

(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
2014年5月22日(22.05.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/077354 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 35/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/080878
- (22) 国際出願日: 2013年11月15日(15.11.2013)
- (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:
61/727,185 2012年11月16日(16.11.2012) US
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 油谷 浩幸(ABURATANI, Hiroyuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 野中 綾(NONAKA, Aya); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宮澤 達也(MIYAZAWA, Tatsuya); 〒1948533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内 Tokyo (JP). 吉田 哲郎(YOSHIDA, Tetsuo); 〒1948533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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))



WO 2014/077354 A1

(54) Title: LONG NON-CODING RNA USED FOR ANTICANCER THERAPY

(54) 発明の名称: 抗癌治療に用いられる長鎖非コードRNA

(57) Abstract: The present invention provides: a novel, long non-coding RNA (lncRNA) that is induced by β -catenin, and is highly-expressed in cancers; a nucleic acid that suppresses the expression of the lncRNA; and a growth promotion or suppression means etc. for cells in which the lncRNA or the nucleic acid is used.

(57) 要約: 本発明は、 β カテニンによって誘導され、癌で高発現している新規な長鎖非コードRNA (lncRNA)、該 lncRNA の発現を抑制する核酸、該 lncRNA または該核酸を用いた細胞の増殖促進または抑制手段等を提供する。

明 細 書

発明の名称：抗癌治療に用いられる長鎖非コードRNA

技術分野

[0001] 本発明は、癌細胞において β カテニンにより誘導され、核酸等による発現抑制により抗癌細胞活性を示す長鎖非コードRNA (Long non-coding RNA; lncRNA)と発現抑制に用いる核酸等に関するものである。

背景技術

[0002] Wntシグナルは、細胞の発生分化や増殖に密接に関わること、Wntリガンドにより刺激された細胞では β カテニンが活性化され標的遺伝子の発現が制御されることが知られている。また、Wntシグナルの異常は、細胞の癌化を引き起こし癌細胞の増殖分化や転移浸潤を促進することが広く知られている。

近年、HOTAIRなどのlncRNAの発現と悪性度の高い癌の治療予後不良等との相関が報告されている。HOTAIRは、乳癌などの癌細胞においてポリコーム複合体を介してヒストンのメチル化修飾を制御することが示唆されている（非特許文献1）。

ポリコーム複合体は、ヒストンメチル化修飾酵素EZH2を含む因子から構成され、細胞の発生分化や増殖制御に関わっている。またリンパ腫や乳癌ほか複数の癌種において、悪性度とEZH2発現の相関が示唆されている（非特許文献2）。

また、高速シーケンサーの発達に伴い新たなlncRNAの探索がヒト及びマウス細胞を中心に試みられている。最近では、マウスES細胞やヒト大腸癌細胞株においてポリコーム複合体と結合するlncRNA取得を目的とした大量シーケンス解析が報告されている（非特許文献3-5、特許文献1）。

しかし一方、これらのlncRNAは、in silicoでの構造予測に過ぎないものが殆どであり、癌細胞の増殖分化や転移との関連など機能については不明な点が多い。また、 β カテニンにより誘導されるlncRNAはまだ知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：；国際公開第2012/065143号パンフレット

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Gupta et al. (2010) Nature 464, 1071-1076.

非特許文献2：Chase and Cross. (2011) Clinical Cancer Research 17, 2613-2618.

非特許文献3：Zhao et al. (2010) Molecular Cell 40, 939-953.

非特許文献4：Chu et al. (2011) Molecular Cell 44, 667-678.

非特許文献5：Guil et al. (2012) Nature Structural & Molecular Biology
doi:10.1038/nsmb.2315

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 癌治療の観点からは、悪性度の高い癌の増殖転移および治療予後不良の改善効果が求められる。そのためには、優れた標的と該標的に対する特異性を高めることが有効な手段となる。

本発明は、癌の新規標的および癌を治療するための核酸を提供することを課題としている。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、転移性癌細胞において、高速シーケンサーを用いた発現RNAの大量塩基配列解析により β カテニンにより誘導される新規のlncRNAを取得し、核酸等を用いて上記lncRNAを発現抑制することにより強力に抗癌細胞活性を発揮できることを見出した。

[0007] すなわち、本発明は、前記の課題を解決するものとして以下の発明を提供する。

(1) 配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列と80%以上の同一性を有する塩基配列からなるlncRNA。

- (2) 配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列からなる核酸の相補鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズするlncRNA。
- (3) 配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列からなるlncRNA。
- (4) 上記(1)～(3)のいずれか1項に記載のlncRNAに対して相補的な塩基配列からなる核酸。
- (5) 上記(1)～(3)のいずれか1項に記載のlncRNAと、該lncRNAの塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とからなる二本鎖核酸。
- (6) 上記(1)～(3)のいずれか1項に記載のlncRNAの発現を抑制する核酸。
- (7) 核酸がsiRNA、アンチセンス核酸、shRNAまたはmiRNAから選ばれる上記(6)に記載のlncRNAの発現を抑制する核酸。
- (8) 配列番号42～50のいずれかで表される塩基配列を標的配列とするsiRNAである、上記(6)に記載のlncRNAの発現を抑制する核酸。
- (9) 上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを発現するベクター。
- (10) 上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを導入した細胞。
- (11) 上記(9)に記載のベクターを導入した細胞。
- (12) 上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを有効成分として含有する、細胞の増殖促進剤または増殖抑制剤。
- (13) 上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを有効成分として含有する、細胞の増殖異常に起因する疾患の診断薬または治療薬。
- (14) 疾患が消化器癌、肝臓癌、腎癌、肺癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、膀胱癌または頭頸部癌から選ばれる疾患である上記(13)に記載の診断薬または治療薬。

(15) 上記(1)～(3)のいずれか1項に記載のLncRNAを用いることを特徴とするLncRNAの発現を検出する方法。

(16) 上記(1)～(3)のいずれか1項に記載のLncRNAを用いることを特徴とするLncRNAの変異を検出する方法。

(17) 上記(4)～(8)のいずれか1項に記載の核酸を用いることを特徴とするLncRNAの発現を抑制する方法。

(18) 上記(1)～(3)のいずれか1項に記載のLncRNAを用いることを特徴とするLncRNAの発現または機能を抑制させる物質をスクリーニングする方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば標的LncRNAを発現する癌細胞の増殖や転移浸潤を抑制することができる。また、標的LncRNAの発現を指標として転移性癌細胞を特定し診断治療することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1](a)はSW480細胞に β カテニンに対するsiRNA (siRNA 1～3)を導入した時のLncRNA8Rの発現量を示し、(b)はSW480細胞に β カテニンに対するsiRNA (siRNA 1～3)を導入した時のLncRNA9Rの発現量を示し、(c)はSW480細胞に β カテニンに対するsiRNA (siRNA 1～3)を導入した時のLncRNA12Rの発現量を示し、(d)はSW480細胞に β カテニンに対するsiRNA (siRNA 1～3)を導入した時のLncRNA13Rの発現量を示し、(e)はSW480細胞に β カテニンに対するsiRNA (siRNA 1～3)を導入した時の β カテニンの発現量をそれぞれ示す。

[図2]正常大腸臨床検体、大腸癌細胞株検体および大腸癌臨床検体におけるLncRNA8Rのシグナル値を示す。

[図3]正常大腸臨床検体、大腸癌細胞株検体および大腸癌臨床検体におけるLncRNA9Rのシグナル値を示す。

[図4]正常大腸臨床検体、大腸癌細胞株検体および大腸癌臨床検体におけるLncRNA12Rのシグナル値を示す。

[図5]正常大腸臨床検体、大腸癌細胞株検体および大腸癌臨床検体におけるLncRNA13Rのシグナル値を示す。

cRNA13Rのシグナル値を示す。

[図6]SW480細胞にlncRNA8Rに対するsiRNAを導入した時の抗細胞活性を示す。点線はコントロールsiRNA、実線は8R1siRNA、破線は8R2siRNA導入細胞の抗細胞活性をそれぞれ示す。

[図7]SW480細胞にlncRNA12Rに対するsiRNAを導入した時の抗細胞活性を示す。点線はコントロールsiRNA、実線は12R#16siRNA、破線は12R#17siRNA導入細胞の抗細胞活性をそれぞれ示す。

[図8]SW480細胞およびSW620細胞にlncRNA12R、lncRNA13Rに対するsiRNAをそれぞれ導入した時の抗細胞活性を示す。

[図9]抗PRC2抗体（EZH2、SUZ12）を用いたSW480細胞のRNA免疫沈降を示す。編線はlncRNA9R、黒はlncRNA12R、白はTUG1、グレーはMALAT1、縦線はHOTAIR、斜線はACTB、網掛はSNORD15をそれぞれ示す。

[図10]抗PRC2抗体（SUZ12）を用いたSW620細胞のRNA免疫沈降を示す。

[図11]SW480細胞およびSW620細胞にlncRNA12Rに対するsiRNA、lncRNA13Rに対するsiRNAをそれぞれ導入した時のコロニー形成能を示す。

[図12]SW480細胞にlncRNA12Rに対するsiRNAを導入した時の遊走能を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明のlncRNAとは、 β カテニンによって誘導される長鎖の一本鎖RNAであり、癌で高発現している新規lncRNAである。

[0011] 本発明のlncRNAとしては、配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列と80%以上の同一性を有する塩基配列からなるlncRNA、より好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなるlncRNA、最も好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）の同一性を有する塩基配列からなるlncRNAを挙げることができる。本発明における塩基配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=0N；マッチスコア=1；ミスマッチスコア=-3）にて計算する

ことができる。

[0012] また、本発明のlncRNAとしては、配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列からなるlncRNAの相補鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズするlncRNAを挙げるることができる。具体的には、配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列からなるlncRNAを挙げるることができる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするlncRNAとは、例えば配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列を有するlncRNAまたはその一部の断片と相補的な核酸（cDNAやcRNA等の二本鎖核酸を含む）をプローブとして、20xSSC 7.5 mL、1M Na₂HPO₄ (pH7.2) 0.6 mL、10%SDS 21 mL、50xDenhardt's solution 0.6 mL、10 mg/mL sonicated salmon sperm DNA 0.3 mLから成るHybridization bufferに、 γ -³²P-ATPで標識したプローブRNAを加え、50℃で一晩反応させた後、50℃で10分間、5xSSC/5%SDS液で洗浄し、更に50℃で10分間、1xSSC/1%SDS液で洗浄し、その後メンブレンを取り出し、X線フィルムに感光させることにより同定できるlncRNAを挙げるることができる。

[0013] 本発明のlncRNAの発現を抑制する核酸としては、該lncRNAの一部の塩基配列および／または該塩基配列に対して相補的な塩基配列を含み、かつlncRNAの発現を抑制する核酸であれば、一本鎖核酸、二本鎖核酸等、いずれの核酸も用いられるが、二本鎖核酸が好適に用いられる。ここで「発現を抑制する」とは、本発明のlncRNAの転写を抑制するか（例、アンチジーン）、lncRNAを切断するか（例、siRNA、shRNA、リボザイム）、あるいは機能的なlncRNAの形成を阻害する（例、アンチセンス核酸、miRNA）ことを包含する意味で用いられる。

本発明の核酸が標的配列とするlncRNAの部分塩基配列は特に制限されないが、例えば、siRNAおよび／またはshRNAの配列を設計する場合には、種々のwebサイト上で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Ambionが提供するsiRNA Target Finder (<http://w>

ww.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) およびpSilencer (登録商標) Expression Vector用インサートデザインツール (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html)、RNAi Codexが提供するGeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>)があるが、これらに限定されない。

- [0014] 本発明において二本鎖核酸とは、二本の鎖が対合し二重鎖形成部を有する核酸をいう。二重鎖形成部とは、二本鎖核酸を構成するヌクレオチドまたはその誘導体が塩基対を構成して二重鎖を形成している部分をいう。二重鎖形成部は、通常15～27塩基対であり、15～25塩基対が好ましく、15～23塩基対がより好ましく、15～21塩基対がさらに好ましく、15～19塩基対が特に好ましい。
- [0015] 二本鎖核酸を構成する一本鎖の核酸は、通常15～30塩基からなるが、15～29塩基からなることが好ましく、15～27塩基からなることがより好ましく、15～25塩基からなることがさらに好ましく、17～23塩基からなることが特に好ましく、19～21塩基からなることが最も好ましい。
- [0016] 本発明の二本鎖核酸において、二重鎖形成部に続く3'側または5'側に二重鎖を形成しない追加のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を有する場合には、これら突出部はリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはこれらの誘導体であってもよい。

突出部を有する二本鎖核酸としては、少なくとも一方の鎖の3'末端または5'末端に1～4塩基、通常は1～3塩基からなる突出部を有するものが用いられるが、2塩基からなる突出部を有するものが好ましく用いられ、dTdTまたはUUからなる突出部を有するものがより好ましく用いられる。突出部は、アンチセンス鎖のみ、センス鎖のみ、およびアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に有することができるが、アンチセンス鎖とセンス鎖の両方に突出部を有する二本鎖核酸が好ましく用いられる。ここで「センス鎖」とは、lncRNAの標的配列と相同な配列を有する鎖を意味し、「アンチセンス鎖」

とは、該標的配列と相補的な配列を有する鎖を意味する。また、二重鎖形成部に続いて標的配列と一部または全てが一致する配列、または、二重鎖形成部に続いて標的配列の相補鎖の塩基配列と一致する配列を用いることもできる。さらに、本発明の二本鎖核酸としては、例えばDicer等のリボヌクレアーゼの作用により上記の二本鎖核酸を生成する核酸分子（W02005/089287）や、3'末端や5'末端の突出部を有していない二本鎖核酸などを用いることもできる。

[0017] また、本発明の核酸としては、一本鎖の核酸を用いることもできる。これらの核酸において1～3塩基、好ましくは1～2塩基、より好ましくは1塩基が置換、欠失もしくは付加され、かつlncRNAの発現抑制活性を有する核酸も用いることができる。また、これらの核酸を含む、30塩基以下、好ましくは29塩基以下、より好ましくは27塩基以下、さらに好ましくは25塩基以下、特に好ましくは23塩基以下の核酸を挙げることができる。

[0018] また、上記した二本鎖核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖を、スパーサー配列を介して連結して一本鎖核酸としたものであってもよい。該一本鎖核酸としては、ステムループ構造によって二重鎖形成部を有するshRNA等の一本鎖核酸であることが好ましい。ステムループ構造を有する一本鎖核酸は、通常50～70塩基長である。

また、別の一本鎖核酸として、アンチセンス核酸が挙げられる。アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。

[0019] 本発明の核酸としては、リボヌクレアーゼ等の作用により上記の一本鎖核酸または二本鎖核酸を生成するように設計した、70塩基長以下、好ましくは50塩基長以下、さらに好ましくは30塩基長以下の核酸であってもよい。

[0020] 本発明の核酸を構成する分子としては、ヌクレオチドまたは該ヌクレオチ

ドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなる分子であってもよく、例えばリボヌクレオチドの重合体であるRNA、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるDNA、RNAとDNAとからなるキメラ核酸、およびこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体が挙げられる。siRNA、sh (short hair pin) RNA、miRNAおよびこれらの核酸内にヌクレオチドと同等の機能を有する分子を少なくとも一つ含む誘導体も、本発明の核酸に含まれる。またRNA中のウラシル (U) は、DNAにおいてはチミン (T) に一義的に読み替えることができる。

[0021] ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えばヌクレオチド誘導体等があげられる。ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドに修飾を施した分子であればいかなる分子であってもよいが、例えばRNAまたはDNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上もしくは安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーをあげるため、細胞透過性をあげるため、または可視化させるために、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が好適に用いられる。

[0022] ヌクレオチド誘導体としては、例えば糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド、ならびに糖部、リン酸ジエステル結合および塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド等があげられる。

[0023] 糖部修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、2' -修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

2' -修飾ヌクレオチドとしては、例えばリボースの2' -OH基がH、OR、R、R' OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、BrおよびIからなる群 (Rはアルキルまたはアリール、好ましくは炭素数1~6のアルキルであり、R' はアルキレン、好ましくは炭素数1~

6のアルキレンである)から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチド、好ましくは2'-OH基がFまたはメトキシ基があげられる。また、2-(methoxy)ethoxy基、3-aminopropoxy基、2-[(N,N-dimethylamino)oxy]ethoxy基、3-(N,N-dimethylamino)propoxy基、2-[2-(N,N-Dimethylamino)ethoxy]ethoxy基、2-(methylamino)-2-oxoethoxy基、2-(N-methylcarbamoyl)ethoxy基および2-cyanoethoxy基からなる群から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチド等も挙げられる。

[0024] また、糖部修飾ヌクレオチドとしては、糖部に架橋構造を導入することにより2つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸 (Bridged Nucleic Acid) (BNA)があげられ、具体的には、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸 (Locked Nucleic Acid) (LNA)、エチレン架橋構造型人工核酸 (Ethylene bridged nucleic acid) (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)]等があげられ、さらにペプチド核酸 (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)]、オキシペプチド核酸 (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)]、ペプチドリボ核酸 (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)]等も挙げられる。

[0025] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等が挙げられる。

[0026] 塩基修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの塩基の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子が炭素数1~6のアルキル基

で置換されたもの、メチル基が水素もしくは炭素数2～6のアルキル基で置換されたもの、アミノ基が炭素数1～6のアルキル基、炭素数1～6のアルカノイル基等の保護基で保護されたものが挙げられる。

[0027] さらに、ヌクレオチド誘導体として、ヌクレオチドまたは糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド誘導体に脂質、リン脂質、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、色素など、別の化学物質を付加したものもあげられ、具体的には、5'-ポリアミン付加ヌクレオチド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチド誘導体、Cy5付加ヌクレオチド誘導体、Cy3付加ヌクレオチド誘導体、6-FAM付加ヌクレオチド誘導体、およびビオチン付加ヌクレオチド誘導体等が挙げられる。

[0028] また、ヌクレオチド誘導体は、核酸内の他のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造、エステル構造、およびこれらの少なくとも一つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

[0029] 本発明の核酸は、lncRNAの一部の塩基配列からなる核酸または該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸と同等な機能を有する核酸であれば、いずれのヌクレオチドまたはその誘導体から構成されていてもよい。すなわち、lncRNAの一部の塩基配列からなる核酸または該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸は、その塩基配列を構成するヌクレオチドが、該ヌクレオチドと同等の機能を有するリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはその誘導体に置換されたものであってもよい。

[0030] 本発明の核酸を製造する方法としては、特に限定されず、公知の化学合成を用いる方法、あるいは、酵素的転写法等があげられる。公知の化学合成を用いる方法として、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法、CEM法 [Nucleic Acid Research, 35, 3287 (2007)] 等をあ

げることができ、例えば、ABI3900ハイスループット核酸合成機（アプライドバイオシステムズ社製）により合成することができる。合成が終了した後は、固相からの脱離、保護基の脱保護および目的物の精製等を行う。精製により、純度90%以上、好ましくは95%以上の核酸を得るのが望ましい。二本鎖核酸の場合には、合成・精製したセンス鎖、アンチセンス鎖を適当な比率、例えば、アンチセンス鎖1当量に対して、センス鎖0.1~1.0当量、好ましくは0.5~2当量、より好ましくは0.9~1.1当量、さらに好ましくは等モル量で混合した後、アニーリングを行って用いてもよいし、または、混合したものをアニーリングする工程を省いて直接用いてもよい。アニーリングは、二本鎖核酸を形成できる条件であればいかなる条件で行ってもよいが、通常、センス鎖、アンチセンス鎖をほぼ等モル量で混合した後、94℃程度で5分程度加熱したのち、室温まで徐冷することにより行われる。本発明の核酸を製造する酵素的転写法としては、目的の塩基配列を有したプラスミドまたはDNAを鋳型としてファージRNAポリメラーゼ、例えば、T7、T3、またはSP6RNAポリメラーゼを用いた転写による方法が挙げられる。

[0031] 本発明の核酸を細胞内に導入する方法としては、トランスフェクション用の担体、好ましくはカチオン性リポソーム等のカチオン性担体を用いる方法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法またはマイクロインジェクション法などが挙げられる。

[0032] また、本発明の核酸の代わりに、細胞内に導入してこれらが発現されるようなベクターを用いてもよい。具体的には、本発明の核酸をコードする配列を発現ベクター内のプロモーター下流に挿入して発現ベクターを構築し、細胞に導入することにより該核酸等を発現させることができる。

発現ベクターとしては、本発明の核酸をコードする配列をウイルスベクター内のプロモーター下流に挿入し、該ベクターをパッケージング細胞に導入して生産した組換えウイルスベクターを用いることができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター

一などが挙げられる。

これらの一本鎖核酸または二本鎖核酸を細胞に導入することにより、lncRNAの発現を抑制することができる。

[0033] また、本発明の一本鎖核酸または二本鎖核酸によるlncRNAの発現抑制活性の評価は、該核酸等を培養系癌細胞などにカチオン性リポソームなどを用いてトランスフェクションし、一定時間培養した後、当該癌細胞におけるlncRNAの発現量をRT-PCRで定量することにより行うことができる。さらに細胞増殖を抑制する効果については、本発明の一本鎖核酸または二本鎖核酸を導入した細胞の生細胞数を算出することにより、評価することができる。

[0034] 本発明のlncRNAの発現を検出する方法としては、検体中のlncRNAの存在が検出できる方法であれば、いかなる方法でもよく、例えば、(1) ノーザンハイブリダイゼーション[Science 294, 853-858 (2001)]、(2) ドットブロットハイブリダイゼーション[モレキュラー・クローニング第3版]、(3) in situハイブリダイゼーション[Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)]、(4) 定量的PCR[Nucleic Acids Research, 32, e43 (2004)]、(5) デフレンシャル・ハイブリダイゼーション[Trends Genet., 7, 314 (1991)]、(6) マイクロアレイ[Genome Res., 6, 639 (1996)]、(7) リボヌクレアーゼ保護アッセイ[mirVana miRNADetection Kit (Ambion社製)]等が挙げられる。

[0035] 本発明のlncRNAの変異を検出する方法としては、検体中lncRNAの塩基配列の変異が検出できる方法であれば、いかなる方法でもよく、例えば、非変異型塩基配列を有する核酸と変異型塩基配列を有する核酸とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二本鎖を検出する方法や、あるいは、検体由来の塩基配列を直接、配列決定して変異の有無を検出する方法等をあげることができる。

ヘテロ二本鎖を検出する方法としては、(1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヘテロ二本鎖検出法 [Trends genet., 7, 5 (1991)]、(2) 一本鎖コンフォメーション多型解析法 [Genomics, 16, 325-332 (1993)]、(3)

) ミスマッチの化学的切断法 (CCM, chemical cleavage of mismatches) [Human Genetics (1996), Tom Strachan and Andrew P. Read, BIOS Scientific Publishers Limited]、(4) ミスマッチの酵素的切断法 [Nature Genetics, 9, 103-104 (1996)]、(5) 変性ゲル電気泳動法 [Mutat. Res., 288, 103-112 (1993)]等の方法が挙げられる。

[0036] 本発明のlncRNAを用いてlncRNAの発現または機能を促進または抑制させる物質をスクリーニングする方法としては、例えば、本発明のlncRNAの塩基配列から、スクリーニングの標的とする塩基配列を選択して、該塩基配列を有する核酸を発現する細胞を利用して、選択したlncRNAの発現または機能を促進または抑制させる物質をスクリーニングすることができる。

スクリーニングに用いる、lncRNAの塩基配列を有する核酸を発現する細胞としては、該塩基配列を有する核酸を発現するベクターを動物細胞などの宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞や、該塩基配列を有する核酸をベクターを用いずに直接導入した細胞等を用いることもできる。

具体的なスクリーニング方法としては、スクリーニングの標的とするlncRNAの発現量の変化を指標にする方法を挙げることができる。

該塩基配列を有する核酸を発現する細胞に対し、試験物質を接触させ、選択した核酸の発現量の変化を指標に、lncRNAの発現を促進または抑制させる物質を得る。

[0037] 本発明はまた、上記した本発明のlncRNAの発現を抑制する一本鎖核酸、二本鎖核酸等の核酸またはベクターを有効成分として含有する医薬組成物に関する。当該医薬組成物は、核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体をさらに含むことができる。本発明の医薬組成物は癌疾患の治療または予防のために用いることができる。癌としては、例えば消化器癌、肝臓癌、腎癌、肺癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、膀胱癌または頭頸部癌などの固形癌を挙げることができる。

[0038] 核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体としては、例えばカチオン性担体があげられる。カチオン性担体としては、カチオン性リポソームおよびカ

チオン性ポリマーなどがあげられる。また、核酸を細胞内に移行させるのに有効な担体として、ウイルスエンベロープを利用した担体を用いてもよい。カチオン性リポソームとしては、2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-O-ジオレオイルグリセロールを含有するリポソーム(以下リポソームAともいう)、オリゴフェクトアミン(Invitrogen社)、リポフェクチン(Invitrogen社)、リポフェクトアミン(Invitrogen社)、リポフェクトアミン2000(Invitrogen社)、DMRIE-C(Invitrogen社)、GeneSilencer(Gene Therapy Systems社)、TransMessenger(QIAGEN社)、TransIT TKO(Mirus社)などが好ましく用いられる。カチオン性ポリマーとしては、JetSI(Qbiogene社)、Jet-PEI(ポリエチレンジアミン; Qbiogene社)などが好ましく用いられる。ウイルスエンベロープを利用した担体としては、GenomeOne(HVJ-Eリポソーム; 石原産業社)などが好ましく用いられる。

[0039] 本発明の医薬組成物に含まれる一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターに上記担体を含む組成物は、当業者に既知の方法により調製することができる。例えば、適当な濃度の担体分散液と一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクター溶液とを混合して調製することができる。カチオン性担体を用いる場合、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターは水溶液中で負電荷を帯びているため、常法により水溶液中で混合することによって容易に調製することができる。該組成物を調製するために用いる水性溶媒としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水などの電解質液、ブドウ糖液、マルトース液などの糖液などが挙げられる。

[0040] また、該組成物を調製する際のpHおよび温度などの条件は当業者が適宜選択できる。例えば、リポソームAの場合、10%マルトース水溶液中の16mg/mlのリポソーム分散液に、10%マルトース水溶液中のオリゴ二本鎖RNA溶液を、pH7.4、25℃で攪拌しながら徐々に添加して調製

することができる。

[0041] 該組成物は、必要ならば超音波分散装置や高圧乳化装置などを用いて分散処理を行うことにより、均一な組成物とすることもできる。当業者であれば、担体と一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターとを含む組成物の調製に最適な方法および条件は、用いる担体に依存するので、上記の方法にとらわれることなく、用いる担体に最適な方法を選択できる。

[0042] 本発明の医薬組成物としては、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターとリード粒子とを構成成分とする複合粒子および該複合粒子を被覆する脂質膜から構成され、該脂質膜の構成成分が可溶性極性有機溶媒を含む液の中に、該脂質膜の構成成分が分散可能で、該複合粒子も分散可能な濃度で該極性有機溶媒を含む液が存在するリポソームも好適に用いられる。リード粒子としては、例えば、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を構成成分とする微粒子があげられ、好ましくはリポソームを構成成分とする微粒子があげられる。本発明におけるリード粒子は、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を2つ以上組み合わせた複合体を構成成分としていてもよく、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等と他の化合物(例えば糖、脂質、無機化合物等)とを組み合わせた複合体を構成成分としていてもよい。

[0043] 該複合粒子を被覆する脂質膜としては、例えば中性脂質およびポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン等を構成成分とするものがあげられる。

該リポソームは、例えばW02006/080118等に記載の方法に従って調製することができる。

[0044] 本発明の医薬組成物に含まれる一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターと担体との配合比は、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターの1重量部に対して担体1~200重量部が適当である。好ましくは、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターの1重量部に対して担体2.5~100重量部、さらに

好ましくは担体 10～20 重量部である。

- [0045] 本発明の医薬組成物には、上記担体の他に、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤などを含んでいてもよい。医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤などは、本質的に化学的に不活性および無害な組成物であり、本発明の医薬組成物の生物学的活性に全く影響を与えないものである。そのようなキャリアーまたは希釈剤の例は、塩溶液、糖溶液、グリセロール溶液、エタノールなどがあるが、これらに限定されない。
- [0046] 本発明の医薬組成物は、疾患の治療または予防に有効な量の該複合体を含み、かつ、患者に適切に投与できるような形態で提供される。本発明の医薬組成物の製剤形態は、例えば注射剤、点眼剤、吸入用などの液剤、例えば軟膏、ローション剤などの外用剤等であってもよい。
- [0047] 液剤の場合、本発明の医薬組成物の濃度範囲は通常、0.001～25% (w/v) であり、好ましくは0.01～5% (w/v) であり、より好ましくは0.1～2% (w/v) である。本発明の医薬組成物は医薬的に許容される任意の添加剤、例えば、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、pH調製剤等を適量含有していてもよい。医薬的に許容される任意の添加剤は、該複合体の分散前でも分散後でも適当な工程で添加することができる。
- [0048] 凍結乾燥製剤は、一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターと担体とを分散処理した後、凍結乾燥処理することにより調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行うことができる。例えば、上記の分散処理後の複合体溶液を無菌状態にて所定量をバイアル瓶に分注し、約-40～-20℃の条件で予備乾燥を約2時間程度行い、約0～10℃で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約15～25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥することができる。そして、例えばバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓することにより、本発明の医薬組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。
- [0049] 本発明の医薬組成物は、任意の適当な溶液の添加によって再溶解し、使用することができる。このような溶液としては、注射用水、生理食塩水などの電解質液、ブドウ糖液、その他一般輸液などをあげることができる。この溶

液の液量は、用途などによって異なり、特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の0.5～2倍量、または500ml以下が好ましい。

[0050] 本発明の医薬組成物は、ヒトを含む動物に対し、例えば静脈内投与、動脈内投与、経口投与、組織内投与、経皮投与、経粘膜投与または経直腸投与することができるが、患者の症状に合わせた適切な方法により投与することが好ましい。特に静脈投与、経皮投与、経粘膜投与が好ましく用いられる。また、癌内局所投与など、局所投与をすることもできる。これらの投与方法に適した剤型としては、例えば各種の注射剤、経口剤、点滴剤、吸収剤、点眼剤、軟膏剤、ローション剤、坐剤等があげられる。

[0051] 本発明の医薬組成物の用量は、薬物、剤型、年齢や体重などの患者の状態、投与経路、疾患の性質と程度などを考慮した上で決定することが望ましいが、通常は一本鎖核酸、二本鎖核酸またはベクターの質量として、成人に対して1日当たり、0.1mg～10g/日、好ましくは1mg～500mg/日である。場合によっては、これ以下でも十分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また1日1回～数回投与することもでき、1日～数日の間隔をおいて投与することもできる。

[0052] 以下に、本発明を実施例により説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0053] 実施例1 癌細胞において β カテニンにより誘導される新規lncRNAの取得

1-1 新規lncRNAの同定方法

大腸癌細胞株SW480 (3×10^5 細胞) に β カテニンに対するsiRNA (ライフテクノロジー社、Stealth RNAi 1299003) またはコントロールsiRNA (ライフテクノロジー社、Stealth RNAi Negative control 12935-112) 各20 nMをHiPerfect Transfection Reagent(キアゲン社)を用いて添付プロトコールに従い添加し、48時間後にトータルRNAをTRIzol (ライフテクノロジー社)を用いて回収した。それぞれのRNAサンプルをイルミナ社のDirectional mRNA-seq sample preparation プロトコールに従い調製し、Genome Analyzer IIxを用いて

解析し、全ゲノム領域のRNA発現を確認した。解析ソフトウェアはTOPHAT解析 (Bioinformatics, 2009,25(9) p1105) を使用した。

その結果、 β カテニンのsiRNAによりRNA発現量が減少する領域で、かつ、その領域の近傍5kb以内に β カテニンの結合が確認できる領域を β カテニンが制御する転写産物として同定した。 β カテニンの結合はChIP-seqにより確認した。ChIPはサンタクルーズ社の抗 β カテニン抗体を用いる方法(sc-7199およびCancer Sci.2008, 99(6) p1139) に従った。また、シーケンス解析はGenome Analyzer IIxおよびイルミナ社のChIP-seq Sample Prep kitを用いた。解析ソフトは、Model-based Analysis for ChIP-seq (MACS, Genome Biol (2008) vol. 9 (9) pp. R137)を使用した。

[0054] 1-2 新規lncRNAの全長塩基配列

クローンテック社のMarathon cDNA Amplification Kitを用いて、上記で同定したlncRNAの末端配列を同定した。また、イルミナ社のHiSeq2000及びPaired-End mRNA-seq kitを用いてシーケンス解析を行い、TOPHAT解析によりcDNAをクローニングして、lncRNAの全長塩基配列 (配列番号1~15および配列番号38~41) を決定した。各配列番号に対応するスプライシングバリエントを以下のとおり命名した。

配列番号1 : 7F、配列番号2 : 8F Variant1、配列番号3 : 8F Variant2、配列番号4 : 8F Variant3、配列番号5 : 8F Variant4、配列番号6 : 8R Variant1、配列番号7 : 8R Variant2、配列番号8 : 9R、配列番号9 : 12R Variant1、配列番号10 : 12R Variant2、配列番号11 : 13R Variant1、配列番号12 : 13R Variant2、配列番号13 : 13R Variant3、配列番号14 : 14R Variant1、配列番号15 : 14R Variant2、配列番号38 : 12R Variant3、配列番号39 : 12R Variant4、配列番号40 : 12R Variant5、配列番号41 : 13R Variant3

[0055] 実施例2 β -カテニンによる新規lncRNAの誘導

実施例1で取得した新規lncRNAが β カテニンによって誘導されることを確認するため、実施例1-1の方法に従って、大腸癌細胞株SW480に β カテニンに

対するsiRNAまたはコントロールsiRNAを添加して培養後トータルRNAを回収し、実施例1に示す新規lncRNAおよびβカテニンの発現量を定量的RT-PCR法でそれぞれ測定した。用いたプライマーを表1に示す。lncRNA8Rの検出にはプライマー8RFおよび8RR（配列番号16、17）、lncRNA9Rの検出にはプライマー9RFおよび9RR（配列番号18、19）、lncRNA12Rの検出にはプライマー12RFおよび12RR（配列番号20、21）、lncRNA13Rの検出にはプライマー13RFおよび13RR（配列番号22、23）をそれぞれ用いた。その結果、lncRNA8R、lncRNA9R、lncRNA12RおよびlncRNA13Rでβカテニンの発現低下に伴ってlncRNAの発現が低下した（図1）。

[0056] [表1]

配列番号	配列 5'-----3'	名前
16	CTGGGTGGCTCCTCTCAACC	8RF
17	CCAAAGGGACCCACATCGAC	8RR
18	GCTGATCCCAGGCCCTACCT	9RF
19	GAATGCCTCCCGGTCCTTCT	9RR
20	CCCAACCACGTCTCTCACCA	12RF
21	TTCAAAGAGCACAGCTGCACA	12RR
22	GATTCAACAGCCCACGCTGA	13RF
23	ATGCCACCTGCGAGAGGAAG	13RR
28	GACGGAGGTTGAGATGAAGC	MALAT1_F
29	ATTCGGGGCTCTGTAGTCCT	MALAT1_R
30	TCCCGGAGGTGCTCTCAATC	HOTAIR_F
31	GGGCTCCCTCTCTCCACTCC	HOTAIR_R
32	TTGCCAGGTGGCCTACTCT	SNORD15A_F
33	CCTTCTCAGACAAATGCCTCTAAGT	SNORD15A_R
34	AGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACC	ACTB_F
35	CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTG	ACTB_R
36	CAAGCACTACCACCAGCACTGTTAC	TUG1_F
37	GCAATCAGGAGGCACAGGACATAAT	TUG1_R

[0057] 実施例3 癌細胞、癌組織におけるlncRNA8R、lncRNA9R、lncRNA12RおよびlncRNA13Rの発現

アフィメトリックス社のHuman Exon 1.0 ST Arrayを用いた公開実験結果『GSE23768』『Series GSE16125』データをNational Center for Biotechnology and Information (NCBI)のGene Expression Omnibus (GEO)から取得して、癌細胞、癌組織におけるlncRNA8R、lncRNA9R、lncRNA12RおよびlncRNA13R

の発現を解析した。実施例1で得たlncRNA8Rのヒト染色体領域『第一染色体:3217233-3231768』のマイナス(-)鎖に設計されている17プローブに対するシグナル値の幾何平均、lncRNA9Rのヒト染色体領域『第十一染色体:2181184-2192608』のマイナス(-)鎖に設計されている4プローブに対するシグナル値の幾何平均、lncRNA12Rのヒト染色体領域『第二染色体:171178123-171264570』のマイナス(-)鎖に設計されている28プローブに対するシグナル値の幾何平均およびlncRNA13Rのヒト染色体領域『第二染色体:171264761-171277160』のマイナス(-)鎖に設計されている7プローブに対するシグナル値の幾何平均をそれぞれ算出した。その結果、いずれも大腸癌サンプルで発現が亢進していることを確認した(図2~5)。

[0058] 実施例4 lncRNA8R、lncRNA12R およびlncRNA13Rの発現抑制による細胞増殖の抑制効果

実施例1で取得したlncRNA8R に対するsiRNA (stealth RNAi (8R1, 8R2)、ライフテクノロジー社)を大腸癌細胞株SW480へ実施例1と同様の方法により導入した。用いたsiRNAの配列およびその標的lncRNA8R配列を表2に示す(配列番号24および47、25および48)。コントロールsiRNAはStealth RNAi Negative Control Medium GC duplex#2 (ライフテクノロジー社、12935-112)を用いた。そして、siRNA導入後0日目から同仁化学のCell Counting Kit-8により細胞増殖を測定した。その結果、lncRNA8Rの発現を低下させることにより大腸癌細胞の増殖が抑制された(図6)。

また、アドジーン社のレンチウイルスベクターpLK0.1 puroレンチウイルスベクターを用いて、実施例1で取得したlncRNA12Rに対するshRNA (12R#16, 12R#17)をそれぞれ大腸癌細胞株SW480へ定法に従い導入した。用いたshRNAの設計に使用したオリゴDNAの配列およびその標的lncRNA12R配列を表3に示す(配列番号26および49、27および50)。導入後0日目から同仁化学のCell Counting Kit-8により細胞増殖を測定した。その結果、lncRNA12Rの発現を低下させることにより大腸癌細胞の増殖が抑制された(図7)。

さらに、lncRNA12R およびlncRNA13R に対する各種siRNA (カスタム合成si

RNA、ジーンデザイン社)を大腸癌細胞株SW480、大腸癌由来リンパ節転移癌細胞株SW620 (1.2×10⁴細胞)へ終濃度50 nMとなるようにLipofectamine 2000(ライフテクノロジーズ社)を用いて添付プロトコールに従いそれぞれ導入した。用いたsiRNAの標的配列を表4に示す(配列番号42-46)。コントロールsiRNAはAllStars Negative Control siRNA(キアゲン社、1027281)を用いた。siRNA導入72時間後にCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit(プロメガ社)を用いて生存細胞数を測定し、コントロールsiRNAに対する生存率を計算することで抗細胞活性を評価した。その結果、lncRNA12R、lncRNA13Rの発現を低下させることにより大腸癌細胞の増殖が抑制された(図8)。

以上より、lncRNA8R、lncRNA12RおよびlncRNA13Rの発現抑制による細胞増殖の抑制効果を確認した。

[0059] [表2]

配列番号	配列 5'-----3'	名前
24	UUCUGGAUGUGGUUCAGUGGACUGG	8R1
25	AUAGGAGCGAAUGUGAACACUGUUC	8R2
47	CCAGUCCACUGAACCAUCAUCCAGAA	8R1target
48	GAACAGUGUUCACAUUCGCUCCUAU	8R2target

[0060] [表3]

配列番号	配列 5'-----3'	名前
26	GCAAATCAGTGTTGGCCATCT	12R#16
27	GGTGTCTACATGGCAGCATAA	12R#17
49	GCAAUCAGUGUUGGCCAUCU	12R#16target
50	GGUGUCUACAUGGCAGCAUAA	12R#17target

[0061]

[表4]

配列番号	配列 5'-----3'	名前
42	CAGUGGCUGGUAUUACAGGAA	12R#506
43	AAGGAAAAAGUUCUCAUAAA	12R#3950
44	UAGGGAGAAGAUAAUCAGAU	12R#16175
45	CCCCCCCAGCAUGGAAAUAAA	13R#9443
46	UCCAGUUUCAGAAAAGAUUA	13R#11616

[0062] 実施例5 癌細胞における新規lncRNAのPRC2結合

実施例1で取得した新規lncRNAがPolycomb Recessive Complex 2 (PRC2)と結合していることを示すために、PRC2の構成成分であるEZH2、SUZ12に対する抗体を用いたRNAクロマチン免疫沈降 (RIP-ChIP) 実験を行った。SW480細胞株から細胞抽出液を調製し、コントロールIgG (シグマアルドリッチ社、カタログ番号A-6154)、抗EZH2抗体 (アクティブモチーフ社、カタログ番号39933)、抗SUZ12抗体 (アブカム社、カタログ番号ab12073) を用いた。方法はNature Protocol 2006 vol1 N012011.12.1に従った。

得られたRNAから、インビトロジェン社のSuperScript IIIを用いてcDNAを調製した。実施例1で得たlncRNA9R、lncRNA12Rおよび既知のlncRNAであるTUG1、MALAT1、HOTAIR、ACTB、SNORD15それぞれに対する特異的プライマーを用いて定量的RT-PCRを行った。用いたプライマー配列を表1に示す (配列番号18-21、28-37)。その結果、lncRNA9R、lncRNA12Rは、SUZ12抗体およびEZH2抗体と共沈しPRC2に結合することが示された (図9)。

さらに、癌細胞株でPRC2と結合するncRNAを網羅的に明らかにするために、PRC2の構成成分であるSUZ12に対する抗体を用いたRNAクロマチン免疫沈降-シーケンス (RIP-seq) 実験を行った。SW620細胞株から核抽出液を調製し、コントロールIgG (シグマアルドリッチ社、カタログ番号A-6154)、抗SUZ12抗体 (アブカム社、カタログ番号ab12073) を用いた。RIP手法はNature Protocol 2006 vol1 N012011.12.1を一部改変したものに従った。

得られたRNAから、イルミナ社のTruSeq RNA Sample Preparation Kitsを用いてシーケンス用ライブラリを調製、イルミナ社シーケンサーHiSeq2000によ

る解読を実施した。TOPHAT解析後、ミトコンドリアにマップされたリード数で標準化した後、lncRNA領域内にマップされたリード数を計数し、コントロールIgGでのリード数に対する抗SUZ12抗体でのリード数の比を求めることでPRC2への結合能を評価した。ネガティブコントロールとしてGAPDH (Glyceraldehyde_3-phosphate_dehydrogenase 遺伝子) を、ポジティブコントロールとしてTUG1 (Taurine upregulated gene 1 遺伝子) を用いた。その結果、lncRNA13RがPRC2に強く結合していることが示された (図10)。

[0063] 実施例6 lncRNA12R、lncRNA13Rの発現抑制による癌細胞のコロニー形成能の抑制効果

lncRNA12RおよびlncRNA13Rに対するsiRNA (カスタム合成siRNA、ジーンデザイン社)を大腸癌細胞株SW480、大腸癌由来リンパ節転移癌細胞株SW620 (3×10^5 細胞)へ終濃度50 nMとなるようにLipofectamine 2000(ライフテクノロジーズ社)を用いて添付プロトコールに従いそれぞれ導入した。用いたsiRNAの標的配列を表4に示す(配列番号42、45)。コントロールsiRNAはAllStars Negative Control siRNA (キアゲン社、1027281)を用いた。そして、siRNA導入から24時間後に軟寒天培地と細胞を混合して 1.5×10^3 細胞を播種し直し、8日後にIn Cell Analyzer 1000 (GEヘルスケアバイオサイエンス社)を用いて形成されたコロニーを撮影した。その結果、大腸癌細胞株SW480ではsiRNA 12R#506、13R#9443を、大腸癌由来リンパ節転移癌細胞株SW620ではsiRNA 12R#506を導入することによりコロニー形成能が抑制された(図11)。

以上より、lncRNA12RおよびlncRNA13Rの発現抑制による癌細胞のコロニー形成能の抑制効果を確認した。

[0064] 実施例7 lncRNA12Rの発現抑制による癌細胞の遊走能の抑制効果

lncRNA12Rに対するsiRNA (カスタム合成siRNA、ジーンデザイン社)を大腸癌細胞株SW480へ実施例6と同様の方法で導入した。用いたsiRNAの標的配列を表4に示す(配列番号42-44)。コントロールsiRNAはAllStars Negative Control siRNA (キアゲン社、1027281)を用いた。そして、siRNA導入から24時間後に無血清培地に懸濁し、xCELLigence Real Time Cell Analyzer D

P (ロシュダイアグノスティックス社) CIM plate 16のupper wellに 4×10^4 細胞を播種した。Lower wellに血清入りの培地を満たしてwellを連結し、血清を誘引物質とした遊走能の評価を行った。その結果、siRNA導入によりlncRNA 12Rの発現を低下させることにより大腸癌細胞株の遊走能が抑制された (図 1 2)。

以上より、lncRNA12Rの発現抑制による癌細胞の遊走能の抑制効果を確認した。

産業上の利用可能性

- [0065] 本発明により、 β カテニンにより誘導される新規のlncRNAが提供される。該lncRNAの発現を抑制する核酸、物質をスクリーニングすることにより、癌の診断または治療をすることができる。
- [0066] 本出願は、2012年11月16日付で出願された米国仮特許出願第61 / 727, 185号を基礎としており、ここで言及することにより、その内容はすべて本願明細書に包含される。

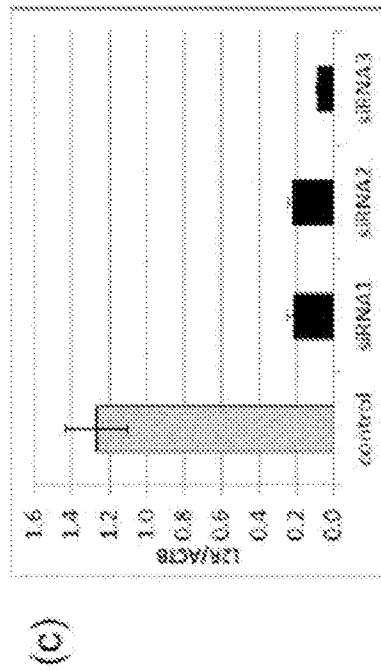
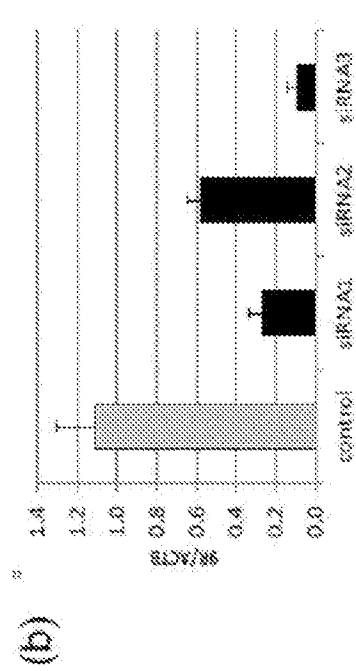
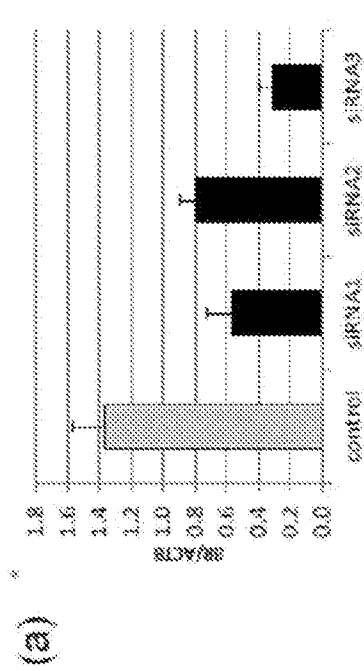
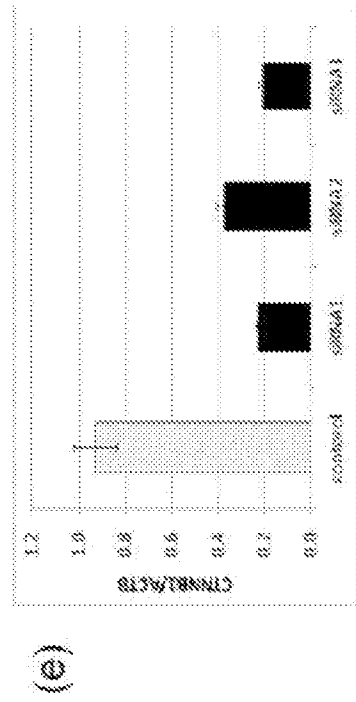
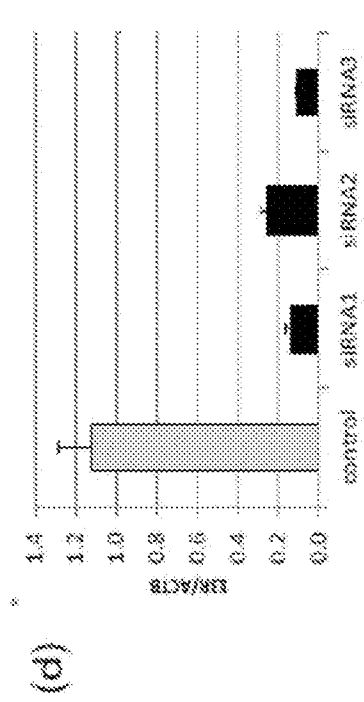
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列と80%以上の同一性を有する塩基配列からなるlncRNA。
- [請求項2] 配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列からなる核酸の相補鎖とストリンジентな条件でハイブリダイズするlncRNA。
- [請求項3] 配列番号1～15および配列番号38～41のいずれかで表される塩基配列からなるlncRNA。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載のlncRNAに対して相補的な塩基配列からなる核酸。
- [請求項5] 請求項1～3のいずれか1項に記載のlncRNAと、該lncRNAの塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸とからなる二本鎖核酸。
- [請求項6] 請求項1～3のいずれか1項に記載のlncRNAの発現を抑制する核酸。
- [請求項7] 核酸がsiRNA、アンチセンス核酸、shRNAまたはmiRNAから選ばれる請求項6に記載のlncRNAの発現を抑制する核酸。
- [請求項8] 配列番号42～50のいずれかで表される塩基配列を標的配列とするsiRNAである、請求項6に記載のlncRNAの発現を抑制する核酸。
- [請求項9] 請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを発現するベクター。
- [請求項10] 請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを導入した細胞。
- [請求項11] 請求項9に記載のベクターを導入した細胞。
- [請求項12] 請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを有効成分として含有する、細胞の増殖促進剤または増殖抑制剤。
- [請求項13] 請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸またはlncRNAを有効成分として含有する、細胞の増殖異常に起因する疾患の診断薬または治療薬。
- [請求項14] 疾患が消化器癌、肝臓癌、腎癌、肺癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立

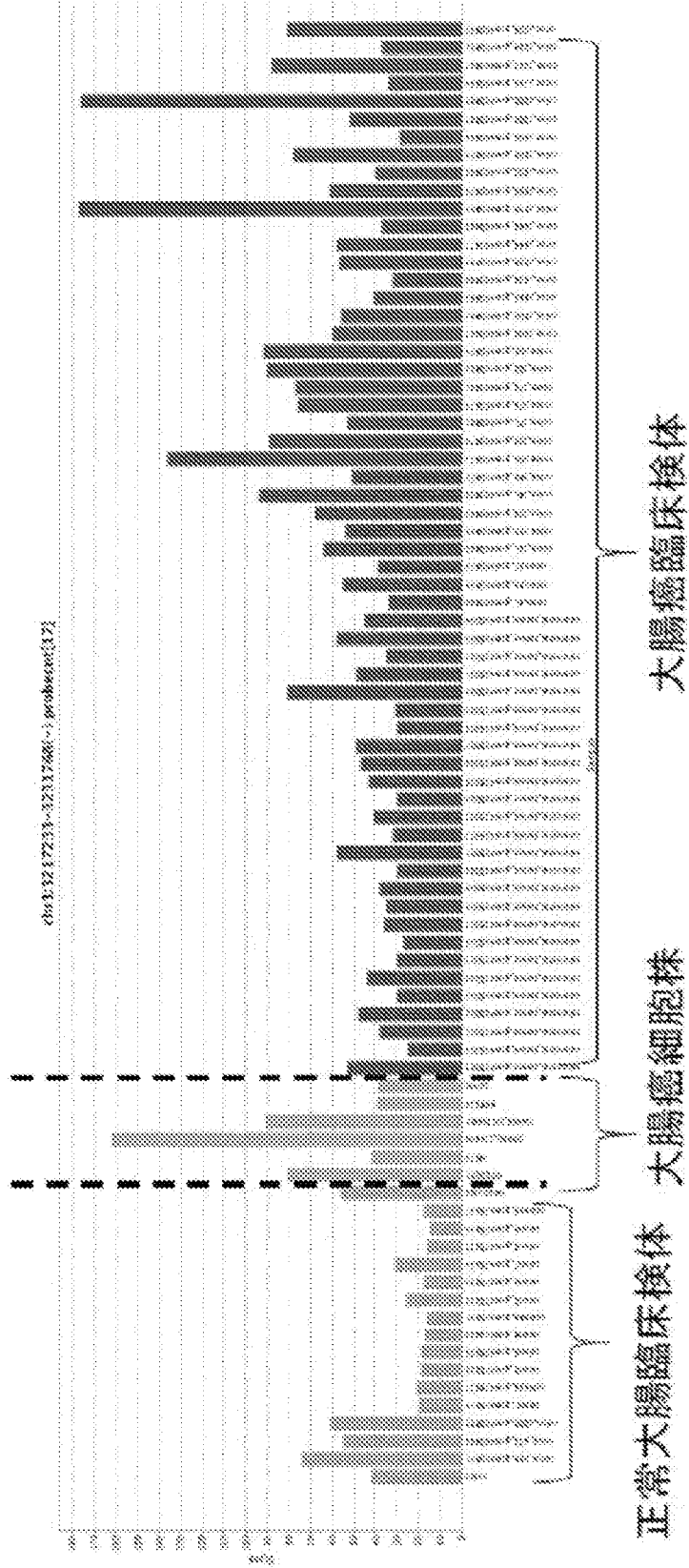
腺癌、膀胱癌または頭頸部癌から選ばれる疾患である請求項 1 3 に記載の診断薬または治療薬。

- [請求項15] 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の lncRNA を用いることを特徴とする lncRNA の発現を検出する方法。
- [請求項16] 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の lncRNA を用いることを特徴とする lncRNA の変異を検出する方法。
- [請求項17] 請求項 4 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸を用いることを特徴とする lncRNA の発現を抑制する方法。
- [請求項18] 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の lncRNA を用いることを特徴とする lncRNA の発現または機能を抑制させる物質をスクリーニングする方法。

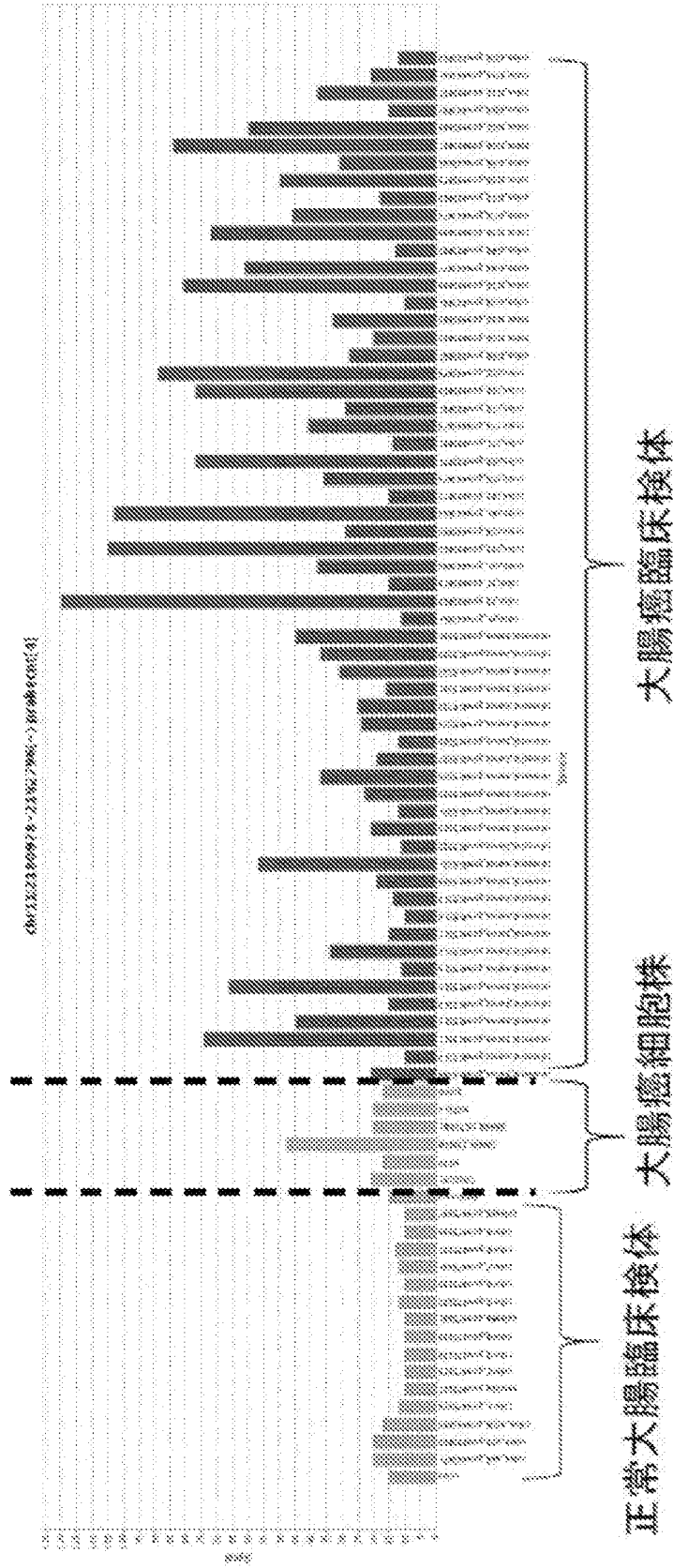
[] 1



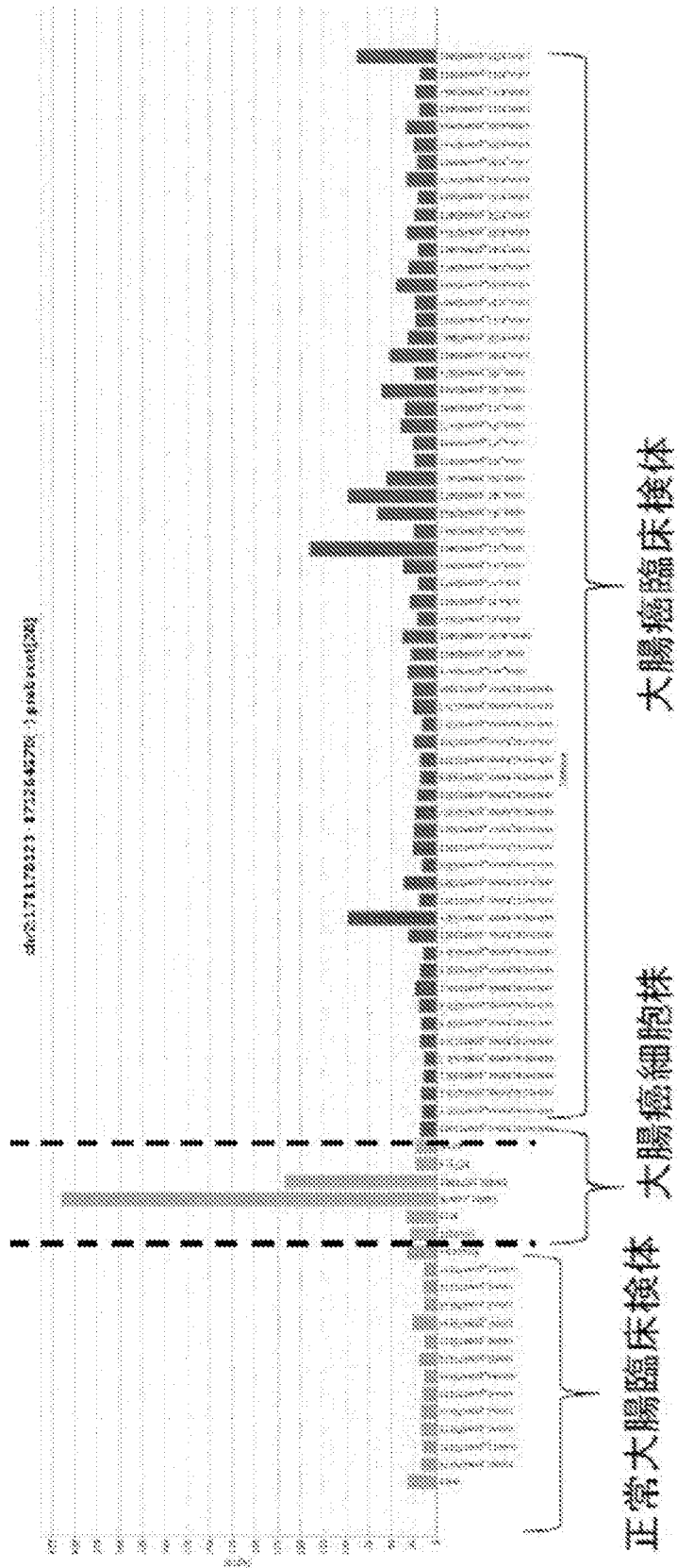
[図2]



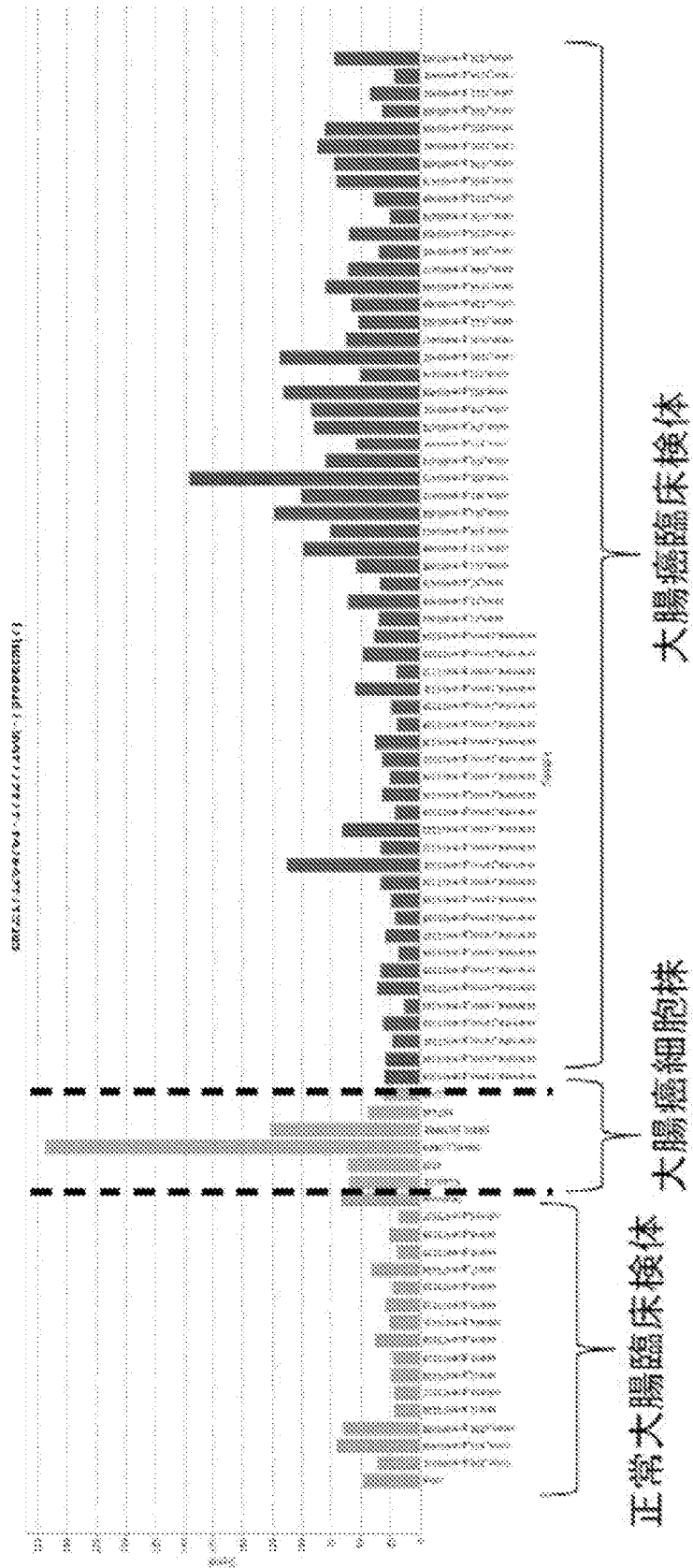
[図3]



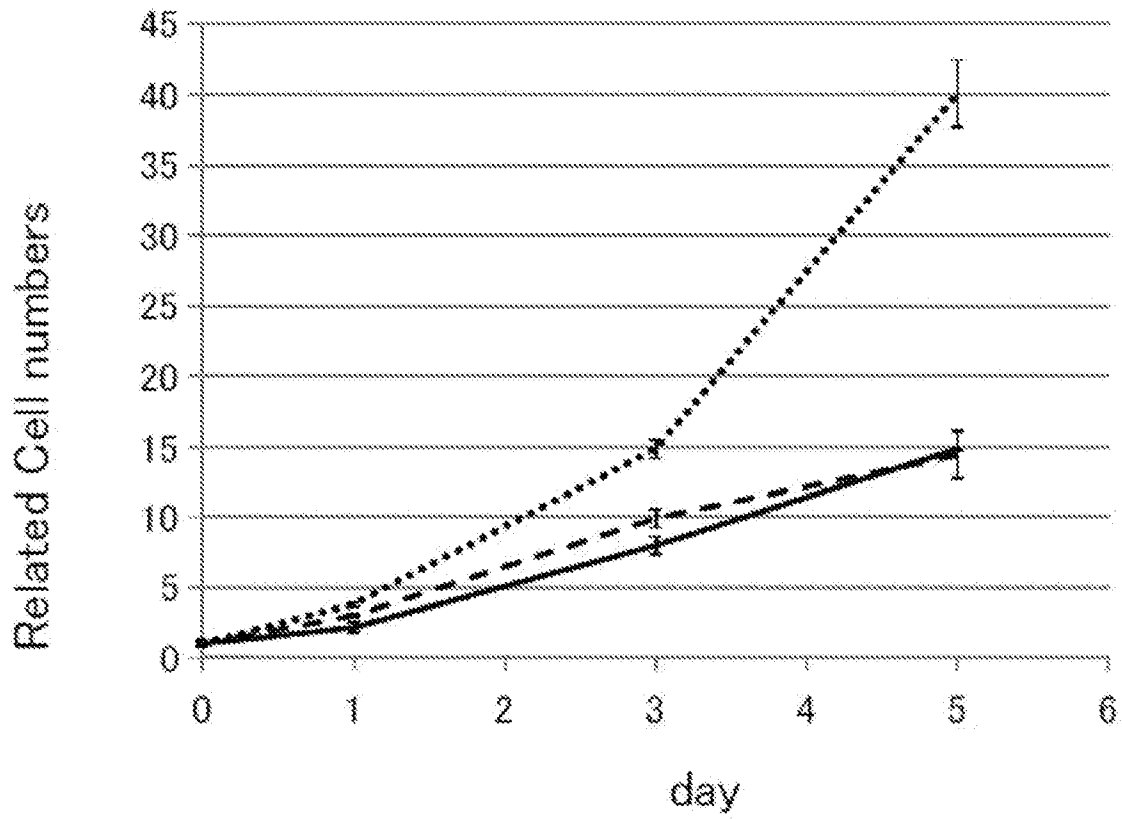
[図4]



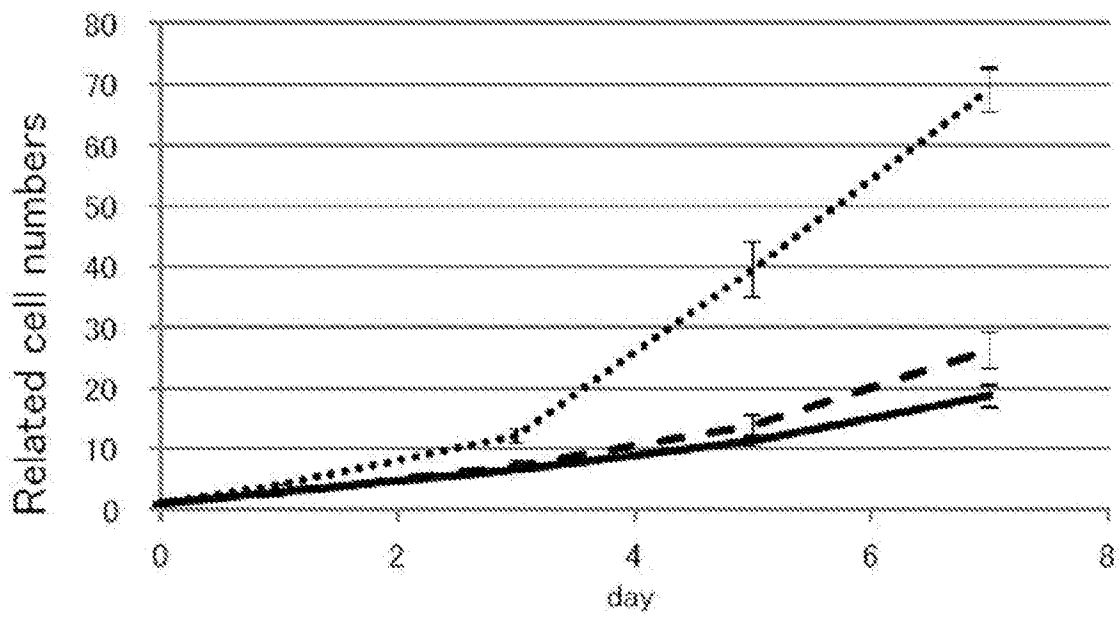
[図5]



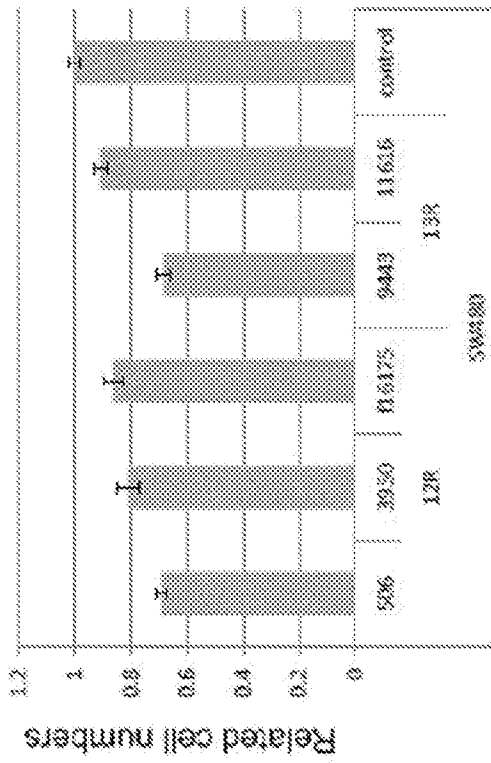
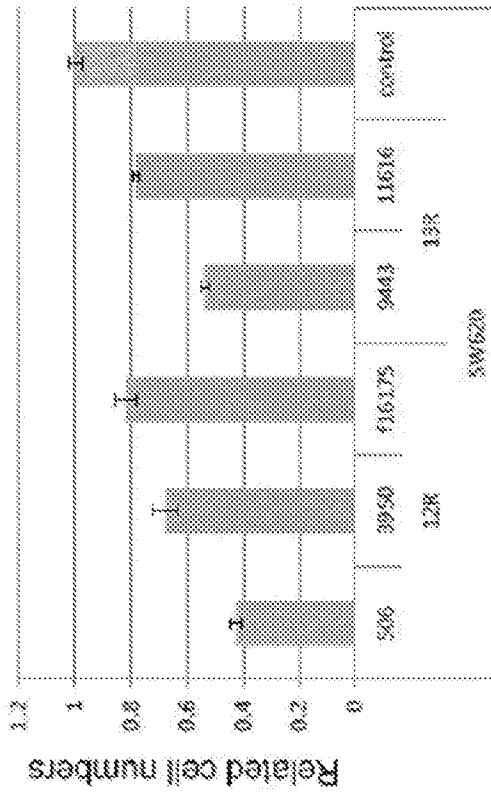
[圖6]



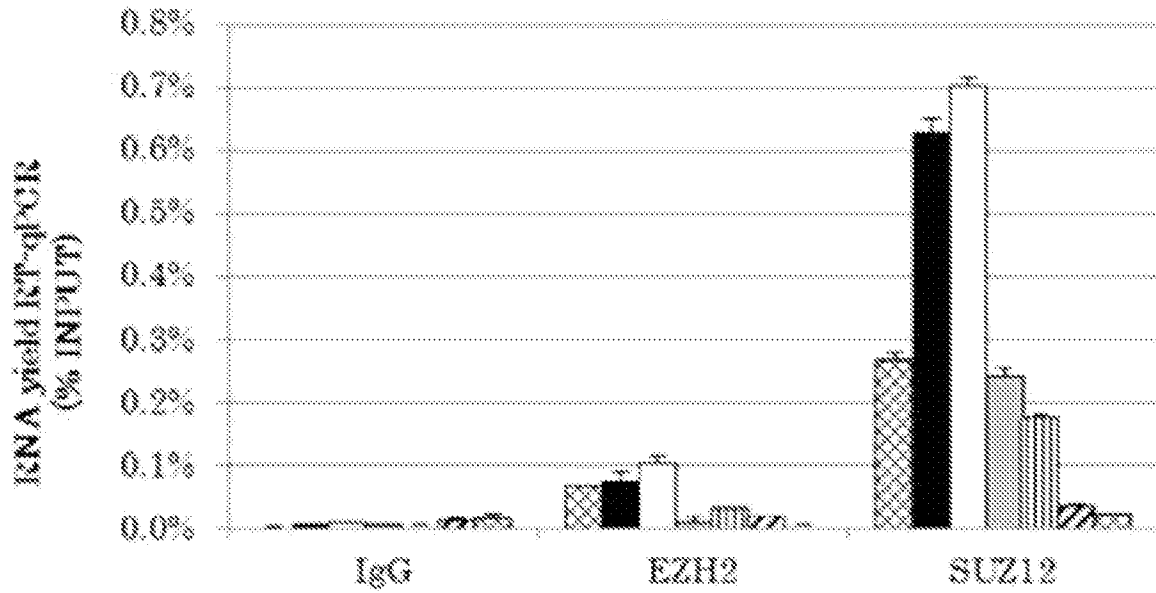
[圖7]



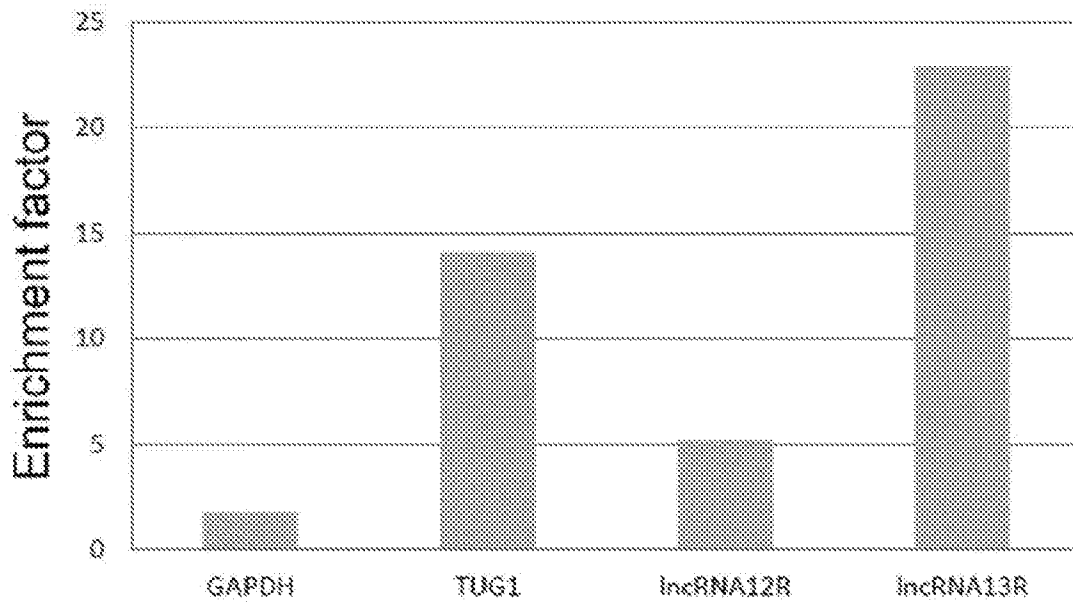
[圖8]



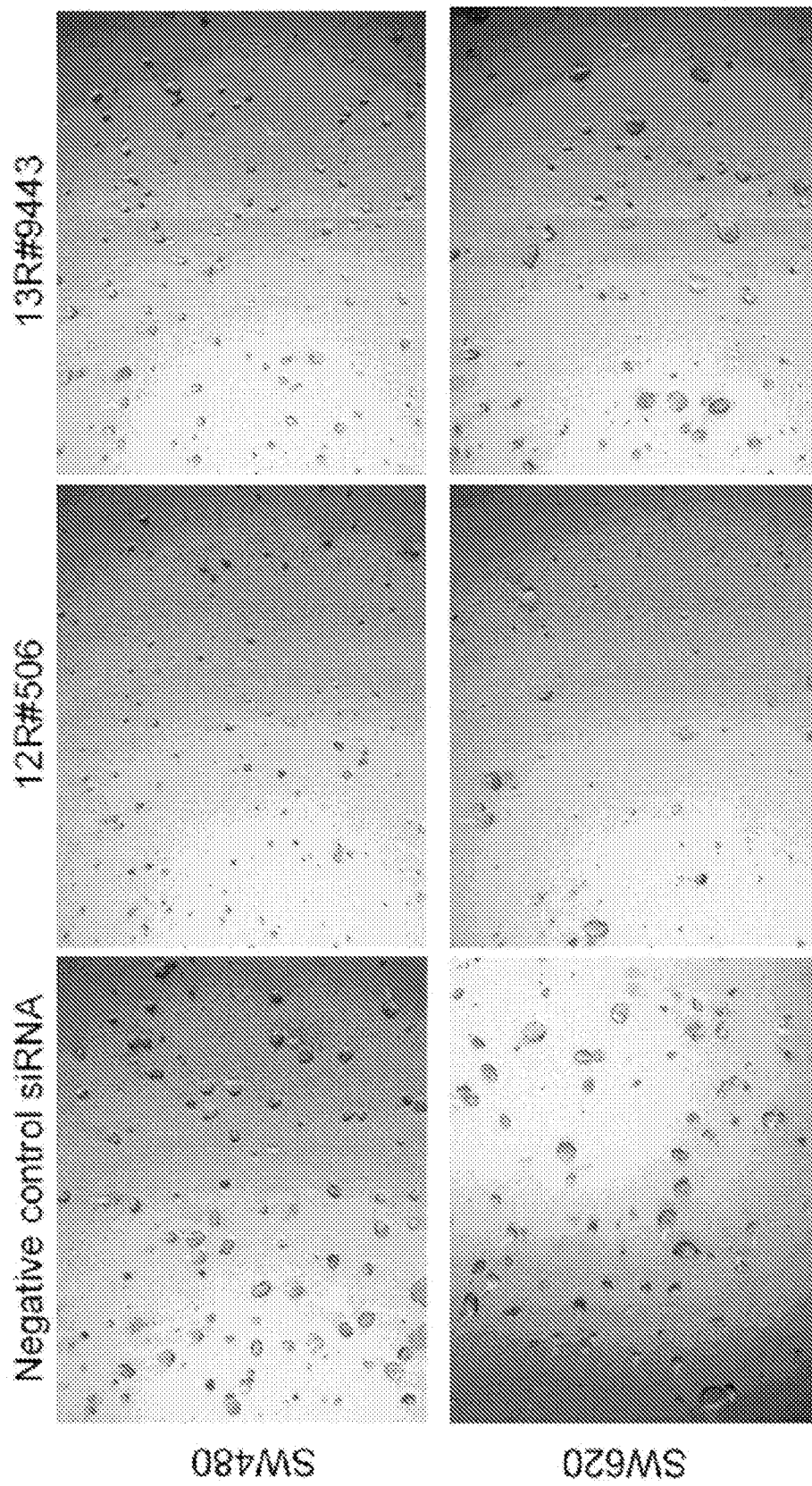
[図9]



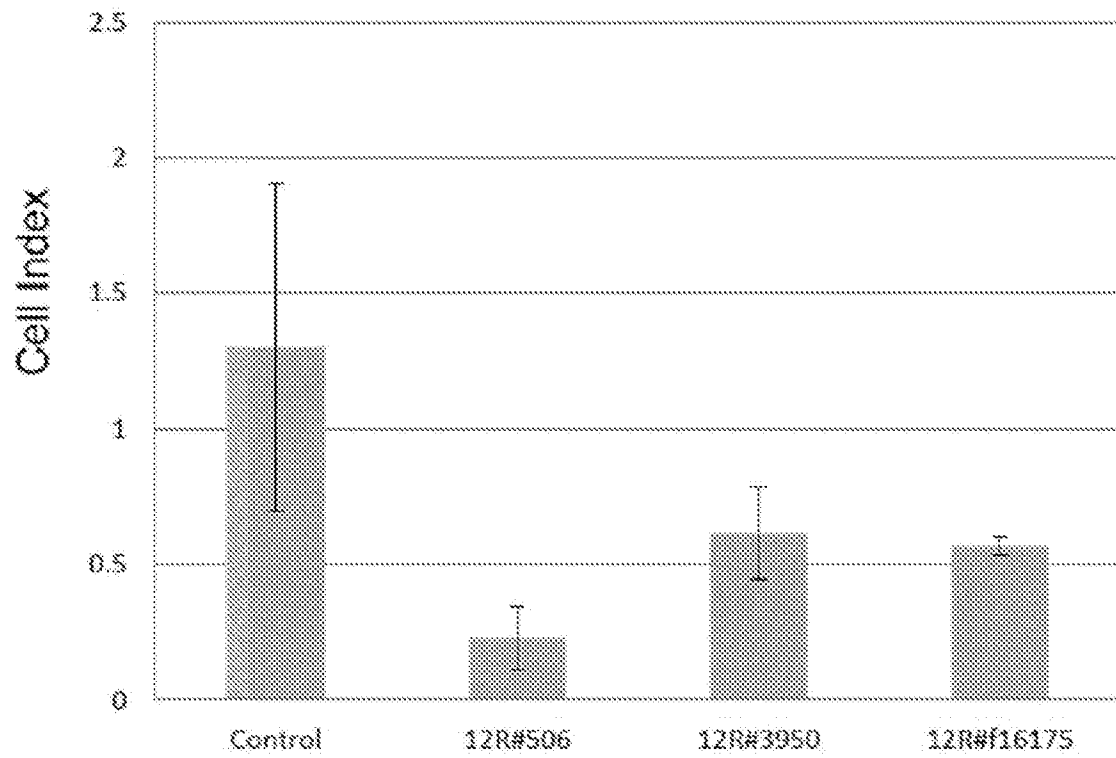
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K35/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i</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) <i>C12N15/09, A61K31/7088, A61K35/00, A61K48/00, C12N5/10, C12N15/113, C12Q1/68</i>												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2013</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2013</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2013</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013		
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013									
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</i>												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y A	GUTSCHNER, T. and DIEDERICHS, S., The hallmarks of cancer. A long non-coding RNA point of view, <i>RNA Biology</i> , 2012.06, 9 (6), p.703-719, page 703, left column, page 711, right column, 4th paragraph	1-7, 9-16, 18 8										
Y A	PRENSNER, J. R. and CHINNAIYAN, A. M., The Emergence of lncRNAs in Cancer Biology, <i>Cancer Discovery</i> , 2011, 1, p.391-407, page 394, right column, 2nd paragraph, Table 2	1-7, 9-16, 18 8										
Y A	MITRA, S. A. et al., A central role for long non-coding RNA in cancer, <i>Front. Genet.</i> , 2012. 02.15, 3, p.1-9, abstract	1-7, 9-16, 18 8										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"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 03 December, 2013 (03.12.13)		Date of mailing of the international search report 17 December, 2013 (17.12.13)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080878

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	FIRESTEIN, R. et al., CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates β -catenin activity, <i>Nature</i> , 2008, 455, p.547-551, abstract	1-7, 9-16, 18 8
Y A	Midori ARAI, Masami ISHIBASHI, "Tennenbutsu o Kiban to suru Wnt Oyobi Hedgehog Signal Sogaizai no Tansaku", <i>Pharmacia</i> , 45 (2), 2009, pages 121 to 125, page 121, right column, last paragraph to page 122, left column, 1st paragraph	1-7, 9-16, 18 8
Y A	Toru AKIYAMA, "Wnt Signal to sono Tasai na Kino: Saibo Kyokusei·Saibo Undo·Kansaibo no Jiko Fukusei·Hatsugan Wnt Signal to Hatsugan", <i>Cell technology</i> , 2004, 23 (6), pages 669 to 672, page 669, left column, 1st paragraph	1-7, 9-16, 18 8
A	JP 2008-518610 A (Almac Diagnostics Ltd.), 05 June 2008 (05.06.2008), entire text & US 2006/0134663 A1 & WO 2006/048291 A2 & CN 101115848 A	1-16, 18
A	DERRIEN, T. et al., The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression, <i>Genome Res.</i> , 2012.09, 22 (9), p.1755-1789, entire text	1-16, 18
A	WO 2005/000087 A2 (CHIRON CORP.), 06 January 2005 (06.01.2005), SEQ ID NO:9270 (Family: none)	1-16, 18
P,A	XU, D. et al., Long noncoding RNAs associated with liver regeneration 1 accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration by activating Wnt/ β -catenin signaling., <i>Hepatology</i> , 2013.08, 58 (2), p. 739-751, abstract	1-16, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/080878

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.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It is recognized that "a method for inhibiting the expression of lncRNA" according to claim 17 includes an in vivo inhibition method.
Therefore, claim 17 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
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:

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

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K35/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K31/7088, A61K35/00, A61K48/00, C12N5/10, C12N15/113, C12Q1/68</p>											
<p>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</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年	
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
<p>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)</p> <p>CAplus/ MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">Y A</td> <td>GUTSCHNER, T. and DIEDERICHS, S., The hallmarks of cancer. A long non-coding RNA point of view, RNA Biology, 2012.06, 9 (6), p.703-719, 703 頁左欄、711 頁右欄 4 段落</td> <td style="text-align:center;">1-7, 9-16, 18 8</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">Y A</td> <td>PRENSNER, J. R. and CHINNAIYAN, A. M., The Emergence of lncRNAs in Cancer Biology, Cancer Discovery, 2011, 1, p.391-407, 394 頁右欄 2 段落、Table 2</td> <td style="text-align:center;">1-7, 9-16, 18 8</td> </tr> </tbody> </table>			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	Y A	GUTSCHNER, T. and DIEDERICHS, S., The hallmarks of cancer. A long non-coding RNA point of view, RNA Biology, 2012.06, 9 (6), p.703-719, 703 頁左欄、711 頁右欄 4 段落	1-7, 9-16, 18 8	Y A	PRENSNER, J. R. and CHINNAIYAN, A. M., The Emergence of lncRNAs in Cancer Biology, Cancer Discovery, 2011, 1, p.391-407, 394 頁右欄 2 段落、Table 2	1-7, 9-16, 18 8
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									
Y A	GUTSCHNER, T. and DIEDERICHS, S., The hallmarks of cancer. A long non-coding RNA point of view, RNA Biology, 2012.06, 9 (6), p.703-719, 703 頁左欄、711 頁右欄 4 段落	1-7, 9-16, 18 8									
Y A	PRENSNER, J. R. and CHINNAIYAN, A. M., The Emergence of lncRNAs in Cancer Biology, Cancer Discovery, 2011, 1, p.391-407, 394 頁右欄 2 段落、Table 2	1-7, 9-16, 18 8									
<p><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。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> </td> </tr> </table>			<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>							
<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">03.12.2013</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">17.12.2013</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">吉田 知美</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:20%;">4B</td> <td style="width:80%;">3335</td> </tr> </table>	4B	3335							
4B	3335										

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
Y A	MITRA, S. A. et al., A central role for long non-coding RNA in cancer, Front. Genet., 2012.02.15, 3, p.1-9, 要約	1-7, 9-16, 18 8
Y A	FIRESTEIN, R. et al., CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates β -catenin activity, Nature, 2008, 455, p.547-551, 要約	1-7, 9-16, 18 8
Y A	荒井緑, 石橋正己, 天然物を基盤とする Wnt 及び Hedgehog シグナル 阻害剤の探索, ファルマシア, 45 (2), 2009, p.121-125, 121 頁右欄最終段落-122 頁左欄 1 段落	1-7, 9-16, 18 8
Y A	秋山徹, Wnt シグナルとその多彩な機能:細胞極性・細胞運動・幹細胞の自己複製・発癌 Wnt シグナルと発癌, 細胞工学, 2004, 23 (6), p.669-672, 669 頁左欄 1 段落	1-7, 9-16, 18 8
A	JP 2008-518610 A (アルマック ダイアグノスティックス リミテッド) 2008.06.05, 全文 & US 2006/0134663 A1 & WO 2006/048291 A2 & CN 101115848 A	1-16, 18
A	DERRIEN, T. et al., The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression, Genome Res., 2012.09, 22 (9), p.1755-1789, 全文	1-16, 18
A	WO 2005/000087 A2 (CHIRON CORPORATION) 2005.01.06, SEQ ID NO:9270 (ファミリーなし)	1-16, 18
P A	XU, D. et al., Long noncoding RNAs associated with liver regeneration 1 accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration by activating Wnt/ β -catenin signaling., Hepatology, 2013.08, 58 (2), p.739-751, 要約	1-16, 18

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 17 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、請求項 17に係る「lncRNAの発現を抑制する方法」には、生体内での抑制方法 (in vivo) も包含されるものと認められる。よって、請求項 17は人体の治療方法に該当するものである。
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。

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。