

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-231376

(P2015-231376A)

(43) 公開日 平成27年12月24日(2015.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数 66 O L (全 95 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-136948 (P2015-136948)	(71) 出願人	593172050
(22) 出願日	平成27年7月8日 (2015.7.8)		ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ
(62) 分割の表示	特願2013-56596 (P2013-56596)		・リサーチ・ファウンデーション
原出願日	平成19年7月12日 (2007.7.12)		THE OHIO STATE UNIV
(31) 優先権主張番号	60/807, 304		ERSITY RESEARCH FOU
(32) 優先日	平成18年7月13日 (2006.7.13)		NDATION
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国オハイオ州43201, コ
(31) 優先権主張番号	60/932, 736		ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
(32) 優先日	平成19年6月1日 (2007.6.1)		524
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 結腸癌関連疾患の診断及び治療のためのマイクロRNAに基づいた方法及び組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予後かどうかを診断する方法、及び、結腸癌を有する対象中の発癌を抑制する方法の提供。

【解決手段】少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含んでなり、対照サンプル中の対応するmiR遺伝子産物のレベルと比較して、該試験サンプル中の該miR遺伝子産物のレベルにおける変化が、該対象が結腸癌関連疾患を有しているか、又は発症するリスクがあることを示すことで診断する方法。また、発癌の抑制のために癌細胞中で発現されるmiR遺伝子産物の量を変化させることを含む方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象が、結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予後を有する、かどうかを診断する方法であって、該対象からの試験サンプル中の少なくとも一つの *mi R* 遺伝子産物のレベルを測定することを含んでなり、対照サンプル中の対応する *mi R* 遺伝子産物のレベルと比較して、該試験サンプル中の該 *mi R* 遺伝子産物のレベルにおける変化が、該対象が結腸癌関連疾患を有しているか、又は発症するリスクがあることを示す、前記方法。

【請求項 2】

該少なくとも一つの *mi R* 遺伝子産物が、*mi R 20 a*、*mi R - 21*、*mi R - 106 a*、*mi R - 181 b*、*mi R - 203* 及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項 1 の方法。

10

【請求項 3】

該少なくとも一つの *mi R* 遺伝子産物が *mi R - 21* である、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

結腸癌関連疾患応答の少なくとも開始、素因、又は減少した生存予後を試験する方法であって：

(1) 試験対象からのサンプル中の少なくとも一つのマーカーの発現レベルを決定すること；該少なくとも一つのマーカーは、*mi R 20 a*、*mi R - 21*、*mi R - 106 a*、*mi R - 181 b*、*mi R - 203* 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの *mi R* 遺伝子産物を含んでいる；

20

(2) 工程 (1) で決定された該発現レベルを、健康な対象からのサンプル中のマーカーの対照発現レベルと比較すること；及び

(3) 工程 (2) での比較の結果が：i) 試験対象中の少なくとも一つのマーカーの発現レベルが、対照中のレベルよりも高い、又は ii) 試験対象中の少なくとも一つのマーカーの発現レベルが、対照中のレベルよりも低いことを示す場合、該対象が結腸癌関連疾患を有すると判断すること；

を含んでなる、前記方法。

【請求項 5】

該サンプルが一つ又はそれより多くの組織、血液、血漿、血清、尿及び糞便を含んでなる、請求項 4 の試験法。

30

【請求項 6】

全方法工程がインビトロで実施される、請求項 4 の試験法。

【請求項 7】

対象が結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予後を有するかどうかを診断する方法であって：

(1) 対象から得られた試験サンプルからの *RNA* を逆転写して、標的オリゴデオキシヌクレオチドの組を提供し；

(2) 該標的オリゴデオキシヌクレオチドを、*mi RNA* 特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイにハイブリダイズさせて試験サンプルについてのハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；及び

40

(3) 試験サンプルハイブリダイゼーションプロファイルと対照サンプルから発生させたハイブリダイゼーションプロファイルを比較し、少なくとも一つの *mi RNA* のシグナルの変化は、対象が結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予後を有することを示す；

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 8】

該少なくとも一つの *mi RNA* のシグナルが、対照サンプルから発生されたシグナルと比較し、上方又は下方調節されている、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

50

該マイクロアレイが、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmi R N Aのためのmi R N A特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなる、請求項7の方法。

【請求項10】

対象において発癌を抑制する方法であって、該対象は結腸癌関連疾患を有する又は有すると疑われ、対照細胞と比較し、該対象の癌細胞においてmi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmi R 遺伝子産物が下方調節又は上方調節されており；

(1) 少なくとも一つのmi R 遺伝子産物が癌細胞中で下方調節されている場合、発癌が該対象中で抑制されるように、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの単離されたmi R 遺伝子産物の有効量を該対象に投与すること；又は

(2) 少なくとも一つのmi R 遺伝子産物が癌細胞中で上方調節されている場合、発癌が該対象中で抑制されるように、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの単離されたmi R 遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の有効量を該対象に投与すること；

を含んでなる、前記方法。

【請求項11】

工程(1)及び/又は工程(2)における該少なくとも一つの単離されたmi R 遺伝子産物が、mi R - 2 1又はそれらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片又は機能的均等物、又はそれらに結合する抗体である、請求項10の方法。

【請求項12】

結腸癌を有する対象中の発癌を抑制する方法であって；

(1) 対照細胞と比較し、対象からの癌細胞中の少なくとも一つのmi R 遺伝子産物の量を決定すること；及び

(2) 該対象における発癌が抑制されるように；

(i) もし癌細胞中で発現された該mi R 遺伝子産物の量が、対照細胞中で発現された該mi R 遺伝子産物の量よりも少ないならば、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの単離されたmi R 遺伝子産物の有効量を該対象に投与すること；又は

(ii) もし癌細胞中で発現された該mi R 遺伝子産物の量が、対照細胞中で発現された該mi R 遺伝子産物の量よりも多いならば、該少なくとも一つのmi R 遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の有効量を該対象に投与すること；

により、癌細胞中で発現されるmi R 遺伝子産物の量を変化させること；

を含んでなる、前記方法。

【請求項13】

工程(i)における該少なくとも一つの単離されたmi R 遺伝子産物が、mi R - 2 1又はそれらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片である、請求項12の方法。

【請求項14】

工程(ii)における該少なくとも一つのmi R 遺伝子産物が、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせ又はそれらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片から成る群から選択される、請求項12の方法。

【請求項15】

発癌の阻害剤を同定する方法であって、細胞に試験剤を提供すること、及び結腸癌関連疾患において変化した発現レベルに関連する少なくとも一つのmi R 遺伝子産物のレベルを測定することを含んでなり、適した対照細胞と比較し、該細胞中での該mi R 遺伝子産物

のレベルの増加又は減少が、試験剤が発癌の阻害剤であることを示す、前記方法。

【請求項 16】

該miR遺伝子産物が、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項15の方法。

【請求項 17】

発癌の阻害剤を同定する方法であって、細胞に試験剤を提供すること、及び結腸癌関連疾患において変化した発現レベルに関連する少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含んでなり、適した対照細胞と比較し、該細胞中での該miR遺伝子産物のレベルの減少が、試験剤が発癌の阻害剤であることを示す、前記方法。

10

【請求項 18】

該miR遺伝子産物が、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項25の方法。

【請求項 19】

該結腸癌関連疾患が腺癌である、請求項26の方法。

【請求項 20】

少なくとも一つの結腸癌関連疾患の開始、進行、重症度、病態、攻撃性、グレード、活性度、能力障害、死亡率、罹患率、疾患細分類又は他の根底にある発症又は病理学的特徴の少なくとも一つに寄与する、一つ又はそれより多くの代謝経路を評価するためのマーカーであって、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiR遺伝子産物を含んでなる、前記マーカー。

20

【請求項 21】

一つ又はそれより多くの該マーカーを含んでなる、請求項20のマーカー。

【請求項 22】

対象における少なくとも一つの結腸癌関連疾患の開始又は発育の可能性を同定する方法であって、一つ又はそれより多くの請求項20のマーカーを測定することを提供する、前記方法。

【請求項 23】

30

該一つ又はそれより多くのマーカーが単離されたサンプル中に存在し、及びすべての工程がインピット口で実施される、請求項22の方法。

【請求項 24】

結腸癌関連疾患を試験するための試薬であって、請求項20の少なくとも一つのマーカーのヌクレオチド配列又は該マーカーのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる、前記試薬。

【請求項 25】

結腸癌関連疾患を試験するための試薬であって、請求項20の少なくとも一つのマーカーによりコードされたタンパク質を認識する抗体を含んでなる、前記試薬。

【請求項 26】

40

結腸癌関連疾患を試験するためのDNAチップであって、その上に請求項20の少なくとも一つのマーカーをアッセイするためのプローブが固定化されている、前記DNAチップ。

【請求項 27】

少なくとも一つの結腸癌関連疾患予防、診断及び/又は治療するための療法の有効性を評価するための方法であって：

- 1) その有効性が評価されている療法を動物に受けさせること；及び
- 2) 請求項20の少なくとも一つのマーカーを評価することにより、該結腸癌関連疾患を治療すること又は予防することにおいて試験されている療法の有効性のレベルを決定すること；

50

を含んでなる、前記方法。

【請求項 28】

候補療法剤が、医薬組成物、栄養補助食品成分又はホメオパシー組成物の一つ又はそれより多くを含んでなる、請求項 27 の方法。

【請求項 29】

評価されている療法が、ヒト対象における使用のためである、請求項 27 の方法。

【請求項 30】

該療法が、手術又は治療によるヒト又は動物体の治療の方法ではない、請求項 27 の方法。

【請求項 31】

動物モデルにおいて結腸癌関連疾患応答を開始する能力についての少なくとも一つの物質の可能性を評価する方法であって：

1) 該動物における結腸癌関連疾患応答を開始させるのに十分な量の一つ又はそれより多くの物質で動物を暴露した後、請求項 20 の一つ又はそれより多くの上方又は下方調節されたマーカーを測定すること；及び

2) 一つ又はそれより多くの上方又は下方調節されたマーカーが結腸癌関連疾患応答を開始する能力を有しているか否かを決定すること；

を提供している、前記方法。

【請求項 32】

結腸癌関連疾患を治療するための医薬組成物であって；miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物；及び薬学的に許容できる担体を含んでなる、前記医薬組成物。

【請求項 33】

該少なくとも一つのmiR遺伝子産物が、適した対照細胞と比較して癌細胞中で上方又は下方調節されているmiR遺伝子産物に対応する、請求項 32 の医薬組成物。

【請求項 34】

該miR遺伝子産物がmiR-21である、請求項 32 の医薬組成物。

【請求項 35】

該結腸癌関連疾患が腺癌である、請求項 32 の医薬組成物。

【請求項 36】

結腸癌を治療するための医薬組成物であって、該少なくとも一つのmiR発現阻害化合物及び薬学的に許容できる担体を含んでなり、該少なくとも一つのmiR発現阻害化合物が、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203 及びそれらの組み合わせから成る群より選択されるmiR遺伝子産物に特異的である、前記医薬組成物。

【請求項 37】

該少なくとも一つのmiR発現阻害化合物が、適した対照細胞と比較して癌細胞中で上方又は下方調節されているmiR遺伝子産物に特異的である、請求項 36 の医薬組成物。

【請求項 38】

製品であって：少なくとも一つの請求項 20 のマーカーから選択される、結腸癌関連疾患のためのマーカーに結合する少なくとも一つの捕捉試薬を含んでなる、前記製品。

【請求項 39】

結腸癌関連疾患を治療する療法剤のための候補化合物をスクリーニングするキットであって：

請求項 20 の少なくとも一つのマーカーの一つ又はそれより多くの試薬、及び

少なくとも一つのマーカーを発現する細胞を含んでなる、前記キット。

【請求項 40】

該マーカーの存在が、少なくとも一つのマーカーと特異的に結合する抗体又は抗体断片を含んでなる試薬を使用して検出される、請求項 39 のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

該試薬が標識され、放射標識され又はビオチン標識されており、及び／又は該抗体又は抗体断片が放射標識され、発色団標識され、フルオロフォア標識され又は酵素標識されている、請求項 4 0 のキット。

【請求項 4 2】

さらに、少なくとも一つの該マーカールを含んでなる容器を含む、請求項 3 9 のキット。

【請求項 4 3】

該試薬が、抗体、該試薬が結合される又は結合可能であるプローブ、及び固定化された金属キレートの一つ又はそれより多くを含んでなる、請求項 3 9 のキット。

【請求項 4 4】

結腸癌関連疾患のためのスクリーニング試験であって：

一つ又はそれより多くの請求項 2 0 のマーカール及びこうしたマーカールのための基質、及び試験剤を接触させること；及び

該試験剤が該マーカールの活性を変調させるかどうかを決定すること；

を含んでなる、前記スクリーニング試験。

10

【請求項 4 5】

すべての方法工程がインビトロで実施される、請求項 4 4 のスクリーニング試験。

【請求項 4 6】

対象における結腸癌関連疾患の存在を予測するためのマイクロアレイであって、請求項 2 0 の少なくとも一つのマーカールに方向付けられた抗体を含んでなる、前記マイクロアレイ。

20

【請求項 4 7】

該マーカールの発現のレベルが、転写されたポリヌクレオチド又はそれらの一部の存在を検出することにより評価され、該転写されたポリヌクレオチドが該マーカールのコード領域を含んでなる、前記の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

該サンプルが、結腸癌関連体液又は組織である、前記の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

該サンプルが、該患者から得られた細胞を含んでなる、前記の請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 5 0】

結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させることを、それらを必要とする個体において行う方法であって：

該個体に、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答シグナル伝達経路を妨害する剤を、こうしたシグナル伝達を妨害するために十分な量で投与すること、

該剤は、miR 20 a、miR - 2 1、miR - 1 0 6 a、miR - 1 8 1 b、miR - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR 遺伝子産物を含んでなる；

を含んでなる、前記方法。

40

【請求項 5 1】

該少なくとも一つのmiR 遺伝子産物がmiR - 2 1である、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 2】

個体において結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させるための医薬の製造のための、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答シグナル伝達経路を妨害する剤の使用であって、

該剤がmiR 20 a、miR - 2 1、miR - 1 0 6 a、miR - 1 8 1 b、miR - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR 遺伝子産物を含んでなる、前記使用。

【請求項 5 3】

該少なくとも一つのmiR 遺伝子産物がmiR - 2 1である、請求項 5 2 の使用。

50

【請求項 5 4】

結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させることを、それらを必要とする個体において行う方法であって、

少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答カスケードを妨害する剤を該個体に投与すること

、
該剤が、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmi R 遺伝子産物を含んでなる；

を含んでなる、前記方法。

【請求項 5 5】

該少なくとも一つのmi R 遺伝子産物がmi R - 2 1である、請求項 5 5 の方法。

【請求項 5 6】

個体において結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させるための医薬の製造のための、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答カスケードを妨害する剤の使用であって、

該剤が、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmi R 遺伝子産物を含んでなる、前記使用。

【請求項 5 7】

該少なくとも一つのmi R 遺伝子産物がmi R - 2 1である、請求項 5 6 の使用。

【請求項 5 8】

多数のデジタル的にコードされた参照プロファイルを有するデータベースを含んでなるコンピューター読み取り可能媒体であって、少なくとも第一の参照プロファイルは、結腸癌関連疾患応答の徴候を示している一つ又はそれより多くの対象からの一つ又はそれより多くのサンプル中の少なくとも第一のマーカのレベルを表しており、

該マーカが、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、mi R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmi R 遺伝子産物を含んでなる、前記コンピューター読み取り可能媒体。

【請求項 5 9】

結腸癌関連疾患応答の徴候を示している一つ又はそれより多くの対象、又は結腸癌関連疾患を有する対象からの一つ又はそれより多くのサンプル中の少なくとも第二のマーカのレベルを表す、第二の参照プロファイルを含む、請求項 5 8 のコンピューター読み取り可能媒体。

【請求項 6 0】

対象が結腸癌関連疾患を有する、有する素因がある、悪い生存予後を有するかどうかを決定するためのコンピューターシステムであって、

請求項 5 8 のデータベース、及び

対象のプロファイルを受け取る、対象プロファイルと診断的に関連している一致参照プロファイルをデータベースから同定する、及び該対象が結腸癌関連疾患を有する、又は有する素因があるかどうかの表示を発生するようにコンピューターを作動させるためのコンピューター実行コードを含んでなるサーバー；

を含んでなる、前記コンピューターシステム。

【請求項 6 1】

対象における結腸癌関連疾患の存在、不在、性質又は程度を評価するためのコンピューター補助法であって：

1) 該対象から得られたサンプルからのデータを分類するためのモデル又はアルゴリズムを含んでなるコンピューターを提供すること、

該分類は、少なくとも一つのマーカの存在、不在又は量についてのデータを分析することを含み、及び

該マーカは、mi R 2 0 a、mi R - 2 1、mi R - 1 0 6 a、mi R - 1 8 1 b、

10

20

30

40

50

miR-203 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くの miR 遺伝子産物を含んでなる；

2) 対象から得られた生体サンプルからのデータを入力すること；及び

3) 生体サンプルを分類して、結腸癌関連疾患の存在、不在、性質又は程度を示すこと；を含んでなる、前記コンピューター補助法。

【請求項 6 2】

該少なくとも一つの miR 遺伝子産物及びそれらの組み合わせが、それらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片又は機能的均等物、又はそれらに結合する抗体を含む、前記の請求項のいずれかの方法。

【請求項 6 3】

該結腸癌関連疾患が腺癌である、前記の請求項のいずれかの方法。

【請求項 6 4】

結腸癌についての動物モデルであって、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くの miR 遺伝子産物の少なくとも一つの変化した発現が存在する、前記動物モデル。

【請求項 6 5】

該動物モデルが非ヒト脊椎動物である、請求項 6 4 の動物モデル。

【請求項 6 6】

該動物モデルが、マウス、ラット、ウサギ、又は霊長類である、請求項 6 4 のマーカー。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、その開示が本明細書において援用される、2006年7月13日に出願された米国仮出願番号 60/807,304、及び2007年6月1日出願された米国仮出願番号 60/932,736 の優先権を主張する。

【0002】

連邦委託研究に関する記載

本発明は、政府支援でなされ、National Institutes of Health 助成金番号 x x x 及び National Cancer Institute の助成金のもと、政府は本発明に特定の権利を有する。

【0003】

背景技術

結腸腺癌は、世界的な癌死亡率の主原因である¹。結腸直腸癌は、米国において3番目に多く、そして2番目に多い癌死の原因である²。散发性結腸腺癌は腺腫として開始され、分子的、細胞的及び組織学的変化の進行を介して進化する³。5年死亡率は最近30年間にわたってやや下落しているが⁴、この疾患についての新規予後バイオマーカー及び治療標的を同定することがまだ必要である。現在、化学療法は著しい治療意義を有するが、手術が唯一の治療の根治的形態である⁵。

【0004】

理想的治療標的は、疾患に原因として関連し、治療介入を計画するために受け入れられるべきである；一方、理想的バイオマーカーは測定が容易であり、及び臨床成績と強い関連を有しているべきである。マイクロRNAは両方の基準に一致する⁶⁻⁸。

【0005】

マイクロRNAは、多くの遺伝子の翻訳を調節する、18~25ヌクレオチド、非コードRNA分子である⁹。それらの発見^{10,11}以来、それらがアポトーシス^{12,14}、分化^{10,11,15}及び細胞増殖¹⁶を含む多様な細胞内プロセスを調節することが発見されている。マイクロRNAは、発癌に因果的役割を有することもできる^{6,17}。マイクロRNA発現レベルは、結腸腫瘍^{19,22}を含むほとんどの腫瘍型で変化している^{18,19}。マイクロRNA miR-15 及び miR-16 は、大多数の慢性リンパ

10

20

30

40

50

性白血病で欠損しているか又は下方調節されている^{2 3}。特定のマイクロRNAの実験的操作は、マウスモデル系において腫瘍発育を変調させる^{1 6, 2 4 - 2 6}。マイクロRNAの予後予測可能性も慢性リンパ性白血病⁷、肺癌⁸及び神経芽細胞腫^{2 7}について示されている。

【0006】

異常なマイクロRNA発現は発癌の原因であることができ、特定のマイクロRNAを阻害することは、治療的意味を有することができる。修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを、マイクロRNA機能を特異的に阻害するために設計し得る^{2 8}。antagomirは、マウスにおいてインビボでマイクロRNA機能を阻害することに有効であると証明された、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一つの型である^{2 9}。マイクロRNA機能の特異的阻害剤を設計する容易さが、それらを治療標的の候補としている。

10

【0007】

発明の要旨

発明の要約

一つの広範な側面において、対象が結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予後を有するかどうかを診断する方法が本明細書で提供される。本方法は、対象からの試験サンプル中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含んでおり、対照サンプル中の対応するmiR遺伝子産物のレベルと比較して、試験サンプル中の該miR遺伝子産物のレベルの変化は、対象が結腸癌関連疾患を有するか、発症するリスクがあることを示す。特定の側面において、該少なくとも一つのmiR遺伝子産物は、miR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される。一つの態様において、該一つのmiR遺伝子産物は、miR-21である。

20

【0008】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患応答の少なくとも開始、素因、又は減少した生存予後を試験する方法が提供され、該方法は：

(1) 試験対象からのサンプル中の少なくとも一つのマーカーの発現レベルを決定すること；該少なくとも一つのマーカーは、miR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物を含んでいる；

30

(2) 工程(1)で決定された該発現レベルを、健康な対象からのサンプル中のマーカーの対照発現レベルと比較すること；及び

(3) 工程(2)での比較の結果が：i) 試験対象中の少なくとも一つのマーカーの発現レベルが、対照中のレベルよりも高い、又はii) 試験対象中の少なくとも一つのマーカーの発現レベルが、対照中のレベルよりも低いことを示す場合、該対象が結腸癌関連疾患を有すると判断すること；

を含んでなる。

【0009】

該サンプルは、組織、血液、血漿、血清、尿及び糞便の一つ又はそれより多くを含んでなることができる。また、すべての方法工程はインビトロで実行し得る。

40

別の広範な側面において、対象が結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予後を有するかどうかを診断する方法が提供され：

(1) 対象から得られた試験サンプルからのRNAを逆転写して、標的オリゴデオキシヌクレオチドの組を提供し；

(2) 該標的オリゴデオキシヌクレオチドを、miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイにハイブリダイズさせて試験サンプルについてのハイブリダイゼーションプロファイルを提供し；及び

(3) 試験サンプルハイブリダイゼーションプロファイルと対照サンプルから発生させたハイブリダイゼーションプロファイルを比較し、少なくとも一つのmiRNAのシグナルの変化は、対象が結腸癌関連疾患を有する、発症するリスクがある、又は減少した生存予

50

後を有することを示す；
 ことを含んでなる。

【0010】

特定の側面において、対照サンプルから発生させたシグナルと比較して、少なくとも一つのmiRNAのシグナルは、上方又は下方調節されている。また、該マイクロアレイは、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiRNAのためのmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなることができる。

【0011】

別の広範な側面において、対象における発癌を抑制する方法であって、該対象は結腸癌関連疾患を有する又は有すると疑われ、対照細胞と比較し、該対象の癌細胞においてmiR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物が下方調節又は上方調節されており；

該方法は：

(1) 少なくとも一つのmiR遺伝子産物が癌細胞中で下方調節されている場合、発癌が該対象中で抑制されるように、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物の有効量を該対象に投与すること；又は

(2) 少なくとも一つのmiR遺伝子産物が癌細胞中で上方調節されている場合、発癌が該対象中で抑制されるように、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の有効量を該対象に投与すること；

を含んでなる。

【0012】

特定の側面において、工程(1)及び/又は工程(2)における少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物は、miR-21又はそれらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片又は機能的均等物、又はそれらに結合する抗体である。

【0013】

別の広範な側面において、結腸癌を有する対象中の発癌を抑制する方法が提供され、該方法は：

(1) 対照細胞と比較し、対象からの癌細胞中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物の量を決定すること；及び

(2) 該対象における発癌が抑制されるように；

(i) もし癌細胞中で発現された該miR遺伝子産物の量が、対照細胞中で発現された該miR遺伝子産物の量よりも少ないならば、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物の有効量を該対象に投与すること；又は

(ii) もし癌細胞中で発現された該miR遺伝子産物の量が、対照細胞中で発現された該miR遺伝子産物の量よりも多いならば、該少なくとも一つのmiR遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の有効量を該対象に投与すること；

により、癌細胞中で発現されるmiR遺伝子産物の量を変化させること；

を含んでなる。

【0014】

特定の側面において、工程(1)の少なくとも一つの単離されたmiR遺伝子産物は、miR-21又はそれらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片である。また、ある態様において、工程(ii)の少なくとも一つのmiR遺伝子産物は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み

10

20

30

40

50

合わせ、又はそれらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片から成る群より選択される。

【0015】

別の広範な側面において、発癌の阻害剤を同定する方法が本明細書で提供され、細胞に試験剤を提供すること、及び結腸癌関連疾患において変化した発現レベルに関連する少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定することを含んでなり、適した対照細胞と比較し、該細胞中での該miR遺伝子産物のレベルの増加又は減少は、試験剤が発癌の阻害剤であることを示す。

【0016】

別の広範な側面において、少なくとも一つの結腸癌関連疾患の開始、進行、重症度、病態、攻撃性、グレード、活性度、能力障害、死亡率、罹患率、疾患細分類又は他の根底にある発症又は病理学的特徴の少なくとも一つに寄与する一つ又はそれより多くの代謝経路を評価するためのマーカーが提供され、該マーカーは、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiR遺伝子産物を含んでなる。

10

【0017】

別の広範な側面において、本明細書に記載された一つ又はそれより多くの該マーカーを含んでなる組成物が提供される。

別の広範な側面において、対象において少なくとも一つの結腸癌関連疾患の開始又は発達の可能性を同定する方法が本明細書で提供され、該方法は、本明細書に記載された一つ又はそれより多くの該マーカーを測定することを提供している。特定の態様において、一つ又はそれより多くのマーカーは単離されたサンプル中に存在し、及びすべての方法工程はインビトロで実施される。

20

【0018】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患を試験するための試薬が本明細書において提供され、該試薬は、本明細書に記載された少なくとも一つのマーカーのヌクレオチド配列又は該マーカーのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含んでなる。

【0019】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患を試験するための試薬が本明細書において提供され、該試薬は、本明細書に記載された少なくとも一つのマーカーによりコードされたタンパク質を認識する抗体を含んでなる。

30

【0020】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患を試験するためのDNAチップが本明細書において提供され、その上には、本明細書に記載された少なくとも一つのマーカーをアッセイするためのプローブが固定化されている。

【0021】

別の広範な側面において、少なくとも一つの結腸癌関連疾患予防、診断及び/又は治療するための療法の有効性を評価するための方法が提供され、該方法は：

- 1) その有効性が評価されている療法を動物に受けさせること；及び
 - 2) 本明細書に記載された少なくとも一つのマーカーを評価することにより、結腸癌関連疾患を治療すること又は予防することにおいて試験されている療法の有効性のレベルを決定すること；
- を含んでなる。

40

【0022】

特定の態様において、候補療法剤は：医薬組成物、栄養補助食品成分又はホメオパシー組成物の一つ又はそれより多くを含んでなる。また、評価されている療法は、ヒト対象においても使用し得る。特定の態様において、該方法は、手術又は療法によるヒト又は動物体の治療法ではない。

【0023】

別の広範な側面において、動物モデルにおける結腸癌関連疾患応答を開始する能力につ

50

いての少なくとも一つの物質の可能性を評価する方法が本明細書において提供され、該方法は：

１）動物において結腸癌関連疾患応答を開始させるのに十分な量の一つ又はそれより多くの物質で動物を暴露した後、一つ又はそれより多くの上方又は下方調節された本明細書に記載のマーカーを測定すること；及び

２）一つ又はそれより多くの上方又は下方調節されたマーカーが結腸癌関連疾患応答を開始する能力を有しているか否かを決定すること；

を提供している。

【００２４】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患を治療するための医薬組成物が本明細書において提供され、該組成物は；*miR20a*、*miR-21*、*miR-106a*、*miR-181b*、*miR-203* 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つの*miR* 遺伝子産物；及び薬学的に許容できる担体を含んでなる。

【００２５】

別の広範な側面において、結腸癌を治療するための医薬組成物が本明細書において提供され、該組成物は、少なくとも一つの*miR* 発現阻害化合物及び薬学的に許容できる担体を含んでなり、該少なくとも一つの*miR* 発現阻害化合物は、*miR20a*、*miR-21*、*miR-106a*、*miR-181b*、*miR-203* 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される*miR* 遺伝子産物に特異的である。

【００２６】

別の広範な側面において、本明細書に記載された少なくとも一つのマーカーより選択される結腸癌関連疾患のためのマーカーに結合する少なくとも一つの捕捉試薬を含んでなる製品が提供される。

【００２７】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患を治療する療法剤のための候補化合物をスクリーニングするキットが本明細書において提供され、該キットは：本明細書に記載された少なくとも一つのマーカーの一つ又はそれより多くの試薬、及び少なくとも一つのマーカーを発現する細胞を含んでなる。特定の態様において、該マーカーの存在は、少なくとも一つのマーカーと特異的に結合する抗体又は抗体断片を含んでなる試薬を使用して検出される。また特定の態様において、該試薬は標識（放射標識又はビオチン標識）されており、及び／又は抗体又は抗体断片が放射標識されて、発色団標識されて、フルオロフォア標識されて又は酵素標識されている。特定の態様において、該キットはさらに、該マーカーの少なくとも一つを含んでなる容器を含む。また、該試薬は：抗体、該試薬が結合される又は結合可能であるプローブ、及び固定化された金属キレート；の一つ又はそれより多くを含んでなることが可能である。

【００２８】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患のためのスクリーニング試験が本明細書において提供され、該試験は：

一つ又はそれより多くの請求項 20 のマーカーとこうしたマーカーのための基質、及び試験剤を接触させること；及び

該試験剤が該マーカーの活性を変調させるかどうかを決定すること；
を含んでなる。

【００２９】

特定の態様において、すべての方法工程はインビトロで実行し得る。

別の広範な側面において、対象における結腸癌関連疾患の存在を予測するためのマイクロアレイが本明細書において提供され、それは請求項 20 の少なくとも一つのマーカーに方向付けられた抗体を含んでなる、

別の広範な側面において、該マーカーの発現のレベルが、転写されたポリヌクレオチド又はそれらの一部の存在を検出することにより評価される、方法、組成物などが本明細書において提供され、該転写されたポリヌクレオチドは該マーカーのコード領域を含んでな

10

20

30

40

50

る。また、該サンプルは、結腸癌関連体液又は組織であり得る。特定の態様において、該サンプルは、患者から得られた細胞を含んでなる。

【0030】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させることを、それらを必要とする個体において行う方法が本明細書において提供され、該方法は：

該個体に、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答シグナル伝達経路を妨害する剤を、こうしたシグナル伝達を妨害するために十分な量で投与すること、該剤は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物を含んでなる；を含ん

10

【0031】

別の広範な側面において、個体において結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させるための医薬の製造のための、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答シグナル伝達経路を妨害する剤の使用が本明細書において提供され、該剤は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物を含んでなる。

【0032】

別の広範な側面において、結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させることを、それらを必要とする個体において行う方法が本明細書において提供され、該方法は、該個体に、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答カスケードを妨害する剤を投与することを含んでなり、該剤は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物を含んでなる。

20

【0033】

別の広範な側面において、個体において結腸癌関連疾患合併症を治療する、予防する、逆行させる、又は重症度を限定させるための医薬の製造のための、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答カスケードを妨害する剤の使用が本明細書において提供され、該剤は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される少なくとも一つのmiR遺伝子産物を含んでなる。

30

【0034】

別の広範な側面において、多数のデジタル的にコードされた参照プロファイル (reference profile) を有するデータベースを含んでなるコンピューター読み取り可能媒体が本明細書において提供され、少なくとも第一の参照プロファイルは、結腸癌関連疾患応答の徴候を示している一つ又はそれより多くの対象からの一つ又はそれより多くのサンプル中の少なくとも第一のマーカーのレベルを表しており、該マーカーは、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiR遺伝子産物を含んでなる。

40

【0035】

ある態様において、該コンピューター読み取り可能媒体は、結腸癌関連疾患応答の徴候を示している一つ又はそれより多くの対象、又は結腸癌関連疾患を有する対象からの一つ又はそれより多くのサンプル中の少なくとも第二のマーカーのレベルを表す、第二の参照プロファイルを含む。

【0036】

別の広範な側面において、対象が結腸癌関連疾患を有する、有する素因がある、悪い生存予後を有するかどうかを決定するためのコンピューターシステムが本明細書において提供され、該システムは、本明細書に記載されたデータベース、及び対象のプロファイルを受け取る、対象プロファイルと診断的に関連している一致参照プロファイルをデータベー

50

スから同定する、及び該対象が結腸癌関連疾患を有する、又は有する素因があるかどうかの表示を発生するようにコンピューターを作動させるためのコンピューター実行コードを含んでなるサーバー、を含んでなる。

【0037】

別の広範な側面において、対象における結腸癌関連疾患の存在、不在、性質又は程度を評価するためのコンピューター補助法が本明細書において提供され、該方法は：

- 1) 対象から得られたサンプルからのデータを分類するためのモデル又はアルゴリズムを含んでなるコンピューターを提供すること、該分類は、少なくとも一つのマーカーの存在、不在又は量についてのデータを分析することを含み、該マーカーは、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiR遺伝子産物を含んでなる；
- 2) 対象から得られた生体サンプルからのデータを入力すること；及び
- 3) 生体サンプルを分類して、結腸癌関連疾患の存在、不在、性質又は程度を示すこと；を含んでなる。

【0038】

別の広範な側面において、少なくとも一つのmiR遺伝子産物及びそれらの組み合わせは、それらの単離された変異株又は生物学的に活性な断片又は機能的均等物、又はそれらに結合する抗体を含む。

【0039】

別の広範な側面において、結腸癌についての動物モデルが本明細書において提供され、以下の生物学的又は化学的プロセスの少なくとも一つが該動物モデルにおいて生じている：miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiR遺伝子産物の上方調節又は下方調節。ある態様において、該動物モデルは非ヒト脊椎動物である。特定の態様において、該動物モデルはマウス、ラット、ウサギ、又は霊長類である。

【0040】

付随する図面を照らし合わせて読んだ場合、以下の好ましい態様の詳細な説明から、当業者には本発明の多様な目的及び利点が明らかになるであろう。

【0041】

好ましい態様の詳細な説明

一つの広範な側面において、その発現が、正常対照細胞と比べ、異なった結腸癌に関連する癌細胞中で変化を受ける特定のマイクロRNAが本明細書において提供される。

【0042】

本明細書において相互交換的に使用される、「miR遺伝子産物」、「マイクロRNA」、「miR」又は「miRNA」とは、プロセッシングされていない（例えば、前駆体）又はプロセッシングされた（例えば、成熟）miR遺伝子からのRNA転写体を指す。miR遺伝子産物はタンパク質に翻訳されないので、用語「miR遺伝子産物」はタンパク質を含んでいない。プロセッシングされていないmiR遺伝子転写体は「miR前駆体」とも称され、又は「miR prec」、そして典型的には約70～100ヌクレオチド長のRNA転写体を含んでなる。miR前駆体は、RNAse（例えば、ダイサー、アルゴノート又はRNAse III、例えば、大腸菌RNAse III）での消化により、活性19～25ヌクレオチドRNA分子にプロセッシングし得る。この活性19～25ヌクレオチドRNA分子は、「プロセッシングされた」miR遺伝子転写体又は「成熟」miRNAとも称される。

【0043】

活性19～25ヌクレオチドRNA分子は、天然のプロセッシング経路（例えば、無傷の細胞又は細胞溶解物を使用して）を介して、又は合成プロセッシング経路（例えば、ダイサー、アルゴノート又はRNAase IIIのような単離されたプロセッシング酵素を使用して）によりmiR前駆体から得ることが可能である。活性19～25ヌクレオチドRNA分子は、miR前駆体からプロセッシングされることなく、生物学的に又は化学

10

20

30

40

50

合成により直接的に生成し得ることも理解されている。マイクロRNAが名称により本明細書で参照される場合、特に示されない限り、該名称は前駆体及び成熟形の両方に対応する。

【0044】

一つの側面において、対象が結腸癌を有するか、又は発症するリスクを有するかどうかを診断する方法が本明細書において提供され：対象からの試験サンプル中の少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物のレベルを測定すること、及び試験サンプル中の該miRNA遺伝子産物のレベルを、対照サンプル中の対応するmiRNA遺伝子産物のレベルと比較することを含んでなる。本明細書で使用される「対象」は、固形癌を有している、又は有していると疑われるいずれの哺乳類でもあり得る。好ましい態様において、該対象は結腸癌を有している、又は有していると疑われるヒトである。

10

【0045】

一つの態様において、試験サンプル中で測定される該少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物は、miRNA20a、miRNA-21、miRNA-106a、miRNA-181b、miRNA-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される。特定の態様において、miRNA遺伝子産物はmiRNA-21である。

【0046】

結腸癌関連疾患は、結腸組織から生じるいずれかの障害又は癌であり得る。こうした癌は典型的には腫瘍塊の形成及び/又は存在が付随し、及び、例えば、腺癌であり得る。

一つの態様において、結腸は腺癌であり、及び試験サンプル中で測定される該少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物は、miRNA20a、miRNA-21、miRNA-106a、miRNA-181b、miRNA-203及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。

20

【0047】

さらなる態様において、試験サンプル中で測定される少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物は、miRNA-21である。

少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物のレベルは、対象から得られた生物学的サンプル（例えば、細胞、組織）中で測定し得る。例えば、組織サンプル（例えば、腫瘍から）は、慣用的生検技術により、結腸癌関連疾患を有していると疑われる対象から、取り出し得る。別の態様において、血液試料を対象から取り出すことが可能であり、そして標準技術によるDNA抽出のために血球細胞（例えば、白血球細胞）を単離し得る。血液又は組織サンプルは、好ましくは、放射線療法、化学療法及びホルモン療法又は他の療法的治療に先立って対象から得られる。対応する対照組織又は血液サンプルは、対象の罹患していない組織から、正常ヒト個体又は正常個体の集団から、又は患者のサンプル中の大多数の細胞に対応している培養細胞から得ることが可能である。対照組織又は血液サンプルは次に、対象のサンプルからの細胞における所与のmiRNA遺伝子から産生されたmiRNA遺伝子産物のレベルを、対照サンプルの細胞からの対応するmiRNA遺伝子産物レベルと比較できるように、対象のサンプルと同様に処理する。生物学的サンプルについての基準miRNA発現標準も、対照として使用し得る。

30

【0048】

対照サンプル中のmiRNA遺伝子産物のレベルと比較して、対象から得られたサンプル中の対応するmiRNA遺伝子産物のレベルの変化（例えば、増加又は減少）は、対象における結腸癌関連疾患の存在を示す。

40

【0049】

一つの態様において、試験サンプル中の少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物のレベルは、対照サンプル中の対応するmiRNA遺伝子産物のレベルよりも高い（即ち、miRNA遺伝子産物の発現が「上方調節」されている）。本明細書で使用するmiRNA遺伝子産物の発現が「上方調節」されているとは、対象からの細胞又は組織サンプル中のmiRNA遺伝子産物の量が、対照細胞又は組織サンプル中の同一遺伝子産物の量よりも多い場合である。

【0050】

別の態様において、試験サンプル中の少なくとも一つのmiRNA遺伝子産物のレベルは、

50

対照サンプル中の対応する m i R 遺伝子産物のレベルよりも低い（即ち、m i R 遺伝子産物の発現が「下方調節」されている）。本明細書で使用する m i R 遺伝子産物の発現が「下方調節」されているとは、対象からの細胞又は組織サンプル中の m i R 遺伝子産物の量が、対照細胞又は組織中の同一遺伝子産物の量よりも少ない場合である。

【 0 0 5 1 】

対照及び正常サンプル中の相対的 m i R 遺伝子発現は、一つ又はそれ以上の R N A 発現標品に対して決定し得る。該標品は、例えば、ゼロ m i R 遺伝子発現レベル、標準細胞株中での m i R 遺伝子発現レベル、患者の影響を受けていない組織中の m i R 遺伝子発現レベル、又は正常ヒト対照の集団について以前に得られている m i R 遺伝子発現の平均レベルを含むことが可能である。

10

【 0 0 5 2 】

サンプル中の m i R 遺伝子産物のレベルは、生物学的サンプル中の R N A 発現レベルを検出するために適しているいずれかの技術を使用して測定し得る。生物学的サンプル（例えば、細胞、組織）中の R N A 発現レベルを決定するために適した技術（例えば、ノーザンブロット分析、R T - P C R、インサイチュハイブリダイゼーション）は当業者には公知である。特定の態様において、少なくとも一つの m i R 遺伝子産物のレベルはノーザンブロット分析を使用して検出される。例えば、全細胞性 R N A を、核酸抽出緩衝剤の存在下での均質化により、及び続いての遠心分離により細胞から精製し得る。核酸を沈澱させ、D N a s e による処理及び沈澱により D N A が取り出される。R N A 分子は次ぎに、標準技術に従ってアガロースゲル上でのゲル電気泳動により分離され、ニトロセルロースフィルターに移される。R N A は次ぎに加熱によりフィルター上に固定される。特異的 R N A の検出及び定量は、問題とする R N A に相補的である、適切に標識された D N A 又は R N A プローブを使用して達成される。例えば、その全開示が本明細書において援用される、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 7 章、を参照されたい。

20

【 0 0 5 3 】

所与の m i R 遺伝子産物のノーザンブロットハイブリダイゼーションに適したプローブは、限定されるわけではないが、目的の m i R 遺伝子産物と少なくとも、約 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % 又は完全相補性を有するプローブが含まれる。標識された D N A 及び R N A プローブの製造法、及び標的ヌクレオチド配列へのそれらのハイブリダイゼーションについての条件は、その開示が本明細書において援用される、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1 0 及び 1 1 章、に記載されている。

30

【 0 0 5 4 】

一つの非制限例において、核酸プローブは、例えば、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 、又は ^{35}S のような放射性核種；重金属；又は標識化リガンドのための特異的結合対メンバーとして機能することが可能であるリガンド（例えば、ビオチン、アビジン又は抗体）、蛍光分子、ケミルミネッセント分子、酵素などで標識化し得る。

【 0 0 5 5 】

プローブは、それらの全開示が本明細書において援用される、Rigby et al., J. Mol. Biol. 113:237-251(1977)、のニクトランスレーション法によるか、又は Fienberg et al., Anal. Biochem. 132:6-13(1983)、のランダムプライミング法により高比活性で標識し得る。後者は、一本鎖 D N A から、又は R N A 鋳型から高比活性の ^{32}P - 標識プローブを合成するために選択される方法である。例えば、ニクトランスレーション法に従って、既存のヌクレオチドを高放射性ヌクレオチドで置き換えることにより、 10^8cpm / マイクログラムをかなり上回る比活性を有する ^{32}P - 標識核酸プローブを製造することが可能である。ハイブリダイゼーションのオートラジオグラフィー検出を、ハイブリダイズされたフィルターを写真フィルムに暴露することにより実施し得る。ハイブリダイズされたフィルターにより暴露された写真フィルムのデンシトメトリックスキャニングは

40

50

【 0 0 5 6 】

10

20

【 0 0 5 9 】

30

40

50

ブリダイゼーションプロファイルは次ぎに対照サンプルのものと比較することが可能であり、どのマイクロRNAが固形癌細胞において変化した発現レベルを有しているのかを決定する。

【0062】

本明細書で使用する「プローブオリゴヌクレオチド」又は「プローブオリゴデオキシヌクレオチド」は、標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であるオリゴヌクレオチドを指す。「標的オリゴヌクレオチド」又は「標的オリゴデオキシヌクレオチド」は、検出されるべき分子を指す（例えば、ハイブリダイゼーションを介して）。「miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチド」又は「miRNAに対して特異的なプローブオリゴヌクレオチド」は、特異的miRNA遺伝子産物又は特異的miRNA遺伝子産物の逆転写体にハイブリダイズするように選択された配列を有するプローブオリゴヌクレオチドを意味する。

10

【0063】

特定のサンプルの「発現プロファイル」又は「ハイブリダイゼーションプロファイル」は、本質的にサンプルの状態のフィンガープリントである；2つの状態は同様に発現されるいずれかの特定の遺伝子を有することができるが、多くの遺伝子の同時評価は、細胞の状態に独特である遺伝子発現プロファイルの発生を可能にする。即ち、正常組織を癌性（例えば、腫瘍）組織、及び癌性組織内の異なった予後状態（例えば、良好な又は不良な長期生存見通し）を決定することができる。異なった状態にある結腸癌組織の発現プロファイルと比較することにより、これらの状態の各々においてどの遺伝子が重要であるかに関する情報（遺伝子の上方及び下方調節を含んで）が得られる。結腸癌組織において異なって発現された配列、ならびに異なった予後結果を生じる異なった発現の同定は、この情報のさまざまな形での使用を可能にする。

20

【0064】

一つの非制限例において、特定の治療計画を評価することができる（例えば、特定の患者において、長期予後を改善するために化学療法薬剤が作用するかどうかを決定するための）。同様に、患者サンプルと既知の発現プロファイルと比較することにより、診断を行う又は確認することができる。さらに、これらの遺伝子発現プロファイル（又は個々の遺伝子）は、結腸癌発現プロファイルを抑制する、又は不良な予後プロファイルをより良い予後プロファイルに変換する薬剤候補のスクリーニングを可能にする。

30

【0065】

従って、対象が結腸癌を有するか、又は発症するリスクを有するかどうかを診断する方法も本明細書において提供され、対象から得られた試験サンプルからRNAを逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドの組を提供すること、標的オリゴデオキシヌクレオチドを、miRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイとハイブリダイズさせて試験サンプルについてのハイブリダイゼーションプロファイルを提供すること、及び試験サンプルハイブリダイゼーションプロファイルと対照サンプルから発生させたハイブリダイゼーションプロファイル比較することを含んでなり、少なくとも一つのmiRNAのシグナルの変化は、該対象が固形癌を有するか又は発症するリスクを有する指標である。

40

【0066】

一つの態様において、該マイクロアレイは、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される一つ又はそれより多くのmiRNAについてのmiRNA特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなる。

【0067】

該マイクロアレイは既知のmiRNA配列から発生させた遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブから調製し得る。該アレイは各miRNAについて2つの異なったオリゴヌクレオチドプローブを含むことができ、1つは活性成熟配列を含んでおり、及び他はmiRNAの前駆体に対して特異的である。該アレイは、ハイブリダイゼーションストリンジ

50

エンシー条件のための対照として働き得、ヒトオルソログとわずか数塩基が異なっている一つ又はそれ以上のマウス配列のような対照も含むことができる。両方の種からの tRNA 及び他の tRNA (例えば、rRNA、mRNA) もマイクロチップ上にプリントすることができ、特異的ハイブリダイゼーションのための内部の、比較的に安定な陽性対照を提供している。非特異的ハイブリダイゼーションのための一つ又はそれ以上の適切な対照もマイクロチップ上に含ませることができる。この目的には、いずれの既知の miRNA とも、いずれの相同性も存在しないことに基づいて配列が選択される。

【0068】

該マイクロアレイは当該技術分野で公知の技術を使用して製作することができる。例えば、適切な長さの (例えば、40ヌクレオチド) のプローブオリゴヌクレオチドが、C6 10
位で 5' - アミン修飾され、商業的に入手可能なマイクロアレイシステム、例えば、Gene Machine OmniGrid (商標) 100 Microarrayer 及び Amersham CodeLink (商標) 活性化スライド、を使用してプリントされる。標的 RNA に対応する標識 cDNA オリゴマーは、標識プライマーで標的 RNA を逆転写することにより調製される。第一鎖合成に続いて、RNA/DNA ハイブリッドを変性させて RNA 鋳型を分解する。このようにして調製された標識された標的 cDNA を、ハイブリダイズ条件下 (例えば、25 で 18 時間の 6X 10
SSPE / 30%ホルムアミド、続いて 37 で 40 分の 0.75X TNT (トリス HCl / NaCl / Tween 20) 中での洗浄)、マイクロアレイチップにハイブリダイズさせる。固定化されたプローブ DNA がサンプル中の相補的標的 cDNA を認識するアレイ上の位置でハイブリダイゼーションが起こる。標識標的 cDNA は、結合が起 20
こったアレイ上の正確な位置に印を付け、自動的な検出及び定量化を可能にする。出力はハイブリダイゼーション事象のリストから成っており、特異的 cDNA 配列の相対的存在量、そしてそれ故、患者サンプル中の対応する相補的 miR の相対量を示している。

【0069】

一つの態様に従うと、標識 cDNA オリゴマーは、ビオチン標識プライマーから調製されたビオチン標識 cDNA である。マイクロアレイは次ぎに、例えば、ストレプトアビジン - Alexa 647 コンジュゲートを使用するビオチン含有転写体の直接検出により処理され、慣用的スキャニング法を利用してスキャンする。アレイ上の各スポットのイメージ強度は、患者サンプル中の対応する miR の存在量に比例している。

【0070】

該アレイの使用は、miRNA 発現検出にいくつかの利点を有する。第一に、数百の遺伝子の全体的発現が、同一サンプル中で 1 つの時点で同定し得る。第二に、オリゴヌクレオチドプローブの注意深い設計を介して、成熟及び前駆体分子の両方の発現を同定し得る。第三に、ノーザンブロット分析と比較し、チップは少量の RNA しか必要とせず、及び 2.5 µg の総 RNA を使用して再現性のある結果を提供する。比較的限られた数の miRNA (種当たり数百) は、それぞれに特有のオリゴヌクレオチドプローブを有するいくつかの種のための共通マイクロアレイの構築を可能にする。こうしたツールは、多様な条件下、各々の既知 miR についての種を越えた発現の分析を可能にするであろう。

【0071】

特異的 miR の定量的発現レベルアッセイのための使用に加えて、miRNA のかなりの部分に対応する miRNA 特異的プローブオリゴヌクレオチド、好ましくは全 miRNA を含有するマイクロチップは、miR 発現パターンの分析のための miR 遺伝子発現プロファイリングを実施するために用いることができる。固有の miR シグニチャーは、確立された疾患マーカーと、又は直接的に疾患状態と関連し得る。

【0072】

本明細書に記載した発現プロファイリング法に従うと、結腸癌を有していると疑われる対象からのサンプルの総 RNA が定量的に逆転写されて、サンプル中の RNA に相補的な標識標的オリゴデオキシヌクレオチドの組を提供する。標的オリゴデオキシヌクレオチドは次ぎに、miRNA 特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイへハイブリダイズされて、サンプルについてのハイブリダイゼーションプロファイルを提供 50

する。結果は、サンプル中の $miRNA$ の発現パターンを示している、サンプルについてのハイブリダイゼーションプロファイルである。該ハイブリダイゼーションプロファイルは、マイクロアレイ中の $miRNA$ 特異的プローブオリゴヌクレオチドへの、サンプルからの標的オリゴデオキシヌクレオチドの結合からのシグナルを含んでなる。該プロファイルは、結合の存在又は非存在（シグナル vs . ゼロシグナル）として記録することができる。

【0073】

より好ましくは、記録された該プロファイルは、各ハイブリダイゼーションからのシグナルの強度を含む。該プロファイルは、正常、即ち、非癌性、対照サンプルから発生されたハイブリダイゼーションプロファイルと比較される。シグナルの変化は、対象における癌の存在、又は発生する性向を示す。

10

【0074】

miR 遺伝子発現を測定するための他の技術も当業者の範囲内であり、 RNA 転写及び分解の速度を測定するための多様な技術を含む。

結腸癌を有する対象の予後を決定する方法も本明細書において提供され、対象からのサンプル中の、結腸癌関連疾患の特定の予後（例えば、良好又は正の予後、不良な又は悪い予後）に関連する、少なくとも一つの miR 遺伝子産物のレベルを測定することを含んでなる。

【0075】

これらの方法に従うと、対照サンプル中の対応する miR 遺伝子産物のレベルと比較して、試験サンプル中の特定の予後に関連する miR 遺伝子生成物のレベルの変化は、該患者が特定の予後の固形癌を有している指標である。一つの態様において、該 miR 遺伝子産物は悪い（即ち、不良）予後に関連する。悪い予後の例には、限定されるわけではないが、低生存率及び急速な疾患進行が含まれる。ある態様において、該少なくとも一つの miR 遺伝子産物のレベルは、対象から得られた試験サンプルからの RNA を逆転写して標的オリゴデオキシヌクレオチドの組を提供すること、該標的オリゴデオキシヌクレオチドを、 $miRNA$ - 特異的プローブオリゴヌクレオチドを含んでなるマイクロアレイとハイブリダイズさせて試験サンプルについてのハイブリダイゼーションプロファイルを提供すること、そして該試験サンプルハイブリダイゼーションプロファイルと対照サンプルから発生させたハイブリダイゼーションプロファイルを比較すること、により測定される。

20

30

【0076】

いずれか一つの理論に束縛されるものではないが、細胞中の一つ又はそれより多くの miR 遺伝子産物のレベルの変化は、これらの miR についての一つ又はそれより多くの意図された標的の調節解除を生じることができると考えられており、それは固形癌の形成を導き得る。それ故、 miR 遺伝子産物のレベルを変化させることで（例えば、固形癌で上方調節されている miR 遺伝子産物のレベルを減少させることにより、固形癌で下方調節されている miR 遺伝子産物のレベルを増加させることにより）、固形癌を成功裏に治療することができる。

【0077】

従って、固形癌を有する、又は有していると疑われる対象における発癌を抑制する方法が本明細書において提供され、該対象の癌細胞中では、少なくとも一つの miR 遺伝子産物が脱調節されている（例えば、下方調節、上方調節）。該少なくとも一つの単離された miR 遺伝子産物が癌細胞中で下方調節されている場合（例えば、 $miR-21$ ）、該方法は、対象中の癌細胞の増殖が抑制されるように、少なくとも一つの単離された miR 遺伝子産物、又は単離された変異体又はそれらの生物学的に活性な断片の有効量を投与することを含んでなる。

40

【0078】

例えば、 miR 遺伝子産物が対象中の癌細胞において下方調節されている場合、単離された miR 遺伝子産物の有効量を該対象に投与することは、該癌細胞の増殖を抑制し得る。該対象に投与される単離された miR 遺伝子産物は、該癌細胞中で下方調節されている

50

内在性野生型 m i R 遺伝子産物（例えば、m i R 遺伝子産物）と同一でもよいし、又は変異体又はそれらの生物学的に活性な断片でもあり得る。

【 0 0 7 9 】

本明細書で定義される m i R 遺伝子産物の「変異体」とは、対応する野生型 m i R 遺伝子産物と 1 0 0 % 未満の同一性を有し、対応する野生型 m i R 遺伝子産物の一つまたはそれより多くの生物活性を所有する m i R N A を指す。こうした生物活性の例には、限定されるわけではないが、標的 R N A 分子の発現の抑制（例えば、標的 R N A 分子の翻訳を抑制すること、標的 R N A 分子の安定性を変調すること、標的 R N A 分子のプロセッシングを抑制すること）、及び固形癌に関連した細胞プロセス（例えば、細胞分化、細胞増殖、細胞死）が含まれる。これらの変異体には、種変異体及び m i R 遺伝子中の一つまたはそれより多くの突然変異（例えば、置換、欠失、挿入）の結果である変異体が含まれる。特定の態様において、該変異体は、対応する野生型 m i R 遺伝子産物と少なくとも、約 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % 又は 9 9 % 同一である。

10

【 0 0 8 0 】

本明細書で定義された、m i R 遺伝子産物の「生物学的に活性な断片」とは、対応する野生型 m i R 遺伝子産物の一つ又はそれより多くの生物活性を有する R N A 断片を指す。上に記載したように、こうした生物活性の例には、限定されるわけではないが、標的 R N A 分子の発現の抑制、及び結腸癌に関連した細胞プロセスの抑制が含まれる。ある態様において、該生物学的に活性な断片は、少なくとも、約 5、7、1 0、1 2、1 5、又は 1 7 ヌクレオチド長である。特定の態様において、単離された m i R 遺伝子産物は、一つ又はそれより多くの追加の抗癌治療と組み合わせて対象に投与し得る。適した抗癌治療には、限定されるわけではないが、化学療法、放射線療法及びそれらの組み合わせ（例えば、放射線化学療法）が含まれる。

20

【 0 0 8 1 】

該少なくとも一つの単離された m i R 遺伝子産物が癌細胞中で上方制御されている場合、該方法は、固形癌細胞の増殖が抑制されるように、該少なくとも一つの m i R 遺伝子産物の発現を抑制するための少なくとも一つの化合物（本明細書において、m i R 遺伝子産物発現抑制化合物と称される）の有効量を該対象に投与することを含んでなる。特定の態様において、該少なくとも一つの m i R 発現抑制化合物は m i R 2 0 a、m i R - 2 1、m i R - 1 0 6 a、m i R - 1 8 I b、m i R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群から選択される m i R 遺伝子産物に特異的である。

30

【 0 0 8 2 】

m i R 遺伝子発現抑制化合物は、一つ又はそれより多くの追加の抗癌治療と組み合わせて対象に投与し得る。適した抗癌治療には、限定されるわけではないが、化学療法、放射線療法及びそれらの組み合わせ（例えば、放射線化学療法）が含まれる。

【 0 0 8 3 】

本明細書で使用される用語「治療する」、「治療すること」及び「治療」は、疾患又は状態、例えば、固形癌に関連する症状を寛解させることを指し、疾患症状の発症を防止する又は遅延すること、及び／又は疾患又は状態の症状の重症度又は頻度を減らすことを含んでいる。用語「対象」、「患者」及び「個体」は、限定されるわけではないが、霊長類、乳牛、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス又は他のウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、げっ歯類又はマウス種を含む哺乳類のような動物を含むことが本明細書において定義される。好ましい態様において、該動物はヒトである。

40

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用される単離された m i R 遺伝子産物の「有効量」とは、固形癌を患っている対象中の癌細胞の増殖を抑制するために十分な量である。当業者は、対象のサイズ及び体重；疾患浸透の程度；対象の年齢、健康及び性；投与経路；及び投与が局所的であるか又は全身的であるかどうかのような因子を考慮に入れることにより、所与の対象に投与すべき m i R 遺伝子産物の有効量を容易に決定し得る。

【 0 0 8 5 】

50

例えば、単離された m i R 遺伝子産物の有効量は、治療されるべき腫瘍塊のおよその重量に基づき得る。腫瘍塊のおよその重量は、該塊のおよその容量を計算することにより決定することが可能であり、1立方センチメートルの容量は大体1グラムに等しい。腫瘍塊の重量に基づいた、該単離された m i R 遺伝子産物の有効量は、腫瘍塊のグラム当たり約10～500マイクログラムの範囲であり得る。特定の態様において、有効量は少なくとも、腫瘍塊のグラム当たり少なくとも約10マイクログラム、腫瘍塊のグラム当たり少なくとも約60マイクログラム又は少なくとも腫瘍塊のグラム当たり約100マイクログラムでもあり得る。

【0086】

単離された m i R 遺伝子産物の有効量は、治療されるべき対象のおよその又は推定体重にも基づき得る。好ましくは、こうした有効量は、本明細書に記載した通り、非経口的に又は経腸的に投与される。例えば、単離された m i R 遺伝子産物の有効量は、体重 k g 当たり約5～3000マイクログラム、体重 k g 当たり約700～1000マイクログラムの範囲で、又は体重 k g 当たり約1000マイクログラムを超えて対象に投与される。

【0087】

当業者は、所与の対象へ一つ又はそれより多くの m i R 遺伝子産物を投与することについての適切な投与計画も容易に決定し得る。例えば、一つ又はそれより多くの m i R 遺伝子産物は対象に一度で投与し得る（例えば、単回注射又はデポジションとして）。もしくは、一つ又はそれより多くの m i R 遺伝子産物は、約3～約28日、より好ましくは約7日～約10日の期間、対象に1日1回又は2回投与し得る。特定の投与計画において、一つ又はそれより多くの m i R 遺伝子産物は7日にわたって1日1回投与される。投与計画が複数の投与を含んでなる場合、対象に投与される一つ又はそれより多くの m i R 遺伝子産物の有効量は、全投与計画にわたって投与された遺伝子産物の総量を含むことが可能であることが理解される。

【0088】

本明細書で使用される「単離された」 m i R 遺伝子産物は、合成された又はヒトの介在を介して天然の状態から変化された又は取り出されたものである。例えば、合成 m i R 遺伝子産物又はその天然の状態で同時に存在する物質から部分的に又は完全に分離された m i R 遺伝子産物が、「単離されて」といって考えられる。単離された m i R 遺伝子産物は実質的に精製された形態で存在することが可能であり、又は m i R 遺伝子産物が送達される細胞内に存在することが可能である。それ故、細胞へ計画的に送達された又は細胞中で発現された m i R 遺伝子産物は、「単離された」 m i R 遺伝子産物と考えられる。 m i R 前駆分子から細胞内部で産生された m i R 遺伝子産物も「単離された」分子であると考えられる。一つの特定の態様に従うと、本明細書に記載された該単離された m i R 遺伝子産物は、対象（例えば、ヒト）における固形癌のための医薬の製造に使用し得る。

【0089】

単離された m i R 遺伝子産物は、多くの標準技術を使用して得ることが可能である。例えば、該 m i R 遺伝子産物は当該技術分野で公知の方法を使用して化学的に合成又は組換え的に産生し得る。一つの態様において、 m i R 遺伝子産物は適切に保護されたりボヌクレオシドホスホラミダイト及び慣用的 D N A / R N A シンセサイザーを使用して化学的に合成される。合成 R N A 分子又は合成試薬の商業的供給元には、例えば、Proligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, U.S.A.), Pierce Chemical (Perbio Science の一部門, Rockford, IL, U.S.A.), Glen Research (Sterling, VA, U.S.A.), ChemGenes (Ashland, MA, U.S.A.) 及び Cruachem (Glasgow, UK) が含まれる

もしくは、該 m i R 遺伝子産物は、いずれかの適したプロモーターを使用して組換え環状又は直線状 D N A プラスミドから発現し得る。プラスミドから R N A を発現するために適したプロモーターには、例えば、U6又はH1 R N A ポリメラーゼ I I I プロモーター配列又はサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。他の適したプロモーターの選択は当業者には自明である。本発明の組換えプラスミドは、癌細胞中での m i R 遺伝子産物の発現のための誘導可能又は調節可能プロモーターも含み得る。

【 0 0 9 0 】

組換えプラスミドから発現された該miR遺伝子産物は、標準技術により培養細胞発現システムから単離し得る。組換えプラスミドから発現されたmiR遺伝子産物は、癌細胞へ送達する、及び該細胞中で直接発現することも可能である。癌細胞へ該miR遺伝子産物を送達するための組換えプラスミドの使用は、以下により詳細に議論されている。

【 0 0 9 1 】

該miR遺伝子産物は別の組換えプラスミドから発現することも、又は同一の組換えプラスミドから発現することも可能である。一つの態様において、該miR遺伝子産物は、単一プラスミドからRNA前駆分子として発現され、そして該前駆分子は、限定されるわけではないが、癌細胞内に実存するプロセッシングシステムを含む適したプロセッシングシステムにより、機能性miR遺伝子産物にプロセッシングされる。他の適したプロセッシングシステムには、例えば、インビトロ ショウジョウバエ細胞溶解システム（例えば、その全開示が本明細書において援用される、Tuschl et al. による米国公開特許出願番号2002/0086356に記載されている）及び大腸菌（E.coli）RNAse IIIシステム（例えば、その全開示が本明細書において援用される、Yang et al. による米国公開特許出願番号2004/0014113に記載されている）が含まれる。

10

【 0 0 9 2 】

該miR遺伝子産物を発現するために適したプラスミドの選択、プラスミド内へ遺伝子産物を発現するための核酸配列を挿入する方法、及び組換えプラスミドを問題とする細胞へ送達する方法は当業者には自明である。例えば、その全開示が本明細書において援用される、Zeng et al. (2002), Molecular Cell 9:1327-1333; Tuschl (2002), Nat. Biotechnol., 20:446-448; Brummelkamp et al. (2002), Science 296:550-553; Miyagishi et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500; Paddison et al. (2002), Genes Dev. 16:948-958; Lee et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505; 及び Paul et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:505-508 を参照されたい。

20

【 0 0 9 3 】

一つの態様において、該miR遺伝子産物を発現しているプラスミドは、CMV中間期プロモーター制御下のmiR前駆体RNAをコードしている配列を含んでなる。本明細書において使用されるプロモーターの「制御下」とは、プロモーターがmiR遺伝子産物コード配列の転写を開始できるように、miR遺伝子産物をコードする核酸配列が該プロモーターの3'に位置していることを意味する。

30

【 0 0 9 4 】

該miR遺伝子産物は組換えウイルスベクターからも発現し得る。該miR遺伝子産物が2つの別の組換えウイルスベクターから、又は同一のウイルスベクターから発現し得ることが企図される。該組換えウイルスベクターから発現されたRNAは、標準技術により培養細胞発現システムから単離することが可能であり、又は癌細胞中で直接発現することも可能である。癌細胞へ該miR遺伝子産物を送達するための組換えウイルスベクターの使用は以下により詳細に議論されている。

【 0 0 9 5 】

本発明の組換えウイルスベクターは、該miR遺伝子産物をコードする配列及びRNA配列を発現するためのいずれかの適したプロモーターを含んでなる。適したプロモーターには、限定されるわけではないが、例えば、U6又はH1 RNA pol IIIプロモーター配列又はサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。他の適したプロモーターの選択は当業者には自明である。本発明の組換えウイルスベクターは、癌細胞中での該miR遺伝子産物の発現のための誘導可能又は調節可能プロモーターも含み得る。

40

【 0 0 9 6 】

該miR遺伝子産物のコード配列を受容することが可能ないずれかのウイルスベクターを使用し得る；例えば、アデノウイルス（AV）；アデノ随伴ウイルス（AAV）；レトロウイルス（例えば、レンチウイルス（LV）、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス）；ヘルペスウイルスなどに由来するベクター。ウイルスベクターの向性は、他のウイ

50

ルスからの外被タンパク質又は他の表面抗原でベクターをシュードタイピングすることにより、又は必要に応じて、異なったウイルスカプシドタンパク質で置換することにより修飾し得る。

【0097】

例えば、本発明のレンチウイルスベクターを、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、狂犬病、エボラ、モコラなどからの表面タンパク質でシュードタイピングし得る。本発明のAAVベクターは、異なったカプシドタンパク質血清タイプを発現するようにベクターを工学処理することにより、異なった細胞を標的とすることができる。例えば、血清タイプ2ゲノム上の血清タイプ2カプシドを発現しているAAVベクターは、AAV2/2と称される。このAAV2/2ベクター中の血清タイプ2カプシド遺伝子を血清タイプ5カプシド遺伝子で置き換えることができ、AAV2/5ベクターが産生される。異なったカプシドタンパク質血清タイプを発現するAAVベクターを構築するための技術は、当業者には自明である；例えば、その全開示が本明細書において援用される、Rabinowitz, J.E., et al. (2002), J. Virol. 76:791-801を参照されたい。

10

【0098】

本発明での使用に適した組換えウイルスベクターの選択、RNAを発現するための核酸配列をベクター内へ挿入する方法、該ウイルスベクターを問題とする細胞へ送達する方法及び発現されたRNA産物の回収は当業者には自明である。例えば、その全開示が本明細書において援用される、Dornburg (1995), Gene Therap. 2:301-310; Eglitis (1988), Biotechniques 6:608-614; Miller (1990), Hum. Gene Therap. 1:5-14; 及びAnderson (1998), Nature 392:25-30、を参照されたい。

20

【0099】

特に適したウイルスベクターはAV及びAAVに由来するものである。該miR遺伝子産物を発現するために適したAVベクター、該組換えAVベクターを構築するための方法、及び標的細胞内に該ベクターを送達するための方法は、その全開示が本明細書において援用される、Xia et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010に記載されている。該miR遺伝子産物を発現するために適したAAVベクター、該組換えAAVベクターを構築するための方法、及び標的細胞内に該ベクターを送達するための方法は、その全開示が本明細書において援用される、Samulski et al. (1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher et al. (1996), J. Virol. 70:520-532; Samulski et al. (1989), J. Virol. 63:3822-3826; 米国特許第5,252,479号; 米国特許第5,139,941号; 国際特許出願番号WO 94/13788; 及び国際特許出願番号WO 93/24641に記載されている。一つの態様において、該miR遺伝子産物は、CMV中間初期プロモーターを含んでなる単一组換えAAVベクターから発現される。

30

【0100】

ある態様において、本発明の組換えAAVウイルスベクターは、ヒトU6 RNAプロモーター制御下、ポリT終結配列と作動可能のように連結されたmiR前駆体RNAをコードする核酸配列を含んでなる。本明細書において使用される「ポリT終結配列と作動可能のように連結された」とは、センス又はアンチセンス鎖をコードする核酸配列が、ポリT終結シグナルと5'方向ですぐに隣接していることを意味する。ベクターからの該miR配列の転写の間、ポリT終結シグナルは転写を終結させるように作用する。

40

【0101】

本発明の治療法の他の態様において、miR発現を抑制する少なくとも一つの化合物の有効量を対象に投与し得る。本明細書において使用される「miR発現を抑制する」とは、治療後、miR遺伝子産物の前駆体及び/又は活性成熟形態の産生が、治療に先だって産生された量よりも少ないことを意味する。当業者は、例えば、上記診断法で議論したmiR転写体レベルを決定するための技術を使用して、癌細胞においてmiR発現が抑制されたかどうかを容易に決定し得る。抑制は、遺伝子発現のレベル(即ち、該miR遺伝子産物をコードするmiR遺伝子の転写を抑制することにより)、又はプロセッシングのレベル(例えば、miR前駆体の成熟活性miRへのプロセッシングを抑制することにより

50

）で起こり得る。

【0102】

本明細書で使用される、miR発現を抑制する化合物の「有効量」とは、癌（例えば、結腸癌）を罹患した対象中の、癌細胞の増殖を抑制するために十分な量である。当業者は、対象のサイズ及び体重；疾患浸透の程度；対象の年齢、健康及び性；投与経路；及び投与が局所的であるか又は全身的であるかどうかのような因子を考慮に入れて、所与の対象に投与すべきmiR発現抑制化合物の有効量を容易に決定し得る。

【0103】

例えば、該発現抑制化合物の有効量は、本明細書に記載したように、治療されるべき腫瘍のおよその重量に基づき得る。miR発現を抑制する化合物の有効量は、本明細書に記載したように、治療されるべき対象のおよその又は推定体重にも基づき得る。

10

【0104】

当業者は、本明細書に記載したように、miR発現を抑制する化合物を所与の対象に投与するための適切な投与計画を容易に決定することも可能である。

miR発現を抑制するために適した化合物には、二本鎖RNA（短い又は小さな干渉RNA又は「siRNA」のような）、アンチセンス核酸及びリボザイムのような酵素的RNA分子が含まれる。これらの化合物の各々は、所与のmiR遺伝子産物へ標的化すること、及び標的miR遺伝子産物の発現を妨害（例えば、翻訳を抑制することにより、開裂又は分解を誘発することにより）することが可能である。

20

【0105】

例えば、所与のmiR遺伝子の発現は、該miR遺伝子産物の少なくとも一部と、少なくとも90%、例えば少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列相同性を有する単離された二本鎖RNA（「dsRNA」）分子で該miR遺伝子のRNA干渉を誘発することにより抑制し得る。特定の態様において、dsRNA分子は、「短い又は小さな干渉RNA」又は「siRNA」である。

【0106】

本方法で有用なsiRNAは、約17ヌクレオチド～約29ヌクレオチド長の、好ましくは約19～約25ヌクレオチド長の短い二本鎖DNAを含んでなる。該siRNAは、標準ワトソン-クリック塩基対形成相互作用により（以後「塩基対形成された」）一緒にアニーリングされたセンスRNA鎖及び相補的アンチセンスRNA鎖を含んでなる。該センス鎖は、該標的miR遺伝子産物内に含有されている核酸配列と実質的に同一である核酸配列を含んでなる。

30

【0107】

本明細書で使用される、該標的mRNA内に含有されている標的配列と「実質的に同一である」、siRNA中の核酸配列は、該標的配列と同一である、又は1又は2ヌクレオチドのみ該標的配列と異なっている核酸配列である。該siRNAのセンス及びアンチセンス鎖は、二つの相補的な一本鎖RNA分子を含んでなることが可能であり、又は二つの相補的部分が塩基対形成された、及び一本鎖「ヘアピン」領域により共有結合で連結された単一分子を含んでなることも可能である。

【0108】

該siRNAは、一つ又はそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び/又は改変により天然に存在するRNAとは異なった改変RNAであることも可能である。こうした改変は、該siRNAの末端（単数又は複数）に対する又は該siRNAの一つ又はそれ以上の内部ヌクレオチドに対する非ヌクレオチド物質の付加、又はヌクレアーゼ消化に対して該siRNAを耐性にする修飾、又はデオキシリボヌクレオチドによる該siRNA中の一つ又はそれ以上のヌクレオチドの置換を含むことができる。

40

【0109】

該siRNAの一つ又は両方の鎖は、3'オーバーハングも含み得る。本明細書において使用される「3'オーバーハング」とは、二重鎖形成したRNA鎖の3'末端から伸長する少なくとも一つの、対を形成していないヌクレオチドを指す。それ故、特定の態様に

50

において、該 *siRNA* は、1～約6ヌクレオチド（リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含む）長、1～約5ヌクレオチド長、1～約4ヌクレオチド長、又は約2～約4ヌクレオチド長の少なくとも一つの3'オーバーハングを含んでなる。特定の態様において、該3'オーバーハングは該 *siRNA* の両方の鎖上に存在し、及び2ヌクレオチド長である。例えば、該 *siRNA* の各鎖は、ジチミジル酸（「TT」）又はジウリジル酸（「uu」）の3'オーバーハングを含んでなることができる。

【0110】

該 *siRNA* は、化学的又は生物学的、又は単離された *miR* 遺伝子産物について前に記載した組換えプラスミド又はウイルスベクターから発現することも可能である。 *dsRNA* 又は *siRNA* 分子を産生する又は試験する方法の例は、それらの全開示が本明細書において援用される、Gewirtz による米国公開特許出願番号2002/0173478及びReich et al. による米国公開特許出願番号2004/0018176 に記載されている。

10

【0111】

所与の *miR* 遺伝子の発現は、アンチセンス核酸によっても抑制し得る。本明細書で使用する「アンチセンス核酸」とは、標的 *RNA* の活性を変化させる *RNA-RNA* 又は *RNA-DNA* 又は *RNA-ペプチド* 核酸相互作用により標的 *RNA* に結合する核酸分子を指す。本方法における使用のために適したアンチセンス核酸は、*miR* 遺伝子産物中の近接する核酸配列に相補的な核酸配列を一般的に含んでなる、一本鎖核酸（例えば、*RNA*、*DNA*、*RNA-DNA* キメラ、ペプチド核酸（*PNA*））である。該アンチセンス核酸は、*miR* 遺伝子産物中の近接する核酸配列と50～100%相補的、75～100%相補的、又は95～100%相補的である核酸配列を含んでなることができる。

20

【0112】

いずれかの理論に束縛されるものではないが、該アンチセンス核酸は、*RNase H* 又は該 *miR* 遺伝子産物/アンチセンス核酸二重鎖を消化する別の細胞ヌクレアーゼを活性化すると信じられている。

【0113】

アンチセンス核酸は、標的特異性、ヌクレアーゼ耐性、送達又は該分子の有効性に関する他の特性を増強するため、核酸主鎖への又は糖及び塩基部分（またはそれらの均等物）への修飾も含有し得る。こうした修飾には、コレステロール部分、アクリジンのような二重鎖インターカレーター、又は一つ又はそれ以上のヌクレアーゼ抵抗性基が含まれる。

30

【0114】

アンチセンス核酸は、化学的又は生物学的、又は該単離された *miR* 遺伝子産物について前に記載した組換えプラスミド又はウイルスベクターから発現することも可能である。産生する又は試験するための方法の例は、当業者には自明である；例えば、それらの全開示が本明細書において援用される、Stein and Cheng (1993), *Science* 261:1004及びWoolf et al., による米国特許第5,849,902号を参照されたい。

【0115】

所与の *miR* 遺伝子の発現は、酵素的核酸によっても抑制し得る。本明細書で 사용되는「酵素的核酸」とは、*miR* 遺伝子産物の近接する核酸配列に相補性を有する基質結合領域を含んでなる核酸を指し、それは該 *miR* 遺伝子産物を特異的に切断することが可能である。酵素的核酸基質結合領域は、*miR* 遺伝子産物中の近接する核酸配列と、例えば、50～100%相補的、75～100%相補的又は95～100%相補的であり得る。該酵素的核酸は、塩基、糖及び/又はリン酸基に修飾を含んでなることもできる。本方法における使用のための酵素的核酸の例はリボザイムである。

40

【0116】

該酵素的核酸は、化学的又は生物学的、又は該単離された *miR* 遺伝子産物について前に記載した組換えプラスミド又はウイルスベクターから発現することも可能である。 *dsRNA* 又は *siRNA* 分子を産生する又は試験するための方法の例は、それらの全開示が本明細書において援用される、Werner and Uhlenbeck (1995), *Nucl Acids Res.* 23:2092-96; Hammann et al. (1999), *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 9:25-31 ; 及びC

50

ech et al. による米国特許第4,987,071 号に記載されている。

【0117】

少なくとも一つのmiR遺伝子産物、又はmiR発現を抑制するための少なくとも一つの化合物の投与は、固形癌を有する対象中の癌細胞の増殖を抑制するであろう。本明細書で使用される「癌細胞の増殖を抑制する」とは、該細胞を殺す、又は該細胞の増殖を持続的又は一時的に休止させる又は遅らせることを意味する。もし、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物の投与後に該対象中のこうした細胞の数が一定に残るか又は減少したら、癌細胞増殖の抑制が推測できる。もし、こうした細胞の絶対数が増加しても、腫瘍増殖の速度が低下したら、癌細胞の増殖の抑制がまた推測できる。

【0118】

対象体中の癌細胞の数は、直接測定により、又は原発性又は転移性腫瘍塊のサイズからの推定により決定し得る。例えば、対象中の癌細胞の数は、免疫組織学的方法、フローサイトメトリー、又は癌細胞の特徴的表面マーカーを検出するように設計された他の技術により測定し得る。

【0119】

腫瘍塊のサイズは、直接視覚的観察により、又はX線、磁気共鳴イメージング、超音波及びシンチグラフィーのような診断的イメージング法により確認し得る。腫瘍塊のサイズを確認するために使用される診断的イメージング法は、当該技術分野では公知の造影剤を用いることができるが、又は用いなくてもよい。腫瘍塊のサイズは、組織塊の触診のような物理的手段により、又はキャリパーのような計測器での組織塊の測定によっても確認し得る

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、対象の癌細胞へこれらの化合物を送達するために適したいずれかの手段により対象に投与し得る。例えば、該miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、これらの化合物で、又はこれらの化合物をコードする配列を含んでなる核酸で該対象の細胞をトランスフェクトするために適した方法により投与し得る。

【0120】

一つの態様において、該細胞は、少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物をコードする配列を含んでなるプラスミド又はウイルスベクターでトランスフェクトされる。

【0121】

真核細胞のためのトランスフェクション法は当該技術分野では公知であり、そして、例えば、細胞の核又は前核内への核酸の直接注入；エレクトロポレーション；リボソーム輸送又は親油性物質により仲介される輸送；レセプター仲介核酸送達；生物弾道又は粒子加速；リン酸カルシウム沈澱、及びウイルスベクターにより仲介されるトランスフェクションが含まれる。

【0122】

例えば、細胞はリボソーム輸送化合物、例えば、DOTAP (N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチル-アンモニウムメチルスルフェート、Boehringer-Mannheim) 又はリポフェクチン (LIPOFECTIN) のような均等物でトランスフェクトし得る。使用される核酸の量は、本発明の実施には決定的ではない；0.1~100マイクログラム核酸/10⁵細胞で受容可能な結果が達成できる。例えば、10⁵細胞当たり、3マイクログラムのDOTAP中に約0.5マイクログラムのプラスミドベクターの比で使用し得る。

【0123】

miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、いずれかの適した経腸又は非経口投与経路によっても対象に投与し得る。本方法のために適した経腸投与経路には、例えば、経口、直腸又は鼻孔内送達が含まれる。適した非経口投与経路には、例えば、血管内投与（例えば、静脈内ボラス投与、静脈内注入、動脈内ボラス投与、動脈内注入、及び血管系内へのカテーテル点滴注入）；組織周辺及び組織内注射（例えば、腫瘍周囲及び

10

20

30

40

50

腫瘍内注射、網膜内注射又は網膜下注射)；皮下注入(浸透圧ポンプによるような)を含む皮下注射又はデポジション；カテーテル又は他の設置デバイス(例えば、網膜ペレット又は座剤、又は多孔質、非多孔質又はゲル状物質を含んでなる移植片)による目的の組織への直接適用；及び吸入が含まれる。特に適した投与経路は注射、注入及び腫瘍内への直接注射である。

【0124】

本方法において、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物は、裸のRNAとして、送達試薬と組み合わせて、又は該miR遺伝子産物又は発現抑制化合物を発現する配列を含んでなる核酸(例えば、組換えプラスミド又はウイルスベクター)として該対象に投与し得る。適した送達試薬には、例えば、Mirus Transit TKO 親油性試薬；リポフェクチン；リポフェクタミン；セルフェクチン；ポリカチオン(例えば、ポリリジン)及びリボソームが含まれる。

10

【0125】

該miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物を発現する配列を含んでなる組換えプラスミド又はウイルスベクター、及びこうしたプラスミド及びベクターを癌細胞に送達するための技術は本明細書で議論されている、及び/又は当該技術分野で公知である。

【0126】

特定の態様において、miR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現阻害化合物(又はそれらをコードする配列を含んでなる核酸)を対象に送達するためにリボソームが使用される。リボソームは該遺伝子産物又は核酸の血中半減期を増加させることもできる。本発明で使用するために適したリボソームは、一般的に中性又は陰性に荷電したリン脂質及びコレステロールのようなステロールを含む、標準小胞形成脂質から形成し得る。脂質の選択は、所望のリボソームサイズ及び血流におけるリボソームの半減期のような因子の考慮により一般的に導かれる。例えば、それらの全開示が本明細書において援用される、Szoka et al. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467；及び米国特許第4,235,871、4,501,728、4,837,028及び5,019,369号に記載されているように、リボソームを作製するための多様な方法は公知である。

20

【0127】

本方法で使用するためのリボソームは、リボソームに癌細胞を標的とさせるリガンド分子を含むことができる。腫瘍細胞抗原に結合するモノクローナル抗体のような、癌細胞に一般的なレセプターに結合するリガンドが好ましい。

30

【0128】

本方法で使用するためのリボソームは、単核マクロファージ系(「MMS」)及び細網内皮系(「RES」)によるクリアランスを避けるために修飾され得る。こうした修飾リボソームは、表面上又はリボソーム構造内に組み入れられたオブソニン化阻害部分を有する。特に好ましい態様において、本発明のリボソームはオブソニン化阻害部分及びリガンドの両方を含んでなることが可能である。

【0129】

本発明のリボソームの調製において使用のためのオブソニン化阻害部分は、典型的にはリボソーム膜へ結合された大きな親水性ポリマーである。本明細書で使用する、オブソニン化阻害部分がリボソーム膜に「結合されて」いるとは、例えば、膜それ自身内への脂溶性アンカーのインターカレーションにより、又は膜脂質の活性基への直接結合により化学的又は物理的に膜に結合されている場合である。これらのオブソニン化阻害親水性ポリマーは保護的表面層を形成し、MMS及びRESによるリボソームの取り込みを著しく減少させる；例えば、その全開示が本明細書において援用される米国特許第4,920,016号に記載されているように。

40

【0130】

リボソームを修飾するために適したオブソニン化阻害部分は、好ましくは、約500～約40,000ダルトン、及びより好ましくは約2,000～約20,000ダルトンの平均分子量を有する水溶性ポリマーである。こうしたポリマーには、ポリエチレングリコ

50

ール (P E G) 又はポリプロピレングリコール (P P G) 又はそれらの誘導体 ; 例えば、メトキシ P E G 及び P P G、又は P E G 及び P P G ステアレート ; ポリアクリルアミド又はポリ N - ビニルピロリドンのような合成ポリマー ; 直鎖状、分枝又は樹状のポリアミドアミン ; ポリアクリル酸 ; 多価アルコール、例えば、カルボキシ又はアミノ基が化学的に結合されたポリビニルアルコール及びポリキシリトール、ならびにガングリオシド G M 1 のようなガングリオシド、が含まれる。P E G、メトキシ P E G 又はメトキシ P P G 又はそれらの誘導体のコポリマーも適している。加えて、該オブソニン化阻害ポリマーは、P E G とポリアミノ酸、ポリサッカリド、ポリアミドアミン、ポリエチレンアミン又はポリヌクレオチドとのブロックコポリマーでもあり得る。該オブソニン化阻害ポリマーは、アミノ酸又はカルボン酸、例えば、ガラクトツロ酸、グルクロン酸、マンノン酸、ヒアルロン酸、ペクチン酸、ノイラミン酸、アルギン酸、カラゲナンを含有する天然のポリサッカリド ; アミノ化ポリサッカリド又はオリゴサッカリド (直鎖又は分枝) ; 又は、例えば、生じたカルボキシル基で繋がっている炭酸の誘導体と反応させたカルボキシル化ポリサッカリド又はオリゴサッカリドでもあり得る。好ましくは、オブソニン化阻害部分は P E G、P P G 又はそれらの誘導体である。P E G 又は P E G 誘導体で修飾されたりボソームは、しばしば「P E G 化リボソーム」と称される。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

オブソニン化阻害部分は、多数の公知の技術のいずれか一つによりリボソーム膜に結合し得る。例えば、P E G の N - ヒドロキシスクシニミドエステルはホスファチジル - エタノールアミン脂溶性アンカーへ結合することが可能であり、そして次ぎに膜へ結合される。同様に、デキストランポリマーは、 $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ 及び 3 0 : 1 2 の比のテトラヒドロフラン及び水のような溶媒混合物を使用した 6 0 での還元的アミノ化を介して、ステアリルアミン脂溶性アンカーで誘導体化し得る。

【 0 1 3 2 】

オブソニン化阻害部分で修飾されたりボソームは、循環系において無修飾リボソームよりも長く残存する。このような理由のため、こうしたリボソームはしばしば「ステルス」リボソームと称される。ステルスリボソームは、多孔質又は「漏出性」微小血管系から栄養を受けている組織で蓄積されることが知られている。それ故、こうした微小血管系欠陥により特徴付けられる組織、例えば、固形腫瘍はこれらのリボソームを効率的に蓄積するであろう ; Gabizon, et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18:6949-53 を参照されたい。加えて、R E S による減少した取り込みは、肝臓及び脾臓におけるリボソームの有意な蓄積を防止することにより、ステルスリボソームの毒性を低下させる。それ故、オブソニン化阻害部分で修飾されたりボソームは、該 m i R 遺伝子産物又は m i R 遺伝子発現阻害化合物 (又はそれらをコードする配列を含んでなる核酸) を腫瘍細胞に送達するのに特に適している。

【 0 1 3 3 】

m i R 遺伝子産物又は m i R 遺伝子発現抑制化合物は、当該技術分野で公知である技術に従って、対象への投与に先立って、しばしば「医薬 (medicament) 」と称される医薬組成物として製剤し得る。従って、本発明は固形癌治療のための医薬組成物を包含する。一つの態様において、該医薬組成物は、少なくとも一つの単離された m i R 遺伝子産物、又は単離された変異体又はそれらの生物学的に活性なフラグメント及び薬学的に許容できる担体を含んでなる。特定の態様において、少なくとも一つの m i R 遺伝子産物は、適した対照細胞と比べて固形癌細胞中で減少したレベルの発現を有する m i R 遺伝子産物に対応する。特定の態様において、単離された m i R 遺伝子産物は、m i R 2 0 a、m i R - 2 1、m i R - 1 0 6 a、m i R - 1 8 1 b、m i R - 2 0 3 及びそれらの組み合わせから成る群より選択される。

【 0 1 3 4 】

他の態様において、本発明の医薬組成物は、少なくとも一つの m i R 発現阻害化合物を含んでなる。特定の態様において、該少なくとも一つの m i R 遺伝子発現抑制化合物は、対照細胞よりも結腸癌細胞においてその発現が多い m i R 遺伝子に特異的である。ある態

様において、mi R 遺伝子発現抑制化合物は、mi R 20 a、mi R - 21、mi R - 106 a、mi R - 181 b、mi R - 203 及びそれらの組み合わせから成る群より選択された一つ又はそれより多くのmi R 遺伝子産物に特異的である。

【0135】

本発明の医薬組成物は少なくとも無菌で及び発熱物質が含まれていないことで特徴付けられる。本明細書で使用される「医薬製剤」は、ヒト及び獣医学使用のための製剤を含む。本発明の医薬組成物を製造するための方法は、例えば、その全開示が本明細書において援用される、Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) に記載されているように、当業者には自明である。

【0136】

本医薬組成物は、医薬として受容可能な坦体と混合された、少なくとも一つのmi R 遺伝子産物又はmi R 遺伝子発現抑制化合物（又はそれらをコードする配列を含んでなる少なくとも一つの核酸）（例えば、0.1～90重量%）又はそれらの生理学的に受容可能な塩を含んでなる。特定の態様において、本発明の医薬組成物は追加の一つ又はそれより多くの抗癌剤（例えば、化学療法剤）を含んでなる。本発明の医薬製剤は、リボソームで被包されている少なくとも一つのmi R 遺伝子産物又はmi R 遺伝子発現抑制化合物（又は、それらをコードする配列を含んでなる少なくとも一つの核酸）及び薬学的に許容できる坦体も含むことができる。一つの態様において、該医薬組成物は、mi R 遺伝子又はmi R - 21である遺伝子産物を含んでなる。

【0137】

特に適した薬学的に許容できる坦体は、水、緩衝化水、通常の生理食塩水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などである。

特定の態様において、本発明の医薬組成物は、ヌクレアーゼによる分解に耐性である該mi R 遺伝子産物又はmi R 遺伝子発現抑制化合物（又は、それらをコードする配列を含んでなる少なくとも一つの核酸）を含んでなる。当業者は、例えば、2'位が修飾されている一つ又はそれ以上のリボヌクレオチドを該mi R 遺伝子産物内に取り込ませることにより、ヌクレアーゼ耐性である核酸を容易に合成し得る。適した2'修飾リボヌクレオチドには、フルオロ、アミノ、アルキル、アルコキシ及びO-アリルで2'位が修飾されているものが含まれる。

【0138】

本発明の医薬組成物は、慣用的医薬賦形剤及び/又は添加剤も含むことができる。適した医薬賦形剤には、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調節剤、緩衝剤及びpH調整剤が含まれる。適した添加剤には、例えば、生理学的生体適合性緩衝剤（例えば、トロメタミン塩酸塩）、キレート剤（例えば、DTPA又はDTPA-ビスアミドのような）又はカルシウムキレート錯体（例えば、カルシウムDTPA、CaNaDTPA-ビスアミドのような）の添加又は、随意に、カルシウム又はナトリウム塩の添加（例えば、塩化カルシウム、アスコビル酸カルシウム、グルコン酸カルシウム又は乳酸カルシウム）が含まれる。本発明の医薬組成物は液体形態での使用のために包装することができ、又は凍結乾燥することができる。

【0139】

本発明の固形医薬組成物のためには、慣用的無毒固体の薬学的に許容できる坦体を使用することができる；例えば、医薬用のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなど。

【0140】

例えば、経口投与のための固形医薬組成物は、上に列挙したいずれかの坦体及び賦形剤、及び10～95%、好ましくは25%～75%の該少なくとも一つのmi R 遺伝子産物又はmi R 遺伝子発現阻害化合物（又は、それらをコードする配列を含んでなる少なくとも一つの核酸）を含み得る。エアロゾル（吸入）投与のための医薬組成物は、0.01～20重量%、好ましくは1%～10重量%の上記のようにリボソーム中に被包された該少

10

20

30

40

50

なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物（又は、それらをコードする配列を含んでなる少なくとも一つの核酸）、及び噴霧剤を含み得る。望むなら坦体も含ませ得る；例えば、鼻腔内送達のためのレシチン。

【0141】

本発明の医薬組成物は、一つ又はそれより多くの抗癌剤をさらに含んでなる。特定の態様において、該組成物は、少なくとも一つのmiR遺伝子産物又はmiR遺伝子発現抑制化合物（又は、それらをコードする配列を含んでなる少なくとも一つの核酸）、及び少なくとも一つの化学療法剤を含んでなる。本発明の方法に適している化学療法剤には、限定されるわけではないが、DNAアルキル化剤、抗腫瘍抗生物質剤、抗代謝製剤、チューブリン安定化剤、チューブリン不安定化剤、ホルモンアンタゴニスト剤、トポイソメラーゼ阻害剤、タンパク質キナーゼ阻害剤、HMG-CoA阻害剤、CDK阻害剤、サイクリン阻害剤、カスパーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、アンチセンス核酸、三重らせんDNA、核酸アプタマー及び分子的修飾ウイルス、細菌又は外毒素剤が含まれる。本発明の組成物に適した剤の例には、限定されるわけではないが、シチジンアラビノシド、メトトレキサート、ビンクリスチン、エトポシド（VP-16）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン（CDDP）、デキサメタゾン、アルグラビン、シクロホスファミド、サルコリシン、メチルニトロソ尿素、フルオロウラシル、5-フルオロウラシル（5FU）、ビンブラスチン、カンプトテシン、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、過酸化水素、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、カルムスチン、ストレプトゾシン、CPT-11、タキソール、タモキシフェン、ダカルバジン、リツキシマブ、ダウノルビシン、1-β-D-アラビノフラノシルシトシン、イマチニブ、フルダラビン、ドセタキセル及びFOLFEX4が含まれる。

10

20

【0142】

発癌の抑制剤を同定する方法も本明細書において提供され、細胞に試験剤を提供すること、及び該細胞中の少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定すること、を含んでなる。一つの態様において、該方法は、細胞に試験剤を提供すること、及び癌細胞中で減少した発現に関連する少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定すること、を含んでなる。適した対照細胞（剤が提供されていない）に比べ、剤が提供された後のmiR遺伝子産物のレベルの増加は、該試験剤が発癌の抑制剤であった指標である。特定の態様において、癌細胞中の減少した発現レベルに関連した少なくとも一つのmiR遺伝子産物は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される。

30

【0143】

他の態様において、該方法は、細胞に試験剤を提供すること、及び癌細胞中で増加した発現に関連する少なくとも一つのmiR遺伝子産物のレベルを測定すること、を含んでなる。適した対照細胞（剤が提供されていない）に比べ、剤が提供された後のmiR遺伝子産物のレベルの減少は、該試験剤が発癌の抑制剤であった指標である。特定の態様において、癌細胞中の増加した発現レベルに関連した少なくとも一つのmiR遺伝子産物は、miR20a、miR-21、miR-106a、miR-181b、miR-203及びそれらの組み合わせから成る群より選択される。

40

【0144】

適した剤には、限定されるわけではないが、薬剤（例えば、低分子、ペプチド）及び生体高分子（例えば、タンパク質、核酸）が含まれる。該剤は、組換え的に、合成的に製造することが可能であり、又は天然源から単離する（即ち、精製する）ことができる。細胞へこうした剤を提供するための多様な方法（例えば、トランスフェクション）は当該技術分野では公知であり、こうした方法のいくつかは上に記載されている。少なくとも一つのmiR遺伝子産物の発現検出するための方法（例えば、ノーザンブロッティング法、インサイチュハイブリダイゼーション、RT-PCR、発現プロファイリング）も当該技術分野では公知である。これらの方法のいくつかも本明細書に記載されている。

【0145】

50

本発明はここで以下の非制限実施例により例示されるであろう。

【実施例】

【0146】

実施例 1

マイクロRNA発現パターンは結腸腫瘍において変化する

我々は、マイクロRNAマイクロアレイ³⁰を使用して、結腸腫瘍性及び隣接する非腫瘍性組織の84対のマイクロRNAプロファイルを比較した。これら84対象は、発症結腸腺癌を有するグレーターボルチモア、メリーランド地区から採用された患者であり、メリーランド試験コホートと称される(表1)。

【0147】

【表 1】

表 1-集団及び腫瘍の特徴

	メーランド ¹ 試験コホート	香港検証コホート
	N=84	N=113
採用地区	ボルネオ、メーランド、USA	香港、中国
登録時年齢-年 平均±SD	64.6±10.7	55.8±15
範囲	32-87	32-84
性-数(%)		
男性	66(79)	56(50)
女性	18(21)	57(50)
人種-数(%)		
白人	52(62)	0(0)
黒人	32(38)	0(0)
アジア人	0(0)	113(100)
腫瘍位置-数(%)		
遠位	48(59)	90(80)
近位	34(41)	23(20)
腺癌組織学-数(%)		
腺癌	75(89)	105(93)
粘液腺癌	8(10)	7(6)
腺扁平上皮癌	1(1)	0(0)
印環細胞および粘液性	0(0)	1(1)
アジアント ² 化学療法 ² -数(%)		
受	22(37)	40(35)
なし	37(63)	73(65)
TNM ステージ-数(%)		
II	29(34)	37(33)
III	36(43)	48(42)
IV	10(12)	19(17)

¹遠位は下行結腸に、又はより遠位に位置している腫瘍を含む。近位腫瘍は脾湾曲部中の、又は近位の腫瘍を含む。腫瘍位置は、オリジナルコホート中の82人の対象、及び検証コホートの全対象から入手可能であった。²化学療法の受け取りに関する詳細な情報は、試験コホート中の59人の対象、及び検証コホートの全対象から入手可能であった。化学療法は主としてフルオロウラシルに基づいており（静脈内5-フルオロウラシルか又はウラシルと共にテガフルを含んでいる経口薬剤【UFT】の形態で）、レバミゾール又はロイコボリンは含まれているか又は含まれていない。

【0148】

腫瘍マイクロRNAプロファイルは、非腫瘍プロファイルと明瞭に異なっていた。37の独立したマイクロRNAが腫瘍において異なって発現されていることが発見された（ $p < 0.001$ 、偽発見率 $< 0.5\%$ ）；表2。

【0149】

【表 2】

表 2—マイクロRNAは腫瘍において異なって発現される

プローブ	成熟 miR	p 値 ¹	FDR ²	変化倍数	染色体位置
hsa-mir-21No1	miR-21	< 1e-07	< 1e-07	1.7	17q23.2
hsa-mir-021-prec-17No1	miR-21	< 1e-07	< 1e-07	1.8	17q23.2
hsa-mir-092-prec-13=092-1No2	miR-92	< 1e-07	< 1e-07	1.4	13q31.3
hsa-mir-222-precNo2	miR-222	1.40E-06	8.05E-05	1.2	Xp11.3
hsa-mir-181b-2No1	miR-181b	1.90E-06	8.74E-05	1.2	9q33.3
hsa-mir-210-prec	miR-210	1.12E-05	0.00032	1.2	11p15.5
hsa-mir-020-prec	miR-20a	2.53E-05	0.00057	1.5	13q31.3
hsa-mir-106-prec-X	miR-106a	3.30E-05	0.00058	1.4	X26.2
hsa-mir-106aNo1	miR-106a	3.51E-05	0.00058	1.4	X26.2
hsa-mir-093-prec-7.1=093-1	miR-93	3.52E-05	0.00058	1.2	7q22.1
hsa-mir-335No2	miR-335	3.55E-05	0.00058	1.2	7q32.2
hsa-mir-222-precNo1	miR-222	4.27E-05	0.00065	1.2	Xp11.3
hsa-mir-338No1	miR-338	5.78E-05	0.00074	1.1	17q25.3
hsa-mir-133bNo2	miR-133b	6.50E-05	0.00079	1.1	6p12.2
hsa-mir-092-prec-X=092-2	miR-92	7.95E-05	0.00083	1.4	Xq26.2
hsa-mir-346No1	miR-346	8.42E-05	0.00084	1.2	10q23.2
hsa-mir-106bNo1	miR-106b	0.0002091	0.00178	1.2	7q22.1
hsa-mir-135-2-prec	miR-153a	0.0002363	0.00194	1.1	12q23.1
hsa-mir-219-1No2	miR-219	0.0002515	0.00199	1.3	9q34.11
hsa-mir-34aNo1	miR-34a	0.000265	0.00203	1.1	1p36.22
hsa-mir-099b-prec-19No1	miR-99b	0.0003758	0.00259	1.1	19q13.41
hsa-mir-185-precNo2	miR-185	0.0003827	0.00259	1.2	22q11.21
hsa-mir-223-prec	miR-223	0.0004038	0.00265	1.4	Xq12
hsa-mir-211-precNo2	miR-211	0.0004338	0.00277	1.1	15q13.3
hsa-mir-135-1-prec	miR-135a	0.0004648	0.00287	1.1	3p21.1
hsa-mir-127-prec	miR-127	0.0004748	0.00287	1.1	14q32.31
hsa-mir-203-precNo1	miR-203	0.0004993	0.00294	1.4	14q32.33
hsa-mir-212-precNo1	miR-212	0.0006339	0.00364	1.1	17p13.3
hsa-mir-095-prec-4	miR-95	0.0006996	0.00392	1.2	4p16.1
hsa-mir-017-precNo2	miR-17-5p	0.0007252	0.00392	1.3	13q31.3

【 0 1 5 0 】

【表 3】

腫瘍中で減少して発現されるマイクロRNA

プローブ	成熟 miR	p 値 ¹	FDR ²	変化倍数	染色体位置
hsa-mir-342No2	miR-342	4.00E-06	0.00015	0.9	14q32.2
hsa-mir-192-2/3No1	miR-192	8.70E-06	0.00029	0.7	11q13.1
hsa-mir-1-2No2	miR-1	2.22E-05	0.00057	0.9	18q11.2
hsa-mir-34bNo2	miR-34b	4.78E-05	0.00069	0.8	11q23.1
hsa-mir-215-precNo1	miR-215	5.26E-05	0.00071	0.7	1q41
hsa-mir-192No1	miR-192	7.36E-05	0.00081	0.7	11q13.1
hsa-mir-301 No2	miR-301	7.44E-05	0.00081	0.7	17q23.2
hsa-miR-324-5pNo2	miR-324-5p	1.00E-04	0.00096	0.9	17p13.1
hsa-mir-030a-precNo2	miR-30a-3p	0.0001933	0.00171	0.9	6q13
hsa-mir-1-1 No2	miR-1	0.0002906	0.00216	0.9	20q13.33
hsa-mir-34cNo2	miR-34c	0.0007334	0.00392	0.9	11q23.1
hsa-mir-331 No2	miR-331	0.0008555	0.00446	0.9	12q22
hsa-mir-148bNo2	miR-148b	0.0008726	0.00446	0.9	12q13.13

¹報告されているP値は、84対の結腸腺癌及び非腫瘍性組織からのマイクロRNA発現パターンのペアクラス比較の結果である。²FDR=偽陽性率

【0151】

26のマイクロRNAがより高いレベルで腫瘍中に発現され、miR-21の富化は最も高いもので1.8倍であった。グローバルマイクロRNAプロファイルは、3近傍か又は近傍セントロイドクラス予測アルゴリズム(10-ホールドクロスバリデーション(fold cross validation)、反復100回)を使用し、腫瘍及び対をなす非腫瘍組織間を89%の正確度で区別し、発癌の間にマイクロRNA発現パターンの系統的变化を示唆している。

【0152】

我々は、腫瘍及び対となった非腫瘍組織間の発現差違と組み合わせられた悪い生存率へのそれらの関連性に基づき、検証のためにmiR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b及びmiR-203を選択した。検証のため、独立したコホートからの腫瘍及び対となった非腫瘍組織において、これらのマイクロRNAの発現レベルをqRT-PCRで測定した。検証コホートは、発症結腸癌を有する香港、中国から採用された113人の患者から成っている(表1)。

【0153】

miR-20a(2.3倍)、miR-21(2.8倍)、miR106a(2.4倍)、miR-181b(1.4倍)及びmiR-203(1.8倍)は腫瘍中でより高いレベルで全て発現された(p<0.001、ウィルコクソンマッチドペア検定)(表3a)。

【0154】

10

20

30

40

【表 4】

表 3 a - 香港検証コホート

			変化倍数	
マイクロ RNA	$\Delta \Delta Ct^1$	SD($\Delta \Delta Ct$)	腫瘍 ²	p 値 ³
miR-20a	1.18	0.97	2.3 倍	p<0.001
miR-21	1.47	1.20	2.8 倍	p<0.001
miR-106a	1.25	0.94	2.4 倍	p<0.001
miR-181b	0.47	1.03	1.4 倍	p<0.001
miR-203	0.83	1.40	1.8 倍	p<0.001

10

【0155】

【表 5】

表 3 b、腺腫 v s. 対の非腺腫組織におけるマイクロ RNA 発現

	平均		変化倍数	
マイクロ RNA	$\Delta \Delta Ct^1$	SD($\Delta \Delta Ct$)	腺腫 ²	p 値 ³
miR-20a	-0.11	0.97	0.9 倍	P=0.82
miR-21	0.64	0.90	1.6 倍	P=0.006
miR-106a	0.28	1.22	1.2 倍	P=0.19
miR-181b	0.30	1.24	1.2 倍	p=0.27
miR-203	0.77	1.98	1.7 倍	p=0.14

20

¹ qRT-PCRからの平均（腫瘍 ΔCt -対の非腫瘍 ΔCt ）又は平均（腺腫 ΔCt -対の非腺腫 ΔCt ）。² $2^{\Delta\Delta Ct}$ により計算された。³ ウィルコクソンマッチドペア検定。SD＝標準偏差。ボールド体の数字は統計的に有意である。腫瘍／非腫瘍比較について、miR-20a及びmiR-203では113対の組織を使用し、一方、miR-21、miR-106a、及びmiR-181bでは111対の組織を使用した。すべての腺腫／非腺腫について、18対の組織を使用した。

【0156】

ほとんどの腫瘍（miR-20aについて89%、miR-21について87%、miR-106aについて90%、miR-181bについて71%及びmiR-203について74%）は対となった非腫瘍組織よりも高発現のこれらのマイクロRNAを有していた。これら5つのマイクロRNAについての発現パターンは、3近傍又は近傍セントロイドアルゴリズムに基づく（10-ホールドクロスバリデーション、反復100回）、それぞれ96%又は98%の正確さで腫瘍に対して対となった非腫瘍組織を識別した。

30

【0157】

腫瘍及び隣接する非腫瘍組織におけるmiR-21発現を可視化するために、インサイチュハイブリダイゼーションを使用した（図1a～fを参照されたい）。

miR-21は、隣接する非腫瘍組織と比較し、ヒト腫瘍組織中の結腸上皮細胞の核及び細胞質の両方において高レベルで発現される。これらの結果は、qRT-PCR及びマイクロアレイデータと一致し、発癌におけるマイクロRNAの役割を支持している。

40

【0158】

miR-21は結腸腺腫中でより高いレベルで発現される

腺腫は、結腸腺癌の前駆体ステージを表す³。18対の腺腫及び隣接する非腺腫組織において、qRT-PCRによりmiR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b及びmiR-203発現レベルを試験した。5つのマイクロRNAの内の4つが腺腫組織において増加したレベルを示したが、miR-21のみが1.6倍より高く有意に富化された（p=0.006、ウィルコクソンマッチドペア検定）（表3b参照）。

【0159】

50

腺腫組織は、15 / 18 の対応対においてより高いレベルの *miR* - 21 を発現した。より進行したステージの腫瘍はより高いレベルの *miR* - 21 を発現する。対象は、腺腫の診断及び T N M 病期に基づいて分類し、腺腫が最も進行しておらず、及び T N M ステージ I V が最も進行していると考えられた。腺腫は、検証コホートからの腫瘍よりも低いレベルの *miR* - 21 しか発現しなかった ($p < 0.001$ 、マンホイットニー検定)。もり進行した腫瘍は、より高いレベルの *miR* - 21 を発現した (傾向分析、 $p < 0.001$) (図 I g 参照)。

【0160】

この傾向は、メリーランド試験コホートからのマイクロRNAマイクロアレイデータを使用しても観察された ($p = 0.04$) (図2参照)。

10

【0161】

高 *miR* - 21 発現は2つの独立したコホートにおいて予後不良を予測する

個々のマイクロRNA腫瘍 / 非腫瘍 (T / N) 発現比を分析し、いずれが予後不良と関係があるかどうかを決定した。T / N マイクロRNA発現比は、最高三分位値に基づいて高いと分類した。高 T I N 比が癌生存率と関係していた ($p < 0.05$) いずれのマイクロRNAも探索した。これらから、腫瘍中で異なって発現されていた ($p < 0.001$) マイクロRNAを選択した。

【0162】

5つのマイクロRNAがこれらの基準を満足した。カプラン・マイヤー分析は、*miR* - 20a ($p = 0.02$)、*miR* - 21 ($p = 0.004$)、*miR* - 106a ($p = 0.01$)、*miR* - 181b ($p = 0.04$) 及び *miR* - 203 ($p = 0.004$) についての高 T / N 比は各々悪い生存率と関連していた。これら5つのマイクロRNAをさらなる分析のために選択した。

20

【0163】

この研究の対象の89 ~ 93 %からの結腸腺癌は典型的組織構造を有していた。少数の腫瘍は、粘液腺癌、腺扁平上皮癌、又は印環細胞癌組織構造であった (表1参照)。腺癌の異なったサブタイプは、生存予後を含む異なった臨床結果と関連し得る³¹。組織構造と関連する交絡 (confounding) の可能性を除去するため、粘液腺癌、腺扁平上皮癌及び印環細胞癌を有するすべての対象を初期分析から除外した。

【0164】

T / N 比と悪い生存率の関連性は、腫瘍組織、取り囲んでいる非腫瘍組織、又は両方の組み合わせにおけるマイクロRNA発現が原因かもしれない。これらの可能性を区別するため、腫瘍及び対となった非腫瘍におけるマイクロRNA発現の関連を別々に分析した。*miR* - 20a、*miR* - 21、*miR* 108a、*miR* - 181b 及び *miR* - 203 についての腫瘍中の高現レベル (最高三分位値に基づいて) は、メリーランド試験コホートにおける悪い生存率と各々関連していた (図3a参照、示されていないデータからも)。該5つのマイクロRNAのいずれについても、非腫瘍組織においてマイクロRNA発現と有意な関連は観察されなかった。

30

【0165】

一変量及び多変量 C o x 比例ハザード分析を使用し、腫瘍発現レベルと典型的腺癌を有する個体における予後との関連性を評価した (表4a)。

40

【0166】

【表 6】

表 4－結腸腺癌¹を有する対象におけるmiR-21発現レベル及び全癌生存率の一変量及び多変量Cox回帰分析

表 4a		メーランド ² 試験コホート		
特性	一変量分析		多変量分析 ²	
	HR (95%CI)	p 値	HR (95%CI)	p 値
miR-21 発現 ³ N=71				
低	1.0		1.0	
高	2.5 (1.2-5.2)	0.01	2.9 (1.4-6.1)	0.004
TNM ステージ ⁴				
I-II	1.0		1.0	
III-IV	3.5 (1.6-7.9)	0.002	3.4 (1.5-7.8)	0.004
登録時年齢				
<50	1.0			
≥50	0.7 (0.2-2.3)	0.52		
性				
女性	1.0			
男性	1.4 (0.5-3.9)	0.57		
人種				
白人	1.0			
黒人	1.0 (0.5-2.1)	0.97		
腫瘍位置				
遠位	1.0			
近位	0.6 (0.3-1.4)	0.26		

10

20

【0167】

30

【表 7】

表 4 b	香港検証コホート			
	一変量分析		多変量分析 ²	
特性	HR (95%CI)	p 値	HR (95%CI)	p 値
miR-21 発現 ³ N=103				
低	1.0		1.0	
高	2.4(1.4-3.9)	0.002	2.4(1.4-4.1)	0.002
TNM ステージ			1.0	
I-II	1.0			
III-IV	4.7(2.4-9.5)	0.001	4.7(2.4-9.5)	<0.001
登録時年齢				
<50	1.0			
≥50	1.5(0.9-2.6)	0.14		
性				
女性	1.0			
男性	1.4(0.8-2.3)	0.29		
腫瘍位置				
遠位	1.0			
近位	0.7(0.3-1.4)	0.27		

マイクロRNA発現は、メリーランドコホートについてmiRNAマイクロアレイで、及び香港コホートについてはqRT-PCRで測定した。¹粘液腺癌、腺扁平上皮癌又は印環細胞癌を有する場合はこの分析から除外した。²多変量分析は、一変量モデルにおいて生存率と関連する ($p < 0.10$) ことが観察された臨床共変量の段階的追加及び除去を使用し、最終モデルは生存率と有意に関連する共変量のみが含まれる (ワルド統計 $p < 0.05$)。³全miRNAについての腫瘍中の高発現は、最高三分位値に基づいて定義された。

【0168】

高レベルのmiR-21を発現している腫瘍を有する個体は、一変量 ($HR = 2.5 [1.2 - 5.2]$ 、 $p = 0.01$) 及び多変量 ($HR = 2.9 [1.4 - 6.1]$ 、 $p = 0.004$) 分析の両方において有意により高い結腸癌からの死のリスクがあった。

【0169】

これらの発見を検証するため、qRT-PCRを使用し、香港検証コホートにおけるこれら5つのマイクロRNAについての腫瘍及び非腫瘍発現レベルを測定して予後との関連性を分析した。高miR-21腫瘍発現は、香港検証コホートにおいて予後不良を予測し ($p = 0.001$ 、カプラン・マイヤーログランク検定)、一方、非腫瘍組織では予測できなかった (図3b参照)。

【0170】

このコホートにおいて、予後とmiR-20a、miR-106a、181b又はmiR-203の発現では、統計的に有意な関連性を発見できなかった。

香港検証コホートにおいて、腫瘍中の高miR-21発現は、年齢、性、腫瘍組織構造、又は腫瘍位置とは有意に関連していなかった (フィッシャーの正確確率検定)。すべての共変量は、Cox比例ハザード分析により試験した (表4b)。

【0171】

腫瘍における高miR-21発現 ($HR = 2.4 [1.4 - 3.9]$ 、 $p = 0.002$) 及びTNM病期 ($HR = 4 \sim 7 [2.4 - 9.5]$ 、 $p = 0.001$) は、一変量モデルにおいて生存率と有意に関連していた。多変量Cox回帰分析は、腫瘍における高miR-21発現が他の臨床的共変量とは独立して悪い生存率予後を予測し ($HR = 2.4 [1$

． 4 - 4 . 1]、 $p = 0 . 0 0 2$)、メリーランド試験コホートにおける我々の発見と一致した。

【 0 1 7 2 】

腫瘍組織構造にかかわらず、すべての対象を含んだ分析を繰り返した。両方のコホートにおいて、高 $miR-21$ 発現と予後との関連が残っていた (図 4 参照、表 5 参照)。

【 0 1 7 3 】

【 表 8 】

表 5 — 全対象での対象における $miR-21$ 発現レベル及び全癌生存率の一変量及び多変量 Cox 回帰分析

表 5a	メリーランド試験コホート			
	一変量分析		多変量分析 ²	
特性	HR (95%CI)	p 値	HR (95%CI)	p 値
$miR-21$ 発現 ³ N=79				
低	1.0		1.0	
高	2.0 (1.1-4.0)	0.04	2.1 (1.1-4.0)	0.03
TNM ステージ ⁴				
I-II	1.0		1.0	
III-IV	3.2 (1.5-6.9)	0.002	3.2 (1.5-6.8)	0.003
登録時年齢				
<50	1.0			
≥50	0.7 (0.2-2.4)	0.59		
性				
女性	1.0			
男性	1.6 (0.7-4.2)	0.33		
黒人	1.0 (0.5-2.0)	0.99		
腫瘍位置				
遠位	1.0			
近位	0.8 (0.3-2.1)	0.65		
組織学				
腺癌	1.0			
粘液性又は 腺扁平上皮	0.7 (0.3-2.1)	0.57		

【 0 1 7 4 】

【表 9】

表 5b	香港検証コホート			
	一変量分析		多変量分析 ²	
特性	HR (95%CI)	p 値	HR (95%CI)	p 値
miR-21 発現 ³ n=111				
低	1.0		1.0	
高	2.3(1.4-3.9)	0.02	2.3(1.4-3.9)	0.002
TNM ステージ				
I-II	1.0		1.0	
III-IV	4.9(2.5-97)	<0.001	4.9(2.5-98)	0.001
登録時年齢				
<50	1.0			
≥50	1.4(0.8-2.4)	0.20		
性				
女性	1.0			
男性	1.3(0.8-2.3)	0.27		
腫瘍位置				
遠位	1.0			
近位	0.7(0.3-1.4)	0.27		
組織学				
腺癌	1.0			
粘液性又は 腺扁平上皮	1.2(0.4-3.3)	0.74		

マイクロRNA発現は、メリーランドコホートについてmiRNAマイクロアレイで、及び香港コホートについてはqRT-PCRで測定した。¹腫瘍組織構造にかかわらずすべての個体がこの分析に含まれている。²多変量分析は、一変量モデルにおいて生存率と関連する ($p < 0.10$) ことが観察された臨床共変量の段階的追加及び除去を使用し、最終モデルは生存率と有意に関連する共変量のみが含まれる (ワルド統計 $p < 0.05$)。³全miRNAについての腫瘍中の高発現は、最高三分位値に基づいて定義された。

【0175】

MiR-21 発現レベル及び療法への応答

アジュバント化学療法への応答に関連するバイオマーカーを同定することは、医師が療法の利点をより良く予測することを可能にする。この目的のため、ステージII及びIII癌患者におけるmiR-21発現とアジュバント化学療法への応答の関連性を分析した。アジュバント化学療法の投与についての情報は、メリーランド試験コホートにおける65人のステージII又はIII対象の内の47人及び香港検証コホートにおける全対象について利用可能であった。

【0176】

両方のコホートにおいて、化学療法投与計画は、主としてフルオロウラシルに基づいており (静脈内5-フルオロウラシルか又はウラシルと共にテガフルを含んでいる経口薬剤 [UFT] の形態で)、レバミゾール又はロイコボリンは含まれているか又は含まれていない。典型的腺癌組織構造を有する対象のみをこの分析では使用し、メリーランドコホートで化学療法を受けた42人のステージII/III個体の内の20人を残した。化学療法を受けたこれらについて、腫瘍中の高miR-21発現は、一層悪い全生存を予測し ($p = 0.01$ 、カプラン・マイヤーログランク検定)、高miR-21がアジュバント化学療法への応答不良に関連するという予備的支持を与えている。

【0177】

香港検証コホートについて、典型的腺癌組織構造を有するステージII/III癌の77個体をこの分析に使用した。アジュバント化学療法を受けたステージII/III対象は、受けなかったものよりも良好な生存予後を有していた ($p = 0.02$ 、カプラン・マイヤーログランク検定)。アジュバント化学療法を受けたこれらの対象間では ($n = 36$)、腫瘍中の高miR-21発現は治療に対する応答不良と関連しており ($p = 0.03$ 、カプラン・マイヤーログランク検定)、メリーランドコホートにおいての観察と一致した (図5a参照)。

【0178】

このコホートにおいて、アジュバント化学療法を受けたすべてのステージII対象 ($n = 11$) が生存したが (図5b参照)、アジュバント化学療法を受けたすべてのステージIII対象 ($n = 25$) については、高miR-21発現は悪い生存率と関連していた ($p = 0.02$ 、カプラン・マイヤーログランク検定) (図5c参照)。

【0179】

これらの観察を分析するために多変量Cox回帰分析が使用され、高miR-21発現が予後不良を予測し ($HR = 3.1 [1.5 - 6.1]$; $p = 0.001$)、及び化学療法を受けることは、他の臨床共変量とは独立して改善された生存における転帰survival outcome)を予測する ($HR = 0.3 [0.1 - 0.5]$; $p = 0.001$) ことが示された (表6a)。

【0180】

【表10】

表6—miR-21発現の一変量及び多変量Cox回帰分析、アジュバント化学療法の受け取り及び腺癌を有するステージI/III¹対象における癌生存率

表6a	メリーランド試験コホート			
	一変量分析		多変量分析 ²	
特性	HR(95%CI)	p値	HR(95%CI)	p値
miR-21発現 ³ N=77				
低	1.0		1.0	
高	2.6(1.3-5.1)	0.005	3.1(1.5-6.1)	0.001
アジュバント ⁴ 化学療法なし	1.0		1.0	
受	0.4(0.2-0.8)	0.01	0.3(0.1-0.5)	<0.001
TNMステージ				
II	1.0		1.0	
III	2.8(1.3-6.0)	0.008	5.4(2.4-12)	<0.001
腫瘍位置				
遠位	1.0		1.0	
近位	0.3(0.1-1.0)	0.04	0.2(0.1-0.8)	0.02
登録時年齢				
<50	1.0			
≥50	1.6(0.8-3.1)	0.20		
性				
女性	1.0			
男性	1.2(0.6-2.3)	0.61		

【0181】

【表 1 1】

表 6b	香港検証コホート			
	一変量分析		多変量分析 ²	
特性	HR (95%CI)	p 値	HR (95%CI)	p 値
miR-21 発現 ³ N=119				
低	1.0		1.0	
高	2.6 (1.3-4.5)	0.001	3.0 (1.7-5.4)	<0.001
アジュバント化学療法なし	1.0		1.0	
受	0.7 (0.4-1.2)	0.21	0.4 (0.2-0.8)	0.004
TNM ステージ				
II	1.0		1.0	
III	3.2 (1.7-6.1)	0.001	5.2 (2.6-11)	<0.001
腫瘍位置				
遠位	1.0		1.0	
近位	0.4 (0.2-0.8)	0.02	0.3 (0.1-0.7)	0.007
登録時年齢				
<50	1.0			
≥50	1.4 (0.7-2.5)	0.32		
性				
女性	1.0			
男性	1.3 (0.7-2.2)	0.44		

miRNAの発現はqRT-PCRで測定した。¹典型的腺癌組織構造を有するTNMステージII / III 対象がこの分析に含まれていた。²多変量分析は、一変量モデルにおいて生存率と関連する ($p < 0.10$) ことが観察された臨床共変量の段階的追加及び除去を使用し、最終モデルは生存率と有意に関連する共変量のみが含まれる。³全miRNAについての腫瘍中の高発現は、最高三分位値に基づいて定義された。人種は予後不良と関連しなかった。

【0182】

癌死の代わりにエンドポイントとして癌再発を使用する分析は、腫瘍中の高miR-21発現が、より速い疾患再発を予測するという類似の関連性を生じた(データは示されていない)。

【0183】

両方のコホートを結合した分析は類似の関連性を生じた。カプラン・マイヤー分析は、高miR-21発現がステージII ($p = 0.02$) 又はステージIII ($p = 0.004$) 対象における予後不良を予測することを実証した(図6参照)。

【0184】

高miR-21発現は、ステージII / III 対象 ($p = 0.003$) 又はステージII 対象単独 ($p = 0.007$) において化学療法に対する応答不良を予測した。多変量Cox回帰分析は、高miR-21発現は予後不良を予測し ($HR = 3.0 [1.7 - 5.4]$; $p < 0.001$)、及びアジュバント化学療法での治療が他の臨床共変量とは独立して改善された生存を予測する ($HR = 0.4 [0.2 - 0.8]$; $p = 0.004$) ことを実証した(表6b)。

【0185】

議論

2つの独立したコホートを使用し、結腸癌組織中のマイクロRNAプロファイルを分析した。マイクロRNAマイクロアレイ分析によると、37のマイクロRNAが腫瘍組織中

では異なって発現された。5つすべての試験されたマイクロRNAの発現パターンを香港コホートにおいて検証した。腫瘍及び非腫瘍組織間を区別する5マイクロRNAの識別力は、発癌の間にマイクロRNA発現パターンの予測可能な及び系統的变化が起こり、散発性結腸腺癌の大多数を代表するようであることを示している。

【0186】

miR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b及びmiR-203はすべて結腸腫瘍中でより高いレベルで発現されていることが観察された。マイクロRNA発現パターンにおけるこれらの変化は、結腸癌又は癌の組織学的進行の原因と単に関連することができる。マイクロRNA発現パターンにおける変化が腫瘍形成を促進するという強い証拠がある(特にmiR-20a及びmiR-21について)。miR-20aはmiR-17-92ポリシストロニックマイクロRNAクラスターの一部である³²。

10

【0187】

このクラスターの過剰発現は、インビトロで細胞増殖を増強し³³、動物モデルにおいて腫瘍形成を促進する¹⁶。miR-17-92クラスターの強制された発現は、抗血管新生Tsp1タンパク質を負に調節することにより、マウスにおいて増加した腫瘍サイズ及び血管形成を引き起こす²⁴。実験的証拠は、増加したmiR-21発現は腫瘍発育を促進することも示唆している。miR-21は、ほとんどの固形腫瘍中で高レベルで発現される^{19, 34}。miR-21の過剰発現は、ヒト神経膠芽腫細胞において抗アポトーシス因子として作用する¹³。miR-21の抑制は、インビトロで細胞増殖を抑制し、抗アポトーシス因子Bcl-2³⁵の間接下方調節を介して異種移植片マウスモデルにおける腫瘍増殖を抑制する³⁵。ヒト細胞株での研究は、miR-21が腫瘍抑制遺伝子PTEN³⁶及びTPM1³⁷も標的とし得ることを示した。これらのデータを一緒にすると、発癌の間に改変されたRNA発現の因果的役割が支持される。

20

【0188】

腺腫は腺癌の前駆体ステージを表す。腺腫は高レベルのmiR-21を発現する。もし、増加したmiR-21発現が結腸腫瘍進行を促進するならば、腺腫における増加した発現は、癌への進行における早期の細胞事象であることができる。miR-21活性を抑制することは、家族性腺腫様ポリープ症³⁸を有する個体のような、結腸癌について高いリスクの集団において腫瘍促進を予防することの助けとなることができる。

30

【0189】

従って、マイクロRNA発現パターンと、結腸癌予後及びアジュバント化学療法に対する応答との関連を実証する証拠が本明細書に提示される。より進行した腫瘍は、より高いレベルのmiR-21を発現する。腫瘍中の高miR-21発現と悪い生存率との強い関連性が、メリーランド試験コホート及び香港検証コホートで別々に観察された。

【0190】

各コホートにおいて、これらの関連性は、他のすべての臨床共変量とは独立しており、miR-21発現は有用な予後指標であることができることを示しており、TNM病期及び他の臨床的指標に加えて、最終的な癌のより高いリスクにある患者を同定する助けとなる。これらの観察は、非常に異なる人種及び地理的構成を有する2つの独立したコホートでなされた。それ故、我々の観察は他の集団に広く応用可能と思われる。

40

【0191】

腫瘍中の高miR-21発現は、両方のコホートにおいて、アジュバント化学療法に対する応答不良と関連していた。これらの結果は、miR-21発現状態が既知である個体における療法の利点を予測する助けとなり得る。加えて、もし高miR-21発現が、結腸癌患者の悪い生存率の原因であるならば、miR-21を標的とするantagomir^{29, 39}又は他のアンチセンス療法剤は、高miR-21発現腫瘍を有する対象において療法的利点を有し得る。これらは生存における転帰を改善する現行療法に加えて使用することができる。

【0192】

50

本発明者はここに、結腸腫瘍及び対となる非腫瘍組織間の、マイクロRNA発現パターンの系統的差違を発見した。腫瘍中の高miR-21発現は、病期及び他の臨床的共変量とは独立して、悪い生存における転帰及びアジュバント化学療法に対する応答不良を予測し、結腸腺癌及び療法への応答を含む生存予後のための有用な診断バイオマーカーであることができることを示唆している。

【0193】

方法

組織採取及びRNA単離：

原発性結腸腫瘍及び隣接する非腫瘍組織の対は、1993年から2002年の間に、University of Maryland Medical Center で採用された84人の患者、及び1991年から2000年の間に、香港のQueen Mary Hospital で採用された113人の患者である。年齢、性、臨床病期、腫瘍位置、診断からの生存時間及びアジュバント化学療法の受け取りを含む各組織ドナーについての詳細な背景を集めた。腫瘍組織構造は、World Health Organization Classification of Tumor System¹に従って分類した。腺腫組織はCooperative Human Tissue Network から得た。この研究は、Institutional Review Board of the National Institutes of Health、Institutional Review Board of the University of Hong Kong/Hospital Authority Hong Kong West Cluster 及びInstitutional Review Board for Human Subject Research at the University of Maryland により承認された。

10

【0194】

RNA単離及びマイクロRNAプロファイリング：

RNAは標準TRIzol (Invitrogen, Carlsbad) 法を使用し、組織から抽出した。マイクロRNAマイクロアレイプロファイリングは、以前に記載されているように実行した³⁰。簡単には、51agの全RNAを標識し、およそ400ヒトマイクロRNAプローブの四つ組を含有する各各マイクロRNAマイクロアレイにハイブリダイズさせた。スライドはPerkinElmer ScanArray LX5Kスキャナーを使用してスキャンした。マイクロRNAのqRT-PCRは、Taqman MicroRNAアッセイ (Applied Biosystems, Foster City) を使用し、製造元の説明書に従い、7500リアルタイムRT-PCRシステム (Applied Biosystems, Foster City) で実施した。全qRT-PCR実験において、U6Bが規格化対照であった。全アッセイは、二重 (miR-20a、miR-203) 又は三重 (miR-21、miR-106a、miR-181b) に行った。miR-21、miR-106a及びmiR-181bについてのqRT-PCRは、その時点で生存における転帰及び検証コホートのメンバーについての臨床データを教えられていないAJSにより実施した。

20

30

【0195】

マイクロアレイ分析：

この出願で議論されたデータはNCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) にすでに寄託されており、GEO Series accession number GSE7828を介して利用できる。LOESS規格化マイクロアレイデータは、BRBアレイツール3.5.0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) 内に移入されており、すべての続いてのマイクロアレイ分析はこのソフトウェアで実施した。

40

【0196】

マイクロアレイ分析を実施した。アレイの>20%が失われている値を有するプローブは本分析から除去され、230のプローブが残った。ペア、クラス比較分析は、腫瘍中で異なって発現されたマイクロRNAを同定した ($p < 0.001$)。

【0197】

悪い生存率に関連するマイクロRNAについての探索を開始するため、マイクロアレイデータを使用し、メリーランドコホート中で、腫瘍/非腫瘍 (T/N) マイクロRNA発現比を分析した。マイクロRNAについてのTN発現比は、 $\log_2$ 腫瘍発現値から $\log_2$ 非腫瘍を差し引くことにより作製される。>25%のT/N比が失われているマイクロRNAをフィルター除去し、208が残った。T/N発現比を2つに分け、最高三分位

50

値は高と分類されより低い2つは低と分類された(追加の方法参照)。この高/低カットオフはこの研究を通して普遍的に使用された。腫瘍及び非腫瘍マイクロRNA発現レベルは、生存率との関連についての全ての分析のため、マイクロアレイ実験の日付に基づいてバッチ規格化された。

【0198】

インサイチュハイブリダイゼーション:

インサイチュハイブリダイゼーション(IISH)は、ヒトmiR-21、スクランブル及びU6(Exiqon、Woburn)に対するプローブを用い、ヒト結腸組織に対してW. Kloosterman(<http://www.exiqon.com/uploads/LNA-52-FFPE-miRNA-in-situ-protocol.pdf>)により記述されたホルマリン-固定パラフィン-包埋(FFPE)組織のための製造元によるプロトコルに修正を加えて実施した。修正には、ポリクローナルウサギ抗DIG/HRP結合抗体及びDakoCytomation GenPoint Tyramid Signal Amplification System(DakoCytomation、Carpinteria)、及びVECTOR[®] NovaRed(商標)基質(Vector Laboratories、Burlingame)の使用が含まれる。イメージはOlympus DP70デジタルカメラ及びDP制御ソフトウェア(Olympus、Champaign)を使用するOlympus BX40顕微鏡で撮影した。

【0199】

統計分析:

統計分析を実施した。ウィルコクソンマッチドペア試験を使用し、すべての全qRT-PCRデータについての、腫瘍及び対となる非腫瘍組織間のマイクロRNA発現の相違、ならびに腺腫及び対となる非腺腫組織間の相違を分析した。報告されているすべての傾向分析は、順序群にわたる傾向に対するノンパラメトリック検定である。すべてのカプラン・マイヤー分析は、WINSTAT 2001(R. Fitch Software)を使用して実施した。多変量Cox回帰分析はIntercooled Stata 9.2(StataCorp LP、College Station)を使用して実施した。最終多変量モデルは、一変量モデルにおいて悪い生存率と関連する($p < 0.10$)ことが観察された臨床共変量の段階的追加及び除去に基づいていた。 $p < 0.05$ のワルド統計を、最終多変量モデルにおける包含の基準として使用した。すべてのp値は両側である。ハザード比は括弧内の95%信頼区間で報告されている。発現グラフは、Graphpad Prism 4.0(Graphpad Software Inc.、San Diego)を使用して作製した。

【0200】

追加のマイクロアレイ分析

この分析に使用されたマイクロアレイは、ピン-スポッテッド(pin-spotted)マイクロRNAマイクロアレイ(Ohio State University Comprehensive Cancer Center、version 2.0から)であった。各スポットの強度はフォアグラウンドの中央値強度であった。この研究に使用された170マイクロアレイの各々は、11520スポットを含んでいた。フォアグラウンド強度がバックグラウンドより低い場合、すべてのスポットはNAと再び割り当てられた(NAは失われたデータスポットの印となる)。スキャナーにより欠損していると警告されたすべてのスポットもNAと再び割り当てられた。高いフォアグラウンド強度を有するすべてのブランク(オリゴなし)スポットはNAと再び割り当てられた。各マイクロRNAオリゴは、2つの隣接するスポットの2つの離れた対として、これらアレイ上の四元のスポットにより表される。もしオリゴ四元について0又は1NAがあり、及び離れたオリゴ対の平均値が $\log_2$ スケールで > 1 異なっていれば、該四元のスポットのすべてがNAと再び割り当てられた。もし、四元について3NAスポットがあれば、最終スポットはNAと再び割り当てられた。総計で、1,958,400スポットの1,082,689がこれらの方法を使用してNAと再び割り当てられた。LOESS(Locally Weighted Scatterplot Smoothing)規格化は、Rソフトウェアパッケージを使用して実施した。すべてのデータを分析のためにBRBアレイツールバージョン3.5.0に移入し、すべての反復スポットを平均した。使用したアレイには本来85対(腫瘍及び対となる非腫瘍組織)があった。本来偶発結腸癌患者と同定された1つのケースが、後に原位置癌腫と診断されていたことが判明したため、分析から除かれ、84対象の研究集団が残った。マイクロRNAリストをフィルターにかけ、389ヒトhsa-miRプローブ

セットのみが含まれるようにした。これらをさらにフィルターにかけ、アレイの25%より多くが失われているプローブセットを除去し、230ヒトマイクロRNAプローブセットを残した。ペアードクラス比較分析を使用し、腫瘍及び対となる非腫瘍組織間で異なって発現されているマイクロRNAを同定した。2つのマイクロRNA (miR-181b 及び miR-338) に対しては、2つの独立したプローブで測定すると各々反対の結果を与え、各々のマイクロRNAについて1つのプローブは腫瘍中でより高い発現を示し、1つのプローブは腫瘍中でより低い発現を示した。各々に対して、より有意ではない結果を廃棄し、miR-181b 及び miR-338 両方が腫瘍において富化されたとした。加えて、qRT-PCRで、miR-181b が腫瘍において富化されていることを確認した。

10

【0201】

我々は最初に各マイクロRNAについての腫瘍/非腫瘍 (T/N) 発現プロファイルを使用し、悪い生存率と関連するマイクロRNAを探索した。この分析のため、すべての発現データを普遍的な高/低カットオフで2分することを決定し、悪い生存率との関連性を捜した。どのような普遍的な高/低カットオフを使用すべきかを決定するため、T/N 発現データを3つの別々の方法で2分し、どの方法が試験コホートにおいて最大の有意な結果を与えるかを決定した。高発現を中央値、最高三分位値又は最高四分位値より高いかに基づいて分類し、一変量Cox回帰分析を使用し、これらのカットオフと悪い生存率との関連を試験した。腫瘍中で異なって発現された37のマイクロRNAの内、中央値より高いに基づく4の高発現が、最高三分位値に基づく5が、及び最高四分位値に基づく2が悪い生存率と関連していた ($p < 0.05$ 、データは示されていない)。最高三分位値に基づいた2分化が、メリーランド試験コホートにおいてこれらの基準に基づいて悪い生存率と関連する最も多いマイクロRNAを与えた；それ故、メリーランド試験コホート及び香港検証コホート両方における、マイクロRNA発現レベル及び予後不良間の関係进行分析するため、この研究を通して最高三分位値に基づいた分類を普遍的に使用した。

20

【0202】

マイクロRNAマイクロアレイを使用し、腫瘍中のmiR-21発現レベルと予後と比較した。この分析に使用したマイクロアレイプローブは、hsa-miR-21-precl7N01であった。この分析はマイクロアレイ実験の日付に基づいたデータのバッチ規格化を要求する。日付により規格化するため、所与のマイクロRNAの最高1/3を発現するアレイを、別々に各日について高いと分類した。いずれの所与の日でも、組織の12対までプロファイルした。10対未満のマイクロアレイが実施されたいずれの日についても、これらの日に実施されたアレイは廃棄され、5つのアレイの損失を生じた。これらのデータは次ぎに、生存における転帰との関連の分析のため結合させた。我々はチェックし、そしてマイクロアレイ実験の日付に基づいて分類した群間で、年齢、性、人種、腫瘍部位、TNMステージ又は癌生存率の頻度分布には有意な相関がないことを見出した (フィッシャーの正確確率検定)。

30

【0203】

統計分析

Cox比例ハザード回帰を使用し、患者生存率に対するmiR-21発現レベル及び他の臨床変数の影響を分析した。臨床変数に含まれるのは、年齢、性、人種、腫瘍部位、腫瘍組織学、アジュバント療法の受け取り及びTNM病期である。これらのモデルに対し、結腸癌について推奨されるスクリーニング年齢が50歳であるので、年齢 >50 対年齢 <50 の2分化年齢を選択し；腫瘍部位は、もし腫瘍が脾湾曲部内又は近位に位置していれば近位と、もし腫瘍が下行結腸内又は遠位に位置していれば遠位と定義し；TNM病期は転移性対非転移性疾患に基づいて2分化し、ステージI-II対III-IVを結果として生じた。メリーランドコホートの1人の患者は手術当日に死亡し、0ヶ月の生存期間を生じた。この場合はカプラン・マイヤー分析には含まれたが、図2の腫瘍中のmiR-21発現間のケースに相違を生じるCox回帰分析 ($n = 72$) 及び表4のCox回帰分析のケースの数 ($n = 71$) については除かれた。一変量Cox回帰が各臨床共変量におい

40

50

て実施され、各患者生存に対する影響を試験した。最終多変量モデルは、一変量モデルにおいて悪い生存率と関連する ($p < 0.10$) ことが観察された臨床共変量の段階的追加及び除去に基づいていた。 $p < 0.05$ のワルド統計を、最終多変量モデルにおける包含の基準として使用した。最終多変量モデルのため、最も簡潔な Cox 回帰モデルを使用した。

【0204】

実施例 2 - 初期結果

miRNA は結腸腫瘍中で異なって発現される

miRNA マイクロアレイを使用し、85 対の癌性及び隣接する非癌性結腸組織の miRNA プロファイル进行分析した。腫瘍の miRNA 発現プロファイルは正常組織とは全く異なっていたことが発見され、miRNA が結腸発癌に重要な役割を果たすことができることを示唆している。ペアードクラス比較分析は、これらの腫瘍中で異なって発現された 27 の独立した miRNA を同定した (表 7)。

10

【0205】

表 7 - 対となる正常組織と比較し、27 の miRNA が結腸腫瘍中で異なって発現された。BRB アレイツール 3.4 でのペアードクラス比較を使用し、27 の miRNA が腫瘍中で異なって発現されることが発見された。 $p < 0.001$ の有意値を異なって発現された基準として使用し、それは 0.08 % の推定偽陽性率を生じた。上方は、腫瘍中でより高いレベルで発現された miRNA を示しており、一方、下方は、miRNA レベルが腫瘍中でより低かったことを示している。

20

【0206】

【表 1 2】

表 7	マイクロ RNA	上方/下方調節	p 値
1	miR-331	下方	1.00E-07
2	miR-21	上方	1.00E-07
3	miR-34b	下方	2.00E-07
4	miR-342	下方	2.00E-07
5	miR-215	下方	2.20E-05
6	miR-371	下方	7.00E-07
7	miR-373	下方	6.30E-06
8	miR-192	下方	7.70E-06
9	miR-148b	下方	1.03E-05
10	miR-138	下方	1.49E-05
11	miR-301	下方	1.85E-05
12	miR-338	下方	2.63E-05
13	miR-153	下方	2.67E-05
14	miR-129	下方	3.20E-05
15	miR-222	上方	9.08E-05
16	miR-346	上方	0.000126
17	miR-204	上方	0.000244
18	miR-181b	上方	0.000263
19	let-7a-2	下方	0.000272
20	miR-106a	上方	0.000305
21	miR-093	上方	0.000334
22	miR-34c	下方	0.000341
23	miR-219	上方	0.000352
24	miR-019b	上方	0.000364
25	miR-210	上方	0.000389
26	miR-185	上方	0.000516
27	miR-1	下方	0.00064

【0207】

偽陽性率（多重比較検定を説明する）はおおよそ 0.8% であり、これらほとんどの（全部ではないにせよ）miRNA が異なって発現されており、多重比較検定の結果ではないことを示している。11 の miRNA が腫瘍中で上昇した発現レベルを有していることが観察され、一方、16 の miRNA が腫瘍中で減少有していることが観察された。加えて、miRNA プロファイルは、組織が腫瘍又は非腫瘍であったかを 92% の正確度で予測するために使用できた。2000 のランダム順列に基づくと、偶然により生じるこれらの予測の確率は極めて低かった（ $p < 0.0005$ ）。これらの結果は、腫瘍及び正常組織間の miRNA 発現プロファイルに系統的な相違があり、miRNA 発現プロファイルが結腸発癌の間に変わってくることを示している。

【0208】

グローバル miRNA 発現プロファイルは結腸癌生存予後を予測する

miRNA 発現プロファイルが患者生存を予測するかどうかを決定した。この分析のため、各個体の各 miRNA について、腫瘍対正常 miRNA 発現比（TIN 比）を計算した。すべての miRNA TIN 比の非介在的（Unsupervised）階層的クラスタリングは、任意に名付けたグループ A 及びグループ B の 2 つのグループに個体をグループ化した（

図 7)。

【 0 2 0 9 】

これら 2 つのグループは、臨床病期 ($p = 0.009$; 図 I b) 及び生存予後 ($p = 0.026$; 図 7 c) の両方が有意に異なっている。

このことは、グローバル miRNA プロファイルは臨床病期を、及びより重要なことには、生存予後を予測することを示している。

【 0 2 1 0 】

一変量及び多変量 Cox 回帰分析を使用して、この関係をさらに詳細に調べた (表 8)

一変量 (上) 及び多変量 (下) Cox 回帰分析が行われ、miRNA グループ B に分類された個体が結腸癌で死亡するより高リスクあることが示された。年齢、性又は人種のどれも生存リスクには寄与していなかった。これらの分析の目的のため、年齢は 50 以上及び未満に 2 分化し、人種をアフリカ系アメリカ人 (AA) 及び白人に 2 分化した。

【 0 2 1 1 】

【 表 1 3 】

表 8 グローバル miRNA プロファイルの Cox 回帰分析

一変量分析		
変数	HR (95%CI)	P 値
クラスター B/A	2.6 (1.0-6.3)	0.042
年齢 ≥ 50 / 年齢 < 50	0.62 (0.14-2.7)	0.53
男性/女性	1.4 (0.48-4.0)	0.54
AA/白人	1.1 (0.83-2.3)	0.83
多変量、年齢、性及び人種を調整		
クラスター B/A	2.7 (1.1-6.8)	0.034
年齢 ≥ 50 / 年齢 < 50	0.49 (0.11-2.2)	0.35
男性/女性	1.5 (0.52-4.4)	0.45
AA/白人	1.0 (0.45-2.2)	0.99

【 0 2 1 2 】

グループ B 個体は、結腸癌で死亡する有意により高いリスクを有していた (ハザード比 [HR] = 2.6 ; $p = 0.04$)。このリスクは、年齢、民族性及び性で調整後も有意に高く残っていた (HR = 2.7 ; $p = 0.03$)。これらの結果は、予後を予測するため、結腸腫瘍の miRNA プロファイルを使用できる可能性を示している。これらの結果は、miRNA が結腸発癌に役割を果たすことができることも示唆する。

【 0 2 1 3 】

miR - 21、miR - 106a、miR - 181b、miR - 16h、miR - 203、lct - 7tg、miR - 29a、miR - 103 - 2 及び miR - 10a のプロファイルは結腸癌予後を予測する

その発現レベルが結腸癌予後の生存を予測する個々の miRNA を同定した。悪い生存予後と関連している miRNA 発現パターンを同定するため、TIN 比に Kaplan-Meier 生存プロット及び多変量 Cox 回帰分析を使用した。悪い生存率に相関する TIN 比を同定するため BRF アレイツールを使用した (データは示されていない)。我々はこれらの miRNA をさらに詳細に分析することを選んだ。腫瘍中で異なって発現された ($p < 0.01$) いずれの miRNA も分析した。各個体についての TIN 比を、中央値及び最高四分位値 TIN 比に基づいて 2 分化した。TIN 比が 18 個体より多くで失われている場合、分析からいずれの miRNA も除いた。その TIN 比が結腸癌予後を示す、miR - 21、miR - 106a、miR - 181b、miR - 16h、miR - 203、lct - 7g、miR - 29a、miR - 103 - 2 及び miR - 10a を含む少なくとも

9 の m i R N A を同定した (図 8 、 表 9) 。

【 0 2 1 4 】

個々の m i R N A についての T I N 比の C o x 回帰分析

個々の m i R N A が結腸癌で死亡するより高リスクの個体を分類するために使用できることを示すため、一変量及び多変量 C o x 回帰分析を実施した。これら 9 m i R N A についての T I N 比は、T N M 病期、年齢、性及び人種とは独立して、生存予後の重要な予測項目であった。m i R - 1 6 b 、 m i R - 2 1 、 m i R - 2 9 a 、 m i R - 1 0 3 - 2 、 m i R - 1 0 6 a 及び m i R - 2 0 3 についての高 / 低識別は、中央値 T I N 比に基づいて分類され、一方、l e t - 7 g 、 m i R - 1 0 a 及び m i R - 1 8 1 b は最高四分位値 T I N 比に基づいて分類されたことに注意されたい。

10

【 0 2 1 5 】

【 表 1 4 】

表 9 - 個々の m i R N A についての T I N 比の C o x 回帰分析

変数	HR (95%CI)	P=	n
一変量分析			
miR-21 高/低	3.0 (11.3-7.0)	0.01	80
多変量分析			
miR-21 高/低	2.8 (1.2-6.8)	0.02	
年齢 ≥ 50 / 年齢 < 50	0.46 (0.10-2.1)	0.32	
女性 / 男性	3.1 (0.9-11.0)	0.07	
AA / 白人	1.2 (0.5-2.7)	0.66	
ステージ III-IV / ステージ I-II	4.4 (1.6-11.9)	0.004	

20

【 0 2 1 6 】

【 表 1 5 】

表 9 - 続き

一変量分析			
miR-181b 高/低	3.4 (1.6-7.5)	0.002	78
多変量分析			
miR-181b 高/低	3.3 (1.3-8.2)	0.01	
年齢 ≥ 50 / 年齢 < 50	0.39 (0.08-1.8)	0.23	
女性 / 男性	2.2 (0.7-7.2)	0.17	
AA / 白人	1.1 (0.5-2.5)	0.82	
ステージ III-IV / ステージ I-II	3.1 (1.2-8.1)	0.02	

30

【 0 2 1 7 】

【 表 1 6 】

表 9 - 続き

一変量分析			
Let-7g 高/低	2.7 (1.3-5.9)	0.01	84
多変量分析			
Let-7g 高/低	2.5 (1.1-5.5)	0.03	
年齢 ≥ 50 / 年齢 < 50	0.5 (0.1-2.4)	0.39	
女性 / 男性	1.5 (0.5-4.4)	0.50	
AA / 白人	1.3 (0.6-2.9)	0.50	
ステージ III-IV / ステージ I-II	3.6 (1.4-9.2)	0.006	

40

50

【 0 2 1 8 】

【 表 1 7 】

表 9 - 続き

変数	HR (95%CI)	p=	n
一変量分析			
miR-103-2 高/低	2.5 (1.1-5.6)	0.03	81
多変量分析			
miR-103-2 高/低	3.1 (1.3-7.5)	0.01	
年齢 $\geq$ 50/年齢<50	0.5 (0.1-2.2)	0.36	
女性/男性	1.6 (0.6-4.9)	0.38	
AA/白人	0.8 (0.4-1.9)	0.69	
ステージ III-IV/ステージ I-II	4.4 (1.7-11.1)	0.002	

10

【 0 2 1 9 】

【 表 1 8 】

表 9 - 続き

変数	HR (95%CI)	p=	n
一変量分析			
miR-16b 高/低	4.6 (1.7-12.5)	0.003	69
多変量分析			
miR-16b 高/低	5.1 (1.8-15.9)	0.003	
年齢 $\geq$ 50/年齢<50	0.4 (0.08-1.7)	0.20	
女性/男性	3.2 (0.8-1.7)	0.12	
AA/白人	0.9 (1.9-22.7)	0.003	
ステージ III-IV/ステージ I-II	6.5 (1.9-22.4)	0.003	

20

【 0 2 2 0 】

【 表 1 9 】

表 9 - 続き

変数	HR (95%CI)	p=	n
一変量分析			
miR-106 高/低	2.6 (1.1-6.1)	0.01	82
多変量分析			
miR-106 高/低	2.4 (1.0-5.7)	0.05	
年齢 $\geq$ 50/年齢<50	0.54 (0.11-2.5)	0.44	
女性/男性	1.8 (0.5-6.5)	0.34	
AA/白人	1.1 (0.5-2.5)	0.84	
ステージ III-IV/ステージ I-II	5.4 (1.8-16.0)	0.002	

40

【 0 2 2 1 】

【表 2 0】

表 9－続き

変数	HR (95%CI)	p=	n
一変量分析			
miR-203 高/低	3.8 (1.4-10.5)	0.01	57
多変量分析			
miR-203 高/低	3.2 (1.1-9.4)	0.03	
年齢 $\geq$ 50/年齢<50	1.0 (0.1-8.1)	0.97	
女性/男性	1.4 (0.4-5.1)	0.61	
AA/白人	0.9 (0.4-2.3)	0.83	
ステージⅢ-Ⅳ/ステージⅠ-Ⅱ	3.9 (1.3-11.8)	0.02	

10

【0 2 2 2】

【表 2 1】

表 9－続き

変数	HR (95%CI)	p=	n
一変量分析			
miR-29a 高/低	3.1 (1.3-7.3)	0.01	77
多変量分析			
miR-29a 高/低	3.2 (1.3-7.9)	0.01	
年齢 $\geq$ 50/年齢<50	0.5 (0.1-2.2)	0.35	
女性/男性	2.2 (0.6-7.4)	0.22	
AA/白人	0.9 (0.4-2.1)	0.76	
ステージⅢ-Ⅳ/ステージⅠ-Ⅱ	4.5 (1.7-12.2)	0.003	

20

【0 2 2 3】

【表 2 2】

表 9－続き

変数	HR (95%CI)	p=	n
一変量分析			
miR-10a 高/低	2.7 (1.3-5.7)	0.01	84
多変量分析			
miR-10a 高/低	3.5 (1.5-7.8)	0.003	
年齢 $\geq$ 50/年齢<50	0.4 (0.1-1.9)	0.26	
女性/男性	1.7 (0.6-5.0)	0.34	
AA/白人	1.0 (0.45-2.3)	0.98	
ステージⅢ-Ⅳ/ステージⅠ-Ⅱ	4.9 (1.9-12.2)	0.001	

30

40

【0 2 2 4】

miR-21 発現は腫瘍で上昇される(表7)。miR-21 TIN比は、同様に結腸癌患者の臨床病期及び生存予後にも関連している(表9、図8a)。

より進行したTNM病期を有する個体は、より高いTIN比を有する傾向があった($p = 0.034$)。TIN比は、データを有する80の個体の各々についての中央値に基づいて2分化した。高miR-21 TIN発現比を有する個体は、カプラン・マイヤー分析($p = 0.004$)に基づくより悪い生存予後を有しており、高レベルのmiR-21を発現している腫瘍は予後不良を示すことを示唆している。これらの結果は、Cox回帰分析でさらに分析した。

50

【0225】

高TIN比のmiR-21を有する個体は、一変量(HR=3.0; p=0.01)及び年齢、性、人種及びTNM病期について調整した多変量(HR=2.8; p=0.02)分析の両方でより高いリスクにあった(表9)。

【0226】

この結果は、miR-21発現レベルが予後予測法として有用であり得ること、及びTNM病期単独よりも生存予後についてのより良い予測値を提供できることを示唆している。miR-21は多くの腫瘍タイプで異なって発現されていることが観察されている¹²~¹⁸。

【0227】

高レベルのmiR-21が神経膠芽腫細胞においてアポトーシスの障害を導くことができ⁵、一方、miR-21の障害がヒラ細胞において増加した細胞増殖を導くことができること¹⁹も研究で示されている。

【0228】

本発明者は、本明細書において、miR-21が同様の様式で結腸発癌に寄与していると信じられることを発見した。

我々は、腫瘍中で上昇されたmiR-106a(表7)、及びmiR-106a TIN比が生存予後と相関することを見出した(表9、図8b)。

【0229】

miR-106aは、miR-17、miR-20、miR-106a及びmiR-106hを含むパラログスmiRNAのクラスのメンバーである²⁰。これらのmiRNAは、1~2ヌクレオチドのみが異なっていること以外はお互いに非常に類似している。それらの類似性のため、それらは類似した標的を有しているようである。興味深いことに、これらのmiRNAの4つすべてが、発現及び予後との関連に類似パターンを示す(データは示されていない)。miR-106aについての関連は、他のmiRNAパラログのいずれか又はすべてがこの関連に寄与しているという可能性を正式に除外するものではない。MiR-106a TIN比は、データを有する82の個体の各々についての中央値に基づいて2分化した。高miR-106a TIN発現比を有する個体は、カプラン・マイヤー分析に基づくより悪い生存予後を有していた(p=0.013; 図8b)。

【0230】

このことは、高レベルのmiR-106aを発現している腫瘍は、悪い生存率予後を予測することを示唆している。高TIN比のmiR-106aを有する個体は、一変量(FIR=2.6、p=0.01)及び年齢、性、人種及びTNM病期について調整された多変量(HR=2.4; p=0.05)分析の両方でより高いリスクにあった(表7)。それ故、miR-106aは、TNM病期とは独立して、結腸癌予後の有用な予後を予測するものであることができる。興味深いことに、網膜芽細胞腫抑制因子遺伝子が、miR-106aの機能的標的であることが示されており¹²、どのようにmiR-106aが結腸発癌に機構的に寄与できるについての機構を支持している。

【0231】

miR-106aのパラログを含有するmiR-17-92クラスターの過剰発現は、マウスにおける腫瘍発育を促進する¹⁰。このことは、miR-106aファミリーのmiRNAが発癌に影響できることを実験的に示し、さらに、miR-106aが発癌及び腫瘍進行に寄与できるという仮説を強化している。

【0232】

7つの追加のmiRNAの発現パターンが、臨床病期及び悪い予後生存に関連していた(表9、図8c~8i)。

より進行したTNM病期を有すると診断された個体は、より高いTIN比を有する傾向があった; let-7a(p=0.010)、miR-10a(p=0.008)、miR-16h(p=0.048)、miR-29a(p=0.005)、miR-103-2(p=0.033)、miR-181h(p=0.016)及びmiR-203(p=

10

20

30

40

50

0.016) (図8)。

【0233】

TIN比は、中央値(miR-16h、miR-29a、miR-103-2、miR-203)又は最高四分位値(let-7g、miR-10a、miR-181h)に基づいて2分化され、カプラン・マイヤー分析は、各々の高TIN比が、悪い生存予後を予測するものであることを明らかにした(図8c~8i)。

【0234】

一変量及び多変量Cox回帰分析は、これらのmiRNAのいずれか一つの高TIN比が、TNM病期とは独立して、悪い結腸癌予後を予測することを確認した(表9)。年齢、性、人種及びTNM病期について調整された多変量Cox回帰モデルは、miR-16b(HR=5.1; p=0.003)、let-7g(HR=2.5; p=0.03)、miR-10a(HR=3.4; p=0.003)、miR-29a(HR=3.2; p=0.01)、miR-103-2(HR=3.1; p=0.01)、miR-181h(HR=3.2; p=0.01)及びmiR-203(HR=3.2; p=0.03)についての高TIN比が、各々悪い生存予後を予測したことを示した。これらの結果は、これらのmiRNAのいずれかの高いレベルを発現している腫瘍を有する患者は、増加した結腸癌で死亡するリスクにあることを示唆している。それ故、これらのmiRNAのいずれかの発現レベルは、TNM病期とは独立して、結腸癌患者についての生存リスクを予測する助けとなり得る、有用なバイオマーカーであることができる。

【0235】

9 miRNAのmiRNA発現シグニチャーは生存予後を予測する：

結腸癌予後を予測し得るmiRNAシグニチャーを開発するため、以前に記述した9つすべてについてのTIN比を使用した。これらの値の9の内の2より多くを失った個体はこの分析から除外した。9 miRNAのTIN比の階層的クラスタリングは、残りの78患者のグループ分けで2つのグループを生じた(図9a)。

【0236】

これらのグループは、有意に異なった生存予後を有していた(図9b; p=0.004)。一変量(HR=3.2; p=0.008)及び多変量(HR=2.8; p=0.04)Cox回帰分析は、miRNAシグニチャーは、TNM病期とは独立して、悪い生存予後と関連していた(表10)。

【0237】

【表23】

表10—マイクロRNAシグネチャーのCox回帰分析

一変量分析		
変数	HR(95%CI)	p値
9 miR クラスターB/A	3.2 (1.4-7.8)	0.008
多変量、年齢、性及び人種を調整		
変数	HR(95%CI)	p値
9 miR クラスターB/A	2.8 (1.0-7.4)	0.043
年齢≥50/年齢<50	0.4 (0.08-1.8)	0.23
女性/男性	1.9 (0.6-6.6)	0.29
AA/白人	0.9 (1.4-10.7)	0.82
ステージ III-IV/ステージ I-II	3.9 (1.4-10.7)	0.007

【0238】

一変量(上)及び多変量(年齢、性、人種及び病期について調整; 下)Cox回帰分析を実施し、9 miRNAシグニチャーを使用して、グループBに分類された個体は結腸癌で死亡するより高リスクにあることが示された。年齢、性又は人種のいずれも、生存リスクには有意に寄与しなかった。クラスター帰属に関連するこのリスクは、病期とは独立し

ていた。

【0239】

これらの結果は、miRNAシグニチャーが、結腸癌患者の生存予後を予測するためのバイオマーカーとして使用できることを示している。

【0240】

議論

個々のmiRNAは結腸腫瘍中で異なって発現され^{1 2 . 1 3}、これらのmiRNAの変化した発現は、結腸発癌の原因となる細胞性変化の一部であることができることを示唆している。これらの発見に加え、我々は本明細書において、miRNA発現プロファイルが結腸癌病期及び予後に関連していることを示した。それ故、miRNA（個々に分析された、又はmiRNAシグニチャーの一部としての）は、医師が患者の生存リスクをより正確に予測することを可能にするであろうバイオマーカーとして使用し得る。

10

【0241】

miRNA TIN比と生存予後の強い相関は、変化したmiRNA発現が結腸発癌及び進行においての原因となる経路の一部であることができることを示唆している。もし、これらのmiRNAのいずれかの変化した発現が発癌の原因であるとすれば、癌を治療するために使用し得るantagomir様医薬を設計することが可能である。miRNA プロファイリング及びmiRNAに基づいた療法を使用し、これら9つのmiRNAが変化されたことに基づいた、個人的薬剤治療戦略を設計することが可能である。加えて、これらの戦略は、遺伝的に受け継がれたリスク又は以前に癌履歴を有するために高リスクである人々において結腸癌を予防することにおいても有用であることができる。

20

【0242】

実施例 3

結腸癌関連疾患を診断、病期分類、予後診断、モニタリング及び治療するための方法、試薬及びキット

一つの態様において、患者が結腸癌関連疾患を有するか、又は結腸癌関連疾患を発症する正常よりも高いリスクを有するかどうかを評価する診断法が提供され、患者サンプル中のマーカーの発現レベルと、対照（例えば、結腸癌関連疾患を有していない患者からのサンプル）における該マーカーの正常レベルを比較する工程を含んでなる。正常レベルと比較し、該患者サンプル中の該マーカーの有意により高いレベルの発現は、該患者が結腸癌関連疾患に罹患しているか、又は結腸癌関連疾患を発症する正常よりも高いリスクを有することの指標である。

30

【0243】

該マーカーは、本方法の陽性予測値が少なくとも約10%、及びある非制限的態様においては、約25%、約50%又は約90%であるように選択される。該方法での使用に好ましいのは、正常細胞と比較し、少なくとも2倍で少なくとも約20%、及びある非制限的態様においては、約50%又は約75%異なって発現されるマーカーである。

【0244】

患者が結腸癌関連疾患を有するかどうかを評価する一つの診断法において（例えば、新規検出（「スクリーニング」）、再発の検出、反射試験）、該方法は：患者サンプル中のマーカーの発現レベル、及びb)対照非結腸癌関連疾患サンプル中の該マーカーの発現の正常レベル；を比較することを含んでなる。正常レベルと比較し、患者サンプル中のマーカー発現の有意に高いレベルは、該患者が結腸癌関連疾患に罹患していることの指標である。

40

【0245】

患者の結腸癌関連疾患を抑制するための療法の効力を評価する診断法も提供される。こうした方法は、a)該患者に療法の少なくとも一部を提供することに先立って、該患者から得られた第一のサンプル中のマーカーの発現、及びb)療法の少なくとも一部を提供した後、該患者から得られた第二のサンプル中のマーカーの発現、を比較することを含んでなる。第一のサンプル中のレベルと比較して、第二のサンプル中の該マーカーの発現の有

50

意により低いレベルは、該患者の結腸癌関連疾患を抑制することにおいて、療法が有効であることの指標である。

【0246】

これらの方法において、「療法」は結腸癌関連疾患を治療するためのいずれの方法でもあり、限定されるわけではないが、医薬組成物、遺伝子治療及び抗体及びケモカインの投与のような生物学的療法が含まれる。それ故、本明細書に記載された方法は、例えば、疾患状態の軽減を評価するため、療法の前、途中及び後で患者を評価するのに使用することができる。

【0247】

ある側面において、該診断法は、化学的又は生物学的剤を使用する療法が指示される。これらの方法は、患者から得られ、及び化学的又は生物学的剤の存在下で維持された第一のサンプル中の該マーカーの発現、及び患者から得られ、及び該剤の不存在下で維持された第一のサンプル中の該マーカーの発現、を比較することを含んでなる。第一のサンプル中のレベルと比較して、第二のサンプル中の該マーカーの有意により低い発現レベルは、該剤が該患者の結腸癌関連疾患を抑制することにおいて有効であることの指標である。一つの態様において、第一及び第二のサンプルは、患者から得られた単一サンプルの一部、又は患者から得られたプールされたサンプルの一部であり得る。

10

【0248】

患者の結腸癌関連疾患の進行を評価するためのモニタリング法も提供され、該方法は：a) マーカーの発現を、第一の時点において患者サンプル中で検出すること；b) 時間内の続いての時点で工程a)を繰り返すこと；及びc) 工程a)及びb)で検出された発現のレベルを比較すること、及びそれらから、患者の結腸癌関連疾患の進行をモニタリングすることを含んでなる。第一の時点でのサンプルのレベルより、続いての時点におけるサンプル中のマーカーの有意により高い発現レベルは、結腸癌関連疾患が進行したことの指標であり、一方、発現の有意により低い発現レベルは、結腸癌関連疾患が退行したことの指標である。

20

【0249】

結腸癌関連疾患が悪化したか、又は将来悪化しそうであるかどうかを決定するための診断法がさらに提供され：a) 患者サンプル中のマーカーの発現レベル、及びb) 対照サンプル中の該マーカーの発現の正常レベル、を比較することを含んでなる。正常レベルと比較して、患者サンプル中での有意により高い発現レベルは、該結腸癌関連疾患が悪化したか、又は将来悪化しそうである指標である。

30

【0250】

患者の結腸癌関連疾患を抑制するための組成物を選択するための試験法も提供される。この方法は：a) 該患者から細胞を含んでなるサンプルを得ること；b) 多数の試験組成物の存在下、サンプルの一定分量を別々に維持すること；c) 該一定分量の各々におけるマーカーの発現を比較すること；及びd) 他の試験組成物の存在下での該マーカーの発現のレベルに比べ、試験組成物を含有する一定分量中の該マーカーの発現のレベルを有意に減少させる試験組成物の一つを選択すること；の工程を含んでなる。

40

【0251】

結腸癌関連疾患を引き起こすことにおいて化合物の有害な可能性を評価する試験法がさらに提供される。この方法は：a) 該化合物の存在及び不存在下、細胞の一定分量を別々に維持すること；及びb) 該一定分量の各々のマーカーの発現を比較すること；の工程を含んでなる。化合物の不存在下で維持された該一定分量のレベルと比べ、該化合物存在下で維持された該一定分量における該マーカーの発現の有意により高い発現レベルは、該化合物がこうした有害な可能性を所有することの指標である。

【0252】

加えて、患者の結腸癌関連疾患を抑制する方法がさらに提供される。この方法は：a) 該患者からの細胞を含んでなるサンプルを得ること；b) 多数の組成物の存在下、サンプルの一定分量を別々に維持すること；c) 該一定分量の各々におけるマーカーの発現を比

50

較すること；及びd)他の組成物の存在下でのマーカーの発現レベルと比べ、組成物を含有する該一定分量においてマーカーの発現レベルを有意に低くする組成物の少なくとも一つを該患者に投与すること；の工程を含んでなる。

【0253】

サンプル中のマーカーの発現レベルは、例えば、対応するマーカータンパク質又は該タンパク質の断片（例えば、タンパク質又は該タンパク質断片に特異的に結合する、抗体、抗体誘導体、抗体断片又は一本鎖抗体のような試薬を使用することにより）、対応するマーカー核酸（例えば、ヌクレオチド転写体又はそれらの相補体）又は核酸の断片（例えば、サンプルから得られた転写ポリヌクレオチドと、該核酸配列の全部又はセグメント又はそれらの相補体を有する一つ又はそれより多くの核酸が加えられている基質と接触させることにより）、直接（即ち、触媒される）又は対応するマーカータンパク質により間接的に産生される代謝物の、該サンプル中の存在を検出することにより評価し得る。

10

【0254】

上記の方法のいずれも、結腸癌関連疾患マーカーを含む、少なくとも一つの又は多数（例えば、2、3、5又は10又はそれ以上の）の結腸癌関連疾患マーカーを使用して実施することができる。

【0255】

こうした方法において、多数のマーカー（その少なくとも一つがマーカーである）の各々のサンプル中での発現レベルを、結腸癌関連疾患に罹患していない対照のヒトから得られた、同一タイプのサンプル中の、多数のマーカーの各々の発現の正常レベルと比較する。マーカーの対応する正常又は対照レベルと比べ、一つ又はそれより多くのマーカーの、又はそれらのいくつかの組み合わせの該サンプル中で有意に変化した（即ち、単一マーカーを使用する上記の方法において明記したように増加した又は減少した）発現のレベルは、該患者が結腸癌関連疾患に罹患していることの指標である。すべての上記の方法について、マーカー（単数又は複数）は、該方法の陽性予測値が少なくとも約10%であるように選択される。

20

【0256】

別の側面において、多様な診断及び試験キットが提供される。一つの態様において、キットは、患者が結腸癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価するために有用である。該キットは、マーカーの発現を評価するための試薬を含んでなる。別の態様において、キットは患者の結腸癌関連疾患を抑制するための化学的又は生物学的剤の適性を評価するために有用である。こうしたキットは、マーカーの発現を評価するための試薬を含んでなり、及び一つ又はそれより多くのこうした剤も含んでなることができる。

30

【0257】

さらなる態様において、該キットは、結腸癌関連疾患細胞の存在を評価するため、又は結腸癌関連疾患を治療するために有用である。こうしたキットは、マーカータンパク質又は該タンパク質の断片に特異的に結合する、抗体、抗体誘導体又は抗体断片を含んでなる。こうしたキットは、多数の抗体、抗体誘導体又は抗体断片を含んでいてもよく、該多数の抗体剤は、マーカータンパク質又は該タンパク質の断片に特異的に結合する。

40

【0258】

追加の態様において、該キットは、結腸癌関連疾患細胞の存在を評価するために有用であり、該キットはマーカー核酸又は該核酸の断片に特異的に結合する、核酸プローブを含んでなる。該キットは多数のプローブを含んでいてもよく、該プローブの各々がマーカー核酸又は該核酸の断片に特異的に結合する。

【0259】

さらなる側面において、結腸癌関連疾患に罹患している又は結腸癌関連疾患を発症するリスクを有する患者を治療するための方法が提供される。こうした方法は、発現を減らすこと及び/又はマーカーの生物学的機能を妨害することを含んでなることができる。一つの態様において、該方法は、マーカー核酸に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、又はそれらのセグメントを該患者に提供することを含んでなる。例

50

えば、アンチセンスポリヌクレオチドは、マーカー核酸又はそれらの断片の抗センスポリヌクレオチドを発現するベクターの送達を介して提供することができる。別の態様において、該方法は、マーカータンパク質又は該タンパク質の断片に特異的に結合する、抗体、抗体誘導体又は抗体断片を該患者に提供することを含んでなる。

【0260】

広範な側面において、少なくとも一つの結腸癌関連疾患の評価のための非ヒト動物モデルを提供するための方法が提供される。該方法は、結腸癌を起こすと信じられている少なくとも一つの化学物質を反復投与して該動物を暴露する。ある側面において、該方法はさらに、該動物から一つ又はそれより多くの選択されたサンプルを採取すること；及び潜在的結腸癌開始又は発育の一つ又はそれより多くの兆候と集めたサンプルを比較すること；を含む。

10

【0261】

広範な側面において、動物モデルを製造するための方法が提供され、それは：該動物を、特異的化学物質を含んでいない環境に維持すること、及び該動物を、結腸癌を起こすと信じられている少なくとも一つの化学物質で感作することを含む。ある態様において、該動物の結腸の少なくとも一部が多数回の逐次的暴露により感作される。

【0262】

別の広範な側面において、少なくとも一つの結腸癌関連疾患に対する剤の有効性についてのスクリーニングの方法が提供される。該方法は一般的に：該動物に少なくとも一つの剤を投与すること；該剤が結腸癌関連疾患の一つ又はそれより多くの症状を軽減する又は悪化させるかどうかを決定すること；一つ又はそれより多くの症状の軽減と該結腸癌関連疾患に対する剤の有効性を関連づけること；又は一つ又はそれより多くの症状の軽減がないことと該剤の無効性を関連づけること；を含む。

20

【0263】

該動物モデルは、少なくとも一つの結腸癌関連疾患の開始、進行、重症度、病態、攻撃性、グレード、活性度、能力障害、死亡率、罹患率、疾患細分類又は他の根底にある発症又は病理学的特徴の少なくとも一つのに寄与する一つ又はそれより多くの代謝経路を評価するために有用である。分析は：階層的クラスタリング、シグニチャーネットワーク構築、質量分析、プロテオーム分析、表面プラズモン共鳴法、線形統計学的モデル化、部分的最小二乗法判別分析及び多線形回帰分析；の少なくとも一つによりなし得る。

30

【0264】

特定の側面において、該動物モデルは、一つ又はそれより多くのマーカー又はそれらへの機能的均等物の発現レベルを試験することにより、少なくとも一つの結腸癌関連疾患について評価される。

【0265】

特に規定しない限り、本明細書で使用されたすべての技術及び科学的用語は、当業者により普通に理解されるものと同じ意味を有する（例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術及び生化学）。標準技術を分子、遺伝子及び生化学法に使用し、それらは当業者の範囲内である。こうした技術は、文献中に十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Mullis et al. 米国特許番号: 4,683,195 号; Nucleic Acid Hybridization (Hames & Higgins eds., 1984); Transcription And Translation (Hames & Higgins eds., 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 論文, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press

40

50

, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986); The Laboratory Rat, editor in chief: Mark A. Suckow; authors: Sharp and LaRegina. CRC Press, Boston, 1988 (本明細書において援用される) 及び化学的方法を参照されたい。

【0266】

本明細書に記載されているのは、多様な細胞の結腸癌誘発状態に関連した新規に発見されたマーカーである。これらのマーカーのいずれか又はこれらのマーカーの組み合わせの正常よりも高い発現レベルが、患者中の結腸癌関連疾患の存在と相関することはすでに発見されている。方法は、サンプル中の結腸癌関連疾患の存在；サンプル中の不存在；結腸癌関連疾患のステージ；及び患者の結腸癌関連疾患の評価、予防、診断、特徴付け及び療法に
10 関係のある結腸癌関連疾患の他の特徴を検出するために提供される。結腸癌関連疾患を治療する方法も提供される。

【0267】

定義

本明細書で使用される以下の用語の各々は、この節に関連する意味を有する。

本明細書で使用される冠詞「a」及び「an」は、冠詞の文法的目的語の一つ又は一つより多く（即ち、少なくとも一つ）を指す。例として、「an element」は一つの要素又は一つより多くの要素を意味する。

【0268】

「マーカー」は、正常又は健康な組織又は細胞中の発現レベルから、組織又は細胞中の発現のレベルが変化されている遺伝子又はタンパク質であり、疾患状態に関連している。
20

【0269】

マーカーの発現の「正常」レベルとは、ヒト対象又は結腸癌関連疾患に罹患していない患者の結腸系細胞におけるマーカーの発現のレベルである。

マーカーの「過剰発現」又は「有意により高いレベルの発現」とは、発現を評価するために用いられたアッセイの標準誤差よりも大きく、ある態様では、対照サンプル（例えば、マーカー関連疾患を有していない健康な対象からのサンプル）中のマーカーの発現レベルの少なくとも2倍、他の態様では、3、4、5又は10倍、及びある態様においては、いくつかの対照サンプル中のマーカーの平均発現レベルである、試験サンプル中の発現レ
30 ベルを指す。

【0270】

マーカーの「有意により低いレベルの発現」とは、対照サンプル（例えば、マーカー関連疾患を有していない健康な対象からのサンプル）中のマーカーの発現レベルの少なくとも2分の1、及びある態様では、3、4、5又は10分の1、及びある態様においては、いくつかの対照サンプル中のマーカーの平均発現レベルである、試験サンプル中の発現レベルを指す。

【0271】

キットは、マーカーの発現を特異的に検出するための少なくとも一つの試薬、例えば、プローブを含んでなる、いずれかの製品（例えば、パッケージ又は容器）である。該キットは、本発明の方法を実施するために、宣伝し、流通させ、又は販売することができる。
40

【0272】

「タンパク質」は、マーカータンパク質及びそれらの断片；変異体マーカータンパク質及びそれらの断片；マーカー又は変異体マーカータンパク質の少なくとも15アミノ酸セグメントを含んでなるペプチド及びポリペプチド；マーカー又は変異体マーカータンパク質、又はマーカー又は変異体マーカータンパク質の少なくとも15アミノ酸セグメントを含んでなる融合タンパク質を包含する。

【0273】

本明細書に記載された組成物、キット及び方法は中でも以下の使用を有する：1) 患者が結腸癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価すること；2) ヒト患者の結腸癌関連疾
50

患のステージを評価すること； 3）患者の結腸癌関連疾患のグレードを評価すること； 4）患者の結腸癌関連疾患の性質を評価すること； 5）患者の結腸癌関連疾患の発症の可能性を評価すること； 6）患者の結腸癌関連疾患に関連する細胞の組織型を評価すること； 7）結腸癌関連疾患を治療する及び／又は患者が結腸癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価するために有用である抗体、抗体断片又は抗体誘導体を作製すること； 8）結腸癌関連疾患細胞の存在を評価すること； 9）患者の結腸癌関連疾患を抑制するための一つ又はそれより多くの試験化合物の効力を評価すること； 10）患者の結腸癌関連疾患を抑制するための療法の効力を評価すること； 11）患者の結腸癌関連疾患の進行をモニタリングすること； 12）患者の結腸癌関連疾患を抑制するための組成物又は療法を選択すること； 13）結腸癌関連疾患に罹患している患者を治療すること； 14）患者の結腸癌関連疾患を抑制すること； 15）試験化合物が有害な可能性を評価すること； 及び 16）結腸癌関連疾患を発症するリスクを有する患者において、結腸癌関連疾患の発症を予防すること。

10

20

30

40

50

【0274】

スクリーニング法

本明細書に記載された方法により作り出された動物モデルは、結腸癌関連疾患を治療する又は予防するために有用な療法剤のスクリーニングを可能にするであろう。従って、本方法は結腸癌関連疾患を治療する又は予防するための療法剤を同定するために有用である。本方法は、本明細書に記載された方法により作製された動物モデルに候補剤を投与すること、候補剤が投与されていない対照動物モデルと比較し、動物モデルにおける少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答を評価すること含んでなる。もし、少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答の症状が軽減され又は発症が遅延されたならば、その候補剤は結腸癌関連疾患を治療する又は予防するための剤である。

【0275】

該候補剤は、当該技術分野ですでに公知である薬理的剤であってもよく、又は何らかの薬理的活性を有する以前には知られていなかった剤でもよい。該剤は、天然に生じたものでも又は実験室で設計されたものでもよい。それらは、微生物、動物又は植物から単離されたものでもよく、又は組換え的に産生された、又は適した化学合成法により合成されてもよい。それらは、小分子、核酸、タンパク質、ペプチド又はペプチド模倣物であることができる。ある態様において、候補剤は、50以上及び約2,500ダルトン未満の分子量を有する小有機化合物である。候補剤は、タンパク質との構造的相互作用に必要な官能基も含んでなる。候補剤は、限定されるわけではないが：ペプチド、サッカリド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体又はそれらの組み合わせを含む生体分子間でも発見された。

【0276】

候補剤は、合成又は天然化合物のライブラリーを含む広範囲の起源から得られる。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチド及びオリゴペプチドの発現を含む、広範囲の有機化合物及び生体分子の無作為及び方向付けられた合成に、多数の手段が利用可能である。もしくは、細菌、真菌、植物及び動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが利用可能であるか又はすでに産生されている。加えて、天然に又は合成的に産生されたライブラリー及び化合物群は、慣用的な化学的、物理的及び生化学的手段を介して容易に修飾され、コンビナトリアルライブラリーを産生するために使用することができる。ある態様において、該候補剤は、非制限例として：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相又は液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「一ピーズ化合物」ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法によるものを含む、コンビナトリアルライブラリー法分野における多数のアプローチのいずれかを使用して得ることが可能である。

【0277】

あるさらなる態様において、ある薬理的剤を、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化のような無作為の又は方向付けられた化学修飾にかけることができ、構造類似体

が生成される。

【0278】

結腸癌関連疾患を治療するための療法剤を同定するためと同じ方法を、インビトロ研究から発生されたリード化合物／剤を検証するために使用し得る。

該候補剤は、一つ又はそれより多くの結腸癌関連疾患応答経路を上方又は下方調節する剤であることができる。ある態様において、該候補剤は、こうした経路に影響するアンタゴニストであることができる。

【0279】

結腸癌関連疾患を治療する方法

本明細書において結腸癌関連疾患応答を治療する、抑制する、救済する又は逆行させるための方法が提供される。本明細書に記載された方法において、シグナル伝達カスケードを妨害する剤が、限定されるわけではないが、こうした合併症はまだ明白ではない、及びすでに少なくとも一つの結腸癌関連疾患応答を有する個体のような、それを必要とする個体に投与される。

【0280】

前の例において、こうした治療は、こうした結腸癌関連疾患応答の発生を予防するため及び／又はそれらが生じる程度を軽減するために有用である。後の例において、こうした治療は、こうした結腸癌関連疾患応答の程度を軽減する、それらのさらなる発生を予防する、又は結腸癌関連疾患応答を逆行させるために有用である。

【0281】

ある態様において、結腸癌関連疾患応答カスケードを妨害する剤は、こうした応答に特異的な抗体であることができる。

【0282】

マーカーの発現

マーカーの発現は、多くの方法で抑制することが可能であり、非制限例として、マーカー（単数又は複数）の転写、翻訳又は両方を抑制するため、結腸癌関連疾患細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供できることが含まれる。もしくは、マーカータンパク質に特異的に結合し、適切なプロモーター／調節因子領域と機能可能なように連結する抗体、抗体誘導体又は抗体断片をコードするポリヌクレオチドを、該タンパク質の機能又は活性を抑制するであろう細胞内抗体を発生させるために提供し得る。マーカーの発現及び／又は機能は、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体、抗体誘導体又は抗体断片で結腸癌関連疾患細胞を治療することによっても抑制することができる。本明細書に記載された方法を使用し、多様な分子（特に、細胞膜を通過可能な十分に小さい分子を含んで）を、マーカーの発現を抑制する又はマーカータンパク質の機能を抑制する分子を同定するためにスクリーニングすることが可能である。そうのようにして同定された化合物を、患者の結腸癌関連疾患細胞を抑制するために該患者に提供し得る。

【0283】

いずれのマーカー又はマーカーの組み合わせ、ならびに該マーカーと組み合わせたいずれの特定のマーカーも、本明細書に記載された組成物、キット及び方法で使用することができる。一般に、結腸癌関連疾患細胞中のマーカーの発現のレベル及び正常結腸系細胞中の同じマーカーの発現のレベル間の相違が可能な限り大きなマーカーを使用するのが望ましい。この相違はマーカーの発現を評価するための方法の検出限界ほど小さい可能性があるが、相違は少なくとも評価法の標準誤差よりも大きく、及びある態様において、正常組織中の同一マーカーの発現のレベルよりも少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、100、500、1000倍またはそれ以上の相違が望ましい。

【0284】

ある種のマーカータンパク質が細胞を取り巻く細胞外空間に分泌されることが認められている。こうしたマーカータンパク質は、組織バイオプシサンプルよりもヒト患者からより容易に集めることができる結腸癌関連体液サンプル中で検出することができるので、これらのマーカーが、組成物、キット及び方法のある態様で使用された。加えて、マーカー

10

20

30

40

50

タンパク質の検出のためのインビボ技術には、該タンパク質に対して方向付けられた標識抗体を対象内へ導入することが含まれる。例えば、放射性マーカーで標識された抗体は、対象中でのその存在及び位置を標準イメージング技術により検出し得る。

【0285】

どの特定のタンパク質が分泌されたタンパク質であるかを決定するため、マーカータンパク質が、例えば、ヒト結腸株のような哺乳類細胞中で発現され、細胞外液を集め、細胞外液中のタンパク質の存在又は不存在を評価した（例えば、該タンパク質に特異的に結合する標識抗体を使用して）。

【0286】

結腸細胞を含んでいる患者サンプルを本明細書に記載された方法において使用できることが理解されるであろう。これらの態様において、該マーカーの発現のレベルは、サンプル中の量（例えば、絶対量又は濃度）を評価することにより評価し得る。該細胞サンプルは、もちろん、サンプル中のマーカー量を評価することに先立って、多様な収集後調製及び保存技術（例えば、核酸及び／又はタンパク質抽出、固定、保存、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心分離など）にかけることができる。

【0287】

該マーカーは、細胞から消化器系、血流及び／又は間質腔内へ排出することもできることも理解されるであろう。該排出マーカーは、例えば、血清又は血漿を試験することにより試験し得る。

【0288】

本組成物、キット及び方法は、それが発現される細胞の表面上に提示された少なくとも一つの部分を有するマーカータンパク質の発現を検出するために使用し得る。例えば、全細胞上のこうしたタンパク質を検出するために免疫学的方法を使用することができ、少なくとも一つの細胞外ドメインの存在を予測するために、コンピューター支援配列分析法を使用することができる（即ち、分泌されたタンパク質及び少なくとも一つの細胞表面ドメインを有するタンパク質の両方を含んで）。細胞の表面上に提示されている少なくとも一つのタンパク質を有するマーカータンパク質の発現は、細胞を溶解する必要なく検出することができる（例えば、該タンパク質の細胞表面ドメインに特異的に結合する標識抗体を使用して）。

【0289】

マーカーの発現は、転写された核酸又はタンパク質の発現を検出するためのいずれかの多様な方法により評価することができる。こうした方法の非制限例には、分泌された、細胞表面、タンパク質の細胞質又は核タンパク質の検出のための免疫学的方法、タンパク質精製法、タンパク質機能又は活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法及び核酸増幅法が含まれる。

【0290】

特定の態様において、マーカーの発現は、全て又は一部がその正常翻訳後修飾を受けたマーカータンパク質を含むマーカータンパク質又はそれらの断片と特異的に結合する、抗体（例えば、放射標識された、発色団標識された、フルオロフォア標識された又は酵素標識された抗体）、抗体誘導体（例えば、基質又はタンパク質リガンド対のタンパク質又はリガンドとコンジュゲートされた抗体）又は抗体断片（例えば、一本鎖抗体、単離された抗体高頻度可変ドメインなど）を使用して評価される。

【0291】

別の特定の態様において、マーカーの発現は、患者サンプル中の細胞からmRNA/cDNA（即ち、転写されたポリヌクレオチド）を調製することにより、及びmRNA/cDNAとマーカー核酸又はそれらの断片と相補的である参照ポリヌクレオチドをハイブリダイズすることにより評価される。cDNAは、参照ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに先立って、いずれかの多様なポリメラーゼ連鎖反応法を使用して増幅されてもよい；好ましくは、増幅されない。一つ又はそれより多くのマーカーの発現も同様に、定量的PCRを使用して検出することが可能であり、マーカー（単数又は複数）の発現の

10

20

30

40

50

レベルが評価される。もしくは、マーカーの突然変異又は変異体（単一ヌクレオチド多型性、欠失など）を検出するいずれかの多くの方法を患者におけるマーカーの出現を検出するために使用することができる。

【0292】

関連する態様において、サンプルから得られた転写されたポリヌクレオチドの混合物を、マーカー核酸の少なくとも一部（例えば、少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、100、500、又はそれ以上のヌクレオチド残基）を有する相補的ポリヌクレオチド又は相同体が固定されている基質と接触させる。もし、相補的又は相同的ポリヌクレオチドが基質上で別個に検出可能ならば（例えば、異なる発色団又はフルオロフォアを使用して、又は異なって選択された位置に固定されて検出可能）、複数のマーカーの発現のレベルを、単一基質（例えば、選択された位置に固定されたポリヌクレオチドの「遺伝子チップ」マイクロアレイ）を使用して同時に評価し得る。一つの核酸と別の核酸のハイブリダイゼーションを含んだマーカー発現の評価方法が使用された場合、ハイブリダイゼーションはストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で実施されるべきである。

10

【0293】

ある態様において、バイオマーカーアッセイは、質量分析法又は表面プラズモン共鳴法を使用して実施される。多様な態様において、結腸癌関連疾患に対して活性な剤を同定する方法は：a) 一つ又はそれより多くのマーカー又はそれらの誘導体を含んでいる細胞のサンプルを提供すること；b) 前記細胞からの抽出物を調製すること；c) 前記抽出物とマーカー結合を含んでいる標識核酸プローブを混合すること；及び、d) 試験剤の存在又は不存在でマーカー及び核酸プローブ間の複合体形成を決定すること；を含むことが可能である。決定工程は、前記抽出/核酸プローブ混合物を電気泳動移動度シフトアッセイにかけるとを含むことが可能である。

20

【0294】

ある態様において、該決定工程は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、蛍光に基づいたアッセイ及び超高スループットアッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴法（SPR）又は蛍光相関分光法（FCS）アッセイから選択されるアッセイを含んでなる。こうした態様において、SPRは金属誘電性表面での小さな屈折率変化に敏感であるので、SPRセンサーは二分子相互作用の直接リアルタイム観察に有用である。SPRは、およそ200nmのSPRセンサー/サンプルインターフェース内の $10^5 \sim 10^6$ 屈折率（RI）単位の変化に感度がよい表面技術である。従って、SPR分光法は、センシング層上に堆積された薄い有機フィルムの成長のモニタリングのために有用である。

30

【0295】

本組成物、キット及び方法は、一つ又はそれより多くのマーカーの発現レベルの相違の検出に依存しているので、マーカーの発現のレベルは、少なくとも一つの正常細胞及び結腸癌病的細胞中での発現を評価するために使用される方法の最小検出限界よりも有意に大きなことが望まれる。

【0296】

一つ又はそれより多くのマーカーを使用する追加の患者のルーチンスクリーニングにより、ある種のマーカーが、特異的結腸癌関連疾患を含む、多様なタイプの細胞中で過剰発現されることが見出され得ることが理解される。

40

【0297】

加えて、非常に多くの患者サンプルがマーカーの発現について評価され、及びサンプルが得られた個々の患者の結果が関連付けられるので、ある種のマーカーの変化した発現が結腸癌関連疾患と強く関連付けられること、及び他のマーカーの変化した発現が他の疾患と強く関連付けられることも確認されるであろう。本組成物、キット、及び方法はそれ故、患者のステージ、グレード、組織学的型、及び結腸癌関連疾患の性質の一つ又はそれより多くを特徴付けるために有用である。

【0298】

50

本組成物、キット、及び方法が、患者のステージ、グレード、組織学的型、及び結腸癌関連疾患の性質の一つ又はそれより多くを特徴付けるために使用される場合、マーカー又はマーカーのパネルは、少なくとも約20%で、及びある態様においては、少なくとも約40%、60%又は80%で、及び対応するステージ、グレード、組織学的型、又は性質で結腸癌関連疾患に罹患している実質的にすべての患者で陽性結果が得られるように選択される。該マーカー又はマーカーのパネルは、一般集団については約10%より大きな陽性予測値が得られるように選択される（非制限例において、80%より大きなアッセイ特異性と相まって）。

【0299】

複数のマーカーが組成物、キット及び方法で使用される場合、患者サンプル中の各マーカーの発現レベルは、単一反応混合物（即ち、各マーカーについて異なった蛍光プローブのような試薬を使用して）か又は一つ又はそれより多くのマーカーに対応する個々の反応混合物中で、同一タイプの非結腸癌サンプルにおける、複数のマーカーの各々の発現の正常レベルと比較し得る。一つの態様において、対応する正常レベルと比べ、サンプルにおける複数のマーカーの一つより多くの発現の有意に増加したレベルは、該患者が結腸癌関連疾患に罹患していることの指標である。複数のマーカーが使用される場合、2、3、4、5、8、10、12、15、20、30又は50又はそれ以上の個々のマーカーを使用し得る；ある態様において、より少ないマーカーの使用が望ましいであろう。

10

【0300】

本組成物、キット及び方法の感度を最大にするため（即ち、患者サンプル中の非結腸系起源に起因する妨害による）、ここで使用されるマーカーは、限定された組織分布を有する、例えば、非結腸系組織では通常発現されないマーカーであることが望ましい。

20

【0301】

本組成物、キット及び方法は、結腸癌関連疾患を発症する増強されたリスクを有する患者及びその医学的アドバイザーに対して特に役に立つであろうことが認められる。結腸癌関連疾患を発症する増強されたリスクを有すると認められる患者には、例えば、結腸癌関連疾患の家族歴を持つ患者が含まれる。

【0302】

正常ヒト結腸系組織中のマーカーの発現レベルは、多様な方法で評価し得る。一つの態様において、この発現の正常レベルは、正常と思われる結腸系細胞の一部におけるマーカーの発現のレベルを評価することにより、及びこの発現の正常レベルを、異常であると疑われている結腸系細胞の一部における発現のレベルと比較することにより評価される。もしくは、及び特に、さらなる情報が本明細書に記載されたルーチン検査の結果として入手可能であるので、該マーカーの正常発現についての集団平均を使用することができる。他の態様において、マーカーの発現の「正常」レベルは、非結腸癌罹患患者から得られた患者サンプル、患者に結腸癌関連疾患の発症が疑われる以前の患者サンプル、保存された患者サンプルなどのマーカーの発現を評価することにより決定することができる。

30

【0303】

サンプル（例えば、保存された組織サンプル又は患者から得られたサンプル）中の結腸癌関連疾患細胞の存在を評価するための組成物、キット及び方法も提供される。これらの組成物、キット及び方法は、上記のものと実質的に同一であるが、但し必要な場合、該組成物、キット及び方法は、患者サンプル以外のサンプルでの使用に適用される。例えば、使用されるべきサンプルがパラフィン処理されたヒト組織サンプルである場合、該サンプル中でのマーカー発現のレベルを評価するため、組成物中、キット中、又は方法中の化合物の比を調節する必要がある。

40

【0304】

キット及び試薬

該キットは、サンプル（例えば、患者サンプルのような）中の結腸癌関連疾患細胞の存在を評価するために有用である。該キットは、複数の試薬を含んでなり、その各々は、マーカー核酸又はタンパク質と特異的に結合することが可能である。マーカータンパク質と

50

の結合に適した試薬には、抗体、抗体誘導体、抗体断片などが含まれる。マーカー核酸（例えば、ゲノムDNA、mRNA、スプライスされたmRNA、cDNAなど）との結合に適した試薬には、相補的核酸が含まれる。例えば、該核酸試薬は、基質に固定化されたオリゴヌクレオチド（標識又は非標識）、基質と結合されていない標識オリゴヌクレオチド、PCRプライマーの対、分子指標プローブなどを含むことができる。

【0305】

該キットは、本明細書に記載の方法を実行するために有用な追加の成分を場合により含んでいてもよい、例としては、該キットは、相補的核酸のアニーリングのため、抗体とそれが特異的に結合するタンパク質との結合のために適した液体（例えば、SSC緩衝液）、一つ又はそれより多くのサンプル区画、該方法の実施を記述している使用説明書、正常結腸系細胞のサンプル、結腸癌関連疾患細胞のサンプルなどを含むことができる。

10

【0306】

抗体を産生する方法

患者が結腸癌関連疾患に罹患しているかどうかを評価するために有用な抗体を産生する、単離されたハイブリドーマを作製する方法も提供される。この方法において、マーカータンパク質の全体又はセグメントを含んでなるタンパク質又はペプチドが合成され又は単離された（例えば、それが発現される細胞からの精製により、又はインビボ又はインビトロで、該タンパク質をコードする核酸の転写翻訳により）。脊椎動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ又はヒツジのような哺乳類を、タンパク質又はペプチドを使用して免疫化した。該脊椎動物がタンパク質又はペプチドに対して強い免疫応答を示すように、少なくとも追加の一回、場合により（及び好ましくは）免疫化してもよい。免疫化された脊椎動物の脾臓細胞を単離し、多様な方法のいずれかを使用して、不死化細胞株と融合させてハイブリドーマを形成させた。このようにして形成されたハイブリドーマは、標準法を使用してスクリーニングし、該マーカータンパク質又はそれらの断片と特異的に結合する抗体を産生する、一つ又はそれより多くのハイブリドーマを同定した。この方法により作製されたハイブリドーマ、及びこうしたハイブリドーマを使用して作製された抗体も本明細書で提供される。

20

【0307】

有効性評価の方法

結腸癌関連疾患細胞を抑制するための試験化合物の効力を評価する方法も本明細書において提供される。上記のように、該マーカーの発現のレベルの相違は、結腸系細胞の異常状態と相関する。ある種のマーカーの、発現のレベルの変化は結腸系細胞の異常状態により生じたようであるが、他のマーカーの、発現のレベルにおける変化が、これらの細胞の異常状態を誘導し、維持し及び促進することも同様に認められている。それ故、患者の結腸癌関連疾患を抑制する化合物は、一つ又はそれより多くの該マーカーの発現のレベルを、そのマーカー発現の正常レベルにより近いレベル（即ち、正常結腸系細胞におけるマーカーの発現レベル）への変化を起こすであろう。

30

【0308】

この方法は従って、試験化合物の存在下で維持された第一の結腸細胞サンプルにおけるマーカーの発現、及び試験化合物の不存在下で維持された第二の結腸細胞サンプルにおけるマーカーの発現を比較することを含んでなる。試験化合物の存在下におけるマーカーの有意に減少した発現は、試験化合物が結腸癌関連疾患を抑制することの指標である。結腸細胞サンプルは例えば、患者から得られた正常結腸細胞の単一サンプルの一部、患者から得られた正常結腸細胞のプールされたサンプル、正常結腸細胞株の細胞、患者から得られた結腸癌関連疾患細胞の単一サンプルの一部、患者から得られた結腸癌関連疾患細胞のプールされたサンプル、結腸癌関連疾患細胞株の細胞などであることができる。

40

【0309】

一つの態様において、サンプルは患者から得られた結腸癌関連疾患細胞であり、多様な結腸癌関連疾患を抑制することについて有効であると信じられている複数の化合物を、患者の結腸癌関連疾患を最もよく抑制するであろう化合物を同定するために試験した。

50

【0310】

この方法は同様に、患者において結腸癌関連疾患を抑制するための療法の効力を評価するために使用することができる。この方法において、対（一方は療法を受けさせ、他方は療法を受けさせなかった）のサンプル中の一つ又はそれより多くのマーカーの発現のレベルを評価した。試験化合物の効力を評価する方法のように、もし該療法がマーカーの発現の有意に低いレベルを誘導すれば、該療法は結腸癌関連疾患を抑制について有効である。上記のように、選択された患者からのサンプルがこの方法で使用されるなら、該患者の結腸癌関連疾患を抑制するために最も有効であるらしい療法を選択するため、代替療法をインビトロで評価することが可能である。

【0311】

上記のように、ヒト結腸細胞の異常状態は、該マーカーの発現のレベルにおける変化と相関する。試験化合物の有害な可能性を評価する方法も提供される。この方法は、試験化合物の存在下又は不存在下でヒト結腸細胞の分離した一定分量を維持することを含んでなる。各一定分量中のマーカーの発現が比較される。試験化合物の存在下で維持された一定分量におけるマーカー発現の有意に高いレベル（試験化合物の不存在下で維持された一定分量と比べて）は、試験化合物が有害である可能性を有する指標である。多様な試験化合物の相対的有害可能性は、発現のレベルは、関連マーカーの発現レベルの増強又は抑制の程度を比較することにより、増強された又は抑制されたマーカーの数を比較することにより、又は両方を比較することにより評価し得る。

【0312】

多様な側面が、以下の副節により詳細に説明されている。

単離されたタンパク質及び抗体

一つの側面は、単離されたマーカータンパク質及びそれらの生物学的に活性な部分、ならびに、マーカータンパク質又はそれらの断片に対して方向付けられた抗体を上昇させるための免疫原として使用するのに適したポリペプチド断片に関する。一つの態様において、天然のマーカータンパク質は、標準タンパク質精製技術を使用する、適切な精製スキームにより、細胞又は組織源から単離し得る。別の態様において、マーカータンパク質の全体又はセグメントを含んでなるタンパク質又はペプチドが、組換えDNA技術により産生される。組換え発現の代わりに、こうしたタンパク質又はペプチドは、標準ペプチド合成技術を使用して化学的に合成し得る。

【0313】

「単離された」又は「精製された」タンパク質又はそれらの生物学的に活性な部分とは、タンパク質が誘導された細胞又は組織源からの細胞材料又は他の夾雑タンパク質を含んでいないか、又は化学的に合成された場合、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含んでいない。言語「実質的に細胞材料を含んでいない」とは、該タンパク質が単離された又は組換え的に産生された細胞の細胞性成分から分離されたタンパク質の調製物を含む。従って、実質的に細胞材料を含んでいないタンパク質には、約30%、20%、10%、又は5%（乾燥重量による）未満の異種タンパク質（本明細書において夾雑タンパク質とも称される）を有するタンパク質の調製試料が含まれる。

【0314】

タンパク質又はそれらの生物学的に活性な部分が組換え的に産生される場合、培養培地を実質的に含んでいないのが好ましい、即ち、培養培地は、タンパク質調製試料の約20%、10%、又は5%未満の量に相当する。タンパク質が化学合成により生成される場合、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含んでいないのが好ましく、即ち、それは、該タンパク質の合成に関与した化学的前駆体又は他の化学物質から分離されている。従って、こうしたタンパク質の調製試料は、約30%、20%、10%、5%（乾燥重量）未満の、化学的前駆体又目的のポリペプチド以外の化合物しか含んでいない。

【0315】

マーカータンパク質の生物学的に活性な部分には、マーカータンパク質のアミノ酸配列と十分に同一である又はマーカータンパク質のアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含んでなるポリペプチドが含まれ、それは、完全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、及び対応する完全長タンパク質の少なくとも一つの活性を示す。典型的には、生物学的に活性な部分是对应する完全長タンパク質の少なくとも一つの活性を有するドメイン又はモチーフを含んでなる。マーカータンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100又はそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。さらに、マーカータンパク質の他の領域が欠損する他の生物学的に活性な部分は、組換え技術により調製することが可能であり、マーカータンパク質の天然形態の機能活性の一つ又はそれより多くを評価する。ある態様において、有用なタンパク質は、これらの配列の一つと実質的に同一であり（例えば、少なくとも約40%、及びある態様において、50%、60%、70%、80%、90%、95%又は99%）、天然のアレル変異又は変異発生によりアミノ酸配列は異なっているが、対応する天然に存在するマーカータンパク質の機能的活性を保持している。

10

【0316】

加えて、マーカータンパク質のセグメントのライブラリーを、スクリーニング及び続いでの変異体マーカータンパク質又はそれらのセグメントの選択のためのポリペプチドの変化に富んだ集団を発生させるために使用し得る。

【0317】

予測医薬

予測医薬の分野における動物モデル及びマーカーの使用も本明細書において提供され、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノミクス及び臨床試験のモニタリングが予後（予測）目的のために使用され、それにより個体を予防的に治療する。従って、個体が結腸癌関連疾患を発症するリスクを有するかどうかを決定するため、一つ又はそれより多くのマーカータンパク質又は核酸の発現のレベルを決定するための診断アッセイも本明細書において提供される。こうしたアッセイは、予後の又は予測目的のために使用され、それにより結腸癌関連疾患の発症に先立って個体を予防的に治療する。

20

【0318】

別の側面において、該方法は少なくとも同一個体の定期的スクリーニングに有用であり、彼/彼女の発現パターンを変化させる化学物質又は毒物に、個体が暴露されたかどうか判る。

【0319】

さらに別の側面は、臨床試験におけるマーカーの発現又は活性に対する剤（例えば、結腸癌関連疾患を抑制するために又はいずれか他の障害を治療するため又は予防するために投与された薬剤又は他の化合物、例えば、こうした治療が有することができる何らかのシステム効果を理解するために）の影響をモニタリングすることに関する。

30

【0320】

薬理ゲノミクス

該マーカーは、薬理ゲノミクスマーカーとしても有用である。本明細書で使用される「薬理ゲノミクスマーカー」は、その発現レベルが、患者の特異的臨床薬剤応答又は感受性と相関する客観的な生化学的マーカーである。薬理ゲノミクスマーカー発現の存在又は量は、患者の予測応答、及びより特定のには、特異的薬剤又は薬剤のクラスによる療法に対する患者腫瘍の予測応答に関連する。患者における一つ又はそれより多くの薬理ゲノミクスマーカーの発現の存在又は量を評価することにより、患者に最も適切である、又はより大きな成功度を有すると予測される薬剤療法を選択することができる。

40

【0321】

臨床試験のモニタリング

マーカーの発現のレベルに対する剤（例えば、薬剤化合物）の影響をモニタリングは、基礎的薬剤スクリーニングのみでなく、臨床試験においても適応し得る。例えば、マーカー発現に影響する剤の有効性は、結腸癌関連疾患の治療を受けている対象の臨床試験でモニターし得る。

【0322】

50

一つの非制限態様において、本発明は剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣剤、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、又は他の薬剤候補）による対象の治療の有効性をモニタリングするための方法を提供し、（i）剤の投与に先だって、対象から投与前サンプルを得ること；（ii）投与前サンプル中の、一つ又はそれより多くの選択されたマーカーの発現のレベルを検出すること；（iii）対象から一つ又はそれより多くの投与後サンプルを得ること；（iv）投与後サンプル中のマーカー（単数又は複数）の発現のレベルを検出すること；（v）投与前サンプル中の、マーカー（単数又は複数）の発現のレベルと投与後サンプル中の、マーカー（単数又は複数）の発現のレベルを比較すること；及び（vi）それに合わせて、対象への剤の投与を変化させること；の工程を含んでなる。

10

【0323】

例えば、治療の過程間のマーカー遺伝子（単数又は複数）の増加した発現は、有効ではない用量を示し、望ましくは用量を増加させる。反対に、マーカー遺伝子（単数又は複数）の減少した発現は、有効な治療を示し、用量を変化させる必要はない。

【0324】

電子装置可読媒体、システム、配列及びそれを用いた方法

本明細書で使用される「電子装置可読媒体」はデータ又は情報の読み出しおよび電子装置により直接的にアクセスし得る、いかなる適した記憶、保持又は維持媒体も指す。こうした媒体は以下のものに限定されるわけではないがフロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記憶媒体、及び磁気テープのような、磁気記憶媒体、コンパクトディスクのような光学記憶媒体、RAM、ROM、EPROM、EEPROMなどのような電子記憶媒体、及び一般的なハードディスク及び磁気／光学記憶媒体などのこれらのカテゴリーの混成物を含み得る。媒体は本明細書に記載された通り、それにマーカーが記録されるよう適合又は設定した。

20

【0325】

本明細書で使用される、用語「電子装置」はいかなる適切な演算又は処理装置、又は他のデータ又は情報を貯蔵するよう設計および適合した装置を含む意味である。本発明で用いるに適した電子装置は、独立型コンピューター装置、ローカルエリアネットワーク（LAN）、ワイドエリアネットワーク（WAN）インターネット含むネットワーク、インターネット、イントラネット及びエクストラネット、個人用デジタル補助装置のような電子機器（PDAs）、携帯電話、ポケベルなど、ローカル及び分散型処理システムを含む。

30

【0326】

本明細書で使用される、「記録」は、電子装置可読媒体上に情報を貯蔵又はエンコードするプロセスを指す。当事者はいかなる方法で媒体上の記録された情報を即座に採択し、本明細書に記載されたマーカーを含んでなる物質を生成し得る。

【0327】

さまざまなソフトウェアプログラム及びフォーマットは、本発明のマーカー情報を電子装置可読媒体上に貯蔵するために使用し得る。無数のデータ処理装置を構成するフォーマット（例えば、テキストファイル又はデータベース）を、その上にマーカーを記録できる媒体を得る又は作製するために採用することができる。マーカーを可読なフォームで供給することで、マーカー配列情報にさまざまな目的でごく普通にアクセスし得る。例えば、当事者はヌクレオチド又はアミノ酸配列を可読なフォームで取り出し、ターゲットの配列又はターゲットの構造モチーフと貯蔵された配列情報をこのデータ貯蔵手段の中で比較し得る。特定のターゲット配列又はターゲットモチーフに一致する、配列の断片又は領域を同定するために検索手段を用いる。

40

【0328】

従って、実行することで、ここに対象が結腸癌関連疾患あるいは素因結腸癌関連疾患が決定する方法、どのようにしてその方法がマーカーの存在又は不在を決定する段階を含んでなるか、対象は結腸癌関連疾患又は結腸癌関連疾患への素因体内動態及び／又は結腸癌関連疾患又は素因結腸癌関連疾患状態に対する特定の治療を推奨する、保持命令のための

50

媒体を提供する。

【0329】

対象が結腸癌関連疾患又はマーカーに関連する結腸癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するための、電子システム及び／又はネットワーク中の、方法も本明細書において提供され、該方法は、マーカーの存在又は不存在を決定する工程、及びマーカーの存在又は不存在に基づいて、該対象が結腸癌関連疾患又は結腸癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定し、及び／又は結腸癌関連疾患又は前結腸癌関連疾患状態についての特定の治療を推奨する工程を含んでなる。該方法はさらに、対象に関連する表現型情報を受け取る、及び該対象に関連する表現型情報をネットワークから獲得する。

【0330】

対象が結腸癌関連疾患又はマーカーに関連する結腸癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するための、ネットワーク、方法も本明細書において提供され、該方法は、マーカーに関連する情報を受け取ること、対象に関連する表現型情報を受け取ること、マーカー及び／又は結腸癌関連疾患に対応する情報をネットワークから獲得すること、及び一つ又はそれより多くの表現型情報、マーカー、及び獲得した情報に基づいて、対象が結腸癌関連疾患又はマーカーに関連する結腸癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定すること、の工程を含んでなる。該方法は、結腸癌関連疾患又は前結腸癌関連疾患状態についての特定の治療を推奨する工程をさらに含んでなる。

【0331】

対象が結腸癌関連疾患又は結腸癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定するためのビジネス方法も本明細書において提供され、該方法は、マーカーに関連する情報を受け取ること、対象に関連する表現型情報を受け取ること、マーカー及び／又は結腸癌関連疾患に対応する情報をネットワークから獲得すること、及び一つ又はそれより多くの表現型情報、マーカー、及び獲得した情報に基づいて、対象が結腸癌関連疾患又はマーカーに関連する結腸癌関連疾患の素因を有するかどうかを決定すること、の工程を含んでなる。該方法は、結腸癌関連疾患又は前結腸癌関連疾患状態についての特定の治療を推奨する工程をさらに含んでなる。

【0332】

アレイ中の一つ又はそれより多くの遺伝子の発現をアッセイするために使用し得るアレイも本明細書において提供される。一つの態様において、該アレイは、組織における遺伝子発現をアッセイするために使用することが可能であり、アレイ中の遺伝子の組織特異性が確認される。このようにして、約7000までの又はそれ以上の遺伝子が発現について同時にアッセイし得る。このことは、一つ又はそれより多くの組織で特異的に発現された遺伝子の集団を示しているプロファイルが展開されるのを可能にする。

【0333】

こうした定性的決定に加え、遺伝子発現の定量化が本明細書において提供される。従って、組織特異性のみならず、組織中の遺伝子の集団の発現レベルも確認可能である。従って、遺伝子は、それらの組織発現それ自体及びその組織中での発現のレベルに基づいてグループ化し得る。このことは、例えば、組織間又は組織のうちでの遺伝子発現の関係を確認することにおいて有用である。従って、一つの組織を攪乱させることが可能であり、そして第二の組織中の遺伝子発現に対する効果を決定し得る。これに関連して、生物学的刺激に応答した、別の細胞タイプに対する一つの細胞タイプの影響を決定し得る。

【0334】

こうした決定は、例えば、遺伝子発現レベルでの細胞間相互作用の効果をj知る上で有用である。もし一つの剤が、一つの細胞タイプを治療するために療法的に投与されて、別の細胞タイプに望まれない効果を有しているならば、本方法は、望まれない効果の分子基盤を決定するアッセイを提供し、及びそれ故、相殺する剤を同時投与する、さもなければ望まれない効果を治療する機会を提供する。同様に、単一細胞タイプ内でも、望まれない生物学的効果を分子レベルで決定し得る。それ故、標的遺伝子以外の発現に対する、一つの剤の効果を確認及び相殺することが可能である。

10

20

30

40

50

【0335】

別の態様において、該アレイは、アレイにおける一つ又はそれより多くの遺伝子の発現の時間経過をモニターするために使用し得る。このことは、本明細書に開示したように、多様な生物学的状況で起こることができる；例えば、結腸癌関連疾患の発症、結腸癌関連疾患の進行、及び結腸癌関連疾患に関連する細胞形質転換のようなプロセス。

【0336】

該アレイは、同一細胞における、又は異なった細胞における遺伝子の発現又は他の遺伝子の発現の効果を確認するために有用である。このことは、例えば、もし最終又は下流病的を調節できないならば、治療介入のための代替分子標的の選択を提供する。

【0337】

該アレイは、正常及び異常細胞における一つ又はそれより多くの遺伝子の差次的発現パターンを確認するためにも有用である。このことは、診断又は治療介入のための分子標的として働くことができない遺伝子の集団を提供する。

【0338】

代理マーカー

該マーカーは、一つ又はそれより多くの障害又は疾患状態のための、又は結腸癌関連疾患状態を導く条件のための代理マーカーとして働くことができる。本明細書で使用される「代理マーカー」は、疾患又は障害の不存在又は存在に、又は疾患又は障害の進行に相関する、客観的生化学的マーカーである。それ故、これらのマーカーは、治療の特定の経過が、疾患状態又は障害の軽減することに有効であるかどうかを示すために働くことができる。代理マーカーは、疾患状態又は障害の存在又は程度が標準方法論ではアクセスすることが困難である場合、又は危険な臨床的エンドポイントに到達する可能性がある前に疾患進行の評価が望まれる場合に特別に使用される。

【0339】

該マーカーは、薬力学的マーカーとしても有用である。本明細書で使用される「薬力学的マーカー」は、薬剤効果と特異的に相関する客観的生化学的マーカーである。薬力学的マーカーの存在又は量は、薬剤が投与された疾患状態又は障害とは関係していない；それ故、該マーカーの存在又は量は、対象中の薬剤の存在又は活性の指標である。例えば、薬力学的マーカーは、生物学的組織中の薬剤の濃度の指標であることができ、そこでマーカーは、薬剤のレベルと関連して、発現され又は転写されるか、又はその組織中で発現されず又は転写されない。この様式で、薬剤の分布又は取り込みが薬力学的マーカーによりモニターすることができる。同様に、力学的マーカーの存在又は量は、該マーカーの存在又は量が、インビボでの薬剤の相対分解速度の指標であるように、薬剤の代謝生成物の存在又は量に関連させることができる。

【0340】

薬力学的マーカーは、薬剤効果の検出の感度を増加させることにおいて、特に薬剤が低用量で投与される場合に特別に使用される。少量の薬剤でさえも、マーカー転写又は発現の多数の経路を活性化するには十分であることができるため、増幅されたマーカーは多量にあり、それは薬剤それ自身よりも容易に検出可能である。また、該マーカーはマーカーそれ自身の性質のため、より容易に検出することができる；例えば、本明細書に記載した方法を使用し、抗体をタンパク質マーカーのための免疫に基づいた検出システムで用いることができ、又はマーカー特異的放射標識プローブをmRNAマーカーの検出に使用することができる。さらに、薬力学的マーカーの使用は、可能な直接観察を超えた薬剤治療によるリスクの機構に基づいた予測を与えることができる。

【0341】

試験のプロトコル

結腸癌関連疾患の試験法は、例えば、対象由来の生体サンプル中の、各マーカー遺伝子の発現レベルを時間とともに測定すること、および対照生体サンプル中のマーカー遺伝子とレベルを比較することを含んでなる。

【0342】

マーカー遺伝子が本明細書に記載された遺伝子の内の一つで、発現レベルは異なった形で現れる場合（例えば、対照の場合より高い又はより低い）、対象は結腸癌関連疾患の影響を受けたと判断される。マーカー遺伝子の発現レベルが許容範囲内に落ちる場合は、対象結腸癌関連疾患の影響を受けない傾向がある。

【0343】

対照に対する標準値は、発現レベルを比較するために、対照中マーカー遺伝子の発現レベルを測定することで前もって決定できる。例えば標準値は、上述した対照中マーカー遺伝子の発現レベルに基づいて決定し得る。例えば特定の態様において、許容範囲を標準値に基づいて $\pm 2S.D.$ とする。一度標準値が決定されると、試験法は対照由来生体サンプル中の発現レベルの測定を行い、その値と対照に対して決定された標準値を比較できる。

10

【0344】

マーカー遺伝子の発現レベルはマーカー遺伝子からmRNAへの転写、およびタンパク質への翻訳を含む。したがって、結腸癌関連疾患の試験法はマーカー遺伝子に相当するmRNAの発現強度、またはマーカー遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルの強度を比較し、それに基づいて行なう。

【0345】

結腸癌関連疾患に対する試験中のマーカー遺伝子の発現レベル測定は、様々な遺伝子解析法に基づいて行なうことができる。具体的には、例えばそれらの遺伝子とハイブリダイゼーションする核酸をプローブとして用いるハイブリダイゼーション技術、あるいはマーカー遺伝子とハイブリダイズするDNAをプライマーとして用いた遺伝子増幅技術を使用し得る。

20

【0346】

試験に用いるプローブ又はプライマーは、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて設計し得る。それぞれのマーカー遺伝子のヌクレオチド配列に対する識別番号は、本明細書に記載されている。

【0347】

さらに、高等生物はほとんどの場合、高い頻度で遺伝子多型を伴うことが理解されるべきである。また、スプライシングプロセスの間、相互に異なるアミノ酸配列を含んでなるアイソフォームを産生する分子がある。マーカー遺伝子と同様の活性を有する結腸癌関連疾患に関連するいずれの遺伝子も、たとえヌクレオチド配列が遺伝子多型による相違又はアイソフォームを有しても、マーカー遺伝子に含まれる。

30

【0348】

マーカー遺伝子はヒトに加え他の種の相同体も含むことができると理解されるべきである。従って、特に規定しない限り、「マーカー遺伝子」発現は、種に固有のマーカー遺伝子、又は個々に導入された外来のマーカー遺伝子の相同体を指す。

【0349】

「マーカー遺伝子の相同体」はストリンジェント条件下でプローブとしてヒトマーカー遺伝子とハイブリダイズできるヒト以外の種由来の遺伝子も指すと理解されるべきである。こうしたストリンジェント条件は、実験的に又は経験的に同様のストリンジェンシーを産生する適切な条件を選択できる当業者において公知である。

40

【0350】

マーカー遺伝子のヌクレオチド配列又は少なくとも15のヌクレオチドを有するマーカー遺伝子のヌクレオチド配列の相補鎖に相補的なヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドは、プライマー又はプローブとして使用し得る。従って、「相補鎖」は他の一本鎖に対して二本鎖DNAの一本鎖を意味し、A:T(RNAに対してはU)およびG:C塩基対から構成される。

【0351】

さらに、「相補的」は少なくとも15の連続したヌクレオチド領域に対して完全に相補的なもののみでなく、場合によってはヌクレオチド配列相同性少なくとも40%、場合に

50

よっては50%、場合によっては60%、場合によっては70%、少なくとも80%、90%、及び95%又はそれ以上のものも意味する。ヌクレオチド配列間の相同性の程度はBLASTなどのアルゴリズムによって決定し得る。

【0352】

こうしたポリヌクレオチドはマーカー遺伝子を検出するプローブ又はマーカー遺伝子を増幅するプライマーとして有用である。プライマーとして用いる場合は、ポリヌクレオチドは通常15bp~100bp、及び特定の態様においてヌクレオチドの15bp~35bpを含んでなる。プローブとして用いる場合は、DNAはマーカー遺伝子の全ヌクレオチド配列（又はその相補鎖）、又は少なくとも15bpのヌクレオチドを有するその部分的配列を含んでなる。プライマーとして用いる場合は、3'領域はマーカー遺伝子に対して相補的でなくてはならず、一方5'領域は制限酵素認識配列又はタグと連結し得る。

10

【0353】

「ポリヌクレオチド」はDNA又はRNAのどちらでもよい。これらのポリヌクレオチドは合成又は天然起源のどちらでもよい。また、ハイブリダイゼーション用のプローブとして用いるDNAは通常標識化されている。当事者は直ちにこうした標識化法を理解する。ここに、用語「オリゴヌクレオチド」は、相対的に低い重合度のポリヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドはポリヌクレオチドに含まれる。

【0354】

ハイブリダイゼーション法を用いた結腸癌関連疾患試験は、例えばノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、又はDNAマイクロアレイ技術などを用いて実施し得る。さらに、RT-PCR法のような遺伝子増幅技術も使用できる。RT-PCRの遺伝子増幅段階でのPCR増幅モニタリング法を使用することで、マーカー遺伝子の発現のより定量的な解析を成し得る。

20

【0355】

PCR遺伝子増幅モニタリング法において、検出ターゲット（DNA又はRNAの逆転写体）は蛍光色素及び蛍光体に吸着する消光剤で標識したプローブとハイブリダイゼーションする。PCRが進行してTaqポリメラーゼが5'~3'エキソヌクレアーゼ活性有するプローブを分解すると、蛍光色素及び消光剤は互いに引き離れ、蛍光が検出される。蛍光はリアルタイムで検出される。標的のコピー数が不明な標準サンプルを同時に測定することにより、PCR増幅が直線状の場合、対象サンプル中の標的のコピー数をサイクル数と共に求めることができる。また、当事者はPCR増幅モニタリング法がどの適切な手法を用いて実行できるものか認識し得る。

30

【0356】

結腸癌関連疾患の試験法はマーカー遺伝子でコードしたタンパク質を検出することでもまた、実行し得る。下文に、マーカー遺伝子でコードしたタンパク質を「マーカータンパク質」として記載する。こうした試験法として、例えば、各マーカー遺伝子に結合する抗体を用いたウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、及びELISA法が採用できる。

【0357】

検出に用いるマーカータンパク質に結合する抗体は、どの適切な技術でも産生できる。また、マーカータンパク質を検出するために、こうした抗体を適切に標識できる。代わりに、抗体を標識せずに、抗体に特異的結合する物質、例えば、タンパク質A又はタンパク質Gを標識化してマーカータンパク質を間接的に検出できる。より具体的に言うと、こうした検出法はELISA法を含み得る。

40

【0358】

抗原として用いたタンパク質又はその部分的ペプチドを、例えば、マーカー遺伝子又はその一部を発現ベクターに挿入し、構成物を適切な宿主細胞に導入して形質転換細胞を産生し、形質転換細胞を培養して組み換えタンパク質を発現し、その発現した組み換えタンパク質を培地または培地の上清から精製した。代わりに、遺伝子でコードしたアミノ酸配列、又は全長のcDNAでコードしたアミノ酸配列の一部を含んでなるオリゴペプチド

50

を免疫源として用いるために化学合成した。

【0359】

さらに、結腸癌関連疾患の試験はマーカー遺伝子の発現レベルの指標のみならず、生体サンプル中のマーカータンパク質の活性の指標として使用し得る。マーカータンパク質の活性はタンパク質への生物学的固有活性を意味する。多様な方法が、各タンパク質の活性を測定するために使用し得る。

【0360】

たとえ患者が定期試験で症状が示されているにも関わらず結腸癌関連疾患に罹患していないと診察されても、こうした患者が結腸癌関連疾患に苦しんでいるがいまいが、本明細書に記載された方法によれば、試験を行なうことで容易に決定し得る。

10

【0361】

より具体的に言うと、特定の態様において、マーカー遺伝子が本明細書に記載された遺伝子の一つの場合、症状が結腸癌関連疾患を示すと少なくとも疑わしい患者の、マーカー遺伝子の発現レベルの増加又は減少は、症状が主に結腸癌関連疾患によるものであることを示している。

【0362】

加えて、本試験は結腸癌関連疾患が患者内で進行しているかどうか決定する上で有用である。言い換えると、本明細書に記載された方法は結腸癌関連疾患に対する処置の治療効果を判断し得る。さらに、マーカー遺伝子が本明細書に記載された遺伝子の一つの場合、結腸癌関連疾患に罹患した症状を有する患者のマーカー遺伝子の発現レベルの増加又は減少は、疾病がより進行していることを暗示する。

20

【0363】

結腸癌関連疾患に対する重症度及び／又は感受性はまた、発現レベルの違いに基づいて決定することができる。例えば、マーカー遺伝子が本明細書に記載された遺伝子の一つの場合、マーカー遺伝子の発現レベルの増加は、結腸癌関連疾患の存在及び／又重症度と関連する。

【0364】

動物モデル

別の側面において、結腸癌関連疾患のための動物モデルが本明細書において提供され、一つ又はそれより多くのマーカー遺伝子又はマーカー遺伝子の機能的に均等な遺伝子の発現レベルは該動物モデルにおいて上昇されている。本明細書で使用される「機能的に均等な遺伝子」とは、一般的に、マーカー遺伝子によりコードされたタンパク質の既知の活性と同様の活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である。機能的に均等な遺伝子の代表的例には、該動物に固有である対象動物のマーカー遺伝子のカウンターパートが含まれる。

30

【0365】

結腸癌関連疾患についての動物モデルは、結腸癌関連疾患による生理学的変化を検出するために有用である。ある態様において、該動物モデルは、マーカー遺伝子の追加の機能を明らかにするため、及び標的がマーカー遺伝子である薬剤を評価するために有用である。

40

【0366】

一つの態様において、結腸癌関連疾患のための動物モデルは、カウンターパート遺伝子の発現レベルを制御することにより、又はカウンターパート遺伝子を投与することにより作製し得る。該方法は、本明細書に記載した遺伝子のグループから選択される遺伝子の発現レベルを制御することにより、結腸癌関連疾患のための動物モデルを作製することを含み得る。別の態様において、該方法は、本明細書に記載された遺伝子によりコードされたタンパク質を投与することにより、又は該タンパク質に対する抗体を投与することにより、結腸癌関連疾患のための動物モデルを作製することを含み得る。ある他の態様において、該マーカーが適切な方法を使用して測定できるように、該マーカーを過剰発現させることが可能であることも理解すべきである。

50

【 0 3 6 7 】

別の態様において、結腸癌関連疾患のための動物モデルは、遺伝子のこうしたグループから選択される遺伝子を導入することにより、又はこうした遺伝子によりコードされたタンパク質を投与することにより作製し得る。

【 0 3 6 8 】

別の態様において、結腸癌関連疾患は、遺伝子のこうしたグループから選択される遺伝子の発現を、又はこうした遺伝子によりコードされたタンパク質の活性を抑制することにより誘発することが可能である。アンチセンス核酸、リボザイム、又はRNAiが該発現を抑制するために使用し得る。タンパク質の活性は、抗体のような、活性を抑制する物質を投与することにより効果的に制御し得る。

10

【 0 3 6 9 】

該動物モデルは、結腸癌関連疾患の根底にある機構を評価するため、及びスクリーニングにより得られた化合物の安全性を試験するために有用である。例えば、動物モデルが結腸癌関連疾患の症状を発症した場合、又はある種の結腸癌関連疾患に関連する測定値が動物中で変化した場合、疾患を寛解する活性を有する化合物を探索するため、スクリーニングシステムを構築し得る。

【 0 3 7 0 】

本明細書で使用される表現「発現レベルの増加」とは、以下のいずれか一つを指す：外来遺伝子として導入されたマーカー遺伝子が人工的に発現された場合；対象動物に固有のマーカー遺伝子の転写及びタンパク質へのそれらの翻訳が増強された場合；翻訳生成物であるタンパク質の加水分解が抑制された場合。本明細書で使用される表現「発現レベルの減少」とは、対象動物のマーカー遺伝子の転写、及びタンパク質へのそれらの翻訳が抑制された状態、又は翻訳産物である該タンパク質の加水分解が増強された状態を指す。遺伝子の発現レベルは、例えば、DNAチップ上のシグナル強度の相違により決定し得る。さらに、翻訳産物（タンパク質）の活性は、正常状態のものと比較することにより決定し得る。

20

【 0 3 7 1 】

該動物モデルはトランスジェニック動物を含むことも企図された範囲内であり、例えば、マーカー遺伝子が導入されており、そして人工的に発現される動物；マーカー遺伝子ノックアウト動物；及び別の遺伝子でマーカー遺伝子が置換されているノックイン動物。マーカー遺伝子のアンチセンス核酸、リボザイム、RNAi効果を有するポリヌクレオチド、又はデコイ核酸として機能するDNA、が導入されているトランスジェニック動物がトランスジェニック動物として使用できる。こうしたトランスジェニック動物には、例えば、遺伝子のコード領域内に突然変異を導入すること、又はアミノ酸配列が修飾されて加水分解に対して抵抗性又は感受性となることにより、マーカータンパク質の活性が増強されている又は抑制されている動物が含まれる。アミノ酸配列中の突然変異には、置換、欠失、挿入及び付加が含まれる。

30

【 0 3 7 2 】

加えて、マーカー遺伝子の発現それ自身を、該遺伝子の転写調節領域中に突然変異（単数又は複数）を導入することにより制御し得る。当業者はこうしたアミノ酸置換を理解している。また、活性が維持されている限り、変異されたアミノ酸の数は特に制限されない。通常、それは50アミノ酸以内、ある非制限態様においては30アミノ酸以内、10アミノ酸以内又は3アミノ酸以内である。突然変異の部位は、活性が維持されている限り、いずれの部位であってもよい。

40

【 0 3 7 3 】

さらに別の側面において、結腸癌関連疾患を治療する療法剤のための候補化合物についてのスクリーニング法が提供される。一つ又はそれより多くのマーカー遺伝子が本明細書に記載した遺伝子の群から選択された。結腸癌関連疾患のための治療薬は、マーカー遺伝子（単数又は複数）の発現レベルを増加させる又は減少させることが可能な化合物を選択することにより得ることが可能である。

50

【 0 3 7 4 】

表現「遺伝子の発現レベルを増加させる化合物」は、遺伝子転写、遺伝子翻訳又はタンパク質活性の発現の工程を促進する化合物を指す。一方、本明細書で使用される表現「遺伝子の発現レベルを減少させる化合物」は、これらの工程のいずれか一つを阻害する化合物を指す。

【 0 3 7 5 】

特定の側面において、結腸癌関連疾患の療法剤についてのスクリーニング法は、インビボか又はインビトロで実施し得る。このスクリーニング法は、例えば、(1)候補化合物を動物対象に投与すること；(2)動物対象からの生物学的サンプル中のマーカー遺伝子(単数又は複数)の発現レベルを測定すること；又は(3)候補化合物に接触されていない対照中のレベルと比較し、マーカー遺伝子(単数又は複数)の発現レベルを増加させる又は減少させる化合物を選択すること、により実施することが可能である。

10

【 0 3 7 6 】

さらに別の側面において、動物対象と候補化合物を接触させ、そして該動物対象に由来するサンプル生物学的サンプル中のマーカー遺伝子(単数又は複数)の発現レベルに対する化合物の効果をモニタリングすることにより、マーカー遺伝子(単数又は複数)の発現レベルに対する医薬品のための候補化合物の効力を評価する方法が本明細書において提供される。該動物対象に由来するサンプル生物学的サンプル中のマーカー遺伝子(単数又は複数)の発現レベルにおける変動は、上記の試験法に使用した同一技術を使用してモニターすることが可能である。さらに、評価に基づいて、医薬品のための候補化合物をスクリーニングにより選択することが可能である。

20

【 0 3 7 7 】

本明細書で引用したすべての特許、特許出願及び参照文献は、その全体が本明細書において援用される。本発明は当業者がそれを作製する及び使用するのに十分に詳細に説明され及び例示されてきたが、本発明の精神及び範囲から離れることなく、多様な変更、修飾及び改善ができるのは明らかなはずである。本発明は、課題を実行し、そして記述した目的及び利点、ならびにここに固有のものを得るためにうまく適用されることを、当業者は容易に理解する。

【 0 3 7 8 】

本明細書に記載された方法及び試薬は、好ましい態様を代表するものであり、例示であり、本発明の範囲の制限を意図するものではない。その中の修飾及び他の使用が当業者には生じるであろう。これらの修飾は本発明の精神内に包含されており、特許請求の範囲により規定されている。本発明の精神及び範囲から離れることなく、様々な置換および修飾をここに開示した発明に行えることができることが、当業者には容易に明らかになるであろう。

30

【 0 3 7 9 】

本発明は好ましい態様及び任意選択の特色により具体的に開示されてきたが、本明細書で開示された概念の修飾及び変形は、当業者に依存することができ、及びこうした修飾及び変形は、付随する特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内であると考えられる。

40

【 0 3 8 0 】

実施例 1 の参照文献

1. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. World Health Organization classification of tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon Oxford: IARC Press; 2000:104-19.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007;57(1):43-66.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990;61(5):759-67.

50

4. Goldman E, Fisher JL. Discrepancies in cancer mortality estimates. *Arch Med Res* 2006;37(4): 548-51.
5. Rodriguez-Bigas MA, Hoff P, Crane CH. Carcinoma of the Colon and Rectum. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, et al., eds. *Holland-Frei Cancer Medicine* 7. 7th ed. Hamilton, Ont: BC Decker Inc; 2006:1369-91.
6. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):857-66.
7. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353(17): 1793-801. 10
8. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9(3): 189-98.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-54.
11. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75(5):855-62.
12. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003;113(0):25-36. 20
13. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65(14):6029-33.
14. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003;13(9):790-5.
15. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303(5654):83-6.
16. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435(7043):828-33. 30
17. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):259-69.
18. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(7): 2257-61.
20. Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(10):3687-92. 40
21. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006;5:29.
22. Michael MZ, Smith OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1(12):882-91.
23. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(24): 15524-9.
24. Dews M, Homayouni A, Yu D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a My 50

c-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006;38(9): 1060-5.

25. Wang CL, Wang BB, Bartha G, et al. Activation of an oncogenic microRNA cluster by provirus integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(49): 18680-4.

26. Georgantas RW5 3rd, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(8):2750-5.

27. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007;67(3):976-83.

28. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J* 2006.

29. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs*. *Nature* 2005;438(7068):685-9.

30. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9740-4.

31. Kang H5 O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2005;48(6):1618.

32. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004;339(2):327-35.

33. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y5 et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005;65(21):962832.

34. Iorio MV5 Ferracin M5 Liu CG5 et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7065-70.

35. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z5 Wu F, Mo YY. miR-21 -mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26(19):2799-803.

36. Meng F, Henson R5 Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130(7):2113-29.

37. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007;282(19): 14328-36.

38. Brosens LA5 van Hattem WA, Jansen M5 de Leng WW, Giardiello FM, Offerhaus GJ. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Mol Med* 2007;7(1):29-46.

39. Mattes J5 Yang M5 Foster PS. Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(1):8-12.

【 0 3 8 1 】

実施例 2 の参照文献

1. American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2006.

2. Bartel, D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p.281-97.

3. Esquela-Kerscher, A. and FJ. Slack, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-69.

4. Brennecke, J., D.R. Hipmer, A. Stark, R.B. Russell, and S.M. Cohen, bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*, 2003. 113(1): p. 25-36.

5. Chan, J. A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, MicroRNA-21 is an antiapoptotic

- , factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6029-33.
6. Xu, P., S.Y. Vernooy, M. Guo, and B.A. Hay, The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*, 2003. 13(9): p. 790-5.
 7. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 843-54.
 8. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993. 75(5): p. 855-62. 10
 9. Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, and D.P. Bartel, Micro-RNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004. 303(5654): p. 83-6.
 10. He, L., J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernandez-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G.J. Hannon, and S.M. Hammond, A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 828-33.
 11. Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, and T.R. Golub, MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 834-8.
 12. Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Arbs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Torio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, and C.M. Croce, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(7): p. 2257-61. 20
 13. Cummins, J.M., Y. He, R.J. Leary, R. Pagliarini, L.A. Diaz, Jr., T. Sjoblom, O. Barad, Z. Bentwich, A.E. Szafranska, E. Labourier, C.K. Raymond, B.S. Roberts, H. Juhl, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and V.E. Velculescu, The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. 103(10): p. 3687-92.
 14. Cahn, G.A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S.E. Wojcik, M. Iorio, R. Visone, N.I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce, A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005. 353(17): p. 1793-801. 30
 15. Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R.M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G.A. Calin, C.G. Liu, C.M. Croce, and C.C. Harris, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006. 9(3): p. 189-98.
 16. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K.G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel, Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 2005. 438(7068): p. 685-9. 40
 17. Liu, C.G., G.A. Calin, B. Meloon, N. Gamliel, C. Sevignani, M. Ferracin, C.D. Dumitru, M. Shimizu, S. Zupo, M. Dono, H. Alder, F. Bullrich, M. Negrini, and C.M. Croce, An oligonucleotide microchip, for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(26): p. 9740-4.
 18. Iorio, M. V., M. Ferracin, C.G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J.P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, and C.M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7065-70. 50

19. Cheng, A.M., M.W. Byrom, J. Shelton, and L.P. Ford, Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(4): p. 1290-7.
20. Tanzer, A. and P.F. Stadler, Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*, 2004. 339(2): p. 327-35.

【図面の簡単な説明】

【0382】

本特許又は出願ファイルは少なくとも一つのカラーで仕上げられた図を含む。カラーの図を含むこの特許又は特許出願印刷物のコピーは、依頼及び必要な料金の支払い後、本事務所により提供されるであろう。

【図1-1】図1a~1g: miR-21は結腸腺癌においてより高いレベルで発現されており、より進行した腫瘍において発現が増加している。(図1a) miR-21についてのインサイチュハイブリダイゼーションを最適化し、miR-21の高い及び低い発現を識別した。ヒト腫瘍(T)中の結腸上皮細胞は、隣接する非腫瘍組織(N)と比較してより高いレベルのmiR-21を発現した。(図1c) 腫瘍組織中の結腸上皮細胞の核及び細胞質は、高倍率で、腫瘍組織においてmiR-21の有意な量を発現した。(図1e) 非腫瘍組織は、同じ倍率で、miR-21の有意な発現を示さなかった。(図1b、図1d、図1f) スクランブル対照プローブは、予測されたように、腫瘍及び非腫瘍組織の一連の切片について、低又は高倍率で有意な染色を示さなかった。スケールバー(図1c~f)は500 µMを示す。

【図1-2】図1g: miR-21はより進行した腫瘍においてより高いレベルで発現された。ドットプロットは、それぞれ対の非腺腫又は非腫瘍組織に対して規格化されている腺腫及び腫瘍発現レベルについてのmiR-21相対Ct値(定量的RT-PCRから)を表している。組織タイプは腺腫からステージI-IV腫瘍へと並べられている。バーは中心値を示している。より進行した腫瘍はmiR-21のより高い発現を有するという有意な傾向がある(並べられたグループにわたる傾向についてのノンパラメトリック検定)。

【図2】miR-21は、より進行した腫瘍においてより高いレベルで発現される。マイクロRNAマイクロアレイを使用して、miR-21発現レベルを測定した。ドットプロットは、オリジナルコホートからのマイクロRNAマイクロアレイから計算されたmiR-21 $\log_2$ (腫瘍/非腫瘍比)を表している。マイクロアレイからのプローブhsa-miR-21-prec17No1を使用して、miR-21発現を測定した。マイクロアレイに基づいたmiR-21の発現が検出されない組織は除外した。組織タイプは、TNMステージIからステージIV腫瘍へと並べられている。バーは中心値を示している。より進行した腫瘍はmiR-21のより高い発現を有するという有意な傾向がある($p = 0.04$; 並べられたグループにわたる傾向についてのノンパラメトリック検定)。

【図3a】図3a及び3b: 腫瘍中の高いmiR-21発現は、両方の独立したコホートにおいて、典型的腺癌組織構造を有する対象における悪い生存率を予測する。この分析は、粘液腺癌か又は腺扁平上皮癌組織構造を有する対象を除外した。(図3a) マイクロRNAマイクロアレイをメリーランド試験コホートに使用して、腫瘍及び非腫瘍組織のマイクロRNA発現レベルを測定した。マイクロアレイに基づいたmiR-21の発現が検出されない組織は除外した。高miR-21発現は、最高三分位値に基づいて分類した。赤線は高発現を有する個体を示し、一方緑線は低発現に対応する。非腫瘍組織については、24/69組織が高いと分類され、一方26/72腫瘍が高いと分類された。腫瘍中の高miR-21発現(右)は、悪い生存率と関連しており、一方、非腫瘍組織において関連はなかった。

【図3b】(図3b) 独立したコホートにおける、腫瘍中の高miR-21発現と予後不良の関連の検証。miR-21の発現レベルは定量的RT-PCRにより測定した。高miR-21発現は、最高三分位値に基づいている。35/103非腫瘍組織が高いと分類され、及び34/103腫瘍組織が高いと分類された。p値は、カプラン・マイヤー分析

10

20

30

40

50

からのログランク p 値である。すべての線上の x は、個体が打ち切られた時間を示している。

【図 4 a】図 4 a 及び 4 b：腫瘍中の高 mi R - 2 1 発現は両方の独立したコホートにおいて悪い生存率を予測する。この分析は腺癌組織構造にかかわらず全対象を含む。(図 4 a) マイクロ RNA マイクロアレイをメリーランド試験コホートに使用して、腫瘍及び非腫瘍組織のマイクロ RNA 発現レベルを測定した。マイクロアレイに基づいた mi R - 2 1 の発現が検出されない組織は除外した。高 mi R - 2 1 発現は、最高三分位値に基づいて分類した。赤線は高発現を有する個体を示し、一方緑線は低発現に対応する。非腫瘍組織については、26 / 74 組織が高いと分類され、一方 28 / 79 腫瘍が高いと分類された。腫瘍中の高 mi R - 2 1 発現(右)は、悪い生存率と関連しており、一方、非腫瘍組織において関連はなかった。

10

【図 4 b】(図 4 b) 独立したコホートにおける、腫瘍中の高 mi R - 2 1 発現と予後不良の関連の検証。mi R - 2 1 の発現レベルは定量的 RT - PCR により測定した。高 mi R - 2 1 発現は、最高三分位値に基づいている。37 / 111 非腫瘍組織が高いと分類され、及び 37 / 111 腫瘍組織が高いと分類された。p 値は、カプラン・マイヤー分析からのログランク p 値である。すべての線上の x は、個体が打ち切られた時間を示している。

【図 5 a】図 5 a、5 b 及び 5 c：高 mi R - 2 1 発現は、通常の腺癌組織構造を有する場合についてのアジュバント化学療法に対する応答不良に関連する。この分析は、粘液腺癌又は腺扁平上皮癌組織構造を有する対象を除いた検証コホートからの対象を含む。(図 5 a) mi R - 2 1 発現レベル及びアジュバント化学療法の受け取りによる、TNM ステージ II / III 対象の生存率と通常の腺癌組織構造の比較。77 のステージ II / III 対象について、25 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けており、28 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けていない、11 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けており、及び 13 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けていないと分類された。アジュバント化学療法の受けたステージ II / III 対象について、腫瘍中の高 mi R - 2 1 発現は悪い生存率と関連していた (p = 0.03)。

20

【図 5 b】(図 5 b) TNM ステージ II 対象と通常の腺癌組織構造の比較。33 のステージ II 対象について、8 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けており、15 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けていない、3 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けており、及び 7 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けていないと分類された。化学療法を受けたすべてのステージ II 対象は、この研究の期間中生存した。

30

【図 5 c】(図 5 c) TNM ステージ III 対象と通常の腺癌組織構造との比較。44 のステージ III 対象について、17 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けており、13 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けていない、8 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けており、及び 6 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けていないと分類された。アジュバント化学療法の受けたステージ III 対象について、腫瘍中の高 mi R - 2 1 発現は悪い生存率と関連していた (p = 0.02)。すべての線上の x は、個体が打ち切られた時間を示している。

【図 6 a】図 6 a、6 b 及び 6 c：腫瘍中の mi R - 2 1 発現及びアジュバント化学療法の受け取りと予後の間の関係を試験している、メリーランド試験コホート及び香港検証コホートの結合分析。この分析は、両方のコホートからのすべての TNM ステージ II / III 対象を含む。除外されたのは、粘液腺癌又は腺扁平上皮癌組織構造を有する個体である。左のカラムは、アジュバント療法の受け取りと予後の間の関係を分析しているカプラン・マイヤープロットを含んでいる。中央のカラムは、腫瘍中の高 mi R - 2 1 発現と予後の間の関係の分析を含んでおり、右のカラムは、化学療法及び mi R - 2 1 発現状態両方に基づいた個体を副分割している。(図 6 a) すべての TNM ステージ II / III 対象。119 のステージ II / III 対象について、40 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けており、41 は低 mi R - 2 1 及び療法を受けていない、16 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けており、及び 22 は高 mi R - 2 1 及び療法を受けていないと分類された。化学療法を受けているもの (p = 0.003)、ならびに化学療法を受けていないもの (p = 0

40

50

． 0 4) について、高 $miR-21$ 発現は悪い生存率と関連していた。

【図 6 b】(図 6 b) すべての TNM ステージ II 対象。52 のステージ II / III 対象について、10 は低 $miR-21$ 及び療法を受けており、25 は低 $miR-21$ 及び療法を受けていない、4 は高 $miR-21$ 及び療法を受けており、及び 13 は高 $miR-21$ 及び療法を受けていないと分類された。化学療法を受けている個体 ($p = 0.11$)、又は化学療法を受けていない個体 ($p = 0.06$) において、高 $miR-21$ 発現及び予後間の関係に、統計的有意差はなかった。

【図 6 c】(図 6 c) すべての TNM ステージ III 対象。67 のステージ III 対象について、30 は低 $miR-21$ 及び療法を受けており、16 は低 $miR-21$ 及び療法を受けていない、12 は高 $miR-21$ 及び療法を受けており、及び 9 は高 $miR-21$ 及び療法を受けていないと分類された。高 $miR-21$ 発現は、化学療法を受けているステージ III 対象においては悪い生存率と有意に関連するが ($p = 0.007$)、化学療法を受けていない対象においては関連していない ($p = 0.30$)。すべての線上の x は、個体が打ち切られた時間を示している。

【図 7 a】グローバル $miRNA$ プロファイルは、臨床的 TNM 病期及び生存予後と関連する。 $miRNA$ TIN 比の階層的クラスタリングは、グループ A 及びグループ B と任意に名付けられた二つのグループの形成を生じた。生じた HEAT マップ及びクラスター帰属は図 7 a に示されている。

【図 7 b】これらの二つのグループは、TNM 病期について有意に異なった生存予後を有する個体から成っており、グループ B 個体はグループ A 個体と比較してステージ III 又は IV とより診断されやすいようである (図 7 b)。

【図 7 c】カプラン・マイヤー分析は、グループ B 個体がより悪い生存予後を有することも示している (図 7 c)。

【図 8 a】図 8 a ~ 8 i : 個々の $miRNA$ の TIN 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の $miRNA$ の各々について、TNM 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による TIN 比を示しているグラフである。Y 軸 (TNM 病期グラフによる TIN 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 TIN 比であり、一方、Y 軸は TNM 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 TIN 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の $miRNA$ についての TIN 比データを有するすべての個体を含む。我々は、TIN 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 b】図 8 a ~ 8 i : 個々の $miRNA$ の TIN 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の $miRNA$ の各々について、TNM 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による TIN 比を示しているグラフである。Y 軸 (TNM 病期グラフによる TIN 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 TIN 比であり、一方、Y 軸は TNM 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 TIN 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の $miRNA$ についての TIN 比データを有するすべての個体を含む。我々は、TIN 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 c】図 8 a ~ 8 i : 個々の $miRNA$ の TIN 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の $miRNA$ の各々について、TNM 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による TIN 比を示しているグラフである。Y 軸 (TNM 病期グラフによる TIN 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 TIN 比であり、一方、Y 軸は TNM 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 TIN 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の $miRNA$ についての TIN 比データを有するすべての個体を含む。我々は、TIN 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

10

20

30

40

50

【図 8 d】図 8 a ~ 8 i : 個々の *miRNA* の *TIN* 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の *miRNA* の各々について、*TNM* 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による *TIN* 比を示しているグラフである。Y 軸 (*TNM* 病期グラフによる *TIN* 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 *TIN* 比であり、一方、Y 軸は *TNM* 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 *TIN* 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の *miRNA* についての *TIN* 比データを有するすべての個体を含む。我々は、*TIN* 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 e】図 8 a ~ 8 i : 個々の *miRNA* の *TIN* 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の *miRNA* の各々について、*TNM* 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による *TIN* 比を示しているグラフである。Y 軸 (*TNM* 病期グラフによる *TIN* 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 *TIN* 比であり、一方、Y 軸は *TNM* 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 *TIN* 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の *miRNA* についての *TIN* 比データを有するすべての個体を含む。我々は、*TIN* 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 f】図 8 a ~ 8 i : 個々の *miRNA* の *TIN* 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の *miRNA* の各々について、*TNM* 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による *TIN* 比を示しているグラフである。Y 軸 (*TNM* 病期グラフによる *TIN* 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 *TIN* 比であり、一方、Y 軸は *TNM* 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 *TIN* 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の *miRNA* についての *TIN* 比データを有するすべての個体を含む。我々は、*TIN* 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 g】図 8 a ~ 8 i : 個々の *miRNA* の *TIN* 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の *miRNA* の各々について、*TNM* 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による *TIN* 比を示しているグラフである。Y 軸 (*TNM* 病期グラフによる *TIN* 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 *TIN* 比であり、一方、Y 軸は *TNM* 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 *TIN* 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の *miRNA* についての *TIN* 比データを有するすべての個体を含む。我々は、*TIN* 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 h】図 8 a ~ 8 i : 個々の *miRNA* の *TIN* 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の *miRNA* の各々について、*TNM* 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による *TIN* 比を示しているグラフである。Y 軸 (*TNM* 病期グラフによる *TIN* 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 *TIN* 比であり、一方、Y 軸は *TNM* 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されている有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 *TIN* 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。カプラン・マイヤープロットは、その特定の *miRNA* についての *TIN* 比データを有するすべての個体を含む。我々は、*TIN* 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

【図 8 i】図 8 a ~ 8 i : 個々の *miRNA* の *TIN* 比は生存予後を予測する。ここに示されているのは、これら 9 の *miRNA* の各々について、*TNM* 病期 (左) 及びカプラン・マイヤー分析 (右) による *TIN* 比を示しているグラフである。Y 軸 (*TNM* 病期グラフによる *TIN* 比) は、各個体についての $\log(2)$ 転換 *TIN* 比であり、一方、Y 軸は *TNM* 病期 (I、II、III 又は IV) により個体をグループ化している。示されて

10

20

30

40

50

いる有意値は、病期によりグループ化された個体にわたった平均 T I N 比値の傾向についてのノンパラメトリック検定の結果である。 Kaplan-Meier プロットは、その特定の miRNA についての T I N 比データを有するすべての個体を含む。我々は、T I N 比が、臨床病期及び生存予後の両方と関連していることを発見した。

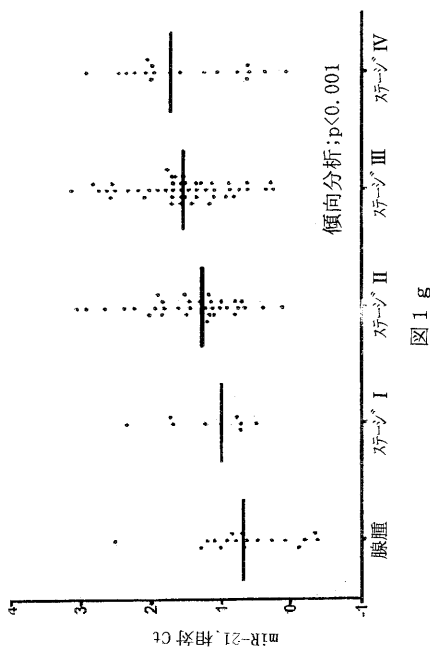
【図 9 a】図 9 a。9つの miRNA の miRNA シグニチャーは結腸癌で死ぬリスクを予測する。miR-21、miR-106a、miR181b、miR-16b、miR-203、let-7g、miR-29a、miR-103-2 及び miR-10a の T I N 比が、各々、結腸癌予後を予測することが示されている。これら 9つの miRNA の階層的クラスタリングは、個体を 2つのグループに分割し (1 A)、有意に異なった生存予後を有した (1 B)。グループ B 個体は、グループ A よりも有意に高い結腸癌で死ぬリスクを有した。もし、個体に、miRNA シグニチャーを作り出している 9 T I N 比に、2 よりも大きな欠損があれば、この分析から除外した。

【図 9 b】図 9 b。9つの miRNA の miRNA シグニチャーは結腸癌で死ぬリスクを予測する。miR-21、miR-106a、miR181b、miR-16b、miR-203、let-7g、miR-29a、miR-103-2 及び miR-10a の T I N 比が、各々、結腸癌予後を予測することが示されている。これら 9つの miRNA の階層的クラスタリングは、個体を 2つのグループに分割し (1 A)、有意に異なった生存予後を有した (1 B)。グループ B 個体は、グループ A よりも有意に高い結腸癌で死ぬリスクを有した。もし、個体に、miRNA シグニチャーを作り出している 9 T I N 比に、2 よりも大きな欠損があれば、この分析から除外した。

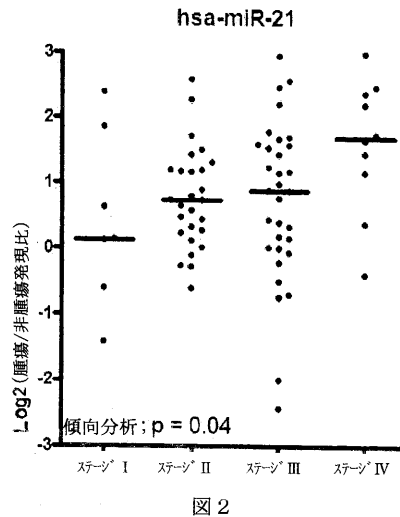
10

20

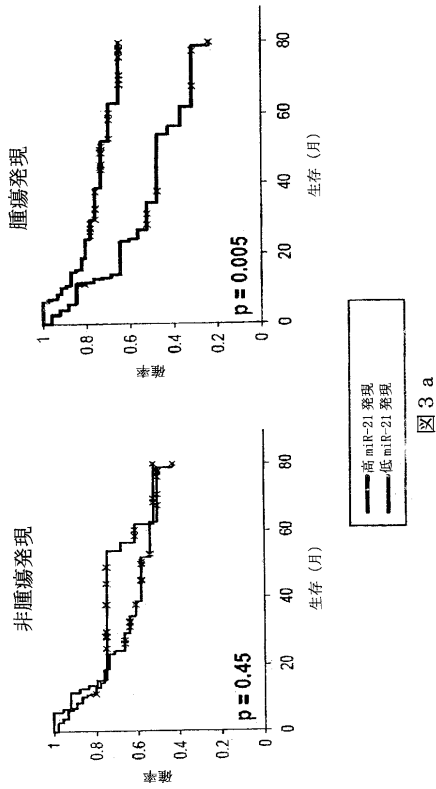
【図 1 - 2】



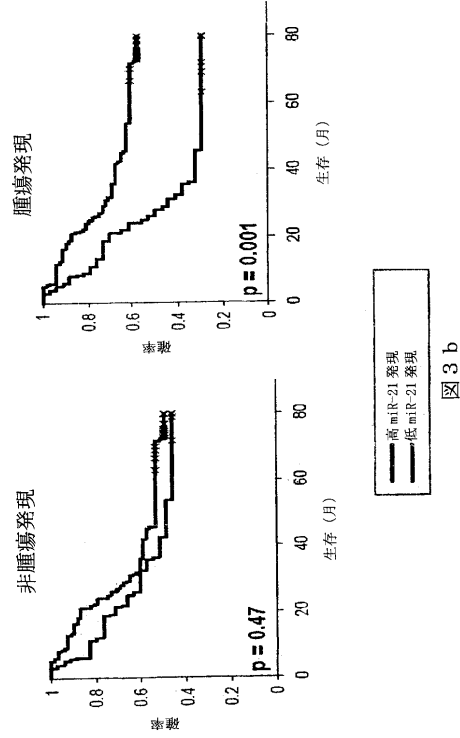
【図 2】



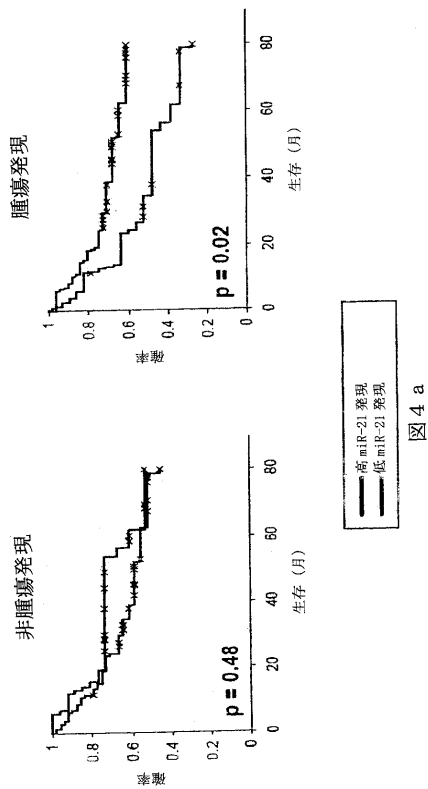
【図 3 a】



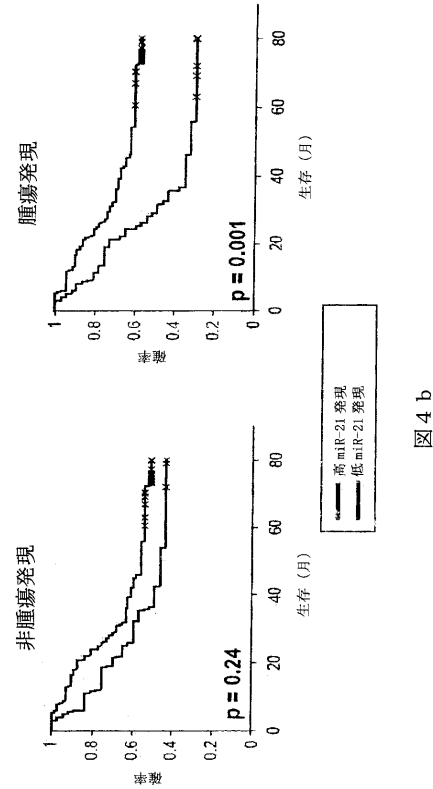
【図 3 b】



【図 4 a】



【図 4 b】



【図 5 a】

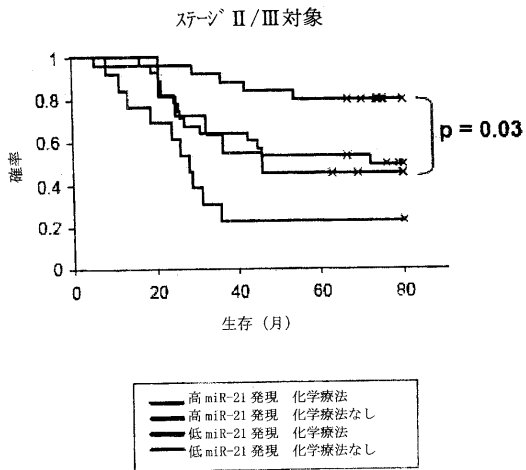


図 5 a

【図 5 b】

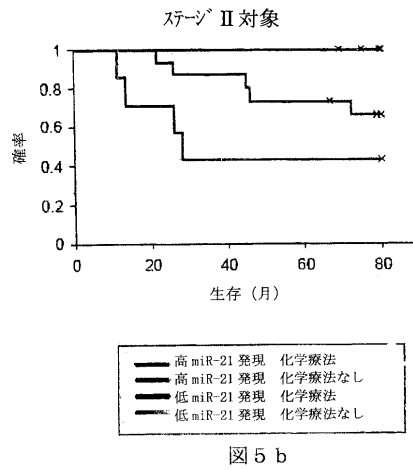


図 5 b

【図 5 c】

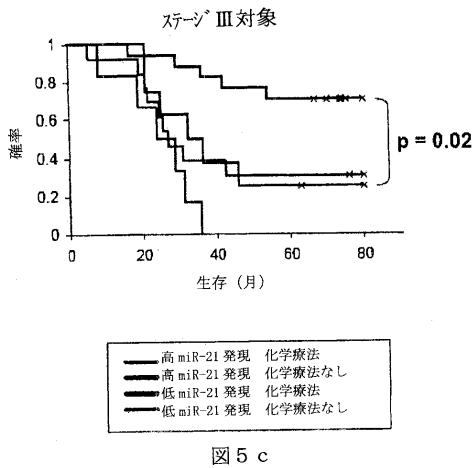


図 5 c

【図 6 a】

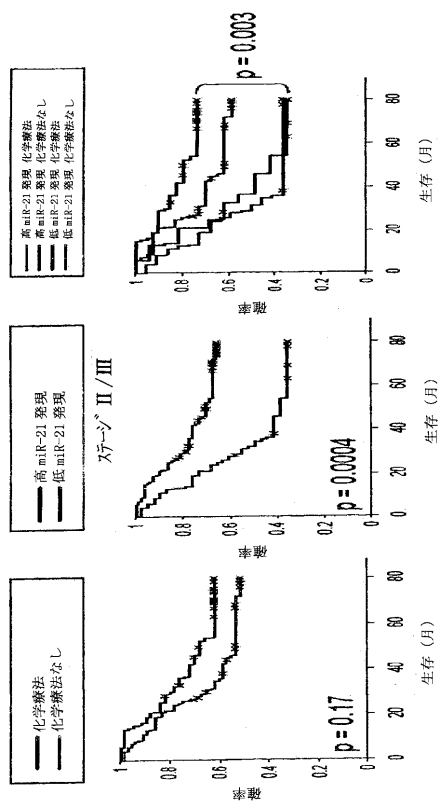


図 6 a

【図 6 b】

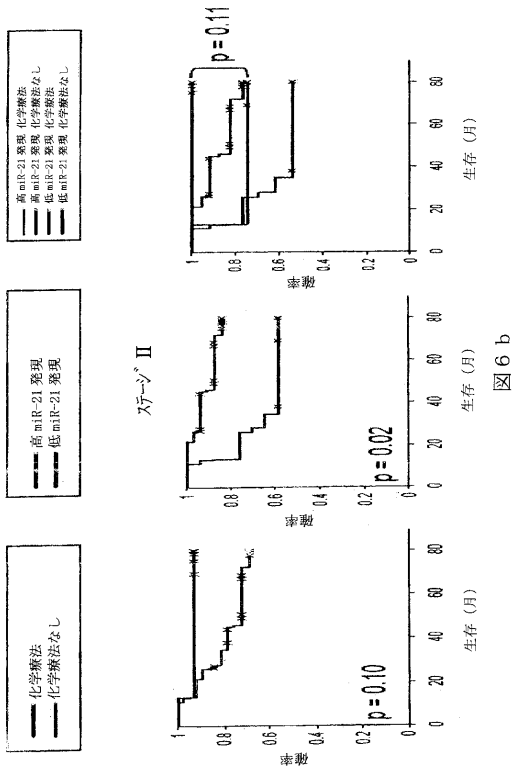


図 6 b

【図 6 c】

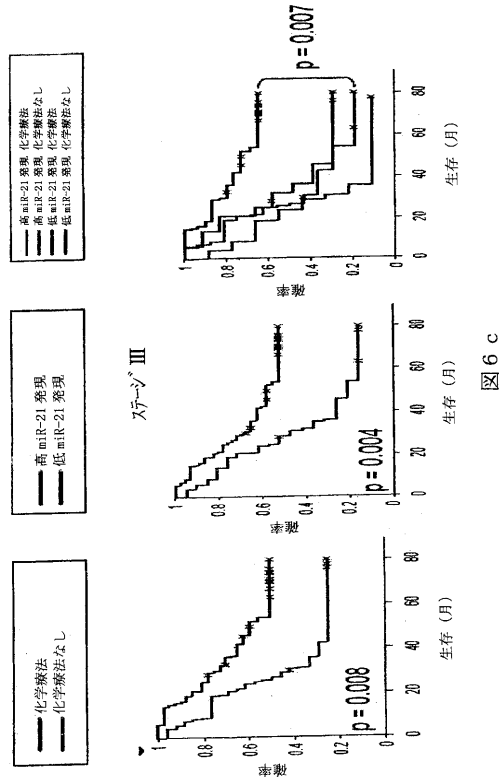


図 6 c

【図 7 c】

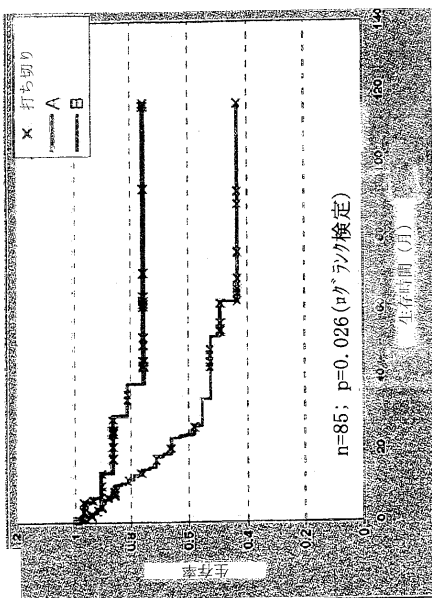


図 7 c

【図 8 a】

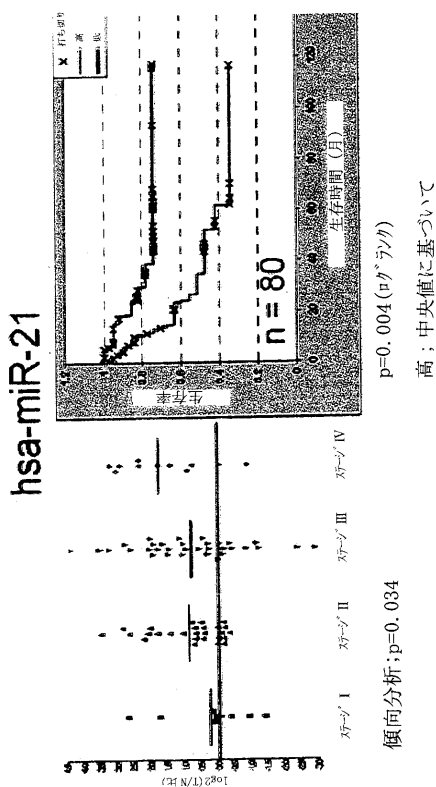


図 8 a

傾向分析: $p=0.034$

$p=0.004$ (log-rank test)

高; 中央値に基づいて

【図 8 b】

hsa-miR-106a

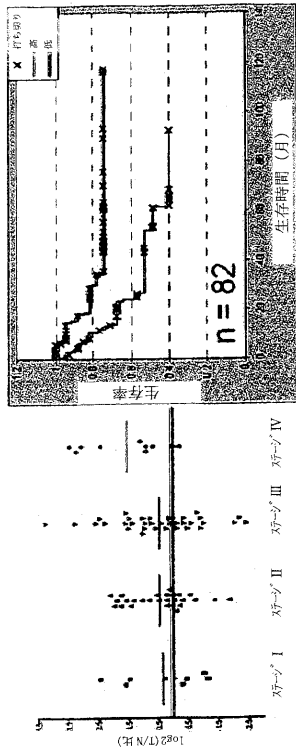


図 8 b

【図 8 c】

hsa-miR-181b

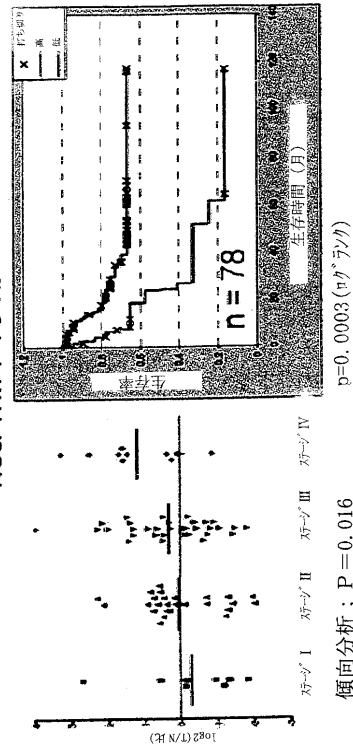


図 8 c

【図 8 d】

hsa-miR-203

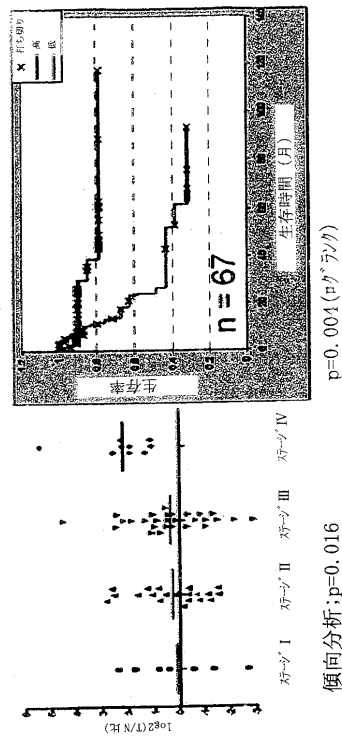


図 8 d

【図 8 e】

hsa-let-7g

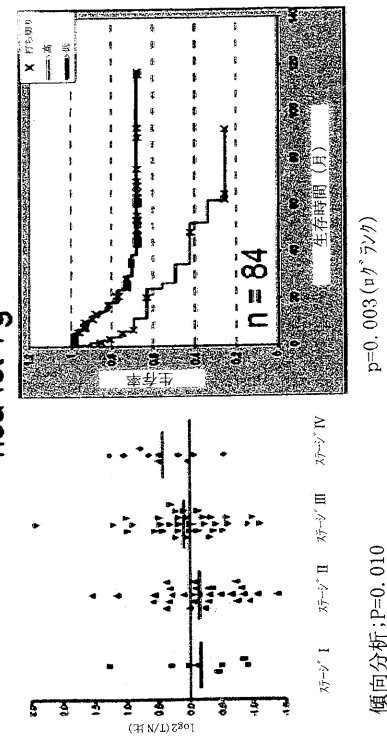
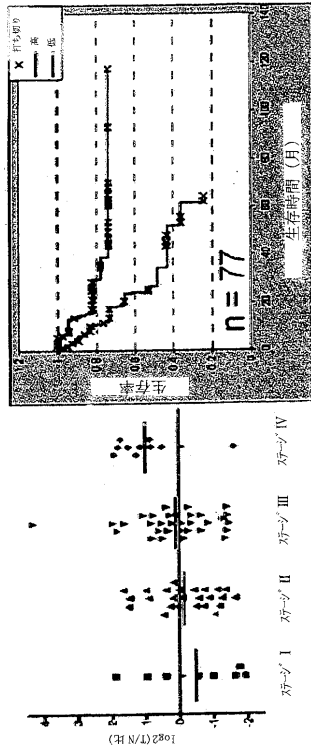


図 8 e

【図 8 f】

hsa-miR-29a

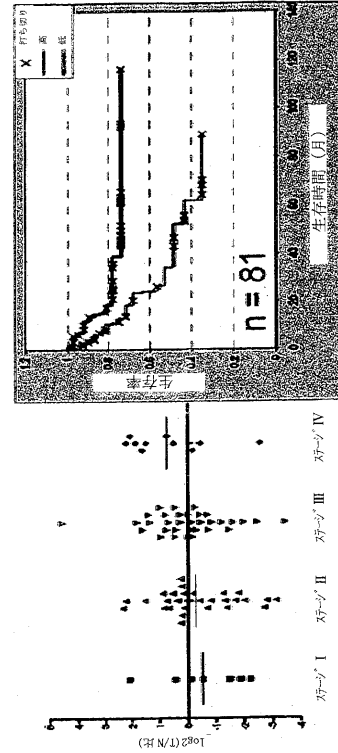


p=0.004 (ロジスティック)
高；中央値に基づいて

図 8 f

【図 8 g】

hsa-miR-103-2

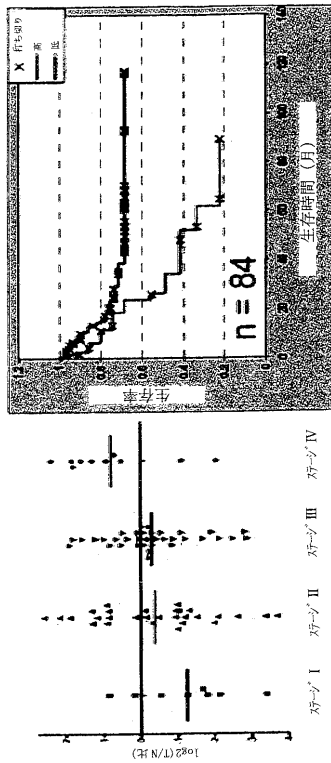


p=0.015 (ロジスティック)
高；中央値に基づいて

図 8 g

【図 8 h】

hsa-miR-10a

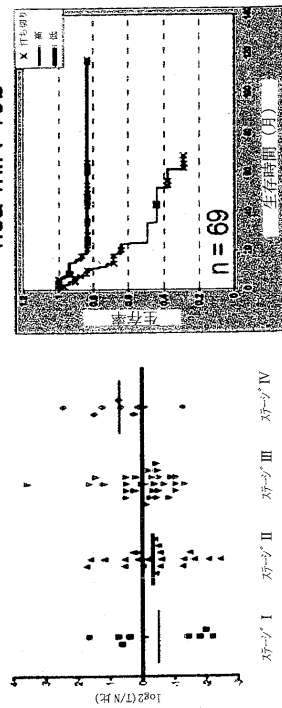


p=0.013 (ロジスティック)
高；最高四分位値に基づいて

図 8 h

【図 8 i】

hsa-miR-16b



p=0.001 (ロジスティック)
高；中央値に基づいて

図 8 i

傾向分析:P=0.005

傾向分析:P=0.033

傾向分析; P=0.008

傾向分析:P=0.048

【図 9 b】

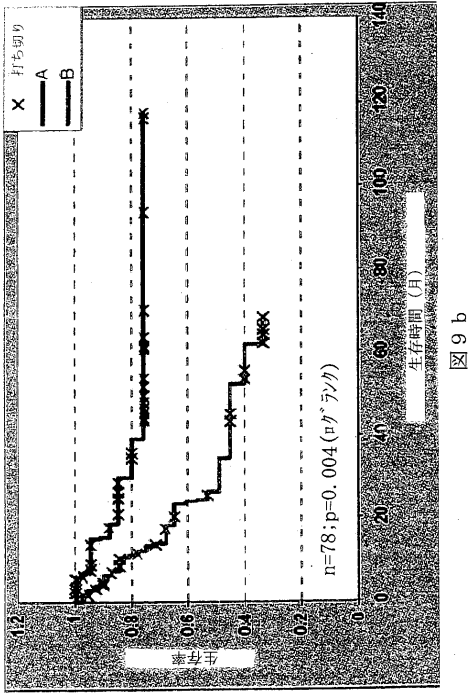


図 9 b

【図 1 - 1】

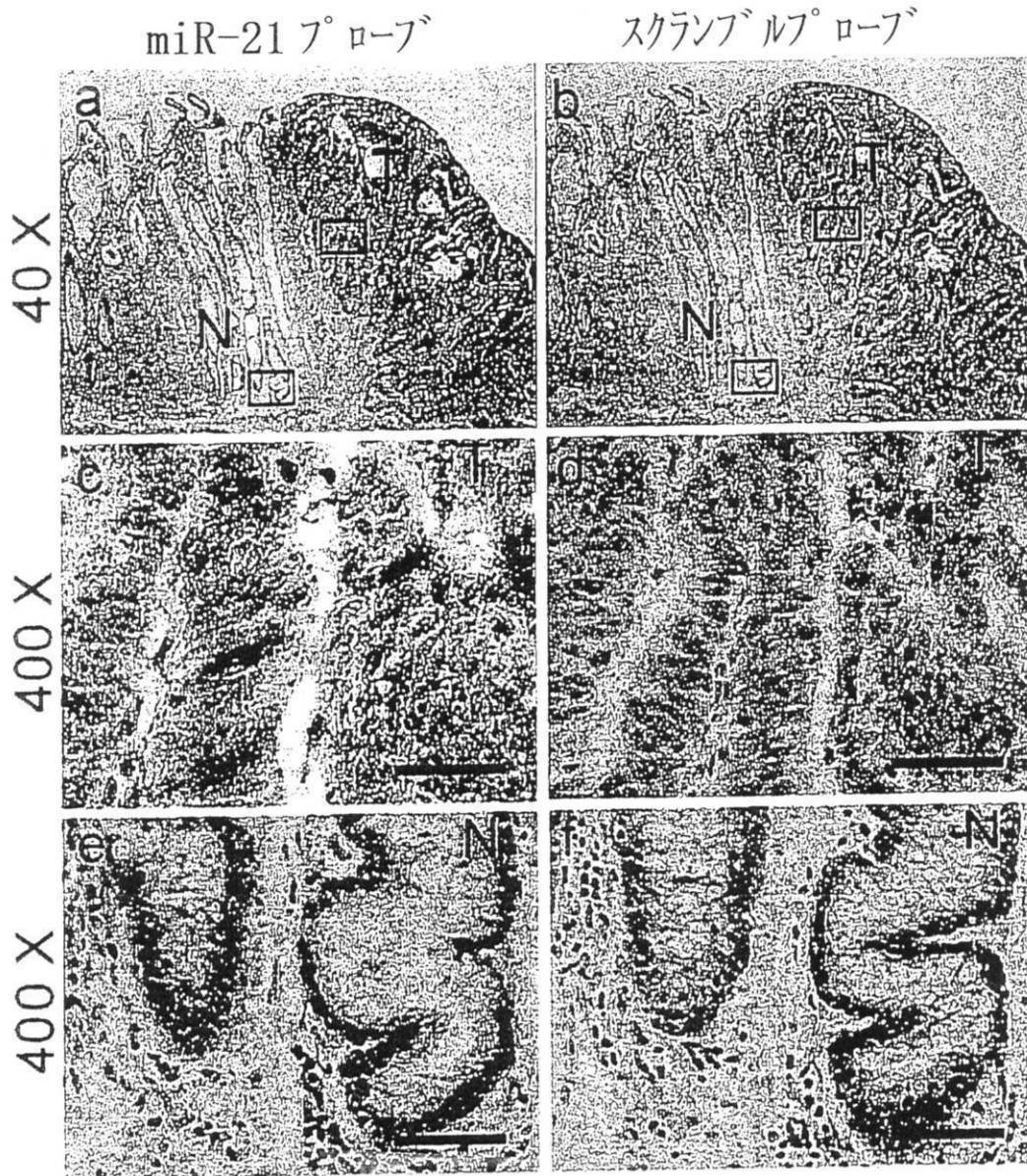


図 1 a ~ 1 f

【図 7 a】

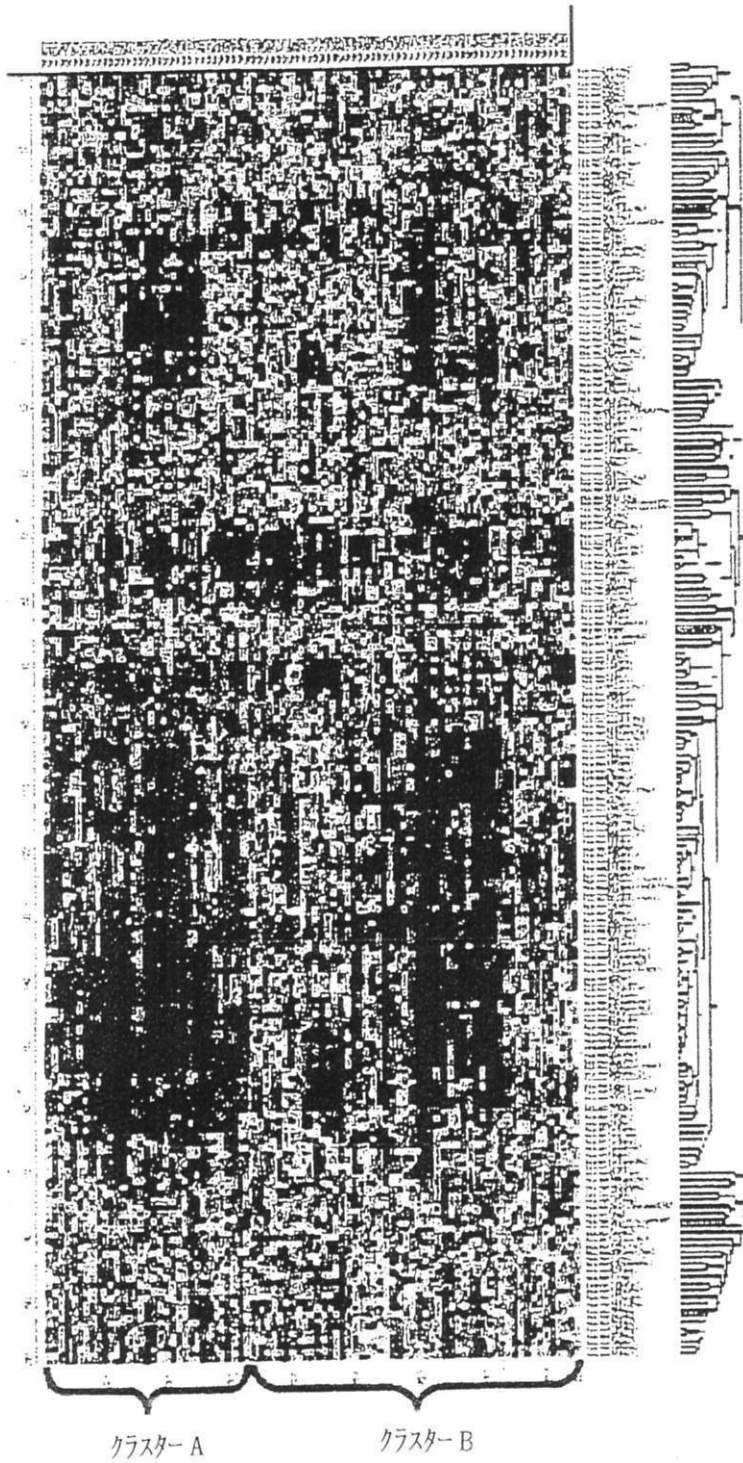


図 7 a

【図 7 b】

	クラスター A	クラスター B	計
ステージ I	5	3	8
ステージ II	15	14	29
ステージ III	11	25	36
ステージ IV	1	9	10
計	32	51	

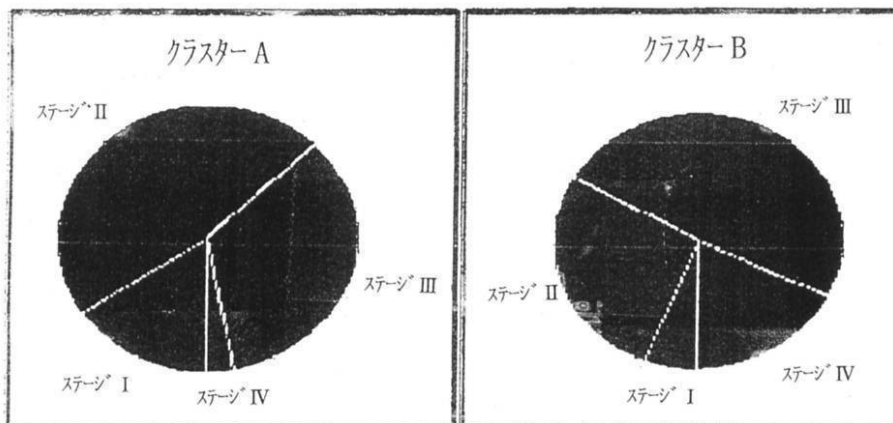


図 7 b

【図 9 a】

クラスタリング実験のためのデンドログラム、
ユークリッド距離及び完全リンクエージを使用して

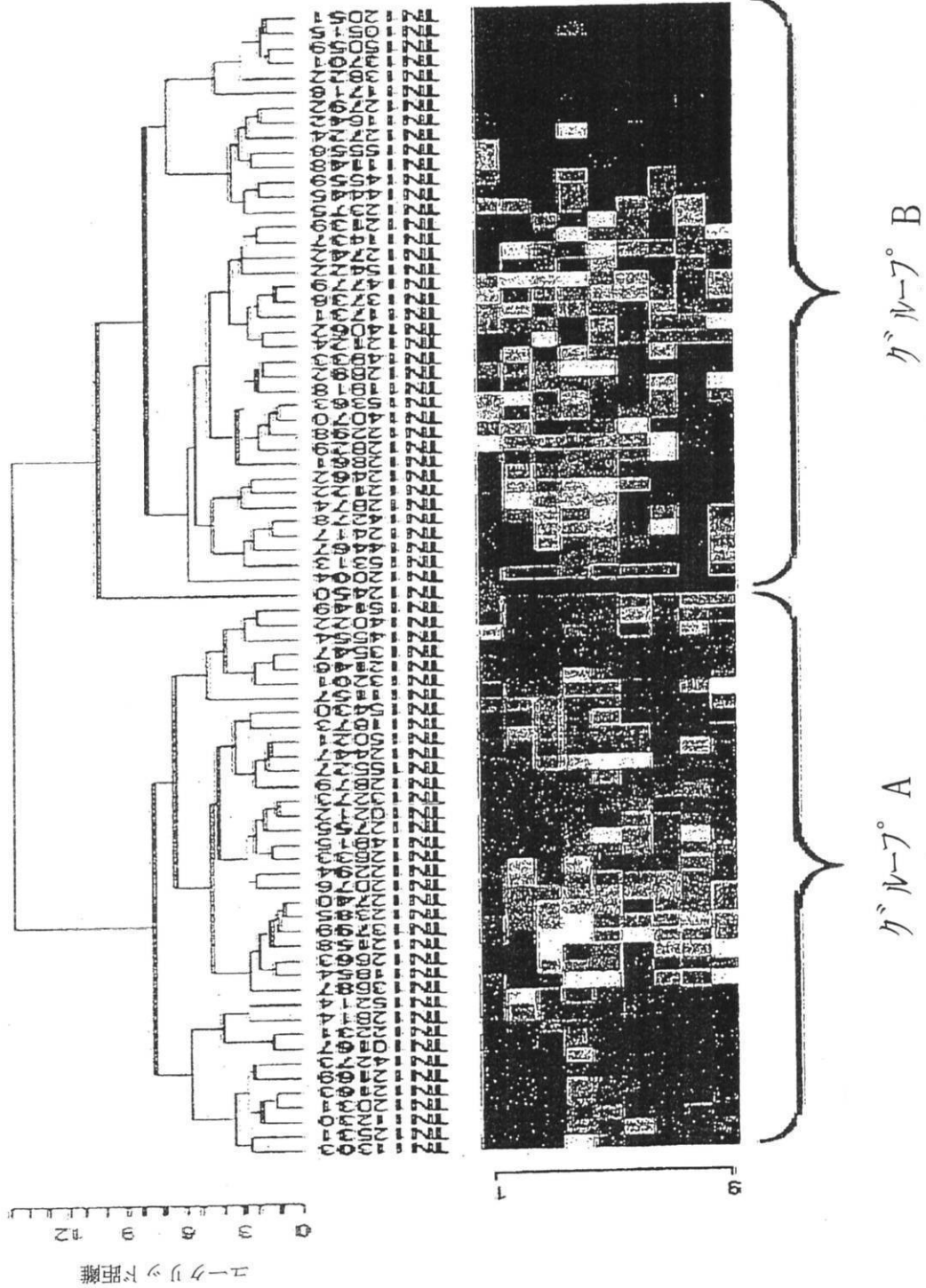


図 9 a

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	17/00 (2006.01)	C 0 7 K	17/00	4 C 0 8 6
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	37/00	1 0 2
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z

- (71)出願人 502006782
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 2 , ロックヴィル , エグゼキュティブ・ブールバード
 6 0 1 1 , スイート 3 2 5 , ナショナル インスティテューツ・オブ・ヘルス , オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
- (74)代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
- (74)代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
- (74)代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
- (74)代理人 100118902
 弁理士 山本 修
- (74)代理人 100135415
 弁理士 中濱 明子
- (72)発明者 クローチェ , カーロ・エム
 アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 2 2 1 , コロンブス , ケンブリッジ・ブールバード 2 1 4 0
- (72)発明者 ハリス , クルティス・シー
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 9 6 , ギャレット・パーク , ウェイバリー・アベニュー 4
 7 2 0 , ビー・オー・ボックス 7 7
- (72)発明者 シェッター , アーロン・ジェイ
 アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 9 1 0 , シルバー・スプリング , ジョージア・アベニュー 8
 7 5 0 , アpartment 1 1 2 0 エイ

F ターム(参考) 2G045 CB01 CB02 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 DA02 DA03 HA01 HA11
 4B029 BB11 CC02 FA15 GA03
 4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ03 QR32 QR35 QS25 QS32 QS34 QX02
 4C084 AA13 AA17 MA31 MA52 MA55 MA59 MA60 MA65 NA05 ZA661
 ZA662 ZB261 ZB262 ZC412
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 ZA66 ZB26
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	基于MicroRNA的方法和组合物，用于诊断和治疗结肠癌相关疾病		
公开(公告)号	JP2015231376A	公开(公告)日	2015-12-24
申请号	JP2015136948	申请日	2015-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	俄亥俄州州立大学研究基金会 美国政府		
申请(专利权)人(译)	迪俄亥俄州州立大学研究基金会 美国		
[标]发明人	クローチエカーロエム ハリスクルティスシー シェッターアーロンジェイ		
发明人	クローチエ,カーロ・エム ハリス,クルティス・シー シェッター,アーロン・ジェイ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12N15/113 C12Q1/02 C12M1/00 C07K17/00 A01K67/027 A61K31/7105 A61P35/00 A61P1/04 A61K48/00 A61K45/00 G01N37/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/574 G01N33/15		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/158 C12Q2600/178 A61P1/04 C12Q1/6809 C12Q2525/207 Y10T436/143333 C12N15/113 C12N2310/113 C12N2310/141 C12N2320/30		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.F C12N15/00.G C12Q1/02 C12M1/00.A C07K17/00 A01K67/027 A61K31/7105 A61P35/00 A61P1/04 A61K48/00 A61K45/00 G01N37/00.102 G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/574.A G01N33/15.Z C12N15/09.200 C12N15/113.P C12N15/113.Z C12Q1/6809.C C12Q1/6809.Z C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/HA01 4B024/HA11 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/FA15 4B029/GA03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA31 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA65 4C084/NA05 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA66 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中滨 明子		
优先权	60/807304 2006-07-13 US 60/932736 2007-06-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，用于诊断其是否具有结肠癌相关疾病，具有发展或具有降低的存活预后的风险，以及用于抑制患有结肠癌的受试者的癌发生的方法。该方法包括测量至少一种miR基因产物的水平，其中测试样品中miR基因产物水平的变化与对照样品中相应的miR基因产物的水平相比较。一种通过指示受试者患有结肠癌相关疾病或有发展它的风险来诊断的方法。此外，还包括改变癌细胞中表达的miR基因产物的量以抑制癌发生的方法。【选择图】无

(43) 公開日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(51) Int. Cl.			F 1			テーマコード (参考)		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	2 G 0 4 5		
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	F	4 B 0 2 4		
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/00	G	4 B 0 2 9		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 B 0 6 3		
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	4 C 0 8 4		

審査請求 未請求 請求項の数 66 O L (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-136948 (P2015-136948)	(71) 出願人	593172050
(22) 出願日	平成27年7月8日 (2015. 7. 8)		ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシティ・リサーチ・ファウンデーション
(62) 分割の表示	特願2013-56596 (P2013-56596)の分割		THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
原出願日	平成19年7月12日 (2007. 7. 12)		アメリカ合衆国オハイオ州43201, コロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1524
(31) 優先権主張番号	60/807,304		
(32) 優先日	平成18年7月13日 (2006. 7. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/932,736		
(32) 優先日	平成19年6月1日 (2007. 6. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 結腸癌関連疾患の診断及び治療のためのマイクロRNAに基づいた方法及び組成物