

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年3月25日(25.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/032506 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/055383
- (22) 国際出願日: 2009年3月12日(12.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-237007 2008年9月16日(16.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号 Tokyo (JP). 株式会社ハプロファーマ(HAPLOPHARMA INC.) [JP/JP]; 〒7700023 徳島県徳島市佐古三番町16番6-1203号 Tokushima (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横関博雄(YOKOZEKI, Hiroo) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 細矢一輝(HOSOYA, Kazuki) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 佐藤貴浩(SATO, Takahiro) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島1丁目5番45号国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 根本靖久(NEMOTO, Yasuhisa) [JP/JP]; 〒7700023 徳島県徳島市佐古三番町16番6-1203号株式会社ハプロファーマ内 Tokushima (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町 MTビル 19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: NUCLEIC ACID DRUG FOR TREATING ALLERGIC DISEASE

(54) 発明の名称: アレルギー疾患の治療のための核酸医薬

(57) Abstract: Provided is a double-stranded (ds)RNA capable of inhibiting the expression of STAT6, which participates in allergic diseases via Th2 type cytokine, by the RNA interference. Also provided is a medicinal composition for preventing or treating an allergic disease which contains the preceding dsRNA. A double-stranded RNA (dsRNA) molecule targeting mRNA in STAT6 gene which satisfies the following requirement (a) or (b): (a) one strand is a sense strand identical with a sequence having 15 to 50 consecutive bases in the STAT6 gene sequence represented by SEQ ID NO:1 or 3, while the other strand is an antisense strand containing a base sequence being complementary to the base sequence of the preceding sense strand; and (b) one strand is a sense strand comprising a sequence derived from a sequence having 15 to 50 consecutive bases in the STAT6 gene sequence represented by SEQ ID NO:1 or 3 by deletion, substitution or addition of one to several bases and being hybridizable with STAT6 gene, while the other strand is an antisense strand containing a base sequence being complementary to the base sequence of the preceding sense strand.

(57) 要約: Th2 型サイトカインを介してアレルギー疾患に関与する STAT6 の発現を RNA 干渉により抑制し得る二本鎖(ds)RNA 及び該 dsRNA を含むアレルギー疾患の予防又は治療用医薬組成物の提供。 STAT6 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) 分子であって、以下の(a)又は(b)の dsRNA 分子: (a) 一方の鎖が配列番号 1 又は 3 で表される STAT6 遺伝子配列中の 15~50 個の連続した塩基を有する配列に同一なセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である; 又は(b) 一方の鎖が配列番号 1 又は 3 で表される STAT6 遺伝子配列中の 15~50 個の連続した塩基を有する配列において 1 又は数個の塩基が欠失、置換若しくは付加した配列であって、STAT6 遺伝子にハイブリダイズし得る配列からなるセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である。

WO 2010/032506 A1

明 細 書

アレルギー疾患の治療のための核酸医薬

技術分野

本発明は、STAT6 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) 分子及び該 dsRNA 分子を含むアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物に関する。

背景技術

RNA 干渉 (RNAi) は、2 本鎖 RNA (dsRNA) によって、その配列特異的に mRNA が切断され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象であり、生物共通の核酸レベルの防御システムであることが報告されている (非特許文献 1 を参照)。RNAi においては、dsRNA がダイサー (Dicer) の作用によりプロセッシングされ siRNA (short interfering RNA) が形成され、siRNA がガイド RNA としてターゲット配列を認識し、ターゲット mRNA を切断することにより、遺伝子の発現が抑制される。

RNAi 法は、遺伝子の発現制御による遺伝子機能解析、遺伝子の発現制御機構の解明、RNAi による遺伝子治療等の利用を目的に種々の検討が行われている。

免疫応答は type-1 helper (Th1) 細胞による細胞性免疫と type-2 helper (Th2) 細胞による体液性免疫からなり、Th1 免疫応答は自己免疫疾患や移植拒絶反応、Th2 免疫応答はアレルギー疾患に関与することが知られている。また、Th2 免疫応答に関与する Th2 型サイトカインとして IL-4 及び IL-13 が知られている。

転写調節因子 STAT6 (Signal transducers and activators of transcription 6) は、Th2 型サイトカインである IL-4 及び IL-13 受容体を介するシグナル伝達の重要な転写調節因子であり、Th2 型免疫応答の維持に関与していることが報告されている。STAT6 の作用に関しては STAT6 の欠損マウスが作製され、該マウスでは IL-4 の情報が細胞に伝達されず、その結果アレルギー反応が起こらないことが報告されている (非特許文献 2 及び 3 を参照)。

非特許文献 1 Waterhouse, P.M. et al., Nature, 411: 834-843, 2001

非特許文献 2 Takeda et al., Nature, 1996 Apr 18; 380(6575): 627-30

非特許文献 3 Shimoda et al., Nature, 1996 Apr 18; 380 (6575): 630-3

発明の開示

本発明は、Th2 型サイトカインを介してアレルギー疾患に関与する STAT6 の発現を RNA 干渉により抑制し得る二本鎖(ds)RNA 及び該 dsRNA を含むアレルギー疾患の予防又は治療用医薬組成物の提供を目的とする。

本願発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、STAT6 遺伝子配列又はその一部に同一な塩基配列を有するセンス鎖と該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を有するアンチセンス鎖からなる dsRNA 分子が、STAT6 遺伝子の発現を特異的に抑制することを見出した。さらに、STAT6 遺伝子の発現の抑制により、Th2 型サイトカイン又はケモカインの産生が抑制され、アレルギー疾患の予防及び治療に効果を奏することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] STAT6 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) 分子であって、以下の (a) 又は (b) の dsRNA 分子：

(a) 一方の鎖が配列番号 1 で表される STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列中の 15～50 個の連続した塩基を有する配列に同一なセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である；又は

(b) 一方の鎖が配列番号 1 で表される STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列中の 15～50 個の連続した塩基を有する配列において 1 又は数個の塩基が欠失、置換若しくは付加した配列であって、STAT6 遺伝子にハイブリダイズし得る配列からなるセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である。

[2] dsRNA 分子が、以下の (c) 又は (d) である、[1] の dsRNA 分子：

(c) 一方の鎖が配列番号 1 で表されるヒト STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 3426～3446 番目の塩基を有する配列、3432～3452 番目の塩基を有する配列、配列番号 3 で表されるマウス STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 259～279 番目の塩基を有する

配列、及び 3026 番目～3046 番目の塩基を有する配列からなる群から選択される塩基配列と同一なセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である；又は

(d) 一方の鎖が配列番号 1 で表されるヒト STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 3426～3446 番目の塩基を有する配列、3432～3452 番目の塩基を有する配列、配列番号 3 で表されるマウス STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 259～279 番目の塩基を有する配列、及び 3026 番目～3046 番目の塩基を有する配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列において 1 又は数個の塩基が欠失、置換若しくは付加した配列であって、STAT6 遺伝子にハイブリダイズし得る配列からなるセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である。

[3] dsRNA 分子が、配列番号 5 で表されるセンス鎖と配列番号 6 で表されるアンチセンス鎖、配列番号 7 で表されるセンス鎖と配列番号 8 で表されるアンチセンス鎖、配列番号 9 で表されるセンス鎖と配列番号 10 で表されるアンチセンス鎖、配列番号 11 で表されるセンス鎖と配列番号 12 で表されるアンチセンス鎖、及び配列番号 13 で表されるセンス鎖と配列番号 14 で表されるアンチセンス鎖からなる群より選択されるいずれかの塩基対からなる、[2]の dsRNA 分子。

[4] センス鎖とアンチセンス鎖がリンカー分子を介して連結されている、[1]～[3]のいずれかの dsRNA 分子。

[5] [4]の dsRNA 分子のテンプレート DNA を含み該 dsRNA 分子を発現するベクター。

[6] [1]～[4]のいずれかの dsRNA 分子を 1 つ又は複数含む、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

[7] [5]のベクターを含む、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

[8] センス鎖の 5' 末端に 1 個又は複数の G (グアニン) からなるオーバーハング塩基を有する、[1]～[3]のいずれかの dsRNA 分子。

[9] センス鎖とアンチセンス鎖がリンカー分子を介して連結されている、[8]

の dsRNA 分子。

[10] [9]の dsRNA 分子のテンプレート DNA を含み該 dsRNA 分子を発現するベクター。

[11] [8]又は[9]の dsRNA 分子を1つ又は複数含む、インターフェロン及び/又は細胞障害を誘導しない、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

[12] [10]のベクターを含む、インターフェロン及び/又は細胞障害を誘導しない、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

[13] 鼻腔投与するための、[6]、[7]、[11]又は[12]のアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

[14] 皮膚に塗布するための軟膏である、[6]、[7]、[11]又は[12]のアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2008-237007 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、実施例の実験プロトコール1 (A)及び2 (B)の概要を示す図である。

図2は、siRNA と shRNA の構造を示す図である。

図3は、ヒト STAT6 siRNA 導入による STAT6 の発現抑制を示す図である。

図4は、ヒト STAT6 siRNA を導入したヒト線維芽細胞による eotaxin-3 産生を示す図である。

図5は、ヒト STAT6 shRNA を導入したヒト線維芽細胞における STAT6 の mRNA レベルでの発現抑制を示す図である。

図6は、ヒト STAT6 shRNA を導入したヒト線維芽細胞における STAT6 のタンパク質レベルでの発現抑制を示す図である。

図7は、ヒト STAT6 shRNA を導入したヒト線維芽細胞による eotaxin-3 産生を示す図である。

図8は、マウス STAT6 siRNA 導入による、正常線維芽細胞における STAT6 発現

の抑制を Western blot 法により確認した結果を示す図である。

図 9 は、マウス STAT6 siRNA 導入による、正常線維芽細胞における STAT6 発現の抑制を RT-PCR により確認した結果を示す図である。

図 10 は、マウス STAT6 siRNA 導入による、正常線維芽細胞において、IL-4 と TNF-alpha の共刺激により産生される eotaxin (CCL11)濃度を ELISA 法にて定量した結果を示す図である。

図 11 は、STAT6 siRNA による接触過敏反応への効果を示す図である。図 11A は、TNCB による接触過敏反応への効果を、図 11B は DNFB による接触過敏反応への効果を、図 11C は Oxazolone による接触過敏反応への効果を示す図である。

図 12 は、STAT6 siRNA による接触過敏反応への効果をギムザ染色により示す図である。

図 13 は、STAT6 siRNA による接触過敏反応への効果を浸潤している細胞のプロフィールにより示す図である。

図 14 は、STAT6 siRNA 含有軟膏による接触過敏反応への効果を示す図である。

図 15 は、鼻炎モデルに対する STAT6 siRNA の効果をくしゃみの回数により示す図である。

図 16 は、鼻炎モデルに対する STAT6 siRNA の効果をギムザ染色により示す図である。

図 17 は、鼻炎モデルに対する STAT6 siRNA の効果を浸潤している好酸球の数により示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は転写調節因子 STAT6 (Signal transducers and activators of transcription 6) の mRNA を標的とする二本鎖からなる dsRNA(double stranded RNA)分子に関する。該 dsRNA 分子の一方の鎖は転写因子 STAT6 遺伝子配列又はその一部に同一な塩基配列を有しハイブリダイズし得るセンス鎖であり、他方の鎖は該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である dsRNA 分子であり、該センス鎖とアンチセンス鎖は相補的に結合する。この際、センス

鎖とアンチセンス鎖は完全に相補的である必要は必ずしもなく、相補的に結合する限り、1又は複数、すなわち、1～10個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは、1～3個、2個若しくは1個のミスマッチがあってもよい。STAT6 遺伝子中の標的配列は、コーディング領域であっても、非コーディング領域であってもよい。

本発明において dsRNA 分子は、siRNA 分子及び shRNA 分子を含む。また、本発明において dsRNA 分子は miRNA 分子を形成し得る。

本発明の dsRNA 分子の STAT6 遺伝子の標的配列の塩基数は、特に限定されないが、15～50 塩基、15～45、15～40、15～35 若しくは 15～30 塩基、好ましくは 20～35 塩基、さらに好ましくは 21～35、21～25 若しくは 21～23 塩基、特に好ましくは 21 塩基である。

本発明において、STAT6 の遺伝子配列又はその一部に同一な塩基配列を有しハイブリダイズし得るセンス鎖とは、配列番号 1 で表されるヒト STAT6 遺伝子配列又は配列番号 3 で表されるマウス STAT6 遺伝子配列中のチミンがウラシルに置換された塩基配列を有する RNA 配列を意味する。本発明の dsRNA 分子を構成するセンス鎖は、STAT6 の遺伝子配列と同一であることが望ましいが、実質的に同一な配列であってもよい。すなわち、dsRNA 分子のセンス鎖と実際に標的となる STAT6 の mRNA 配列がハイブリダイズする限り 1 又は複数、すなわち、1～10個、好ましくは 1～5 個、さらに好ましくは、1～3 個、2 個若しくは 1 個の塩基が欠失、置換又は付加してミスマッチが生じていてもよい。この場合のハイブリダイズする条件は、本発明の dsRNA を生体内に投与して医薬として用いる場合は、生体内の条件であり、本発明の dsRNA を試薬として *in vitro* で用いる場合は、中度のストリンジントな条件あるいは高度なストリンジントな条件であり、このような条件として、例えば、400mM NaCl、40mM PIPES pH6.4、1mM EDTA、50℃から 70℃で 12～16 時間でのハイブリゼーション条件が挙げられる。

また、本発明の dsRNA のセンス鎖配列と標的配列は、BLAST[J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)]、FASTA[Methods. Enzymol., 183, 63-98 (1990)]等の当業者に公知の相同性検索プログラムをデフォルト（初期設定）のパラメータを用いて算出される数値で 90%以上、好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 96、97、98

若しくは99%以上の配列同一性を有する。

また、本発明の dsRNA 分子は、上に定義されたセンス鎖とアンチセンス鎖がリンカー分子を介して連結され、そのリンカー部でループ構造を形成し折りたたまれた shRNA (short hairpin RNA) 分子として提供され得る。shRNA 分子はダイサーによってプロセッシングされ、siRNA 分子を生じ得る。shRNA 分子に含まれるリンカー分子は、センス鎖とアンチセンス鎖を連結しステムループ構造を形成し得る限り、ポリヌクレオチドリンカーであっても、非ポリヌクレオチドリンカーであってもよく、特に限定しないが、当業者に公知であるポリヌクレオチドリンカーが好ましい。ヘアピンループ配列は限定されないが、5～12塩基からなる UU で始まる配列、例えば UUCAAGAGA が挙げられる。そのほかのループ配列としては、Lee NS. et al. (2002) Nat. Biotech. 20, 500-505、Paddison PJ. et al. (2002) Genes and Dev. 16, 948-958、Sui G. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5515-5520、Paul CP. et al. (2002) Nat. Biotech. 20, 505-508、Kawasaki H. et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31, 700-707 等に記載の配列からなるループを採用することができる。shRNA 分子も、上記したように公知の方法に基づいて、in vitro 又は in vivo にて合成することが可能である。合成に際しては、センス鎖とアンチセンス鎖を逆方向配列として含む1本の RNA 鎖を合成し、その後この1本の RNA 鎖を自己相補的結合によって二本鎖構造を形成させ shRNA 分子を得ることができる。

dsRNA 分子を構成するセンス鎖又はアンチセンス鎖は必要に応じて、3' 末端にオーバーハングを有していてもよく、該オーバーハングの塩基の種類、数は限定されず、例えば、1～5、好ましくは1～3、さらに好ましくは1若しくは2塩基からなる配列が挙げられ、例えば、TTT、UU や TT が挙げられる。本発明において、オーバーハングとは、dsRNA 分子の一方の鎖の末端に付加された塩基であって、もう一方の鎖の対応する位置に相補的に結合し得る塩基が存在しない塩基をいう。オーバーハングは標的とする STAT6 遺伝子の DNA を本来的に構成する塩基であってもよい。例えば、本発明の dsRNA は、センス鎖が STAT6 遺伝子配列中のチミンがウラシルに置換された塩基配列中の連続する 21 塩基からなり、アンチセンス鎖はセンス鎖の 3' 末端側の 2 塩基を除く塩基配列に相補的な配列を有し、セ

ンス鎖とアンチセンス鎖の3'末端側に、2塩基からなるオーバーハングを有する構造を有する。

また、センス鎖の5'端に1~3、好ましくは3、2若しくは1のG(グアニン)からなる配列からなるオーバーハングを有していてもよい。このようにセンス鎖の5'末端に1個又は複数のGからなるオーバーハングを設けることにより、shRNAを導入した細胞においてインターフェロンの発現が誘導されることがない(Gondai et al., Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 3, e18, Epub 2008 Jan 21)。

さらに、dsRNA分子を構成するセンス鎖又はアンチセンス鎖は、遺伝子の配列決定など種々の実験操作を円滑に行うために、siRNA活性に対して影響を与えない範囲で必要に応じて1~3塩基、さらに好ましくは1若しくは2塩基の置換、付加、欠失をさらに含んでも良い。

また、センス鎖又はアンチセンス鎖は必要に応じて、5'末端がリン酸化されていてもよく、shRNA分子については5'末端に三リン酸(ppp)が結合していてもよい。上記のようにセンス鎖の5'末端のGからなるオーバーハングに三リン酸(ppp)が結合していてもよい。

本発明において、好ましくはセンス鎖が、配列番号1で表されるヒトSTAT6遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の3426~3446番目の塩基を有する配列、3432~3452番目の塩基を有する配列、配列番号3で表されるマウスSTAT6遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の259~279番目の塩基を有する配列、及び3026番目~3046番目の塩基を有する配列からなる群から選択される塩基配列と同一であることが好ましく、特に配列番号1で表されるヒトSTAT6遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の3426~3446番目の塩基を有する配列、又は3432~3452番目の塩基を有する配列と同一であることが好ましい。

本願発明のdsRNA分子は、配列番号5で表されるセンス鎖と配列番号6で表されるアンチセンス鎖、配列番号7で表されるセンス鎖と配列番号8で表されるアンチセンス鎖、配列番号9で表されるセンス鎖と配列番号10で表されるアンチセンス鎖、配列番号11で表されるセンス鎖と配列番号12で表されるアンチセ

センス鎖、及び配列番号13で表されるセンス鎖と配列番号14で表されるアンチセンス鎖からなる群より選択されるいずれかの塩基対からなり、特に配列番号5で表されるセンス鎖と配列番号6で表されるアンチセンス鎖又は配列番号7で表されるセンス鎖と配列番号8で表されるアンチセンス鎖からなる dsRNA 分子が好ましい。

本発明の dsRNA は、化学合成や、プロモーター及び RNA ポリメラーゼを用いた転写系により *in vitro* で合成することができる。化学合成による合成は、互いに相補的な配列を逆方向配列として有し自己相補性を有する RNA 1 本鎖を合成し、自己相補性部分で結合させればよい。合成されたセンス鎖及びアンチセンス鎖のアニーリングは、当業者に公知である一般的な方法によって行うことができる。合成したセンス鎖及びアンチセンス鎖をそれぞれ dsRNA 用アニーリングバッファーに溶解し、等量（等モル数）を混合し、二本鎖が解離するまで温度を加熱し、その後徐々に冷却してインキュベートすることによって行うことができる。アニーリング条件は、例えば、90°Cにて1分間、続いて37°Cにて1時間静置することによって行えばよい。その後、フェノール/クロロホルム抽出・エタノール沈殿を行うことによって、dsRNA 分子を得ることができる。また、プロモーター及び RNA ポリメラーゼを用いた合成は、1つのプロモーターの下流にセンス鎖とアンチセンス鎖をループで連結した構造を有するテンプレート DNA を合成し RNA ポリメラーゼにより RNA を転写すればよい。センス鎖の5'末端にGからなるオーバーハング配列を付加するためには、プロモーターの末端にGからなる配列を付加すればよい。この際、DNA 配列には、適宜ターミネーター等の制御配列を含ませる。プロモーター及び/又はその他の制御配列はベクターに機能し得るかたちで連結する。「機能し得るかたちで連結する」とは、当該ベクターが導入された細胞において、プロモーター及び/又はその他の制御配列の制御の下、上記 dsRNA 分子が発現され標的となる STAT6 の mRNA が分解されるように、プロモーター及び/又はその他の制御配列を連結してベクターに組み込むことを意味する。ターミネーター配列としては、例えば、TTTTTT 配列を用いればよい。プロモーターとしては、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、時期特異的プロモーター等を用いることができ、*in vitro* で製造する場合、T3 プロモーター、T7 プロモ-

ター等が用いられる。ベクターに本発明の2本鎖RNAのテンプレートDNAを導入し、該ベクターを生体内に投与して生体内で2本鎖RNAを合成する場合、U6プロモーター、H1プロモーターなどのPo1III系プロモーター等が用いられる。ベクターを用いる場合、ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等を用いることができる。プラスミドベクターとしては、pBAsiベクター、pSUPERベクター等を用いればよく、ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を用いることができる。なお、本発明のdsRNAの合成にT7プロモーター等を用いた場合、Gからなる配列の存在によりT7プロモーターが活性化され、dsRNAの製造効率が高まるという利点もある。

本発明は、上記dsRNA分子を発現するベクターをも包含する。

本発明のdsRNA分子は、配列特異的にSTAT6のmRNAを切断し、その結果STAT6遺伝子の発現を抑制するRNA干渉(RNAi)を引き起こし、STAT6遺伝子をノックダウンすることができる。STAT6遺伝子がノックダウンされる結果、Th2サイトカイン、ケモカインの産生が抑制され、例えば、皮膚等の炎症部位において単核球、好酸球、好中球、肥満細胞、リンパ球等の浸潤が抑制され、炎症を抑制する。

本発明のdsRNA分子は、30塩基以上の長さで提供される場合、ダイサー(Dicer)と呼ばれるRNaseIII様酵素の作用によってプロセッシングされ、3'末端に2塩基のオーバーハングを有する21~27塩基のsiRNA(small interfering RNA)分子を生じ得る。このsiRNA分子が、RISC(RNA-induced silencing complex)と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、STAT6 mRNAをsiRNA分子との相同性により認識し分解し、STAT6遺伝子の発現抑制を行う。

本発明のdsRNA分子はアレルギー疾患の治療及び予防に用いることができる。ここで、アレルギー疾患には、鼻閉症、アレルギー性気管支炎、アレルギー性結膜炎、炎症性疾患、皮疹、じん麻疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎(花粉症)、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎、気管支喘息、小児喘息、食物アレルギー、薬物アレルギー、炎症性疾患、等が含まれる。

本発明は、STAT6遺伝子を標的とする上記のdsRNA分子を含むアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物を包含する。該組成物は、本発明のdsRNA分

子又はベクターの1種又は複数種を組み合わせて含んでもよい。例えば、配列番号5で表されるセンス鎖と配列番号6で表されるアンチセンス鎖、配列番号7で表されるセンス鎖と配列番号8で表されるアンチセンス鎖、配列番号9で表されるセンス鎖と配列番号10で表されるアンチセンス鎖、配列番号11で表されるセンス鎖と配列番号12で表されるアンチセンス鎖、及び配列番号13で表されるセンス鎖と配列番号14で表されるアンチセンス鎖からなるdsRNA分子の1種、2種又は3種を含んでいてもよい。

本発明のdsRNAの導入方法としては、被験体が細胞や組織の場合、細胞や組織と同時に培養することにより導入することができる。その他、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。被験体が動物個体の場合、経口ルート、鼻孔ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内の注射又は非経腸的ルートで投与することができる。喘息や鼻炎等の治療のためには、公知の浸透剤と混合した液体状態又はエアロゾル状態で投与することができる。また、皮膚炎等の治療のためには、軟膏の形態で皮膚の患部に塗布により局所投与され得る。該軟膏は、キャリアとして、脂肪、脂肪油、ラノリン、ワセリン、パラフィン、蝋、硬膏剤、樹脂、プラスチック、グルコール類、高級アルコール、グリセリン、水若しくは乳化剤、懸濁化剤を含む。この際、正電荷を有するポリマーであるカチオニックポリマーと混合して投与してもよい。カチオニックポリマーとしては、ポリエチエレンイミン(PEI、直鎖型若しくは分岐型)、ポリアミンや市販の遺伝子導入試薬が挙げられる。市販の遺伝子導入試薬として、Lipofectamine(登録商標)、Lipofectamine 2000、Lipofectamine RNAiMAXなどを挙げるることができる。

さらに、特定の部位に投与する場合、ドラッグデリバリーシステムを用いて特定部位にデリバリーしてもよい。ドラッグデリバリーシステムは種々の公知の方法があり、投与しようとする部位に応じて適当な方法を採用することができる。ドラッグデリバリーシステムとしては、例えば、キャリアとしてリポソーム、エマルジョン、ポリ乳酸等を利用した公知の方法等が挙げられる。投与は、医薬的に許容され得る希釈剤又はキャリアと混合して行うことが望ましい。適切なキャ

リアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。導入する dsRNA の量は、予防、治療しようとする疾患の種類、重篤度、被検体の年齢、体重等により適宜決定することができるが、疾患部の細胞 1 個当たり少なくとも、1 コピーの dsRNA が導入されるような量が好ましい。例えば 1 投与単位あたり、dsRNA 分子量で 1nM~100 μ M、好ましくは 10nM~50 μ M、より好ましくは 100nM~20 μ M である。

本発明において、RNA 干渉により STAT6 遺伝子の発現を抑制（サイレンシング）するとは、STAT6 遺伝子の発現を遺伝子の mRNA 又はタンパク質の発現量を指標に判定した場合に、本発明の dsRNA を導入しない場合に対して、100%抑制される場合のみならず、75%以上、50%以上あるいは 20%以上抑制される場合も含まれる。発現抑制の程度は、STAT6 遺伝子の mRNA 又はタンパク質の産生量を dsRNA 導入前後で比較すればよい。mRNA の場合は、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、in situ hybridization 等により測定することができ、タンパク質の場合は、ウエスタンブロッティング、ELISA、抗体を結合させたプロテインチップを用いた測定、タンパク質の活性測定等により測定することができる。また、センス鎖の 5' 端に 1 個又は数個の G からなるオーバーハングを有する本発明の dsRNA は、細胞や個体に導入しても該細胞、個体でインターフェロン反応を引き起こさない。インターフェロンを誘導しないとは、インターフェロン α 又は β の発現を誘導しないことをいい、インターフェロンの合成のみならず、インターフェロンが関与するパスウェイを活性化しないことを含む。インターフェロンの発現が 100%抑制される場合のみならず、75%以上、50%以上、20%又は 10%以上抑制される場合も含まれる。インターフェロン反応の有無は、インターフェロン自体又はインターフェロンの mRNA の産生を測定することにより決定することができる。この測定には、上記のようにノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、in situ hybridization、ウエスタンブロッティング、ELISA、抗体を結合させたプロテインチップを用いた測定、タンパク質の活性測定を行えばよい。

さらに、本発明の dsRNA は、細胞や個体に導入しても該細胞や、個体の細胞に細胞障害を誘導しないことを特徴とする。一般的に二本鎖 RNA を投与した場合、

dsRNA 依存的プロテインキナーゼ (PKR) の活性化により、細胞障害を誘導し得るが、本発明の dsRNA は PKR を活性化することがなく細胞障害を誘導することもない。ここで、細胞障害とは、細胞が正常の機能を発揮しないか、あるいは増殖が抑制される程度障害を受けていることをいい、アポトーシス、ネクローシス等の細胞死を含む。本発明において、細胞障害を誘導しないとは、細胞障害を全く誘導しない場合のみならず、センス鎖の 5' 末端に G からなる配列を付加しない 2 本鎖 RNA を導入した場合に比べ、細胞障害を起こす細胞の数が 75% 以下、50% 以下、20% 以下、又は 10% 以下である場合を含む。細胞障害が誘導されたか否かは、細胞を観察し細胞変性効果 (CPE) が出現したかどうかを調べることによりわかり、また、細胞の代謝活性を測定したり、トリパンブルー等の色素排除アッセイにより判断することができる。本発明の dsRNA は、インターフェロン誘導及び細胞障害の両方を誘導しないか、又はインターフェロン誘導又は細胞障害のいずれかを誘導しない。上記のように本発明において、「インターフェロン及び／又は細胞障害を誘導せずに」とは、誘導が完全に阻害される場合だけではなく、誘導が減じられる場合も含む。また、インターフェロン及び／又は細胞障害の誘導の阻害も試験系や被験体によって、程度が異なってくることがあるが、少なくとも一つの系又は被験体においてインターフェロン及び／又は細胞障害を誘導しなければ、本発明のインターフェロン及び／又は細胞障害を誘導しない dsRNA に含まれる。

本発明は、さらに本発明の dsRNA を生物体に投与して、該生物体において STAT6 遺伝子の発現をインターフェロンの発現を誘導せずに抑制する方法、本発明の dsRNA を動物に投与して、STAT6 遺伝子が関与するアレルギー疾患を、インターフェロンの発現を誘導せずに予防、治療する方法を包含する。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

方法

動物

BALB/c マウスは三協ラボサービス株式会社より購入した。全てのマウスは無菌環境施設で、東京医科歯科大学の動物実験ガイドラインに基づき、餌と水を与え飼育した。実験には 7-12 週齢のマウスを用い、1 グループは少なくとも 4 匹以上

とした。

ヒト STAT6 siRNA (small interfering RNA) 及び shRNA (small hairpin RNA) の作成並びにそれらの効果判定

実験に使用する small RNA である STAT6 siRNA 及び STAT6 shRNA はハプロファーマ社 (株) との共同研究により作製した。既存のものよりも強力な RNAi を誘導する理論 (Ui-Tei K, et al., Nucleic Acids Res. (2004). 32: 936-948) を基盤として、BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml>; off target 効果の回避) の利用並びに mRNA の高次構造を予測 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~zukerm/>) をすることにより、まず、siRNA の候補配列を決定した。

候補配列は 6 つであり、各々の効果は、ヒトの皮膚組織生検から採取したヒト正常皮膚線維芽細胞に導入して評価した。効率のよい RNA 干渉を示す配列の siRNA を選定した後、その配列をもとにして、導入時の非特異的反応 (インターフェロン応答) がほとんどみられないという特長をもつ shRNA を作成し、同様に RNAi の効果検討を行った。

マウス STAT6 siRNA の候補選定

In vivo における実験はマウスを用いる予定であったため、マウス STAT6 siRNA についてもヒトと同様に in vitro における検討を行う必要があった。そこでマウス STAT6 siRNA の配列候補をヒトの場合と同じ理論をもとに 3 種類設計した。RNA 干渉の効果判定に関しては新生児マウス背部の皮膚より採取した正常線維芽細胞を用いた。

細胞の培養と刺激

STAT6 siRNA の細胞内導入は Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 社) にて行った。

細胞内導入は 2 種類のプロトコールで行った。それぞれのプロトコールを図 1A 及び B に示す。

実験プロトコール 1

6well プレートに正常線維芽細胞を播種する。培養は培養液として Dullbeco' s modified Eagle' s medium (DMEM; Sigma 社) に 10% fetal calf serum (FCS; Sigma

社)と 1% antibiotics/antimycotics (Gibco-BRL 社)を添加したものをを用い、37°C、5% CO₂の条件下で行った。60~70% subconfluent の状態で siRNA 又は shRNA を導入し、導入後、さらに 48 時間培養を継続し細胞を回収する。

実験プロトコール 2

siRNA 又は shRNA の導入はプロトコール 1 と同様に行う。導入後、培養液を DMEM に 2%FCS と 1 % antibiotics/antimycotics を添加したものに変更した (Serum starvation)。24 時間後に rhIL-4 (マウスでは rmIL-4 10ng/mL と TNF α 40ng/mL) (全て R & D 社) で細胞を刺激し、その 24 時間後に細胞上清を回収する。

shRNA は、ダイサー (Dicer) に分解される前段階で細胞内に導入されるため、二本鎖を別々に発現する siRNA より特異的に働き、また、導入によるインターフェロン応答を軽減できる。shRNA と siRNA の構造を図 2 に示す。

ハプテンによる急性接触過敏反応の誘導

Day0 に 5%2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) (in acetone: olive oil=4:1) (Nacalai Tesque 社)、0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) (in acetone: olive oil=4:1) (Nacalai Tesque 社) 、又は 5% 4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolone (Oxazolone) (in acetone: olive oil=4:1) (Sigma 社)を剃毛腹部にそれぞれ 50 μ L 塗布して感作した。(DNFB のみ Days0、1 の連日塗布。) その後、Day5 で耳介に 1% TNCB (in acetone: olive oil =1:4)、0.2%DNFB (in acetone: olive oil=4:1)、又は 1%Oxazolone (in acetone: olive oil=4:1)をそれぞれ耳介に 20 μ L 塗布して惹起。接触過敏反応の指標として耳介腫脹を、dial thickness gauge (Peacock 社)を用いて測定した。

Western blot 法

細胞からのタンパク抽出は Cell lysis buffer (Cell signaling 社)を用いた。電気泳動後、Hybond-P (Amersham pharmacia biotech 社)に転写。電気泳動は 80V 30min、その後 130V 60min の条件で行った。1次抗体として、抗ヒト β -アクチン抗体又は抗 mouse β -アクチン抗体と、抗ヒト STAT6 抗体又は抗 mouse STAT6 抗体(共に Santa Cruz Biotechnology 社)を用いて反応後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラビット immunoglobulins 抗体(DAKO)と反応。発色には ECL plus Western blotting detection Reagents (GE Healthcare)を用いた。

RNA の抽出と逆転写

正常線維芽細胞からの RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン社)を用いて行った。逆転写は hexanucleotide mixture (A260; 6.25U/ml) (Roche 社)、dNTPs (0.125mM) (Takara Bio 社)、human placenta RNase inhibitor (80U) (Takara Bio 社)、reverse transcriptase (400U; Moloney murine leukemia virus) (Takara Bio 社)を含んだ反応緩衝液と 800ng の RNA を用いて行った。全量を 40 μ L とし、37°C 60min で反応を行った。

定量的 Polymerase chain reaction (PCR)

定量的 PCR 反応は、Stratagene 社の Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix を用いて、プロトコルに従って行った。測定には Mx3000P Real-Time PCR system (Stratagene 社)を用いた。

STAT6 siRNA のマウスへの投与

Day3 に STAT6 siRNA (in OPTI-MEM (登録商標) I: Lipofectamine™2000= 50: 1) を耳介皮下に 30 μ L 投与(1nmol/ear)した。

STAT6 siRNA 含有軟膏

STAT6 siRNA 含有軟膏は、親水ワセリンを基剤として 2%となるよう調製した。この軟膏を、Day3 に耳介に 10nmol/ear となるように塗布した。

鼻炎モデルマウスの作成

Days 0, 7, 14, 21 に ovalbumin (albumin from chicken egg white, Grade V) (OVA) (Sigma 社) 0.1mg、alum 1mg を腹腔内投与して感作。Days 21 から 27 にかけて 0.2mg/日の OVA を連日鼻腔内に吸入させて惹起した。鼻炎の症状の指標として、Day 27 の最終惹起直後に 5 分間あたりのくしゃみの回数をカウントした。

病理組織学的検討

接触過敏反応モデルでは、耳介組織を回収し、10%ホルマリンで固定してパラフィンブロックを作成。これを薄切し、May- Grunwald- Giemsa 染色にて病理組織学的検討を行った。鼻炎モデルでは、最終惹起 12hr 後の鼻粘膜組織切片を May- Grunwald- Giemsa 染色にて病理組織学的検討を行った。細胞数は、400 倍の視野下で単核細胞、好中球、好酸球、肥満細胞の浸潤細胞数を少なくとも 5 視野数えて数値化した。

統計学的解析

統計学的有意差は、Student's t-test を用いて検討した。

結果

1. ヒト STAT6 siRNA 導入による STAT6 の発現抑制

作成したヒト STAT6 siRNA の 6 つの候補配列について、効率よく STAT6 発現を抑制できる配列の検討を Western blot 法を用いて行った。図 3 に結果を示す。図 3 中、2~7 レーンは今回新規に作成した 6 種類の STAT6 siRNA であり、既存の配列 (Rippmann JF et al., FEBS Lett. (2005). 579: 173-178) は 8 レーンである。新規作成したもののうち 4、5 レーンについては既存のものに比して明らかに強力な STAT6 発現の抑制効果を示している。

そこで以下の実験にはこの 2 配列の STAT6 siRNA を用いることにした (以後、3424=STAT6 siRNA 3、3430=STAT6 siRNA 4 とする)。塩基配列は以下のごとくである。

3424 (STAT6 siRNA 3)

5' - GCUUCUGAUACGUGUAUGAGA sense strand (配列番号 5)

UCCGAAGACUAUGCACAUACU - 5' anti-sense strand (配列番号 6)

3430 (STAT6 siRNA 4)

5' - GAUACGUGUAUGAGACUAUGC sense strand (配列番号 7)

GACUAUGCACAUACUCUGAUA - 5' anti-sense strand (配列番号 8)

2. ヒト STAT6 siRNA を導入したヒト線維芽細胞による eotaxin-3 産生

IL-4 刺激により、STAT6 経路に依存してヒト線維芽細胞から産生される eotaxin-3 の産生は、実験 1 により選定された STAT6 siRNA 3 あるいは STAT6 siRNA 4 の導入によって有意に抑制された。図 4 に ELISA で測定した結果を示す。また、無刺激状態での線維芽細胞からの eotaxin-3 産生には影響を与えなかった (data not shown)。

3. ヒト STAT6 shRNA を導入したヒト線維芽細胞における STAT6 の発現抑制

上記実験 1、2 で効果がみられた siRNA 2 つの配列をもとにして shRNA を作製した (それぞれ STAT6 shRNA3、STAT6 shRNA4)。そして、これらの in vitro での STAT6 発現への効果を検討した。まず、Real time PCR 法にて確認した STAT6 の

mRNA レベルの発現は、siRNA の結果と同様、新規配列の 2 つにおいてより強力な抑制効果が得られた)。図 5 に ELISA で測定した結果を示す。

Western blot 法を用いて検討したタンパクレベルにおける STAT6 の発現も、shRNA の導入によって抑制されている。既存の配列をもとにした shRNA も同等の STAT6 の発現抑制をみているが (図 6 の第 3 レーン)、 β -アクチンとの比較をみると今回新たに作成した配列のほうがより強力な抑制効果をもつと考えられる (図 6)。

4. ヒト STAT6 shRNA を導入したヒト線維芽細胞による eotaxin-3 産生

shRNA 導入にても、siRNA 導入時と同様、新規作成したものが既存のものより強い eotaxin-3 産生抑制効果がみられた。図 7 に ELISA で測定した結果を示す。

5. マウス STAT6 siRNA 導入による、正常線維芽細胞における STAT6 発現への効果

マウス STAT6 siRNA の候補配列を以下に示す。図 8 に STAT6 タンパク発現の抑制を Western blot 法にて確認した結果を示す。図 8 に示すように、STAT6 siRNA 1, 2, 3 の全てに STAT6 タンパク発現を抑制する効果が見られた。その中でも最も効率よく STAT6 タンパク発現を抑制した STAT6 siRNA 3 を以後 STAT6 siRNA として用いた。図 9 に STAT6 mRNA 発現の抑制を RT-PCR により確認した結果を、図 10 に IL-4(10ng/mL) と TNF-alpha(40ng/mL) の共刺激により産生される eotaxin (CCL11)濃度を ELISA 法にて定量した結果を示す。図 9 及び 10 に示すように、STAT6 mRNA の発現、eotaxin (CCL11)の産生に関しても、新たに開発したマウス STAT6 siRNA は抑制効果を示した。

マウス STAT6 siRNA 1

5' - GCCGAGGCACCCUGUAUAUCC sense strand (配列番号 9)
GACGGCUCCGUGGGACAUAUA - 5' anti-sense strand (配列番号 10)

マウス STAT6 siRNA 2

5' - CCUGGUUCUGUUAAGGAUUCA sense strand (配列番号 11)
GGGACCAAGACAAUCCUAA - 5' anti-sense strand (配列番号 12)

マウス STAT6 siRNA3

5' - CGAAUGUGAUACAACUGUAUC sense strand (配列番号 13)

GAGCUUACACUAUGUUGACAU - 5' anti-sense strand (配列番号 1 4)

6. STAT6 siRNA による接触過敏反応への効果

TNCB、DNFB、Oxazolone による接触過敏反応は、STAT6 siRNA の耳介への皮下投与により有意に抑制された(図 1 1)。また、TNCB に対する接触過敏反応においてギムザ染色により病理組織学的検討を行ったところ、STAT6 siRNA を投与した群において、コントロール群と比較して、顕著な浮腫の軽減と細胞浸潤の減少がみられた(図 1 2)。浸潤している細胞のプロフィール検討では、単核細胞、好酸球、好中球、脱顆粒している肥満細胞において細胞数の減少がみられた(図 1 3)。

7. STAT6 siRNA 含有軟膏による接触過敏反応への効果

STAT6 siRNA 含有軟膏を作成し、耳介に塗布したところ、コントロール群と比較して耳介腫脹に有意な抑制が得られた(図 1 4)。この結果から、STAT6 siRNA は軟膏としての使用が可能と考えられた。

8. 鼻炎モデルに対する STAT6 siRNA の効果

OVA 感作マウスの鼻腔に Days 21 から 27 にかけて連日 OVA を吸入させて鼻炎反応を誘発。そして、Days 22, 23, 24 に PBS に溶解した STAT6 siRNA (3nmol/day) を鼻腔内に投与して、その治療効果を検討した。その結果、STAT6 siRNA の投与により、くしゃみの回数が有意に減少した(図 1 5)。炎症反応の抑制は、好酸球浸潤の顕著な減少など、病理組織学的にも確認された。図 1 6 にギムザ染色の結果を、図 1 7 に好酸球浸潤数を示す。

産業上の利用可能性

本発明による dsRNA 分子を用いて、STAT6 遺伝子の発現を特異的に抑制することができ、それによって Th2 型サイトカイン及びケモカインの産生を阻害することができ、その結果アレルギー疾患を予防及び治療することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号 5 から 1 4 合成

請求の範囲

1. STAT6 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) 分子であって、以下の(a)又は(b)の dsRNA 分子：

(a) 一方の鎖が配列番号 1 又は 3 で表される STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列中の 15～50 個の連続した塩基を有する配列に同一なセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である；又は

(b) 一方の鎖が配列番号 1 又は 3 で表される STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列中の少なくとも 15～50 個の連続した塩基を有する配列において 1 又は数個の塩基が欠失、置換若しくは付加した配列であって、STAT6 遺伝子にハイブリダイズし得る配列からなるセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である。

2. dsRNA 分子が、以下の(c)又は(d)である、請求項 1 記載の dsRNA 分子：

(c) 一方の鎖が配列番号 1 で表されるヒト STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 3426～3446 番目の塩基を有する配列、3432～3452 番目の塩基を有する配列、配列番号 3 で表されるマウス STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 259～279 番目の塩基を有する配列、及び 3026 番目～3046 番目の塩基を有する配列からなる群から選択される塩基配列と同一なセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖である；又は

(d) 一方の鎖が配列番号 1 で表されるヒト STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 3426～3446 番目の塩基を有する配列、3432～3452 番目の塩基を有する配列、配列番号 3 で表されるマウス STAT6 遺伝子配列においてチミンがウラシルに置換された塩基配列の 259～279 番目の塩基を有する配列、及び 3026 番目～3046 番目の塩基を有する配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列において 1 又は数個の塩基が欠失、置換若しくは付加した配列であって、STAT6 遺伝子にハイブリダイズし得る配列からなるセンス鎖であり、他方の鎖が該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖であ

る。

3. dsRNA 分子が、配列番号 5 で表されるセンス鎖と配列番号 6 で表されるアンチセンス鎖、配列番号 7 で表されるセンス鎖と配列番号 8 で表されるアンチセンス鎖、配列番号 9 で表されるセンス鎖と配列番号 10 で表されるアンチセンス鎖、配列番号 11 で表されるセンス鎖と配列番号 12 で表されるアンチセンス鎖、及び配列番号 13 で表されるセンス鎖と配列番号 14 で表されるアンチセンス鎖からなる群より選択されるいずれかの塩基対からなる、請求項 2 記載の dsRNA 分子。

4. センス鎖とアンチセンス鎖がリンカー分子を介して連結されている、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分子。

5. 請求項 4 に記載の dsRNA 分子のテンプレート DNA を含み該 dsRNA 分子を発現するベクター。

6. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分子を 1 つ又は複数含む、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

7. 請求項 5 記載のベクターを含む、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

8. センス鎖の 5' 末端に 1 個又は複数の G (グアニン) からなるオーバーハング塩基を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 分子。

9. センス鎖とアンチセンス鎖がリンカー分子を介して連結されている、請求項 8 記載の dsRNA 分子。

10. 請求項 9 に記載の dsRNA 分子のテンプレート DNA を含み該 dsRNA 分子を発現するベクター。

11. 請求項 8 又は 9 に記載の dsRNA 分子を 1 つ又は複数含む、インターフェロン及び/又は細胞障害を誘導しない、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

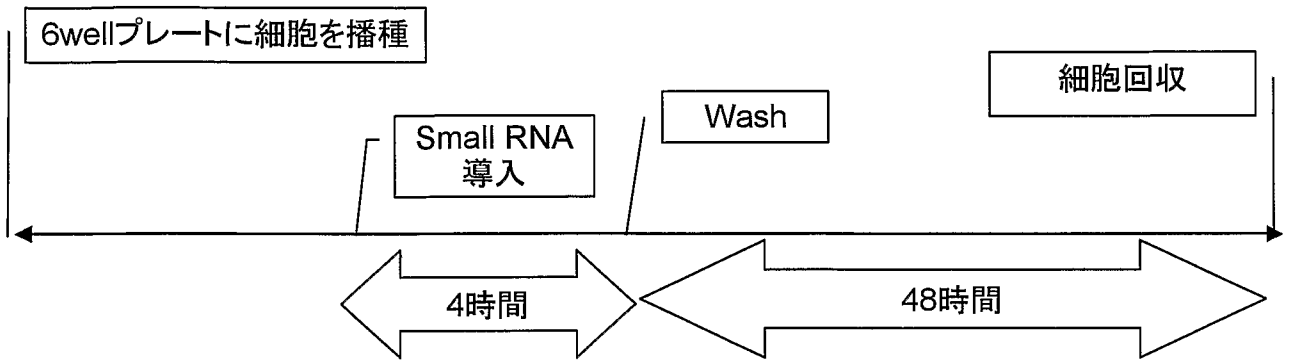
12. 請求項 10 に記載のベクターを含む、インターフェロン及び/又は細胞障害を誘導しない、STAT6 遺伝子の発現を抑制し得るアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

13. 鼻腔投与するための、請求項6、7、11又は12に記載のアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

14. 皮膚に塗布するための軟膏である、請求項6、7、11又は12に記載のアレルギー疾患の治療又は予防のための医薬組成物。

図 1

A



B

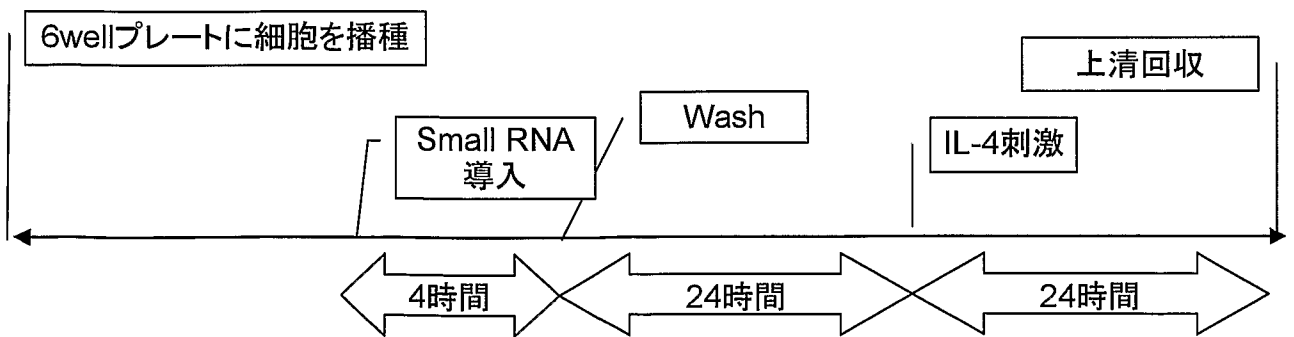


図 2

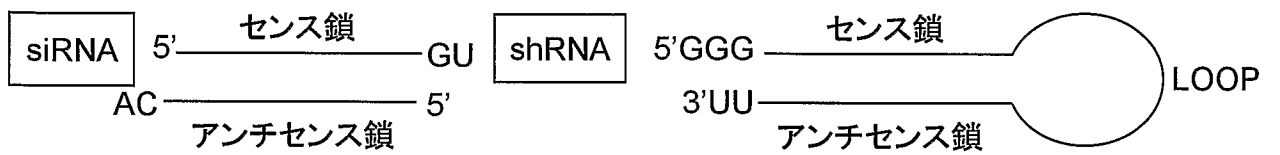
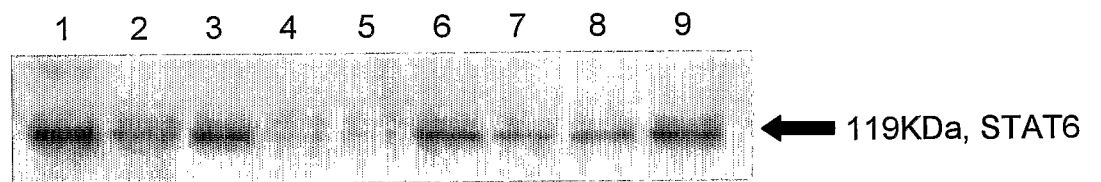


図 3



1: 溶媒、2: 764、3: 2623、4: 3424、5: 3430、
6: 3575、7: 3576、8: 既存のもの、9: Scramble RNA

図 4

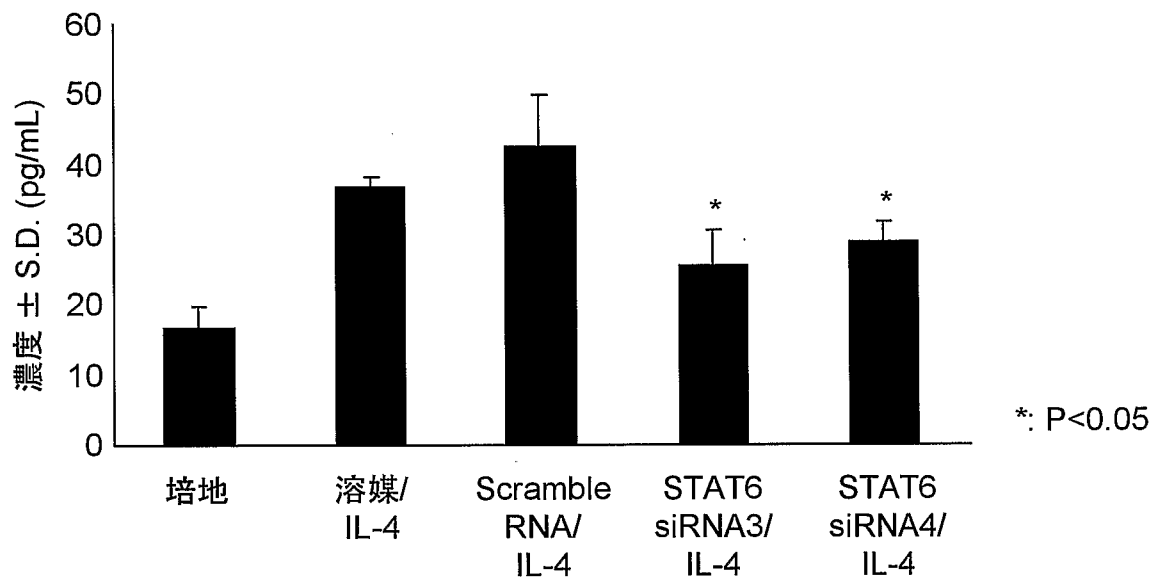


図 5

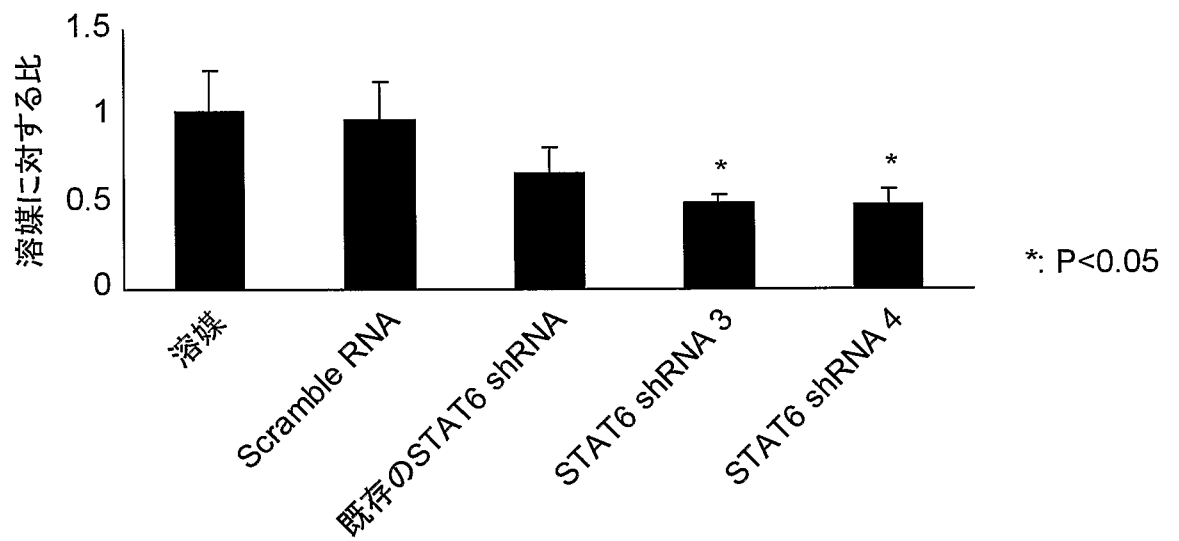
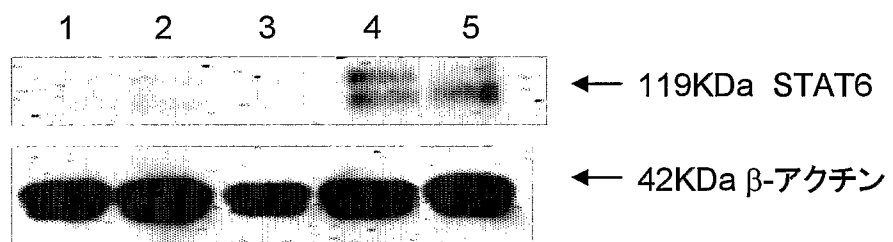


図 6



- 1: STAT6 shRNA3
- 2: STAT6 shRNA4
- 3: 既存の配列のshRNA
- 4: Scramble RNA
- 5: 溶媒

図 7

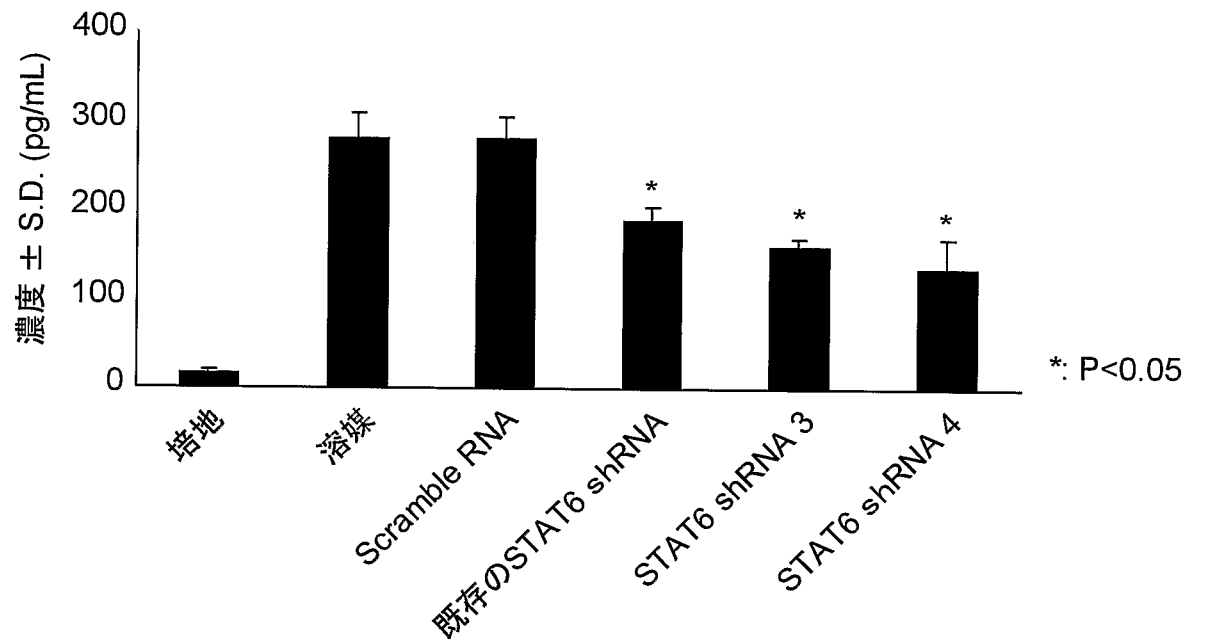
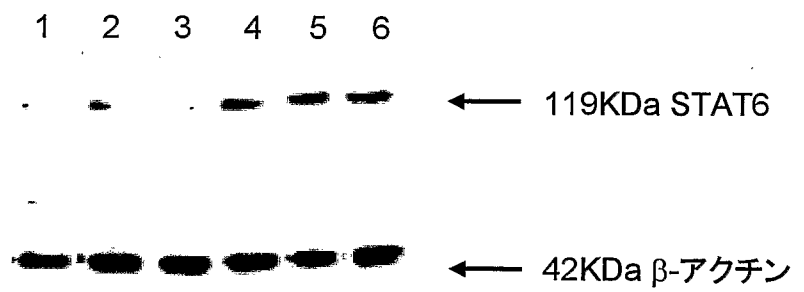


図 8



- 1: STAT6 siRNA 1
- 2: STAT6 siRNA 2
- 3: STAT6 siRNA 3
- 4: Scramble RNA
- 5: 溶媒
- 6: 無処置

図 9

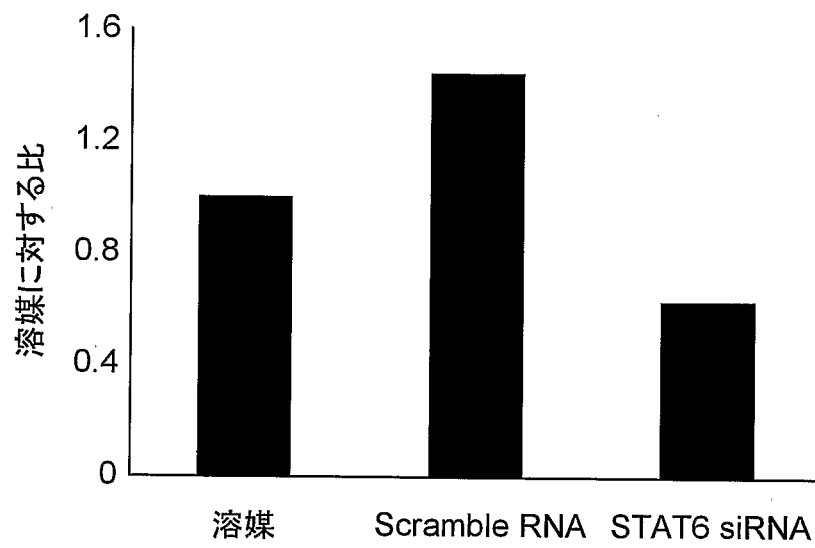


図 10

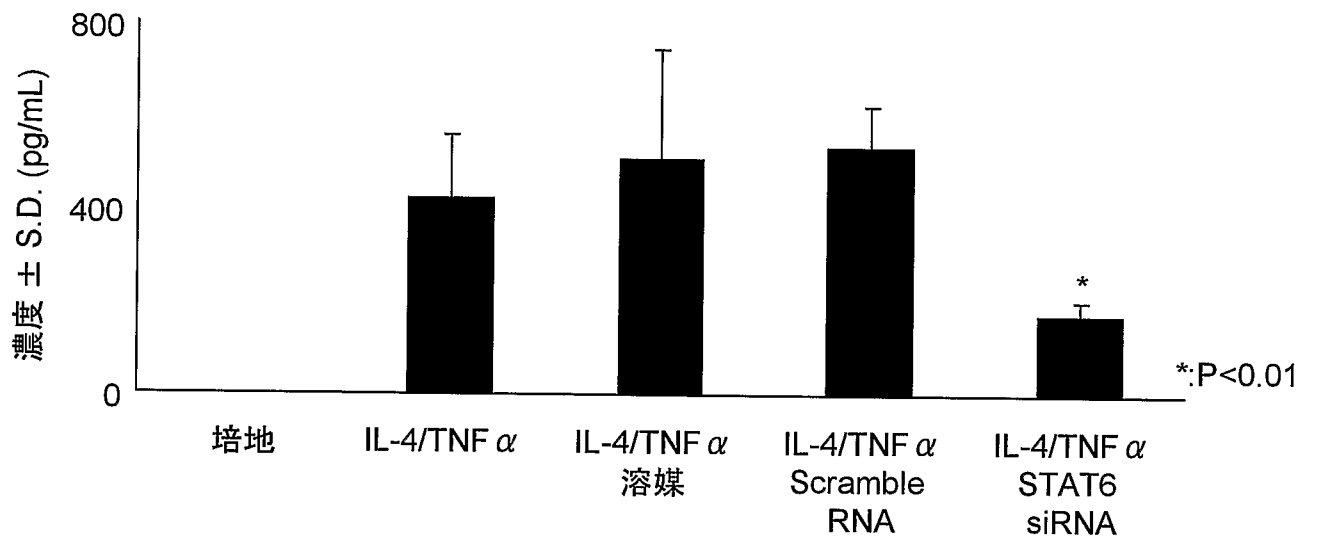


図 1 1

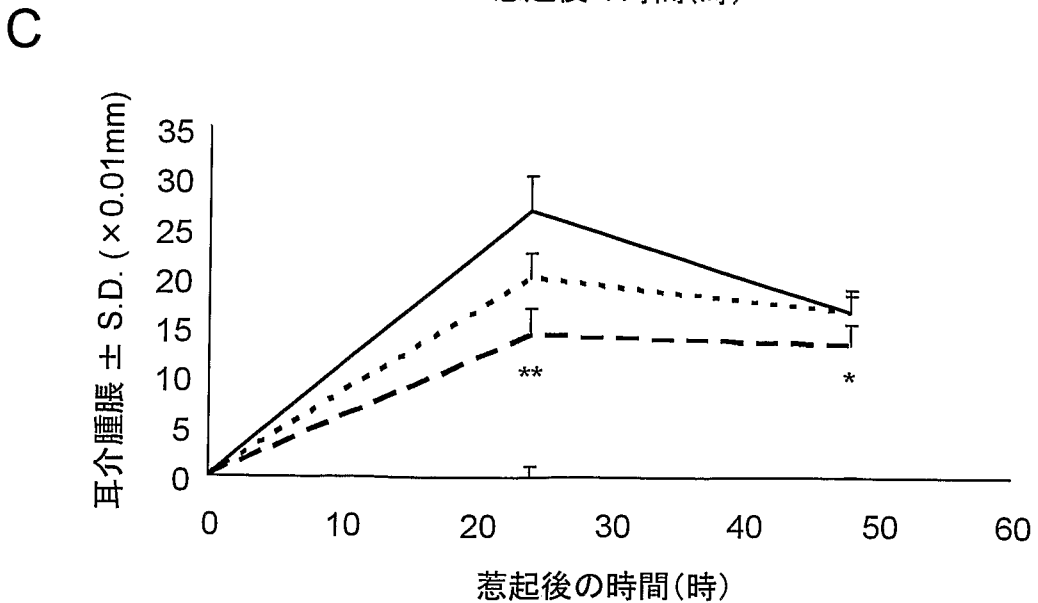
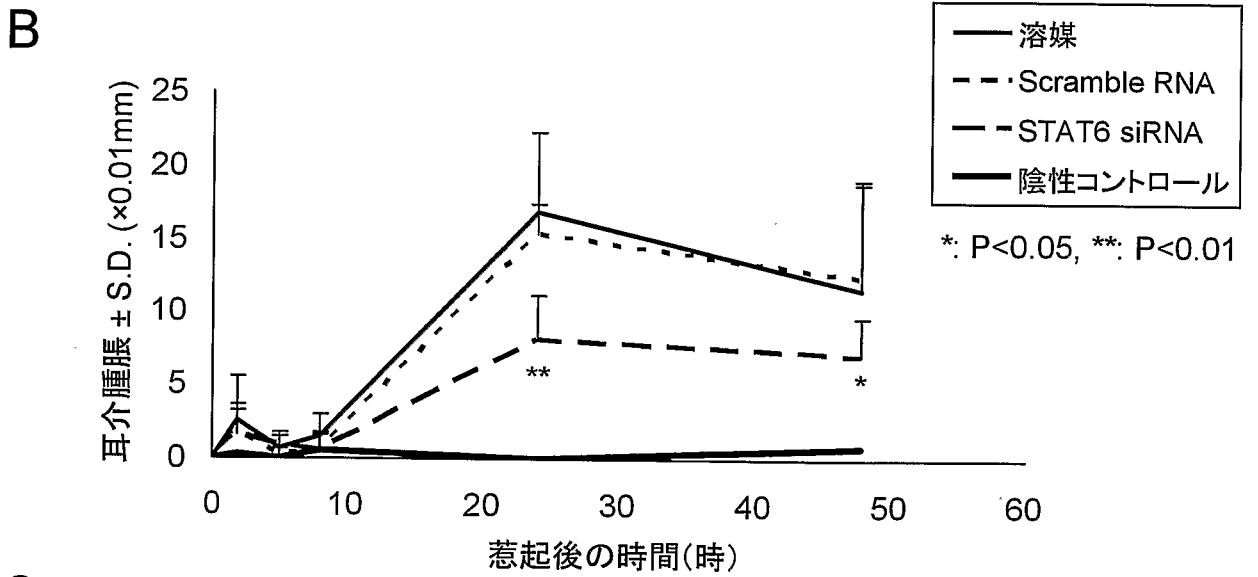
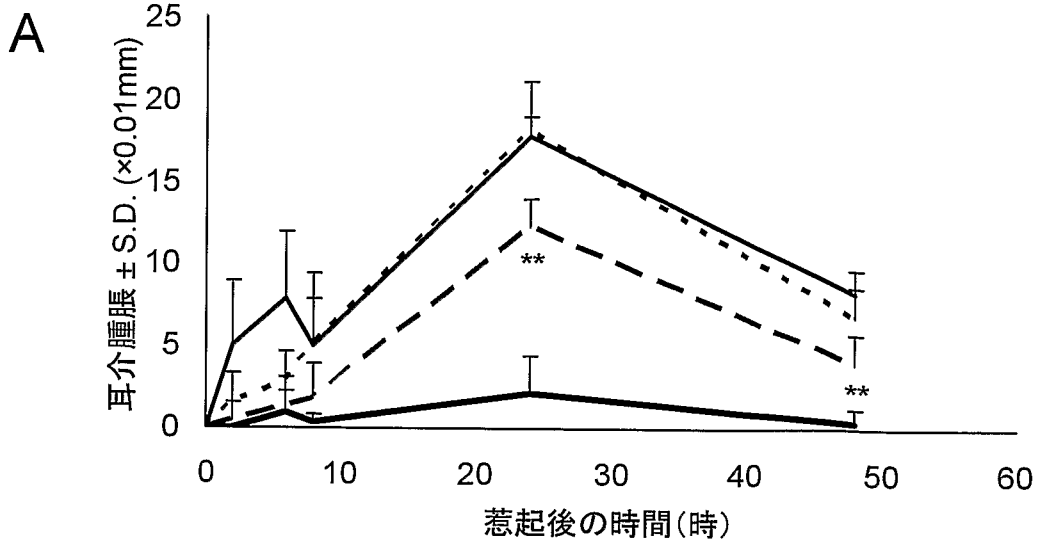


図 1 2

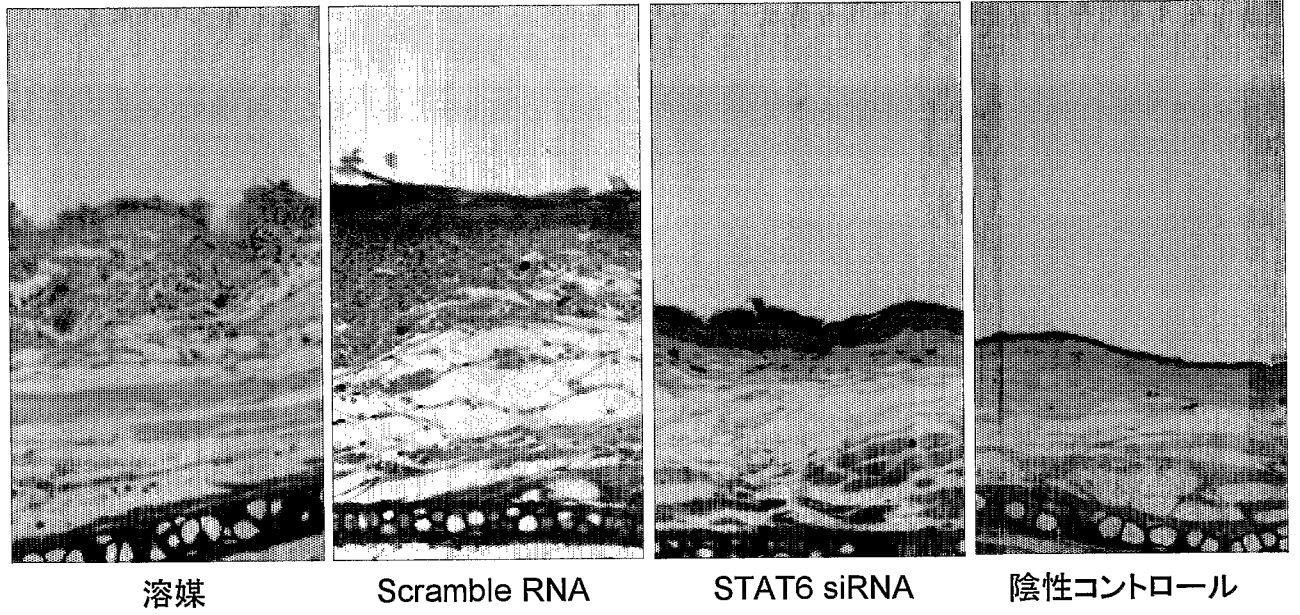


図 1 3

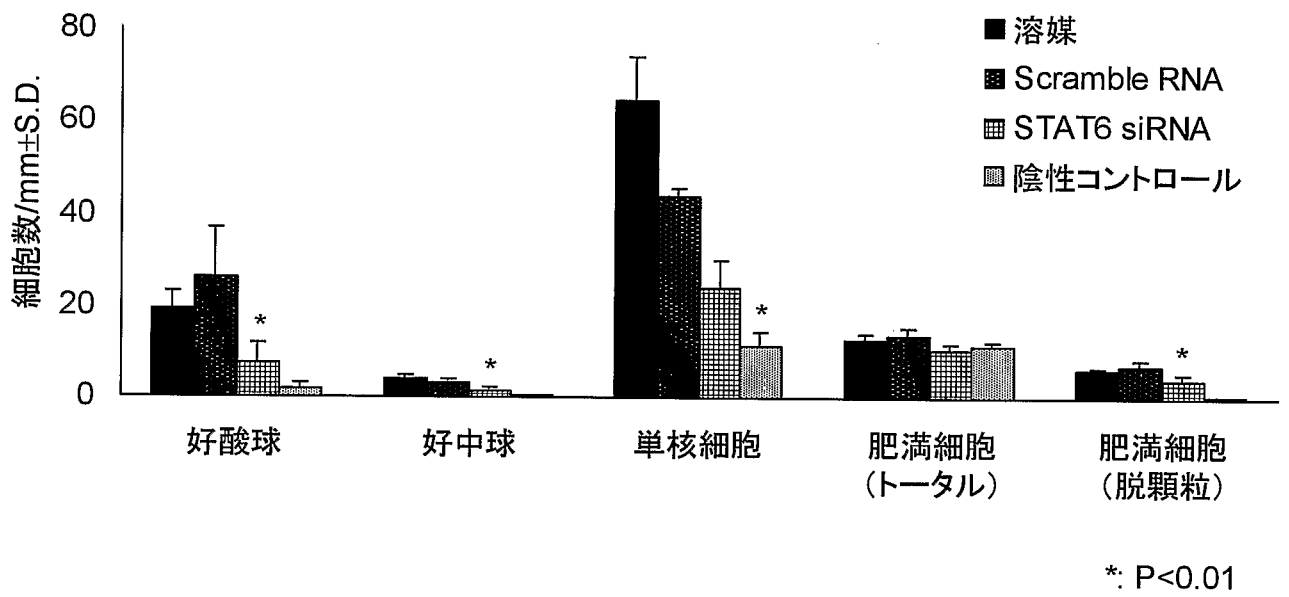


図 1 4

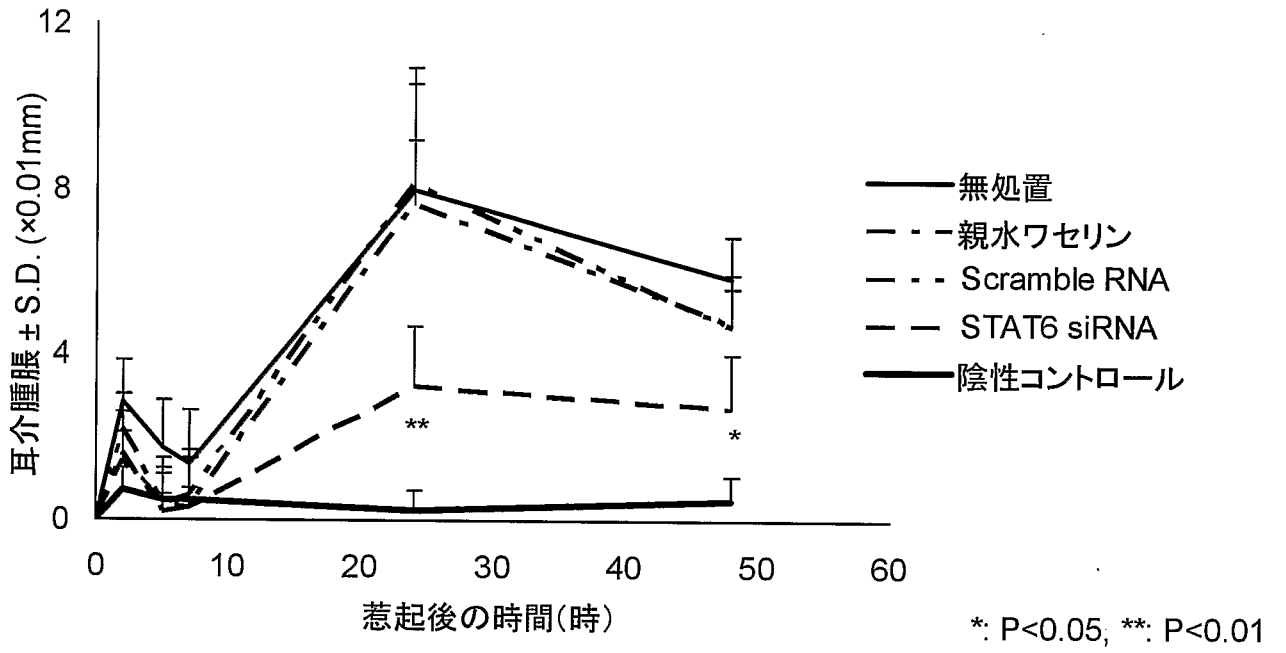


図 15

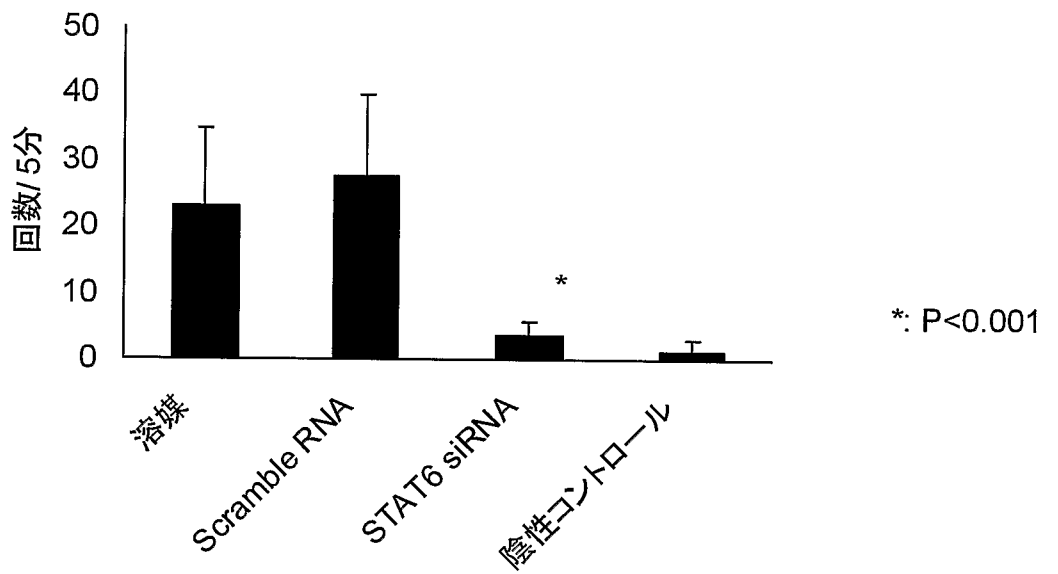
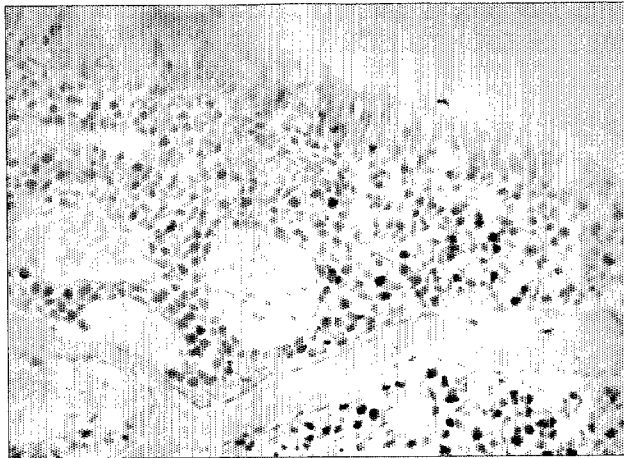


図 16

溶媒



STAT6 siRNA

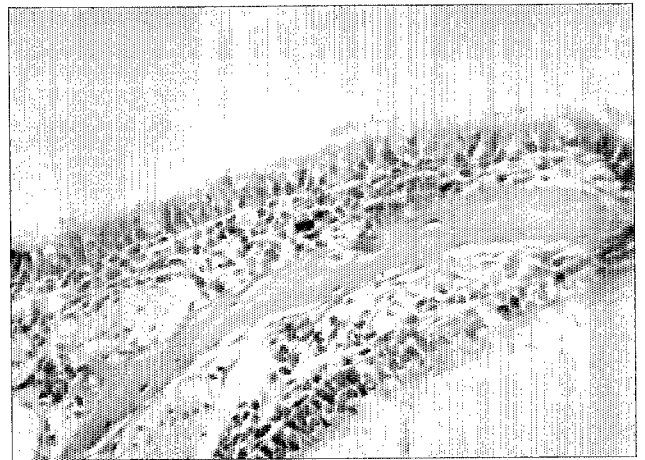
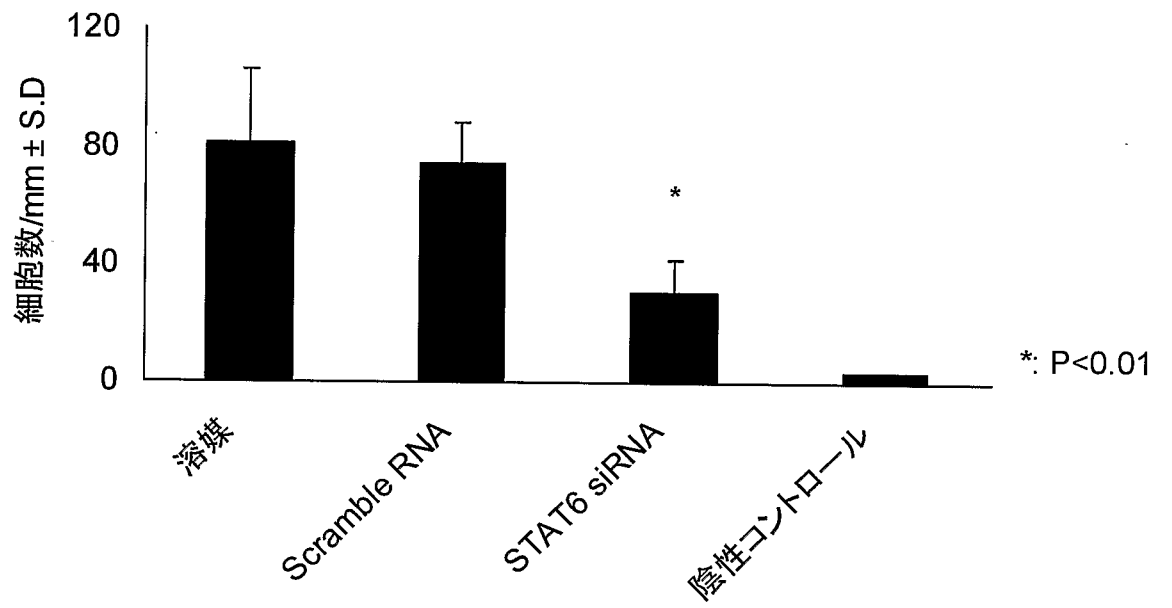


図 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/055383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/00 (2006.01) i

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)
C12N15/00

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X/A | JP 2007-523658 A (Arana Erutidi), 23 August, 2007 (23.08.07), Full text & WO 2005/083083 A2 & EP 1725658 A2 & US 2008/0234212 A1 | 1, 2, 4-14/3 |
| X/A | JP 2007-523159 A (Genesis Research and Development Co., Ltd.), 16 August, 2007 (16.08.07), Full text & WO 2005/080410 A1 & EP 1716164 A1 & US 2005/0202077 A1 | 1, 2, 4-14/3 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "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 |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "&" document member of the same patent family |
| "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 | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 07 April, 2009 (07.04.09) | Date of mailing of the international search report 14 April, 2009 (14.04.09) |
|--|---|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055383

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X/A | RIPPMANN J.F. et al., Gene silencing with STAT6 specific siRNAs blocks eotaxin release in IL-4/TNF α stimulated human epithelial cells., FEBS Lett., 2005, vol. 579, no. 1, p. 173-178, full text | 1,2,4-14/3 |
| X/A | Ken IKAWA et al., "RNA Kansho o Riyo shite STAT6 no Kino o Sogai suru Koto ni yoru Hifu Allergy-sei Ensho no Yokusei", Japanese Journal of Dermatology, 25 March, 2008 (25.03.08), Vol.118, No.4, (Special Extra Issue), page 863(SH2-4), full text | 1,2,4-14/3 |
| X/A | HOSOYA K., et al., Treatment of the allergic cutaneous inflammation in mouse model by STAT6 inhibition with RNA interference., J. Invest. Dermatol., 2008.04, vol. 128, no. suppl. 1, p. S122.(730) | 1,2,4-14/3 |
| X/A | WO 2005/116210 A2 (HALMON BEHEER B.V.), 08 December, 2005 (08.12.05), Full text & EP 1751285 A2 | 1,2,4-10/3, 11-14 |
| A | WO 2006/124686 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.), 23 November, 2006 (23.11.06), Full text & EP 1888782 A2 US 2006/0258610 A1 | 1-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055383

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:

The matter common to claims 1 to 14 resides in "a double-stranded RNA (dsRNA) molecule targeting mRNA in STAT6 gene". However, document 1 [JP 2007-523658 A (ARANA LTD), August 23, 2007 (08.23.07)], document 2 [JP 2007-523159 A (GENESIS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION LIMITED), August 16, 2007 (08.16.07)] and document 3 [FEBES Lett., 2005, vol. 579, no. 1, p.173-178] individually disclose that an siRNA to mRNA of STAT6 gene was constructed and this siRNA is usable in treating an allergic disease. Thus, the above-described special technical feature falls within the category of prior art and, therefore, cannot be considered as a special technical feature in the meaning under PCT Rule 13.2.

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.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

| | | |
|--|---|----------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| X/A | JP 2007-523658 A (アラーナ エルティードイー) 2007.08.23, 全文, & WO 2005/083083 A2 & EP 1725658 A2 & US 2008/0234212 A1 | 1,2,4-14/3 |
| X/A | JP 2007-523159 A (ジェネシス リサーチ アンド デベロップメント コーポ レイション リミテッド) 2007.08.16, 全文, & WO 2005/080410 A1 & EP 1716164 A1 & US 2005/0202077 A1 | 1,2,4-14/3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 07.04.2009 | 国際調査報告の発送日 14.04.2009 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 中野 あい 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4B 3758 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| X/A | RIPPMANN J.F. et al., Gene silencing with STAT6 specific siRNAs blocks eotaxin release in IL-4/TNF α stimulated human epithelial cells., FEBS Lett., 2005, vol. 579, no. 1, p. 173-178, 全文 | 1,2,4-14/3 |
| X/A | 井川健 他 RNA 干渉を利用して STAT6 の機能を阻害することによる皮膚アレルギー性炎症の 抑制, 日皮会誌, 2008.03.25, vol. 118, no. 4 (臨時増刊号) , p. 863 (SH2-4), 全文 | 1,2,4-14/3 |
| X/A | HOSOYA K., et al., Treatment of the allergic cutaneous inflammation in mouse model by STAT6 inhibition with RNA interference., J. Invest. Dermatol., 2008.04, vol. 128, no. suppl. 1, p. S122.(730) | 1,2,4-14/3 |
| X/A | WO 2005/116210 A2 (HALMON BEHEER B. V.) 2005.12.08, 全文 & EP 1751285 A2 | 1,2,4-10/3,11-14 |
| A | WO 2006/124686 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2006.11.23, 全文 & EP 1888782 A2 & US 2006/0258610 A1 | 1-14 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-14に共通の事項は「STAT6 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) 分子」であるが、文献1 [JP 2007-523658 A (アラナー エルティエディー) 2007.08.23]、文献2 [JP 2007-523159 A (ジェネシス リサーチ アンド デベロップメント コーポレイション リミテッド) 2007.08.16]、文献3 [FEBS Lett., 2005, vol. 579, no. 1, p. 173-178] には、それぞれ、STAT6 遺伝子の mRNA に対する siRNA を作製したこと、また該 siRNA がアレルギー性疾患の治療に利用できることが記載されており、上記特別な技術的特徴は先行技術の域を出るものではなく、PCT 規則 13.2 における特別な技術的特徴であるとはいえない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。