



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201317251 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21) 申請案號：101133177

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 11 日

(51) Int. Cl. : C07H21/02 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

C40B30/06 (2006.01)

(30) 優先權：2011/09/14 日本

2011-200756

(71) 申請人：日本化藥公司 (日本) NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)

日本

(72) 發明人：佐藤學道 SATO, TAKAMICHI (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：2 共 48 頁

(54) 名稱

細胞之增殖抑制方法、對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子、及抗癌劑

METHOD FOR INHIBITING PROLIFERATION OF CELLS, NUCLEIC ACID MOLECULE HAVING RNA INTERFERING ACTIVITY ON NEK10 VARIANT GENE, AND ANTI-CANCER AGENT

(57) 摘要

本發明提供一種細胞之增殖抑制方法、作為抗癌劑有用之核酸分子、及新穎抗癌劑之篩選方法。於本發明中，藉由將對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子導入細胞中，而獲得對 NEK10 變異基因之表現之抑制效果或對 NEK10 變異蛋白質之活性之抑制效果。本發明亦提供以該抑制效果作為指標之抗癌劑之篩選方法。



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201317251 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21) 申請案號：101133177

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 11 日

(51) Int. Cl. : C07H21/02 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

C40B30/06 (2006.01)

(30) 優先權：2011/09/14 日本

2011-200756

(71) 申請人：日本化藥公司 (日本) NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)

日本

(72) 發明人：佐藤學道 SATO, TAKAMICHI (JP)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：2 共 48 頁

(54) 名稱

細胞之增殖抑制方法、對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子、及抗癌劑

METHOD FOR INHIBITING PROLIFERATION OF CELLS, NUCLEIC ACID MOLECULE HAVING RNA INTERFERING ACTIVITY ON NEK10 VARIANT GENE, AND ANTI-CANCER AGENT

(57) 摘要

本發明提供一種細胞之增殖抑制方法、作為抗癌劑有用之核酸分子、及新穎抗癌劑之篩選方法。於本發明中，藉由將對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子導入細胞中，而獲得對 NEK10 變異基因之表現之抑制效果或對 NEK10 變異蛋白質之活性之抑制效果。本發明亦提供以該抑制效果作為指標之抗癌劑之篩選方法。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101133177

C07H 21/02 (2006.01)

※ 申請日：101.9.11

※IPC 分類：A61K 31/713 (2006.01)

C40B 30/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

細胞之增殖抑制方法、對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之核酸分子、及抗癌劑

METHOD FOR INHIBITING PROLIFERATION OF CELLS, NUCLEIC ACID MOLECULE HAVING RNA INTERFERING ACTIVITY ON NEK10 VARIANT GENE, AND ANTI-CANCER AGENT

二、中文發明摘要：

本發明提供一種細胞之增殖抑制方法、作為抗癌劑有用之核酸分子、及新穎抗癌劑之篩選方法。於本發明中，藉由將對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之核酸分子導入細胞中，而獲得對NEK10變異基因之表現之抑制效果或對NEK10變異蛋白質之活性之抑制效果。本發明亦提供以該抑制效果作為指標之抗癌劑之篩選方法。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a method for inhibiting proliferation of cells, a nucleic acid molecule useful as an anti-cancer agent, and a method for screening as novel anti-cancer agent. In the present invention, inhibition effects on the expression of NEK10 variant gene or the activity of the NEK10 variant protein can be obtained by introducing, into a cell, a nucleic acid molecule having an RNA interfering activity to the NEK10 variant gene. The present invention also provides a method for screening anti-cancer agents, using the inhibition effects as an index.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種細胞之增殖抑制方法、對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之核酸分子、用於在細胞內使該核酸分子表現之表現載體、包含該核酸分子之NEK10變異基因表現抑制用組合物、以該核酸分子作為有效成分之抗癌劑、及抗癌劑之篩選方法。

【先前技術】

癌近年來於日本為第1位死因，每年30,000人以上因癌而死亡。儘管癌之檢測及治療有所進步，但癌之死亡率依然較高。作為癌之化學療法，雖然近年來基利克(Glivec，註冊商標)或賀癌平(Herceptin，註冊商標)等分子標靶(molecular-targeted)抗癌劑備受矚目，但見效之患者受到限定，因此期待開發出新穎之分子標靶抗癌劑。

二十世紀七十年代初期，自小巢狀麴菌(*Aspergillus nidulans*)發現NIMA(never in mitosis gene a，永離有絲分裂基因A)激酶，又，自作為NIMA激酶之同源物之Fin1發現裂殖酵母(fission yeast)。NIMA激酶屬於絲胺酸/蘇胺酸激酶家族，其對細胞週期之M期較為重要。即，明確NIMA激酶係於進入M期、染色體之凝聚、紡錘體之形成及細胞質分裂之控制中具有核心作用的分子(例如參照非專利文獻1)。

人類之NIMA激酶之同源物係NIMA相關激酶(NEK)，存在NEK1~NEK11，形成NEK家族。目前為止已知NEK家族

係對細胞週期及訊號傳遞途徑重要之分子。例如報告有NEK家族中之NEK2、NEK6、NEK7、及NEK9與NIMA激酶及Fin1同樣地參與進入M期、染色體之凝聚、紡錘體之形成及細胞質分裂之控制(例如參照非專利文獻2)。

關於NEK10，報告有其對UV照射之應答之G2/M期檢查點控制較為重要(例如參照非專利文獻3)。又，報告有存在於NEK10基因中之SNP與乳癌之罹患率有關(例如參照非專利文獻4及5)。其中，關於NEK10是否參與細胞、特別是癌細胞之增殖，尚不確定。又，於NCBI之資料庫中，登錄有被推測為人類NEK10變異體之分子(寄存編號：AK098832.1，以下，人類NEK10變異體)。由於與其他NEK家族分子同樣地具有激酶區，故而人類NEK10變異體亦存在與細胞週期控制相關之可能性，但於活體內具有何種功能尚不確定。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[非專利文獻1] M. J. O'Connell et al., TRENDS in cell Biology, 2003, vol. 13, p. 221 ~ 228.

[非專利文獻2] L. O' Regan et al., Cell Division, 2007, vol. 2, p. 25 ~ 36.

[非專利文獻3] L. S. Moniz et al., MOLECULAR and Cellular Biology, 2011, vol. 31, p. 30 ~ 42.

[非專利文獻4] S. Ahmed et al., Nature Genetics, 2009, vol. 41, p. 585 ~ 590.

[非專利文獻5] A. C. Antoniou et al., Cancer Research, 2010, vol. 70, p. 9742 ~ 9754.

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明之目的在於提供一種細胞之增殖抑制方法、作為抗癌劑有用之核酸分子、及新穎之抗癌劑之篩選方法。

[解決問題之技術手段]

本發明者認為由於與人類NEK10變異體具有同源性之分子於小鼠體內亦存在，NEK10變異體係超越物種而保存，故而NEK10變異體對細胞增殖或細胞週期控制較為重要，並且對在活體內之功能不明確之NEK10變異體進行努力研究。結果本發明者發現：若於細胞中抑制NEK10變異體之表現，則引起細胞增殖抑制，及對NEK10變異mRNA具有RNA干擾作用之核酸(NEK10 siRNA)具有對細胞、特別是癌細胞之細胞增殖抑制作用，從而完成本申請發明。

即，本發明採用下述構成。

(1) 一種細胞之增殖抑制方法，其包括於細胞中使NEK10變異基因之表現降低之表現降低步驟、或使NEK10變異蛋白質之活性降低之活性降低步驟。

(2) 如上述(1)之細胞之增殖抑制方法，其中上述表現降低步驟係將選自由藉由RNA干擾而抑制NEK10變異基因之表現之核酸分子、上述核酸分子之前驅物、及可表現上述核酸分子或上述前驅物之表現載體所組成之群中之至少1種導入細胞中之步驟。

(3) 如上述(2)之細胞之增殖抑制方法，其中上述核酸分子係以序列編號2或4所表示之NEK10變異基因之mRNA中之鹼基序列為標靶的具有RNA干擾作用之siRNA，

上述前驅物係以序列編號2或4所表示之NEK10變異基因之mRNA中之鹼基序列作為標靶的具有RNA干擾作用之shRNA。

(4) 如上述(2)或(3)之細胞之增殖抑制方法，其中上述核酸分子係選自由如下(a)~(g)所組成之群：

(a) 含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；

(b) 含有包含序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號5所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；

(c) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(d) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(e) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺

失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(f) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；以及

(g) 上述(a)~(f)中之任一siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

(5) 如上述(2)至(4)中任一項之細胞之增殖抑制方法，其中上述前驅物係於細胞內產生如下(a)~(g)中之任一者之核酸分子：

(a) 含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；

(b) 含有包含序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號5所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；

(c) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(d) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個

連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(e) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(f) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；或

(g) 上述(a)~(f)中之任一siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

(6) 如上述(2)之細胞之增殖抑制方法，其中上述前驅物為

(p) 含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號3所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；或者

(q) 含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、

置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號5所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；並且

於細胞內，自上述(p)之shRNA及上述(q)之shRNA產生對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

(7) 如上述(1)至(6)中任一項之細胞之增殖抑制方法，其中上述細胞為癌細胞。

(8) 一種核酸分子，其係

(a) 含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；

(b) 含有包含序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號5所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；

(c) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(d) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(e) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以

上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(f) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；或

(g) 上述(a)~(f)中之任一siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

(9) 一種核酸分子，其係

(p) 含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號3所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；或者

(q) 含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號5所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；

其係於細胞內用於產生對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA的前驅物。

(10) 一種表現載體，其含有如上述(8)或(9)之核酸分子，且可使該核酸分子表現。

(11) 一種NEK10變異基因表現抑制用組合物，其含有選自由如上述(8)之核酸分子、如上述(9)之核酸分子、及如上述(10)之表現載體所組成之群中之1種以上。

(12) 一種抗癌劑，其含有選自由如上述(8)之核酸分子、如上述(9)之核酸分子、及如上述(10)之表現載體所組成之群中之1種以上作為有效成分。

(13) 一種抗癌劑之篩選方法，其以對NEK10變異基因之表現之抑制效果或對NEK10變異蛋白質之活性之抑制效果作為指標。

(14) 如上述(13)之抗癌劑之篩選方法，其包括如下步驟：

在關於NEK10變異基因之表現抑制效果或對NEK10變異蛋白質之活性之抑制效果的候補物質之存在下及非存在下，分別培養NEK10變異體表現細胞之步驟；及

測定該細胞內之NEK10變異 mRNA表現量或NEK10變異蛋白質之活性量，對在該候補物質之存在下及非存在下之表現量或活性量進行比較之步驟。

[發明之效果]

可利用本發明之細胞之增殖抑制方法，藉由於NEK10變異體活性降低之新穎途徑上發揮作用，而抑制細胞之增

殖。又，本發明之核酸分子係對NEK10變異 mRNA具有RNA干擾作用之物質，適宜用於本發明之細胞之增殖抑制方法。即，本發明之細胞之增殖抑制方法及核酸分子於癌之治療中極為有用，從而可期待即便針對藉由先前之增殖抑制方法未獲得效果之癌病患者，亦顯示出抗腫瘤效果。

又，藉由本發明之抗癌劑之篩選方法，可取得新穎之抗癌劑之候補化合物。

【實施方式】

<細胞之增殖抑制方法>

本發明之細胞之增殖抑制方法之特徵在於包括：於細胞中使NEK10變異基因之表現降低之表現降低步驟及/或使NEK10變異蛋白質(NEK10變異基因所編碼之蛋白質)之活性降低之活性降低步驟。可藉由抑制細胞內之NEK10變異蛋白質之功能而抑制細胞之細胞增殖。認為其係因NEK10變異蛋白質參與細胞中之細胞增殖而產生之現象。使NEK10變異基因之表現或NEK10變異蛋白質之活性降低之方法並無特別限定，亦可使用於使細胞內之特定之基因之表現或蛋白質之活性降低時所使用之公知方法中之任一種。

作為使NEK10變異蛋白質之活性降低之方法，例如可列舉如下方法：將針對NEK10變異蛋白質之抗體等之與NEK10變異蛋白質結合之物質導入細胞內，而使該物質與細胞內之NEK10變異蛋白質結合，藉此抑制NEK10變異蛋白質與其他活體分子之相互作用。向細胞內導入與NEK10

變異蛋白質結合之物質之方法並無特別限定，可藉由注入等將該物質直接導入細胞內，亦可使該物質接觸細胞表面並藉由內噬作用等使之進入細胞內。除此以外，自NEK10變異蛋白質之結構可推測NEK10變異蛋白質與NEK10蛋白質同樣地具有激酶活性。因此，NEK10變異蛋白質之活性亦可藉由於細胞內使已缺失或置換NEK10變異蛋白質之激酶活性部位的顯性負性體表現而進行抑制。

另一方面，作為使NEK10變異基因之表現降低之方法，可列舉藉由RNA干擾法而使NEK10變異基因表現降低之方法。具體而言，向細胞內導入以NEK10變異基因之mRNA(NEK10變異mRNA)為標靶之反義核酸、核酶核酸、或雙鏈RNA(dsRNA)等之誘導RNA干擾的核酸分子，而使該細胞內之NEK10變異mRNA分解。

一般而言，所謂RNA干擾係指如下現象：將由包含與標靶基因之mRNA序列之一部分同源之序列的正義siRNA(small interfering RNA)及包含與其互補之序列之反義siRNA所形成之dsRNA的siRNA投予至細胞中，藉此於細胞內，siRNA背離正義siRNA及反義siRNA，標靶基因mRNA與反義siRNA形成雙鏈，其後利用切丁酶(Dicer)而分解該形成之dsRNA，藉此抑制標靶基因之表現。RNA干擾法除將siRNA導入細胞內外，亦可藉由向細胞內導入成為siRNA之前驅物的相對長鏈之dsRNA或髮夾型之shRNA(small hairpin RNA)，或導入表現siRNA或其前驅物之載體，而與siRNA同樣地抑制標靶基因之表現。進而，

亦已知有藉由 siRNA 而於活體內 (in vivo) 抑制標靶基因之表現之方法 (P. Anton et al., Nature, 2002, vol. 418, p38 - 39 ; L. David et al., Nat. Genet., 2002, vol. 32, p107 - 108)。

[對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子]

於本發明中，較佳為藉由向細胞內導入對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子 (以下，有稱為「RNAi 核酸分子」之情況) 而使 NEK10 變異基因之表現降低。作為 RNAi 核酸分子，若為對 NEK10 變異 mRNA 具有 RNA 干擾作用之核酸分子，則無特別限定，較佳為 siRNA。

於本發明中用作 RNAi 核酸分子之 siRNA 只要對 NEK10 變異 mRNA 具有 RNA 干擾作用，則亦可對應於任意區域之 siRNA。對 NEK10 變異 mRNA 之部分鹼基序列具有 RNA 干擾作用之 siRNA 係基於 NEK10 變異 mRNA 之鹼基序列資訊，從業者可適當設計而製備。例如將人類 NEK10 變異 mRNA 之 cDNA 之鹼基序列示於序列編號 1。於本發明中使用之 siRNA 雖較佳為具有與 NEK10 變異 mRNA 中之作為標靶之鹼基序列完全互補之鹼基序列，但只要具有 RNA 干擾作用，則亦可錯配 1 個或數個鹼基。

於本發明中使用之 siRNA 之鹼基對長度只要為顯示對 NEK10 變異 mRNA 之 RNA 干擾作用者，則無特別限定。例如可列舉包含正義 RNA 及反義 RNA 為 15~30 個之鹼基對、較佳為 21~23 個鹼基對的 siRNA。

又，於本發明中使用之 siRNA 只要具有 RNA 干擾作用，

則亦可修飾1個或數個鹼基。作為該修飾，可列舉甲基化、肌苷化、dU化、螢光基修飾、或磷酸化等。siRNA中，修飾鹼基可存在於正義RNA中，亦可存在於反義RNA中，亦可存在於兩者中。

若可藉由RNA干擾效果調節NEK10變異基因之表現，則於本發明中使用之siRNA之末端結構亦可為平滑末端與突出末端中之任一種。突出末端結構不僅為3'末端側突出之結構，只要顯示上述RNA干擾效果，則亦可包含5'末端側突出之結構。又，突出之鹼基數於已經報告有對其他基因顯示RNA干擾效果之siRNA中多為2~3個鹼基，但於本發明中使用之siRNA中，只要為可誘導RNA干擾效果之鹼基數即可，例如突出之鹼基數亦可為1~8個鹼基，較佳為2~4個鹼基。關於該突出之鹼基，無需與NEK10變異mRNA互補(反義)或同源(正義)之序列。

作為對NEK10變異mRNA具有RNA干擾作用之siRNA，例如可列舉：以NEK10變異mRNA中之序列編號2所表示之鹼基序列之全長或其一部分連續的鹼基序列、例如15~24個連續之鹼基序列、較佳為18~20個連續之鹼基序列作為標靶的具有RNA干擾作用之siRNA。又，亦可列舉：以NEK10變異mRNA中之序列編號4所表示之鹼基序列之全長或其一部分連續的鹼基序列、例如15~24個連續之鹼基序列、較佳為18~20個連續之鹼基序列作為標靶的具有RNA干擾作用之siRNA。

作為以NEK10變異mRNA中之序列編號2所表示之鹼基序

列之全長或其一部分鹼基序列作為標靶的siRNA，具體而言，可列舉：含有包含序列編號2(5'-GAAAUCCUGUCAGAUGAUAACUUCA-3')所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3(5'-UGAAGUUAUCAUCUGACAGGAUUUC-3')所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；或包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。又，亦可為包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。除此以外，亦可為於該等siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

作為以NEK10變異mRNA中之序列編號4所表示之鹼基序列之全長或其一部分鹼基序列作為標靶的siRNA，具體而言，可列舉：含有包含序列編號4(5'-UCUGCCUUGUUUGUUCACCACUAUU-3')所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號5(5'-AAUAGUGGUGAACAAACAAGGCAGA-3')所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；或包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA

及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。又，亦可為包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列的正義RNA、及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。除此以外，亦可為於該等siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

[RNAi核酸分子之前驅物]

於本發明之細胞之增殖抑制方法中，可向細胞直接導入siRNA等RNAi核酸分子，亦可向細胞導入RNAi核酸分子之前驅物，於該細胞內藉由分解等反應而自該前驅物產生RNAi核酸分子。作為RNAi核酸分子之前驅物，若為於細胞內最終產生siRNA等RNAi核酸分子之前驅物，則無特別限定。作為siRNA之前驅物，例如可列舉：經由間隔基而連結構成相對長鏈之dsRNA、siRNA之正義RNA及反義RNA之單鏈RNA。間隔基之長度並無特別限定，例如可設為3~23個鹼基。又，亦較佳為連結正義RNA及反義RNA之間隔基形成環，而其前後之RNA序列彼此退火形成雙鏈之RNA(shRNA)。shRNA中之環及莖之長度並無特別限定，例如莖可設為5~29個鹼基。又，亦可於5'末端及/或3'末端具有數個鹼基之突出物，亦可不具有突出物。該等前驅物於細胞內藉由切丁酶等消化，結果產生siRNA等RNAi核酸

分子。

作為本發明之細胞之增殖抑制方法中使用之前驅物，可列舉以NEK10變異基因之mRNA中之序列編號2或4所表示之鹼基序列作為標靶的具有RNA干擾作用之shRNA。作為於本發明中使用之前驅物，較佳為於細胞內可產生以NEK10變異mRNA中之序列編號2所表示之鹼基序列之全長或其一部分鹼基序列作為標靶的siRNA或以NEK10變異mRNA中之序列編號4所表示之鹼基序列之全長或其一部分鹼基序列作為標靶的siRNA中之任一種shRNA。

作為用於產生以序列編號2所表示之鹼基序列之全長或其一部分鹼基序列作為標靶之siRNA的前驅物之核酸分子，例如可列舉：含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號3所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA等，且於細胞內，自該shRNA產生對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。作為用於產生以序列編號4所表示之鹼基序列之全長或其一部分鹼基序列作為標靶之siRNA的作為前驅物之核酸分子，例如可列舉：含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號5所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1

個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA等，且於細胞內，自該shRNA產生對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

作為siRNA等RNAi核酸分子或其前驅物之核酸分子例如可藉由如下方法等而適宜製備：使用有化學性之活體外合成系、噬菌體RNA聚合酶之活體外轉錄法；將選殖化之cDNA作為模板進行轉錄，將締合而成之長dsRNA利用RNase III或切丁酶進行切割之方法。又，於使用含有修飾鹼基之RNAi核酸分子之情形時，可對所合成之核酸分子實施修飾，亦可使用修飾鹼基而合成RNAi核酸分子。

[表現載體]

於本發明之細胞之增殖抑制方法中，亦可將可表現作為RNAi核酸分子或其前驅物之核酸分子的表現載體導入細胞中，而於該細胞內自該表現載體產生RNAi核酸分子等。作為可表現siRNA之載體，例如可列舉：以siRNA之正義RNA與反義RNA分別表現之方式分別與各自之啟動子連結的表現載體；藉由選擇性剪切等，由1個啟動子各別地轉錄正義RNA與反義RNA之表現載體等。作為可表現shRNA之載體，例如可列舉於啟動子之下游連結有構成shRNA之單鏈RNA的表現載體等。

對於從業者而言，該等表現載體可藉由一般基因工程學技術而容易地製作(T. R. Brummelkamp et al., Science, 2002, vol. 296, p. 550 ~ 553; N. S. Lee et al., Nat. Biotech., 2001, vol. 19, p. 500 ~ 505; M. Miyagishi and K.

Taira, Nat. Biotech., 2002, vol. 19, p. 497 ~ 500 ; P. J. Paddison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, vol. 99, p. 1443 ~ 1448 ; C. P. Paul et al., Nat. Biotech., 2002, vol. 19, p. 505 ~ 508 ; G. Sui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, vol. 99, p. 5515 ~ 5520 ; G. M. Barton and R. Medzhitov, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, vol. 99, p. 14943 ~ 14945 ; P. J. Paddison et al., Genes Dev., 2002, vol. 16, p. 948 ~ 958)。更具體而言，可藉由向公知之各種表現載體適宜插入編碼目標RNA序列之DNA而構建。作為啟動子，可使用RNA聚合酶III啟動子等。具體而言，例如可應用U6啟動子或H1啟動子等。作為公知之載體，可應用反轉錄酶病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、負鏈RNA病毒載體等病毒載體或質體等非病毒載體等。

[向細胞之導入]

向細胞導入siRNA等RNAi核酸分子、其前驅物、或該等之表現載體之方法並無特別限定，可使用向細胞內導入核酸分子時使用之公知方法中之任一種。例如可藉由注入等將RNAi核酸分子等直接導入細胞內，亦可視需要使用公知之基因導入試劑等，藉由內噬作用等使之進入細胞內。又，向細胞導入之RNAi核酸分子等可僅使用1種，亦可混合2種以上而導入。

於本發明之細胞之增殖抑制方法中，成為抑制增殖之對象之細胞為表現NEK10變異基因之細胞，即可表現作為NEK10變異基因之轉錄產物之mRNA或作為其轉譯產物之

蛋白質的細胞(以下，NEK10變異體表現細胞)。若為NEK10變異體表現細胞，則無特別限定，可為正常細胞，亦可為癌細胞。又，來源之組織等並無特別限定。例如於為癌細胞之情形時，癌種類亦無特別限定。又，可為源自人類之細胞，亦可為源自人類以外之動物之細胞。成為抑制增殖之對象之細胞可為自培養細胞或生物個體採集之細胞，亦可為生物個體中之細胞。

<NEK10變異基因表現抑制用組合物、抗癌劑>

若將對NEK10變異 mRNA具有RNA干擾作用之 siRNA、上述 siRNA之前驅物(其中，shRNA)、上述 siRNA之表現載體、或上述前驅物之表現載體等核酸分子導入細胞內，則於該細胞內引起RNA干擾，使NEK10變異基因之表現降低，結果該細胞之細胞增殖受到抑制。即，該等核酸分子係可作為細胞增殖抑制劑之有效成分者，因此係作為對腫瘤等細胞過度增殖等成為問題之疾病之醫藥品有用的物質。因此，該等核酸分子可直接或適宜與藥理學上所容許之調配劑進行混合，而用作NEK10變異基因表現抑制用組合物(本發明之組合物)或抗癌劑(本發明之抗癌劑)。再者，本發明之組合物及抗癌劑可含有 siRNA等核酸分子僅1種，亦可組合複數種而含有。

認為以對NEK10變異 mRNA具有RNA干擾作用之核酸分子作為有效成分之本發明的抗癌劑，在針對表現NEK10變異基因之癌之治療中極為有用。並且，NEK10變異基因不僅於乳癌中表現，亦至少於肝癌、腎癌、攝護腺癌、及子

宮癌中表現。因此，期待本發明之抗癌劑於多種癌細胞中顯示細胞增殖作用，而發揮較高之抗腫瘤效果。

本發明之組合物及抗癌劑對表現NEK10變異基因之癌細胞顯示出癌細胞增殖抑制作用、誘導癌細胞死亡作用等抗癌作用，或對抗癌劑等之感受性之增強作用等。又，由本發明之組合物或抗癌劑產生之該等作用效果可為短暫性地發揮者，亦可為恆常性地發揮者。又，亦可為導入本發明之組合物或抗癌劑後，經過一定時間後，最終顯現效果者。

作為可添加至本發明之組合物及抗癌劑中之調配劑，可列舉：載體、賦形劑、崩散劑、黏合劑、潤滑劑、流動化劑、塗佈劑、懸浮劑、乳化劑、穩定劑、保存劑、矯味劑、調味劑、稀釋劑、溶解助劑等製藥上可容許之添加劑。又，本發明之組合物及抗癌劑係以粉劑、顆粒劑、錠劑、膠囊錠劑、膠囊劑、注射劑、栓劑、軟膏劑等製劑形態，以經口或非經口(全身投予、局部投予等)之方式安全投予。本發明之組合物及抗癌劑中之有效成分(作為RNAi核酸分子或其前驅物之核酸分子)之含量根據製劑而有所不同，通常較佳為0.1~100重量%。投予量根據投予途徑、患者之年齡及應預防或治療之實際症狀等而有所不同，例如對成人經口投予之情形時，作為有效成分，可設為1天0.01 mg~2000 mg，較佳為設為0.1 mg~1000 mg，且可1天投予1次或分數次進行投予。

< 抗癌劑之篩選方法 >

如上所述，藉由使NEK10變異基因之表現降低等而抑制癌細胞內之NEK10變異蛋白質之功能，藉此抑制癌細胞之細胞增殖，而顯示抗腫瘤效果。因此，對於具有抑制NEK10變異基因之表現之作用的物質或具有抑制NEK10變異蛋白質之活性之作用的物質，其作為癌治療藥之有效成分有用之可能性較高。因此，可藉由將對NEK10變異基因之表現之抑制效果或對NEK10變異蛋白質之活性之抑制效果作為指標，而篩選新穎之抗癌劑。

作為抗癌劑之候補物質，可列舉：核酸、肽、蛋白質、有機化合物(包括低分子化合物或高分子化合物)、無機化合物等。本發明之篩選方法可將含有該等候補物質(以下，試驗樣品)之試樣作為對象而實施。含有試驗樣品之試樣包括細胞萃取物、基因庫之表現產物、微生物培養上清液及菌體成分等。

自試驗樣品中，將對NEK10變異基因之表現之抑制效果作為指標進行探索之情形時，具體而言，係於試驗樣品之存在下或非存在下培養NEK10變異體表現細胞，並對兩種條件下之NEK10變異 mRNA 或 NEK10 變異蛋白質之表現量進行比較。

作為用於篩選之細胞，只要為NEK10變異體表現細胞即可。於篩選對人類有效之抗癌劑之情形時，較佳為使用源自人類之NEK10變異體表現細胞，但若為源自存在與人類NEK10變異 mRNA 顯示出同源性之鹼基序列之物種的細胞，則亦可為源自人類以外之動物之NEK10變異體表現細

胞。例如，於小鼠之轉錄產物中，亦存在與人類NEK10變異 mRNA 顯示出同源性的鹼基序列 (NCBI之寄存編號：NM_001195119.1)，因此亦可使用源自小鼠之NEK10變異體表現細胞。再者，於用於篩選之細胞之範疇中，亦包括作為細胞之聚集體之組織。除此以外，亦可依據慣例，將轉形細胞用作NEK10變異體表現細胞，上述轉形細胞係導入具有人類NEK10變異基因之cDNA之表現載體而製備成可產生NEK10變異蛋白質之狀態。

於上述篩選方法中，試驗樣品與NEK10變異體表現細胞之接觸例如藉由於NEK10變異體表現細胞之培養液中添加有試驗樣品之狀態下進行培養而進行。又，試驗樣品與NEK10變異體表現細胞之接觸條件並無特別限定，較佳為選擇該細胞未死滅，且可表現NEK10變異 mRNA 或蛋白質之培養條件(溫度、pH值、培養基組成等)。

候補物質之篩選例如可藉由於上述條件下使試驗樣品與NEK10變異體表現細胞接觸，探索使NEK10變異 mRNA 或蛋白質之表現量降低的物質而進行。具體而言，於試驗樣品之存在下培養NEK10變異體表現細胞之情形時，篩選NEK10變異 mRNA 或蛋白質表現量小於相同條件之在試驗樣品之非存在下之NEK10變異 mRNA 或蛋白質表現量的試驗樣品。

NEK10變異 mRNA 之表現量可藉由如下方法測定：利用具有與NEK10變異 mRNA 之鹼基序列互補之序列之寡核苷酸探針等的北方墨點法或利用DNA陣列之測定方法、以

NEK10變異 mRNA中之部分鹼基序列作為引子之RT-PCR法或即時PCR法等。

NEK10變異蛋白質之表現量例如可藉由利用針對NEK10變異蛋白質之抗體的公知方法而測定。作為利用抗體之測定方法，例如可列舉西方點墨法、免疫沈澱法、ELISA等。

可由結構推斷NEK10變異體具有激酶活性。因此，亦可將對NEK10變異蛋白質之激酶活性之抑制效果作為指標，自試驗樣品中篩選抗癌劑。具體而言，例如使用精製之NEK10變異蛋白質或表現NEK10變異蛋白質之細胞之提取液，對在試驗樣品之存在下或非存在下之NEK10變異蛋白質的激酶活性進行比較。

作為用於激酶活性測定之NEK10變異蛋白質，可使用藉由基因重組技術而產生之重組蛋白質。重組蛋白質可使用NEK10變異基因之cDNA與公知之表現系，藉由常法而製造。作為表現系，可列舉以大腸桿菌、酵母、昆蟲細胞、哺乳類細胞等作為宿主細胞之表現系、無細胞表現系等。例如，可將強制表現NEK10變異蛋白質後之宿主細胞之提取液直接用於激酶活性測定，亦可使用自該提取液精製之重組蛋白質。又，亦可將原來表現NEK10變異蛋白質之細胞之提取液或自該提取液精製之NEK10變異蛋白質用於激酶活性測定。

作為用於激酶活性測定之受質，可使用通常使用之各種蛋白質作為激酶之受質。具體而言，可列舉MBP(myelin

basic protein, 髓鞘鹼性蛋白)、組織蛋白等。成為受質之蛋白質可為重組蛋白質,亦可為藉由肽合成等而人工合成者,亦可為細胞內之內在性之蛋白質。於使用重組蛋白質或原來存在於細胞內之蛋白質之情形時,亦可將細胞之提取液與自該提取液精製之蛋白質中之任一種用於激酶活性測定。

於上述篩選方法中,使試驗樣品與NEK10變異體表現細胞於激酶活性測定之測定環境下接觸。激酶活性測定之溫度、pH值、鹽濃度等條件若為由NEK10變異蛋白質引起成為受質之蛋白質之磷酸化的條件,則無特別限定。

候補物質之篩選例如可藉由於上述條件之試驗樣品之存在下,對由NEK10變異蛋白質引起之受質蛋白質之磷酸化量與試驗樣品之非存在下之受質蛋白質之磷酸化量加以比較而進行。具體而言,篩選試驗樣品之存在下之受質蛋白質之磷酸化量小於相同條件之在試驗樣品之非存在下之受質蛋白質之磷酸化量之試驗樣品。

藉由本發明之抗癌劑之篩選方法而挑選之物質係具有於細胞中抑制NEK10變異基因之表現而使NEK10變異蛋白質之產生降低,或使NEK10變異蛋白質之激酶活性降低的作用者,認為對癌治療有用。又,藉由製造利用該篩選方法而篩選之受檢物質之各種衍生物,並對該等進行進一步篩選,亦可獲得效果及安全性優異之衍生物。

[實施例]

以下,藉由實施例等更具體地說明本發明,但其為一

例，本發明並不限定於該等。再者，於實施例等中提及之市售試劑只要沒有特別說明，則依據製造者之使用說明而使用。

[參考例1]

本參考例係為於各種癌細胞株中，確認NEK10變異mRNA之表現而進行。即，藉由利用SYBR(註冊商標)GREEN之即時PCR而測定表1所記載之各種癌細胞株中之NEK10變異體的mRNA之相對表現量。

使用RNAeasy試劑盒(QIAGEN公司)而自各癌細胞株精製總RNA。使用400 ng之經精製之RNA，並依據使用說明使用反轉錄酶SuperscriptIII(Invitrogen公司)，而製備cDNA。即，於65°C下對RNA進行5分鐘改性處理後，於4°C下進行急速冷卻，其後於55°C下反應30分鐘及於75°C下反應15分鐘，而合成cDNA。

將所獲得之cDNA中1 μ L作為模板，使用用於擴增由NEK10變異mRNA合成之cDNA之引子及用於擴增由GAPDH之mRNA合成之cDNA的引子，並依據使用說明而使用BRILIANT SYBR(註冊商標)GREEN反應混合液(GREEN master mix, STRATAGENE公司)進行即時PCR。GAPDH之擴增係作為反應系之對照而進行。即，於95°C、10分鐘之熱改性後，以95°C、30秒鐘，繼而55°C、60秒鐘，其後72°C、60秒鐘為1個循環，進行40個循環之PCR反應。即時PCR機係使用MX3000(STRATAGENE公司)。作為用於擴增由NEK10變異mRNA合成之cDNA之引子，係使用包含序列編

號6：5'-GCACACAAAGGTATTTTATGG-3'之鹼基序列之前置引子及包含序列編號7：5'-CTACTCAAACCTTGCCTTCTCA-3'之鹼基序列的反置引子。又，作為用於擴增由GAPDH之mRNA合成之cDNA的引子，係使用包含序列編號8：5'-TCTGCTCCTCCTGTTCGACAGT-3'之鹼基序列之前置引子及包含序列編號9：5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGAC-3'之鹼基序列的反置引子。Ct值之判定係使用軟體MX Pro(STRATAGENE公司)。所謂Ct值係藉由PCR反應，標靶基因之擴增以指數函數上升之循環數(Cycle Threshold(循環閾值)：Ct值)。

使用下述式(1)，由所獲得之Ct值求出各種癌細胞株之NEK10變異mRNA之 Δ Ct值(與校正液比較之情形時之相對Ct值)。

式(1)：

$$\Delta\text{Ct}(\text{NEK10 基因變異體})\text{值} = \text{NEK10 變異 mRNA 之 Ct 值} - \text{GAPDH mRNA 之 Ct 值}$$

使用由式(1)獲得之各種癌細胞株中之NEK10變異mRNA之 Δ Ct值，根據式(2)求出將HeLaS3細胞中之NEK10變異mRNA之表現量設為100之情形時之各種癌細胞株之相對NEK10變異mRNA表現量。

式(2)：

$$\text{各種癌細胞株之NEK10變異mRNA之相對表現值} = (\text{各種癌細胞株中之NEK10變異mRNA之}\Delta\text{Ct值} / \text{HeLaS3細胞中之NEK10變異mRNA之}\Delta\text{Ct值}) \times 100$$

於表1中揭示將使用上述式(2)而獲得之HeLaS3細胞之NEK10變異mRNA表現量設為100之情形時之各種癌細胞株中之NEK10變異mRNA之相對表現量。於乳癌細胞、肝癌、腎癌、攝護腺癌及子宮癌細胞中發現NEK10變異mRNA之表現。因此推測NEK10變異體不僅於乳癌細胞中，於乳癌以外之癌細胞中亦承擔重要作用。

[表1]

細胞株	癌種類	NEK10變異mRNA (相對於HeLaS3之%)
MDA-MB-157	乳癌	965
MDA-MB-231	乳癌	156
MDA-MB-468	乳癌	227
ZR-75-30	乳癌	121
HepG2	肝癌	217
HLE	肝癌	435
A498	腎癌	166
Caki-1	腎癌	112
PC3	攝護腺癌	108
HeLaS3	子宮癌	100

[實施例1]

本實施例係為了確認對NEK10變異mRNA具有RNA干擾作用之siRNA抑制NEK10變異mRNA之表現，且抑制癌細胞之增殖之情況而進行。

<NEK10變異mRNA之表現抑制作用之確認>

對於含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA(以下，NEK10 siRNA#1)及包含含有序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及包含含有序列編號5所表示之鹼基

序列之反義RNA之組合的siRNA(以下，NEK10 siRNA#2)，藉由利用SYBR(註冊商標)GREEN之即時PCR，測定導入細胞內進行siRNA處理後之NEK10變異mRNA，從而研究對NEK10變異mRNA之表現降低效果。

於實施例1中使用確認表現NEK10變異mRNA之乳癌細胞株MDA-MB-231，將對照siRNA、NEK10 siRNA#1、或NEK10 siRNA#2導入細胞內，藉由利用SYBR(註冊商標)GREEN之即時PCR，測定siRNA處理後之NEK10變異mRNA，從而研究利用各siRNA之NEK10變異mRNA之表現降低效果。對照siRNA係自Invitrogen公司購入，且NEK10 siRNA#1及NEK10 siRNA#2係使用Invitrogen公司合成者。

將1萬個/孔之MDA-MB-231細胞接種於12孔培養盤上，24小時後，依據製造者之使用說明，使用Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen公司)而導入siRNA。即，將於50 μ L之OptiMEM(Invitrogen公司)中溶解有1 μ L之siRNA(20 nM)之溶液與將1 μ L之Lipofectamine RNAiMAX溶解於50 μ L之OptiMEM中並於室溫下靜置5分鐘之溶液加以混合，進而於室溫下靜置20分鐘。靜置後，將上述混合液添加至細胞中，於37°C下培養3小時後，交換培養基，進而培養72小時。其後，去除培養基，使用RNAeasy試劑盒(QIAGEN公司)而自各孔中之細胞精製RNA。

使用經精製之RNA 500 ng，並使用反轉錄酶SuperscriptIII(Invitrogen公司)，以與參考例1相同之方式製備cDNA。將所獲得之cDNA 1 μ L作為範本，並以與參考例1相同之方式

進行Ct值之測定。所使用之試劑、引子及機器亦與參考例1相同。

實驗係以三重複(triplicate)進行，並將Ct值之三重複之平均值代入下述式(3)中，而求出各siRNA處理群之 ΔCt 值。又，重複實驗3次。

式(3)-1：

$\Delta Ct(\text{對照})\text{值} = \text{對照 siRNA 處理群之 NEK10 變異 mRNA 之 Ct 值} - \text{對照 siRNA 處理群之 GAPDH 之 mRNA 之 Ct 值}$

式(3)-2：

$\Delta Ct(\text{樣本})\text{值} = \text{NEK10 siRNA 處理群之 NEK10 變異 mRNA 之 Ct 值} - \text{NEK10 siRNA 處理群之 GAPDH 之 mRNA 之 Ct 值}$

使用上述式(3)中獲得之各siRNA處理群之 ΔCt 值，根據下述式(4)，以將第一次之對照siRNA處理群設為100之情形時之相對值之形式求出各實驗中之利用各siRNA處理之NEK10變異mRNA的表現量。其中，式(4)中，NEK10變異mRNA量係相對於對照siRNA處理群之%。

式(4)：

$\text{NEK10 變異 mRNA 量} = 2^{(\Delta Ct(\text{對照})\text{值} - \Delta Ct(\text{樣本})\text{值})} \times 100$

將算出結果示於圖1。圖1中，縱軸係表示將對照siRNA處理時之NEK10變異mRNA表現設為100之情形時之各siRNA處理群的相對NEK10變異mRNA表現量。橫軸係表示各siRNA處理群。

關於乳癌細胞MDA-MB-231中之對照siRNA或利用NEK10 siRNA處理之NEK10 mRNA之相對於對照之%，其

對照 siRNA 處理群為 107 ± 6.2 、NEK10 siRNA#1 處理群為 11 ± 0.5 ，NEK10 siRNA#2 處理群為 86 ± 7.4 。藉由 Dunnet 檢定而檢定對照 siRNA 處理群與 NEK10 siRNA 處理群，結果 NEK10 siRNA#1 處理群與對照 siRNA 處理群相比，顯著地 (***)， $p < 0.001$) 抑制 NEK10 變異 mRNA。同樣地，NEK10 siRNA#2 處理群與對照 siRNA 處理群相比，亦顯著地 (**， $p < 0.01$) 抑制 NEK10 變異 mRNA 之表現。即，可明確 NEK10 siRNA#1 及 NEK10 siRNA#2 均於乳癌細胞中抑制 NEK10 變異體之 mRNA 表現。

< NEK10 siRNA 之癌細胞之增殖抑制效果 >

確認 NEK10 siRNA#1 及 NEK10 siRNA#2 具有對癌細胞之增殖抑制效果。即，藉由亞甲基藍法，研究將 NEK10 siRNA#1 及 NEK10 siRNA#2 導入細胞內而使 NEK10 變異基因減弱 (knockdown)，藉此是否抑制細胞增殖。

以與上述 (NEK10 變異 mRNA 之表現抑制作用之確認) 相同之方式，將各 siRNA 導入 MDA-MB-231 細胞中，導入後培養 72 小時。培養後去除培養基，添加 $1000 \mu\text{L}$ 之甲醇並於室溫下放置 2 分鐘，而固定細胞。去除甲醇後，添加 $1000 \mu\text{L}$ 之染色液 (0.05% 亞甲基藍溶液)，進行 30 分鐘染色。利用 4 mL 之蒸留水清洗 3 次後，添加 3% HCl 溶液 2 mL，從而使用微盤分析儀 (BioRad 公司) 測定亞甲基藍之 660 nm 之吸光度。

實驗係以三重複實施，重複相同之實驗 3 次。將第一次實驗之對照 siRNA 處理群之三重複之平均值作為對照，使

用各實驗之 siRNA 處理群之三重複之平均值，根據下述式 (5) 算出細胞增殖率 (%)。

式 (5)：

$$\text{細胞增殖率 (\%)} = (\text{各實驗之對照 siRNA 處理群或 NEK10 siRNA 處理群之 660 nm 之吸光度} / \text{第一次實驗之對照 siRNA 處理群之 660 nm 之吸光度}) \times 100$$

將算出結果示於圖 2。圖 2 中，縱軸係表示將對照 siRNA 處理時之細胞增殖設為 100 之情形時之各 siRNA 處理群的細胞增殖率。橫軸係表示各 siRNA 處理群。

利用各 siRNA 處理之乳癌細胞 MDA-MB-231 之細胞增殖率 (%)，其對照 siRNA 處理群為 88 ± 18 ，NEK10 siRNA#1 處理群為 34 ± 14 ，NEK10 siRNA#2 處理群為 58 ± 17 。藉由 Dunnet 檢定，檢定對照 siRNA 處理群與 NEK10 siRNA 處理群，結果 NEK10 siRNA#1 處理群與對照 siRNA 處理群相比，顯著地 (*, $p < 0.05$) 抑制 MDA-MB-231 細胞之增殖。

又，雖然 NEK10 siRNA#2 處理群之顯著性於統計學上無法確認，但與對照 siRNA 處理群相比，MDA-MB-231 細胞之增殖受到抑制。即，NEK10 siRNA#1 及 NEK10 siRNA#2 無論效果高低，均具有對乳癌細胞之增殖抑制效果。

又，NEK10 變異 mRNA 之表現抑制效果更高之 NEK10 siRNA#1 之細胞增殖抑制效果高於 NEK10 siRNA#2。由此提示如下情況：藉由使用 NEK10 變異 mRNA 之表現抑制效果較高之 siRNA 而獲得更高之細胞增殖抑制效果；為了獲得充分之細胞增殖抑制效果，較佳為使用可使 NEK10 變異

mRNA之表現量相對於對照(%)為86以下之siRNA。又，由於NEK10 siRNA#1與NEK10 siRNA#2以NEK10變異mRNA之不同序列為標靶，故而期待藉由併用NEK10 siRNA#1與NEK10 siRNA#2，而獲得高於單獨使用各自之siRNA之情形時之細胞增殖抑制效果(抗腫瘤效果)。

[產業上之可利用性]

本發明之細胞之增殖抑制方法及核酸分子可抑制表現NEK10變異基因之各種細胞、特別是癌細胞之增殖，因此可應用於癌之治療及抗癌劑之製造等領域。

【圖式簡單說明】

圖1係表示於實施例1中將對照siRNA處理時之NEK10變異mRNA表現設為100之情形時之各siRNA處理群之相對NEK10變異mRNA表現量的圖。

圖2係表示於實施例1中將對照siRNA處理時之細胞增殖設為100之情形時之各siRNA處理群之細胞增殖率的圖。

序 列 表

- <110> 日本化藥股份有限公司
 <120> 細胞之增殖抑制方法、對 NEK10 變異基因具有 RNA 干擾作用之核酸分子、及抗癌劑
 <130> J70124A1
 <140> 101133177
 <141> 2012-09-11
 <150> 2011-200756
 <151> 2011-09-14
 <160> 9
 <210> 1
 <211> 1215
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 1

```

atggagctga tagaaggagc cccgcttggg gagcatttca gttctttgaa ggaaaaacat      60
caccatttta ctgaagaaag actatggaaa atatttatac agctgtgctt agctottoga      120
tacttacaca aggagaagag gattgtccat agagatctga caccaaaca cattatgttg      180
ggggataagg acaaagtaac cgttactgac tttggcctgg caaagcaaaa acaagaaaac      240
agtaaactca cctctgtggt tggaacaatc ctgtattctt gccccgaggt actgaagagt      300
gagccgatag gggagaaggc tgatgtctgg gcagtaggct gcacccctta tcagatggcg      360
actttgagtc cccccttcta cagcactaac atgctgtcct tggctacaaa aatagtggag      420
gcggtatatg aaccagtccc agaaggtatc tactctgaaa aagtaacaga caccatcagc      480
aggcgcctca ctctgatgc ggaagctcgt ccagatattg tagaagtcag ttcgatgata      540
tcagatgtca tgatgaaata tttagacaac ttatctacat cccagttgtc cttggaaaag      600
aagctagaac gggaacgaag acgcacacaa aggtatttta tggaagccaa ccggaacacc      660
gtcacatgtc accatgagct ggctgttcta totcagaga cctttgagaa ggcaagtttg      720
agtagcagca gcagtggagc agccagcctg aaaagtgaac ttcagaaag cgcagacctg      780
ccccctgaag gcttccaggc ctctatggt aaagacgaag acagggcctg tgacgaaatc      840
ctgtcagatg ataacttcaa cctggaaaat gotgagaaag atacatattc agaggtagat      900

```

gatgaattgg acatttcgga taactccagc agctccagtt caagccccct gaaagaatct 960
 acattcaaca ttttaaagag aagttttagt gcttcaggag gagaaagaca atcccaaaca 1020
 agggacttca ctggaggaac aggatcaaga ccaagaccag ctttgctgcc tcttgacctg 1080
 cttctgaaag tgccacccca catgctcagg gccacatta aggaaataga ggctgagtta 1140
 gtgacagggt ggcagtccca tagccttcct gctgtgattc ttogaaatct caaagatcat 1200
 ggtagtactt actag 1215

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：NEK10變異基因之siRNA之正義RNA

<400> 2

gaaauccugu cagaugauaa cuuca 25

<210> 3

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：NEK10變異基因之siRNA之反義RNA

<400> 3

ugaaguuauc aucugacagg auuuc 25

<210> 4

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：NEK10變異基因之siRNA之正義RNA

<400> 4

ucugccuugu uuguucacca cuauu

25

<210> 5

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：NEK10變異基因之siRNA之反義RNA

<400> 5

aauaguggug aacaacaag gcaga

25

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：NEK10變異基因mRNA之前置引子

<400> 6

gcacacaaag gtattttatg g

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：NEK10變異mRNA之反置引子

<400> 7

ctactcaaac ttgccttctc a

21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：GAPDH mRNA之前置引子

<400> 8

tctgctcctc ctgttcgaca gt

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：GAPDH mRNA之反置引子

<400> 9

accaaatccg ttgactccga c

21

七、申請專利範圍：

1. 一種細胞之增殖抑制方法，其包括於細胞中使NEK10變異基因之表現降低之表現降低步驟及/或使NEK10變異蛋白質之活性降低之活性降低步驟。
2. 如請求項1之細胞之增殖抑制方法，其中上述表現降低步驟係將選自由藉由RNA干擾而抑制NEK10變異基因之表現之核酸分子、上述核酸分子之前驅物、及可表現上述核酸分子或上述前驅物之表現載體所組成之群中之至少1種導入細胞中之步驟。
3. 如請求項2之細胞之增殖抑制方法，其中上述核酸分子係以序列編號2或4所表示之NEK10變異基因之mRNA中之鹼基序列作為標靶的具有RNA干擾作用之siRNA，
上述前驅物係以序列編號2或4所表示之NEK10變異基因之mRNA中之鹼基序列作為標靶的具有RNA干擾作用之shRNA。
4. 如請求項2之細胞之增殖抑制方法，其中上述核酸分子選自由如下(a)~(g)所組成之群：
 - (a) 含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；
 - (b) 含有包含序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號5所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的siRNA；
 - (c) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24

個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(d) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(e) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(f) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；以及

(g) 上述(a)~(f)中之任一siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

5. 如請求項2之細胞之增殖抑制方法，其中上述前驅物係於細胞內產生如下(a)~(g)中之任一者之核酸分子：

(a) 含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及含有序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA之組合

的 siRNA；

(b) 含有包含序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及含有序列編號5所表示之鹼基序列之反義RNA之組合的 siRNA；

(c) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之 siRNA；

(d) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之 siRNA；

(e) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之 siRNA；

(f) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之 siRNA；或

(g) 上述(a)~(f)中之任一 siRNA 中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之

siRNA。

6. 如請求項2之細胞之增殖抑制方法，其中上述前驅物為

(p) 含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號3所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；或者

(q) 含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號5所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；並且

於細胞內，自上述(p)之shRNA及上述(q)之shRNA產生對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

7. 如請求項1之細胞之增殖抑制方法，其中上述細胞為癌細胞。

8. 一種核酸分子，其係

(a) 含有包含序列編號2所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號3所表示之鹼基序列之反義RNA的組合之siRNA；

(b) 含有包含序列編號4所表示之鹼基序列之正義RNA及包含序列編號5所表示之鹼基序列之反義RNA的組合

之 siRNA；

(c) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(d) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15~24個連續之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(e) 包含含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；

(f) 包含含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列中有1個或數個鹼基經置換、附加或缺失之鹼基序列之正義RNA及含有與上述正義RNA互補之鹼基序列之反義RNA的組合，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA；或

(g) 上述(a)~(f)中之任一siRNA中有1個或數個鹼基經修飾，且對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA。

9. 一種核酸分子，其係

(p) 含有序列編號2所表示之鹼基序列中之15個以上連

續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與

序列編號3所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；或者

(q) 含有序列編號4所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列，與序列編號5所表示之鹼基序列中之15個以上連續之鹼基序列或該鹼基序列中之1個或數個鹼基經修飾、置換、附加或缺失之鹼基序列的shRNA；

其係於細胞內中，用於產生對NEK10變異基因具有RNA干擾作用之siRNA的前驅物。

10. 一種表現載體，其含有如請求項8或9之核酸分子，且可使該核酸分子表現。
11. 一種NEK10變異基因表現抑制用組合物，其含有選自由如請求項8之核酸分子、如請求項9之核酸分子、及如請求項10之表現載體所組成之群中之1種以上。
12. 一種抗癌劑，其含有選自由如請求項8之核酸分子、如請求項9之核酸分子、及如請求項10之表現載體所組成之群中之1種以上作為有效成分。
13. 一種抗癌劑之篩選方法，其以對NEK10變異基因之表現之抑制效果或對NEK10變異蛋白質之活性之抑制效果作為指標。

14. 如請求項13之抗癌劑之篩選方法，其包括如下步驟：

在關於NEK10變異基因之表現抑制效果或對NEK10變異蛋白質之活性之抑制效果的候補物質之存在下及非存在下，分別培養NEK10變異體表現細胞之步驟；及

測定該細胞內之NEK10變異 mRNA表現量或NEK10變異蛋白質之活性量，對在該候補物質之存在下及非存在下之表現量或活性量進行比較之步驟。

八、圖式：

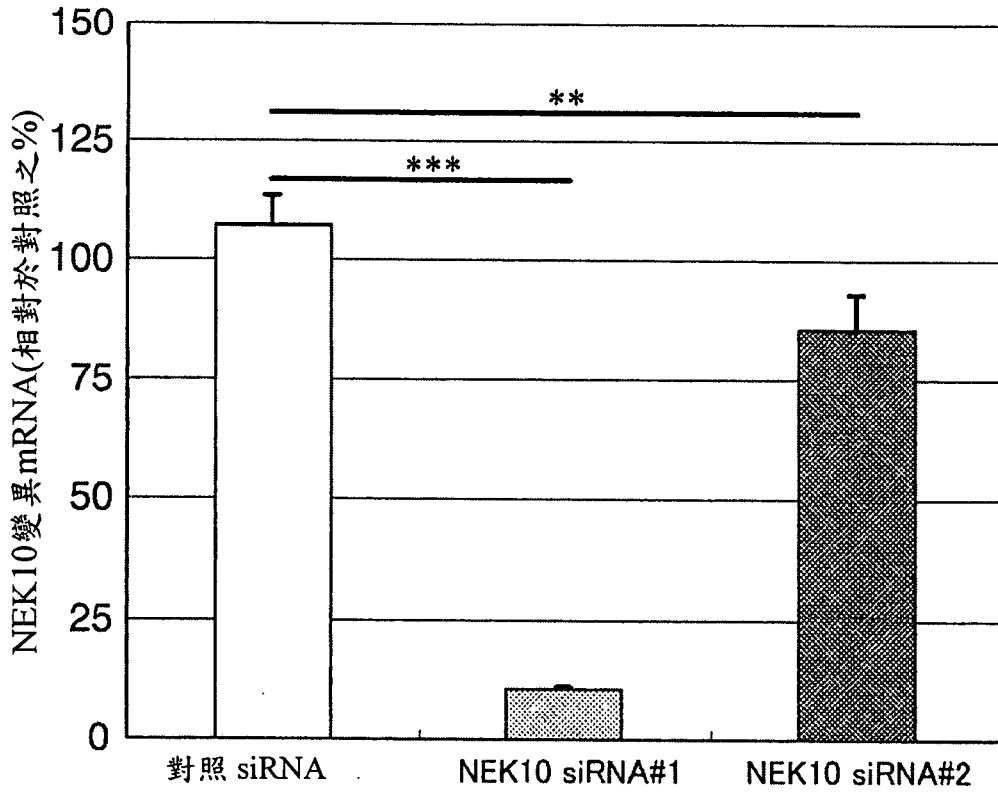


圖1

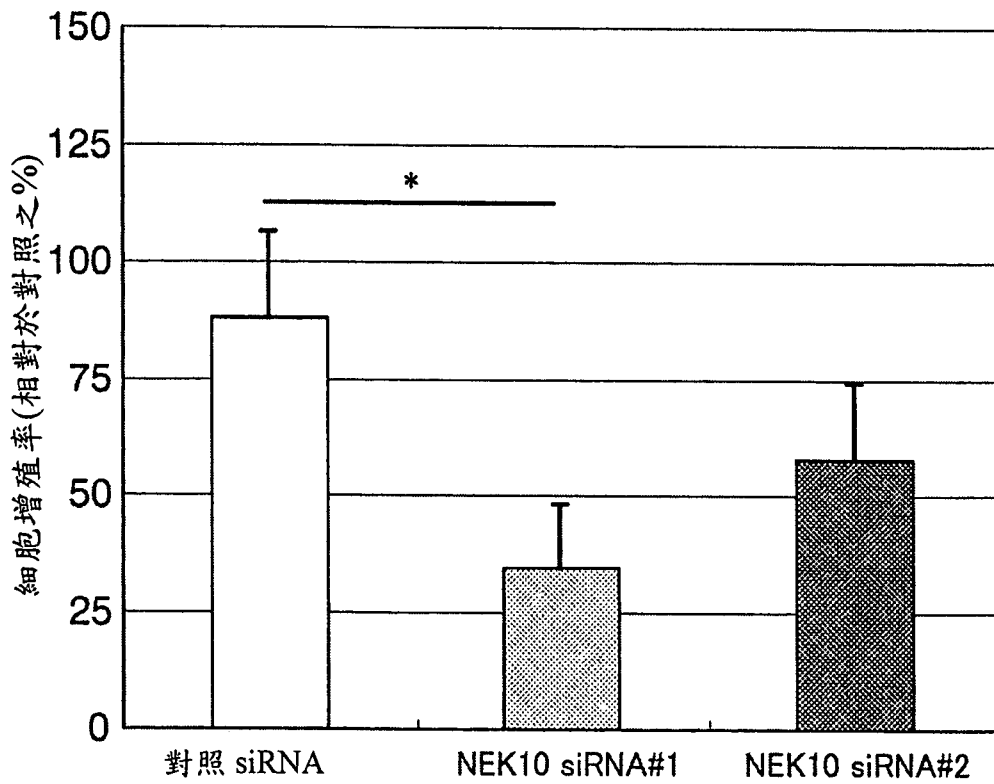


圖2