

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5624470号  
(P5624470)

(45) 発行日 平成26年11月12日(2014.11.12)

(24) 登録日 平成26年10月3日(2014.10.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	A
G 01 N 33/53	(2006.01)	G 01 N 33/53	M

請求項の数 7 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2010-525014 (P2010-525014)
(86) (22) 出願日	平成20年9月12日 (2008.9.12)
(65) 公表番号	特表2010-538653 (P2010-538653A)
(43) 公表日	平成22年12月16日 (2010.12.16)
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/076109
(87) 國際公開番号	W02009/036236
(87) 國際公開日	平成21年3月19日 (2009.3.19)
審査請求日	平成23年9月7日 (2011.9.7)
(31) 優先権主張番号	60/993,809
(32) 優先日	平成19年9月14日 (2007.9.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/055,178
(32) 優先日	平成20年5月22日 (2008.5.22)
(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 1 524
(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】ヒト末梢血微小胞におけるm i RNAの発現およびその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被験者における前立腺癌の診断または予後診断を補助するために、被験者に由来するサンプルを分析する方法であって、以下：

i ) 被験者の末梢血から単離した微小胞内の、少なくとも1つのm i R遺伝子産物のレベルを決定する；そして

i i ) 当該少なくとも1つのm i R遺伝子産物のレベルをコントロールと比較する、ここで、コントロールのレベルと比較しての、当該少なくとも1つのm i R遺伝子産物のレベルの増加が前立腺癌の診断または予後診断を補助するための指標である、  
を含み、

ここで、m i R - 2 1 ならびに以下のm i R : m i R - 1 5 a、m i R - 1 6 - 1、m i R - 1 4 3 およびm i R - 1 4 5 の少なくとも1つのレベルを決定する、前記方法。

## 【請求項2】

前立腺癌のためのバイオマーカーとしての単離微小胞の使用であって、当該バイオマーカーは、前立腺癌を有する被験者の末梢血中の微小胞から単離され、

少なくとも以下のm i R : m i R - 2 1 が、単離微小胞内で、コントロール被験者と比較してアップレギュレートされ、そして少なくとも以下のm i R : m i R - 1 5 a、m i R - 1 6 - 1、m i R - 1 4 3 およびm i R - 1 4 5 が、単離微小胞内で、コントロール被験者と比較してダウンレギュレートされる、前記使用。

## 【請求項3】

10

20

コントロールが以下から成る群：

i ) リファレンススタンダード；

i i ) 前立腺癌を有していない被験者由来の単離微小胞内の当該少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産物のレベル；および

i i i ) 前立腺癌を提示していない被験者サンプル由来の単離微小胞内の当該少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産物のレベル

より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

被験者に由来するサンプルが、血漿を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

当該少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産物のレベルが、 R T - P C R 、ノーザンプロット解析、液相ハイブリダイゼーション法、および / またはマイクロアレイ解析によって測定される、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

微小胞が、遠心により単離したものである、請求項 1 、 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

m i R - 2 1 が、単離微小胞内で、コントロール被験者と比較してアップレギュレートされ；そして以下の m i R : m i R - 1 5 a 、 m i R - 1 6 - 1 、 m i R - 1 4 3 および m i R - 1 4 5 の少なくとも 1 つが、単離微小胞内で、コントロール被験者と比較してダウンレギュレートされる、請求項 1 、 4 、 5 または 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

ヒト末梢血微小胞における m i R N A の発現およびその使用に関する。

優先権の主張、および連邦政府による資金提供を受けた研究開発に関する記載

本出願は、 2 0 0 7 年 9 月 1 4 日に提出された米国仮特許出願 6 0 / 9 9 3 , 8 0 9 号、および 2 0 0 8 年 5 月 2 2 日に提出された 6 1 / 0 5 5 , 1 7 8 号に対する優先権を主張し、これら文献を本明細書において参照としてすべて援用する。本発明は政府のいかなる援助も受けておらず、したがって政府は本発明における権利を有するものではない。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

マイクロ R N A ( m i R N A または m i R ) は、動物および植物において発現される低分子ノンコーディング R N A である。これらは、細胞の機能、細胞の生存、細胞の活性化、および発生時の細胞の分化を制御する<sup>7</sup> ;<sup>8</sup> 。

【 0 0 0 3 】

マイクロ R N A は、 1 9 - 2 5 ヌクレオチドの R N A の低分子ノンコーディングファミリーであり、配列特異的な様式でメッセンジャー R N A ( m R N A ) を標的とし、 m i R N A およびそれらの標的との間の相補性の程度に依存して、翻訳の抑制または m R N A の分解の誘発することにより、遺伝子の発現を制御する ( Bartel, D.P. (2004) Cell 116, 281- 297; Ambros, V. (2004) Nature 431, 350-355)。多くの m i R は、遠位の関連する器官の間で配列中に保存されており、これらの分子が本質的な過程にかかわっていることを示唆する。事実 m i R は、発生時の遺伝子発現の制御 ( Xu, P. , et al. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795) 、細胞の増殖 ( Xu, P. , et al. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795) 、アポトーシス ( Cheng, A.M. , et al. (2005) Nucl. Acids Res. 33, 1290-1297) 、グルコース代謝 ( Poy, M.N. , et al. (2004) Nature 432, 226-230) 、ストレス抵抗性 ( Dresios , J. , et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1865-1870) 、および癌 ( Calin, G.A. , et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 1554-15529; Calin, G.A. , et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 11755-11760; He, L. , et al (2005) Nature 435, 828-833; および Lu, J. , et al (2005) Nature 435:834-838) に関与している。

【 0 0 0 4 】

10

20

30

40

50

m i R が、哺乳類の血球新生に一役を担っているという強力なエビデンスもある。マウスにおいて m i R - 1 8 1 、 m i R - 2 2 3 、 m i R - 1 4 2 は、血球新生組織中で差次的に発現され、それらの発現は血球新生および分化系列決定の間に制御を受ける (Chen, C.Z., et al. (2004) *Science* 303, 83-86)。マウスの血球新生前駆細胞における m i R - 1 8 1 の異所的発現は、B 細胞内コンパートメントにおける増殖をもたらした (Chen, C.Z., et al. (2004) *Science* 303, 83-86)。マウス血球新生系細胞における系統的な m i R 遺伝子のプロファイリングは、神経組織と比較して血球新生系における異なる m i R 発現パターンを明らかにし、細胞分化の間に起こる個々の m i R の発現の変化を同定した (Monticelli, S., et al. (2005) *Genome Biology* 6, R71)。近年の研究は、C D 3 4 + 脣帯血前駆体細胞のヒト赤血球新生培養において、m i R - 2 2 1 および m i R - 2 2 2 が 10 低レベルに調節されることを同定した (Felli, N., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086)。これらの m i R は、腫瘍遺伝子 c - K i t を標的とすることが発見された。さらなる機能の研究は、赤血球新生培養におけるこれら 2 つの m i R の低下が、K i t タンパク質の産生を翻訳レベルで遮断できなくなり、早期赤血球細胞の expansion (成熟血球の増幅) を導くことを示した (Felli, N., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086)。m i R 群が細胞分化を制御するという仮定と一致して、m i R - 2 2 3 は、C / E B P a および N F I - A の関与する制御回路の鍵となるメンバーであり、オールトランスレチノイン酸処理した急性前骨髄球性白血病細胞株において、顆粒球の分化をコントロールすることが発見された (Fazi, F., et al. (2005) *Cell* 123, 819-831)。 20

## 【 0 0 0 5 】

B 細胞性慢性リンパ性白血病における、2 つの m i R の高頻度の欠失および低発現が同定された<sup>9</sup>。この発見が、頭頸部癌、小細胞肺癌、神経膠芽腫、乳癌、慢性リンパ性白血病、およびバーキットリンパ腫における、m i R の異常な発現を実証する多数の論文を刺激することとなった<sup>9-12</sup>。より最近には、炎症と m i R 間の関連性がマクロファージにおいて報告されている<sup>13</sup>。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】 Bartel, D.P. (2004) *Cell* 116, 281-297 30

【非特許文献 2】 Ambros, V. (2004) *Nature* 431, 350-355

【非特許文献 3】 Xu, P., et al. (2003) *Curr. Biol.* 13, 790-795

【非特許文献 4】 Cheng, A.M., et al. (2005) *Nucl. Acids Res.* 33, 1290-1297

【非特許文献 5】 Poy, M.N., et al. (2004) *Nature* 432, 226-230

【非特許文献 6】 Dresios, J., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1865-1870

【非特許文献 7】 Calin, G.A., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1554-15529

【非特許文献 8】 Calin, G.A., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11755-11760 40

【非特許文献 9】 He, L., et al. (2005) *Nature* 435, 828-833

【非特許文献 10】 Lu, J., et al. (2005) *Nature* 435:834-838

【非特許文献 11】 Chen, C.Z., et al. (2004) *Science* 303, 83-86

【非特許文献 12】 Monticelli, S., et al. (2005) *Genome Biology* 6, R71

【非特許文献 13】 Felli, N., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086

【非特許文献 14】 Fazi, F., et al. (2005) *Cell* 123, 819-831

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 7 】

そのような障害に関する検査を目的として、そのようなマクロファージの存在を確認するための組織サンプルが獲得されている。加えて現在までのところ、血中を循環する微小胞がm i Rを含有することを示す報告はなされていない。

#### 【0008】

本発明のさらなる利点、目的、および特色は、以下の記述で部分的に説明することとし、そして当業者には以下の実験で部分的に明らかになり、または本発明を実施することで学ばれることと思う。本発明の目的および利点は、付記した請求項で特に指摘したように理解され、達成されることと思う。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

##### 発明の概要

1つの側面において、微小胞内に存在し、そして/または組織、体液、および/もしくは細胞において具体的なm i Rの発現レベルが変化している、具体的なm i Rを同定するための方法を提供する。

#### 【0010】

微小胞は細胞間の情報交換を促進する。マクロファージ、血小板、T細胞、および腫瘍を含む多くの細胞は、核酸および/またはタンパク質を含有する小さな微小胞を放出する<sup>1 - 5</sup>。微小胞内に含有される因子は、血管新生、細胞の成長、および細胞の分化を制御する<sup>1 - 3</sup>。

#### 【0011】

もう1つの側面において、特定の障害に罹っている患者の末梢血のような体液中のm i Rの存在を決定する。

もう1つの側面において、肺線維症に罹っている患者の肺組織中のm i Rの存在を決定する。

#### 【0012】

なおもう1つの側面において、被験者（例えばヒト）の特定の障害を診断または予後診断する方法を本明細書にて提供する。1つの特定の方法に従って、被験者由来検査サンプル中の少なくとも1つのm i R遺伝子産生物のレベルを、コントロールサンプル中の対応するm i R遺伝子産生物のレベルと比較する。コントロールサンプル中の対応するm i R遺伝子産生物のレベルと比較しての、検査サンプル中のm i R遺伝子産生物のレベルの変化（例えば増加、減少）が、被験者が急性炎症性障害を有する、または発症するリスクがあるかのいずれかであることを示す。

#### 【0013】

1つの態様において被験者由来検査サンプル中のm i R遺伝子産生物のレベルは、コントロールのレベルより高い。もう1つの態様において、少なくとも1つのm i R遺伝子産生物は、本明細書に示したようなm i R N Aから成る群より選択される。

#### 【0014】

特定の態様において診断または予後診断される障害は、単核食細胞および/またはT H P - 1細胞による微小胞放出を引き起こすものである。

特定の態様において診断または予後診断される障害は、炎症反応を引き起こすものである。

#### 【0015】

もう1つの態様において本発明は、被験者（例えばヒト）の癌および/または炎症性障害を治療する方法である。

1つの特定の方法において、表I - VIに見出せる群の1つまたはそれより多くより選択される、少なくとも1つのm i R遺伝子産生物の発現を阻害するための化合物の有効量を、被験者に投与する。

#### 【0016】

1つの態様において、少なくとも1つのm i R遺伝子産生物の発現を阻害するための化合物は、表I - VIに見出せる群の1つまたはそれより多くより選択されるm i R遺伝子

10

20

30

40

50

産生物の発現を阻害する。

【0017】

本発明はさらに、癌および/または炎症性障害を治療するための医薬組成物を提供する。1つの態様において本発明の医薬組成物は、少なくとも1つのm i R 発現阻害化合物、および医薬的に受容可能な担体を包含する。特定の態様において、少なくとも1つのm i R 発現阻害化合物は、その発現が正常と比較して疾患患者由来血液中でより高いm i R 遺伝子産生物に対して特異的である。

【0018】

なおもう1つの態様において、医薬組成物はさらに少なくとも1つの抗炎症薬を包含する。

10

1つの態様において本発明は、m i R 遺伝子産生物の過剰発現と関連する癌、および/またはm i R 遺伝子産生物の過剰発現と関連する肺の障害を治療するための、医薬組成物である。そのような医薬組成物は、少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物の有効量、および医薬的に受容可能な担体を包含し、その場合少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物が結合して、そのm i R 遺伝子産生物の発現を低減させる。もう1つの態様において、少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物は、そのm i R 遺伝子産生物の核酸配列と相補的である核酸配列を包含する。まだもう1つの態様において、少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物は、m i R、またはそのバリエントもしくは生物学的に活性なそのフラグメントである。なおもう1つの態様において、医薬組成物はさらに少なくとも1つの抗癌薬を包含する。

【0019】

20

本発明の様々な目的および利点は、添付の図を照らし合わせて読むことで、好ましい態様の以下の詳細な記載から当業者には明らかになろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、分化がマクロファージからの微小胞の放出を誘導したことを示す。末梢血単球(PBM)は、未処理のまま(淡黒点)とするか、または24時間GM-CSFで処理(黒点)した。細胞を含まない上清を集め、超遠心した。小胞をPBS中に再懸濁し、フローサイトメトリーでサイズについて解析した。解析の前に、2μm標準ビーズを使用してFSSおよびSSCのパラメータを調整した(示していない)。3名の別個のドナーからの代表的なデータを示す。

30

【図2】図2A-2Cは、微小胞がマクロファージの分化を仲介することを示す。微小胞を、PMA処理したTHP1細胞より集めた後、未分化のTHP1細胞(図2B)または単球(図2C)に加えた。コントロールとして、THP1細胞を未処理のまま残した(図2A)。細胞は毎日写真撮影した。第3日の細胞を示す。

【図3】図3A-3Cは、末梢血微小胞の単離を示す。インフォームドコンセント後、正常なボランティアドナーからの20cc血液から血漿を得た。0.5cc血漿由来の微小胞を、CD206-FITCまたはMHCII-FITC抗体と共にインキュベートし、前方散乱 対 側方散乱を使用してのサイズ(図3A)、および表面抗原発現(図3B)について、BD FACS Caliburで解析した。同位体のコントロールと比較してのCD206またはMHC IIのいずれかの発現のパーセントを、図3Aに示したゲート領域に関して決定した(図3C)。2人のドナーの平均±SEMを示す。

40

【図4】末梢血微小胞の由来の解析。図4は、健常なドナー(n=10)由来の末梢血微小胞をフローサイトメトリーにより解析した。細胞の由来を決定するため、微小胞を、CD3、CD202b(Tie-2)、CD66b、CD79a、またはCD41aについて染色し、T細胞、内皮細胞、好中球、B細胞、または血小板に由来するものを決定した。単核食細胞由来の微小胞は、CD14、CD206、CCR3、CCR2、またはCCR5に対してポジティブとした。ゲートされた全イベントの最大値の%の平均±S.E.Mを示す。

【図5A】末梢血微小胞およびPBMからのm i RNAの発現。(図5A)微小胞およびPBMに関する階層的クラスター解析を、フィルタリング基準に基づいて示す。

50

【図5B】末梢血微小胞およびPBM CからのmiRNAの発現。微小胞(図5B)に関する発現プロファイルを示すヒートマップを作製した。

【図5C】末梢血微小胞およびPBM CからのmiRNAの発現。PBM C(図5C)に関する発現プロファイルを示すヒートマップを作製した。

【図5D】末梢血微小胞およびPBM CからのmiRNAの発現。(図5D)各サンプル群で共有する数、および各サンプル群に特異的な数を示す。

【図6】図6：表1は、様々な疾患、ならびにそれらに関連してアップレギュレートおよびダウンレギュレートされたmiRを示す。癌および癌以外の適用を含む、ヒトの疾患の組織内において重要であるマイクロRNAを列記する。我々のデータセット(図7、表I I)からは血漿中に検出されないmiRNAを、特定の疾患の組織内で増加することが知られているmiRNAと比較して、発見者らは、数種のmiRNAが血漿中のバイオマーカーとして役立ててよいことを予測することを今回確信する(図6、表1の増加した発現の列の太字のmiRを参照のこと)。

【図7-1】図7-1：表I Iは、血漿中で発現されたmiR、および検出されなかったmiRを示す。

【図7-2】図7-2：表I I(続き)は、血漿中で発現されたmiR、および検出されなかったmiRを示す。

【図7-3】図7-3：表I I(続き)は、血漿中で発現されたmiR、および検出されなかったmiRを示す。

【図8】図8：表I I IはmiRを列記し、すべての個体からの血漿微小胞およびPBM Cにおける最も高発現の10のmiRNAを示す。

【図9】図9：表I Vは、Sanger miRBase単独(上)、またはSanger miRBaseおよびTargetScanからの共通の標的(下)を使用すると、獲得免疫系の代謝および制御に関する基準経路が、これらのmiRNAの発現により大きく制御されることを示す。

【図10-1】図10-1：表Vは、PBM C分画中では20のmiRNAが、微小胞血漿サンプルと比較して3倍の発現増加を有したこと、同様にPBM Cと比較しての血漿小胞における倍数変化(最後の列)を示す。

【図10-2】図10-2：表V(続き)は、PBM C分画中では20のmiRNAが、微小胞血漿サンプルと比較して3倍の発現増加を有したこと、同様にPBM Cと比較しての血漿小胞における倍数変化(最後の列)を示す。

【図11-1】図11-1：表V Iは、検出されたすべてのmiRに関する正規化した発現データ：ディテクターの名称、平均-MNC、標準偏差-MNC、ディテクターの名称、平均-血清、標準偏差-血清を示す。

【図11-2】図11-2(続き)：表V Iは、検出されたすべてのmiRに関する正規化した発現データ：ディテクターの名称、平均-MNC、標準偏差-MNC、ディテクターの名称、平均-血清、標準偏差-血清を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は部分的には、炎症反応に関与し、そして/または血中で発現レベルが変化している具体的なマイクロRNA(miRNA)の同定に基づく。本発明はさらに部分的には、特定の診断、予後診断、および治療の特徴と、これらのmiRNAとの関連性に基づく。

【0022】

本明細書において説明して実例を挙げたように、特定のmiRNAは、組織の障害時および/または炎症時にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる。

本明細書において互換的に使用される場合、“miR遺伝子産生物”、“マイクロRNA”、“miR”、“miR(斜体)”、または“miRNA”は、プロセシングされていないまたはプロセシングされたmiR遺伝子からのRNA転写物をいう。miR遺伝子産生物はタンパク質に翻訳されないため、“miR遺伝子産生物”という用語はタンパク質を含まない。プロセシングされていないmiR遺伝子転写物はまた、“miR前駆体”

10

20

30

40

50

とも呼ばれ、典型的には約 70 - 100 ヌクレオチド長の RNA 転写物を包含する。m i R 前駆体は、リボヌクレアーゼ（例えばダイサー、アルゴノート、RNAse III（例えば大腸菌 RNAse III））により活性な 19 - 25 ヌクレオチド RNA 分子に消化されることにより、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、“プロセシングされた” m i R 遺伝子転写物、または“成熟” m i RNA とも呼ばれる。

#### 【 0023 】

活性な 19 - 25 ヌクレオチド RNA 分子は、天然のプロセシング経路（例えばインタクトな細胞もしくは細胞可溶化液を使用して）を通して、または合成のプロセシング経路（例えば単離されたプロセシング酵素、例えば単離されたダイサー、アルゴノート、RNAse III を使用して）により、m i R 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、m i R 前駆体からプロセシングするのではなく、生物学的または化学的合成により直接合成することもできる。マイクロ RNA を本明細書においてこの名称でいう場合、別に指摘していない限り、その名称は前駆体および成熟型の双方に対応する。

#### 【 0024 】

本発明は、被験者が、微小胞が放出される障害を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを診断または予後診断する方法を包括的に含む。

当該方法は、被験者由来サンプル中の少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物のレベルを決定し、そしてサンプル中の m i R 遺伝子産生物のレベルをコントロールと比較することを包含する。本明細書において使用する場合、“被験者”は、そのような障害を有する、または有すると疑われるあらゆる哺乳類であることができる。好ましい態様において、被験者は、そのような障害を有する、または有すると疑われるヒトである。

#### 【 0025 】

少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物のレベルは、被験者から得た生体サンプルの細胞において測定することができる。

もう 1 つの態様において、サンプルは被験者から採取することができ、そして DNA は標準的な技術により抽出および単離することができる。例えばある種の態様において、サンプルは、放射線療法、化学療法、またはその他の治療処置の開始前に、被験者から入手することができる。対応するコントロールサンプル、またはコントロールリファレンスサンプル（例えばコントロールサンプルの母集団から得たもの）は、被験者の障害を受けていないサンプルから、正常なヒト個体もしくは正常な個体集団から、または被験者のサンプル中の大半の細胞に対応する培養細胞から得ることができる。その後、コントロールサンプルは被験者由来サンプルと共に処理することができ、その結果被験者のサンプル由来細胞中の所定の m i R 遺伝子から產生される m i R 遺伝子産生物のレベルを、コントロールサンプルの細胞由来の対応する m i R 遺伝子産生物のレベルと比較することができる。あるいはリファレンスサンプルを、検査サンプルとは別に（例えば別の時に）入手して処理することもでき、検査サンプル由来細胞中の所定の m i R 遺伝子から產生される m i R 遺伝子産生物のレベルを、リファレンスサンプル由来の対応する m i R 遺伝子産生物のレベルと比較することができる。

#### 【 0026 】

1 つの態様において、検査サンプル中の少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物のレベルは、コントロールサンプル中の対応する m i R 遺伝子産生物のレベルより高い（すなわち m i R 遺伝子産生物の発現は“アップレギュレート”されている）。本明細書において使用する場合、被験者由来サンプル中の m i R 遺伝子産生物の量が、コントロール（例えばリファレンススタンダード、コントロール細胞サンプル、コントロール組織サンプル）中の前記遺伝子産生物の量より多い場合、m i R 遺伝子産生物の発現は“アップレギュレート”されている。

#### 【 0027 】

もう 1 つの態様において、検査サンプル中の少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物のレ

10

20

30

40

50

ベルは、コントロールサンプル中の対応する m i R 遺伝子産生物のレベルより低い（すなわち m i R 遺伝子産生物の発現は“ダウンレギュレート”されている）。本明細書において使用する場合、被験者由来サンプル中のその遺伝子から產生される m i R 遺伝子産生物の量が、コントロールサンプル中の前記遺伝子から產生される量より少ない場合、 m i R 遺伝子産生物の発現は“ダウンレギュレート”されている。コントロールおよび正常なサンプル中の相対的な m i R 遺伝子の発現は、1つまたはそれより多くの R N A 発現スタンダードに関して決定することができる。スタンダードは、例えば m i R 遺伝子のゼロレベルの発現、スタンダードの細胞株における m i R 遺伝子の発現レベル、被験者の障害を受けていないサンプル中の m i R 遺伝子発現レベル、または正常なヒトコントロールの集団に関する先に得た m i R 遺伝子発現の平均レベル（例えばコントロールリファレンススタンダード）を包含することができる。10

#### 【 0 0 2 8 】

少なくとも1つの m i R 遺伝子産生物のレベルは、当業者に周知されている多様な技術（定量的または半定量的 R T - P C R、ノーザンプロット解析、液相ハイブリダイゼーション法）を使用して測定することができる。特定の態様において、少なくとも1つの m i R 遺伝子産生物のレベルは、被験者から得た検査サンプル由来の R N A を逆転写して、ひと組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供し、その標的オリゴデオキシヌクレオチドを1つまたはそれより多くの m i R N A 特異的なプローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて（例えば m i R N A 特異的なプローブオリゴヌクレオチドを包含するマイクロアレイ）、検査サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、そして検査サンプルのハイブリダイゼーションプロファイルを、コントロールサンプルから作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する。コントロールサンプルと比較しての検査サンプル中の少なくとも1つの m i R N A のシグナルの変化が、被験者が特定の障害を有する、またはそのリスクがあることを示す。20

#### 【 0 0 2 9 】

またマイクロアレイは、公知の m i R N A 配列から作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。アレイは、各 m i R N A に対して2つの異なるオリゴヌクレオチドプローブを含有してよく、一方は活性な成熟した配列を含有し、そして他方は m i R N A の前駆体に対して特異的なものとする。このアレイはまた、ハイブリダイゼーションのストリンジエントな条件のためのコントロールとして役立てることができるコントロール、例えばわずか数塩基しかヒトのオルソログと異なる 1 つまたはそれより多くのマウスの配列を含有してよい。双方の種由来の t R N A およびその他の R N A（例えば r R N A、m R N A）もまた、マイクロチップ上にプリントし、特異的なハイブリダイゼーションのための内部基準の、比較的安定なポジティブコントロールを提供してよい。非特異的なハイブリダイゼーションに関する1つまたはそれより多くの適当なコントロールもまた、マイクロチップ上に含めてよい。この目的に関しては配列は、いかなる公知の m i R N A といかなる相同意もないとに基づいて選択する。30

#### 【 0 0 3 0 】

マイクロアレイは、当該技術分野に公知の技術を使用して製作してよい。例えば適当な長さ、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、C 6 位で修飾された 5' - アミンとし、市販の利用可能なマイクロアレイシステム、例えば the GeneMachine Om niGrid（登録商標）100 Microarrayer および Amersham CodeLink（登録商標）活性化スライドを使用してプリントする。標的 R N A に対応する標識 c D N A オリゴマーは、標識プライマーによる標的 R N A の逆転写により調製する。最初の二本鎖の合成に続いて、 R N A / D N A ハイブリッドを変性させ、 R N A の鑄型を分解する。その後このように調製した標識した標的 c D N A を、ハイブリダイゼーションの条件下でマイクロアレイチップにハイブリダイズさせる、例えば 6 X S S P E / 3 0 % ホルムアミド、 2 5 、 1 8 時間、 続いて 0 . 7 5 X T N T 中、 3 7 で 4 0 分間洗浄する。固定化したプローブ D N A がサンプル中の相補的な標的 c D N A を認識するアレイ上の位置で、ハイブリダイゼーションが起こる。標識した標的 c D N A は、結合が起こるアレイ上の正確な位置を指示示し4050

、自動的な検出および定量を可能にする。結果はハイブリダイゼーションのイベントのリストから成り、特異的な cDNA 配列が比較的多量にあること、そしてそれ故患者サンプル中に対応する相補的 mRNA が比較的多量にあることを示す。1 つの態様に従って標識 cDNA オリゴマーは、ビオチン標識プライマーより調製されたビオチン標識 cDNA である。次に、例えば Streptavidin-Alexa64 複合体を使用してのビオチン含有転写物の直接的な検出によりマイクロアレイを処理し、従来のスキャン法を利用してスキャンする。アレイ上の各スポットの画像強度は、患者サンプル中の対応する mRNA の量と比例する。

【 0 0 3 1 】

アレイの使用は、m i R N A の発現検出についていくつかの利点を有する。第一に、数百の遺伝子の網羅的な発現を同一サンプル中で一度に同定することができる。第二に、オリゴヌクレオチドプローブの注意深いデザインを通して、成熟した分子と前駆体分子の双方の発現を同定することができる。第三に、ノーザンプロット解析と比較して、チップは少量の R N A を必要するため、2 . 5  $\mu$  g の総 R N A を使用して再現性ある結果を提供する。比較的限定された数の m i R N A (一種あたり数百) であることが、各種に関する個別のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、いくつかの種に関する共通のマイクロアレイの作成を可能にする。そのようなツールは、様々な条件下での公知の各 m i R に関する種横断的な発現の解析を可能にする。

〔 0 0 3 2 〕

具体的なmiRの定量的発現レベルのアッセイのための使用に加えて、miRNomeの実質的な部分、好ましくはmiRNome全体に対応する、miRNA特異的な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利用して、miR発現パターンの解析ためのmiR遺伝子発現プロファイリングを実行してもよい。個別のmiRシグネチャは、確立された疾患のマーカーに、または直接疾患の状態に関連させることができる。

【 0 0 3 3 】

本明細書に記載した発現プロファイリング法に従って、特定の障害を有すると疑われる被験者由来サンプルからの総RNAを、定量的に逆転写して、サンプル中のRNAに相補的なひと組の標識した標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供する。次に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包含するマイクロアレイにハイブリダイズさせて、サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供する。この結果は、サンプル中のmiRNAの発現パターンを表す、サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルである。このハイブリダイゼーションプロファイルは、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への、サンプル由来標的オリゴデオキシヌクレオチドの結合からのシグナルを包含する。プロファイルは、結合の有無（シグナル 対 ゼロシグナル）として記録してよい。より好ましく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シグナルの強度を含む。このプロファイルを、正常なコントロールサンプルまたはリファレンスサンプルから作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。シグナルの変化が、被験者における特定の障害の存在、または発症する傾向を示す。

〔 0 0 3 4 〕

miR遺伝子の発現を測定する他の技術もまた、当該分野の技術の範囲内であり、RNAの転写および分解の速度を測定するための様々な技術を含む。

本発明はまた、被験者が有害な予後を伴う特定の障害を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを診断する方法を提供する。本方法において、特定の障害の有害な予後と関連する少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物のレベルは、被験者から得た検査サンプル由来のR N Aを逆転写して、ひと組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを提供することにより測定する。次にこの標的オリゴデオキシヌクレオチドを、1つまたはそれより多くのm i R N A - 特異的プローブオリゴヌクレオチド（例えばm i R N A - 特異的プローブオリゴヌクレオチドを包含するマイクロアレイ）とハイブリダイズさせて、検査サンプルに関するハイブリダイゼーションプロファイルを提供し、そして検査サンプルハイブリダイゼーションプロファイルを、コントロールサンプルから作成されたハイブリダイゼーション

ヨンプロファイルと比較する。コントロールサンプルと相対しての検査サンプル中の少なくとも1つのm i RNAのシグナルの変化が、被験者が有害な予後を伴う特定の障害を有する、または発症するリスクがあることを示す。

【0035】

症例によっては、サンプル中の複数の異なるm i R 遺伝子産生物の発現レベルを同時に決定することが望ましいこともある。他の症例では、特定の障害に相關するすべての公知のm i R 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こともある。数百ものm i R 遺伝子または遺伝子産生物に関する具体的な発現レベルを評価することは、時間もかかり、多量の総RNA（各ノーザンプロットに関しては少なくとも20 μg）を必要とし、自動放射線撮影技術は放射性同位体を必要とする。

10

【0036】

これらの制限を克服するため、ひと組のm i R 遺伝子に対して特異的であるひと組のオリゴヌクレオチド（例えばオリゴデオキシヌクレオチド）プローブを含有する、マイクロチップフォーマット（すなわちマイクロアレイ）上のオリゴライブラリーを構成してよい。そのようなマイクロアレイを使用して、生体サンプル中の多数のマイクロRNAの発現レベルを、RNAを逆転写してひと組の標的オリゴデオキシヌクレオチドを作成し、そしてそれらをマイクロアレイ上のプローブオリゴヌクレオチドと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作成することにより、決定することができる。次に検査サンプルのハイブリダイゼーションプロファイルを、コントロールサンプルのそれと比較して、どのマイクロRNAが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。本明細書において使用する場合、“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とハイブリダイズする能力のあるオリゴヌクレオチドをいう。“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、検出される分子（例えばハイブリダイゼーションを介して）をいう。“m i R 特異的プローブオリゴヌクレオチド”または“m i R に対して特異的なプローブオリゴヌクレオチド”により、特異的なm i R 遺伝子産生物と、または特異的なm i R 遺伝子産生物の逆転写物とハイブリダイズするように選択された配列を有する、プローブオリゴヌクレオチドを意味する。

20

【0037】

特定のサンプルの“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、本質的にサンプルの状態のフィンガープリントである；2つの状態で、どれか特定の遺伝子の発現が類似していてもよく、いくつかの遺伝子を同時に評価することで、その細胞の状態に独特である遺伝子発現プロファイルの作成が可能になる。すなわち、正常なサンプルは、対応する障害提示サンプルとは識別されてよい。そのような障害提示サンプルの内で、異なる診断の状態（例えば良好なまたは悪い長期生存の見通し）が決定されてもよい。異なる状態にある障害提示サンプルの発現プロファイルを比較することにより、これら状態の各々においてどの遺伝子が重要であるか（遺伝子のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーション双方を含む）に関する情報が得られる。

30

【0038】

障害提示サンプル内で異なって発現された配列の同定、ならびに異なる予後の結果に至る異なる発現は、いくつかのやり方でのこの情報の使用することが可能になる。例えば特定の治療計画を（例えば特定の被験者における長期的予後を改善するように化学療法薬が作用するかどうかを決定するために）評価してよい。同様に、被験者由来サンプルを公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、または確立してよい。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）は、特定の障害の発現プロファイルを抑制する、または悪い予後のプロファイルをより良好なプロファイルに変換する薬剤候補物質のスクリーニングを可能にする。

40

【0039】

細胞内の1つまたはそれより多くのm i R 遺伝子産生物のレベルの変化は、結果的にこれらm i R に関する1つまたはそれより多くの意図された標的の制御を解除してしまう可

50

能性があり、そのことが特定の障害を導き得る。それ故、m i R 遺伝子産生物のレベルを（例えば障害提示細胞内でアップレギュレートされているm i Rのレベルを減少させることにより、障害提示細胞内でダウンレギュレートされているm i Rのレベルを増加させることにより）変化させることで、障害を治療することができるものと思われる。

#### 【 0 0 4 0 】

したがって本発明は、被験者の障害を治療する方法を包括的に含み、その場合被験者の細胞において少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物は制御が解除されている（例えばダウンレギュレート、アップレギュレートされている）。1つの態様において、検査サンプル中の少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物のレベルが、コントロールサンプルまたはリファレンスサンプル中の対応するm i R 遺伝子産生物のレベルより高い。もう1つの態様において、検査サンプル中の少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物のレベルが、コントロールサンプル中の対応するm i R 遺伝子産生物のレベルより低い。少なくとも1つの単離されたm i R 遺伝子産生物が検査サンプル中でダウンレギュレートされている場合、当該方法は、少なくとも1つの単離されたm i R 遺伝子産生物、または単離されたそのバリエントもしくは生物学的に活性なそのフラグメントの有効量を投与し、そして被験者体内の障害提示細胞の増殖を阻害することを包含する。

#### 【 0 0 4 1 】

例えば、あるm i R 遺伝子産生物が被験者の癌細胞内でダウンレギュレートされている場合、有効量の単離されたm i R 遺伝子産生物を被験者に投与することで、癌細胞の増殖を阻害することができる。被験者に投与する単離されたm i R 遺伝子産生物は、癌細胞内でダウンレギュレートされている内在する野生型m i R 遺伝子産生物と同一であることができ、またはそのバリエントもしくは生物学的に活性なそのフラグメントであることもできる。

#### 【 0 0 4 2 】

本明細書において定義する場合、m i R 遺伝子産生物の“バリエント”は、対応する野生型m i R 遺伝子産生物と100%より少ない同一性を有するが、対応する野生型m i R 遺伝子産生物の1つまたはそれより多くの生物的活性を保有するm i R N Aをいう。そのような生物的活性の例として、標的R N A分子の発現の阻害（例えば標的R N A分子の翻訳を阻害する、標的R N A分子の安定性を調節する、標的R N A分子のプロセシングを阻害する）、ならびに癌および/または骨髄増殖性障害と関連する細胞の過程（例えば細胞の分化、細胞の成長、細胞死）の阻害を含むが、これに限定されない。これらのバリエントには、m i R 遺伝子における種のバリエント、および1つまたはそれより多くの変異（例えば置換、欠失、挿入）の結果であるバリエントを含む。ある種の態様においてバリエントは、対応する野生型m i R 遺伝子産生物と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一である。

#### 【 0 0 4 3 】

本明細書において定義する場合、m i R 遺伝子産生物の“生物学的に活性なフラグメント”は、対応する野生型m i R 遺伝子産生物の1つまたはそれより多くの生物学的活性を保有する、m i R 遺伝子産生物のR N Aフラグメントをいう。上に記載したように、そのような生物学的活性の例として、標的R N A分子の発現の阻害、ならびに癌および/または骨髄増殖性障害と関連する細胞の過程の阻害を含むが、これに限定されない。ある種の態様において生物学的に活性なフラグメントは、少なくとも約5、7、10、12、15または17ヌクレオチド長である。特定の態様において、単離されたm i R 遺伝子産生物は、1つまたはそれより多くの付加的な抗癌治療と組み合わせて被験者に投与することができる。適切な抗癌治療には、化学療法、放射線療法、およびそれらの組み合せ（例えば放射線化学療法）を含むが、これに限定されない。

#### 【 0 0 4 4 】

癌細胞内で少なくとも1つの単離されたm i R 遺伝子産生物がアップレギュレートされている場合、当該方法は、少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物の発現を阻害し、そして障害提示細胞の増殖を阻害する化合物の有効量を、被験者に投与することを包含する。

10

20

30

40

50

そのような化合物は、本明細書においてm i R 遺伝子発現阻害化合物という。適切なm i R 遺伝子発現阻害化合物の例として、本明細書に記載したもの（例えば二本鎖R N A、アンチセンス核酸、および酵素としてのR N A分子）を含むが、これに限定されない。

【0045】

特定の態様において、m i R 遺伝子発現阻害化合物は、1つまたはそれより多くの抗癌治療と併用して被験者に投与することができる。適切な抗癌治療には、化学療法、放射線療法、およびそれらの組み合せ（例えば放射線化学療法）を含むが、これに限定されない。

【0046】

本明細書に記載したように、少なくとも1つの単離されたm i R 遺伝子産生物が癌細胞内でアップレギュレートされている場合、当該方法は、少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物の発現を阻害する少なくとも1つの化合物の有効量を被験者に投与し、そして癌細胞の増殖を阻害することを包含する。

【0047】

“治療する”、“治療すること”、“治療”という用語は、本明細書において使用する場合、疾患の症状の開始を妨げるもしくは遅らせる、および/または疾患、障害もしくは状態の症状の重症度もしくは頻度を軽減することを含む、疾患または状態、例えば癌および/またはその他の状態または障害に関連する症状を寛解させることをいう。“被験者”、“患者”および“個体”という用語は、本明細書において、動物、例えば哺乳類（靈長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、またはその他のウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、げっ歯類、もしくはネズミの種を含むがこれに限定されない）を含むものと定義する。好ましい態様において動物はヒトである。

【0048】

本明細書において使用する場合、“単離された”m i R 遺伝子産生物は、合成されたもの、またはヒトの介入により天然の状態から変化させたもしくは取り出されたものである。例えば、合成m i R 遺伝子産生物、またはその天然の状態の共存する材料から部分的にもしくは完全に分離されたm i R 遺伝子産生物は、“単離された”とみなされる。単離されたm i R 遺伝子産生物は、実質的に精製された形で存在することができ、またはm i R 遺伝子産生物が送達された細胞内に存在することができる。したがって送達可能なように送達された、または細胞内で発現されたm i R 遺伝子産生物は、“単離された”m i R 遺伝子産生物とみなされる。m i R 前駆体分子から細胞内部で産生されるm i R 遺伝子産生物もまた、“単離された”分子であるとみなされる。本発明に従って、本明細書に記載した単離されたm i R 遺伝子産生物を、被験者（例えばヒト）を治療するための医薬剤の製造のために使用することができる。

【0049】

単離されたm i R 遺伝子産生物は、いくつかの標準的な技術を使用して得ることができる。例えばm i R 遺伝子産生物は、当該技術分野で公知の方法を使用して化学的に合成する、またはリコンビナントにより産生させることができる。1つの態様においてm i R 遺伝子産生物は、適当に保護されたリボヌクレオシドホスホラミダイト、および従来のD N A / R N A シンセサイザーを使用して化学的に合成する。合成R N A 分子または合成試薬の市販供給元として、例えばProligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, U.S.A.), Pierce Chemical (Perbio Scienceの一部, Rockford, IL, U.S.A.), Glen Research (Sterling, VA, U.S.A.), ChemGenes (Ashland, MA, U.S.A.) およびCruachem (Glasgow, UK)を含む。

【0050】

あるいはm i R 遺伝子産生物は、いずれかの適切なプロモーターを使用して、リコンビナントの環状または直鎖D N A 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R N A を発現するための適切なプロモーターとして、例えばU 6 もしくはH 1 R N A p o l I I I 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。その他の適切なプロモーターの選択も当該分野の技術の範囲内である。本発明のリコンビナ

10

20

30

40

50

ントプラスミドはまた、細胞（例えば癌細胞、骨髄増殖性障害を提示する細胞）における $m_iR$ 遺伝子産生物の発現のための、誘導性プロモーターまたは制御可能なプロモーターを包含することができる。

#### 【0051】

リコンビナントプラスミドから発現させた $m_iR$ 遺伝子産生物は、標準的な技術により培養細胞発現系から単離することができる。リコンビナントプラスミドから発現させた $m_iR$ 遺伝子産生物はまた、細胞内に送達し、細胞内で直接発現させることができる。

#### 【0052】

$m_iR$ 遺伝子産生物は、別々のリコンビナントプラスミドから発現させることができ、または同一のリコンビナントプラスミドから発現させることもできる。1つの態様において $m_iR$ 遺伝子産生物は、ただ1つのプラスミドからRNA前駆体分子として発現させ、そして癌細胞内に現存するプロセシングシステムを含むがこれに限定されない適切なプロセシングシステムにより、前駆体分子を機能的な $m_iR$ 遺伝子産生物にプロセシングする。

#### 【0053】

$m_iR$ 遺伝子産生物を発現するための適切なプラスミドの選択、核酸配列をプラスミド内に挿入して遺伝子産生物を発現させる方法、およびリコンビナントプラスミドを対象の細胞に送達する方法は、当該分野の技術の範囲内である。例えば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を参照のこと。これら文献の全開示内容を本明細書において参照として援用する。例えばある種の態様において、 $m_iR$ 遺伝子産生物を発現するプラスミドは、CMV即時-早期プロモーターのコントロール下で $m_iR$ 前駆体RNAをコードする配列を包含することができる。本明細書において使用する場合、プロモーターの“コントロール下”は、 $m_iR$ 遺伝子産生物をコードする核酸配列がプロモーターの3'に位置し、その結果プロモーターが $m_iR$ 遺伝子産生物をコードする配列の転写を開始するこを意味する。

#### 【0054】

$m_iR$ 遺伝子産生物はまた、リコンビナントウイルスベクターから発現させることができる。 $m_iR$ 遺伝子産生物は、2つの別々のリコンビナントウイルスベクターから、または同一のウイルスベクターから産生させることができると考えられる。リコンビナントウイルスベクターから発現させたRNAは、標準的な技術により培養細胞発現系から単離するか、または細胞（例えば癌細胞、骨髄増殖性障害を提示する細胞）内で直接発現させるかのいずれかとすることができます。

#### 【0055】

本発明の治療法のその他の態様において、 $m_iR$ の発現を阻害する少なくとも1つの化合物の有効量を、被験者に投与することができる。本明細書において使用する場合、“ $m_iR$ の発現を阻害すること”は、治療後に $m_iR$ 遺伝子産生物の前駆体および/または活性な成熟した形の産生が、治療前に産生された量より少ないことを意味する。当業者は、例えば本明細書で考察した $m_iR$ 転写物のレベルを決定するための技術を使用して、 $m_iR$ の発現が細胞内で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、遺伝子の発現レベルで（すなわち $m_iR$ 遺伝子産生物をコードする $m_iR$ 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（例えば成熟した活性な $m_iR$ への $m_iR$ 前駆体のプロセシングを阻害することにより）起こることができる。

#### 【0056】

本明細書において使用する場合、 $m_iR$ の発現を阻害する化合物の“有効量”は、癌および/または骨髄増殖性障害に罹っている被験者における細胞の増殖を阻害するための十分量である。当業者は、所定の被験者に投与する $m_iR$ 発現阻害化合物の有効量を、因子

10

20

30

40

50

、例えば被験者のサイズおよび体重；疾患の浸透の程度；被験者の年齢、健康状態および性別；投与経路；ならびに投与が局所的または全身性であるかどうかを考慮することにより、容易に決定することができる。

【0057】

当業者はまた、m i R の発現を阻害する化合物を所定の被験者に投与するための適当な投与計画を、本明細書に記載したように容易に決定することができる。m i R 遺伝子の発現を阻害するための適切な化合物として、二本鎖RNA（例えば低分子干渉RNAまたは“s i RNA”）、アンチセンス核酸、および酵素としてのRNA分子、例えばリボザイムを含む。これらの化合物は各々、所定のm i R 遺伝子産生物を標的とし、標的m i R 遺伝子産生物の発現を（例えば翻訳を阻害することにより、開裂および/または分解を誘導することにより）妨害することができる。10

【0058】

例えば所定のm i R 遺伝子の発現は、m i R 遺伝子産生物の少なくとも一部分との、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列相同性を有する、単離された二本鎖RNA（“d s RNA”）を用いて、m i R 遺伝子のRNA干渉を誘導することにより阻害することができる。特定の態様において、d s RNA分子は“低分子干渉RNA”または“s i RNA”である。

【0059】

少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物の投与、またはm i R 発現を阻害するための少なくとも1つの化合物の投与は、癌および/または骨髄増殖性障害を有する被験者における、細胞（例えば癌細胞、骨髄増殖性障害を提示する細胞）の増殖を阻害することになる。本明細書において使用する場合、“癌細胞、または骨髄増殖性障害を提示する細胞の増殖を阻害する”ことは、細胞を死滅させる、または細胞の成長を永久にもしくは一時的に抑止もしくは遅延させることを意味する。被験者の体内のそのような細胞の数が、m i R 遺伝子産生物もしくはm i R 遺伝子発現阻害化合物の投与後に一定であるか、または減少している場合、細胞増殖の阻害を推測することができる。癌細胞または骨髄増殖性障害を提示する細胞の増殖の阻害はまた、そのような細胞の絶対数は増加していくも、腫瘍の成長速度が減少している場合にも、推測することができる。20

【0060】

m i R 遺伝子産生物またはm i R 遺伝子発現阻害化合物はまた、あらゆる適切な経腸的または非経口の投与経路により被験者に投与することができる。本方法のための適切な経腸投与経路には、例えば経口、経直腸、または経鼻による送達を含む。適切な非経口経路には、例えば血管内投与（例えば静脈内ボーラス注射、静脈内点滴、動脈内ボーラス注射、動脈内点滴、および血管内へのカテーテル滴下注入）；組織周囲および組織内への注射（例えば腫瘍周囲および腫瘍内への注射、網膜内注射、または網膜下注射）；皮下注入（例えば浸透圧ポンプによる）を含む皮下注射または皮下設置(deposition)；例えばカテーテルまたはその他の設置デバイス（例えば網膜ペレット、または座剤、または多孔質、非多孔質、もしくはゼラチンの材料を包含するインプラント）による対象組織への直接投与、；および吸入、を含む。特に適切な投与経路は、注射、注入、および腫瘍内への直接注射である。30

【0061】

m i R 遺伝子産生物またはm i R 遺伝子発現阻害化合物は、それらを被験者に投与する前に、当該分野の公知の技術に従って、時には“医薬剤”と呼ばれる医薬組成物として製剤化することができる。したがって本発明は、癌および/または骨髄増殖性障害を治療するための医薬組成物を包括的に含む。

【0062】

本医薬組成物は、少なくとも1つのm i R 遺伝子産生物またはm i R 遺伝子発現阻害化合物（またはm i R 遺伝子産生物もしくはm i R 遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも1つの核酸）（例えば0.1から90重量%）、または生理学的に受容可能なその塩を、医薬的に受容可能な担体と混合して包含する。ある種の態様において

50

30

40

50

て本発明の医薬組成物は、付加的に 1 つまたはそれより多くの抗癌薬（例えば化学療法薬）を包含する。本発明の医薬製剤はまた、リポソームおよび医薬的に受容可能な担体によりカプセル化された、少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物または m i R 遺伝子発現阻害化合物（または m i R 遺伝子産生物もしくは m i R 遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも 1 つの核酸）を包含することができる。

#### 【 0 0 6 3 】

本発明の医薬組成物はまた、従来の医薬用賦形剤および/または添加剤を包含することができる。適切な医薬用賦形剤には、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調整剤、バッファー、および pH 調整剤を含む。適切な添加剤として、例えば生理学的に生物学的適合性のあるバッファー（例えばトロメタミン塩酸塩）、キレート剤（例えば D T P A 、 D T P A - ビスマミド）もしくはキレートカルシウム複合体（例えばカルシウム D T P A 、 C a N a D T P A - ビスマミド）の添加、または所望により、カルシウム塩もしくはナトリウム塩（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）の添加を含む。本発明の医薬組成物は、液体の形での使用のために梱包することができるし、または凍結乾燥することもできる。

#### 【 0 0 6 4 】

本発明の固体医薬組成物用には、従来の非毒性の固体の医薬的に受容可能な担体；例えば医薬グレードのマンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、サッカリントリウム、タルカム、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウム、等を含むことができる。

#### 【 0 0 6 5 】

例えば経口投与用の固体医薬組成物は、上に列記した担体および賦形剤のいずれか、および 10 - 95 % 、好ましくは 25 % - 75 % の少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物または m i R 遺伝子発現阻害化合物（またはそれらをコードする配列を包含する少なくとも 1 つの核酸）を包含することができる。エアゾール（吸入）投与用の医薬組成物は、0.01 - 20 重量 % 、好ましくは 1 重量 % - 10 重量 % の、少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物または m i R 遺伝子発現阻害化合物（または m i R 遺伝子産生物もしくは m i R 遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも 1 つの核酸）を、上に記載したようなリポソーム内、および噴霧剤内に封入して包含することができる。担体はまた所望の場合には、例えば鼻腔内送達用のレシチンを含めることができる。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明の医薬組成物はさらに、1 つまたはそれより多くの抗癌薬を包含することができる。特定の態様において当該組成物は、少なくとも 1 つの m i R 遺伝子産生物または m i R 遺伝子発現阻害化合物（または m i R 遺伝子産生物もしくは m i R 遺伝子発現阻害化合物をコードする配列を包含する少なくとも 1 つの核酸）、および少なくとも 1 つの化学療法薬を包含する。本発明の方法に適する化学療法薬として、D N A - アルキル化薬、抗腫瘍性抗生物質、抗代謝薬、チューブリンの安定化剤、ホルモンのアンタゴニスト剤、トボイソメラーゼ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害薬、N M G - C o A 阻害薬、C D K 阻害薬、サイクリン阻害薬、カスパーーゼ阻害薬、メタロプロテイナーゼ阻害薬、アンチセンス核酸、三重鎖 D N A 、核酸アプタマー、ならびに分子的に修飾されたウイルス、細菌および外毒素の薬剤を含むが、これに限定されない。本発明の組成物に適する薬剤の例として、シチジンアラビノシド、メトトレキセート、ビンクリスチン、エトポシド（ V P - 16 ）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン（ C D D P ）、デキサメタゾン、アルグラビン、シクロホスファミド、サルコリシン、メチルニトロソウレア、フルオロウラシル、5 - フルオロウラシル（ 5 F U ）、ビンプラスチン、カンプトテシン、アクチノマイシン - D 、ミトマイシン C 、過酸化水素、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、カルムスチン、ストレプトゾシン、C P T - 11 、タキソール、タモキシフェン、ダカルバジン、リツキシマブ、ダウノルビシン、1 - - D - アラビノフルノシルシトシン、イマチニブ、フルダラビン、ドセタキセル、および F O L F O X 4 を含むが、これに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0067】

1つの態様において本方法は、検査薬を細胞に提供し、そして癌細胞内の減少した発現レベルに関連する少なくとも1つのm i R遺伝子産生物のレベルを測定することを包含する。適切なコントロール(例えばコントロール細胞内のm i R遺伝子産生物のレベル)と比較して、細胞内のm i R遺伝子産生物のレベルが増加することが、検査薬が抗癌薬であることを示す。

## 【0068】

適切な薬剤には、薬剤(例えば低分子物、ペプチド)、および生体高分子(例えばタンパク質、核酸)を含むが、これに限定されない。薬剤は、リコンビナントにより、合成により製造することができるが、あるいは天然の原料から単離(例えば精製)してもよい。10  
そのような薬剤を細胞に提供するための様々な方法(例えば形質導入)は、当該分野において周知されており、そのような方法のいくつかは本明細書でも上述している。少なくとも1つのm i R遺伝子産生物の発現を検出するための方法(例えばノーザンプロット法、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、当該技術分野において周知されている。これらの方法のいくつかもまた本明細書に記載する。

## 【実施例】

## 【0069】

以下の非限定的な実施例を参照することにより本発明はより理解されることと思うが、これら実施例は本発明を説明するためであって、限定するために提示する訳ではない。

本明細書のデータは、活性化された単核食細胞およびTHP-1細胞が、新たに単離された単球の生存および分化を誘導する微小胞を放出することを示す。理論に拘束されることは望まないが、発見者らは本明細書において、特定の炎症性疾患のもとでは微小胞の含有量が変化して急速に反応を誘導するのではないかと考えている。データはまた、微小胞がヒト末梢血内を循環することを示す。循環血液中の微小胞は、正常な細胞の恒常性を制御し、組織の傷害および炎症の間には遠位の細胞への指示を循環する。

## 【0070】

微小胞は、疾患の病因、および自然免疫反応の全身へのメディエーターに関するバイオマーカーとして、役立つものと思われる。したがって侵襲的でなく組織を得る代わりに、末梢血中の微小胞の単離を通して同様の情報を入手できることは、有益である。また末梢血中の微小胞の正常なシグネチャを理解することは、急性炎症イベント時のイベントを理解するための基盤を提供することにもなる。

## 【0071】

また本明細書に示したように異常なマクロファージの分化は、免疫の恒常性の破壊をきたす。単球の成熟はGM-CSFまたはM-CSFにより誘導されるため、発見者らは、GM-CSFおよびM-CSFを介した分化の機序および相違点を理解する研究に着手した。M-CSFとは異なり、GM-CSFに対する応答における分化への傾倒は、急速で非可逆的であった(データは示していない)。わずか4時間の処置でマクロファージの分化が誘導されるため、持続的なGM-CSFの刺激はこの効果に関しては必要ではなかった。同様の観察結果は、マクロファージの分化のモデルとして使用されるPMA処理したTHP1細胞においても得られた。

## 【0072】

したがって発明者らは、分化を誘導する際に、シグナルを維持するか、または他の細胞を活性化して分化させるかのいずれかである少なくとも1つの因子が分泌されると特定した。それ故、単球またはTHP1細胞を、各々GM-CSFに4時間またはPMAに1時間暴露させ、その後細胞を洗浄し、刺激物質を含まない最小培地に入れた。24時間後、培養液の上清を集め、未分化の単球またはTHP1細胞に加えた。特に、PMA処理したTHP1細胞の上清、またはGM-CSF処理した単球の上清は、単球およびTHP1細胞を分化させた(データは示していない)。

## 【0073】

培養液上清中の27種類までの異なるサイトカインを検出するためBioplex懸濁アレイ

10

20

30

40

50

システムを使用したが、発見者らは原因となるサイトカインを検出することはできなかった。発見者らは、増殖因子非依存性のT H P 1 細胞株をG M - C S F 刺激した単球の上清を用いて分化させたことから、サイトカイン/増殖因子がこの効果の原因ではないと結論した。発明者らは次に、微小胞が培養液上清中に分泌されて骨髄の成熟を仲介する可能性について調べた。

【0074】

図1に示したように、G M - C S F で24時間処理した単球は、未処理の単球（淡黒点）と比較して、培養液上清中に有意数の微小胞（黒点）を放出していた。

同様にP M A処理したT H P 1 細胞もまた、分化の間に微小胞を分泌した（データは示していない）。特に図1は、分化がマクロファージからの微小胞の放出を誘導したこと10を示す。末梢血単球（P B M）は未処理のまま（淡黒点）、またはG M - C S F で24時間処理（黒点）した。細胞を含まない上清を集め、超遠心した。小胞をP B S 中に再懸濁し、フローサイトメトリーでサイズについて解析した。解析の前に、F S S およびS S C のパラメータを、2 μ mスタンダードビーズを使用して調整した（示していない）。3名の異なるドナーからの代表的なデータを示す。

【0075】

P M A処理したT H P 1 細胞由来の微小胞を精製し、新たに単離した単球、または未分化のT H P 1 細胞のいずれかに加えた。形態的に示した（図2A - 2Cを参照のこと）ように、微小胞単独で、双方の細胞タイプにおいてマクロファージの分化、および表面抗原の発現を誘導した（データは示していない）。

【0076】

これらの微小胞の含有物を解析した。発見者らは、P M A処理したT H P 1 細胞由来微小胞内に、m i R N Aの存在を検出した（データは示していない）。

発見者らはまた、正常なボランティアの末梢血中の循環する微小胞およびm i R N Aについても評価した。サイズに基づいて、発見者らは循環血液中の微小胞の3つの亜集団を発見した（図3A）。マクロファージ由来微小胞は、マンノース受容体（C D 2 0 6）およびM H C I I を検出する抗体を使用して検出した（図3B）。血漿中の全微小胞のおよそ40%（ゲート領域）が、C D 2 0 6またはM H C I I のいずれかの発現に基づき、マクロファージに由来する（図3C）。

【0077】

発明者らはさらに、m i R N Aが末梢血微小胞内に含有されているかどうかを決定した。我々は多数のm i R N Aの発現を検出した。最も高く検出されたm i R N Aを、表I I Iを示す図8に示す（n = 51）。

【0078】

特に、m i R - 1 4 6 は末梢血中では検出されず、一方m i R - 1 5 5 の発現は最も高発現のm i R N Aの80分の1であった。m i R - 1 4 6 およびm i R - 1 5 5 の双方とも我々のI P F 患者サンプル中では上昇していたが、正常なドナー由来末梢血中では低くて検出されなかったことから、循環血液中のm i R N Aを検討することは、疾患のバイオマーカーとして役立つと思われる。

【0079】

今回本明細書において、循環血液中の微小胞はm i R N Aを含有し、そして循環血液中微小胞が、m i R N Aが細胞 - 対 - 細胞の情報交換を行うための手段を提供することができる事を示す。m i R N Aを収容する微小胞はまた、疾患の遺伝的基盤への洞察を提供することができ、予測バイオマーカーとして役立てることができる。

【0080】

またマクロファージの分化の間に放出される微小胞は、未成熟細胞の成熟を仲介することができる。マクロファージの成熟時に集められた微小胞は、ヒト単球の分化および生存を仲介し、R N Aを含有する。m i R N Aおよびプロセシングされたm R N Aの双方とも、未成熟細胞に成熟のシグナルを与える原因となる。

【0081】

10

20

30

40

50

### 実施例 - 血漿

微小胞は、正常な健康な固体の血漿から単離する。微小胞およびマッチする单核細胞の双方からRNAを単離し、リアルタイムPCRにより420の公知の成熟miRNAについてプロファイリングする。データセットの階層的クラスター解析は、末梢血单核細胞(PBMC)および血漿微小胞間のmiRNA発現における有意差を示した。

#### 【0082】

我々は、微小胞およびPBMCで有意に発現された各々104および75のmiRNAについて観察した。特に33のmiRNAは、PBMCと比較して微小胞において特異的に発現された。miRNAのコンピュータによるモデリングを行い、検出されたmiRNAにより制御される生物学的経路を決定した。血液由来微小胞で発現されたマイクロRNAの大半は、血液細胞の細胞分化および代謝経路を制御すると予測された。興味深いことに選択された数種のマイクロRNAは、免疫機能の重要なモジュレータであると予測される。

#### 【0083】

本実施例は、正常な被験者の循環血血漿の微小胞におけるmiRNAの発現を同定し定義する初めての例である。

近年のエビデンスは、細胞間のmRNAおよびmiRNAの遺伝子交換が、エキソームを介しての伝達を通して達成される可能性があることを明らかにしている (PMID:17486113)。微小胞は、正常な健常な細胞タイプ、または損傷された細胞タイプにより放出されるエンドサイトーシス由来の小さなエキソーム/小胞である (PMID: 17337785, PMID: 17409393, PMID: 16791265)。微小胞は細胞膜から細胞外環境に排出されて、細胞間の情報交換を促進する。これらの小さなサイズ (50nmから1μm) にもかかわらず、微小胞は生理活性分子内に濃縮され、核酸および/またはタンパク質を含有すると予想されている：これらの細胞粒子は、成長、分化、および癌の進行に一役を担う (PMID: 16453000)。末梢血において、2/3の微小胞は血小板に由来する。血小板由来微小胞は、血管新生および癌、例えば肺癌の転移拡大に一役を担う (PMID: 15499615)。血小板由来微小胞は、造血細胞、内皮細胞、および单核球細胞における遺伝子発現を制御することで免疫反応を誘導する (PMID: 17378242, PMID: 17127485)。

#### 【0084】

興味深いことに、微小胞とmiRNAとの関係が近年構築してきた。近年、Valadiおよび共同研究者らは、ヒトおよびマウスのマスト細胞株から放出される小胞が、1200を越えるmRNAおよびおよそ121のmiRNA分子を含有することを報告した (PMID: 17486113)。反対に本発明は、自然の状態で生成されるヒト血漿および血液の微小胞が、ex vivoで生物学的効果を導くマイクロRNAを含有していることに関する。

#### 【0085】

図8-表1は、マイクロRNAが、癌および癌以外の適用を含むヒトの疾患において重要なことを示す。ヒト血漿微小胞において、疾患組織では発現が増加するが、正常には本来の低発現または検出できない発現を伴うマイクロRNA分子 (表1、図6に示す) は、健康および疾患の変化を定義する機会を提供し、そして有効なバイオマーカーであってよい (太字、増加した発現の列)。同様に正常には豊富なマイクロRNAが、組織内で観察される減少を反映して、ヒト血漿微小胞内で減少してもよい (太字、減少した発現の列)。

#### 【0086】

かなりのエビデンスが、ヒト遺伝子系の不可避な礎石としてのmiRNAの重要性を示している。遺伝子材料を伝達するために微小胞の使用を取り入れることは、ヒト体内での有効な伝達方法となるだろう。微小胞によるmiRNAの伝達は、遠距離での情報交換を可能にすることだろう。

#### 【0087】

##### 方法

血液の採集および微小胞の単離。末梢血 (40cc) は、インフォームドコンセント後

10

20

30

40

50

24名女性および27名男性の健康な非喫煙白人ドナーから、EDTA試験管に採集した。血液の採集は、午前中および午後の早い時間のいずれかに行った。女性ドナー、ならびに男性ドナーの年齢の中央値は29歳であった。末梢血は無菌低エンドトキシンPBSで1:1希釈し、以前に記載されている(PMID: 16931806)ようにficolli-hypaque(d=1.077)上で層化し、遠心した。単核細胞画分はPBS中で1回洗浄した。微小胞は血漿から精製した。手短には小胞を160,000×g、1時間、4の遠心により濃縮した(PMID: 10648405)。

#### 【0088】

RNA抽出。トリゾール(Invitrogen, Carlsbad, CA)抽出法により、総RNAを単離した。低分子RNAの収率を上げるために、RNAを一晩沈殿させた。RNAの濃度を決定し、Agilent 2100バイオアナライザー(Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA)でのキャピラリー電気泳動によりRNAの完全性(integrity)を決定した。単核細胞から単離したRNAに関しては、9以上のRNA integrity number(RIN)のみを使用した。微小胞においてはインタクトの18sおよび28s rRNAが可変的であったため、これらのサンプルに関してはRINで制限することはできなかった。

#### 【0089】

定量的PCRによるmiRNAのプロファイリング。420の成熟ヒトmiRNAの発現を、リアルタイムPCRによりプロファイリングした。以前に公開された逆転写条件(PMID: 18158130)を使用して、420の公知のヒト成熟miRNAに対するループプライマーの混合物(MegaPlex kit, Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて刺激することにより、RNA(50ng)をcDNAに変換した。微小胞中の公知のコントロールmiRNAがないため、いくつかの内部コントロールについて検討した。内部コントロール、すなわち低分子核小体(sno)RNA U38B、snorRNA U6、低分子核(sn)RNA U6、ならびに18Sおよび5S rRNAに対するプライマーを、プライマーの混合物中に含めた。

#### 【0090】

発現は、384ウェル反応プレートを装備したApplied Biosystems 7900HTリアルタイムPCR装置を使用してプロファイリングした。液体ハンドリングロボットおよびZymak Twisterロボットを使用して、スループットを増加し、エラーを低減した。リアルタイムPCRは標準的な条件を使用して行った。

#### 【0091】

フローサイトメトリー。末梢血微小胞は、遠心により濃縮せずに直接血漿から免疫染色した。由来する細胞を決定するため、0.5ccの血漿を抗体のパネルごとに免疫染色した。パネルIは、CD66b-FITC(好中球)、CD202b(Tie2)-PE(内皮細胞)、CD206-PE-Cy5(マクロファージ/樹状細胞)、CD79a-APC(B細胞)およびCD14-PE-Cy7(単球)を認識する抗体を含有した。パネルIIは、CD41a-PE-Cy5(血小板)、CCR2-APC(単球)、CCR3-PE(樹状細胞)、CCR5-PE-Cy7(マクロファージ)、およびCD3-Alexa610(T細胞)に対する抗体を含有した。パネルIIIはアイソタイプのコントロール抗体を含有した。サンプルはBD Ariaフローサイトメーター(BD Biosciences San Jose, CA)で解析した。データはゲートされた細胞のパーセントとして表した。

#### 【0092】

統計解析。バックグラウンドのノイズを低減するため、個々の観察結果の80%が35より高いCT生スコアを有したmiRNAは、データ解析時に除外した。内部コントロール(18S、5S、snorRNA U38B、snorRNA U43、およびsnRNA U6)は血漿微小胞においては非常に可変的であり、同様に血漿微小胞対末梢血単核細胞(PBMC)における発現レベルも有意に異なった。

#### 【0093】

したがって、あるmiRNAを正規化補正因子として使用することに起因するバイアスを低減し、そしてRT-PCRアレイ間のサンプルの変動を低減するため、median norma

10

20

30

40

50

lization(中央値による正規化)解析を使用して、各アレイ上のm i R N A全体の発現に対する相対的発現に基づいて、血漿微小胞およびP B M C間でm i R N Aを比較した(PM ID: 16854228)。ドナーの性別および年齢をコントロールし、線形混合モデルを使用して、血漿微小胞およびP B M C間での特異的なm i R N Aの差を見積もった。倍数変化は、見積もられた平均の差に基づいて算出した。

#### 【0094】

各組織に関するフィルタリング基準を満たしたm i R N Aを使用してヒートマップを作成し、m i R N Aの相対的発現の平均に基づいて、m i R N Aの階層的クラスタリングを行った。m i R N Aの発現はまた、血漿微小胞およびP B M Cに関するそれらのC生スコアに基づいてランクづけした。さらなる統計解析、例えばA N O V Aを行って、2つの処理群間で有意に発現されているm i R N Aを決定した。

10

#### 【0095】

経路の解析および予測。予測されるm i R N Aの標的は、miRanda (microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/)を使用して決定した。miRandaアルゴリズムに基づき、各標的についてスコアを作成し、17より大きいスコアのみをIngenuity Pathway Analysis ソフトウェア(Ingenuity Systems, Redwood City, CA)を使用してさらに解析した。このソフトウェアを使用して、基準の経路をm i R N Aの標的にに基づいて決定した。データセットを検討して、m i R N Aの標的の遺伝子オントロジーに基づいて関連する経路を決定した。

#### 【0096】

##### 結果

20

##### 末梢血微小胞の亜集団

最初に、正常な健康な被験者の末梢血中の微小胞の由来細胞を検討した。フローサイトメトリーを使用して、以前に報告された(PMID: 10648405)ように末梢血微小胞の大半が血小板由来であることを発見した(図4)。

#### 【0097】

我々はまた、単核細胞食細胞系列に由来する微小胞の第二の大きな集団についても観察した。単核食細胞上の表面抗原を検出する抗体を用いて、この集団を免疫染色した。特にわずかなパーセントの末梢血微小胞だけしか、T細胞および好中球に由来していなかった。B細胞に由来する小胞は検出できなかった(データは示していない)。興味深いことに、内皮細胞由来の表面抗原を発現する微小胞の小さな亜集団を検出した。

30

#### 【0098】

##### 血漿微小胞およびP B M Cにおけるm i R N Aの発現

m i R N Aが、末梢血中の微小胞内コンパートメントに含有されていて、体内の異なる組織間の情報伝達を可能にし、遺伝子の変化に影響を及ぼすかどうかを検査するため、精製した血漿由来微小胞に関するm i R N Aプロファイリングを行った。27名男性および24名女性を包含する51名の非喫煙の健康な個体に由来する微小胞のすべての亜集団について解析した。微小胞およびP B M C間でm i R N Aの発現に違いがあるかどうかを決定するため、各ドナー由来P B M Cもまた精製した。リアルタイムP C R解析を行って、420のm i R N Aの発現について検討した。フィルタリングしたデータに、P B M Cおよび血漿サンプル間のm i R N A発現プロファイルを比較する階層的クラスター解析を行った(図5A)。

40

#### 【0099】

3つを除くすべてのP B M Cサンプルを、微小胞サンプルとは別にクラスター化したところ、2群間のm i R N A発現プロファイルが有意に異なることを示した。バックグラウンドのノイズを低減するフィルタリング基準に基づくと、微小胞およびP B M Cサンプルにおいて各々104および75のm i R N Aが発現されていることを発見した(図5Bおよび5C)。

#### 【0100】

これらのm i R N Aのうち、71は各サンプル群で共有していた(図5D)。特に、2つのm i R N A、すなわちm i R - 031および29cのみがP B M Cサンプル中だけで

50

発現され、一方4つのmiRNA (miR-127、-134、-485-5p、および-432) は血漿画分において独自に発現されていた。血漿中で正常に発現された104 miRNAすべてを示す(表II、図7に示す)。

#### 【0101】

##### 年齢および性別の効果

いざれかのサンプル群からのmiRNA発現において、年齢および/または性別の効果は観察できなかった。特に、女性および男性双方のドナーの年齢の中央値は29歳であった。最も高年齢の個体は58歳であり、最も若年齢は21歳であった。したがって差異を検討するためさらにデータを層別化した。年齢のマッチしたサンプル間の検討でも、PBMCおよび微小胞サンプル間でmiRNA発現にいかなる有意な効果も明らかにされなかった。性別をコントロールして、我々はまた年齢の上位四分位点を年齢の下位四分位点と比較した。すなわち各群の平均年齢は各々48.9±6.2歳および21.9±1.2歳であった。しかし年齢に基づいてのサンプルセット間で、miRNA発現に有意差を検出することはできなかった(データは示していない)。

#### 【0102】

##### PBMCおよび微小胞におけるmiRNA発現の比較

表II、図8に、すべての個体に由来する血漿微小胞およびPBMCにおいて、最も高発現の10のmiRNAを示す。血漿に関する最も高発現の10のmiRNAは、高い方から順にmiR-223、-484、-191、-146a、-016、-026a、-222、-024、-126、および-32である。一方PBMCにおいては、miR-223、-150、-146b、-016、-484、-146a、-191、-026a、-019b、および-020aが高く発現されていた。微小胞における最も高発現の10のmiRNAは、100%の個体で検出された。しかしPBMCサンプルでは、miR-150(98%のドナー)およびmiR-484(89%のドナー)を除くすべてが100%の個体で観察された。

#### 【0103】

我々はまた、これらmiRの6つ(miR-223、miR-484、miR-191、miR-146a、miR-26a、およびmiR-16)が、PBMCおよび微小胞の双方において最も高発現の10で共有されていることを発見した。特にmiR-223は、双方のコンパートメント内で最も顕著に発現されたmiRである。各個体のドナーのランキング解析に基づいて、具体的なmiRNAが最も高発現の10のmiRNAに挙げられる頻度を決定したところ、miR-223はPBMCおよび微小胞の双方において100%の頻度であった。miR-486の発現は、血漿微小胞で最も高い10のmiRNAに挙げられているにもかかわらず、このmiRNAは、プロファイリングした個体の20%のみでしか最も高い10に挙げられていないことを発見した。興味深いことに血漿微小胞において最も高発現のmiRNA群は、組織特異的なmiR群として同定できなかった。

#### 【0104】

我々はさらに、各々>66%および>88%という任意の値(データセットからのnatural cut-off)より大きなランクスコアを持つ、微小胞およびPBMCのmiRの集合的機能について検討した。この基準に基づいて、微小胞およびPBMCのサンプルから最も高い9にランクされたmiRについて、さらに検討した。したがって、血漿で見出されたmiR-223、-484、-191、-146a、-016、-026a、-222、-024、および-126の組み合わせた機能を解析した。PBMCに関しては、以下のmiRNA、すなわちmiR-223、-150、-146b、-016、-484、-146a、-191、-026a、および-019bの組み合わせた機能を検討した。Sanger miRBase Target version 5を使用して、血漿微小胞に関する組み合わせたmiRの、1578の予測される標的を見出した(データは示していない)。これらの組み合わせの標的についてコンピュータ解析を行って、それらが集合的に制御する経路を決定した。Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを使用し、獲得免疫系の代謝および

10

20

30

40

50

制御に関する基準の経路が、m i R N A で示されたこれらの発現により大きく制御されることを発見した（表 I V、図 9 の上に示す）。

#### 【 0 1 0 5 】

P B M C 画分から検討した 9 の m i R N A について、1 8 5 7 の予測される m R N A の標的を見出した（データは示していない）。最終的にこれらの m i R N A により制御される最も高い 5 の基準の経路は、とりわけ様々なアミノ酸および脂質の代謝経路である（表 I V、図 9 の上に示す）。我々はまた Sanger miRBase および TargetScan から共通して予測される標的を見出し、それらの機能を決定した（表 I V、図 9 の下に示す）。

#### 【 0 1 0 6 】

次に、微小胞および P B M C 間でどの m i R N A が異なって発現されたかについて検討した。2 0 の m i R N A が、微小胞サンプルと比較して P B M C 画分において 3 倍より高く発現された（表 V、図 1 0 に示す）。反対に、1 5 の m i R N A は、P B M C と比較して血漿微小胞において有意に発現されていた。

#### 【 0 1 0 7 】

図 1 1 : 表 V I は、P B M C および 血漿において発現されたすべての m i R N A ( ディテクターの名称 ) に関する、正規化したデータの平均を各々の標準偏差と共に示す。

#### 考察

これらの実施例において、発見者らは今回、末梢血中の正常な恒常的状態下で m i R が微小胞内にて循環することを示す。本明細書において、1 0 4 の m i R が血漿微小胞内で発現され、そして m i R の発現は P B M C とは有意に異なっていたことを示す。今日までに多数の研究が、多くの細胞の機能を制御する m i R の能力を示している。しかしながらこれらの研究はほとんど、m i R がそのホスト細胞内にとどまって効果を及ぼすことを意味している (PMID: 17923084)。我々のデータは、微小胞内に含有された m i R N A が、細胞の恒常性を制御するための遠位の細胞への情報伝達シグナルであると思われることを示すものである。

#### 【 0 1 0 8 】

微小胞内のこれらの m i R N A は、異なる組織の標的へと循環すると思われる。血漿微小胞内で最も高発現された m i R N A のさらなる検討は、これらの機能の多くが血球新生および細胞分化プログラムを制御することを示す（表 I I I 、図 8 に示す）。例えば m i R - 2 2 3 の発現は、骨髄、顆粒球、および破骨細胞の分化を制御する (PMID: 18278031, PMID: 17471500, PMID: 16325577)。m i R - 2 2 3 はまた造血幹細胞の増殖に一役を担っているようである (PMID: 18278031)。興味深いことに m i R - 2 2 3 は、急性骨髄性白血病 ( A M L ) では喪失される (PMID: 18056805)。反対に m i R - 1 2 6 のダウンレギュレーションは巨核球の分化時に起こる (PMID: 16549775)。特に m i R - 2 4 の発現は、血球新生の強力なポジティブおよびネガティブ制御因子である T G F - ににより制御される (PMID: 16123808, PMID: 18353861)。微小胞内で発現される m i R - 2 4 および m i R - 1 6 は双方とも赤血球の産生を制御する (PMID: 17906079, PMID: 17976518) が、一方 m i R - 1 6 はリンパ系の発生もまた調節する (PMID: 16616063)。m i R - 1 6 の発現の喪失は、慢性リンパ性白血病 ( C L L ) において広範に検討されている (PMID: 17327404, PMID: 17351108)。

#### 【 0 1 0 9 】

血漿微小胞内で発現される多くの m i R はまた、細胞周期の進行にかかわるタンパク質を制御する (PMID: 18365017 PMID: 17914108)。m i R - 2 2 2 は p 2 7 K i p 1 を標的とし (PMID: 17914108)、一方 m i R - 2 4 は p 1 6 ( I N K 4 a ) を抑制する (PMID: 18365017)。m i R - 1 6 の増加された発現は、結果的に細胞周期 G 0 / G 1 期に細胞を蓄積することになる (PMID: 16123808)。反対に乳癌細胞における m i R - 1 2 6 の発現は細胞の増殖および腫瘍の成長を増大するが、転移を阻害する (PMID: 18185580)。このことは血管細胞接着分子 - 1 ( V C A M 1 ) を通して起こる (PMID: 18227515)。

#### 【 0 1 1 0 】

他の m i R が血漿微小胞内で高発現されるのとは異なり、m i R - 1 4 6 a は異なるレ

10

20

30

40

50

ペルで機能するようである。*miR-146a*は腫瘍抑制因子として作用し、この*miR*の喪失は前立腺癌の発症と関連することが示唆された (PMID: 18174313) が、*miR-146a*は免疫機能もまた調節する (PMID: 16885212, PMID: 18057241)。血漿微小胞におけるこの*miR*の発現が、免疫制御機能を定義する可能性がある (表IV、図9に示す)。

#### 【0111】

標的の遺伝子オントロジーを検討するIPA解析に基づくと、*miR-146a*の発現により影響を受けると予測される最大の関連ネットワークは、細胞の増殖、免疫系およびリンパ系の発生および機能である。加えてこの*miR*は、自然免疫反応を制御すると予測されている。この解析から我々は、LPS/IL-1およびトール様受容体のシグナリングが、この*miR-146a*により制御されると予測される最も高い5の基準経路の中にあることを発見した。

#### 【0112】

今日まで*miR-484*または*miR-486*の機能はわかっていない。*miR-146a*と同様に、*miR-484*および*miR-486*も免疫反応のモジュレータとして機能するようである。特に*miR-484*は、相対的発現に基づくと微小胞画分において2番目に高く発現された*miR*である。予測モデリングは、この*miR*が複数の機能を有することを示している。微小胞内で発現された多くの他の*miR*の様に、*miR-484*は血球新生を制御すると予測される。特に、NK細胞シグナリング経路およびIL-4シグナリング経路が、*miR-484*の標的であると予測されるが、一方*miR-484*は抗原提示を制御すると提唱されている。加えて*miR-486*は、細胞の分化、増殖および成長も制御するようである。

#### 【0113】

我々は血漿微小胞内に104の*miR*を検出したが、プロファイリングした全*miR*から検出できなかったものも多い。血漿微小胞内の検出できなかった*miR*もまた、疾患のバイオマーカーとして役立つかもしれない。近年Lawrieらは、B細胞リンパ腫の患者の血漿中に*miR*が検出されたことを報告した (PMID: 18318758)。この研究は、これらの患者由来血漿中で*miR-155*、*miR-210*および*miR-21*が上昇し、そして*miR-21*が再発に相關することを示した。この研究に基づき、我々は正常な個体において*miR-155*および*miR-21*を検出したが、*miR-210*は発見できなかった。興味深いことに我々は、血漿において75%の個体が*miR-155*を発現し、60%が*miR-21*を発現することを発見した (データは示していない)。

#### 【0114】

したがって、疾患の予測マーカーとしてこれらの*miR*を使用するためには、各個体は疾患の検出の前にベースラインを必要とすることになる。したがって*miR-210*の発現は、B細胞リンパ腫のより良いマーカーとして役立つものと思われる。さらなる関連性も存在すると思われる。例えば*miR-203*は血漿微小胞には検出できない。この*miR*の上昇した発現は膀胱癌および結腸腺癌と関連しており、したがってバイオマーカーとして使用できると思われる (PMID: 18230780, PMID: 17826655)。

#### 【0115】

正常には発現されるがその後疾患にともなって喪失されるという逆の関係も、血漿*miR*に関して存在すると思われる。例えば急性リンパ芽球性白血病 (ALL)において、*miR-223*はダウンレギュレートされる (PMID: 18056805)。*miR-223*は血漿微小胞内で発現される最も顕著な*miR*であるため、その減少した発現はALLの診断マーカーとして有用であると思われる。加えて*miR-15a/16*は、慢性リンパ球性白血病 (CLL) では喪失またはダウンレギュレートされる (PMID: 18362358)。我々は、*miR-16*は検討したすべての健常な個体で発現されていたことを発見したが、*miR-15a*はプロファイリングした個体の44%にしか発現されていなかった (データは示していない)。

#### 【0116】

10

20

30

40

50

我々が正常な個体の血液中に組織特異的なm i R N Aを検出しなかったことは興味深い(PMID: 18025253)。正常な個体からの微小胞の大半は、血液細胞に由来する。我々は、わずかなパーセントの内皮細胞由来の微小胞を実際に検出した。この内皮細胞由来微小胞は、内皮細胞の損傷時に増加すると思われる。同様に、末梢血中の組織特異的m i R および微小胞の検出は、組織損傷時にしばしば起こるイベントであると思われる。腫瘍は微小胞を産生する(PMID: 16283305)ため、これらが末梢血中に検出されてもよい。

#### 【0117】

m i R が血漿中で検出されることが報告された(PMID:18318758)が、本発明は公知の血漿由来m i R すべての特徴づけを行った最初の研究である。本研究において我々は、人種を因子としてコントロールした。

10

#### 【0118】

末梢の体液および/または血液中のm i R の存在、不在、またはレベルの変化を検査することは、様々な疾患について検討し、独特のm i R N A プロファイルを同定し、そして疾患の予測因子であるバイオマーカーとして、有用となり得る。微小胞内に含有される循環血液中のm i R は、血液細胞の恒常性の産生ならびに代謝機能を制御する上での、生命維持機能を有する。

#### 【0119】

明確に参照として援用しなかった本明細書に引用したすべての公開文献の関連技術を、それらの全内容において本明細書にて参照として援用する。本発明は、その好ましい態様に関して特に示し記載してきたが、当業者には、付記した請求項に包括的に含まれる本発明の範囲から離れることなく、形および詳細における様々な変更を行ってよいことは、理解されるものとする。

20

#### 【0120】

本発明を様々なそして好ましい態様に関して記載してきたが、当業者には、本発明の本質的な範囲から離れることなく、その要素について様々な変更を行ってよく、そして均等物を置き換えてよいことは、理解されなければならない。加えて、特定の状況または材料を本発明の技術に適応するために、本発明の本質的な範囲から離れることなく、多くの修飾を行ってよい。それ故本発明は、本発明を実行するために考慮された本明細書に開示された特定の態様に限定されないが、本発明は請求項の範囲内に収まるすべての態様を含むものとすることを意図する。

30

#### 【0121】

対象のm i R は公開データベースに列記されている。ある種の好ましい態様において、公開データベースは、m i R 配列に命名の割り付けが行われ、同様に世界中のウェブサイトを介して到達でき、オンライン検索できるデータベース内の配列の保管場所であるSanger研究所[www.http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/](http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/)により提供される中心的レポートリであることができる。一般にSanger研究所によりm i R の配列について集められたデータは、種、原料、対応するゲノム配列およびゲノムの位置(染色体の座標)、ならびに完全長の転写産生物、および成熟した完全にプロセシングされたm i R N A (5'末端リン酸基を有するm i R N A )の配列を含む。もう1つのデータベースとして、アメリカのthe National Institutes of Health(国立衛生研究所)およびthe National Library of Medicine(国立医学図書館)により維持管理されている、National Center for Biotechnology Information (NCBI: 国立生物工学情報センター)のウェブサイトを通してアクセスするGenBankデータベースが可能である。これらのデータベースをすべて本明細書において参照として援用する。

40

#### 【0122】

【表1】

表VII-1

miR *低レベルで 機能のわからぬ 生合成副産物	m i R 塩基 成熟配列 アクセション#	成熟配列	SEQ ID NO
hsa-let-7a*	MIMAT0004481	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	1
hsa-let-7a-1	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	2
hsa-let-7a-2	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	3
hsa-let-7a-3	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	4
hsa-let-7b	MIMAT0000063	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	5
hsa-let-7b*	MIMAT0004482	CUAUACAAACCUACUGCCUUCCC	6
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGGUU	7
hsa-let-7c*	MIMAT0004483	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA	8
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	9
hsa-let-7d*	MIMAT0004484	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	10
hsa-let-7e	MIMAT0000066	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	11
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	CUAUACGGCCUCCUAGCUUCC	12
hsa-let-7f-1	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	13
hsa-let-7f-1*	MIMAT0004486	CUAUACAAUCUAUUGCCUUCCC	14
hsa-let-7f-2	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	15
hsa-let-7f-2*	MIMAT0004487	CUAUACAGCUACUGUCUUCC	16
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	17
hsa-let-7g*	MIMAT0004584	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC	18
hsa-let-7i	MIMAT0000415	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	19
hsa-let-7i*	MIMAT0004585	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU	20
hsa-mir-009-1	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	21
hsa-mir-009-1*	MIMAT0000442	AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU	22
hsa-mir-009-2	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
hsa-mir-009-3	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	24
hsa-mir-010a	MIMAT0000253	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	25
hsa-mir-010a*	MIMAT0004555	CAAAUUCGUACUAGGGGAAUA	26
hsa-mir-015a	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	27
hsa-mir-015b	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	28
hsa-mir-015b*	MIMAT0004586	CGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUA	29
hsa-mir-016-1	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	30
hsa-mir-016-1*	MIMAT0004489	CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA	31
hsa-mir-016-2	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	32
hsa-mir-016-2*	MIMAT0004518	CCAAUAAUACUGUGCUGCUUUA	33
hsa-mir-017-3-p	MIMAT0000071	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	34
hsa-mir-017-5-p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	35
hsa-mir-018a	MIMAT0000072	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	36
hsa-mir-018a*	MIMAT0002891	ACUGCCUAAGUGCUCCUUCUGG	37
hsa-mir-019a	MIMAT0000073	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	38
hsa-mir-019b-1	MIMAT0000074	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	39
hsa-mir-019b-1*	MIMAT0004491	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	40
hsa-mir-019b-2	MIMAT0000074	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	41

【0 1 2 3】

【表2】

表V I I - 2

hsa-mir-019b-2*	MIMAT0004492	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUCA	42
hsa-mir-020a	MIMAT0000075	UAAAGUGCUUAUAGUGGCAGGUAG	43
hsa-mir-020a*	MIMAT0004493	ACUGCAUUAUGAGCACUUAAG	44
hsa-mir-020b	MIMAT0001413	CAAAGUGCUCAUAGUGGCAGGUAG	45
hsa-mir-021	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	46
hsa-mir-021*	MIMAT0004494	CAACACCAAGUCGAUGGGCUGU	47
hsa-mir-023a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	48
hsa-mir-023a*	MIMAT0004496	GGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUU	49
hsa-mir-023b	MIMAT0004587	UGGGUUCCUGGCAGCUAGCUAUUU	50
hsa-mir-024-1	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	51
hsa-mir-024-1*	MIMAT0000079	UGCCUACUGAGCUGAUACAGU	52
hsa-mir-024-2	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	53
hsa-mir-024-2*	MIMAT0004497	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	54
hsa-mir-025	MIMAT0000081	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	55
hsa-mir-025*	MIMAT0004498	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG	56
hsa-mir-026a-1	MIMAT0000082	UUCAAGUAUCCAGGAUAGGU	57
hsa-mir-026a-1*	MIMAT0004499	CCUAUUCUUGGUACUUGCACG	58
hsa-mir-026a-2	MIMAT0000082	UUCAAGUAUCCAGGAUAGGU	59
hsa-mir-026a-2*	MIMAT0004681	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	60
hsa-mir-026b	MIMAT0000083	UUCAAGUAUUCAGGAUAGGU	61
hsa-mir-026b*	MIMAT0004500	CCUGUUCUCCAUACUUGGCUC	62
hsa-mir-027a	MIMAT0000084	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	63
hsa-mir-027a*	MIMAT0004501	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	64
hsa-mir-027b	MIMAT0000419	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	65
hsa-mir-027b*	MIMAT0004588	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	66
hsa-mir-028-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	67
hsa-mir-028-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	68
hsa-mir-029a	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	69
hsa-mir-029a*	MIMAT0004503	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	70
hsa-mir-029b-1	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	71
hsa-mir-029b-1*	MIMAT0004514	GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGA	72
hsa-mir-029b-2	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	73
hsa-mir-029b-2*	MIMAT0004515	CUGGUUUCACAUUGGUGGCUUAG	74
hsa-mir-029b-3	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	75
hsa-mir-029c	MIMAT0000681	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	76
hsa-mir-030a	MIMAT0000087	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG	77
hsa-mir-030a*	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	78
hsa-mir-030b	MIMAT0000420	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	79
hsa-mir-030b*	MIMAT0004589	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	80
hsa-mir-030c-1	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	81
hsa-mir-030c-2	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	82
hsa-mir-030c-2*	MIMAT0004550	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU	83
hsa-mir-030d	MIMAT0000245	UGUAAACAUCCCCACUGGAAG	84
hsa-mir-030d*	MIMAT0004551	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC	85
hsa-mir-031	MIMAT0000089	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	86
hsa-mir-031*	MIMAT0004504	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU	87

【0 1 2 4】

【表3】

表V I I - 3

hsa-mir-032	MIMAT0000090	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA	88
hsa-mir-032*	MIMAT0004505	CAAUUAGUGUGUGUAUUU	89
hsa-mir-034a	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	90
hsa-mir-034a*	MIMAT0004557	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU	91
hsa-mir-092a-1	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCCGGCCUGU	92
hsa-mir-092a-1*	MIMAT0004507	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU	93
hsa-mir-093	MIMAT0000093	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	94
hsa-mir-093*	MIMAT0004509	ACUGCUGAGCUAGCACUUCCCG	95
hsa-mir-095	MIMAT0000094	UUCAACGGGUAUUUUUGAGCA	96
hsa-mir-096	MIMAT0000095	UUUGGCACUAGCACAUUUUGCU	97
hsa-mir-096*	MIMAT0004510	AAUCAUGUGCAGUGCCAAUAG	98
hsa-mir-098	MIMAT0000096	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	99
hsa-mir-099b	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	100
hsa-mir-099b*	MIMAT0004678	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG	101
hsa-mir-100	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	102
hsa-mir-100*	MIMAT0004512	CAAGCUUGUAUCUAUAGGUAUG	103
hsa-mir-103-1	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	104
hsa-mir-103-2	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	105
hsa-mir-105-1	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	106
hsa-mir-105-1*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	107
hsa-mir-105-2	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	108
hsa-mir-105-2*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	109
hsa-mir-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	110
hsa-mir-106a*	MIMAT0004517	CUGCAAUGUAAGCACUUUCUAC	111
hsa-mir-106b	MIMAT0000680	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	112
hsa-mir-106b*	MIMAT0004672	CCGCACUGUGGUACUUGCUGC	113
hsa-mir-107	MIMAT0000104	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA	114
hsa-mir-122	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	115
hsa-mir-122*	MIMAT0004590	AACGCCAUUAUCACACUAAAUA	116
hsa-mir-125a-3p	MIMAT0004602	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC	117
hsa-mir-125a-5p	MIMAT0000443	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	118
hsa-mir-125b-1	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	119
hsa-mir-125b-1*	MIMAT0004592	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	120
hsa-mir-125b-2	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	121
hsa-mir-125b-2*	MIMAT0004603	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	122
hsa-mir-126	MIMAT0000445	UCGUACCGUGAGUAUAU AUGCG	123
hsa-mir-126*	MIMAT0000444	CAUUAUACUUUUGGUACGCG	124
hsa-mir-127-3p	MIMAT0000446	UCGGAUCCGUCUGAGCUUUGGCU	125
hsa-mir-127-5p	MIMAT0004604	CUGAACGUCAGAGGGCUCUGAU	126
hsa-mir-128-1	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	127
hsa-mir-128-2	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	128
hsa-mir-130a	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU	129
hsa-mir-130a*	MIMAT0004593	UUCACAUUGUGCUACUGUCUGC	130
hsa-mir-130b	MIMAT0000691	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	131
hsa-mir-130b*	MIMAT0004680	ACUCUUUCCCCUGUUGGCACUAC	132
hsa-mir-132	MIMAT0000426	UAACAGUCUACAGCCAUGGUUG	133

【0 1 2 5】

【表4】

表V I I - 4

hsa-mir-132*	MIMAT0004594	ACCGUGGCCUUUCGAUUGUUACU	134
hsa-mir-133a-1	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	135
hsa-mir-133a-2	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	136
hsa-mir-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	137
hsa-mir-134	MIMAT0000447	UGUGACUGGUUGACCAGAGGG	138
hsa-mir-135b	MIMAT0000758	UAUGGCUUUCAUCCUAUGUGA	139
hsa-mir-135b*	MIMAT0004698	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG	140
hsa-mir-140-3p	MIMAT0004597	UACCACAGGGUAGAACACCG	141
hsa-mir-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUACCCUAUGGUAG	142
hsa-mir-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	143
hsa-mir-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAGUAGAAAGCACUACU	144
hsa-mir-143	MIMAT0000435	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	145
hsa-mir-143*	MIMAT0004599	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU	146
hsa-mir-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUUUCCAGGAUCCU	147
hsa-mir-145*	MIMAT0004601	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU	148
hsa-mir-146a	MIMAT0000449	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	149
hsa-mir-146a*	MIMAT0004608	CCUCUGAAAUUCAGUUCUCAG	150
hsa-mir-146b-3p	MIMAT0004766	UGCCCUGUGGACUCAGUUCUGG	151
hsa-mir-146b-5p	MIMAT0002809	UGAGAACUGAAUCCAUGGCU	152
hsa-mir-147	MIMAT0000251	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC	153
hsa-mir-148a	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	154
hsa-mir-148a*	MIMAT0004549	AAAGUUUCUGAGACACUCCGACU	155
hsa-mir-148b	MIMAT0000759	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	156
hsa-mir-148b*	MIMAT0004699	AAGUUUCGUUAUACACUCAGGC	157
hsa-mir-149	MIMAT0000450	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCC	158
hsa-mir-149*	MIMAT0004609	AGGGAGGGACGGGGCUGUGC	159
hsa-mir-150	MIMAT0000451	UCUCCCAACCUUGUACCAGUG	160
hsa-mir-150*	MIMAT0004610	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG	161
hsa-mir-151-3p	MIMAT0000757	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	162
hsa-mir-151-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGGCUCACAGCUAGU	163
hsa-mir-155	MIMAT0000646	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	164
hsa-mir-155*	MIMAT0004658	CUCCUACAUUUAGCAUUAACA	165
hsa-mir-181a-1	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	166
hsa-mir-181a-1*	MIMAT0000270	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	167
hsa-mir-181a-2	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	168
hsa-mir-181a-2*	MIMAT0004558	ACCACUGACCGUUGACUGUACC	169
hsa-mir-181b-1	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	170
hsa-mir-181b-2	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	171
hsa-mir-181d	MIMAT0002821	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	172
hsa-mir-182	MIMAT0000259	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACU	173
hsa-mir-182*	MIMAT0000260	UGGUUCUAGACUUGCCAACUA	174
hsa-mir-183	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	175
hsa-mir-183*	MIMAT0004560	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUA	176
hsa-mir-185	MIMAT0000455	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA	177
hsa-mir-185*	MIMAT0004611	AGGGGCUGGCUUUCCUCUGGUC	178
hsa-mir-186	MIMAT0000456	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	179

【0 1 2 6】

【表5】

表VII-5

hsa-mir-186*	MIMAT0004612	GCCCCAAGGUGAAUUUUUUGGG	180
hsa-mir-190	MIMAT000458	UGAUUAUGUUUGAUUAUUAUGGU	181
hsa-mir-191	MIMAT000440	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	182
hsa-mir-191*	MIMAT0001618	GCUGCGCUUGGAUUCGUCCCC	183
hsa-mir-192	MIMAT000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	184
hsa-mir-192*	MIMAT0004543	CUGCCAAUCCAUAGGUACAG	185
hsa-mir-193a-3p	MIMAT000459	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	186
hsa-mir-193a-5p	MIMAT0004614	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	187
hsa-mir-193b	MIMAT0002819	AACUGGCCUCAAAAGUCCCAGU	188
hsa-mir-193b*	MIMAT0004767	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA	189
hsa-mir-195	MIMAT000461	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	190
hsa-mir-195*	MIMAT0004615	CCAAUAIJUGGCUGUGCUGCUCC	191
hsa-mir-196a*	MIMAT0004562	CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG	192
hsa-mir-196a-1	MIMAT000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	193
hsa-mir-196a-2	MIMAT000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	194
hsa-mir-196b	MIMAT0001080	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	195
hsa-mir-197	MIMAT000227	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	196
hsa-mir-198	MIMAT000228	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	197
hsa-mir-199a-3p	MIMAT000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	198
hsa-mir-199a-5p	MIMAT000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUUC	199
hsa-mir-199a-5p	MIMAT000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUUC	200
hsa-mir-199b-3p	MIMAT0004563	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	201
hsa-mir-199b-5p	MIMAT000263	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	202
hsa-mir-200a	MIMAT000682	UAACACUGUCUGGUACAGGAUGU	203
hsa-mir-200a*	MIMAT0001620	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA	204
hsa-mir-200b	MIMAT000318	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	205
hsa-mir-200b*	MIMAT0004571	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	206
hsa-mir-200c	MIMAT000617	UAAUACUGCCGGUAUGAUGGA	207
hsa-mir-200c*	MIMAT0004657	CGUCUUACCCAGCAGGUUUGG	208
hsa-mir-203	MIMAT000264	GUGAAAUGUUUAGGACACUAG	209
hsa-mir-204	MIMAT000265	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	210
hsa-mir-205	MIMAT000266	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	211
hsa-mir-210	MIMAT000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	212
hsa-mir-213	MIMAT000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	213
hsa-mir-214	MIMAT000271	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	214
hsa-mir-214*	MIMAT0004564	UGCCUGUCUACACUUGCUGGC	215
hsa-mir-216a	MIMAT000273	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	216
hsa-mir-216b	MIMAT0004959	AAAUCUCUGCAGGCAAUGUGA	217
hsa-mir-217	MIMAT000274	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA	218
hsa-mir-218-1	MIMAT000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	219
hsa-mir-218-1*	MIMAT0004565	AUGGUUCCGUCAAGCACCAUGG	220
hsa-mir-218-2	MIMAT000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	221
hsa-mir-218-2*	MIMAT0004566	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG	222
hsa-mir-221	MIMAT000278	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	223
hsa-mir-221*	MIMAT0004568	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU	224
hsa-mir-222	MIMAT000279	AGCUACAUUCUGGUACUGGGU	225

10

20

30

40

【0127】

【表6】

表VII-6

hsa-mir-222*	MIMAT0004569	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCCU	226
hsa-mir-223	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	227
hsa-mir-223*	MIMAT0004570	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	228
hsa-mir-224	MIMAT0000281	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	229
hsa-mir-302a	MIMAT0000684	UAAGUGCUCCAUGUUUUGGUGA	230
hsa-mir-302a*	MIMAT0000683	ACUUAAACGUGGAUGUACUUGCU	231
hsa-mir-302b	MIMAT0000715	UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG	232
hsa-mir-302b*	MIMAT0000714	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC	233
hsa-mir-302c	MIMAT0000717	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	234
hsa-mir-302c*	MIMAT0000716	UUUAACAUGGGGUACCUGCUG	235
hsa-mir-302d	MIMAT0000718	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU	236
hsa-mir-302d*	MIMAT0004685	ACUUUAACAUGGAGGCACUUGC	237
hsa-mir-302e	MIMAT0005931	UAAGUGCUUCCAUGCUU	238
hsa-mir-302f	MIMAT0005932	UAUUUGCUUCCAUGUUU	239
hsa-mir-320a	MIMAT0000510	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	240
hsa-mir-320b-1	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	241
hsa-mir-320b-2	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	242
hsa-mir-320c-1	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	243
hsa-mir-320c-2	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	244
hsa-mir-320d-1	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	245
hsa-mir-320d-2	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	246
hsa-mir-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCAGGUGCUGCUUGG	247
hsa-mir-324-5p	MIMAT0000761	CGCAUCCCCUCAGGGCAUUGGUGU	248
hsa-mir-326	MIMAT0000756	CCUCUGGGCCCUCUCCUCAG	249
hsa-mir-328	MIMAT0000752	CUGGCCUCUCUGCCCCUUCGU	250
hsa-mir-330-3p	MIMAT0000751	GCAAAGCACACGCCUGCAGAGA	251
hsa-mir-330-5p	MIMAT0004693	UCUCUGGGCCUGUGCUUAGGC	252
hsa-mir-331-3p	MIMAT0000760	GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA	253
hsa-mir-331-5p	MIMAT0004700	CUAGGUAUUGGUCCCAGGGAUCC	254
hsa-mir-335	MIMAT0000765	UCAAGAGCAUAACGAAAAAUGU	255
hsa-mir-335*	MIMAT0004703	UUUUUCAUUAUUGCUCCUGACC	256
hsa-mir-339-3p	MIMAT0004702	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG	257
hsa-mir-339-5p	MIMAT0000764	UCCCUGGUCCUCCAGGAGCUCACG	258
hsa-mir-340	MIMAT0004692	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	259
hsa-mir-340*	MIMAT0000750	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC	260
hsa-mir-342-3p	MIMAT0000753	UCUCACACAGAAUCGCACCCGU	261
hsa-mir-342-5p	MIMAT0004694	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA	262
hsa-mir-345	MIMAT0000772	GCUGACUCCUAGGUCCAGGGCUC	263
hsa-mir-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	264
hsa-mir-361-5p	MIMAT0000703	UUAUCAGAAUCUCCAGGGUAC	265
hsa-mir-370	MIMAT0000722	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	266
hsa-mir-374a	MIMAT0000727	UUUAUAUACAACCUGAUAGUG	267
hsa-mir-374b	MIMAT0004955	AUAUAUACAACCUGUAAGUG	268
hsa-mir-376a*	MIMAT0003386	GUAGAUUCUCCUUCUAUGAGUA	269
hsa-mir-376a-1	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	270
hsa-mir-376a-2	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	271

【0128】

【表7】

表VII-7

hsa-mir-376b	MIMAT0002172	AUCAUAGAGGAAAUCCAUGUU	272
hsa-mir-376c	MIMAT0000720	AACAUAGAGGAAAUCACGU	273
hsa-mir-378	MIMAT0000732	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	274
hsa-mir-378*	MIMAT0000731	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU	275
hsa-mir-382	MIMAT0000737	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUCG	276
hsa-mir-411	MIMAT0003329	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG	277
hsa-mir-411*	MIMAT0004813	UAUGUAACACGGGUCCACUAACC	278
hsa-mir-423	MIMAT0004748	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	279
hsa-mir-423*	MIMAT0001340	AGCUCGGUCUGAGGCCUCAGU	280
hsa-mir-425-3p	MIMAT0001343	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCCC	281
hsa-mir-425-5p	MIMAT0003393	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	282
hsa-mir-432	MIMAT0002814	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	283
hsa-mir-432*	MIMAT0002815	CUGGAUGGCUCCCUCCAUGUCU	284
hsa-mir-433	MIMAT0001627	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	285
hsa-mir-484	MIMAT0002174	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	286
hsa-mir-485-3p	MIMAT0002176	GUCAUACACGGCUCUCCUCU	287
hsa-mir-485-5p	MIMAT0002175	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC	288
hsa-mir-486-3p	MIMAT0004762	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU	289
hsa-mir-486-5p	MIMAT0002177	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	290
hsa-mir-487a	MIMAT0002178	AAUCAUACAGGGACAUCCAGUU	291
hsa-mir-487b	MIMAT0003180	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	292
hsa-mir-532	MIMAT0002888	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	293
hsa-mir-532-5p	MIMAT0004780	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	294
hsa-mir-539	MIMAT0003163	GGAGAAAUUAUCCUUGGUGUGU	295
hsa-mir-574-3p	MIMAT0003239	CACGCUCUAGCACACACCCACA	296
hsa-mir-574-5p	MIMAT0004795	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU	297
hsa-mir-584	MIMAT0003249	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	298
hsa-mir-628-3p	MIMAT0003297	UCUAGUAAGAGUGGGCAGUCGA	299
hsa-mir-628-5p	MIMAT0004809	AUGCUGACAUUUACUAGAGG	300
hsa-mir-643	MIMAT0003313	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	301
hsa-mir-660	MIMAT0003338	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG	302

## 【0129】

## 「参考文献」

1. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran 7, Urbanowicz B, Branski P, Ratajczak MZ, Zembala M. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes (腫瘍由来微小胞は、腫瘍細胞のいくつかの表面決定因子およびmRNAを保有し、これらの決定因子の一部を単球に移送する). *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55:808818.
2. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor (白血球由来組織因子の血小板への移送はCD15および組織因子により仲介される). *Blood.* 2000; 96:170-175.
3. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines (血小板 - 白血球の相互作用: トロンビンの刺激による血小板の、ヒトの単球、多形核白血球、および関連細胞株への選択的結合). *Blood.* 1986; 67:629-636.
4. Lyberg T, Nakstad B, Hetland O, Boye NP. Procoagulant (thromboplastin) activity in human bronchoalveolar lavage fluids is derived from alveolar macrophages

10

20

30

40

50

(ヒト気管支肺胞洗浄液中のプロコアグラント(トロンボラスチン)の活性は肺胞マクロファージに由来する). Eur Respir J. 1990; 3:61-67.

5. Thiagarajan P, Le A, Benedict CR. Beta(2)-glycoprotein I promotes the binding of anionic phospholipid vesicles by macrophages (ベータ(2)-糖タンパク質Iは、マクロファージによる陰性リン脂質小胞の結合を促進する). Arterioscler Thromb Vase Biol. 1999;19:2807-2811.

6. Setzer F, Oberle V, Blass M, Moller E, Russwurm S, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Losche W. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells: a DNA microarray study (血小板由来微小胞は、単球細胞における異なった遺伝子発現を誘導する: DNAマイクロアレイ試験). Platelets. 2006;17:571- 576. 10

7. Plasterk RH. Micro RNAs in animal development (動物の発生におけるマイクロRNA). Cell. 2006;124:877-881.

8. Willingham AT, Gingras TR. TUF love for "junk" DNA (TUFは"ジャンクな"DNAを愛する). Cell. 2006;125: 1215- 1220.

9. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome- wide microRNA profiling in human and mouse tissues (ヒトおよびマウスの組織におけるゲノムワイドなマイクロRNAプロファイリングのためのオリゴヌクレオチドマイクロチップ). Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:9740- 9744. 20

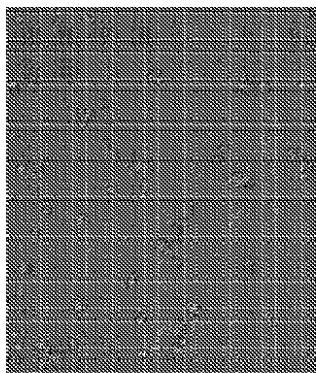
10. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance (臨床上の意義を伴う新規プレーヤーとしての慢性リンパ性白血病のマイクロRNAのゲノミクス). Semin Oncol. 2006;33: 167-173.

11. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk B. High mobility group A 2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma (高移動度A 2は、頭頸部扁平上皮細胞癌においてmiRNA - 98 の標的である). Mol Cancer. 2007;6:5.

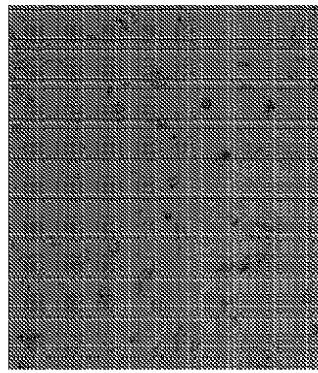
12. Voorhoeve PM, Agami R. Classifying microRNAs in cancer: The good, the bad and the ugly (癌におけるマイクロRNAの分類: 良好、悪い、非常に悪い). Biochim Biophys Acta. 2006. 30

13. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses (自然免疫反応のシグナリングタンパク質を標的とするインヒビターであるマイクロRNA、miR - 146の、NF - カッパB依存による誘導). Proc Natl Acad Sci US A. 2006;103:12481-12486.

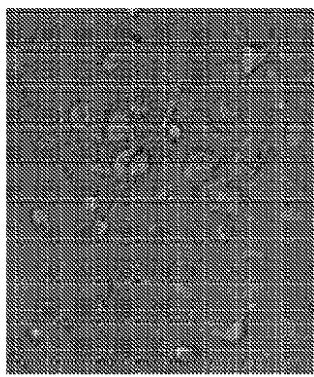
【図 2 a】

**Fig. 2a**

【図 2 b】

**Fig. 2b**

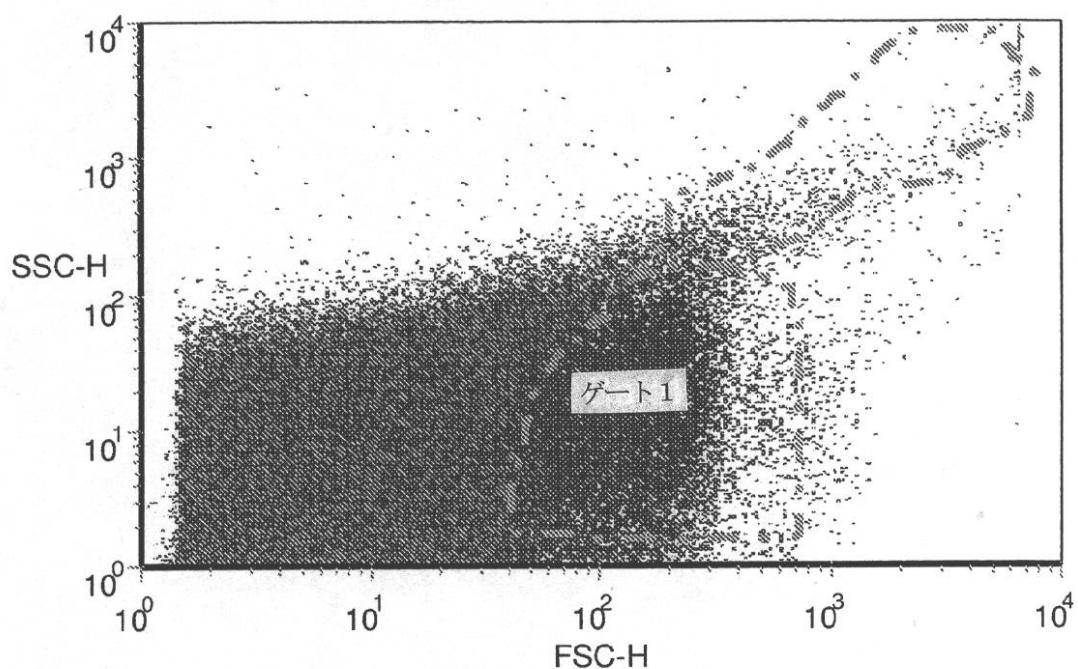
【図 2 c】

**Fig. 2c**

【図1】

## FSC 対 SSC オーバーレイ

※ 未処理の PBM MV ■ GM-CSF 処理した PBM MV



【図3】

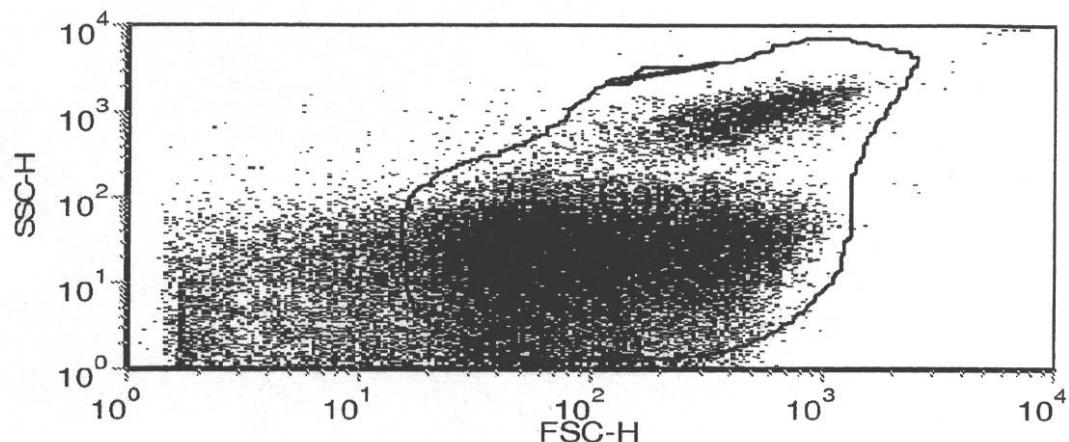


Figure 3a

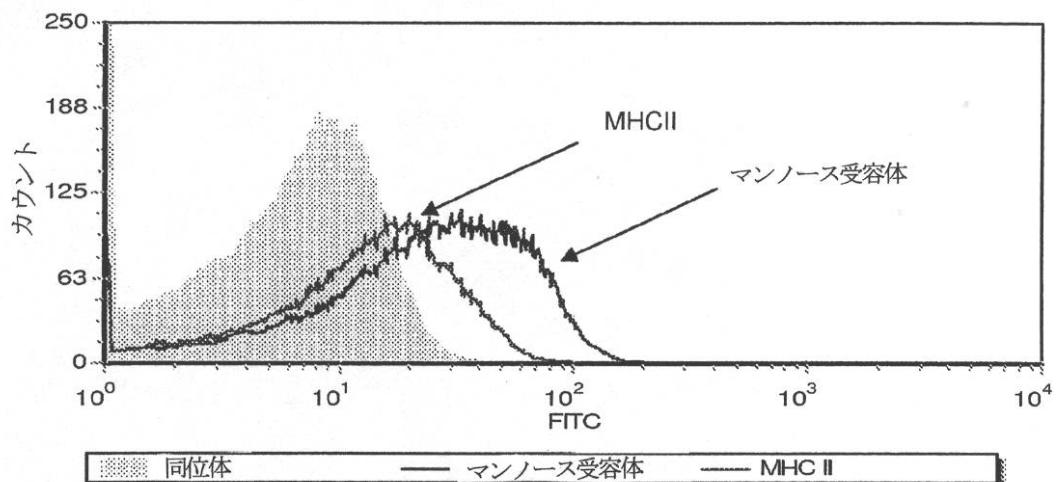


Figure 3b

同位体のコントロールに対する発現%

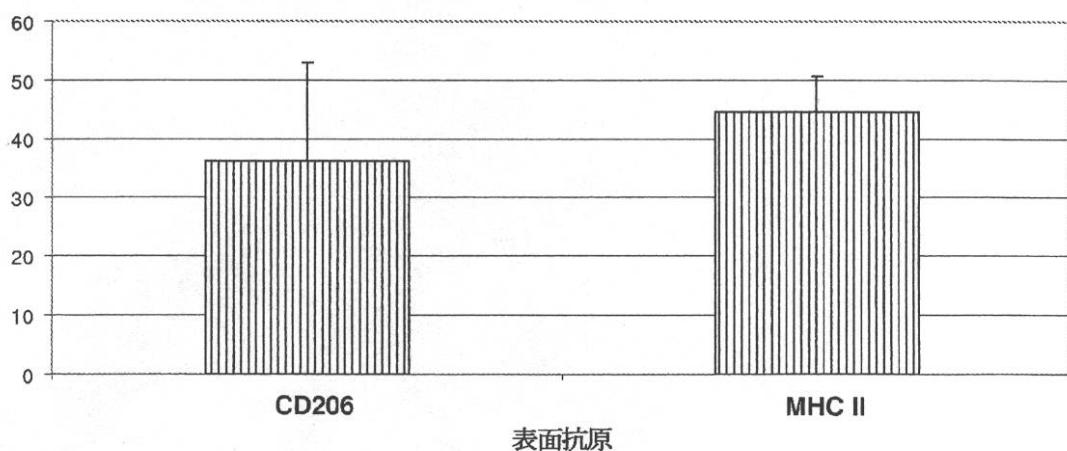
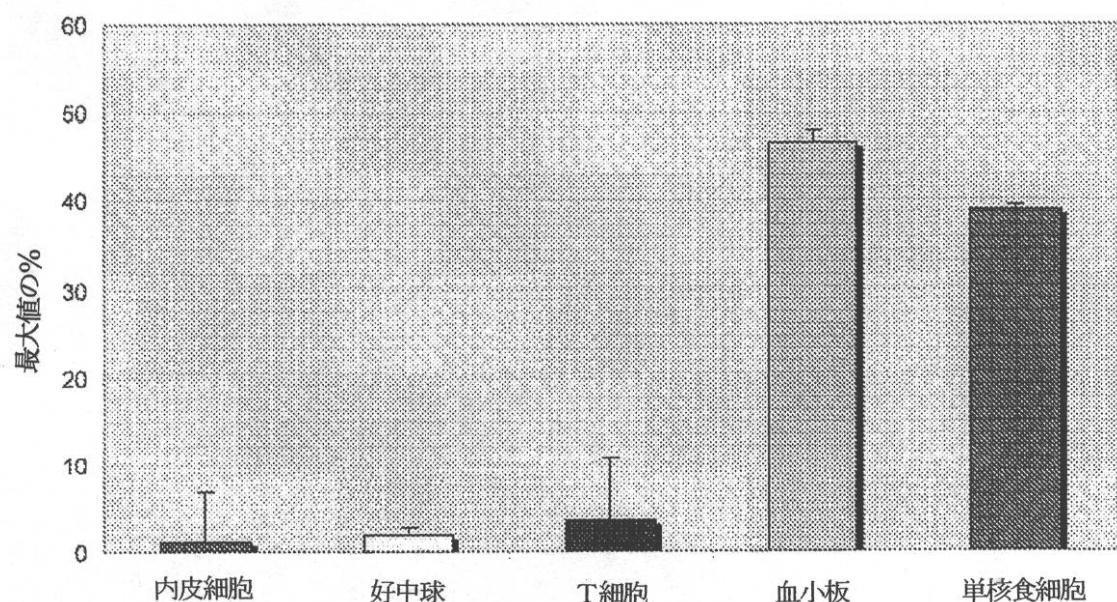
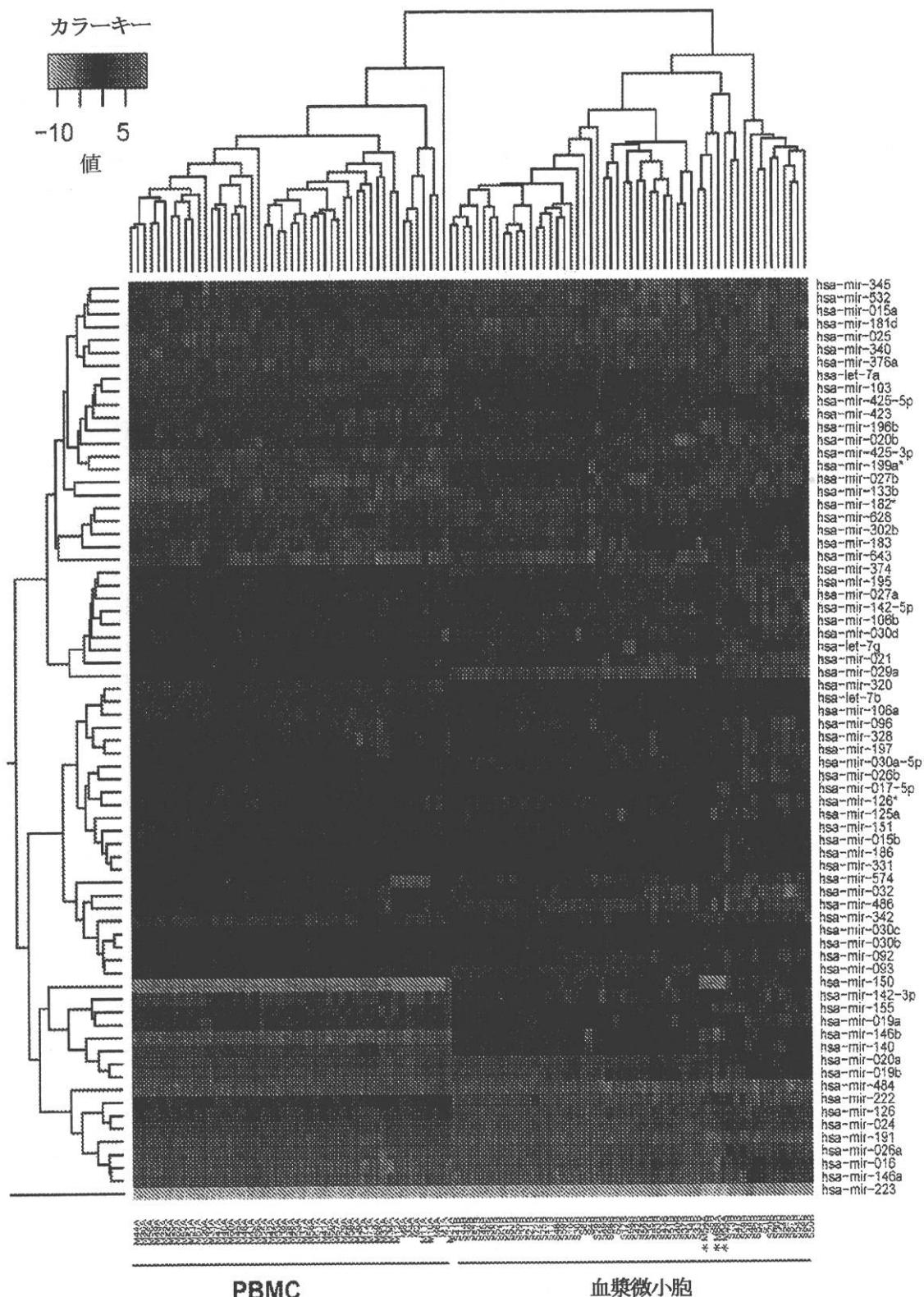


Figure 3c

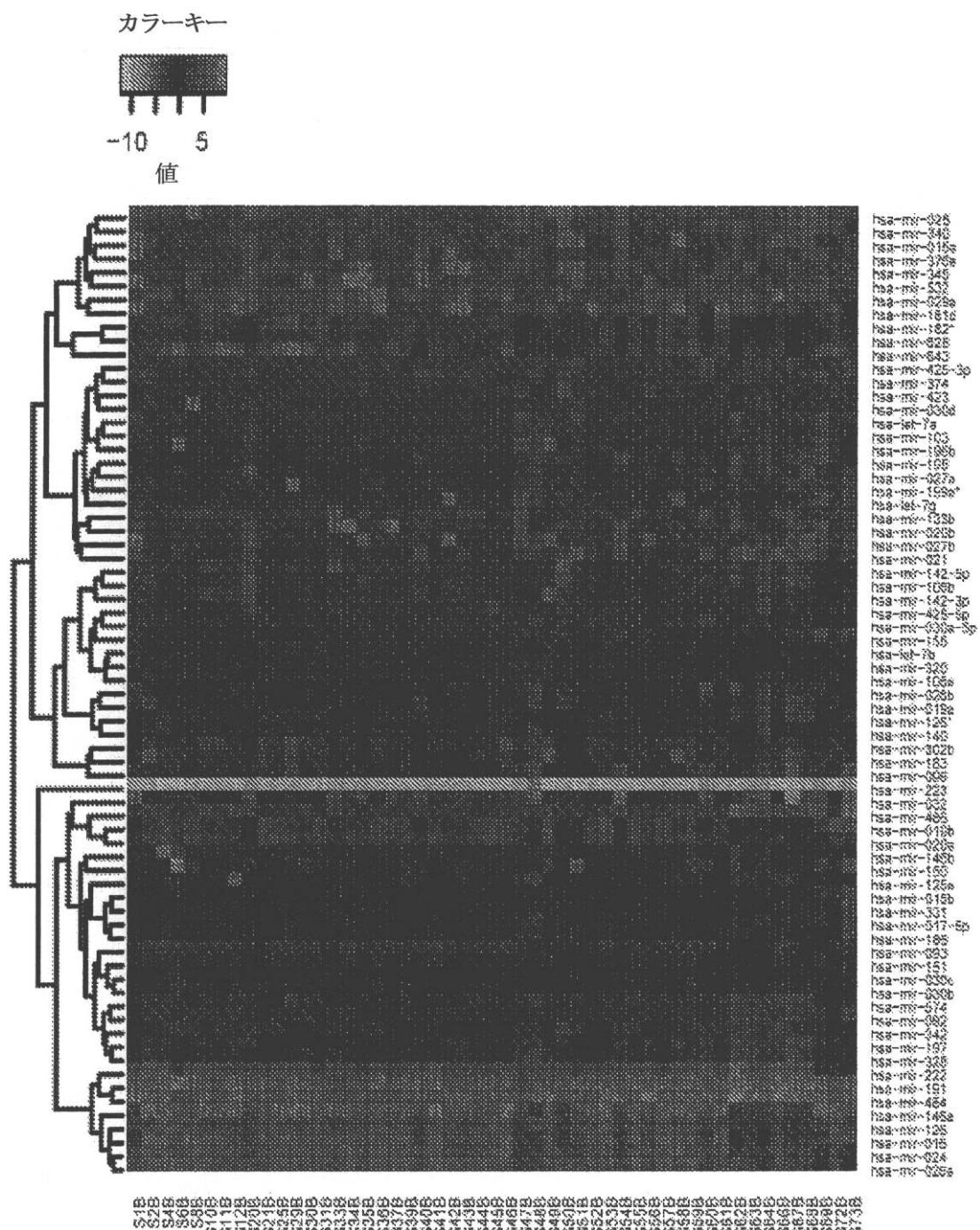
【図4】



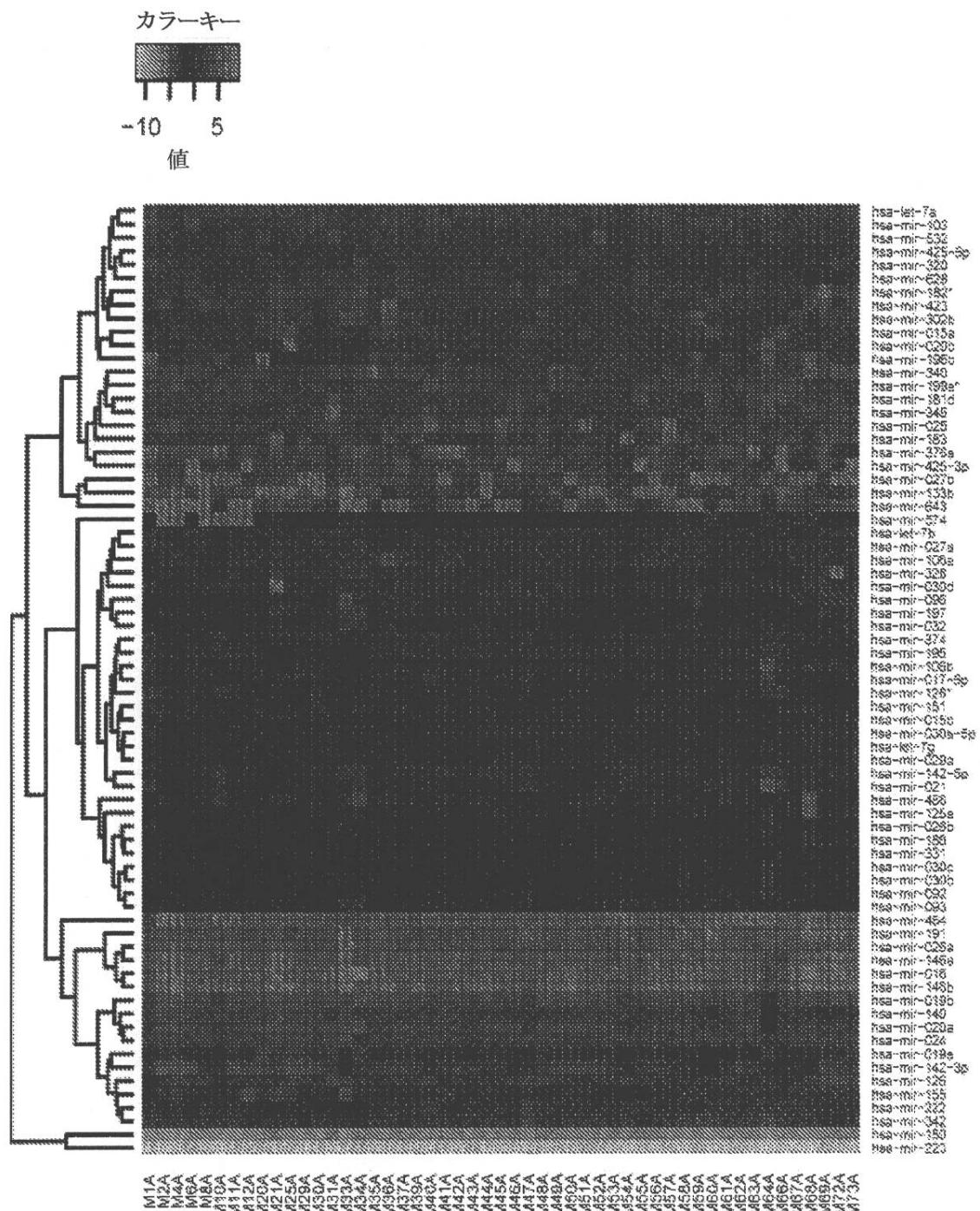
【図 5 A】



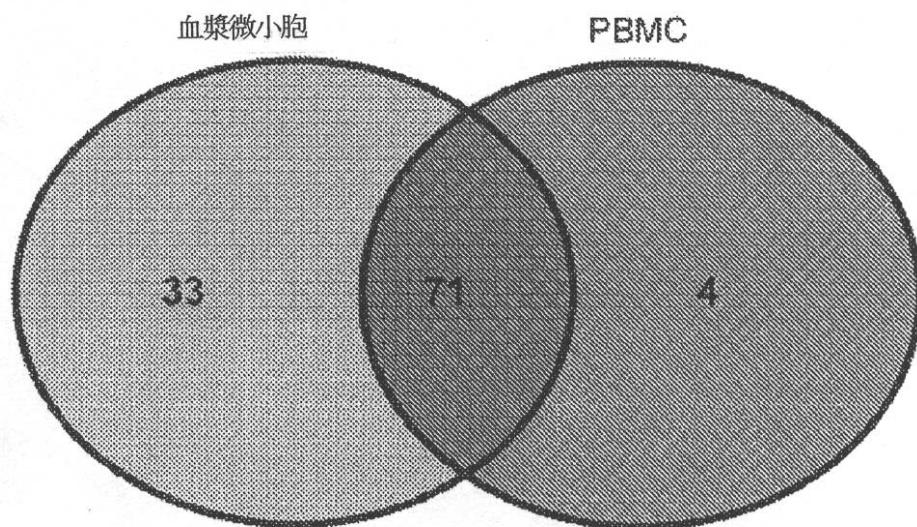
【図 5 B】



【図5C】



【図 5 D】



## 【図6】

図6、表I

表I			
疾患	疾患組織における 増加した発現	疾患組織における 減少した発現	参考文献
結腸腺癌	miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, <b>miR-203</b>		JAMA. 2008 Jan 30; 299(4):425-36; Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
結腸直腸癌	miR-19a, miR-21, miR-127, <b>miR-31</b> , miR-96, <b>miR-135b</b> およびmiR-183,	miR-30c, miR-133a, miR-143, <b>miR-133b</b> および <b>miR-145</b>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77; Cancer. 2006 Jul 19; 5:29; Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
前立腺癌	miR-21	<b>miR-15a</b> , miR-16-1, miR-143, <b>miR-145</b>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
肺癌	miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, <b>miR-205</b> , miR- <b>210</b>	<b>miR-let-7</b>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
乳癌	miR-21, miR-155	miR-125b, <b>miR-145</b>	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
B細胞リンパ腫	miR-155, miR-17-92, miR-19a, miR-92, miR-142, miR-155, miR-221		Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
膀胱癌	miR-103 and <b>miR-107</b> , miR-18a, <b>miR-31</b> , miR-93, miR-221およびmiR-224, miR-155	miR-133a, miR-216, miR 217	J Clin Oncol. 2006 Oct 10; 24(29):4677-84; Oncogene. 2007 Jun 28; 26(30):4442-52
びまん性大細胞型 BCL	miR-155, miR-17-92		Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77.
CLL	<b>miR-23b</b> , miR-24-1, miR-146, miR-155, miR-195, miR-221, miR-331, miR-29a, miR-195, <b>miR-34a</b> , および <b>miR-29c</b>	<b>miR-15a</b> , <b>miR-16-1</b> , miR-29, miR-223	Int J Cancer. 2008 Mar 1; 122(5):969-77; Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
膀胱癌	miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, <b>miR-203</b> , miR-17-5p, <b>miR-23a</b> , および <b>miR-205</b>		Urol Oncol. 2007 Sep-Oct; 25(5):387-92
腎癌	<b>miR-28</b> , <b>miR-185</b> , miR-27, およびmiR-let-7f-2		Urol Oncol. 2007 Sep-Oct; 25(5):387-92
低酸素腫瘍	<b>miR-23</b> , miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, <b>miR-107</b> , <b>miR-181</b> , <b>miR-210</b> , およびmiR-213		Mol Cell Biol. 2007 Mar; 27(5):1859-67.
子宮筋腫	miR-let-7 family, miR-21, <b>miR-23b</b> , <b>miR-29b</b> , およびmiR-197		Genes Chromosomes Cancer. 2007 Apr; 46(4):336-47
卵巣癌	miR-199*, <b>miR-200a</b> , <b>miR-214</b>	miR-100, <b>miR-let-7</b> クラスター, miR-125b	Cancer Res. 2008 Jan 15; 68(2):425-33
C型肝炎ウイルス に関連する 肝細胞癌	<b>miR-122</b> , <b>miR-100</b> , および <b>miR-10a</b>	miR-198および <b>miR-145</b>	Hepatology. 2007 Dec 19 [Epub ahead of print]
ALL	<b>miR-128b</b> , <b>miR-204</b> , <b>miR-218</b> , miR-331, およびmiR-181b-1, miR-17-92		Braz J Med Biol Res. 2007 Nov; 40(11):1435-40.
アルツハイマー病	<b>miR-9</b> , <b>miR-128</b>	miR-107	J Neurosci. 2008 Jan 30; 28(5):1213-23 Neuroreport. 2007 Feb 12; 18(3):297-300
骨髄線維症	<b>miR-190</b>	miR-31, <b>miR-150</b> , およびmiR-95	Exp Hematol. 2007 Nov; 35(11):1708-18
骨髄線維症、 真性多血症、 血小板血症		miR-34a, -342, -326, -105, -149, および-147	Exp Hematol. 2007 Nov; 35(11):1708-18
HIV	miR-29a, <b>miR-29b</b> , <b>miR-149</b> , <b>miR-378</b> , miR-324-5p		Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 2; 337(4):1214-8.
HIV-1 潜伏期	<b>miR-28</b> , <b>miR-125b</b> , miR-150, miR-223およびmiR-382		Nat Med. 2007 Oct; 13(10):1241-7.

## 【図7-1】

図7-1、表II

表II

ディテクター_名称	フィルター	検出されなかった ディテクター 名称			
hsa-let-7a	0.333333333	hsa-let-7e	hsa-mir-346	hsa-mir-520c	hsa-mir-629
hsa-let-7b	0.058823529	hsa-mir-001	hsa-mir-362	hsa-mir-520d	hsa-mir-630
hsa-let-7c	0.725490196	hsa-mir-007	hsa-mir-363	hsa-mir-520d*	hsa-mir-631
hsa-let-7d	0.529411765	hsa-mir-009	hsa-mir-363*	hsa-mir-520e	hsa-mir-632
hsa-let-7f	0.745098039	hsa-mir-009*	hsa-mir-365	hsa-mir-520f	hsa-mir-633
hsa-let-7g	0.215686275	hsa-mir-010a	hsa-mir-367	hsa-mir-520g	hsa-mir-634
hsa-mir-015a	0.568627451	hsa-mir-010b	hsa-mir-368	hsa-mir-520h	hsa-mir-635
hsa-mir-015b	0.078431373		hsa-mir-369-3p	hsa-mir-521	hsa-mir-636
hsa-mir-016	0	hsa-mir-017-3p	hsa-mir-369-5p	hsa-mir-522	hsa-mir-637
hsa-mir-017-5p	0.117647059	hsa-mir-018b	hsa-mir-371	hsa-mir-523	hsa-mir-638
hsa-mir-018a	0.784313726	hsa-mir-022	hsa-mir-372	hsa-mir-524	hsa-mir-639
hsa-mir-018a*	0.784313726	hsa-mir-023a	hsa-mir-373	hsa-mir-525	hsa-mir-641
hsa-mir-019a	0.176470588	hsa-mir-023b	hsa-mir-373*	hsa-mir-525*	hsa-mir-642
hsa-mir-019b	0.058823529	hsa-mir-028	hsa-mir-375	hsa-mir-526a	
hsa-mir-020a	0	hsa-mir-029b	hsa-mir-376a*	hsa-mir-526b	hsa-mir-644
hsa-mir-020b	0.37254902	hsa-mir-029c	hsa-mir-376b	hsa-mir-526b*	hsa-mir-645
hsa-mir-021	0.411764706	hsa-mir-031	hsa-mir-377	hsa-mir-526c	hsa-mir-646
hsa-mir-024	0	hsa-mir-033	hsa-mir-378	hsa-mir-527	hsa-mir-647
hsa-mir-025	0.647058824	hsa-mir-034a	hsa-mir-379		hsa-mir-648
hsa-mir-026a	0	hsa-mir-034b	hsa-mir-380-3p		hsa-mir-649
hsa-mir-026b	0.176470588	hsa-mir-034c	hsa-mir-380-5p	hsa-mir-542-3p	hsa-mir-650
hsa-mir-027a	0.254901961	hsa-mir-095	hsa-mir-381	hsa-mir-542-5p	hsa-mir-651
hsa-mir-027b	0.352941177	hsa-mir-099a	hsa-mir-383	hsa-mir-544	hsa-mir-652
hsa-mir-029a	0.764705882	hsa-mir-100	hsa-mir-409-5p	hsa-mir-545	hsa-mir-653
hsa-mir-030a-3p	0.37254902	hsa-mir-101	hsa-mir-410	hsa-mir-548a	hsa-mir-654
hsa-mir-030a-5p	0.098039216	hsa-mir-105	hsa-mir-412	hsa-mir-548b	hsa-mir-655
hsa-mir-030b	0.039215686	hsa-mir-107	hsa-mir-422a	hsa-mir-548c	hsa-mir-656
hsa-mir-030c	0.019607843	hsa-mir-122a	hsa-mir-422b	hsa-mir-548d	hsa-mir-657
hsa-mir-030d	0.274509804	hsa-mir-124a	hsa-mir-424	hsa-mir-549	hsa-mir-658
hsa-mir-032	0	hsa-mir-125b	hsa-mir-429	hsa-mir-550	hsa-mir-659
hsa-mir-092	0	hsa-mir-126	hsa-mir-432*	hsa-mir-551a	hsa-mir-660
hsa-mir-093	0.058823529	hsa-mir-128a	hsa-mir-448	hsa-mir-551b	hsa-mir-661
hsa-mir-096	0	hsa-mir-128b	hsa-mir-449	hsa-mir-552	hsa-mir-662
hsa-mir-098	0.784313726	hsa-mir-129	hsa-mir-449b	hsa-mir-553	
hsa-mir-099b	0.549019608	hsa-mir-133a	hsa-mir-450	hsa-mir-554	

## 【図7-2】

図7-2、表II (続き)

hsa-mir-103	0.235294118	hsa-mir-135a	hsa-mir-451	hsa-mir-555
hsa-mir-106a	0.058823529	hsa-mir-135b	hsa-mir-452	hsa-mir-556
hsa-mir-106b	0.215686275	hsa-mir-136	hsa-mir-452*	hsa-mir-557
hsa-mir-125a	0.078431373	hsa-mir-137	hsa-mir-453	hsa-mir-558
hsa-mir-126	0	hsa-mir-138	hsa-mir-455	hsa-mir-559
hsa-mir-126*	0.117647059	hsa-mir-139	hsa-mir-483	hsa-mir-561
hsa-mir-127	0.176470588	hsa-mir-141	hsa-mir-485-5p	hsa-mir-562
hsa-mir-130a	0.666666667	hsa-mir-143	hsa-mir-487a	hsa-mir-563
hsa-mir-130b	0.705882353	hsa-mir-147	hsa-mir-488	hsa-mir-564
hsa-mir-132	0.705882353	hsa-mir-148a	hsa-mir-489	hsa-mir-565
hsa-mir-133b	0.529411765	hsa-mir-149	hsa-mir-491	hsa-mir-566
hsa-mir-134	0.235294118	hsa-mir-152	hsa-mir-492	hsa-mir-567
hsa-mir-140	0.078431373	hsa-mir-153	hsa-mir-493-3p	hsa-mir-569
hsa-mir-142-3p	0.196078431	hsa-mir-154	hsa-mir-493-5p	hsa-mir-570
hsa-mir-142-5p	0.254901961	hsa-mir-154*	hsa-mir-494	hsa-mir-571
hsa-mir-145	0.705882353	hsa-mir-181a hsa-mir-181a*	hsa-mir-495	hsa-mir-572
hsa-mir-146a	0	hsa-mir-181c	hsa-mir-496	hsa-mir-573
hsa-mir-146b	0.078431373	hsa-mir-182	hsa-mir-497	
hsa-mir-148b	0.784313726	hsa-mir-184	hsa-mir-498	hsa-mir-575
hsa-mir-150	0.019607843	hsa-mir-185	hsa-mir-499	hsa-mir-576
hsa-mir-151	0.019607843	hsa-mir-187	hsa-mir-500	hsa-mir-578
hsa-mir-155	0.176470588	hsa-mir-189	hsa-mir-501	hsa-mir-579
hsa-mir-181d	0.725490196	hsa-mir-190	hsa-mir-502	hsa-mir-580
hsa-mir-182*	0.196078431	hsa-mir-192	hsa-mir-503	hsa-mir-583
hsa-mir-183	0.058823529	hsa-mir-193b	hsa-mir-504	
hsa-mir-186	0.039215686	hsa-mir-194	hsa-mir-505	hsa-mir-585
hsa-mir-191	0	hsa-mir-196a	hsa-mir-506	hsa-mir-586
hsa-mir-193a	0.666666667	hsa-mir-198	hsa-mir-507	hsa-mir-587
hsa-mir-195	0.31372549	hsa-mir-199a	hsa-mir-508	hsa-mir-588
hsa-mir-196b	0.254901961	hsa-mir-199b	hsa-mir-509	hsa-mir-589
hsa-mir-197	0.019607843	hsa-mir-200a	hsa-mir-510	hsa-mir-591
hsa-mir-199a*	0.254901961	hsa-mir-200a hsa-mir-200a*	hsa-mir-511	hsa-mir-592
hsa-mir-221	0.784313726	hsa-mir-202	hsa-mir-512-3p	hsa-mir-593
hsa-mir-222	0	hsa-mir-202*	hsa-mir-512-5p	hsa-mir-594
hsa-mir-223	0	hsa-mir-203	hsa-mir-513	hsa-mir-596
hsa-mir-224	0.529411765	hsa-mir-204	hsa-mir-514	hsa-mir-597
hsa-mir-302b	0.078431373	hsa-mir-205	hsa-mir-515-3p	hsa-mir-599
hsa-mir-320	0.098039216	hsa-mir-206	hsa-mir-515-5p	hsa-mir-600
hsa-mir-324-3p	0.705882353	hsa-mir-207	hsa-mir-516-5p	hsa-mir-601
hsa-mir-324-5p	0.470588235	hsa-mir-208	hsa-mir-517*	hsa-mir-603
hsa-mir-328	0	hsa-mir-209	hsa-mir-517a	hsa-mir-604

## 【図 7 - 3】

図 7-3、表 I I (続き)

hsa-mir-330	0.666666667	<b>hsa-mir-208</b>	<b>hsa-mir-517b</b>	<b>hsa-mir-606</b>
hsa-mir-331	0.039215686	<b>hsa-mir-210</b>	<b>hsa-mir-517c</b>	<b>hsa-mir-607</b>
hsa-mir-335	0.725490196	<b>hsa-mir-211</b>	<b>hsa-mir-518a</b>	<b>hsa-mir-608</b>
hsa-mir-339	0.607843137	<b>hsa-mir-214</b>	<b>hsa-mir-518b</b>	<b>hsa-mir-609</b>
hsa-mir-340	0.529411765	<b>hsa-mir-215</b>	<b>hsa-mir-518c</b>	<b>hsa-mir-610</b>
hsa-mir-342	0.019607843	<b>hsa-mir-216</b>	<b>hsa-mir-518c*</b>	<b>hsa-mir-612</b>
hsa-mir-345	0.705882353	<b>hsa-mir-217</b>	<b>hsa-mir-518d</b>	<b>hsa-mir-613</b>
hsa-mir-361	0.725490196	<b>hsa-mir-218</b>	<b>hsa-mir-518e</b>	<b>hsa-mir-614</b>
hsa-mir-370	0.549019608	<b>hsa-mir-219</b>	<b>hsa-mir-518f</b>	<b>hsa-mir-615</b>
hsa-mir-374	0.37254902	<b>hsa-mir-220</b>	<b>hsa-mir-519a</b>	<b>hsa-mir-616</b>
hsa-mir-376a	0.450980392	<b>hsa-mir-296</b> <b>hsa-mir-299-</b>	<b>hsa-mir-519b</b>	<b>hsa-mir-617</b>
hsa-mir-382	0.607843137	<b>3p</b> <b>hsa-mir-299-</b>	<b>hsa-mir-519c</b>	<b>hsa-mir-618</b>
hsa-mir-411	0.607843137	<b>5p</b>	<b>hsa-mir-519d</b>	<b>hsa-mir-619</b>
hsa-mir-423	0.215686275	<b>hsa-mir-301</b>	<b>hsa-mir-519e</b>	<b>hsa-mir-621</b>
hsa-mir-425-3p	0.31372549	<b>hsa-mir-302a</b> <b>hsa-mir-</b>	<b>hsa-mir-519e*</b>	<b>hsa-mir-622</b>
hsa-mir-425-5p	0.215686275	<b>302a*</b> <b>hsa-mir-</b>	<b>hsa-mir-520a</b>	<b>hsa-mir-624</b>
hsa-mir-432	0.392156863	<b>302b*</b>	<b>hsa-mir-520a*</b>	<b>hsa-mir-626</b>
hsa-mir-433	0.470588235	<b>hsa-mir-302c</b> <b>hsa-mir-</b>	<b>hsa-mir-520b</b>	<b>hsa-mir-627</b>
hsa-mir-484	0	<b>302c*</b>		
hsa-mir-485-3p	0.31372549	<b>hsa-mir-302d</b>		
hsa-mir-486	0	<b>hsa-mir-323</b>		
hsa-mir-487b	0.529411765	<b>hsa-mir-325</b>		
hsa-mir-532	0.62745098	<b>hsa-mir-326</b>		
hsa-mir-539	0.588235294	<b>hsa-mir-329</b>		
hsa-mir-574	0	<b>hsa-mir-337</b>		
hsa-mir-584	0.784313726	<b>hsa-mir-338</b>		
hsa-mir-628	0			
hsa-mir-643	0.568627451			

## 【図8】

図8、表III

表III 血漿微小胞およびPBMCにおける最も高発現の10のmiRNA							
血漿微小胞				PBMC			
miRNA	正規化した発現( $\pm$ S.D.)	ドナーにおいて発現された頻度(%)	最も高発現の10にランクされる頻度(%)	miRNA	正規化した発現( $\pm$ S.D.)	ドナーにおいて発現された頻度(%)	最も高発現の10にランクされる頻度(%)
mir-223	1589 $\pm$ 653	100	100	mir-223	2143 $\pm$ 499	100	100
mir-484	50.9 $\pm$ 22.9	100	96	mir-150	241 $\pm$ 94.6	98	98
mir-191	46.4 $\pm$ 14.9	100	100	mir-146b	57.5 $\pm$ 21.1	100	100
mir-146a	39.5 $\pm$ 19	100	88	mir-016	54.7 $\pm$ 32.9	100	100
mir-016	25.4 $\pm$ 13.3	100	78	mir-484	40.6 $\pm$ 18.8	89	88
mir-026a	25.2 $\pm$ 9.95	100	90	mir-146a	39.6 $\pm$ 13.0	100	98
mir-222	24.5 $\pm$ 12.4	100	76	mir-191	32.4 $\pm$ 15.6	100	94
mir-024	22.7 $\pm$ 10.5	100	80	mir-026a	30 $\pm$ 8.92	100	100
mir-126	18.2 $\pm$ 8.04	100	66	mir-019b	21.7 $\pm$ 7.49	100	80
mir-032	15.3 $\pm$ 32.6	100	31	mir-020a	15 $\pm$ 5.11	100	4

## 【図9】

図9、表IV

Sanger のmiR塩基のみより予測される標的のIPA解析に基づいての血漿微小胞およびPBMC画分中で発現されるmiRNAにより制御される予測経路			
血漿微小胞	p値	PBMC	p値
グリセロリン脂質の代謝	3.29E-03	軸索誘導のシグナリング	1.47E-02
イノシトールリン酸の代謝	5.77E-03	シナプスの長期増強	2.07E-02
リン脂質の分解	9.17E-03	エストロゲン受容体のシグナリング	2.23E-02
アラニンおよびアスパラギン酸の代謝	1.96E-02	グリセロリン脂質の代謝	2.45E-02
エストロゲン受容体のシグナリング	2.14E-02	D-グルタミン酸およびD-グルタメートの代謝	2.78E-02
TargetScan およびSanger のmiR塩基を組み合わせての標的からの血漿微小胞およびPBMC画分中で発現されるmiRNAにより制御される予測経路			
血漿微小胞	p値	PBMC	p値
抗原提示経路	1.28E-03	グリシン、セリン、スレオニンの代謝	3.63E-03
グリセロリン脂質の代謝	9.05E-03	グリセロリン脂質の代謝	2.38E-02
グリシン、セリン、スレオニンの代謝	1.56E-02	D-グルタミン酸およびD-グルタメートの代謝	2.54E-02
ナチュラルキラー細胞のシグナリング	1.57E-02	グリオキシル酸、ジカルボン酸の代謝	4.37E-02

## 【図10-1】

図10-1、表V

血漿\_平均は、血漿に関する51名の観測値すべてにわたるCt生データの平均である。

P BMC\_平均は、PBMCに関する51名の観測値すべてにわたるCt生データの平均である。

“血漿-P BMC”は血漿およびPBMC間の正規化したデータの差である。

血漿-MNC “+”：mIRレベルはPBMCにおいてより高く、“-”：mIRレベルは血漿においてより低い。

“倍数変化”は $2^{\Delta Ct}$ の値である。mIR 29aに関して： $4.0 = 2^{\Delta Ct} (5.33)$ であり、これはPBMC中のmIRレベルが血清中のレベルより40倍高いことを意味する。

“p値”は、p値 $<0.05/72 = 0.0006$ の場合に、有意とみなした。

ディテクター_名称	血漿_平均	P BMC_平均	血漿-MNC	倍数変化	p値	血漿に関する倍数変化
hsa-mir-029a	37.12771586	31.87566924	5.3333	40.31654208	9.70E-28	0.024803715
18S (CT)	12.71460766	9.451029281	3.3449	10.16050356	9.84E-25	0.098420319
hsa-mir-155	32.77301951	29.64446324	3.2098	9.252222752	6.61E-23	0.108082136
hsa-mir-146b	30.87718855	26.44380422	4.5147	22.85915231	1.81E-22	0.043746154
hsa-mir-142-3p	33.45027482	28.97701498	4.5545	23.49855274	1.91E-22	0.042555812
hsa-mir-222	27.69255453	29.77206378	-1.9982	0.250312111	1.18E-21	3.995012452
hsa-mir-328	30.15998382	32.9642692	-2.723	0.151459083	1.64E-21	6.602443268
hsa-mir-151	30.40933518	32.29093225	-1.8003	0.287114879	2.24E-21	3.482926432
hsa-mir-150	30.47592494	24.6518619	5.9053	59.93388544	7.01E-21	0.016685052
hsa-mir-486	28.73173943	31.56628224	-2.7533	0.148311256	4.31E-20	6.74257657
hsa-mir-197	30.22004439	32.22121169	-1.9199	0.264272828	5.34E-18	3.783968293
hsa-mir-140	30.80686384	28.81119314	2.077	4.219289268	2.87E-17	0.237006741
hsa-mir-320	32.3865371	33.86695527	-1.3991	0.379165604	1.63E-16	2.637370031
hsa-mir-374	34.51049488	32.67750663	1.9143	3.76930882	8.01E-15	0.265300629
hsa-mir-019a	32.11311761	29.96710463	2.2273	4.682568177	2.86E-12	0.213558022
hsa-mir-019b	29.4539469	27.85115537	1.6841	3.213398715	7.12E-12	0.311196988
hsa-mir-126	28.07632355	29.10031739	-0.9427	0.520258307	2.61E-11	1.922122121
hsa-mir-016	27.74576263	26.5689361	1.2581	2.391805375	1.35E-10	0.418094219
hsa-mir-532	36.36702118	34.20639555	2.2419	4.730196117	6.15E-10	0.211407725
hsa-mir-092	29.75216725	30.55396618	-0.7205	0.606887075	1.17E-09	1.647753003
hsa-mir-199a*	33.58726049	35.4571252	-1.7886	0.289452796	3.21E-09	3.454794744
hsa-let-7g	33.60687451	31.98889118	1.6993	3.247433539	4.99E-09	0.307935478
hsa-mir-032	29.54416735	31.80526606	-2.1798	0.220706343	8.52E-09	4.530907381
hsa-mir-345	36.51374094	34.71916814	1.8759	3.670305114	1.26E-08	0.272456913
hsa-mir-103	33.43298386	34.64525506	-1.131	0.456599125	1.99E-08	2.190104942
hsa-mir-021	34.3396759	32.34668429	2.0743	4.211400264	4.23E-08	0.237450714
hsa-mir-183	32.45422284	35.11564953	-2.5801	0.167229352	7.17E-08	5.979811469
hsa-mir-142-5p	33.80914806	32.4729949	1.4174	2.671037073	9.83E-08	0.374386417
hsa-mir-017-5p	31.31194325	32.41959375	-1.0264	0.490933663	1.26E-07	2.03693508
hsa-mir-106b	33.74281576	32.50763722	1.3165	2.490611501	1.28E-07	0.401507822
hsa-mir-342	30.04861659	29.34785373	0.782	1.719512972	3.06E-07	0.581560021

## 【図10-2】

図10-2、表V（続き）

hsa-mir-015a	36.02643541	34.41777394	1.6899	3.226343396	3.25E-07	0.309948408
hsa-mir-106a	32.27341998	33.310393	-0.9557	0.515591362	4.92E-07	1.939520467
hsa-mir-030a-5p	32.84903206	32.11457514	0.8157	1.760151976	4.98E-07	0.56813276
hsa-mir-181d	36.91248884	35.10117465	1.8926	3.713037794	5.30E-07	0.269321255
hsa-mir-574	29.77877718	31.99443544	-2.1344	0.227762162	3.05E-06	4.390544899
hsa-mir-020a	29.10969835	28.36665692	0.8243	1.770675693	3.74E-06	0.564756157
hsa-mir-133b	35.04172861	36.86655569	-1.7435	0.298644281	4.05E-06	3.348465259
hsa-let-7b	32.39289143	33.23120741	-0.757	0.591725511	4.25E-06	1.689972769
hsa-mir-026b	32.29385324	31.16910598	1.206	2.30697121	5.44E-06	0.433468782
hsa-mir-027b	34.97319163	37.12771071	-2.0732	0.23763183	1.20999E-05	4.208190455
hsa-mir-223	21.63665394	21.16179467	0.5561	1.470289246	2.99379E-05	0.680138281
hsa-mir-195	33.54064118	32.45677802	1.1652	2.242643031	0.000055077	0.44590244
hsa-mir-024	27.78702461	28.36258525	-0.4943	0.709906043	0.000137267	1.408637114
hsa-mir-030d	33.8831652	32.98623929	0.9782	1.970005968	0.000154741	0.507612675
hsa-mir-015b	31.44832671	32.07442065	-0.5448	0.685486424	0.000371404	1.458818095
hsa-mir-096	31.46980261	32.73422363	-1.1831	0.44040416	0.000386324	2.270641588
hsa-mir-191	26.63890682	27.27556098	-0.7068	0.612677595	0.00047708	1.632179808
hsa-mir-425-3p	34.77417378	35.82356186	-0.9681	0.511178832	0.00084906	1.95626254
hsa-mir-020b	34.97815304	33.84422814	1.2152	2.321729667	0.000852341	0.430713366
hsa-mir-643	35.6734501	37.16658316	-1.4118	0.375842469	0.00130314	2.660689207
hsa-mir-126*	31.16681945	32.1345669	-0.8865	0.54092482	0.001314585	1.84868574
hsa-mir-423	33.93739253	34.82278949	-0.8041	0.57271925	0.001362239	1.746056205
hsa-mir-425-5p	33.23637712	33.88098071	-0.5633	0.676752398	0.00179719	1.477645299
hsa-mir-026a	27.61150875	27.32677761	0.366	1.28877463	0.003310506	0.775930854
hsa-mir-302b	33.23113157	34.33434284	-1.0219	0.492467356	0.003731969	2.030591447
hsa-mir-484	26.55751618	28.13046808	-1.4917	0.355593289	0.009046242	2.812201558
hsa-mir-125a	30.94104939	31.63410639	-0.6118	0.654379746	0.02785181	1.528164657
hsa-let-7a	34.16573733	34.66154112	-0.4145	0.750279477	0.031855987	1.332836671
hsa-mir-628	33.65892745	34.23451988	-0.4943	0.709906043	0.033363855	1.408637114
hsa-mir-182*	34.51246341	35.19580641	-0.6021	0.65879431	0.04206113	1.517924464
hsa-mir-093	29.92991163	30.33080725	-0.3196	0.801292012	0.043597802	1.247984486
hsa-mir-376a	35.49479343	36.2218518	-0.6458	0.639138279	0.048003434	1.564606648
hsa-mir-196b	33.89190492	34.56216867	-0.589	0.664803554	0.052904716	1.504203751
hsa-mir-025	36.27231106	35.85259422	0.501	1.41519416	0.069149461	0.706616822
hsa-mir-027a	33.33901471	32.99540369	0.4249	1.342479446	0.101287776	0.744890362
hsa-mir-146a	27.051654	26.95885476	0.1741	1.12826034	0.241458101	0.886320262
hsa-mir-340	35.71472961	35.53800265	0.258	1.195819797	0.297093531	0.8362464
hsa-mir-030b	30.55810765	30.72009382	-0.0807	0.945598728	0.389875101	1.057531033
hsa-mir-186	31.31177086	31.45367741	-0.06062	0.958851963	0.659198081	1.042913858
hsa-mir-331	31.20308243	31.25979306	0.02458	1.017183525	0.843135202	0.983105761
hsa-mir-030c	30.93719829	31.01586004	0.002625	1.001821168	0.97816881	0.998182143

【図11-1】

図11-1、表VI

表 VI

デイテクター _名称	P BMCの 正規化した 発現の平均	P BMCの 標準偏差	デイテクター _名称	血漿の 正規化した 発現の平均	血漿の 標準偏差
hsa-mir-223	2143.797514	499.6723532	hsa-mir-223	1589.265353	653.1441
hsa-mir-150	241.3339986	94.6316509	hsa-mir-484	50.93154102	22.91411
hsa-mir-146b	57.51515588	21.17347322	hsa-mir-191	46.44422571	14.98219
hsa-mir-016	54.79023342	32.92864759	hsa-mir-146a	39.5631478	19.02017
hsa-mir-484	40.62828652	18.89513879	hsa-mir-016	25.45043823	13.32435
hsa-mir-146a	39.66536453	13.01422255	hsa-mir-026a	25.2068328	9.956682
hsa-mir-191	32.44104295	15.62493155	hsa-mir-222	24.51626706	12.42177
hsa-mir-026a	30.05789737	8.928309461	hsa-mir-024	22.79169634	10.53596
hsa-mir-019b	21.72111133	7.496587814	hsa-mir-126	18.20923598	8.04666
hsa-mir-020a	15.03972998	5.117918017	hsa-mir-032	15.32305403	32.61654
hsa-mir-024	14.49037987	2.924884427	hsa-mir-486	12.89548349	11.97428
hsa-mir-142-3p	11.61802275	7.535807778	hsa-mir-020a	10.12067658	5.597534
hsa-mir-140	11.15286241	3.933184767	hsa-mir-019b	9.158209689	6.76422
hsa-mir-126	9.209558485	3.825687483	hsa-mir-150	8.165508668	25.08223
hsa-mir-342	7.803100549	3.388772813	hsa-mir-574	5.939301367	3.722014
hsa-mir-155	6.584151232	4.579272166	hsa-mir-092	5.700980896	3.157407
hsa-mir-222	5.715723219	2.105344287	hsa-mir-093	5.436799962	2.417329
hsa-mir-019a	5.53562668	2.957936571	hsa-mir-342	5.114543492	3.297305
hsa-mir-093	3.756090874	1.000518353	hsa-mir-197	4.9808586	4.507
hsa-mir-092	3.215354275	0.85390195	hsa-mir-328	4.707858075	3.592588
hsa-mir-486	3.096228853	7.676887526	hsa-mir-096	3.674085488	5.965292
hsa-mir-030b	2.865611791	0.76538861	hsa-mir-151	3.452172299	1.08377
hsa-mir-574	2.458205492	1.894539696	hsa-mir-146b	3.272000368	2.101495
hsa-mir-030c	2.335820956	0.663949738	hsa-mir-140	3.196516876	1.71678
hsa-mir-026b	2.129402092	0.705755408	hsa-mir-030b	3.134519745	1.142809
hsa-mir-331	1.985929854	0.609153141	hsa-mir-125a	3.080410769	1.975409
hsa-mir-125a	1.808127477	1.087896802	hsa-mir-126*	3.023376204	2.068206
hsa-mir-186	1.720577641	0.419612713	hsa-mir-183	2.854264163	6.494415
hsa-mir-032	1.716467503	1.338128537	hsa-mir-030c	2.412532336	0.863587
hsa-mir-029a	1.323099465	0.533548819	hsa-mir-017-5p	2.13024101	0.998316
hsa-mir-126*	1.269368187	0.759421276	hsa-mir-331	2.087433557	0.81255
hsa-let-7g	1.199246639	0.349725473	hsa-mir-186	2.022411766	0.916917
hsa-mir-021	1.161213483	0.674584117	hsa-mir-015b	1.808314178	0.81048
hsa-mir-197	1.149407136	0.647186919	hsa-mir-019a	1.697172987	1.453897

【図11-2】

図11-2、表V I (続き)

hsa-mir-015b	1.14628446	0.432407565	hsa-mir-302b	1.339313335	2.387044
hsa-mir-030a-5p	1.094683149	0.306485271	hsa-mir-026b	1.292369054	0.824158
hsa-mir-195	1.017673959	0.797387672	hsa-mir-106a	1.186157531	1.293289
hsa-mir-151	1.007960478	0.397967603	hsa-let-7b	0.97666637	0.625536
hsa-mir-142-5p	0.962665368	0.492490733	hsa-mir-320	0.911092198	0.420503
hsa-mir-017-5p	0.941159371	0.360846484	hsa-mir-155	0.808867743	0.52866
hsa-mir-106b	0.910164376	0.403715009	hsa-mir-030a-5p	0.727538734	0.549257
hsa-mir-096	0.875989336	0.559638262	hsa-mir-628	0.713396354	1.263219
hsa-mir-374	0.764917256	0.274388929	hsa-mir-027a	0.641903058	0.448917
hsa-mir-328	0.720096352	0.412158586	hsa-mir-142-3p	0.627217683	0.607184
hsa-mir-030d	0.662654685	0.22361572	hsa-mir-195	0.564628001	0.392046
hsa-mir-027a	0.622821419	0.251240619	hsa-mir-425-5p	0.554428361	0.275865
hsa-mir-106a	0.542577626	0.312616405	hsa-let-7g	0.515997707	0.337364
hsa-let-7b	0.534079686	0.25068168	hsa-mir-021	0.51383279	0.491008
hsa-mir-020b	0.410435233	0.262371622	hsa-mir-199a*	0.503454664	0.327551
hsa-mir-320	0.344918355	0.140441973	hsa-mir-142-5p	0.485752905	0.504504
hsa-mir-425-5p	0.334114444	0.131686276	hsa-mir-103	0.469571039	0.215895
hsa-mir-628	0.323074686	0.328272174	hsa-mir-106b	0.455236625	0.295268
hsa-mir-302b	0.31107497	0.233922375	hsa-mir-182*	0.450866408	0.779637
hsa-mir-532	0.30283697	0.175299492	hsa-mir-196b	0.424682779	0.283318
hsa-mir-196b	0.291839926	0.203868959	hsa-mir-643	0.410079866	0.934729
hsa-mir-015a	0.263528933	0.156658681	hsa-mir-030d	0.360317322	0.195419
hsa-mir-183	0.223615225	0.225419033	hsa-mir-423	0.355300524	0.267033
hsa-mir-345	0.222589939	0.14617654	hsa-let-7a	0.316043353	0.197157
hsa-mir-423	0.213547231	0.136842846	hsa-mir-027b	0.252490316	0.182518
hsa-mir-103	0.205412359	0.093491856	hsa-mir-374	0.251770179	0.197212
hsa-let-7a	0.198065472	0.082808812	hsa-mir-020b	0.227198431	0.167979
hsa-mir-181d	0.170055022	0.109234879	hsa-mir-133b	0.201227753	0.178372
hsa-mir-182*	0.151155794	0.079789533	hsa-mir-425-3p	0.183808363	0.094868
hsa-mir-340	0.128492001	0.08303611	hsa-mir-376a	0.166829158	0.161986
hsa-mir-425-3p	0.127886265	0.097067479	hsa-mir-340	0.113550436	0.088995
hsa-mir-199a*	0.127527328	0.079775882	hsa-mir-015a	0.110336695	0.095621
hsa-mir-376a	0.124903907	0.160137603	hsa-mir-181d	0.093074354	0.212993
hsa-mir-643	0.116164417	0.195641411	hsa-mir-532	0.086633253	0.064244
hsa-mir-025	0.11319355	0.079644761	hsa-mir-025	0.072911126	0.043857
hsa-mir-133b	0.100108157	0.121551814	hsa-mir-345	0.071420142	0.054899
hsa-mir-027b	0.07101679	0.067406886	hsa-mir-029a	0.058322216	0.093625

---

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 マーシュ, クレイ・ビー

アメリカ合衆国オハイオ州43221, コロンバス, クラブ・ロード 2266

(72)発明者 パイパー, メリッサ・ジー

アメリカ合衆国オハイオ州43017, ダブリン, フィンラリグ・ドライブ 8640

(72)発明者 イスマイル, ノウラ

アメリカ合衆国オハイオ州43212, コロンバス, アッシンガー・ブルバード 1616

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 國際公開第2007/081740 (WO, A2)

國際公開第2009/015357 (WO, A1)

Int. J. Cancer, 2008年 3月, vol.122, no.5, pp.969-977

Nat. Cell. Biol., 2007年, vol.9, no.6, pp.654-659

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS /

WPIIDS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed