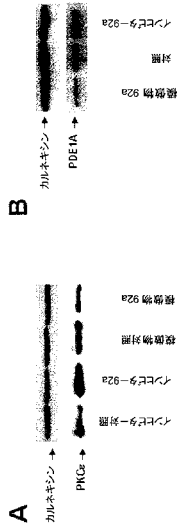
【 図 1 5 】



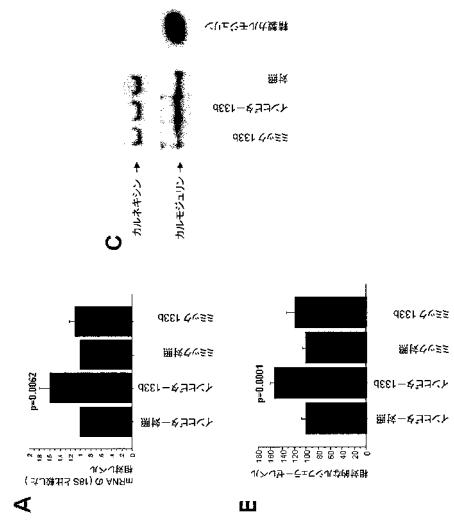
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/70508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68; C12P 19/34 (2009.01) USPC - 435/6; 435/91.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) -C12Q 1/68; C12P 19/34 (2009.01) USPC -435/6; 435/91.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWest (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar: heart, cardiovascular, micro, RNA, miRNA, miR-542 GenCore 6.3 (All databases): SEQ ID NO:1		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0161004 A1 (Brown et al.) 12 Jul 2007 (12.07.2007) para [0226] and [0227]	1
Y	WO 2006/119266 A2 (Tuschl et al.) 9 Nov 2006 (09.11.2006) pg 10, Table A SEQ ID NO:48	2, 5, 28-30
Y	US 2003/0096782 A1 (Bristow et al.) 22 May 2003 (22.05.2003) para [0240] and [246]	2
Y	US 2003/0096782 A1 (Bristow et al.) 22 May 2003 (22.05.2003) para [0240] and [246]	5, 28-30
Y	US 2004/0152088 A1 (Fishman et al.) 5 Aug 2004 para [0043]	28-30
Y	Lui et al. Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer. Cancer Research 1 July 2007, 67(13):6031-6043: Abstract, pg 3, Table S3 appearing after pg 6043	1, 2, 5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 February 2009 (08.02.2009)		24 FEB 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/70508

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I, claims 1, 2, 5, 28-30, drawn to a method of diagnosing or prognosing heart failure in a subject by measuring the level of expression of one or more miRNA, limited to SEQ ID NO:1.

Group II+, claims 1-6, 28-30, drawn to a method of diagnosing or prognosing heart failure in a subject by measuring the level of expression of one or more miRNA. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a SEQ ID NO: to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO.

Group III+, claims 7-27, drawn to a method of treating or preventing a subject by administering a therapeutically effective amount of a miRNA mimic or a miRNA inhibitor to the subject. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a SEQ ID NO: to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO.

----please see additional sheet----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 5 and 28-30 restricted to SEQ ID NO:1.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AUS 08/70508

continuation of Box III

The inventions listed as Groups I-III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I and II+ do not include the inventive concept of treating or preventing a subject by administering a therapeutically effective amount of a miRNA mimic or a miRNA inhibitor to the subject, as required by Group III+.

Group III+ does not include the inventive concept of diagnosing or prognosing heart failure in a subject by measuring the level of expression of one or more miRNA, as required by Group I and II+.

Although Groups I and II+ do share the technical feature of measuring the level of expression of one or more miRNA to monitor heart conditions, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, US 2007/0161004 A1 (12 Jul 07) to Brown; et al. teaches methods for generating miRNA profiles and employing such profiles for therapeutic, diagnostic, and prognostic applications (abstract). As the above measuring the level of expression of miRNA to monitor heart conditions was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, the claimed SEQ ID NOs do not share a significant structural element that is an improvement over the prior art and is essential to their common utility. Specifically, US 2007/0050146 A1 to Bentwich; et al. (01 Mar 2007) discloses oligonucleotide comprising the claimed SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO 12421). Therefore, there is no teaching as to a shared significant structural element, and hence, there is no disclosure of the same or corresponding technical feature. Therefore, unity of invention is lacking.

Groups I-III+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

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

(72) 発明者 スカロフ, カルメン

アメリカ合衆国, コロラド州 8 0 0 2 7, スペリオル, ストーンハム ストリート 1 3 6 5

(72) 発明者 ブリストー, マイケル アール.

アメリカ合衆国, コロラド州 8 0 1 1 3, チェリー ヒルズ ビレッジ, ブラックマー ロード 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA11 DA03 GA11 HA14 HA17
 4B063 QA19 QQ08 QQ52 QR35 QR55 QR77 QS34 QX01
 4C084 AA13 AA19 NA14 ZA36 ZC75
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA36 ZC75