

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-524164

(P2011-524164A)

(43) 公表日 平成23年9月1日 (2011.9.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-512239 (P2011-512239)	(71) 出願人	309007575
(86) (22) 出願日	平成21年6月5日 (2009.6.5)		サントル・ナシオナル・ドウ・ラ・ルシエ
(85) 翻訳文提出日	平成23年1月31日 (2011.1.31)		ルシユ・シアンティファイク (セー・エヌ・
(86) 国際出願番号	PCT/IB2009/005878		エール・エス)
(87) 国際公開番号	W02009/147519		フランス国、エフー 7 5 7 9 4 ・パリ・セ
(87) 国際公開日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		デクス・1 6、リュ・ミシエランジュ、3
(31) 優先権主張番号	61/059, 354	(74) 代理人	100081558
(32) 優先日	平成20年6月6日 (2008.6.6)		弁理士 齋藤 晴男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100154287
(31) 優先権主張番号	61/153, 324		弁理士 齋藤 貴広
(32) 優先日	平成21年2月18日 (2009.2.18)	(72) 発明者	ギビング、デルリック
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランス国 ストラスブール エフー 6 7
			0 0 0、ブルバール ダンバール 3
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 小分子RNAに基づく治療および診断ならびに小分子RNAの実験的研究におけるエンドリソーム系および分泌小胞 (エキソソーム様) の用途

(57) 【要約】

本発明は、標的器官または標的細胞への s i R N A、m i R N A または関連分子の送達速度および / または効率の決定方法と、キットと、R N A、小分子 R N A、例えば m i R N A、s i R N A および p i R N A、m R N A または非コード R N A の活性および / または細胞間移行を調節するためのエンドリソーム系の形成に関与するタンパク質または脂質の使用とに関する。それには、特に、m i R N A または s i R N A 治療薬の (1 つまたは複数の) 標的を同定するための方法において、s i R N A および / または m i R N A 治療薬による治療の効率を決定するための方法において、ならびにヒト、腫瘍または胎児の遺伝子型を調べるためおよび / またはその状態の特性を決定するための方法において、多くの適用がある。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標的器官または標的細胞への / 標的器官または標的細胞中の *s i R N A*、*m i R N A* または関連分子の送達速度および / または効率を決定する方法であって、前記標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、前記 *s i R N A* および / または *m i R N A*、ならびに / あるいは前記 *m i R N A* および / または前記 *s i R N A* が標的とする *m R N A* のレベルを測定することを含む方法。

【請求項 2】

(i) 好ましくは以前に *s i R N A* および / または *m i R N A* で治療された患者の体液からエキソソームまたは小胞を単離するステップと、

(i i) 前記エキソソーム中の *s i R N A* および / または *m i R N A* および / または標的 *m R N A* のレベルを測定するステップと、

(i i i) 場合により、前記レベルを対照と比較し、次いで、内在形態または治療薬形態の *s i R N A* および / または *m i R N A* の送達速度および / または効率を決定するステップと

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記体液が、血液産物、尿、肺洗浄液および唾液、他の体液、または培養細胞の上清から選択される、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

s i R N A および / または *m i R N A* および / または標的 *m R N A* のレベルの前記測定が、*q R T - P C R* により、あるいはマイクロアレイまたは他のチップ上のハイブリダイゼーションにより、あるいはゲルもしくは膜上または溶液中でのハイブリダイゼーションにより実施される、請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記対照が、治療された、治療されていない、または対照で治療された個体、動物または細胞の *s i R N A* および / または *m i R N A* および / または *m R N A* および / または他の *R N A* および / または小胞の定量を許容する他の分子、あるいはその成分である、請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ステップ (i) ~ (i i i) が、*s i R N A* および / または *m i R N A* 治療の前および後、および最終的にはその間に実施される、請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

標的器官または標的細胞への *s i R N A* および / または *m i R N A* の送達効率または活性を決定するための、請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 *s i R N A* および / または *m i R N A* の送達効率または活性が、治療後のエキソソーム中の *m i R N A*、*s i R N A* または標的 *m R N A* のレベルの低下または変化によって認識される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

全細胞の *m R N A* の含量を決定する前記ステップが、*m R N A* マイクロアレイ、*m i R N A* もしくは *s i R N A* が標的とする *m R N A* または他の *R N A* もしくは *D N A* を同定する大規模方法、*q R T - P C R*、大規模多重遺伝子アプローチから選択される方法を用いて実施される、請求項 7 乃至 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記標的器官または標的細胞の膜画分中および全細胞中の、前記 *s i R N A* および / または前記 *m i R N A*、および / または前記 *m i R N A* および / または前記 *s i R N A* が標的とする前記 *m R N A* のレベルを測定することを含む、請求項 7 乃至 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

エキソソーム、膜画分および全細胞の中における *mi* / *si* RNA 標的 *m* RNA の比を比較するステップを含む、請求項 7 乃至 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

mi RNA または *si* RNA 治療薬の (1 つまたは複数の) 標的を同定するための、請求項 1 乃至 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

si RNA および / または *mi* RNA 治療薬または他の分子により行われる治療の効率を決定するための、請求項 1 乃至 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記治療が、RNA、小分子 RNA、例えば *mi* RNA、*si* RNA および *pi* RNA、*m* RNA または非コード RNA の活性および / または細胞間移行を調節するための多胞体 (MVB) の形成、相互作用または活性に関与するタンパク質、脂質、RNA または他の分子により実施される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記タンパク質が、Alix、Hrs、vps36 (液胞タンパク質選別会合タンパク質 36)、EAP30 (30 kDa の ELL 会合タンパク質、SNF8)、EF1a (延長因子 1a) および BIG2、hps4 (ヘルマンスキー - パドラック症候群 4)、hps1 (ヘルマンスキー - パドラック症候群 1)、PRNP (プリオンタンパク質)、SCF ユビキチンリガーゼ (Skp1 - Cullin - F - ボックスタンパク質)、Surf
eit-4、V0 または V1 ATPアーゼ (V0 または V1 アデノシン三リン酸分解酵素)、vps41、COG4 (保存されたオリゴマーゴルジ成分 4)、ATG3 (オートファジー関連タンパク質 3)、ATG8、COG4、PI3K (ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ)、NEDD4L (発生的に発現が下方制御された神経前駆細胞 4 様)、ARFGEF4 (ADP リボシル化因子グアニンヌクレオチド交換因子 4 タンパク質)、CHML (コロイデミア様)、RAB10 (ras 関連 GTP 結合タンパク質 10)、RAB35、RALB (V - ral サル白血病ウイルス癌遺伝子相同体 B)、RAPGEF6 (Rap グアニンヌクレオチド交換因子 6)、SCD (ステアロイル CoA デサチユラーゼ)、GIPC1 (GIPC PDZ ドメイン含有ファミリー、メンバー 1)、SCGB1D1 (セクレトグロビン、ファミリー 1D、メンバー 1)、UBE2M (ユビキチン共役酵素 E2M)、USP10 (ユビキチン特異的プロテアーゼ 10)、EEF2 (真核生物翻訳伸長因子 2)、LILRB1 (白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリー B)、RAB36、RANBP2 (Ran 結合タンパク質 2)、SFRP2 (分泌性 Frizzled 関連タンパク質 2)、SLC4A4 (溶質キャリアファミリー 4、重炭酸ナトリウム共輸送体、メンバー 4)、SMPD3 (スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 3)、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリンシンターゼ 1、スフィンゴミエリンシンターゼ 2、Epopamil 結合タンパク質、usp22 (ユビキチン特異的プロテアーゼ 22)、trpc3 (一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリー C、メンバー 3)、CLCN7 (クロライドチャネル 7)、CTSC (カテプシン C)、LAMR1 (ラミニン受容体 1)、RNF32 (リングフィンガータンパク質 32)、ERI3 (増強された RNAi - 3)、HMGCR (3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル CoA 還元酵素)、NPC1 (ニーマン - ピック病、C1 型)、SLC6A4 (ナトリウム依存性セロトニントランスポーター、溶質キャリアファミリー 6 メンバー 4)、FAU、THEA (ACOT11、アシル補酵素 A チオエステラーゼ 11)、CKAP4、COG1 - 8 タンパク質、vps1 - 45 タンパク質、CHMP ファミリータンパク質、選別ネキシン、rab5、7、9、38、Arf2、Arf6、GGA1 - 3、スフィンゴミエリンおよびステロール代謝遺伝子および薬物 (例えば、GW4869、スフィンゴミエリンエステラーゼ)、MVB またはエキソソーム内への選別のその関与に関連するコレステロールまたは脂質ラフト分割および代謝に影響を及ぼす薬物および遺伝子、特に NPC1、HMGCR、およびコレステロール低下薬のスタチンクラスから成る群から選択され

10

20

30

40

50

る、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 乃至 11 のいずれか一項に記載の方法を含む、ヒト、腫瘍または胎児の遺伝子型を調べるため、および / またはその状態の特性を決定するための方法。

【請求項 17】

生物、細胞または植物における *miRNA* または小分子 *RNA* の活性をコントロールするための方法であって、

タンパク質、またはこのタンパク質の活性を修飾する化学物質、またはこのタンパク質を標的とする *siRNA* もしくは *miRNA* もしくはその関連分子を生物に投与することを含み、

このタンパク質が、*Alx*、*Hrs*、*vps36* (液胞タンパク質選別会合タンパク質 36)、*EAP30* (30 kDa の *ELL* 会合タンパク質、*SNF8*)、*EF1a* (延長因子 1a) および *BIG2*、*hps4* (ヘルマンスキー - パドラック症候群 4)、*hps1* (ヘルマンスキー - パドラック症候群 1)、*PRNP* (プリオンタンパク質)、*SCF* ユビキチンリガーゼ (*Skp1* - *Cullin* - *F* - ボックスタンパク質)、*Surfeit-4*、*V0* または *V1 ATPアーゼ* (*V0* または *V1* アデノシン三リン酸分解酵素)、*vps41*、*COG4* (保存されたオリゴマーゴルジ成分 4)、*ATG3* (オートファジー関連タンパク質 3)、*ATG8*、*COG4*、*PI3K* (ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ)、*NEDD4L* (発生的に発現が下方制御された神経前駆細胞 4 様)、*ARFGEF4* (*ADP* リボシル化因子グアニンヌクレオチド交換因子 - 4 タンパク質)、*CHML* (コロイデミア様)、*RAB10* (*ras* 関連 *GTP* 結合タンパク質 10)、*RAB35*、*RALB* (*V-ral* サル白血病ウイルス癌遺伝子相同体 B)、*RAPGEF6* (*Rap* グアニンヌクレオチド交換因子 6)、*SCD* (ステアロイル *CoA* デサチュラーゼ)、*GIPC1* (*GIPC* PDZ ドメイン含有ファミリー、メンバー 1)、*SCGB1D1* (セクレトグロビン、ファミリー 1D、メンバー 1)、*UBE2M* (ユビキチン共役酵素 *E2M*)、*USP10* (ユビキチン特異的プロテアーゼ 10)、*EEF2* (真核生物翻訳伸長因子 2)、*LILRB1* (白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリー B)、*RAB36*、*RANBP2* (*Ran* 結合タンパク質 2)、*SFRP2* (分泌性 *Frizzled* 関連タンパク質 2)、*SLC4A4* (溶質キャリアファミリー 4、重炭酸ナトリウム共輸送体、メンバー 4)、*SMPD3* (スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 3)、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリンシンターゼ 1、スフィンゴミエリンシンターゼ 2、*Epopamil* 結合タンパク質、*usp22* (ユビキチン特異的プロテアーゼ 22)、*trpc3* (一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリー C、メンバー 3)、*CLCN7* (クロライドチャネル 7)、*CTSC* (カテプシン C)、*LAMR1* (ラミニン受容体 1)、*RNF32* (リングフィンガータンパク質 32)、*ERI3* (増強された *RNAi* - 3)、*HMGCR* (3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル *CoA* 還元酵素)、*NPC1* (ニーマン - ピック病、C1 型)、*SLC6A4* (ナトリウム依存性セロトニントランスポータ、溶質キャリアファミリー 6 メンバー 4)、*FAU*、*THEA* (*ACOT11*、アシル補酵素 A チオエステラーゼ 11)、*CKAP4*、*COG1-8* タンパク質、*vps1-45* タンパク質、*CHMP* ファミリータンパク質、選別ネキシン、*rab5*、7、9、38、*Arf2*、*Arf6*、*GGA1-3*、スフィンゴミエリンおよびステロール代謝遺伝子および薬物 (例えば、*GW4869*、スフィンゴミエリンエステラーゼ)、*MVB* またはエキソソーム内への選別のその関与に関連するコレステロールまたは脂質ラフト分割および代謝に影響を及ぼす薬物および遺伝子、特に *NPC1*、*HMGCR*、およびコレステロール低下薬のスタチンクラスから選択される、方法。

【請求項 18】

診断または治療のための候補分子のスクリーニングのための、請求項 1 乃至 11 のいずれか一項に記載の方法の用途。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

前記候補分子が、RNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAまたは非コードRNAの活性および/または細胞間移行を調節するための、多胞体(MVB)の形成に關与するタンパク質または脂質から選択される、請求項18に記載の用途。

【請求項20】

(a) 体液からエキソソームまたは小胞を単離するための手段と、

(b) 前記エキソソーム中のsiRNAおよび/またはmiRNAおよび/または標的mRNAのレベルを測定するための手段とを含むキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的器官または標的細胞へのsiRNA(低分子干渉リボ核酸)、miRNA(マイクロリボ核酸)または関連分子の送達速度および/または効率の決定方法と、キットと、RNA(リボ核酸)、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA(Piwi相互作用リボ核酸)、mRNA(メッセンジャーリボ核酸)または非コードRNAの活性および/または細胞間移行を調節するためのエンドリソソーム系の形成に關与するタンパク質または脂質の用途とに關する。

【0002】

本発明の多くの適用の中で、本発明者らは、特に、miRNAまたはsiRNA治療薬の(1つまたは複数の)標的を同定するための方法、siRNAおよび/またはmiRNA治療薬による治療の効率を決定するための方法、ならびにヒト、腫瘍または胎児の遺伝子型を調べるためおよび/またはその状態の特性を決定するための方法を挙げることができる。

20

【0003】

以下に続く以下の記載において、参考文献とは、添付の参考文献一覧を指す。

【0004】

参考文献一覧において本明細書に引用されるすべての文献は、下記の本文において参照により組み込まれる。

【背景技術】

30

【0005】

多胞体(MVB)の細胞質表面上に位置するESCRT(endosomal sorting complex required for transport)複合体は、ユビキチン化タンパク質を認識し、MVB内に出芽する小胞内に選別し、小胞は、リソソームに送達され得るか、またはエキソソームとして細胞外空間内に放出され得る。RNAサイレンシング機構は膜とは無関係であるといわれることが多いが、Ago2(Argonaute-2)が少なくとも、未知の膜と緊密に会合する可能性があるとの他の証拠から示唆されている。GW182は、ユビキチン結合ドメインを含有し、ユビキチン化される。ESCRT複合体の幾つかのメンバーを標的とするsiRNAは、miRNA活性をブロックしたが、MVBへのGW182の局在化を著しく乱すことはなかった。GW182は、miRNAをも含有したエキソソーム中に明確に濃縮された。最後に、エキソソームは、BIG2(プレフェルジンA阻害グアニンヌクレオチド交換タンパク質2)に依存してmiRNA活性を標的細胞に移行させた。

40

【0006】

多胞体(MVB)は、内部に出芽することにより形成される腔内小胞(ILV)を含有する、エンドソームとリソソームの間の中間選別センターである。MVB内へのタンパク質送達の最も研究された機構の内の1つは、ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)であり、それは、ユビキチン化タンパク質を認識し、このタンパク質をILV内に送達する。ESCRTに会合するユビキチン化されたタンパク質および因子は、ESCRTと総称される3種のヘテロマーサブ複合体によりMVB内に選別され

50

て、さらにエキソソーム中に分泌され、かつ／またはリソソームを介して分解され得る。ILVは、リソソームに輸送されて分解され得る。あるいは、MVBは、形質膜に融合して細胞外空間内にILVを放出することができ、この場合ILVはエキソソームと称される。エキソソームの放出は、単球、樹状細胞、および幾つかの腫瘍細胞において主として研究されてきたが、ほとんどの細胞がエキソソームを放出すると思われる。エキソソームは、タンパク質性抗原を腫瘍細胞から樹状細胞に移行させ、抗腫瘍免疫応答を活性化することができる。ペプチド抗原の移行が、エンドサイトーシスおよびタンパク質の分解によって起きるのか、または細胞質への抗原の送達によって起きるのかは知られていない。エキソソームは、その表面上に、産生細胞に由来する形質膜受容体をさらに含有し、それにより、エキソソームは、特異的な細胞型を標的として送り込まれ、さらには標的細胞上の形質膜受容体を活性化させる。

10

【0007】

細胞質、細胞膜、ゴルジ等の他の小器官、または細胞外空間のタンパク質およびRNAは、タンパク質のユビキチン化によるか、またはMVB中に選別される他のタンパク質、RNAまたは脂質に会合するドメインにより、MVBに送達され得る。次いで、MVBは、これらのタンパク質を細胞膜に移行させ、エキソソームと呼ばれる小胞内にこのタンパク質を分泌し、またはリソソーム内にこのタンパク質を送達して分解することができる。したがって、本発明において、miRNAの機能に必須の小分子RNAおよびタンパク質が、MVBにより分泌されるエキソソーム内において見出された。

20

【0008】

miRNA、siRNAまたはpiRNAと呼ばれる18～35のヌクレオチドから成るRNAは、ヘテロクロマチンの形成により、あるいはDNA転写(DNA[デオキシリボ核酸])、mRNAの分解もしくは安定化、またはタンパク質へのmRNAの翻訳の阻害もしくは活性化の変化をもたらす他の修飾により、遺伝子または非コードRNAの発現を調節することができる。これらの小分子RNAは、生物の多くの発達、癌および免疫において役割を果たす。さらに、siRNAの技術は、研究および医学においてRNAまたはタンパク質の発現を特異的に阻害するように適合されてきた。マイクロRNA(miRNA)は、翻訳を配列特異的に阻害もしくは活性化することができ、または標的mRNAの分解もしくは安定化および局在化を促進することができる19～24ヌクレオチドのRNA分子である。数百種のmiRNAが、遺伝子の約30%を調節すると考えられている。数年前、P-ボディまたはGW-ボディと呼ばれる細胞内構造が、小分子RNAと、その機能に必須のタンパク質、例えば、Dcp1a(デキャッピング酵素ホモログA)、GW182およびArgonauteファミリーメンバーを含む、miRNAおよびsiRNAにより媒介される転写後調節に関与するタンパク質の内の多くとを集合させ得るとして同定された。P-ボディは、脂質二重層とは無関係であると考えられ(Eystathiou, T.ら、A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. Mol. Biol. Cell. 13、1338～1351頁(2002)[1]、Schneider, M.D.ら、Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early Drosophila development. J. Cell Biol. 174、349～358頁(2006)[2])、リソソーム、初期エンドソーム、ゴルジまたはペルオキシソームを含むいずれの公知の細胞内小器官または構造とも広範囲には重複しない([1]、Jakymiw, A.ら、Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. Nat. Cell Biol. 7、1267～1274頁(2005)[3])。しかし、幾つかの証拠は、RNAサイレンシング機構の成分が膜と会合する可能性があることを示唆する。AgO2はマイクロソームにより精製され、マイクロソームのAgO2は、洗剤による処理の後でのみトリブ

30

40

50

シン消化に利用可能である (Cikaluk, D. E. ら、GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 10、3357~3372 頁 (1999) [4])。さらに、GW182 を認識する自己抗体と同じ染色パターンが得られる脂質ホスファチジルエタノールアミンに対する自己抗体が最近同定された (Laurino, C. C. ら、Human autoantibodies to diacyl-phosphatidylethanolamine recognize a specific set of discrete cytoplasmic domains. *Clin. Exp. Immunol.* 143、572~584 頁 (2006) [5])。驚くべきことに、GW182 はユビキチン会合 (UBA) ドメインを有するが、そのことは、GW182 が、ユビキチン化タンパク質により MVB で ESCRT 複合体に結合し得ることを示唆する。

10

【0009】

さらに、ユビキチン化タンパク質に結合し、MVB においてユビキチン化タンパク質を選別する ESCRT の多くのタンパク質はまた、miRNA または siRNA がその mRNA およびその標的タンパク質の発現を低下させることを促進する際に重要であることも分かった。また、エキソソームは、miRNA または siRNA 活性をある細胞から別の細胞に移行させることが可能であることも分かった。さらに、MVB の形成に關与する多くのタンパク質は、細胞質分裂に、ならびに DNA ヘテロクロマチンによる転写または遺伝子発現の調節に重要であることから、これらのタンパク質の一部は、幾つかの細胞分裂により siRNA 効果を拡大できる可能性があり、または小分子 RNA が DNA 構造および/または転写、例えばヘテロクロマチン形成または後成的調節による等に影響を及ぼすことができる可能性がある。

20

【0010】

エキソソームは、特異的なエキソソーム受容体、例えば、ICAM-1 (細胞間接着分子 1) (Segura, E., Guerin, C., Hogg, N., Amigorena, S., および Thery, C. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol.* 179、1489~1496 頁 (2007) [36]) および、場合により、MFG-E8 (乳脂肪球-EGF 因子 8 タンパク質) (Zeelenberg, I. S. ら、Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res.* 68、1228~1235 頁 (2008) [37]) によって、マクロファージおよび DC (樹状細胞) を標的とする。エキソソームは、免疫応答を調節するように、離れた抗原提示細胞にリンパ液、胸膜腔または血液で輸送され得る (Morelli, A. E. ら、Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 104、3257~3266 頁 (2004) [38])。リンパ節または脾臓における DC に対する病原菌感染部位における活性化 DC により分泌されるエキソソームによる免疫抑制性 miR-146 および -155 の輸送 (O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., および Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104、1604~1609 頁 (2007) [39]) は、免疫応答のための周縁を確立することの一助となり、全身的活性化および敗血症性ショックのリスクを低下させる可能性がある。特に興味深い可能性は、多くのウイルスまたは細菌による、それらのライフサイクルを達成するための RNA プロセッシングまたは翻訳機構の

30

40

50

破壊に関する (Pelchen - Matthews, A., Raposo, G., および Marsh, M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. Trends Microbiol. 12, 310 ~ 316 頁 (2004) [40])。抗原提示細胞への輸送のために日常的に RNA および固定タンパク質をエキソソーム内にパッケージングすることは、それ以外の場合に哺乳類におけるタンパク質に基づく抗原特異免疫を回避し得る主要なウイルスタンパク質に対する免疫応答を生じさせる巧妙な方法である。各タイプの分化細胞により産生されるエキソソームは、その細胞に由来する特殊な一組の表面受容体を含むることにより、部分的に miRNA を介して、離れた場所で類似の調節変化を行うことができる。例えば、エキソソームは、皮膚および毛の色を調節する要素、または精子の成熟に関与するエビジモソーム (epididymosome) (Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., および Frette, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. Blood Cells Mol. Dis. 35, 1 ~ 10 頁 (2005) [41]) を輸送するメラノソームと多くの類似性を共有する。より離れて、エキソソームは、シナプス小胞、および免疫細胞により分泌される各種の顆粒と類似性を共有する。シナプス - 軸索結合がシナプス小胞の miRNA 交換によりフィードバック調節される可能性があり、または miRNA のサブセットが、免疫細胞顆粒内に特異的に選別される可能性があり、かつ寄生生物 (腫瘍形成性) 内に送達される可能性があり、またはウイルスで細胞を感染させてそれらの生存に必須の遺伝子を標的としたと推測することができた。この点において興味深いことに、一連の電子顕微鏡観察研究は、肥満細胞顆粒内における RNA の存在を示唆する (Dvorak, A. M. および Morgan, E. S. The case for extending storage and secretion functions of human mast cell granules to include synthesis. Prog. Histochem. Cytochem. 37, 231 ~ 318 頁 (2002) [27])。

【0011】

HIV - 1 等のレトロウイルス (ヒト免疫不全症ウイルス - 1) は、パッケージングおよび細胞間輸送のための MVB を取り込む (Martin - Serrano, J. The role of ubiquitin in retroviral egress. Traffic. 8, 1297 ~ 1303 頁 (2007) [42])。内在性レトロウイルス中における Gag の保存、およびエキソソームのプロテオミクス研究における内在性レトロウイルスからの Gag の発見 (Segura, E., Amigorena, S., および Thery, C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen - specific effector immune responses. Blood Cells Mol. Dis. 35, 89 ~ 93 頁 (2005) [43]) は、幾つかの内在性レトロウイルスが MVB を利用することもできることを示唆する。一部がレトロウイルスを抑制し得る miRNA (Lecellier, C. H. ら、A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. Science. 308, 557 ~ 560 頁 (2005) [44]) と、場合によってはエキソソーム中における活性化内在性レトロウイルスおよび他の転置因子を標的とする siRNA とを含むことは、発生のこれらの作用因子に対する細胞および細胞自律的防御であり得る。さらに、III 型分泌物を有する細菌は、RNA サイレncing 機構の成分を標的とする細胞内にタンパク質を注入する。(Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins Navarro ら、Science 2008 321: 964 頁 [87])。マイコバクテリウム・スメグマチス (Mycobacteria smegmatis) 等の幾つかの細胞内細菌は、ESCRT 複合体により制限され、場合により直接的または間接的に RNA サイレncing 機構に影響を及ぼす (

Philips, J. A., Porto, M. C., Wang, H., Rubin, E. J., および Perrimon, N. ESCRT factors restrict mycobacterial growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3070~3075 頁 (2008) [45])。

【0012】

s i R N A および m i R N A は、毒性が最小限である特異的遺伝子の医薬的標的化のために大きな興味があり、内在性 m i R N A は、多くの癌、発育上の欠失、および免疫応答において重要な役割を果たす。しかし、すべての標的細胞の内の大部分の中への s i R N A または m i R N A の送達は、インビボでのそれらの使用を限定する主要な問題である。さらに、直接 m i R N A 活性を調節する多くの遺伝子は、細胞生存に必須であり、しかる 10
に薬物で標的とすることは容易ではない。さらに、M V B を通過する病原菌および / または M V B に会合し、場合によっては現行の薬物に対する耐性を発現する病原菌を除去する治療はしばしば存在しない。最後に、s i R N A または m i R N A の効果は、タンパク質産生の効果的な阻害についての予想よりもしばしば低い。

【0013】

したがって、細胞に対する望ましくない効果がないか、もしくは小さい、インビボでのすべての標的細胞の大多数への s i R N A または m i R N A の改善された送達方法の開発の必要性、または m i R N A 活性を直接調節する遺伝子を標的とすることの必要性が残っている。さらに、M V B を通過する病原菌および / または M V B に会合し、場合によっ 20
ては現行の薬物に対する耐性を発現する病原菌を除去する治療の必要性が、依然として存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献 1】Eystathiou, T. et al. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, G W182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. Mol. Biol. Cell. 13, 1338-1351 (2002).

【非特許文献 2】Schneider, M. D. et al. Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early Drosophila development. J. Cell Biol. 174, 349-358 (2006).

【非特許文献 3】Jakymiw, A. et al. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. Nat. Cell Biol. 7, 1267-1274 (2005).

【非特許文献 4】Cikaluk, D. E. et al. GERP95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. Mol. Biol. Cell. 10, 3357-3372 (1999).

【非特許文献 5】Laurino, C. C. et al. Human autoantibodies to diacyl-phosphatidylethanolamine recognize a specific set of discrete cytoplasmic domains. Clin. Exp. Immunol. 143, 572-584 (2006).

【非特許文献 6】Vidal, M., Mangeat, P., & Hoekstra, D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. J. Cell Sci. 110, 1867-1877 (1997).

【非特許文献 7】Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., & Anderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. J. Cell Biol. 147, 1431-1442 (1999).

【非特許文献 8】Kedersha, N. & Anderson, P. Mammalian stress granules and processing bodies. Methods Enzymol. 431:61-81., 61-81 (2007).

【非特許文献 9】Peschard, P. et al. Structural basis for ubiquitin-mediated dimerization and activation of the ubiquitin protein ligase Cbl-b. Mol. Cell. 27, 474-485 (2007).

【非特許文献 10】Bloch, D. B., Gulick, T., Bloch, K. D., & Yang, W. H. Processing body 50

autoantibodies reconsidered. *RNA*. 12, 707-709 (2006).

【非特許文献 1 1】Cabezas, A., Bache, K.G., Brech, A., & Stenmark, H. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J. Cell Sci.* 118, 2625-2635 (2005).

【非特許文献 1 2】Doench, J.G. & Sharp, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-511 (2004).

【非特許文献 1 3】Adams, B.D., Furneaux, H., & White, B.A. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* 21, 1132-1147 (2007).

【非特許文献 1 4】Buschow, S.L., Liefhebber, J.M., Wubbolts, R., & Stoorvogel, W. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 398-403 (2005).

【非特許文献 1 5】Thery, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569-579 (2002).

【非特許文献 1 6】Islam, A. et al. The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* 282, 9591-9599 (2007).

【非特許文献 1 7】Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654-659 (2007).

【非特許文献 1 8】Morelli, A.E. et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 104, 3257-3266 (2004).

【非特許文献 1 9】Voinnet, O. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.* 579, 5858-5871 (2005).

【非特許文献 2 0】Matsumoto, M. et al. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*. 5, 4145-4151 (2005).

【非特許文献 2 1】El-Shami, M. et al. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* 21, 2539-2544 (2007).

【非特許文献 2 2】Chim, S.S. et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* 54, 482-490 (2008).

【非特許文献 2 3】Behm-Ansmant, I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885-1898 (2006).

【非特許文献 2 4】Parry, D.H., Xu, J., & Ruvkun, G. A whole-genome RNAi screen for *C. elegans* miRNA pathway genes. *Curr. Biol.* 17, 2013-2022 (2007).

【非特許文献 2 5】Wilsch-Brauninger, M., Schwarz, H., & Nusslein-Volhard, C. A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* 139, 817-829 (1997).

【非特許文献 2 6】Irion, U. & St. J.D. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*. 445, 554-558 (2007).

【非特許文献 2 7】Dvorak, A.M. & Morgan, E.S. The case for extending storage and secretion functions of human mast cell granules to include synthesis. *Prog. Histochem. Cytochem.* 37, 231-318 (2002).

【非特許文献 2 8】Bhanji, R.A., Eystathiou, T., Chan, E.K., Bloch, D.B., & Fritzler, M.J. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin. Immunol.* 125, 247-256 (2007).

【非特許文献 2 9】Laroia, G., Sarkar, B., & Schneider, R.J. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1842-1846 (2002).

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 3 0】Hock, J. et al. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* 8, 1052-1060 (2007).
- 【非特許文献 3 1】Dorrello, N.V. et al. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science.* 314, 467-471 (2006).
- 【非特許文献 3 2】An, Q., Huckelhoven, R., Kogel, K.H., & van Bel, A.J. Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cell Microbiol.* 8, 1009-1019 (2006).
- 【非特許文献 3 3】Wang, T. & Hong, W. RILP interacts with VPS22 and VPS36 of ESCRT-II and regulates their membrane recruitment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 413-423 (2006). 10
- 【非特許文献 3 4】Hernandez-Pinzon, I. et al. SDE5, the putative homologue of a human mRNA export factor, is required for transgene silencing and accumulation of trans-acting endogenous siRNA. *Plant J.* 50, 140-148 (2007).
- 【非特許文献 3 5】Saleh, M.C. et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNA silencing. *Nat. Cell Biol.* 8, 793-802 (2006).
- 【非特許文献 3 6】Segura, E., Guerin, C., Hogg, N., Amigorena, S., & Thery, C. CD8⁺ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol.* 179, 1489-1496 (2007). 20
- 【非特許文献 3 7】Zeelenberg, I.S. et al. Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res.* 68, 1228-1235 (2008).
- 【非特許文献 3 8】Morelli, A.E. et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 104, 3257-3266 (2004).
- 【非特許文献 3 9】O'Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1604-1609 (2007).
- 【非特許文献 4 0】Pelchen-Matthews, A., Raposo, G., & Marsh, M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 12, 310-316 (2004). 30
- 【非特許文献 4 1】Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., & Frenette, G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 1-10 (2005).
- 【非特許文献 4 2】Martin-Serrano, J. The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic.* 8, 1297-1303 (2007).
- 【非特許文献 4 3】Segura, E., Amigorena, S., & Thery, C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 89-93 (2005).
- 【非特許文献 4 4】Lecellier, C.H. et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science.* 308, 557-560 (2005). 40
- 【非特許文献 4 5】Philips, J.A., Porto, M.C., Wang, H., Rubin, E.J., & Perrimon, N. ESCRT factors restrict mycobacterial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3070-3075 (2008).
- 【非特許文献 4 6】Vidal, M., Mangeat, P., & Hoekstra, D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J. Cell Sci.* 110, 1867-1877 (1997).
- 【非特許文献 4 7】Jakymiw, A. et al. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* 7, 1267-1274 (2005).
- 【非特許文献 4 8】Sherer, N.M. et al. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic.* 4, 785-801 (2003). 50

3).

【非特許文献 4 9】Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., & Rapoport, T.A. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*. 124, 573-586 (2006).

【非特許文献 5 0】Pfeffer, S. Identification of Virally Encoded MicroRNAs. *Methods Enzymol*. 427:51-63., 51-63 (2007).

【非特許文献 5 1】Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., & Tuschl, T. Cloning of small RNA molecules. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 26:Unit 26.4., Unit (2005).

【非特許文献 5 2】Thery, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-79 (2002).

【非特許文献 5 3】Skog, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10, 1470-6 (2008).

【非特許文献 5 4】Islam, A. et al. The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 282, 9591-9 (2007).

【非特許文献 5 5】Yu, J. H., Yang, W. H., Gulick, T., Bloch, K. D. & Bloch, D. B. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *Rna* 11, 1795-802 (2005).

【非特許文献 5 6】Doench, J.G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-11 (2004).

【非特許文献 5 7】Sherer, N.M. et al. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4, 785-801 (2003).

【非特許文献 5 8】Vidal, M., Mangeat, P. & Hoekstra, D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci* 110 (Pt 16), 1867-77 (1997).

【非特許文献 5 9】Laurino, C. C. et al. Human autoantibodies to diacyl-phosphatidylethanolamine recognize a specific set of discrete cytoplasmic domains. *Clin Exp Immunol* 143, 572-84 (2006).

【非特許文献 6 0】Kedersha, N. et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169, 871-84 (2005).

【非特許文献 6 1】Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654-9 (2007).

【非特許文献 6 2】Taylor, D.D. & Gercek-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110, 13-21 (2008).

【非特許文献 6 3】Farh, K.K. et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817-21 (2005).

【非特許文献 6 4】Eulalio, A. et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21, 2558-70 (2007).

【非特許文献 6 5】Matsumoto, M. et al. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics* 5, 4145-51 (2005).

【非特許文献 6 6】Hock, J. et al. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8, 1052-60 (2007).

【非特許文献 6 7】Bloch, D.B., Gulick, T., Bloch, K. D. & Yang, W. H. Processing body autoantibodies reconsidered. *Rna* 12, 707-9 (2006).

【非特許文献 6 8】Razi, M. & Futter, C. E. Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell* 17, 3469-83 (

10

20

30

40

50

2006).

【非特許文献 6 9】Cabezas, A., Bache, K. G., Brech, A. & Stenmark, H. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci* 118, 2625-35 (2005).

【非特許文献 7 0】Liu, J. et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7, 1261-6 (2005).

【非特許文献 7 1】Doyotte, A., Mironov, A., McKenzie, E. & Woodman, P. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6308-13 (2008).

【非特許文献 7 2】Decker, C.J. & Parker, R. CAR-1 and trailer hitch: driving mRNA P granule function at the ER? *J Cell Biol* 173, 159-63 (2006).

【非特許文献 7 3】Buchet-Poyau, K. et al. Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies. *Nucleic Acids Res* 35, 1289-300 (2007).

【非特許文献 7 4】Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7, 1545-9 (2008).

【非特許文献 7 5】Vasudevan, S. & Steitz, J. A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105-18 (2007).

【非特許文献 7 6】Sen, G. L. & Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633-6 (2005).

【非特許文献 7 7】Haley, B. & Zamore, P. D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11, 599-606 (2004).

【非特許文献 7 8】Li, S. et al. Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing. *J Cell Sci* 121, 4134-44 (2008).

【非特許文献 7 9】El-Shami, M. et al. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21, 2539-44 (2007).

【非特許文献 8 0】Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 15, 346-53 (2008).

【非特許文献 8 1】Chu, C. Y. & Rana, T. M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4, e210 (2006).

【非特許文献 8 2】Raposo, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-72 (1996).

【非特許文献 8 3】Jakymiw, A. et al. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* 7, 1267-74 (2005).

【非特許文献 8 4】Kedersha, N. & Anderson, P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol* 431, 61-81 (2007).

【非特許文献 8 5】Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M. & Tuschl, T. Cloning of small RNA molecules. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 26, Unit 26.4 (2005).

【非特許文献 8 6】Eisenberg, E. & Levanon, E. Y. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 19, 362-5 (2003).

【非特許文献 8 7】Navarro et al. *Science* 2008 321: 964

【非特許文献 8 8】Yekta et al. *Science*, 2004, 304: 594

【非特許文献 8 9】Wu et al. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25: 9198

【非特許文献 9 0】Bhattacharyya et al. *Cell* 2006, 126: 1111

【非特許文献 9 1】Rossi *Nat. Chem Biol.* 2007, 3: 136

【非特許文献 9 2】Maragkakis *Nucleic Acids Research* 2009 1-4

10

20

30

40

50

【非特許文献 9 3】Schwamborn et al. Cell 2009 136: 913

【非特許文献 9 4】Saleh MC et al. Nat Cell Biol. 2006 8: 793

【非特許文献 9 5】Eystatoy et al. Mol. Biol. Cell 2002 13: 1338

【非特許文献 9 6】Spizzo 2009 Cell 137: 586

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

ここで、本発明の発明者らは、有意な比率の GW182 および Ago2 が、miRNA が細胞間で輸送され得る P - ボディ様構造で多胞体 (MVB) に会合することを完全に予想外に発見した。ESCRT 複合体の幾つかの成分が miRNA の活性にとって重要であるので、MVB との RNA サイレンシング機構の会合は機能的である。このように、この研究は、細胞内区画と miRNA 経路との間の新しい結合を提案する。

10

【0016】

また、本発明者らは、GW182 および Ago2 を含有する GW - ボディは、MVB と集合するので、P - ボディとは異なることをも発見した。さらに、miRNA 抑制 mRNA は、細胞膜で特異的に濃縮されるが、このことは、MVB が miRNA - RISC 作用の新規な部位であることを意味する。MVB により分泌される精製エキソソーム様小胞は、P - ボディ成分ではなく、GW182 中において非常に濃縮される。また、ごくわずかな細胞 Ago2 および成熟 miRNA がエキソソーム中においても見出されるが、miRNA 抑制 mRNA は存在しない。MVB 内へのその ESCRT 依存性選別に一致して、P - ボディ成分でなく GW182 は、ユビキチン結合するか、またはユビキチン化タンパク質と相互作用する。さらに、幾つかの ESCRT 成分を欠く細胞は、GW182 を過剰蓄積し、miRNA 媒介遺伝子サイレンシングが損なわれたことを示す。したがって、場合により一部分の miRNA 負荷 Ago2 に会合する GW182 は、分泌および / またはリソソーム分解のために MVB 内に選別される。このプロセスは、複数回の mRNA 抑制に必要な膜結合型 miRNA - RISC の高い解離速度を可能にする。あるいは、このプロセスは、小分子 RNA の生合成、標的認識、または小分子 RNA 複合体のターンオーバー / 分解を調節する際に小分子 RNA による Ago の負荷に関与する可能性がある。実際、本発明者らは、miRNA の mRNA 標的がリソソーム内膜上に蓄積することを示すが、このことは、mRNA 標的認識がこれらの膜上で起きる可能性があることを意味する。本発明者らは、リソソームを含有する密度勾配画分中において GW182 を見出すが、このことは、小分子 RNA 複合体のターンオーバー / 分解がリソソームを介して起きることを示唆する。

20

30

【0017】

また、本発明者らは、Ago2 および GW182 を含む RNA サイレンシング機構の幾つかの主要成分が MVB のマーカーと共同在することを示した。

【0018】

驚くべきことに、本発明者らはまた、ESCRT 複合体およびユビキチン化が、哺乳類細胞内における RNA サイレンシングおよびその細胞間移行の重要な調節成分であることをも見出した。

40

【0019】

また、本発明者らは、多胞体 (MVB) に会合する大量の P - ボディまたは GW - ボディが膜と会合し、場合によっては膜で囲まれる可能性があることを示す。さらに、MVB の形成に関与する多くのタンパク質、即ち ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) からのタンパク質、例えば、Alix、Hrs (肝細胞応答性血清リントタンパク質)、vps36 (液胞タンパク質選別会合タンパク質 36)、EF1a1 および 2、PRP (プリオンタンパク質)、HMGCR (HMG CoA 還元酵素)、スフィンゴミエリナーゼ (化学抑制剤 GW4869 により標的とされる)、NPC1 (Niemann - Pick C1 タンパク質)、または MVB、もしくはエキソソームの分泌物 (例えば BIG2) に会合する他のタンパク質が、miRNA 活性にとって重要であ

50

ることが示された。ESCRT複合体は、miRNAの能力を阻害するか、または増強して、その相補型mRNAのタンパク質発現を抑制することができる。ESCRT複合体は、ある種類の小分子RNAの機能を、別の種類の機能を無損傷にする一方で選択的に調節するための手段を提供することができる。例えば、miRNA活性が影響され得るが、siRNA活性はそうではない。また、MVB中において形成され、かつ細胞により放出されるエキソソームと呼ばれる少しの小胞（直径約50nmの）しか、ある細胞から別の細胞にmiRNA活性またはsiRNA活性を移行することができないことも示された。これらの発見は、miRNA活性またはsiRNA活性を細胞中において調節することが可能であり、かつ他のヒト細胞に移行することが可能な手段を示す。さらに、本発明者らは、ESCRT複合体の幾つかのメンバーのノックダウンがmiRNA活性を除去するが、一方で他のノックダウンがその活性を増加させることを見出す。最後に、RNAサイレンシング機構およびmiRNAの成分は、エキソソーム内に負荷され、エキソソームと共にインキュベートされる細胞内における遺伝子発現を阻害することができる。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0020】

したがって、本発明の第1の態様は、標的器官もしくは標的細胞へのsiRNA、miRNAもしくは関連分子またはかかる分子の阻害剤の送達速度および/または効率を決定する方法であって、前記標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、前記siRNAおよび/またはmiRNAの、ならびに/あるいは、前記miRNAおよび/または前記siRNAが標的とするmRNAのレベルを測定することを含む方法に関する。

【0021】

換言すれば、本発明は、標的器官もしくは標的細胞へのsiRNA、miRNAもしくは関連分子またはその阻害剤の送達速度および/または送達効率を決定する方法であって、前記標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、前記siRNAおよび/またはmiRNAの、ならびに/あるいは、前記miRNAおよび/または前記siRNAが標的とするmRNAのレベルを測定することを含む方法に関する。

【0022】

本発明の意味における「siRNA」は、本発明に適切であり得る任意の干渉RNAを意味する。さらに詳しくは、siRNAは、6～29ヌクレオチドを含む短い干渉RNAを示すことができる。より正確には、およそ22ヌクレオチド長の短い干渉RNAを示すことができる。好都合には、場合によりAGOタンパク質1～4および/またはGW182タンパク質A、BもしくはCまたはTNBW1（トリヌクレオチドGW1）の内のいずれかを含むRNAサイレンシング複合体の少なくとも1種の成分と共に、例えばmRNA開裂、分解、または翻訳の阻害によって遺伝子発現を修飾する短い干渉RNAであり得る。

【0023】

本発明の意味における「miRNA」は、本発明に適切であり得る任意のmiRNAを意味する。好都合には、生物学的活性型において、長さが約17～約25個のヌクレオチド塩基である任意の天然小型非コードRNAである。好ましくは、わずか9個のヌクレオチドであってよく、即ち9個以下のヌクレオチドを含む。好都合には、miRNAは、標的mRNA翻訳を抑制するか活性化することにより、またはmRNAの分解、安定化もしくは細胞内局在性を促進することにより、転写後に遺伝子発現を調節することができる。本発明の意味において、しばしば、しかし限定されることなく、miRNAは、内因的に発現されて、または合形成態および変異型で投与されて、mRNA翻訳の負の調節因子として機能することが可能であり、即ち、より大きな量の特異的miRNAがより低いレベルの標的遺伝子発現と相関する。また、miRNAは、翻訳（例えばVasudevans refs 74および75の）を活性化することもできる。好都合には、miRNA様である小分子RNA分子は、転写を活性化することができるか、または抑制することができる。

【0024】

本発明の意味における「関連分子」は、DNA（デオキシリボ核酸）、piRNA、合成ヌクレオチド、ならびにsiRNA、miRNA、DNAまたはその変異体の修飾変異体を含むあらゆるヌクレオチドを意味する。かかる変異体は、化学的に合成することが可能であり、RNAサイレンシングに関連するプロセスに利点を有する可能性がある。これらの修飾の一部、例えば2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-デオキシ-フルオロウリジン修飾またはホスホロチオエートは、siRNA関連分子を分解から保護することの一助となり得る。また、他の修飾、例えばメチレン架橋により2'-酸素がリボース環の4'-炭素に連結されるロックされた核酸の修飾は、siRNA関連分子のその標的への親和性を増加させること、または標的外の効果を低下させることの一助となり得る。他の修飾は、例えば、二本鎖miRNA/miRNA*複合体の一方の鎖に5'リン酸またはメチルを付加することにより、AGO内へのsiRNAまたはmiRNAの正確な鎖の負荷を増強することができる。

10

【0025】

本発明の意味において、siRNA、miRNAまたは関連分子は、動物、好ましくはヒトに、または細胞に投与される。前記ヒトは、それを必要とする患者であってよい。前記投与は、疾患、例えば癌の治療の中に、または細胞へのトランスフェクションにより実施され得る。投与されると、このsiRNA、miRNAまたは関連分子は、標的器官または標的細胞に送達される。

【0026】

siRNA、miRNAまたは関連分子の投与は、標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、前記siRNAおよび/またはmiRNAの、ならびに/あるいは、前記miRNAおよび/または前記siRNAが標的とするmRNAのレベルの測定の前に実施される。

20

【0027】

この投与は、当業者により周知のすべての手法により、例えば、siRNAと、インビトロでのトランスフェクションのために使用されるカチオン脂質トランスフェクション試薬とを混合し、関連組織内にsiRNA脂質複合体を直接注入すること、または体腔内にそれを点滴することにより、あるいは、siRNAと、細胞内に核酸を運搬することが知られている他の分子（即ち、特定のカチオン性ペプチド）とを混合し、流出静脈内へのカテーテルを介した急激な逆方向の注入を行い、末梢静脈への水圧注入を行い、カチオン性ポリマーもしくはペプチドとsiRNAを複合体形成するか、ナノ粒子もしくはリボソーム内にsiRNAを組み込むかまたは特異的受容体を担持する細胞へのsiRNAの送達を限定するために細胞表面受容体への抗体フラグメントもしくはリガンドに共有結合もしくは非共有結合することにより実施され得るが、この一覧は限定的ではない。

30

【0028】

すべての細胞がRNAi機構を有し、かついずれの遺伝子も可能な標的であるので、優性遺伝子の発現により引き起こされる、または非常に悪化するいずれの疾患も、概ねRNAiにより治療され得る。これらの疾患は、例えば癌、神経変性疾患、ウイルス感染症および黄斑変性であり得るが、この一覧は限定的ではない。

【0029】

本発明の意味において、「送達速度」は、対照と比較した、その作用部位、即ちそのmRNA標的が局在する部位に到着し得る、または開裂し得るか、もしくは標的mRNAの分解をもたらし得る、または標的mRNAの翻訳を阻害し得る、個体に投与されたsiRNAまたはmiRNAの任意の比または量を意味する。

40

【0030】

本発明の意味において、「送達効率」は、対照と比較した、その作用部位、即ちそのmRNA標的が局在する部位で活性を有し得る、または開裂し得るか、もしくは標的mRNAの分解をもたらし得る、または標的mRNAの翻訳を阻害し得る、個体に投与されたsiRNAまたはmiRNAの任意の比または量を意味する。

【0031】

50

本発明の意味において、「標的器官または標的細胞」は、*s i R N A*、*m i R N A*もしくは関連分子が多少の*m R N A*の翻訳を抑制し得るか、その分解を増強し得るか、または多少の*m R N A*の開裂を向上させ得るあらゆる器官または細胞を意味する。

【0032】

任意の細胞、細胞群、細胞断片または細胞産物は、本発明の方法で使用され得る。

【0033】

細胞は、培養培地中に、または生体液中に、または体液中に含まれ得る。

【0034】

本発明の意味において、「小胞」または「エキソソーム」は、大きさが20~250 nmのあらゆる小胞または膜結合構造を意味する。かかる小胞の例は、微小胞、微粒子、エキソソーム様小胞、デキソソーム、テキソソーム、プロテアソーム、エビジモソーム、「エキソソーム様小胞」であり得るが、この一覧は網羅的ではない。小胞の大きさは、一般に20~250 nm、例えば20~100 nmであるが、100 nm~3マイクロMであってもよい。小胞は、例えば血液、尿、唾液および他の体液から、当業者に公知の手段により精製され得る。例えば、通常、遠心分離により、例えば200 gで細胞を除去し、しかるに小胞またはエキソソームを含有する上清を得ることによって小胞を精製することが可能である。小胞またはエキソソームを得る別の方法は、エキソソームまたは小胞を精製するためのさらなる遠心分離ステップを行うことであり、より大きな小胞をさらに除去するための1000 gおよび10000~16000 gでのステップを含む可能性がある。70000~120000 gでのその後の遠心分離が、エキソソーム様小胞を精製するために標準的に使用される。エキソソームまたは小胞を得るための別の方法は、異なる粒度を排除するためのフィルタの組合せを使用することを含み、例えば興味の対象の小胞よりも大きい小胞または粒子を除去するために、0.45マイクロMまたは0.22マイクロMのフィルタを使用し得る。エキソソームまたは小胞は、最終的にはエキソソーム様小胞について濃縮するためのビーズ（例えば、アガロース/セファロースビーズ、磁性ビーズ、または精製を容易にする他のビーズ）と組み合わせて、抗体、レクチン、または興味の対象の小胞に特異的に結合する他の分子を含む幾つかの手段により精製され得る。エキソソーム様小胞上で濃縮されるタンパク質の例としては、CD63、トランスフェリン受容体、シアル酸、ムチン、Tsg101（腫瘍感受性遺伝子101）、Alix、アネキシンII、EF1a（翻訳伸長因子1a）、CD82（分化クラスター82）、セラミド、スフィンゴミエリン、脂質ラフトマーカー、PRNP（PRionタンパク質）を挙げることができるが、勿論これらに限定されるものではない。本発明の場合、興味の対象の細胞型に由来するマーカーが、しばしば使用され得る。例えば、RNAi治療が肝臓組織を対象とする場合、小胞は、他の細胞または組織に由来する小胞から肝臓由来小胞を区別するために肝臓特異的マーカーを使用して無細胞液から精製され得る。エキソソームを精製するための他の手法としては、密度勾配遠心分離法（例えば、ショ糖勾配またはoptiprep勾配）、電荷分離が挙げられる。これらのすべての濃縮手法および精製手法は、他の方法と組み合わせることが可能であるか、または単独で用いることが可能である。したがって、体液から単離されたエキソソームは、*s i R N A*治療薬の送達速度または効率の定量的測度を提供することができる。

【0035】

本発明の意味において、「エキソソーム」は、細胞のあらゆる小型小胞を意味する。本発明の意味において、かかる小型小胞は、多胞体を含むが限定されない幾つかの手段により細胞中において生成され得る。

【0036】

本発明の意味において、「多胞体」は、異なるタンパク質選別機構を使用し得るエンドリソソーム系の任意のボディ、例えば多胞体の任意のサブタイプを意味する。例えば、MVBは、エンドソーム、例えば後期エンドソーム、MHC（主要組織適合性複合体）クラスII負荷区画、エンドリソソーム系に輸送することができるか、もしくはエンドリソソーム系から輸送することができる小胞体およびゴルジに由来するオートファゴソーム、リ

10

20

30

40

50

ソソーム、エンドソームおよび小胞を含む細胞内小器官であり得る。

【0037】

本発明の意味において、「測定」は、定量的または質的な測定を可能にし得る任意の解析、あるいは *siRNA* および / または *miRNA* および / または *mRNA* 標的のレベルを比較することを可能にし得る任意の解析を意味する。*RNA* を測定するための当業者に公知の任意の方法は、本発明に適切であり得る。かかる方法は、実際の多くの変法における *qRT-PCR* (定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) (例えば、*Sybr Green*、*Beacon technologies*)、またはヌクレオチドの特異性がマイクロ *RNA*、*mRNA*、他の *RNA*、または *DNA* 分子を検出するために使用される任意の種類または組合せの修飾 (特に、ロックされた核酸 [*LNA*]、2'-*o*-メチル) による任意の長さのオリゴヌクレオチドまたはヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づく手法であってよい。これらの手法において、オリゴヌクレオチドは、溶液中、チップ上、ゲルまたは他の担体の中にあってよい。これらの手法において、*mRNA* またはマイクロ *RNA* は、蛍光、またはクエンチャーと蛍光との組合せ、放射能、または他の化学もしくは発光検出方法を使用して検出され得る。*RNAi* の概念に基づく *siRNA* または治療分子が使用される場合、*RNA* 分子は、化学的に修飾することが可能であり (例えば、*LNA*、2'-*o*-メチル)、*RNAi* 治療分子の測定は、*RNAi* 治療薬として使用される *RNA* / *DNA* または他の分子の修飾を検出することを可能にする任意の手法により実施され得る。4. 本発明の一実施形態において、*siRNA* および / または *miRNA* および / または標的 *mRNA* のレベルの測定は、*qRT-PCR* により、あるいはマイクロアレイまたは他のチップ上のハイブリダイゼーションにより、あるいはゲルもしくは膜上または溶液中におけるハイブリダイゼーションにより実施される。

10

20

【0038】

これらの測定は、*Trizol* 抽出等、当業者に公知の幾つかの手法の内のいずれかにより単離される、場合によっては精製形態における細胞、組織または小胞からの *RNA* を含有する画分を例えば必要とすることができる。

【0039】

例えば、動物の血清を含まない培地中で細胞を培養して、前記血清からのエキソソームの混入を回避することができる。エキソソームからの *RNA* の測定は、例えば細胞の除去によるより大量の細胞 *RNA* からの除去または独立を必要とする可能性がある。好都合には、細胞、組織または小胞は、*siRNA* 治療の治療条件、または *miRNA* もしくは *siRNA* 標的 *mRNA* の研究における興味の対象の条件を保存するかまたは模倣するために培養すること、治療すること、または得ることが可能である。例えば、*siRNA* 療法の有効性を確認するために使用される組織または小胞は、低温で処理することが可能であり、直ちにおよび続いて、試料の統合性を保存するのに十分な温度で凍結することが可能である。

30

【0040】

例えば、飢餓中に肝臓内の *miR-122* により調節される *mRNA* を発見するため、飢餓動物から得られた肝臓組織が模倣体または阻害剤で治療される。*miRNA* または *siRNA* の模倣体は、内在性 *miRNA* またはその前駆体の多くのまたはすべての性質を保持することができるが、また、*miRNA* / *siRNA* 分子について上で考察されたようにその安定性または有効性を増強するために修飾されることも可能である。

40

【0041】

miRNA または *siRNA* の阻害剤は、阻害すべき *miRNA* または *siRNA* に対する1つまたは複数の、完全にまたは部分的にマッチする標的部位を含むことが可能であり、それにより、*miRNA* または *siRNA* の分解を隔離すること、競合すること、または引き起こすことができる。これらの阻害剤は、類似の方法でも修飾され得る。これらの修飾の一部、例えば2'-*o*-メチル、2'-*o*-アリル、2'-デオキシ-フルオロウリジン修飾またはホスホロチオエートは、*siRNA* 関連分子を分解から保護することの一助となり得る。また、他の修飾、例えばメチレン架橋により2'-酸素がリボース環

50

の4'-炭素に連結されるロックされた核酸の修飾は、s i R N A 関連分子のその標的への親和性を増加させること、または標的外の効果を低下させることの一助となり得る。他の修飾は、例えば、二本鎖m i R N A / m i R N A * 複合体の一方の鎖に5'リン酸またはメチルを付加することにより、A G O 内へのs i R N A またはm i R N A の正確な鎖の負荷を増強することができる。これらの種類の分子は、幾つかの会社、例えばm i R - 122のQ i a g e n およびA m b i o n から現在商業的に入手可能であり、血液から精製された肝臓由来エキソソームが使用され得る。

【0042】

本発明の意味における「前記m i R N A および/または前記s i R N A が標的とするm R N A」は、s i R N A、m i R N A または関連分子の投与により完全にまたは部分的に脱アデニル化され得るかまたは分解され得る任意のm R N A を意味する。好都合には、その翻訳は、s i R N A もしくはm i R N A もしくは関連分子により抑制され得るか、または開裂され得る。

10

【0043】

前記m i R N A および/または前記s i R N A が標的とするかかるm R N A は、例えば、m i R - 196、L i n - 28、C A T - 1、T N F であってよい。M i R - 196は、その標的m R N A の内の少なくとも1つ(H O X B 8)の開裂をもたらすm i R N A の一例である(Y e k t a ら、S c i e n c e、2004年、304:594頁[88])。L i n - 28は、m i R N A (m i R - 125b)により分解されるm R N A の一例である(W u ら、M o l . C e l l . B i o l . 2005年、25:9198頁[89])。C A T - 1は、m i R N A による翻訳抑制を受けるm R N A の一例である(B h a t t a c h a r y y a ら、C e l l 2006年、6:1111頁[90])。T N F は、その翻訳がm i R 369により活性化されるm R N A の一例である(V a s u d e v a n ら、[74]および[75])。また、小分子R N A は、負および正の方法で転写を調節することもできる(R o s s i N a t . C h e m B i o l . 2007年3:136頁[91])。

20

【0044】

本発明の特定の一実施形態において、本発明の方法は、
(i) 好ましくは以前にs i R N A および/またはm i R N A で治療された患者の体液からエキソソームまたは小胞を単離するステップと、
(ii) 前記エキソソーム中のs i R N A および/またはm i R N A および/または標的m R N A のレベルを測定するステップと、
(iii) 場合により、前記レベルを対照と比較し、
次いでs i R N A および/またはm i R N A の送達速度および/または効率を決定するステップと
を含む。

30

【0045】

本発明の意味において、「単離」は、培地からのエキソソームまたは小胞の分離を意味する。この分離は、s i R N A および/またはm i R N A および/または標的m R N A のレベルの測定を可能にする。単離または分離は、s i R N A および/またはm i R N A および/または標的m R N A のレベルの測定を可能にするためにエキソソームまたは小胞の精製を伴ってよい。

40

【0046】

幾つかの実施形態においては、エキソソームまたは小胞を単離するためにサイズ排除クロマトグラフィーを用いることができる。サイズ排除クロマトグラフィー手法は、本技術分野において周知である。幾つかの実施形態において、空隙体積の画分は、単離され、興味の対象のエキソソームまたは小胞を含む。さらに、幾つかの実施形態において、エキソソームまたは小胞は、本技術分野において周知の通りの(1種または複数のクロマトグラフィー画分の)遠心分離手法により、クロマトグラフ分離の後でさらに単離され得る。幾つかの実施形態においては、例えば密度勾配遠心分離法を、さらにエキソソームを単離す

50

るために用いることができる。

【0047】

本発明の意味において、「レベル」は、s i R N Aおよび/またはm i R N Aおよび/または標的m R N Aの定性的（例えば、単離されたエキソソームまたは小胞中に存在するかまたはしないか）および/または定量的（例えば、どれだけ存在するか）な測定を意味する。

【0048】

本発明の意味において、「対照」は、i R N A治療薬による治療の前もしくは後の同じ個体のエキソソーム中における、またはi R N A治療薬で治療されない、もしくはプラセボで治療された別の個体のエキソソームの、s i R N Aおよび/またはm i R N Aおよび/またはm R N A標的のレベルを意味する。対照は、治療された、治療されていない、または対照で治療された個体、動物または細胞のs i R N Aおよび/またはm i R N Aおよび/またはm R N Aおよび/または他のR N Aおよび/またはエキソソームまたは小胞を定量することを許容する/可能にする他の分子、あるいはその成分であってよい。

10

【0049】

本発明の意味において、「他のR N A」は、m R N A分子以外の任意のR N A分子を意味する。同化または異化のプロセスにおける、非コードR N A、例えばX i s tまたはB I C、t R N A、r R N A、s i R N A、p i R N A、m i R N A、リボザイムまたは他のR N A分子。

【0050】

本発明の本実施形態において、対照は、標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、以前に投与されたs i R N Aのレベルに従うことにより実施され得る。エキソソームまたは小胞中のs i R N Aのレベルは、細胞の他の区画中の、例えば細胞質中の、または細胞外区画中のs i R N Aのレベルと比較され得る。

20

【0051】

また、対照は、標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、以前に投与されたm i R N Aのレベルに従って実施することも可能である。エキソソームまたは小胞中におけるm i R N Aのレベルは、細胞の他の区画中の、例えば細胞質中の、または細胞外区画中のm i R N Aのレベルと比較され得る。

【0052】

また、対照は、標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、以前に投与されたs i R N Aおよび/またはm i R N Aにより標的とされるm R N Aのレベルに従って実施することも可能である。エキソソームまたは小胞中の標的m R N Aのレベルは、細胞の他の区画中の、例えば細胞質中の、または細胞外区画中の標的m R N Aのレベルと比較され得る。

30

【0053】

また、対照は、標的器官または標的細胞のエキソソームまたは小胞中の、以前に投与された別のR N Aのレベルに従って実施することも可能である。この他のR N Aは、任意の内在性m i R N A（500超のm i R N A / 種の一覧についてはm i R b a s e [G r i f f i t h s - J o n e s 2008年、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 36 : (S 1) D 1 5 4] 参照）、任意の合成または誘導m i R N A模倣体、s i R N A分子、コードまたは非コードR N A、m i R - 21、m i R - 141、m i R - 200a、m i R - 200b、m i R - 200c、m i R - 203、m i R - 205、m i R - 214、U6 R N A、6 R N AによるY1、t R N A、28S、18Sまたは5S r R N A、7SK R N A、s n o R N A、チューブリンm R N A、グリセルアルデヒド3 - リン酸デヒドロゲナーゼ（G A P D H）m R N A、 β - 2 - マイクログロブリンm R N A、ユビキチンm R N Aであってよいが、この一覧は網羅的でない。エキソソームまたは小胞中の他のR N Aのレベルは、細胞の他の区画中の、例えば細胞質中の、または細胞外区画中の他のR N Aのレベルと比較され得る。

40

【0054】

50

本発明の意味における「エキソソームまたは小胞の定量を許容する他の分子」は、エキソソームまたは小胞中の *miRNA*、*siRNA* または *RNA* のレベルを測定するための基準として公知の任意の分子を意味する。標的 *RNA* レベルは、エキソソーム中において比較的一定 (± 35 の変動) のまたは公知のレベルの脂質、タンパク質、代謝産物等の *RNA* 以外の分子に正規化され得る。これは、未治療であるかまたは健康なヒトのエキソソームまたは小胞中のレベルが当業者に周知である分子であってよい。例えば、この他の分子は、アクチンまたは *RRM2* (リボヌクレオチドレダクターゼ *M2* ポリペプチド) *mRNA*、*U6 RNA*、*CD63*、*CD82* または他のテトラスパニンタンパク質、*tsG101*、*flotillin*、*EF1a*、*MHC* クラス *I* または *II*、スフィンゴミエリン、コレステロール、*GPI* アンカー型タンパク質、またはホスファチジルエタノールアミンであってよい。

10

【0055】

本発明の意味において、「その成分」は、エキソソームまたは小胞の任意の成分を意味する。この成分は、例えば、*CD63*、*CD82*、*PLP* または他のテトラスパニンタンパク質、*tsG101*、*flotillin*、*EF1a*、*MFG-E8*、*TCTP* (翻訳調節腫瘍タンパク質)、*MHC* クラス *I* または *II*、スフィンゴミエリン、コレステロール、*GPI* アンカー型タンパク質、またはホスファチジルエタノールアミンであってよい。

【0056】

本発明の意味において、「治療されていない個体」は、*siRNA* または *miRNA* または関連分子の投与を受けなかった個体を意味する。この個体は、健康なヒト、あるいはまだ治療されていない、または *siRNA* もしくは *miRNA* もしくは関連分子による治療の効果が低下するのに十分に隔たった時点 (3日間~少なくとも2週間以上) に治療された患者であってよい。

20

【0057】

本発明の意味において、「対照で治療された個体」は、プラセボ、または同じ遺伝子の発現を標的とすることができないある分子で以前に治療された任意の個体を意味する。

【0058】

本発明の一実施形態において、体液は、血液産物、尿、肺洗浄液、唾液、乳、血清、血漿、腹水、囊胞液、胸膜液、腹腔液、髄液または脳脊髄液、涙液、喀痰、および他の体液、または培養細胞の上清から選択され得る。

30

【0059】

本発明の一実施形態において、本発明の方法のステップ (i) ~ (iii) は、*siRNA* および / または *miRNA* 治療の前および後、および / または治療の効果が減少する期間 (3日間~少なくとも2週間以上) の後 (即ち、*siRNA* および / または *miRNA* の投与の前および後) に実施される。

【0060】

換言すれば、本発明の方法は、*siRNA* および / または *miRNA* による患者の治療の前に1回、ならびに *siRNA* および / または *miRNA* による患者の治療の後、および / または治療の効果が減少する期間 (3日間~少なくとも2週間以上) の後に1回の2回実施される。治療前および治療後のエキソソームまたは小胞中の標的とされる *siRNA* および / または *miRNA* および / または *mRNA* のレベルを比較することは、こうして可能である。本実施形態において、対照は、治療前のエキソソームまたは小胞における *siRNA* および / または *miRNA* のレベルの測定である。

40

【0061】

換言すれば、本発明の方法は、*siRNA* および / または *miRNA* で治療されていないヒトからエキソソームまたは小胞を単離するステップと、次いで前記エキソソームまたは小胞中の *siRNA* および / または *miRNA* および / または標的 *mRNA* のレベルを測定するステップと、次いで、場合により、前記レベルと対照とを比較するステップと、前記 *siRNA* および / または *miRNA* を前記ヒトに投与するステップと、次いで本発

50

明の方法のステップ(i)~(iii)を実施するステップと、次いでs i R N Aおよび/またはm i R N A治療薬の送達速度および/または効率を決定するステップとを含む。

【0062】

ステップ(i)~(iii)が、s i R N Aおよび/またはm i R N A治療の前、間および後に実施される、請求項1から5までのいずれか一項に記載の方法。

【0063】

本発明の意味において、「s i R N Aおよび/またはm i R N A治療の間」は、前記方法が、s i R N Aおよび/またはm i R N Aで治療された患者からのエキソソームまたは小胞の単離と、s i R N Aおよび/またはm i R N Aの投与の後の異なる時点での前記エキソソームまたは小胞中のs i R N Aおよび/またはm i R N Aおよび/または標的m R N Aのレベルの測定とを含むことを意味する。これらの異なる時点は、例えば、s i R N Aの送達後0分間、1分間、2分間、5分間、10分間、30分間、45分間、1時間、2時間、3時間、または好ましくは1日間~5日間であってよい。

10

【0064】

本発明の別の目的は、標的器官または標的細胞へのs i R N Aおよび/またはm i R N Aの送達効率または活性の決定方法であって、前述のs i R N A、m i R N Aまたは関連分子の送達速度および/または効率の決定方法を実施することを含む方法である。

【0065】

換言すれば、標的器官または標的細胞へのs i R N Aおよび/またはm i R N Aの送達効率または活性の決定方法は、前述のs i R N A、m i R N Aまたは関連分子の送達速度および/または効率の決定方法を実施することと、標的器官または標的細胞へのs i R N Aおよび/またはm i R N Aの送達効率または活性の決定とを含む。

20

【0066】

本発明の意味における「s i R N Aおよび/またはm i R N Aの送達効率」は、s i R N Aおよび/またはm i R N Aがその機能特性を保持し得る方法で細胞に到着する能力を意味する。効率的送達は、対照と比較して標的m R N Aのレベルの変化(例えば低下)がエキソソーム中において生じる場合に認識され得る。また、効率的送達は、細胞内膜上における標的とされるm R N Aの蓄積によっても認識され得る。また、効率的送達は、エキソソーム中におけるm i R N Aまたはs i R N Aの濃縮によっても認識され得る。

30

【0067】

本発明の意味において、「s i R N Aおよび/またはm i R N Aの活性」は、細胞中における標的m R N Aおよび/またはタンパク質のレベルに影響を及ぼすs i R N Aおよび/またはm i R N Aの能力を意味する。この効果は、細胞中における標的m R N Aまたはタンパク質のレベルの変化(例えば低下)であってよい。さらに詳しくは、それは、エキソソーム中における標的m R N Aまたはタンパク質のレベルの低下であってよい。

【0068】

本発明の特定の一実施形態において、前記s i R N Aおよび/またはm i R N Aの送達効率または活性は、治療後の、即ちm i R N A、s i R N Aまたは関連分子の投与後のエキソソーム中におけるm i R N A、s i R N Aまたは標的m R N Aのレベルの低下または変化によって認識される。

40

【0069】

本発明の意味において、「低下」は、対照と比較して、s i R N Aまたはm i R N Aまたはm R N Aのレベルの1%超、または10%もしくは20%もしくは30%超の減少を意味する。

【0070】

本発明の意味において、「濃縮」は、対照と比較して、s i R N Aまたはm i R N Aまたはm R N Aのレベルの1%超、または10%もしくは20%もしくは30%超の増加を意味する。

【0071】

本発明の一実施形態において、ステップi)の前に、(1つまたは複数の)m R N A標

50

的を同定するために全細胞の mRNA の含量を決定するステップが実施される。

【0072】

好都合には、全細胞の mRNA の含量を決定するこのステップは、siRNA、miRNA または関連分子の投与前に実施される。好都合には、それは、siRNA、miRNA または関連分子の投与後に再度実施され得る。

【0073】

好都合には、ある mRNA のレベルの低下または変化は、この mRNA が siRNA、miRNA または関連分子の標的である可能性があることを示す。

【0074】

本発明の一実施形態において、全細胞の mRNA の含量を決定するステップは、mRNA マイクロアレイ、mRNA、または miRNA もしくは siRNA が標的とする他の RNA もしくは DNA を同定する大規模方法、qRT-PCR、大規模多重遺伝子アプローチから選択される方法を用いて実施される。場合により、全細胞の mRNA の含量の決定は、生物情報科学的解析を用いて確認され得る。

10

【0075】

本発明の一実施形態において、標的器官または標的細胞への siRNA および / または miRNA の送達効率または活性の決定方法は、前記標的器官もしくは標的細胞の膜画分中および全細胞中における、前記 siRNA および / または前記 miRNA、および / または前記 miRNA および / または前記 siRNA が標的とする前記 mRNA のレベルの測定を含む。

20

【0076】

本発明の意味において、「膜画分」は、任意の種類の膜画分を意味する。例えば、これとしては、一般的な膜（小胞体およびゴルジの膜）、トランスゴルジ網、エンドソーム、リソソーム、オートファゴソーム、多胞体、またはこれらの細胞小器官の内のいずれかの間、もしくはエンドリソソーム系の間で輸送されるあらゆる小胞の中において濃縮される画分を挙げることができる。

【0077】

本発明の特定の一実施形態において、全細胞の mRNA の測定が行われる。当業者に公知の RNA を測定するための任意の方法が使用され得る。かかる方法は、実際の多くの変種における qRT-PCR（定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）（例えば、Sybr Green、Beacon technologies）、またはヌクレオチドの特異性が前記 RNA を検出するために使用される任意の種類または組合せの修飾（特に、ロックされた核酸 [LNA]、2'-O-メチル）による任意の長さのオリゴヌクレオチドまたはヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づく手法であってよい。これらの手法において、オリゴヌクレオチドは、溶液中、チップ上、ゲルまたは他の担体の中にあってよい。これらの手法において、RNA は、蛍光、またはクエンチャーと蛍光との組合せ、放射能、または他の化学もしくは発光検出方法を使用して検出され得る。

30

【0078】

miRNA、siRNA または関連分子の存在下での全細胞中における mRNA レベルの低下により、それが miRNA 標的であることが確認され得る。

40

【0079】

あるいは、標的器官または標的細胞への siRNA および / または miRNA の送達効率または活性の決定方法は、エキソソーム、膜画分および全細胞の中における mi/siRNA 標的 mRNA の比を比較するステップを含む。

【0080】

換言すれば、本発明の方法は、エキソソーム中、膜画分中、および全細胞中における miRNA または siRNA 標的 mRNA のレベルを決定し、次いで、エキソソーム中の標的 mRNA / 膜画分中の標的 mRNA の比と、エキソソーム中の標的 mRNA / 全細胞中の標的 mRNA の比とを算出するステップを含む。

【0081】

50

あるいは、前記方法は、エキソソーム中と細胞中とにおける $miRNA$ もしくは $siRNA$ ($mi/siRNA$) 標的 $mRNA$ の比を比較するステップ、またはエキソソーム中と膜中とにおける $mi/siRNA$ 標的 $mRNA$ の比を比較するステップ、またはエキソソーム中と細胞中と膜中とにおける $mi/siRNA$ 標的 $mRNA$ の比を比較するステップ、または膜中と細胞中とにおける $mi/siRNA$ 標的 $mRNA$ の比を比較するステップ、または $mi/siRNA$ を含有する細胞に由来するエキソソーム中と前記 $mi/siRNA$ を含有しない対照細胞に由来するエキソソーム中とにおける $mi/siRNA$ 標的 $mRNA$ の比を比較するステップを含む。

【0082】

本発明の特定の一実施形態において、体液からエキソソームを単離するステップ (i) は、沈殿、溶媒抽出、遠心分離、クロマトグラフィー、分画遠心分離、サイズ濾過、全細胞の除去、密度分離、電気分離、または小胞の特徴的な脂質、糖もしくはタンパク質マーカーを使用する親和性濃縮から選択される手法により実施される。

【0083】

場合により、前記方法は、前記エキソソームまたは小胞中における前記 $siRNA$ および/または $miRNA$ および/または標的 $mRNA$ のレベルの検出のステップをさらに含み、場合により、標識、放射能標識、蛍光標識、 $qRT-PCR$ 、ハイブリダイゼーション、クエンチャーおよび蛍光の組合せ、放射能、 RNA/DNA もしくは他の分子の修飾を検出することを可能にする任意の手法のステップを含む。

【0084】

本発明の別の目的は、前記 $siRNA$ の「標的外」のまたは望ましくない効果の決定を含む、 $miRNA/siRNA$ または類似の分子が標的とする $mRNA$ または遺伝子を決定するための本発明による方法の使用である。

【0085】

例えば、この方法は、前記 $siRNA$ の「標的外」のまたは望ましくない効果の決定を含む、 $miRNA/siRNA$ もしくは類似の分子の $mRNA$ 標的の内の大きな比率、例えば 10 ~ 1000、またはすべての決定のために使用され得る。

【0086】

本発明の意味において、「標的外」は、 $siRNA$ 媒介サイレンシングの意図しない帰結を意味する。換言すれば、標的外の効果は、 $RNAi$ 戦略が意図的には標的としなかった遺伝子の調節であり得る。

【0087】

本発明の意味において、「 $siRNA$ の望ましくない効果の決定」は、 $RNAi$ の望ましくない標的である RNA またはタンパク質に対する認められた効果を意味する。この場合、 $siRNA$ は、1つまたは少しの特異的 RNA を標的とするために使用される可能性があるが、一方で $siRNA$ の効果は、異なるか、またはより多くの RNA またはタンパク質に対して認められる。この方法は、すぐに約 20000 $mRNA$ のレベルを定量するためのマイクロアレイまたは高スループット配列決定を使用することができる。

【0088】

本発明は、費用効果的かつ効率的な方法で $miRNA$ 標的の内の大きな比率の正確な決定を可能にすることができる。本発明者らは、 $miRNA$ および外因的に送達された $siRNA$ が、エキソソームと呼ばれる細胞が分泌する 50 ~ 100 nm の小胞内に含まれることを示した。本発明者らは、 $miRNA$ および $miRNA$ 活性に關与するタンパク質の選択群がエキソソーム中において分泌される機構を詳細に記載した。 $miRNA$ レポーター系を使用して、本発明者らは、対照 $mRNA$ と比較して、 $miRNA$ が標的とする $mRNA$ の輸送および局在化をフォローすることができた。本発明者らは、 $miRNA$ 標的 $mRNA$ が、細胞内膜上に 5 ~ 10 倍蓄積し、分泌されたエキソソームの内部で同様に減少したことを見出した (図 1 g および 3 f)。 $miRNA$ が標的とする単一の $mRNA$ により為されたこの発見を追求するため、本発明者らは、細胞と比較してエキソソーム中におけるすべての $mRNA$ の存在を測定した一般公開されているデータを利用した。このデ

10

20

30

40

50

ータセットにより、87%の公知のmiRNA抑制mRNAがエキソソーム中において選択的に減少することが確認された。miRNAが過剰発現するかまたは阻害される場合の膜でのおよびエキソソーム中における反対の濃縮および反対の効果に基づくさらなる対照による最適化戦略は、miRNA標的の同定の率を87%へと非常に高めるが、それは、他の利用可能な手法により提供されるmiRNA標的の同定の率(20~70%)および精度を既に非常に上回る。

【0089】

mRNAマイクロアレイは、全細胞において実施され得る。miRNAの存在下での全細胞中におけるmRNAレベルの低下により、miRNA標的としてのmRNAがさらに確認される(全細胞中における不変のmRNAレベルが標的としてのmRNAを除外しないにもかかわらず)。

10

【0090】

miRNA標的が保存または非保存miRNA標的配列を含有することを生命情報科学的に確認することにより、2次的またはsi/miRNA独立標的が減少し得るか、または除去され得る。

【0091】

上記のアプローチの組合せは、偽陽性をほとんど取り除いた総合的なsi/miRNA標的の一覧を提供することができる。

【0092】

マイクロアレイまたは高スループット配列決定の生命情報科学解析と結び付けられたエキソソーム精製が、興味の対象のmiRNAまたはsiRNAの(1つまたは複数の)標的を同定するために使用され得る。miRNAの数百または数千の標的とsiRNAのおそらくより少ない標的とを詳述する報告を提供することは、本発明の一態様である。生命情報科学を用いて、同定されたmiRNA標的のサブ群により調節される生理学のおよび細胞プロセスならびに分子ネットワークを予測することができる。これは、miRNA標的の総合的な一覧と所定のmiRNAにより調節される生理学のプロセスおよび根本的な分子機構の簡潔な一覧とを提供する。本発明は、インビボでのsiRNAの送達および有効性のモニタリングを伴うことができる。siRNAの送達の多くの方法は、動物において示され、ヒトにおける試験の各種段階においてある。これらの方法は、脂質、タンパク質、および多種多様な付随する修飾を有するウイルス由来ベクターを含む。細胞により後で体液中に放出されるエキソソーム中への、細胞中に含まれるmiRNA、mRNAおよびsiRNAの選別は、成功したRNAi療法の間接的測定を提供することができる。エキソソームは、最初は血液とsiRNAまたはmiRNAとから精製され、標的または対照のmRNAは、qRT-PCRで測定され得る。試験がRNAi治療の前および後で実施された場合、RNAiの効率は、治療後のエキソソーム中における標的mRNAのレベルの低下により測定され得る。

20

30

【0093】

マイクロRNA標的は、エキソソーム中、膜画分中および全細胞中におけるmi/siRNA標的mRNAの比を比較することにより包括的にかつ正確に同定され得る。

【0094】

好都合には、本発明の方法は、最高水準の技術で不明の予測された標的における信頼水準を提供することを可能にすることができる。この高信頼水準は、本発明の方法の幾つかの要素により提供され得る。第1に、エキソソームおよび/または細胞および/または膜の間のmRNA標的の濃縮の差は、特に3つすべての細胞区画を比較する場合、有意な信頼度を提供することができる。mRNA標的の妥当性におけるさらなる信頼度は、インターネット(例えば、PicTar pictar.mdcberlin.de/、MIRanda pictar.mdc-berlin.de/、MIRbase microrna.sanger.ac.uk/sequences/、DianaMicroT microrna.gr/ (Maragkakis Nucleic Acids Research 2009年 1~4)を介して利用可能な一般公開されているRNA解析ア

40

50

ルゴリズムを使用することにより得ることが可能であり、その解析は、miRNA 標的部位の存在、標的部位アクセシビリティおよび他のパラメータについてRNA 配列を標的とすることができる。多くの変種において、所定のmRNA が所定のmiRNA により標的とされる確率を予測しようとするスコアを割り当てることができる。これらのアルゴリズムに似ている独立プロセスは、これらの実験においてmRNA におけるmiRNA 標的部位を探索するパラメータを最適化するために開発され得る。miRNA のレベルまたは活性が変化した場合にmRNA レベルが変化するという観察は、前記mRNA における、少なくとも1つの、多少保存されたかまたは古典的なmiRNA 標的部位（相補型シード領域）の存在と組み合わせ、前記miRNA がmiRNA またはsiRNA の真の標的であったという信頼度を増加させることができる。

10

【0095】

本発明の別の目的は、前述の本発明の方法を含む、miRNA またはsiRNA またはその阻害剤の治療薬の（1つまたは複数の）標的を同定するための方法である。

【0096】

本実施形態において、miRNA またはsiRNA 治療薬の標的は、miRNA、siRNA または関連分子の投与後のエキソソーム中のmiRNA、siRNA または標的mRNA のレベルの低下または変化によって同定される。

【0097】

場合により、さらなるアッセイは、miRNA 標的がmiRNA 結合部位を含むかどうかを決定するために、および最終的に前記標的部位が幾つかの種のmRNA の中で保存されるかどうかを決定するために実施される。

20

【0098】

本発明の意味において、「幾つかの種のmRNA の中で保存される」は、幾つかまたは2種以上の種において類似の遺伝子位置内に存在する配列を意味する。miRNA のmRNA 標的の決定は、miRNA 結合部位についての可能なmRNA 標的の配列の解析により完了され得る。例えば、miRNA 結合部位が予測mRNA において見出される場合、mRNA がmiRNA により実際に標的とされる信頼度がより多く与えられ得る。さらに、miRNA 標的部位が幾つかの種（例えば、ハエ～ヒト）のmRNA の中で保存される場合、これは、それが実際のmiRNA 標的であるさらにより大きな信頼度を与えることができる。これらの解析は、多くの使用者にとって所望でない方法で予測miRNA 標的の数を減少させるために用いることが可能である。

30

【0099】

miRNA またはsiRNA は、一般に約20ヌクレオチド長であるが、有利には、それは、標的タンパク質の発現を有効に低下させるためにmiRNA / siRNA のヌクレオチド2～7に沿った標的RNA との正確なまたはほとんど正確な配列特異的マッチングを必要とし得るのみである。miRNA / siRNA のRNA 標的を生物情報科学的に予測するためにコンピュータアルゴリズム（例えば、PicTar pictar.mdc-berlin.de/、MIRanda pictar.mdc-berlin.de/、MIRbase microrna.sanger.ac.uk/sequences/、DianaMicroT microrna.gr/（Maragkakis Nucleic Acids Research 2009年 1～4））が開発されてきたが、本発明者らの予測ルールが多くの例外を有することから、これらのコンピュータアルゴリズムは不正確であり、かつ偽陽性または偽陰性の高い誤差の傾向がある。しかし、予測標的のその後の生物情報科学的解析なしの本発明の使用は、miRNA が標的とするRNA のおそらく非常に完全な一覧を与えることができるが、その多くは、コンピュータアルゴリズムまたは他の方法によって予測され得ない。好都合には、miRNA / siRNA のRNA 標的のより対処可能な一覧において、異なる厳密性（使用者が望む標的RNA 一覧の長さに依存する）で定義されるmiRNA 標的部位を有するそれらのRNA だけを保持するため、上述のコンピュータアルゴリズムが使用され得る。コンピュータアルゴリズムの後で得られた一覧は、各標的が真の標的であるより高い信頼度を提供することが

40

50

できるが、すべての標的のおそらくより完全でない一覧を提供する可能性がある。コンピュータアルゴリズムは、miRNAおよび会合タンパク質へのmRNA内におけるこの部位のアクセシビリティによって（領域のRNA折りたたみエネルギーを解析することによって）、配列マッチングの長さおよび配置（mRNA中、miRNA中）によりRNAがmiRNA/siRNAの標的である確率をスコアすることができる（Maragkakis Nucleic Acids Research 2009年 1~4 [92]）。

【0100】

前述した通りの本発明による方法を含む、siRNAおよび/またはmiRNA治療薬または他の分子による治療の効率の決定方法。

10

【0101】

好都合には、治療は、分子もしくは小胞の形成、相互作用、輸送、またはRNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAもしくは非コードRNAの活性および/または細胞間移行を調節するための、多胞体(MVB)の活性に關与するタンパク質、脂質、RNAまたは他の分子により実施され得る。

【0102】

好都合には、分子は、ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)、Alix、LBPA(リゾピスホスファチジン酸)から、または脂質ラフトの形成、コレステロール(例えば、NPC1、HMGCR、HMG CoA還元酵素)もしくはスフィンゴミエリン(スフィンゴミエリナーゼ)、例えばGW4869の代謝もしくは選別に由来し得る。

20

【0103】

この方法において、タンパク質および小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNAは、多胞体(MVB)または細胞外空間内の他の機構により分泌される小胞内に含まれ得る。

【0104】

好都合には、小胞は、エキソソームまたはエキソソーム様小胞であってよい。

【0105】

本発明の特定の一実施形態において、前記タンパク質は、Alix、Hrs、vps36(液胞タンパク質選別会合タンパク質36)、EAP30(30kDAのELL会合タンパク質、SNF8)、EF1a(延長因子1a)およびBIG2、hps4(ヘルマンスキー-パドラック症候群4)、hps1(ヘルマンスキー-パドラック症候群1)、PRNP(プリオンタンパク質)、SCFユビキチンリガーゼ(Skp1-Cullin-F-ボックスタンパク質)、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ(V0またはV1アデノシン三リン酸分解酵素)、vps41、COG4(保存されたオリゴマーゴルジ成分4)、ATG3(オートファジー関連タンパク質3)、ATG8、COG4、PI3K(ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ)、NEDD4L(発生的に発現が下方制御された神経前駆細胞4様)、ARFGEF4(ADPリボシル化因子グアニンヌクレオチド交換因子-4タンパク質)、CHML(コロイデレミア様)、RAB10(ras関連GTP結合タンパク質10)、RAB35、RALB(V-ralサル白血病ウイルス癌遺伝子相同体B)、RAPGEF6(Rapグアニンヌクレオチド交換因子6)、SCD(ステアロイルCoAデサチュラーゼ)、GIPC1(GIPC PDZドメイン含有ファミリー、メンバー1)、SCGB1D1(セクレトグロビン、ファミリー1D、メンバー1)、UBE2M(ユビキチン共役酵素E2M)、USP10(ユビキチン特異的プロテアーゼ10)、EEF2(真核生物翻訳伸長因子2)、LILRB1(白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーB)、RAB36、RANBP2(Ran結合タンパク質2)、SFRP2(分泌性Friszle関連タンパク質2)、SLC4A4(溶質キャリアファミリー4、重炭酸ナトリウム共輸送体、メンバー4)、SMPD3(スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ3)、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリンシンターゼ1、スフィンゴミエリンシンターゼ2、Epopamil結合タン

30

40

50

パク質、u s p 2 2 (ユビキチン特異的プロテアーゼ 2 2)、t r p c 3 (一過性受容器
電位カチオンチャネル、サブファミリー C、メンバー 3)、C L C N 7 (クロライドチャ
ネル 7)、C T S C (カテプシン C)、L A M R 1 (ラミニン受容体 1)、R N F 3 2 (
リングフィンガータンパク質 3 2)、E R I 3 (増強された R N A i - 3)、H M G C R
(3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル C o A 還元酵素)、N P C 1 (ニーマン - ピッ
ク病、C 1 型)、S L C 6 A 4 (ナトリウム依存性セロトニントランスポータ、溶質キャ
リアファミリー 6 メンバー 4)、F A U、T H E A (A C O T 1 1、アシル補酵素 A チオ
エステラーゼ 1 1)、C K A P 4、C O G 1 - 8 タンパク質、v p s 1 - 4 5 タンパク質
、C H M P ファミリータンパク質、選別ネキシン、r a b 5、7、9、3 8、A r f 2、
A r f 6、G G A 1 - 3、スフィンゴミエリンおよびステロール代謝遺伝子および薬物 (
例えば、G W 4 8 6 9、スフィンゴミエリンエステラーゼ)、M V B またはエキソソーム
内への選別のその関与に関連するコレステロールまたは脂質ラフト分割および代謝に影響
を及ぼす薬物および遺伝子、特に N P C 1、H M G C R、およびコレステロール低下薬の
スタチンクラス (例えばメバスタチン) から成る群から選択され得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

好都合には、この方法は、マイコバクテリアおよび他の細胞内病原菌、神経変性疾患 (
例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞踏病、脆弱 X 症候群、プリオン疾患、例え
ばクロイツフェルト - ヤコブ、パーキンソン病)、ヘルマンスキー - パドラック症候群、
ニーマン - ピック病または心臓血管疾患を含むコレステロールレベルに影響を及ぼす他の
状態、H T L V - 1 (ヒト T - リンホトロピックウイルス - 1) および H T L V - 2、H
I V - 1、他のレトロウイルス、または m i R N A を産生するウイルスもしくは他の病原
菌、例えば K S H V (カポシ肉腫関連ヘルペスウイルス) や E B N A (エプスタイン・バ
ー核抗原) により生じる疾患、癌、発育上の欠失、ならびにウイルス感染症を含む群から
選択される疾患の予防または治療のために使用され得る。

【 0 1 0 7 】

好都合には、本発明は、疾患のどの部分が m i R N A または他の小分子 R N A の調節不
全に起因し得るのかを認識することを可能にすることができる。多くの疾患、例えばクロ
イツフェルト - ヤコブ、アルツハイマー、A I D S および以前に列挙された他のものは、
リソソーム内および時にはより特異的に M V B - エキソソームプロセスに影響する可能性
がある。本発明は、これらの疾患の症状の一部が m i R N A または小分子 R N A 経路に対
する効果に起因し得ることを認めることを可能にすることができる。本発明は、M V B お
よびエキソソームに影響を及ぼすことにより、アルツハイマー病が m i R N A 活性に悪影
響を及ぼす可能性があることを認めることを可能にすることができる。

【 0 1 0 8 】

m i R N A 経路の変更および回復は、アルツハイマー病の治療であり得る。かかる場合
、m i R N A 活性は、m i R N A 活性の各種の成分 (例えば、m i R N A、ダイサー、G
W 1 8 2、A G O) を細胞に送達することにより、または 2 次的に m i R N A 活性を変え
るためにエンドリソソーム系を標的とすることにより、増大され得るか、または回復され
得る。

【 0 1 0 9 】

したがって、本発明は、公知のまたはまだ知られていない多くの手段により m i R N A
または他の小分子 R N A の活性を増加させるか、または変えることによって、病徴を治療
する必要性を認めることを可能にすることができる。

【 0 1 1 0 】

実際、本発明の方法は、疾患のより良好な治療または治療投与量を選択するため、そし
て疾患の治療または予防のためのこの治療を使用するため、s i R N A および / または m
i R N A 治療薬または他の分子による治療の効率を決定した後に使用され得る。

【 0 1 1 1 】

本発明の別の目的は、本発明による方法を含むヒト、腫瘍または胎児の遺伝子型を調べ
るためおよび / またはその状態の特性を決定するための方法である。

【0112】

本発明の別の目的は、生物、細胞または植物におけるmiRNAまたは小分子RNAの活性を制御するための方法であって、前記生物の遺伝子修飾、あるいはタンパク質、またはこのタンパク質の活性を修飾する化学物質、またはこのタンパク質を標的とするsiRNAもしくはmiRNAもしくはその関連分子の生物における投与を含み、このタンパク質が、Alx、Hrs、vps36（液胞タンパク質選別会合タンパク質36）、EAP30（30kDAのELL会合タンパク質、SNF8）、EF1a（延長因子1a）およびBIG2、hps4（ヘルマンスキー - パドラック症候群4）、hps1（ヘルマンスキー - パドラック症候群1）、PRNP（プリオンタンパク質）、SCFユビキチンリガーゼ（Skp1 - Cullin - F - ボックスタンパク質）、Surfeit - 4、V0またはV1ATPアーゼ（V0またはV1アデノシン三リン酸分解酵素）、vps41、COG4（保存されたオリゴマーゴルジ成分4）、ATG3（オートファジー関連タンパク質3）、ATG8、COG4、PI3K（ホスファチジルイノシトール3 - キナーゼ）、NEDD4L（発生的に発現が下方制御された神経前駆細胞4様）、ARFGEF4（ADPリボシル化因子グアニンヌクレオチド交換因子 - 4タンパク質）、CHML（コロイデミア様）、RAB10（ras関連GTP結合タンパク質10）、RAB35、RALB（V - ralサル白血病ウイルス癌遺伝子相同体B）、RAPGEF6（Rapグアニンヌクレオチド交換因子6）、SCD（ステアロイルCoAデサチュラーゼ）、GIPC1（GIPC PDZドメイン含有ファミリー、メンバー1）、SCGB1D1（セクレトグロビン、ファミリー1D、メンバー1）、UBE2M（ユビキチン共役酵素E2M）、USP10（ユビキチン特異的プロテアーゼ10）、EEF2（真核生物翻訳伸長因子2）、LILRB1（白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーB）、RAB36、RANBP2（Ran結合タンパク質2）、SFRP2（分泌性Frizzled関連タンパク質2）、SLC4A4（溶質キャリアファミリー4、重炭酸ナトリウム共輸送体、メンバー4）、SMPD3（スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ3）、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリンシンターゼ1、スフィンゴミエリンシンターゼ2、Epopamil結合タンパク質、usp22（ユビキチン特異的プロテアーゼ22）、trpc3（一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリーC、メンバー3）、CLCN7（クロライドチャネル7）、CTSC（カテプシンC）、LAMR1（ラミニン受容体1）、RNF32（リングフィンガータンパク質32）、ERI3（増強されたRNAi - 3）、HMGCR（3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリルCoA還元酵素）、NPC1（ニーマン - ピック病、C1型）、SLC6A4（ナトリウム依存性セロトニントランスポーター、溶質キャリアファミリー6メンバー4）、FAU（）、THEA（ACOT11、アシル補酵素Aチオエステラーゼ11）から選択される、方法である。

【0113】

好都合には、ESCRT遺伝子、例えばtsg101およびvps45は、植物におけるmiRNA活性に影響を及ぼす。本発明者らは、驚くべきことに、tsg101およびvps45の植物相同体内にTDNA挿入（遺伝子内に挿入され、遺伝子の発現を乱すトランスポゾン）を有するその植物が、制御タンパク質でなく、miRNAにより調節されるタンパク質の蓄積を示すことができることを示す。したがって、MVBについて列挙される遺伝子、タンパク質および脂質の同じ群を標的とすることを用いて、植物の抗病原菌防御、例えば抗ウイルスの防御、非細胞自律的RNAサイレンシング、遺伝子修飾植物の遺伝子発現の維持、または植物形質の後成的維持（ヘテロクロマチンの生殖系列再設定に影響を及ぼすことによる）を調節することができる。

【0114】

好都合には、本発明者らにより、エキソソームが、それらが由来する細胞と同じmiRNAを比例して同様の量で含有することが示されることから、個体のmiRNAおよび場合により他の小分子RNAのレベルの特性を評価するために任意の体液からのエキソソームを使用し、それにより健康のその相対的状态を確認することが可能であり得る。エキソ

ソームおよび細胞は、同じ *miRNA* を含有することが可能であり（例えば両方とも *miR-16*、*miR-27a*、*miR-206* を含有する）、各 *miRNA* の相対量（例えばプロファイル）は、細胞およびエキソソーム中において同じである可能性がある（例えば細胞およびエキソソームの両方で、*miR-16* が最も多く、*miR-206* は5倍少なく、*miR-27a* は3倍少ない）。細胞からの *miRNA* のプロファイルを使用して診断または予後を得ることができることから、エキソソーム中における *miRNA* のプロファイルは、同様に診断または予後のために使用され得る。

【0115】

例えば、*Let-7a* は、前立腺癌において下方制御される（*Spizzo 2009 Cell 137:586, [96]*）。前立腺癌が癌細胞中におけるより低いレベルの *let-7a* により診断され得る場合、癌組織からのエキソソームを含有する可能性のある源（例えば、前立腺についての尿）からのエキソソームを使用して、*let-7a* の相対レベルを評価し、生検材料を行うことなく癌の診断および/または予後に到達することができる。同時に、可能性のある腫瘍（例えば、X線で認められる）の部位に由来する液中において得られる *miRNA* のプロファイルを使用して、発現した *miRNA* のプロファイルまたはパターンにより癌だった細胞の種類を決定し、それにより予後の確立を補助することができる。さらに、形質転換細胞や多能性細胞等、所定の状態に関連する特異的な *miRNA* または *piRNA* 等の他の小分子 *RNA* の検出は、癌等の患者の状態の重症度を決定する際に一助となり得る。別の例において、羊水からのエキソソームを使用して、受胎の数日後の乳児の性別を決定するために性特異的 *miRNA* を使用することができる。

10

20

【0116】

本発明の別の目的は、エキソソーム中における *mRNA* の使用に基づく疾患の診断または予後の方法であって、これが、小分子 *RNA* に依存する細胞中におけるディファレンシャルプライミングまたは遺伝子調節によりエキソソーム中に異なって存在する、方法である。

【0117】

解析は、当業者に公知の任意のステップ、例えば、排除限界濾過、分画超遠心分離、エキソソームまたは小胞に特異的なマーカーを使用する抗体-ビーズ系精製によって、所定の体液からのエキソソームまたは小胞を濃縮することにより実施され得る。*RNA* は、例えば、*qRT-PCR* による *miRNA* もしくは他の小分子 *RNA* もしくは *mRNA* の解析のための *Trizol*、マイクロアレイ、または相対量の小分子 *RNA* 分子を確立することを可能にする他の方法により濃縮され得る。

30

【0118】

miRNA または *mRNA* の量の変化は、エキソソーム中における他の *RNA*、タンパク質、脂質または他の分子の量に関して評価され得る。有利には、例えば症状または治療の前および後で、これらの量を、対照（照査基準）で治療した個体における量と比較することが可能であり得る。

【0119】

本発明の別の目的は、診断または治療のための候補分子のスクリーニングのための本発明による方法の使用である。

40

【0120】

本発明の別の目的は、診断基準または予後基準を確立する目的で疾患または病的状態における調節不全 *miRNA* や *mRNA* 等の診断マーカーまたは予後マーカーを同定するための方法である。好都合には、エキソソームは、細胞の他の部分よりも患者から得るのが困難でないので、*miRNA* の調節不全を評価するために使用され得る。好都合には、エキソソームは、各種の方法、例えばマイクロアレイまたは *qRT-PCR* により *miRNA* の調節不全を評価するために使用され得る。疾患の *miRNA* マーカーは、疾患の診断または予後であることが既に公知のものから選択され得るか（例えば、*Spizzo 2009 Cell 137:586 [96]*）、または本発明もしくは他の手法を使用し

50

て新しく開発され得る。これらのマーカーを検出するためのステップは、上記と同じもの、エキソソームの単離、各種方法による特異的miRNAの検出であってよい。

【0121】

あるいは、エキソソームRNAにおけるmRNAマイクロアレイは、疾患状態において上方制御および下方制御されるmRNAを決定するために使用され得る。続いて、疾患に関連がある(1つまたは複数の)miRNAを予測するために生命情報科学が使用され得る。

【0122】

miRNA、siRNAまたは関連分子の投与後にエキソソーム中におけるmiRNA、siRNAまたは標的mRNAのレベルの低下または変化が認められる場合、候補分子、マーカーもしくは治療送達剤(例えばリポソーム)または送達方法は選択され得る。

10

【0123】

好都合には、候補分子は、RNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAまたは非コードRNAの活性および/または細胞間移行を調節するための多胞体(MVB)の形成に關与するタンパク質または脂質から選択され得る。

【0124】

より正確には、タンパク質は、Alix、Hrs、Vps36、EAP30、EF1a、BIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、Vps41、N-スフィンゴミエリナーゼから成る群から選択され得る。

20

【0125】

好都合には、本発明の方法は、結核、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞蹈病、脆弱X症候群)、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス(例えばKSHV、EBNA)またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、ならびにウイルス感染症または他の感染症を含む群から選択される疾患の予防または治療または診断のために使用され得る。

【0126】

本発明の別の目的は、

(a) 体液からエキソソームまたは小胞を単離するための手段と、
(b) 前記エキソソーム中のsiRNAおよび/またはmiRNAおよび/または標的mRNAのレベルを測定するための手段と
を含むキットである。

30

【0127】

好都合には、本発明のキットは、対照との比較の手段をさらに含むことができる。

【0128】

miRNA/siRNAのすべての標的を同定することに関する本発明の部分について、対照とは、同様であるが有効でない分子で治療された細胞または動物を指すことができる。本発明の一実施形態において、小胞またはその成分の量に対するmRNA量だけを測定すればよい。かかる実施形態において、前記対照は、小胞またはその成分の量である。他の場合、前記対照は、未治療の個体等であってよい。

40

【0129】

本発明の別の目的は、RNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAまたは非コードRNAの活性および/または細胞間移行を調節するためのエンドリソーム系の形成に關与するタンパク質または脂質の使用である。

【0130】

本発明の意味において、「RNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAまたは非コードRNAの活性を調節する」は、細胞中におけるRNAもしくは小分子RNAの合成における、あるいは細胞中におけるRNAもしくは小分子RNAのレベルにおける、あるいはRNAの転写を調節するその能力、RNAのデキャッピング、脱アデニル化もしくは分解を誘導するその能力、翻訳を調節するその能力、ま

50

たはそれ以外の場合はタンパク質の発現を阻害するその能力における修飾の任意の誘導を意味する。好都合には、前記修飾は、使用前のRNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAもしくは非コードRNA、または前記タンパク質もしくは脂質の活動レベルと比較した遺伝子の低下または阻害であってよい。

【0131】

本発明の意味において、「RNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAまたは非コードRNAの細胞間移行を調節する」は、使用前の移行または前記タンパク質もしくは脂質のレベルと比較した細胞から別の細胞へのRNA、小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNA、mRNAまたは非コードRNAの移行の修飾を意味する。特に、これはまた、例えば培養培地中において細胞からエキソソームまたは小胞を産生し、次いでエキソソームを個体に移行して個体の細胞中へのRNA移行を媒介する能力を含むこともできる。

10

【0132】

最高水準の技術と比較して、本発明者らは、驚くべきことに、本発明による遺伝子の阻害は、細胞に対する影響が小さく、例えば細胞分裂に対する障害が少ないことを見出した。

【0133】

好都合には、前記タンパク質は、ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) に由来し得る。

【0134】

好都合には、これらのタンパク質および小分子RNA、例えばmiRNA、siRNAおよびpiRNAは、細胞外空間中において多胞体(MVB)により分泌される小胞中に含まれ得る。

20

【0135】

本発明の一実施形態において、前記小胞は、エキソソームであってよい。

【0136】

本発明の別の実施形態において、前記タンパク質は、Alix、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0もしくはV1ATPアーゼ、vps41、または請求項36の方法により同定される遺伝子によりコードされる任意のタンパク質、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0もしくはV1ATPアーゼ、vps41、COG4、ATG3、ATG8、COG4、PI3K、NEDD4L、ARFGEF4、CHML、RAB10、RAB35、RALB、ARFGEF6、SCD、GIPC1、SCGB1D1、UBE2M、USPIO、EEF2、LILRB1、RAB36、RANBP2、SFRP2、SLC4A4、SMPD3、スフィンゴミエリナーゼ、Epopamil結合タンパク質、usp22 (ユビキチン特異的ペプチダーゼ22)、trpc3、CLCN7、CTSC、LAMR1、RNF32、PRNIP、HMGCR、NPC1、SLC6A4、FAU、THEA、ZP2、SCGB1D1から成る群から選択され得る。

30

【0137】

本発明の特定の一態様において、関与するタンパク質または脂質は、結核、神経変性疾患 (例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞蹈病、脆弱X症候群)、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス (例えばKSHV、EBNA) またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の予防または治療のために使用され得る。

40

【0138】

本発明の別の特定の一態様において、前記タンパク質または脂質は、ヒト、腫瘍または胎児の遺伝子型を調べるためおよび/またはその状態の特性を決定するために使用され得る。

【0139】

50

本発明の別の目的は、結核、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞踏病、脆弱X症候群）、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス（例えばKSHV、EBNA）またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の治療のためのエンドリソソーム系の体を標的とするためのAllyx、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、vps41から成る群から選択されるタンパク質の使用である。

【0140】

換言すれば、本発明の別の目的は、結核、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞踏病、脆弱X症候群）、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス（例えばKSHV、EBNA）またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の治療方法であって、エンドリソソーム系の体を標的とするためのAllyx、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、vps41から成る群から選択される医薬的に有効な量のタンパク質または上記のものを、それを必要とする対象に投与することを含む方法である。

【0141】

さらに換言すれば、本発明の別の目的は、結核、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞踏病、脆弱X症候群）、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス（例えばKSHV、EBNA）またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の治療のための治療薬の製造のための、エンドリソソーム系の体を標的とするためのAllyx、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、vps41、Allyx、Hrs、vps36（液胞タンパク質選別会合タンパク質36）、EAP30（30kDAのELL会合タンパク質、SNF8）、EF1a（延長因子1a）およびBIG2、hps4（ヘルマンスキー-パドラック症候群4）、hps1（ヘルマンスキー-パドラック症候群1）、PRNP（プリオンタンパク質）、SCFユビキチンリガーゼ（Skp1-Cullin-F-ボックスタンパク質）、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ（V0またはV1アデノシン三リン酸分解酵素）、vps41、COG4（保存されたオリゴマーゴルジ成分4）、ATG3（オートファジー関連タンパク質3）、ATG8、COG4、PI3K（ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ）、NEDD4L（発生的に発現が下方制御された神経前駆細胞4様）、ARFGEF4（ADPリボシル化因子グアニンヌクレオチド交換因子-4タンパク質）、CHML（コロイデレミア様）、RAB10（ras関連GTP結合タンパク質10）、RAB35、RALB（V-rasサル白血病ウイルス癌遺伝子相同体B）、RAPGEF6（Rapグアニンヌクレオチド交換因子6）、SCD（ステアロイルCoAデサチュラーゼ）、GIPC1（GIPC PDZドメイン含有ファミリー、メンバー1）、SCGB1D1（セクレトグロビン、ファミリー1D、メンバー1）、UBE2M（ユビキチン共役酵素E2M）、USP10（ユビキチン特異的プロテアーゼ10）、EEF2（真核生物翻訳伸長因子2）、LILRB1（白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーB）、RAB36、RANBP2（Ran結合タンパク質2）、SFRP2（分泌性Frizzled関連タンパク質2）、SLC4A4（溶質キャリアファミリー4、重炭酸ナトリウム共輸送体、メンバー4）、SMPD3（スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ3）、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリンシンターゼ1、スフィンゴミエリンシンターゼ2、Epopam1結合タンパク質、usp22（ユビキチン特異的プロテアーゼ22）、trpc3（一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリーC、メンバー3）、CLCN7（クロライドチャネル7）、CTSC（カテプシンC）、LAMR1

10

20

30

40

50

(ラミニン受容体1)、RNF32(リングフィンガータンパク質32)、ERI3(増強されたRNAi-3)、HMGCR(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA還元酵素)、NPC1(ニーマン-ピック病、C1型)、SLC6A4(ナトリウム依存性セロトニントランスポータ、溶質キャリアファミリー6メンバー4)、FAU、THEA(ACOT11、アシル補酵素Aチオエステラーゼ11)、CKAP4、COG1-8タンパク質、vps1-45タンパク質、CHMPファミリータンパク質、選別ネキシン、rab5、7、9、38、Arf2、Arf6、GGA1-3、スフィンゴミエリンおよびステロール代謝遺伝子および薬物(例えば、GW4869、スフィンゴミエリンエステラーゼ)、MVBまたはエキソソーム内への選別のその関与に関連するコレステロールまたは脂質ラフト分割および代謝に影響を及ぼす薬物および遺伝子、特にNPC1、HMGCR、およびコレステロール低下薬のスタチンクラス(例えばメバスタチン)から成る群から選択されるタンパク質の使用である。

10

【0142】

本発明の別の目的は、結核、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞蹈病、脆弱X症候群)、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス(例えばKSHV、EBNA)またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の治療のためであって、エンドリソソーム系の体を標的とするための、Alx、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、vps41から成る群から選択される

20

【0143】

本発明の別の目的は、結核、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞蹈病、脆弱X症候群)、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス(例えばKSHV、EBNA)またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の治療方法であって、エンドリソソーム系の体を標的とするための、Alx、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、vps41から成る群から選択されるタンパク質を標的とする治療上有効量のsiRNAまたはmiRNAまたはその関連分子の、それを必要とする個体への投与を含む。

30

【0144】

本発明の別の目的は、結核、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、ハンテントン舞蹈病、脆弱X症候群)、HTLV-1およびHTLV-2、HIV-1、miRNAを産生するウイルス(例えばKSHV、EBNA)またはプリオンにより生じる疾患、癌、発育上の欠失、およびウイルス感染症を含む群から選択される疾患の治療方法であって、エンドリソソーム系の体を標的とするためのAlx、Hrs、vps36、EAP30、EF1aおよびBIG2、hps4、PRNP、SCFユビキチンリガーゼ、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ、vps41、Alx、Hrs、vps36(液胞タンパク質選別会合タンパク質36)、EAP30(30kDAのELL会合タンパク質、SNF8)、EF1a(延長因子1a)およびBIG2、hps4(ヘルマンスキー-パドラック症候群4)、hps1(ヘルマンスキー-パドラック症候群1)、PRNP(プリオンタンパク質)、SCFユビキチンリガーゼ(Skp1-Cullin-F-ボックスタンパク質)、Surfeit-4、V0またはV1ATPアーゼ(V0またはV1アデノシン三リン酸分解酵素)、vps41、COG4(保存されたオリゴマーゴルジ成分4)、ATG3(オートファジー関連タンパク質3)、ATG8、COG4、PI3K(ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ)、NEDD4L(発生的に発現が下方制御された神経前駆細胞4様)、ARFGAP4(ADPリボシル化因子グアニンヌクレオチド交換因子-4タンパク質)、CHML(コロイデレミア様)、RAB10(ras関連GTP結合タンパク質10)、RAB35、RALB(V-ralサル白血病

40

50

ウイルス癌遺伝子相同体B)、RAPGEF6(Rapグアニンヌクレオチド交換因子6)、SCD(ステアロイルCoAデサチュラーゼ)、GIPC1(GIPC PDZドメイン含有ファミリー、メンバー1)、SCGB1D1(セクレトグロビン、ファミリー1D、メンバー1)、UBE2M(ユビキチン共役酵素E2M)、USP10(ユビキチン特異的プロテアーゼ10)、EEF2(真核生物翻訳伸長因子2)、LILRB1(白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリーB)、RAB36、RANBP2(Ran結合タンパク質2)、SFRP2(分泌性Frizzled関連タンパク質2)、SLC4A4(溶質キャリアファミリー4、重炭酸ナトリウム共輸送体、メンバー4)、SMPD3(スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ3)、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリンシンターゼ1、スフィンゴミエリンシンターゼ2、Epopamyl結合タンパク質、usp22(ユビキチン特異的プロテアーゼ22)、trpc3(一過性受容器電位カチオンチャネル、サブファミリーC、メンバー3)、CLCN7(クロライドチャネル7)、CTSC(カテプシンC)、LAMR1(ラミニン受容体1)、RNF32(リングフィンガータンパク質32)、ERI3(増強されたRNAi-3)、HMGCR(3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA還元酵素)、NPC1(ニーマン-ピック病、C1型)、SLC6A4(ナトリウム依存性セロトニントランスポータ、溶質キャリアファミリー6メンバー4)、FAU、THEA(ACOT11、アシル補酵素Aチオエステラーゼ11)、CKAP4、COG1-8タンパク質、vps1-45タンパク質、CHMPファミリータンパク質、選別ネキシン、rab5、7、9、38、Arf2、Arf6、GGA1-3、スフィンゴミエリンおよびステロール代謝遺伝子および薬物(例えば、GW4869、スフィンゴミエリンエステラーゼ)、MVBまたはエキソソーム内への選別のその関与に関連するコレステロールまたは脂質ラフト分割および代謝に影響を及ぼす薬物および遺伝子、特にNPC1、HMGCR、およびコレステロール低下薬のスタチンクラス(例えばメバスタチン)から成る群から選択されるタンパク質の活性を修飾する化学物質を治療上有効量で、それを必要とする個体への投与を含む。

【0145】

本発明の意味において、「修飾する」は、タンパク質の活性の低下または増加を意味する。

【0146】

本発明は、こうして多くの適用を見出し、それらの内の幾つかは後で記載される。

【0147】

一般的に言って、RNA送達は、治療に対する主要な障壁である。本発明は、早期臨床試験における送達方法を最適化することの一助となるための、後期臨床試験での転帰の測度と医薬品規制当局による承認の機会とを増強するための、および個ヒトのための用量および薬物選択を可能にするための、各患者におけるRNA送達の費用効果的な測度を提供するものである。

【0148】

前記研究により小分子RNA活性を制御するエンドリソソーム系の能力が示されるので、本発明は、どの遺伝子が実際にmiRNA活性に影響を及ぼすのかを同定することを可能にすることができる。これらの遺伝子としては、ESCRT複合体よりもmiRNA活性に直接関与し得る幾つか、例えばゴルジ小胞選別、多胞体-リソソーム選別に関与する遺伝子を挙げることができるが、この一覧は網羅的ではない。本発明者らの研究は、ESCRT複合体がmiRNA活性に影響を及ぼすが、実際は、ESCRT複合体の効果は、他の多胞体プロセス、例えばコレステロール/脂質ラフト選別、BLOC複合体(リソソーム関連細胞小器官複合体の生合成)、セラミド、スフィンゴミエリン、GGA複合体(ゴルジ局在性γ-ea含有ADPリボシル化因子結合タンパク質)または他のものに対する間接効果である可能性があることを示唆する。

【0149】

本発明は、特異的な細胞型を標的とすることを可能にし、血液、またはリンパ管、または細胞間隙および体液への拡散によりsiRNAの移行を可能にする手段により、細胞

10

20

30

40

50

中における活性 *s i R N A* および *m i R N A* を送達することを可能にすることができる。

【0150】

本発明はまた、*s i R N A* および *m i R N A* の活性を増加すること、または減少すること、あるいは小分子 *R N A* 経路の成分を区画するもしくは制御する細胞間移行によるか、またはヘテロクロマチンによる *D N A* 転写の調節によるかのいずれかによりその効果を拡大することを可能にすることもできる。したがって、*M V B* または *m i R N A* に会合する *H I V - 1* やプリオン等の多くのウイルスおよび疾患は、本発明により標的とされ得る。さらに、本発明は、血液試料によって、状態（例えば腫瘍）またはヒト（特に母親からの血液による胎児）もしくは腫瘍の遺伝子型を診断する方法を提供することができる。

【0151】

本発明は、小分子 *R N A* のサブセットの活性を選択的に制御するための新規な手段と、病原菌の増殖を阻害するための有効な手段とを提供することができる。

【0152】

また、本発明は、例えば、胎児の遺伝子型を調べることと、現在使用される手法より少ないリスクをもたらす血液試料により癌を評価することとを可能にすることもできる。本発明は、本技術分野において周知の手段により特異的細胞型に標的とされ得る内在性手段（最小限の毒性効果および免疫学的な効果）によって、細胞内に *s i R N A*、*m i R N A* または他の小分子 *R N A* を移行することを可能にすることができる。

【0153】

本発明は、*s i R N A* または *m i R N A* 活性、および任意の生物における疾患の治療または治療の調節に使用される他の種類の小分子 *R N A* の活性を調節するような医療的適用を有することができる。

【0154】

また、本発明は、疾患のための *m i R N A* 調節における適用を有することも可能であり、ここで小分子 *R N A*、それらのプロセッシングまたは効果は、例えば癌、発育上の問題、胚発生、受精およびウイルス感染症にとって重要である。

【0155】

本発明は、標的細胞への、任意の種類の *R N A*、特に小分子 *R N A* または *m R N A* の送達における適用を有することもできる。

【0156】

本発明の別の可能な適用は、血液もしくは別の源からの血液エキソソーム中またはヒトもしくは母親からの他の成分中に含まれる *R N A*、*m i R N A* または場合によっては *D N A* の解析を行う能力である。それは、一方で、現在使用される手法（例えば、羊水または生検材料の試料を得る）よりも危険でない方法で、ヒト、腫瘍または胎児の遺伝子型を調べるか、またはその状態の特性を決定することを可能にすることができる。多くの神経変性疾患、ウイルス性疾患、またはプリオンに基づく疾患は、感染の間の *R N A* と、*m i R N A* 機構に関与するものと同じタンパク質とに依存する。これらの疾患の治療は、本発明に由来することができる。さらに、本発明は、*m i R N A* に会合するタンパク質と結合する抗体が存在する自己免疫疾患の、および *M V B* または *m i R N A* が重要である多くの疾患、例えば、結核、*H T L V - 1* または *H T L V - 2* および *H I V - 1*、*m i R N A* を産生するウイルス（*K S H V*、*E B N A* 等）、プリオン、または *m i R N A* もしくは *M V B* 経路を標的とする任意の感染要因、ならびにアルツハイマー病、ハンテントン舞蹈病または脆弱 *X* 症候群としての他の神経変性疾患の治療を可能にすることができる。

【0157】

本発明の別の目的は、内生的に産生された小分子 *R N A*、例えば *m i R N A* の効率または活性を測定するための方法である。内生的に産生された *m i R N A* または小分子 *R N A* の活性 / 効率または発現 / 欠如は、エキソソーム中における小分子 *R N A* を直接測定すること、またはその標的 *R N A*、通常は *m R N A* を測定することにより測定され得る。これは、細胞自体により産生される小分子 *R N A* の活性または存在または効率に基づく診断試験または予後試験の基礎であり得る。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】Ago2およびGW182が多胞体と共局在することを示す共焦点顕微鏡写真。所定のプラスミドによるトランスフェクションの翌日にMVBを標識するために細胞にN-Rh-PEを負荷し、その細胞を共焦点顕微鏡法により検討した。細胞を、(A)CD82-YFP、(B)Sec61 β 、(C)eGFPN1、(D、E)GFP-GW182、または(F、G)GFP-Ago2でトランスフェクションした。(H)において、細胞をN-Rh-PEで負荷しなかった。代わりに、Gag-RFPおよびAgo2-GFPを発現するプラスミドで細胞を共トランスフェクションした。(I)において、Ago2-GFPでトランスフェクションした細胞を軽く固定し、透過処理し、Dcp1aを免疫蛍光により検出した。

10

【図2】MVBへのGFP-GW182の局在化がストレス顆粒形成には依存しないことを示す共焦点顕微鏡写真。細胞を、GFP-GW182、ならびにそれぞれストレス顆粒の形成を阻害するかまたは駆動する(A)顕性不活性TIA-1または(B)構成的活性eIF2 α S51Dを発現するプラスミドで共トランスフェクションした。(C)において、GFP-GW182を発現し、N-Rh-PE(N-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)を負荷した細胞をシクロヘキシミドで処置し、P-ボディおよびストレス顆粒を溶解させた。

【図3】Dcp1a(mRNA-デキャッピング酵素1A)でなく、GW182がユビキチン結合していることを示すウエスタンブロット。(A)移行受容体、(B)Dcp1a、または(C)GW182およびUbの免疫共沈降を行った。内在性タンパク質を認識する抗体でタンパク質を検出した。対照は、種およびアイソタイプ(可能な場合)がマッチした抗体の免疫沈降から成る。(C)の右のパネルにおいて、Ge-1を認識する抗体で免疫沈降したユビキチン化タンパク質をブロットした。

20

【図4】ESCRT複合体のメンバーは、MVBへのGW182の局在化でなくmiRNA活性に影響を及ぼす。(A)GFP-GW182、ならびにAlixまたはVps36を標的とする50nMのsiRNAによるトランスフェクションの翌日にMVBを標識するN-Rh-PEを負荷した細胞を示す共焦点顕微鏡写真。(B)突然変異部位に対するLet-7aの発現率を示す(ウミシイタケルシフェラーゼで正規化)。ESCRT複合体の幾つかのメンバーのノックダウンは、Let-7aの活性を阻害する。対照、tsG101、Vps36、hrs、alixおよびGW182についての突然変異部位の発現に対するLet-7aのレベルの解析。ウミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミド、無傷のまたは突然変異したLet-7a標的部位に結合する50nM siRNA、およびホタルルシフェラーゼを発現するpGL3で細胞をトランスフェクションした(n=6)。(C)ESCRT複合体の幾つかのメンバーのノックダウンは、miR-206の活性を阻害する。対照、tsG101、Vps36、hrs、alixおよびGW182についてのmiR-206標的の発現率の解析。50nM siRNA、miR-206またはmiR-K12-4を発現するプラスミド、および二重ルシフェラーゼプラスミドpsiCHECK(商標)(Promega)内に挿入されるエストロゲン受容体3'UTRで細胞をトランスフェクションした(n=4)。30時間後の評価したルシフェラーゼ活性。

30

【図5】分画遠心分離はエキソソームを非常に濃縮する。(A)エキソソームのマーカー(CD63、Tfr RまたはUb)による50 μ gの細胞またはエキソソーム溶解物のウエスタンブロット。(B)BIG2を標的とするsiRNAまたは対照による細胞のトランスフェクションの36時間後のエキソソームペレットの細胞数および総タンパク質定量。(C)酢酸ウラニル染色の後の再懸濁エキソソームペレットの電子顕微鏡観察。(D)PBS(リン酸緩衝食塩水)中に再懸濁した精製エキソソームペレットの動的光散乱解析。上のグラフは、検出された粒子の相対数(y軸)の関数としてのnm(x軸)における大きさとして5セットの測定値を表す。下のグラフは、体積(y軸)の関数としてのnm(x軸)における大きさを表す。体積による測定値は、存在するより大きな粒子の表

40

50

現を指数的に増幅する。

【図6】エキソソームは、GW182中において濃縮され、miRNAを含有する。(A) GW182、Ago2、Dcp1aおよびGe-1を認識する抗体による全細胞溶解物およびエキソソームからの等量のタンパク質のウエスタンブロット。(B) 15%のアクリルアミドゲル上のトータル細胞RNAと比較したエキソソームの2つの調製物からのPNK標識RNA。(C) エキソソームからクローン化した19~33のヌクレオチドのRNAの配列。

【図7】エキソソームは、BIG2に依存する方法で標的細胞に活性siRNAおよびmiRNAを移行する。(A) GFPでトランスフェクションした細胞から精製されたエキソソーム。GFPでトランスフェクションした細胞と共にsiRNAまたは対照siRNAをインキュベートした。フローサイトメトリーによって、8時間または24時間後にGFP発現を検討した。GFP発現を、 $1 - (\text{GFP発現GFP siRNAエキソソーム} / \text{GFP発現制御siRNAエキソソーム}) \times 100$ ($n = 3$ 、 $p < 0.05$ 、対応のあるt検定)として算出した。(B) miR-206またはmiR-K12-4でトランスフェクションした細胞から精製されたエキソソームを、psiCHECK二重ルシフェラーゼプラスミド内に挿入したmiR-K12-4についての標的部位でトランスフェクションした細胞と共にインキュベートした。8時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ発現の阻害を、 $1 - (\text{ホタルルシフェラーゼ} / \text{ウミシイタケルシフェラーゼmiR-K12-4エキソソーム}) / (\text{ホタルルシフェラーゼ} / \text{ウミシイタケルシフェラーゼmiR-206エキソソーム}) \times 100$ ($n = 4$ 、 $p < 0.05$ 、対応のあるt検定)として算出した。誤差棒は、平均値の標準誤差を表す。

【図8】エキソソームは、BIG2に依存する方法でmiRNA活性の移行を媒介する。miR-206またはmiR-K12-4ならびにBIG2を標的とするsiRNAまたは対照でトランスフェクションした細胞から精製したエキソソームを、miR-K12-4についての挿入標的部位でホタルルシフェラーゼを発現するpsiCHECK二重ルシフェラーゼプラスミドでトランスフェクションした細胞と共にインキュベートした。他の対照において、psiCHECKレポーターを発現する細胞を、miR-206またはmiR-K12-4についての裸のプラスミドと共にインキュベートした。8時間後にルシフェラーゼの活性を測定した ($n = 4$ 、 $p = 0.0287$ 、t検定、 $\alpha = 0.05$)。左下。GFPを標的とするsiRNAもしくは対照siRNA、または裸のトランスフェクションされなかったsiRNAでトランスフェクションした細胞からのエキソソームを、GFPでトランスフェクションした細胞と共にインキュベートした。8または24時間後にFACS解析でGFP発現を測定した(右)。

【図9】精製エキソソームは、Dcp1aやGe-1でなくGW182中において濃縮される。(a) エキソソームおよび細胞からの等量のタンパク質を、エキソソーム濃縮タンパク質(CD63)についてのウエスタンブロットにより解析した。再懸濁エキソソームペレットの電子顕微鏡観察。(b) エキソソームの動的光散乱は、適切な大きさ(20~90nm)の単一の母集団を示す。誤差棒、5つの測定値のSEM。(c) BIG2のRNAiは、エキソソーム調製物中におけるタンパク質の回収を低下させる(対応のあるt検定、 $n = 4$ 、 $p = 0.0194$ 、 $\alpha = 0.05$)。対照に対するBIG2についての細胞数のパーセントと、対照に対するBIG2についてのエキソソームペレットのパーセントとの解析。(d) エキソソームおよび全細胞からの等量のタンパク質をウエスタンブロットにより解析した。(e) エキソソームを、抗GW182 mAb 4B6で標識し、電子顕微鏡観察により観察した。(f) 粗膜画分および細胞質(上清)画分のウエスタンブロット(16000g、15分間)。(g) ウミシイタケルシフェラーゼ(5から適応させた)に融合した標的3'UTRとのlet-7a相互作用を示すレポーター構築体。MiRNA抑制mRNAは、細胞質画分内に存在しないが、膜画分内には存在する(16000g、45分間、アクチン $n = 3$ 、 $p = 0.0390$ 、RRM2 $n = 3$ 、 $p = 0.0225$)。

【図10】Dcp1aでなく、GW182は、多胞体と共局在する。(a) 細胞に、(a

10

20

30

40

50

) Y F P - C D 8 2、M V B 濃縮タンパク質、(b、c) G F P - G W 1 8 2、(d) G F P - A g o 2、または(e、f) D c p 1 a を発現するプラスミドによるトランスフェクションの後で N R h P E を負荷する。(g、h) 細胞を、G F P - G W 1 8 2 および R F P - D c p 1 a でトランスフェクションした。スケール棒 = 2 μ M。R F P または N R h P E は、赤色で示され(左の欄)、G F P または Y F P 標識タンパク質は緑色で示され(中央の欄)、共局在は、結合したパネルにおいて黄色で示される(右の欄)。

【図 1 1】エキソソームは、成熟 m i R N A を含むが、m i R N A 標的 m R N A を欠く。(a) ヒトゲノム D N A にマッチする配列の割合としての、精製エキソソーム中におけるクローン化小分子 R N A 配列の同一性を表す円グラフ。(b) エキソソームからクローン化した全 m i R N A の粒度分布は、2 1 ~ 2 2 のヌクレオチドで中央値を有する母集団を示す。(c) エキソソームは、全細胞と同様の m i R N A プロファイルを含む。(d) M i R N A 抑制 m R N A は、細胞と比較してエキソソームから除外される(アクチン n = 4、p = 0 . 0 0 1 9、R R M 2 n = 3、p = 0 . 0 0 6)。(e) 生物情報科学的事後解析は、m i R N A の確認された m R N A 標的がエキソソーム中において過度に少なく示され(1 3 . 6 3 %、期待値 1 4、 $\chi^2 = 6 . 6 3 6$ 、p = 0 . 0 1)、より少ない m i R N A 標的化を受けるハウスキーピング遺伝子がエキソソーム中において過度に多く示される(3 5 . 8 9 %、 $\chi^2 = 1 6 . 6 4 1$ 、p < 0 . 0 0 0 1)ことを示す。誤差棒は、信頼区間(9 5 %、改良した W a l d 法)を示す。

【図 1 2】E S C R T 複合体成分のノックダウンは、m i R N A 活性に支障を来す。(a) D c p 1 a ではなく、G W 1 8 2 は、ユビキチン化タンパク質と会合する。免疫沈降の抗体は上のレーンに示され、プロット法の抗体は白色で示される。(b) E S C R T 複合体成分のノックダウンは、G W 1 8 2 の蓄積を引き起こす。(c) s i R N A のトランスフェクションの 3 6 時間後に G F P - G W 1 8 2 および N - R h - P E の共局在化を検討した。(d) E S C R T 複合体の幾つかの成分のノックダウンは、L e t - 7 a の活性を阻害する(分散分析、n = 4、p = 0 . 0 0 3、F = 4 . 8 5 4、a = 0 . 0 5)が、L e t - 7 a の蓄積を変化させない。負荷対照として U 6 R N A を使用した。(e) E S C R T 複合体の幾つかのメンバーのノックダウンは、m i R - 2 0 6 の活性を阻害する。(分散分析、n = 3、p = 0 . 0 1 5、F = 6 . 5 7 7、a = 0 . 0 5)。単球のトランスフェクションの際の単球細胞中における検出可能な m i R 2 0 6 発現および m i R 2 0 6 の蓄積の欠如がノーザンプロット法により確認された。

【図 1 3】ウシ血清に依存しないエキソソーム様小胞中における、および細胞中における G W 1 8 2 の濃縮は、免疫系統ではない。(a) D c p 1 a ではなく、G W 1 8 2 は、無血清培地(X - V i v o - 1 5)中で培養された単球細胞または(b) H e l a 細胞から調製されたエキソソーム中において濃縮される。

【図 1 4】さらなる共焦点顕微鏡画像。G F P 不含(上)、小胞体特異的タンパク質 s e c 6 1 b - G F P (中央)および N R h P E、または H I V - 1 および G F P - A g o 2 からの R F P - G a g (下)の共焦点顕微鏡法。スケール棒 = 2 μ M。

【図 1 5】免疫蛍光による内在性 G W 1 8 2、D c p 1 a および M V B (C D 6 3) の局在化。(a) M o n o - M a c - 6 細胞中における抗ヒト G W 1 8 2 抗血清 1 8 0 3 3 で標識した一部の病巣が M V B と共局在する(白色の矢印は、共局在した病巣を強調する)。なお、抗 G W 1 8 2 抗血清は、G W 1 8 2 に加えて A g o および G e - 1 1 6 を認識することから、P - ボディおよび G W - ボディの両方を標識する。(b) M V B とのより小さい共局在性が、抗 D c p 1 a 抗体で観察された。(c) 前述の 2 4 のように抗 G W 1 8 2 m A b 4 B 6 および抗 D c p 1 a で共標識された 2 9 3 T 細胞。

【図 1 6】共焦点顕微鏡写真: D c p 1 a ではなく、G W 1 8 2 は、H e l a 細胞中における多胞体と共局在する。(a) N - R h - P E との G F P - A g o 2、G F P - D c p 1 a もしくは G F P - G W 1 8 2 の、または R F P - D c p 1 a との G F P - G W 1 8 2 の H e l a 細胞中における共局在性。スケール棒 = 2 μ M。G F P - G W 1 8 2 および M V B による R F P - D c p 1 a の高度な共局在性が、H e l a において、単球細胞とは対照的に観察された(それぞれ 5 8 % 対 6 %)。しかし、G F P - G W 1 8 2 中断構造は、

10

20

30

40

50

D c p 1 a よりも非常に頻繁に H e l a 細胞中における M V B マーカー N - R h - P E と共局在した (6 8 % 対 1 5 %) 。 (b) 小さい比率の細胞は、G F P - A g o 2 と M V B との間の共局在性を少ししか示さなかった。N - R h - P E との G F P - A g o 2 の劣った共局在性、または M V B (中央) および G F P - G W 1 8 2 (下) との R F P - D c p 1 a の著しい共局在性を示す H e l a 細胞の例。スケール棒 = 2 μ m。

【図 1 7】共焦点顕微鏡写真：M V B に対する G F P G W - 1 8 2 の局在化は、ストレス顆粒形成に依存しない。N - R h - P E との G F P - G W 1 8 2 の共局在性を、単独 (a) で、あるいはそれぞれストレス顆粒 3 3 の形成を阻害するかもしれない駆動する (b) T I A - 1 顕性不活性または (c) 構成的活性 e I F 2 a 変異体 (S 5 1 D) による共トランスフェクションの後で検討した。スケール棒 = 2 μ m。

【図 1 8】細胞と比較してエキソソーム中における濃縮を示す公知の m i R N A 標的またはハウスキーピング遺伝子の m R N A の表。m i R N A の公知の標的およびハウスキーピング遺伝子の細胞に対するエキソソーム中における m R N A の比を示すことから誘導されるマイクロアレイデータ。赤色で強調された m R N A は、細胞と比較してエキソソーム中における濃縮を示し、緑色のものは、エキソソーム中において減弱する。

【図 1 9】s i R N A 治療の有効性の確認。(a) 所定の s i R N A によるトランスフェクションの 3 0 時間後に単球細胞から c D N A を調製した。b - アクチンおよび適切な m R N A を増幅するために 3 0 サイクルの P C R をプライマーにより行った。1 0 n M s i R N A による治療の 4 8 時間後、(a) タンパク質レベルの H e l a 細胞におけるノックダウン (a l i x 、 h r s 、 s i R N A) における通りの (b) m R N A レベルについて H e l a 細胞をアッセイするか、または E G F R 分解の阻害 (t s g 1 0 1 、 v p s 3 6 、 h r s 、 P T P N 2 3) を用いて、s i R N A によるそれぞれタンパク質産生およびタンパク質機能の効率的阻害を確認した。E S C R T 複合タンパク質は、A l i x を除いて、E G F によるそのライゲーションの後、E G F R の効率的な下方制御のために必要とされる。

【図 2 0】効率的な m i R N A 活性は、H e l a 細胞中における多少の E S C R T 複合タンパク質を必要とする。H e l a 細胞中における効率的な m i R N A 活性は、E S C R T 複合体のメンバーの選択を必要とする。s i R N A およびレポータープラスミドによる細胞のトランスフェクションの 4 8 時間後に二重ルシフェラーゼ測定を行った。E S R (一元配置分散分析、F = 1 0 . 8 2 、p = 0 . 0 0 0 4) 、L e t - 7 a (一元配置分散分析、F = 9 . 4 6 、p = 2 E - 0 7) 。

【図 2 1】H e l a 細胞中における m i R N A 活性の効率が、E S C R T 複合体のメンバーの選択を必要とすることを示す。s i R N A およびレポータープラスミドによる細胞のトランスフェクションの 4 8 時間後に二重ルシフェラーゼ測定を行った。(a) エストロゲン受容体 (E S R 、m i R - 2 0 6 についての標的部位を含む) の 3 ' U T R に結合するホタルルシフェラーゼを有する P s i c h e c k 二重ルシフェラーゼレポーターと、m i R - 2 0 6 前駆体または m i R K 1 2 - 4 前駆体のいずれかを発現する第 2 プラスミドとで細胞を共トランスフェクションした (一元配置分散分析、F = 1 0 . 8 2 、p = 0 . 0 0 0 4) 。値をウミシイタケルシフェラーゼ発現に正規化する。(b) ホタルルシフェラーゼを発現するプラスミド p G L 3 と、2 つのヒト工的 l e t - 7 a 標的部位または突然変異 l e t - 7 a 標的部位に結合するウミシイタケルシフェラーゼを発現する第 2 プラスミドとで細胞をトランスフェクションした (一元配置分散分析、F = 9 . 4 6 、p = 2 E - 0 7) 。値をホタルルシフェラーゼに正規化する。(c) M o n o - M a c 6 および H e l a 細胞中における l e t - 7 a および m i R 2 0 6 レポーターを使用して行われた二重ルシフェラーゼアッセイについての正規化されていない値または生の値。

【発明を実施するための形態】

【実施例 1】

【0 1 5 9】

細胞への活性 s i R N A および m i R N A の送達
材料および方法

10

20

30

40

50

抗体

抗体を以下のように得た。ウサギおよびマウス免疫グロブリンG (Sigma - Aldrich、St. Quentin Fallavier、France)、抗モノおよびポリユビキチン化タンパク質クローンFK2 [Tebu - bio、Le Perray en Yvelines、France]、抗Dcp1aウサギポリクローナル (J. Lykke - Andersen、University of Coloradoの寄贈)、抗GW182 (血清18033)、抗Ge - 1 (血清1C6)、および正常ヒト血清 (M. Fritztler、University of Calgaryの寄贈)。

【0160】

細胞培養

10% FBS (リン酸緩衝食塩水) と非必須アミノ酸 (Invitrogen、Paris、France) とOPI (オキサロアセテート、ビルベートおよびウシインスリン) 培地補助剤 (Sigma - Aldrich) とを含有するRPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 緩衝液) 中でMono - Mac 6細胞系 (DSMZ、Braunschweig、Germany ACC - 124) を培養した。

【0161】

エキソソームの濃縮

細胞を、8 ~ 24時間、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で増殖させた。細胞を、5分間、400gで遠心分離し、上清を除去した。同じプロセスを、1200g (5分間)、10000g (30分間) で遠心分離により繰り返した。100000gでの遠心分離 (1時間、SW27ロータ、Beckman - Coulter、Roissy、France) の後、すべての上清をマイクロピペットにより除去し、その後の分析のためにPBS中においてペレットを回収した。

【0162】

共焦点顕微鏡法

細胞を、遠心分離 (90g、5分間) により濃縮し、培地中に再懸濁し、直ちに解析した。使用するフルオロフォアの明るさおよび63×対物レンズにより可能となる最小面 ($0.4 \sim 1.2 \mu\text{m}$) を使用して488nmおよび561nmのレーザによるZeiss LSM 510共焦点顕微鏡で画像を取り込んだ。使用するフィルタは、500 ~ 530nm (GFP) および550 ~ 650 (N - ロードミン - ホスファチジルエタノールアミン、ロードミン蛍光タンパク質 (RFP) であった)。Image Jを使用して画像を解析した。

【0163】

N - ロードミン - ホスファチジルエタノールアミン (N - Rh - PE) による細胞負荷 (Vidal, M.、Mangeat, P.、およびHoekstra, D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle - mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. J. Cell Sci. 110、1867 ~ 1877頁 (1997) [46]) に記載されるように手法を行った。本質的に、PBS中で細胞を2回洗浄し、エタノールにおける3μM N - Rh - PE (Avanti Polar Lipids、Alabaster、AL、USA) を細胞懸濁液内にハミルトン注射器で注入した。ボルテックスした後、細胞を4で1.5時間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、培養培地中で再懸濁し、5%のCO₂で37で4時間インキュベートした後、共焦点解析を行った。

【0164】

プラスミドおよびsiRNA

GFP - hAgo2 (Jakymiw, A.ら、Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. Nat. Cell Biol. 7、1267 ~ 1274頁 (2005) [47]) (

11590)、YFP-CD82 (Sherer, N. M.ら、Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. Traffic. 4、785~801頁(2003)[48])(1819)、(1817)、Gag-RFP[48](1814)、Sec61 β -GFP (Voeltz, G. K.、Prinz, W. A.、Shibata, Y.、Rist, J. M.、およびRapoport, T. A. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. Cell. 124、573~586頁(2006)[49])(15108)を発現するプラスミドをAddgene (Cambridge, MA, USA)を介して入手した。GFP-GW182-GFP[3](Ed Chan、University of Florida、USA)と、TIA-1の顕性不活性バージョン(Kedersha, N. L.、Gupta, M.、Li, W.、Miller, I.、およびAnderson, P. RNA-binding proteins TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1) and TIAR (T-CELL restricted intracellular antigen related protein) link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. J. Cell Biol. 147、1431~1442頁(1999)[7])(Nancy Kedersha Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School、Boston, MA, USA)と、eIF2 α の構成的活性バージョン[7](Randall Kaufmann、University of Michigan、Ann Arbor, MI, USA)とを発現するプラスミドは、Nancy Kedershaの寄贈であった。

【0165】

少なくとも70%のノックダウンmRNA発現が確認されたsiRNAを、Qiagen (Courtaboeuf, France)から入手した。これらは以下の通りだった(すべての参照は、特異的siRNAを示すQiagenからのカタログ番号である)。Hrs (SI00288239 CCGGAACGAGCCCAAGTACAA*)、siRNAは、特に明記しない限りQiagen (Courtaboeuf, France)から入手した。*は、少なくとも75%、それぞれの遺伝子のノックダウンmRNA発現に対して会社により確認されたsiRNAを示す。これらは、以下の通りだった。Hrs (CCGGAACGAGCCCAAGTACAA*)、GW182 (TNRC6A、SI03648743: AAGAGCTTA ACTCATCTTTAA*)、Alix (SI02655345: AAGAGCTGTGTGTTGTTCAAT*)、Vps36 (CCGATCAATTGAGAAATTTAT*)、Tsg101 (SI00318045)、GFP (1022064、siRNA GAACUUCAGGGUCAGCUUGC CG、配列番号: 23)。すべての星印は、陰性対照siRNA (この配列は、明らかにされず、それは、企業の秘密1027281である)。

【0166】

免疫沈降

20 μ M MG132 (プロテアソーム阻害剤)とコンブリートプロテアーゼ阻害剤クテル (Roche、Meylan, France)とを有するPBSにおいて、0.5% NP-40 (ノニルフェノキシルポリエトキシルエタノール40)、10%グリセロールにおいて20 $\times$ 10⁶ 細胞/mLの濃度で細胞を溶解した。4 で20分間回転させた後、溶解物を16000gで30分間遠心分離した。溶解物に抗体を添加した (GW182およびGe-1については1/400、ならびに対照の正常ヒト血清; 2 μ g マウスIgMまたは抗ユビキチンFK2; 1/400抗Dcp1aおよび当量のウサギIg [Dcp1a濃度のELISA測定により決定される])。3時間後、タンパク質Gアガロース

(Roche、Meylan、France)または抗マウスIgM - アガロース (Sigma - Aldrich) を1時間添加した。3回の洗浄を溶解緩衝液により行い、12000gで1分間遠心分離した。

【0167】

電子顕微鏡観察

0.25% Formvar 膜 (EMS) を被覆したニッケルカバーガラス (100メッシュ、EMS、Pennsylvania、USA) 上で精製エキソソームを静置した。2% 酢酸ウラニルで30秒間染色した後、カバーガラスを乾燥させ、透過型電子顕微鏡 (Hitachi H600、75KV) を使用して視覚化した。

【0168】

動的光散乱

DPBS (Dulbeccoリン酸緩衝食塩水) (Invitrogen) 中に再懸濁させた精製エキソソームを、Malvern Instruments (Malvern、UK) からのZetasizer Nano Sで解析した。40マイクロLの石英キュベット中において試料を負荷し、20で2分間の平衡化時間の後、5回の測定を自動モードで行った。実験データを、粒子が球体であると仮定してマルチプルローモードで処理し、溶媒の屈折率および粘度について補正した (それぞれ、溶媒組成から算出される通り1.332および1.029)。平均エキソソーム径を、散乱光の強度の関数としての粒度分布のプロットから導き出した。

【0169】

PNK、低分子量RNAゲル

トータルRNAを、Trizol LS (Invitrogen) を有する100μLのPBS中においてエキソソーム (100×10^6 の細胞に由来する) から抽出し、10μLの水の中で再懸濁した。2μLのエキソソームRNAまたは0.5μLのトータルRNAを、総体積20μLで1時間、37で交換緩衝液B (Fermentas、St. Remy les Chevreuse、France) および5μCi γ ATP中で1μLのT4ポリヌクレオチドキナーゼと共にインキュベートした。40μLの水を添加し、過剰な γ ATP (アデノシン三リン酸) をG25ミニカラム (GE Healthcare、Orsay、France) で除去した。RNAを、前述のように6M尿素を含有する15%ポリアクリルアミドゲル上を移動させた。

【0170】

ライブラリークローニング

MonoMac-6細胞からのライブラリーについての200μgのトータルRNAとエキソソームからの2μgのトータルRNAとを使用して、記載されるように (Pfeffer, S. Identification of Virally Encoded MicroRNAs. Methods Enzymol. 427: 51~63頁 (2007) [50])、小分子RNAクローニングを行った。454テクノロジー (www.454.com) を使用してライブラリーを配列決定した。以下のデータベースを使用して、記載されるように (Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., およびTuschl, T. Cloning of small RNA molecules. Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 26: Unit 26.4., Unit (2005) [51])、配列に注釈をつけた。ゲノム配列は、UCSC Genome Browserデータベース (NCBI build 37、2007年7月) からのものだった。tRNA (移行リボ核酸)、rRNA (リボソームリボ核酸)、snRNA (小型核リボ核酸)、snoRNA (小型核小体リボ核酸) およびscRNA (小型細胞質リボ核酸) 配列を、Genbankのリリース158 (2007年2月15日) から抽出した。

【0171】

miRNA活性の試験

miR-206についての標的を含むESR (エストロゲン受容体) の3' UTR (3

10

20

30

40

50

、非翻訳領域)を含む0.2 μ gのプラスミド(Adams, B. D., Furneaux, H., およびWhite, B. A. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. Mol. Endocrinol. 21, 1132~1147頁(2007)[13])、miR-206またはK12-4を発現する2 μ gのいずれかのプラスミド、およびts g101、vps36、hrs、alixまたはGW182を標的とするいずれかの対照siRNAまたはsiRNA(50 nM)で細胞をトランスフェクションした。Glo-Max Multi 蛍光リーダ(Promega)でDual Luciferase Reporter Assay Kit(Promega, Madison, USA)を使用してルシフェラーゼ活性を30時間後に読み取った。siRNA活性の増加率を、以下のように算出した(例えばts g101)。([ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ] K4 miRNA + ts g101 siRNA / [ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ] + 206 miRNA + ts g101 siRNA) / ([ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ] + miRNA K4 + 対照siRNA / [ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ] + miRNA 206 + 対照siRNA)。

10

【0172】

siRNAおよびmiRNAの細胞間移行

20

一群の細胞を250 nM GFP siRNAまたは対照siRNAでトランスフェクションし、8時間培養した後、エキソソームを単離した。エキソソームペレットを、1.2 mLのX-VIVO15培地(Lonza, St. Beauzire, France)中において再懸濁した。第2群の細胞を、eGFP N1を発現する1 μ gのプラスミドでトランスフェクションした。eGFP N1プラスミドのトランスフェクションの1時間後、X-VIVO15培地(Lonza, St. Beauzire, France)中で細胞を2回洗浄し、500 μ Lのエキソソーム含有X-VIVO15中に 0.4×10^6 の細胞を再懸濁させた。標的細胞中における標的発現の阻害率を、100 - (GFP siRNAを含有するエキソソームの幾何平均 / 対照siRNAを含有するエキソソームの幾何平均)として、GFP + 細胞上でゲーティングして算出した。エキソソームによるmiRNA移行の実験を、エキソソーム産生細胞中へのmiR-206またはmiR-K12-4を発現するプラスミドのトランスフェクションと標的細胞内へのmiR-K12-4についての標的部位を含むpsiCHECKプラスミドのトランスフェクションとを除いて上と同様に繰り返した。対照siRNAまたはBIG2 siRNAを、miR-206およびmiR-K12-4で共トランスフェクションした。ホタルルシフェラーゼ発現の阻害率を、(miR-K12-4を含有するエキソソームを有するホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ) / (miR-206を含有するホタル/ウミシイタケルシフェラーゼエキソソーム)として算出した。

30

【0173】

トランスフェクション

40

miRNA活性のアッセイ以外のすべての実験について、 5×10^6 の細胞を、Solution V(Amaxa, Cologne, Germany)中でNucleofector IIで、製造業者の説明書に従ってトランスフェクションした。遺伝子発現の阻害のために、50 nM siRNAを使用した。miRNA活性を評価する実験のため、250 μ g/mLのDEAE-デキストラン(Promega, Charbonniere, France)を使用して、FBSを含まない100 μ Lの培養培地中において、 1×10^6 の細胞をトランスフェクションした。細胞は、37 で1.5時間インキュベートした。10 μ LのDMSOを添加した。3分後、2 mLの細胞培養培地を添加し、細胞を遠心分離し、FBSを含有するRPMI 1640中で30時間再懸濁させた。

【0174】

50

結果

miRNA 機構の成分は多胞体と共局在する

ホスファチジルエタノールアミンに対する自己抗体は、GW182 に対する自己抗体と共局在し [5]、Gawky ショウジョウバエ GW182 相同体のノックダウンは、拡大した MV B をもたらす [2]。N - ローダミン標識ホスファチジルエタノールアミン (N - Rh - PE) は、MV B 中に選択的に蓄積する (Vidal , M .、Mangeat , P .、および Hoekstra , D . Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocytomaturation . J . Cell Sci . 110 , 1867 ~ 1877 頁 (1997) [6])。したがって、本発明者らは、Ago2 および GW182 が N - Rh - PE および MV B と共局在するのかについて試験した。N - Rh - PE による MV B の正確な標識は、CD82 との共局在性 (図 1 A)、および Sec61β または GFP との共局在性の欠如 (図 1 B、C) により確認された。GFP - GW182 は、有意な比率で N - Rh - PE と共局在した中断構造を標識した。同様の結果は、GFP - Ago2 について見出された (図 1 F、G)。また、Ago2 - GFP は Gag と共局在し、別のタンパク質は MV B 中に選択的に蓄積した (図 1 H)。

10

【 0175 】

一時的トランスフェクション細胞中で認められる Ago2 - GFP の局在化が内在性 Ago2 について予想されたものに対応することを確認するため、細胞を軽く固定し、透過処理し、抗 Dcp1a Ab で染色して P - ボディをマークした。Ago2 - GFP は、予想通り内在性 Dcp1a と共局在化した (図 11)。

20

【 0176 】

Ago2 等の miRNA 機構の成分は、ストレス顆粒と共局在化することができる。本発明者らは、GFP - GW182 および GFP - Ago2 がストレス顆粒の一部として MV B と共局在化したかどうかについて調べた。構成的活性 eIF2α 変異体によるストレス顆粒の誘導も、TIA-1 の顕性不活性バージョンによるストレス顆粒の阻害も [7]、MV B との GFP - GW182 の共局在性を改変しなかった (図 2 A、B)。これは、GW182 および Ago2 が、ストレス顆粒を生成する古典的ストレス応答の一部として MV B と共局在しないことを示唆する。実際、GW182 は、ストレス顆粒中においてではなく、P - ボディ中のみにおいて局在すると考えられる (Kedersha , N . および Anderson , P . Mammalian stress granules and processing bodies . Methods Enzymol . 431 : 61 ~ 81 頁 (2007) [8])。

30

【 0177 】

P - ボディは、シクロヘキシミドによる治療の際に分解される [8]。したがって、中断 GW182 + 構造は、シクロヘキシミド治療細胞中において、少ししか、または全く MV B と共局在しないことが観察された (図 2 C)。したがって、有意なプールの GW182 および Ago2 が P - ボディ様構造の一部として MV B と共局在する。

40

【 0178 】

したがって、小分子 RNA 機構にとっての多くの必須成分が、特異的細胞小器官、即ち MV B 中に局在すると思われる。

【 0179 】

GW182 はユビキチン結合する。

MV B に対する選別タンパク質の主要な機構は、ユビキチン化タンパク質と結合する ESCRT 複合体である。本発明者らは、ユビキチン化タンパク質との会合のための、または特異的もしくは抗 Ub 抗体との免疫沈降による直接的ユビキチン化のための RNA サイレンシング機構の幾つかの成分を試験した。陽性対照としてのトランスフェリン受容体 (TfrR) を、抗 Ub 抗体により免疫沈降するタンパク質の中で検出することができたが、逆に、免疫沈降した TfrR は、抗 Ub 抗体によって検出することができた (図 3 A)

50

。D c p 1 a 免疫沈降物中において、ユビキチン化タンパク質をわずかに検出した。これらのタンパク質はD c p 1 a の分子量と一致せず、抗U b 抗体により免疫沈降したタンパク質の中でD c p 1 a は検出されなかった（図3 B）。したがって、D c p 1 a は、多少のユビキチン化タンパク質と弱くまたは一時的に相互作用し得るが、直接ユビキチン化しない可能性がある。GW 1 8 2 は、他のタンパク質においてしばしばユビキチンと結合するU B A ドメインを有するが、U B A ドメインを有するタンパク質は、しばしばそれ自身でユビキチン化する（P e s c h a r d , P . ら、S t r u c t u r a l b a s i s f o r u b i q u i t i n - m e d i a t e d d i m e r i z a t i o n a n d a c t i v a t i o n o f t h e u b i q u i t i n p r o t e i n l i g a s e C b l - b . M o l . C e l l . 2 7 , 4 7 4 ~ 4 8 5 頁（2007）[9]）。抗U b 抗体は、抗GW 1 8 2 抗血清との反応性があるタンパク質を免疫沈降させ（図3 C）、抗GW 1 8 2 抗体は、GW 1 8 2 の大きさに一致したユビキチン化タンパク質を免疫沈降させた（図3 C）。抗GW 1 8 2 血清は、主にGW 1 8 2 を認識すると共に、Ge - 1 を認識する抗体をも含む。Ge - 1 はユビキチン化タンパク質の中で検出されなかったが（図3 D）、このことは、Ge - 1 ではなくGW 1 8 2 がユビキチン化され、かつ検出されたユビキチン会合タンパク質であることを示唆する。

10

【0180】

E S C R T 経路は、s i R N A およびm i R N A 活性に対する負の効果を有する。

M V B への成分の局在化は、サイレンシング機構のm R N A、m i R N A および / またはタンパク質成分を効率的に再組織するための手段を提供することができる。本発明者らは、この局在化を乱すことがm i R N A 活性に影響を及ぼし得ると仮定した。

20

【0181】

前述のように、A l i x またはv p s 3 6（E S C R T 複合体の成分）を標的とするs i R N A は、幾つかの細胞中におけるM V B の大きさの増大（v p s 3 6 を標的とするs i R N A）またはM V B の核周囲分布の増大（A l i x を標的とするs i R N A）を誘導した（C a b e z a s , A . , B a c h e , K . G . , B r e c h , A . , およびS t e n m a r k , H . A l i x r e g u l a t e s c o r t i c a l a c t i n a n d t h e s p a t i a l d i s t r i b u t i o n o f e n d o s o m e s . J . C e l l S c i . 1 1 8 , 2 6 2 5 ~ 2 6 3 5 頁（2005）[11]）。しかし、これらの変化したM V B とのGW 1 8 2 の共局在性は、著しくは乱れなかった（図4 A）。このことにもかかわらず、本発明者らは、E S C R T 複合体の成分がs i R N A により標的とされた細胞中におけるm i R N A の活性を試験した。t s g 1 0 1（補足図1）ではなく、h r s（E S C R T 複合体の別の成分）、v p s 3 6 またはa l i x のノックダウンは、l e t - 7 部位に2つのヌクレオチド変化を有する対照と比較してl e t - 7 の活性を有意に阻害した（図4 B）（D o e n c h , J . G . およびS h a r p , P . A . S p e c i f i c i t y o f m i c r o R N A t a r g e t s e l e c t i o n i n t r a n s l a t i o n a l r e p r e s s i o n . G e n e s D e v . 1 8 , 5 0 4 ~ 5 1 1 頁（2004）[12]）。E S C R T 複合体の成分、特にa l i x によるm i R N A 活性の阻害は、GW 1 8 2 のノックダウンの際に達成されたものに近づいた（図4 B）。

30

40

【0182】

m i R N A 活性に対するE S C R T 複合体の効果がl e t - 7 または以前のレポーター系に限定されなかったことを確認するため、本発明者らは、第2の系による類似の実験を行った。m i R - 2 0 6 またはカポジ肉腫ウイルス（K S H V）m i R N A K - 1 2 - 4 を発現するプラスミドを、m i R - 2 0 6 の内在性標的（エストロゲン受容体 - $\alpha 3$ ' U T R）に結合するレポーターと共に細胞内にトランスフェクションした[13]。以前の系と一致して、t s g 1 0 1 ではなく、a l i x またはh r s のノックダウンは、m i R - 2 0 6 の比活性を阻害した。

【0183】

エキソソームの特性決定

50

miRNA経路の成分がMVBに局在することから、それらの成分を、MVB内におけるILV内にパッケージし、エキソソームとしばしば称されるものとして細胞外空間内に放出することが可能だった。この可能性を検討するため、本発明者らは、最初に、本発明者らの手中にある確立されたプロトコルによって精製されたエキソソームの同一性および純度の特性決定を行った。精製されたエキソソームを、トランスフェリン受容体、CD63およびユビキチン化タンパク質、エキソソームのすべての古典的マーカーの中で高度に濃縮した(Buschow, S. I., Liefhebber, J. M., Wubbolts, R., およびStoorvogel, W. Exosomes contain ubiquitinated proteins. Blood Cells Mol. Dis. 35, 398~403頁(2005)[14]、Thery, C., Zitvogel, L., およびAmigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat. Rev. Immunol. 2, 569~579頁(2002)[15]) (図5A)。精製されたエキソソームは、電子顕微鏡観察により視覚化した際に予想された大きさおよび形態の小胞を含有した(図5B)。本発明者らの調製物中におけるエキソソームの純度を確立するため、本発明者らは2つの方法を用いた。第1に、プレフェルジンA阻害グアニンヌクレオチド交換タンパク質(BIG2、補足図1に示されるノックダウン)を標的とするsiRNAは、エキソソーム様小胞の放出に重要であり(Islam, A.ら、The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles. J. Biol. Chem. 282, 9591~9599頁(2007)[16])エキソソーム放出を約50%低下させた(図4C)。使用する単球細胞中におけるトランスフェクション効率の適度なレベル(プラスミドDNAにより約50%)を考慮に入れると、これは、大多数の精製材料がエキソソームから成ることを示唆する。第2に、本発明者らは、精製されたエキソソームの均質性を数量化するために動的光散乱を用いた。精製材料は、エキソソームに一致した平均的大きさを有し、大きさが均質で(低分散の単一の母集団を認めることができる)、99%超の相対純度を有した(図4D)。これは、標準的手法により精製されるエキソソームが非常に純粋であることを示唆する。

【0184】

miRNA経路の成分は、分泌エキソソーム中において見出される

miRNA経路の成分がMVBに局在することから、それらの成分は、最終的にはエキソソーム中に分泌され得る。本発明者らは、エキソソーム陽性対照について上で実施したように、ウエスタンブロットを用いて、全細胞溶解物からの等量のタンパク質と比較してエキソソーム中におけるRNAサイレンシングのタンパク質成分の存在を調べた。Ago2は、全細胞溶解物と同等の量のエキソソーム中において見出された。際立って、GW182は、全細胞溶解物と比較してエキソソーム中において非常に濃縮され(図6A)、Dcp1aはほとんど存在しなかった。

【0185】

エキソソームはmRNAおよびマイクロRNA17を含有したことが以前に示されていた。15%アクリルアミドゲル上におけるポリヌクレオチドキナーゼ標識RNAの分離は、エキソソームおよび全細胞の中に含まれる小分子RNAの視覚化を可能にした。エキソソームからのRNAは、全細胞RNAと比較したRNAの幾つかのバンドの明瞭な濃縮を示したが、このことは、エキソソーム中における幾つかの小分子RNA種の選択的負荷を示唆する。また、miRNAに一致する19~24のヌクレオチド長さのRNAの独立した集団が、エキソソームRNA中において観察された(図5B)。19~33ヌクレオチド長さのRNAのライブラリーを精製エキソソームから作製し、トータルRNAを単球から作製した。ハイスループットパイロシーケンシングの予備的解析は、有意な量のmiRNAの存在を示した(図7)。例えば、miR-16およびmiR-27bは、有意な量で存在した[1.43%(106/7436)および0.30%(22/7436)]

。miR-16*に由来する配列は取り出されなかったが、このことは、鎖分離後にエキソソーム中へのmiRNAの負荷が生じることを示唆する。これらの結果より、非常に精製されたエキソソームがmiRNAを含有することが確認される。

【0186】

siRNAおよびmiRNAの細胞間移行

エキソソームをマクロファージおよび樹状細胞に標的とし、続いて形質膜陥入する(Morelli, A. E.ら、Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. Blood, 104, 3257~3266頁(2004)[18])。エキソソームに会合するタンパク質をペプチドに分解することが可能であり、エキソソームを取る細胞のMHCクラスI上に提示することができる[15]。これは、エキソソームまたはエキソソームの幾つかの成分が、リソソームにおける完全な分解の前にサイトゾルに流出することができることを示唆する。植物およびC・エレガンスにおいて、miRNAの細胞間輸送が発生するので(Voinnet, O. Non-cell autonomous RNA silencing. FEBS Lett, 579, 5858~5871頁(2005)[19])、本発明者らは、エキソソームによって輸送されるsiRNAまたはmiRNAが標的細胞中における遺伝子発現を阻害することができたのかについて試験した。GFPを標的とするsiRNAまたは対照siRNAで細胞をトランスフェクションし、エキソソームを8~12時間後に精製し、GFP発現細胞に添加した。GFP発現は、対照siRNAでトランスフェクションした細胞に由来するエキソソームとインキュベートした細胞と比較して、GFP siRNAトランスフェクション細胞からのエキソソームと共にインキュベートした細胞中において7.3%低下した(図7A)。GFP siRNAエキソソームによるGFP発現の減少は、添加した再懸濁エキソソームの数と共に増加した(図7A、100μLのエキソソームで1.58%、対して500μLのエキソソームで7.3%)。標的細胞中におけるGFP siRNAの効果は、6時間と比較して24時間でわずかに減少した(図7B、6時間でGFP発現の6.1%の阻害、対して24時間で4.3%)。

【0187】

本発明者らは、miRNAの転写およびプロセッシングがエキソソーム中にパッケージする前に生じなければならない場合、観察される小分子RNAの細胞間移行が依然として生じるのかについて試験するためのウイルスmiRNAおよび標的を使用した。1バッチの細胞を、KHSV miR-K12-4を発現するプラスミドまたはmiR-206を発現する対照プラスミドでトランスフェクションした。細胞によるmiR-K12-4を含有するエキソソームのインキュベーションは、miR-206を含有するエキソソームと比較して、miR-K12-4標的レポーターの発現を15.3%減少させた(図7C)。標的細胞中におけるレポーター発現のノックダウンがmiR-K12-4のエキソソーム媒介移行に起因する場合、BIG2を標的とするsiRNAは、エキソソームの放出を阻害することによりこの効果をブロックする(図4C)[16]。miR-K12-4またはmiR-206を発現するプラスミドと同時にBIG2を標的とするsiRNAの送達は、miR-K12-4またはその前駆体の内の1つを含む可能性があるエキソソームにより、標的細胞中におけるmiR-K12-4レポーター発現のノックダウンを阻害した。したがって、エキソソーム様小胞は、BIG2に依存する方法で機能性miRNAを標的細胞に移行することができる。

【0188】

細胞への活性siRNAおよびmiRNAの送達

本発明者らは、有意な比率のRNAサイレンシング機構がMVBと共局在することを示す。本発明者らは、RNAサイレンシング機構の少なくとも2つの分離可能なプールがMVBと会合することを示唆する。GW182、多少のAGO2およびmiRNAを含むが少しのDcp1aしか含まない一方のプールを、ILV中において細胞質RNAから隔離する。これらのILVを、エキソソームとして放出することができる。エキソソーム中に

おけるmiRNAの最初の説明([17])は、細胞質の内容のランダム負荷と解釈することができた。MV BにおけるGW182およびAgo2の共局在性、ならびにエキソソーム中におけるGW182の明瞭な濃縮およびDcp1aの欠如がある場合、miRNAおよび場合によってはそのmRNA標的は、エキソソーム中への負荷のための選択的選別プロセスを受ける可能性がある。GW182はエキソソーム中において非常に濃縮されるが、一方で、少しのDcp1aしか存在しなかった。これは、エキソソーム中へのP-ボディの、すべてではないが、幾つかの成分を集める特異的選別機構が存在することを示唆する。GW182のUBAドメイン、およびGW182の共有結合性ユビキチン化は、MV Bとのその相互作用とエキソソーム内への選別とを駆動することができる。逆に、Dcp1aのユビキチン化の欠如は、エキソソーム内へのその負荷を好まない可能性がある。Ago2は、ユビキチン化タンパク質と会合し(Matsumoto, M.ら、Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*. 5、4145~4151頁(2005)[20])、GW182に結合するが、(El-Shami, M.ら、Repeated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* 21、2539~2544頁(2007)[21])、このことは、エキソソーム中におけるその外観のための機構を示唆する。Dcp1aは、GW182がILVに送達される前にP-ボディ複合体から位置を変化させることができるか、または、場合によっては、GW182がエキソソーム中にパッケージされ、Dcp1aがリソソーム分解のための明瞭なILV内にパッケージされる。

10

20

30

40

50

【0189】

RNAサイレンシング機構の第2のプールは、Ago2の膜局在化を生化学的に記載した以前の研究と一致してMV Bの表面上にある可能性がある[4]。本発明者らは、GW182およびAgo2の局在化が、miRNA成熟、AgoへのmiRNA結合、標的mRNA結合、翻訳阻害の特定の手段、デキャッピング、またはmRNA分解、およびRNAサイレンシング機構の更新のためのものであるのかについてのmiRNA活性の特定のステージにおけるアドレッシング機構であると仮定する。これらのステップのいずれかの崩壊は、ESCRT複合体の幾つかの成分のノックダウンの際に観察される通りのmiRNA活性を阻害する可能性があった。

【0190】

ILV含有miRNAは、エキソソームとしてリソソーム分解または細胞外放出について標的とされ得る。メッセンジャーRNAおよびmiRNAは、以前はエキソソーム中に(Valadi, H.ら、Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9、654~659頁(2007)[17])、および無細胞血漿中に(Chim, S. S.ら、Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* 54、482~490頁(2008)[22])において示されていた。前者の研究は、標的細胞中のエキソソームmRNAの転写を示したことを主張したが、幾つかの不確かなものが残存した[17]。

【0191】

本発明者らは、エキソソーム中におけるmiRNAの存在を確認し、小分子RNAが標的細胞にエキソソームにより機能形態で移行され得、成熟miRNAは、エキソソームにより移行される活性要素であることを初めて示す。

【0192】

本発明によれば、多胞体およびユビキチン化は、種全体のmiRNA成分の局在化および活性のためのプラットフォームを表すことができる。GW182のUBAドメインでな

く、そのそばのグルタミンを多く含むドメインは、欠失変異体の末端上のUBAドメインが機能しない場合を除き[23]、P-ボディへのGW182の局在化を担う([3]、Behm-Ansmant, l.ら、mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20、1885~1898頁(2006)[23])。GW182はユビキチン化され、UBAドメインを含むので、これは、ESCRT複合体上の足場を駆動する可能性があるCbl[9]に関して、その自己会合性を駆動することができる。C・エレガンスおよび植物において、細胞骨格機構の成分および2種のARFタンパク質は、miRNA活性にとって重要であることが同定されたが(Peter BrodersenおよびOlivier Voinnet;提出済)(Parry, D. H.、Xu, J.、およびRuvkun, G. A whole-genome RNAi screen for C. elegans miRNA pathway genes. *Curr. Biol.* 17、2013~2022頁(2007)[24])、これは、miRNA活性における小胞輸送の可能性を示唆する。興味深いことに、小胞は、bicoid RNAの輸送に関与する卵母細胞スポンジ体に会合することが認められた(Wiltsch-Brauninger, M.、Schwarz, H.、およびNusslein-Volhard, C. A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during Drosophila oogenesis. *J. Cell Biol.* 139、817~829頁(1997)[25])。Vps36は、bicoid RNAの輸送に必要であり(Irion, U. およびSt, J. D. bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature.* 445、554~558頁(2007)[26])、本発明者らは、このESCRT複合体タンパク質がmiRNA活性に影響を及ぼすことを本明細書で示す。

【0193】

RNAサイレンシングにおいて、ユビキチン経路およびMVBの他の成分、例えば、MEX-3B(Dvorak, A. M. およびMorgan, E. S. The case for extending storage and secretion functions of human mast cell granules to include synthesis. *Prog. Histochem. Cytochem.* 37、231~318頁(2002)[27])、TRIM(3要素モチーフ)またはNHL(リングフィンガー-b-boxコイルドコイル)ファミリータンパク質(Schwambornら、Cell 2009 136:913頁[93])、および場合によりRo52(Bhanji, R. A.、Eystathiou, T.、Chan, E. K.、Bloch, D. B.、およびFritzler, M. J. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin. Immunol.* 125、247~256頁(2007)[28])、亜鉛フィンガー-リング型ユビキチンリガーゼ、またはmRNA上のタンパク質の特定の構築体を認識する他の種類のユビキチンリガーゼが使用され得る。かかるリガーゼは、例えばAUF1であってよく、3'UTRへの結合は、ユビキチン媒介分解のためのmiRNA-mRNA対を標的とすることができる(Laroia, G.、Sarkar, B.、およびSchneider, R. J. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99、1842~1846頁(2002)[29])。同様に、nhl-2、およびRBCC-リングファミリーの他のタンパク質、可能なユビキチンリガーゼは、アルゴノートと結合するために使用するこ

とが可能であり、let-7 標的 mRNA に対する mRNA 貯蔵機構を集める (Schwamborn ら、[93])。このモデルと一致して、ユビキチンは、Ago 複合体 I I および I I I において見出され、ポリリボソーム、PABP および mRNA を有するショ糖画分から取り出される (Hock, J. ら、Proteomic and functional analysis of Argonaute containing mRNA-protein complexes in human cells. EMBO Rep. 8、1052~1060 頁 (2007) [30])。実際、mRNA キャップ結合複合体の幾つかの成分は、ユビキチン化により調節されるが (Dorrell o, N. V. ら、SK1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. Science. 314、467~471 頁 (2006) [31])、このことは、MVB での局在化ユビキチン化および選別が、miRNA による翻訳開始の阻害を微細に調節することができたことを示唆する。

【0194】

本発明によれば、多胞体が配位結合する小胞輸送は、植物および C・エレガンスにおける非細胞自律的 RNAi のために利用され得る。細胞外空間内のエキソソーム様小胞は、最近 MVB と会合する植物において同定された (An, Q.、Huckelhoven, R.、Kogel, K. H.、および van Bel, A. J. Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. Cell Microbiol. 8、1009~1019 頁 (2006) [32])。さらに、遺伝子スクリーニングによって、MVB 形成、輸送にとって重要な、またはユビキチン経路における機能を有する幾つかのタンパク質は RNAi に必要であることが分かった。Rab7 は、ドロソフィラおよびシノラブディス・エレガンスにおける RNAi に必須である。Rab7 は MVB への輸送に関与し、Rab7 のエフェクター、RILP は、vps36 と相互作用し、多胞体形態および機能にも重要である (Wang, T. および Hong, W. RILP interacts with VPS22 and VPS36 of ESCRT-II and regulates their membrane recruitment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 350、413~423 頁 (2006) [33])。ショウジョウバエ、アラビドプシスおよびシノラブディス・エレガンスにおける RNAi 移動に関与する幾つかのタンパク質は、後期エンドソーム、または多胞体様構造 (例えば、vps41 および vps34) またはユビキチン化 (CG8184、UBA ドメイン; SDE-5 (Hernandez-Pinzon, I. ら、SDE5, the putative homologue of a human mRNA export factor, is required for transgene silencing and accumulation of trans-acting endogenous siRNA. Plant J. 50、140~148 頁 (2007) [34]) または CG5382 (Saleh, M. C. ら、Nat Cell Biol. 2006 8 : 793 頁 [94])、vps51 (リングフィンガードメイン) [5]) に会合する。

【実施例 2】

【0195】

多胞体への GW182 の選別は、マイクロ RNA 活性を制御する

材料および方法

エキソソーム精製

前述のように分画遠心分離によりエキソソームを精製した (Raposo, G. ら、B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. J Exp Med 183、1161~1172 頁 (1996) [82])。

10

20

30

40

50

【0196】

共焦点顕微鏡法

488nmおよび561nmのレーザおよび63×対物レンズによるZeiss LSM510共焦点顕微鏡で画像を取り込んだ。使用するフィルタは、500～530nm (GFP) および550～650nm (N-Rh-PE、RFP) だった。

【0197】

動的光散乱

DPBS (Invitrogen) 中に再懸濁させた精製エキソソームを、40マイクロLの石英キュベット中においてMalvern Instruments (Malvern、UK) からのZetasizer Nano Sで解析した。20 で2分間の平衡化の後、5回の測定を自動モードで行った。実験データを、球状粒子と仮定してマルチプルローモードで製造業者のソフトウェアにより処理した。溶媒の屈折率(1.332) および粘度(1.029) についての補正を用いた。

【0198】

miRNA活性の試験

miRNA活性を試験するため、miR-206についての標的部位を含むESRの3' UTRを発現する0.2ugのプラスミド、miR-206またはK12-4を発現する2ugのいずれかのプラスミド、および10nM siRNAで細胞をトランスフェクションした。Glo-Max Multi 蛍光リーダ(Promega)でDual Luciferase Reporter Assay Kit (Promega、Madison、USA) を使用してルシフェラーゼ活性を30時間後に読み取った。他の実験において、ウミシタケルシフェラーゼを発現する0.2ugプラスミド、2つの結合let-7a標的部位またはその突然変異バージョン(図11d)、構築体、Let-7a およびb (Doench, J. G. およびSharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes Dev 18, 504～11頁(2004) [56])、ホタルルシフェラーゼを発現する1ugプラスミドpGL3、および10nM対照または特異的siRNAで細胞をトランスフェクションし、上記のように解析した。特異的miRNAによる阻害ルシフェラーゼ発現率を、例えば、ts g101 ([特異的luc/対照luc] 特異的miRNA+ts g101 siRNA/[特異的luc/対照luc] 対照miRNA+ts g101 siRNA) として算出した。miRNA活性率を、100-阻害ルシフェラーゼ発現率として算出した。

【0199】

統計量

示されるすべての誤差棒は、平均値の標準誤差を表す。

【0200】

抗体

抗体を、以下のように得た。ウサギおよびマウス免疫グロブリンG (Sigma-Aldrich、St. Quentin Fallavier、France)、抗CD63 (Santa Cruz Biotech、Santa Cruz、CA、USA)、抗モノおよびポリユビキチン化タンパク質クローンFK2 [Tebu-bio、Le Perray en Yvelines、France]、抗Dcp1aウサギポリクローナル(J. Lykke-Andersen、University of Coloradoの寄贈)、抗GW182 (血清18033、最初に論文Eystatoyら、Mol. Biol. Cell 2002 13:1338 [95]において、自己免疫性患者から採取し、かつUniversity of Calgary CanadaのMarvin Fritztlerにより特性が評価された「発端患者血清」、以下の抗Ge-1血清1C6の導出と同じ)、抗Ge-1 (血清1C6)、および正常ヒト血清(M. Fritztler、University of Calgaryの寄贈)、抗hrs (ab56468、ABCAM)、抗alix (クローン2H11、Santa Cruz)。

【0201】

細胞培養、およびN - ローダミン - ホスファチジルエタノールアミン (N - Rh - PE) による負荷

10% FBS と非必須アミノ酸 (Invitrogen、Paris、France) と OPI 培地補助剤 (Sigma - Aldrich) とを含有する RPMI 1640 中で Mono - Mac 6 細胞系 (DSMZ、Braunschweig、Germany ACC - 124) を培養した。あるいは、X - Vivo - 15 無血清培地 (Lonza、Levallois、France) 中で Mono - Mac 6 を培養した。5% FBS を補充した DMEM 中で Hela 細胞を増殖させた。記載されるように (Vidal、M.、Mangeat、P. および Hoekstra、D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. J Cell Sci 110 (Pt 16)、1867 ~ 77 頁 (1997) [58])、細胞に 3 μM N - Rh - PE (Avanti Polar Lipids、Alabaster、AL、USA) を負荷した。

10

【0202】

プラスミドおよび siRNA

GFP - hAgo2 (11590) (Addgene) (Jakymiw、A. ら、Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. Nat Cell Biol 7、1267 ~ 1274 頁 (2005) [83])、YFP - CD82 (1819) (Addgene) (Sherer、N. M. ら、Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. Traffic 4、785 ~ 801 頁 (2003) [57])、Gag - RFP (1814) (Addgene) ([57])、Sec61β - GFP (15108) (Addgene)、および無傷の (11325) (Addgene) または突然変異した (11324) 2 つの let - 7a 標的部位 56 を含む 3' UTR を発現するプラスミドを Addgene (Cambridge、MA、USA) を介して入手した。GFP - GW182 (Ed Chan、University of Florida、USA) と、Dcp1a - RFP と、Dcp1a - GFP と、TIA - 184 の顕性不活性バージョン (Nancy Kedersha Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School、Boston、MA、USA) と、eIF2α の構成的活性バージョン (Randall Kaufmann、University of Michigan、Ann Arbor、MI、USA) とを発現するプラスミドは、Nancy Kedersha の寄贈であった。

20

30

【0203】

siRNA を、特に明記しない限り Qiagen (Courtaboeuf、France) から入手した。* は、少なくとも 75%、それぞれの遺伝子のノックダウン mRNA 発現に対して会社により確認された siRNA を示す。これらは、以下の通りだった。Hrs (CCGGAACGAGCCCAAGTACAA* (配列番号 1)、GCACGCTTTTCCAGAAATTCAA* (配列番号 2)、GW182 (TNRC6A、AAGAGCTTAACCTCATCTTTAA* (配列番号 3)、ATGGATATGAACA GTATTAA* (配列番号 4))、Alix (AAGAGCTGTGTGTGTGTTCATCAAT* (配列番号 5)、GAGGTACTTTATACTAACATA* (配列番号 6))、vps36 (CCCGATCAATTGAGGAATTTAT* (配列番号 7)、ACGGAGGTGTACTGCTTAGTA (配列番号 8))、tslg101 (CAGTTTATCATTCAGAGTGTA* (配列番号 9)、ACCCGTTTATGATCAAGAAAGTA* (配列番号 10))、BIG2 (CGAUGAAAUUAAGCA

40

50

G A A (配列番号 1 1))、P T P N 2 3 (A m b i o n)、A G U U U G U C C U G A
A G A A U U A t t * (配列番号 1 2)。すべての星印は、陰性対照 s i R N A (1 0 2
7 2 8 1)。遺伝子発現のノックダウンを、以下のプライマーを使用して R T - P C R に
より確認した。t s g 1 0 1 (5 ' G A T A C C C T C C C A A T C C C A G T 3 '
(配列番号 1 3) および 5 ' G T C A C T G A C C G C A G A G A T G A 3 ' (配列
番号 1 4))、v p s 3 6 (5 ' C A G T G G C G T C A T G G T A A T T G 3 ' (配列
番号 1 5) および 5 ' C T G A G T C A T C A C G G C A A A G A 3 ' (配列番
号 1 6))、a l i x (5 ' T G G C T G C A A A G C A C T G T A T C 3 ' (配列
番号 1 7) および 5 ' A G G G C A C G A T T T G A T T T T G T C 3 ' (配列番号 1
8))、B I G 2 (5 ' C A G G A G G T G G T G A A G G A C A T 3 ' (配列番号
1 9) および 5 ' C C C G T T G G T C T G T G A G T T T 3 ' (配列番号 2 0))
、ならびに h r s (5 ' G G T C C A G G A C A C C T A C C A G A 3 ' (配列番号
2 1) および 5 ' A G T G G T G C T T A C G G G T C A T C 3 ' (配列番号 2 2)
)。

【 0 2 0 4 】

小分子 R N A クローニングおよびライブラリー

記載されるように (P f e f f e r , S . , L a g o s - Q u i n t a n a , M . およ
び T u s c h l , T . C l o n i n g o f s m a l l R N A m o l e c u l e s
. C u r r P r o t o c M o l B i o l C h a p t e r 2 6 , U n i t 2 6 4
(2 0 0 5) [8 5])、M o n o M a c 6 細胞からの 2 0 0 μ g の R N A、または M o
n o M a c 6 由来エキソソームからの 2 μ g の R N A を使用して、小分子 R N A クロー
ニングを行った。G A T C (K o n s t a n z , G e r m a n y) により 4 5 4 パイロシー
クエンシングテクノロジー (w w w . 4 5 4 . c o m) を使用してライブラリーを配列決
定した。以下のデータベースを使用して、配列に注釈をつけた。ゲノム配列は、U C S C
G e n o m e B r o w s e r データベース (N C B I b u i l d 3 7 , 2 0 0 7 年
7 月) からのものだった。t R N A、r R N A、s n - s n o R N A および s c R N A 配
列を、G e n b a n k のリリース 1 5 8 (2 0 0 7 年 2 月 1 5 日) から抽出した。m i R
B a s e バージョン 1 0 . 1 を使用して m i R N A を同定した。

【 0 2 0 5 】

m i R N A に依存する m R N A 選別実験

L e t - 7 a についての標的部位を有する 1 μ g のレポータープラスミドで M o n o -
M a c - 6 細胞をトランスフェクションした (図 1 1 d)。2 4 時間後、細胞を、P B S
中で 3 回洗浄し、0 . 2 5 0 M ショ糖、7 8 m M K C l、4 m M M g C l₂、8 . 4
m M C a C l₂、1 0 m M E G T A、5 0 m M H e p e s - N a O H p H 7 . 0
における 7 0 行程のダウンス型ホモナイザにより破碎した。膜選別実験のため、細胞溶
解物を 1 0 0 0 g (5 分間) で 2 回遠心分離し、続いて 1 6 0 0 0 g (4 5 分間) で遠心
分離した。2 5 0 μ L の P B S 中でペレットを再懸濁させ、T r i z o l L S (I n v
i t r o g e n) を使用して R N A を 2 5 0 μ L の上清からのものと並行して抽出した。
エキソソーム選別実験を同様に言い、T r i z o l L S を使用して R N A の抽出のため
に 2 5 0 μ L の P B S 中において全細胞および精製エキソソームを再懸濁させた。

【 0 2 0 6 】

エキソソームへの m R N A 選別の生物情報科学的解析

エキソソームと比較した神経膠芽細胞腫細胞における転写物の相対的濃縮を詳述する比
較 m R N A マイクロアレイが最近公開された ([2])。2 0 0 単位の背景閾値を越えた
シグナルを検出する 1 9 6 1 9 本のプローブの中で、1 3 5 0 4 本 (3 1 . 1 7 %) が、
細胞よりもエキソソーム中における高レベルで検出された。エキソソーム中における m i
R N A 標的 m R N A の低下を評価するため、本発明者らは、マイクロアレイ 5 3 に使用す
る神経膠芽細胞腫細胞およびエキソソーム中における高レベルで検出される 1 1 の m i R
N A のために実験的に確認された標的 (m i R e c o r d) を利用した。同様に解析して
、4 5 の m i R N A 抑制 m R N A の内で 6 (1 3 . 6 3 %、期待値 1 4、 $\chi^2 = 6 . 6 3$

10

20

30

40

50

6、 $p = 0.01$) がエキソソーム中において過度に多かった。miRNA が標的としな
い mRNA のセットは容易に利用可能ではないことから、本発明者らは、場合によっては
miRNA 63 による調節を最小限に抑えるために、3' UTR 86 を短縮した傾向があ
る一組のハウスキーピング遺伝子 (Eisenberg, E. および Levanon, E.
Y. Human housekeeping genes are compact. Trends Genet 19、362~5 頁 (2003) [86]) を利用した。ハウ
スキーピング mRNA (1577 本の合計プローブ) の内、568 本 (35.89%、期
待値 492、 $\chi^2 = 16.641$ 、 $p < 0.0001$) が、細胞と比較してエキソソーム
中において濃縮された。

【0207】

結果

エキソソームに似ている分泌小胞から抽出された RNA ([52]) (直径 50~100 nm) は miRNA を含む (Skog, J. ら、Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol 10、1470~6 頁 (2008) [53])。かかる小胞が miRNA 活性に必要なタンパク質を含むのかについて試験するため、本発明者らは、エキソソームを分泌することが知られている培養単球を使用した。本発明者らは、エキソソームに一致する大きさが均一な集団を形成する形態的に一様の小胞を精製した (図 9a~b)。これらを、CD63 (公知のエキソソームマーカー) において非常に濃縮した (図 9a)。さらに、エキソソーム解放の放出に必要であるブレフェルジン A 阻害グアニンヌクレオチド交換タンパク質 2 (BIG2) の RNAi (Islam, A. ら、The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles. J Biol Chem 282、9591~9 頁 (2007) [54]) は、小胞収率を約 50% 低下させた (図 9c)。精製エキソソーム様材料は、全細胞溶解物中において非常により小さいが多少の Ago2 を含有し、Ago2 への結合による miRNA 機能に必要である GW182 において非常に濃縮された (図 9d)。透過化処理された精製小胞の免疫金標識および電子顕微鏡観察によって、この GW182 濃縮がさらに確認された (図 9e)。逆に、P-ボディ成分 Dcp1a は、デキャッピング複合体中における Dcp1a と相互作用する Ge-1 のように全細胞溶解物と比較して分泌小胞中においてわずかに検出可能だった (Yu, J. H.、Yang, W. H.、Gulick, T.、Bloch, K. D. および Bloch, D. B. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. Rna 11、1795~802 頁 (2005) [55]) (図 9d)。同様の結果は、無血清培地中で培養した単球で (ウシ血清からの小胞の寄与を除外する) (図 13a)、および HeLa (図 13b) およびエクスピボ由来樹状細胞 (データ示さず) から第三者 (S. Amigorena および同僚、Institut Curie、Paris) により独立して精製されたエキソソームで得られた。

【0208】

エキソソーム内にパッケージするため、またはエキソソームと会合するため、GW182 および GW182 結合 Ago2 は、膜と相互作用する。実際、Dcp1a よりも非常に大きな量の GW182 および Ago2 が、全細胞 16000 g の画分の上清とは対照的にペレット中において認められた (図 9f)。miRNA 抑制 mRNA が膜にも標的とされるのかについて試験するため、本発明者らは、2つの Let-7a 標的部位 5 を含む 3' UTR に融合するウミシイタケ mRNA を発現するプラスミド、または 2つのシードミスマッチを含む陰性対照を使用した (図 9g)。著しいことに、ほとんどの Let-7a 抑制 mRNA は、対照 mRNA と比較して膜と会合したが (図 9g)、このことは膜会合 m

10

20

30

40

50

iRNA-RISCの存在を示唆する。エキソソームはMVBにより分泌されるので、本発明者らは、GW182およびAgo2会合細胞小器官がMVBを含み得るのかについて試験した。本発明者らは、N-ローダミン標識脂質ホスファチジルエタノールアミン(N-Rh-PE)を使用した。その理由は、N-Rh-PEがMVB(多胞体)MVB57に選別され、その中に保持されるからである。さらに、PEに対する自己抗体は、幾つかの状況において選択的にMVB58中において蓄積するが、GW182自己抗体59と同じ病巣を染色する。単球における正確なMVB標識化は、MVB会合テトラスパニタンパク質CD82とのN-Rh-PEの共局在性により確認された(図10a;図14)。GFP標識GW182(GFP-GW182)は、中断構造を形成したが、その大部分は、試験された単球の93%においてN-Rh-PEと共局在した(n=83)(図10b~c)。N-Rh-PEとのGFP-Ago2中断構造の類似の共局在性は、膜画分内におけるAgo2の存在と一致して(図9f)、83%の細胞において観察された(図10d)。さらに、GFP-Ago2は、MVB標的HIV-1Gagタンパク質57と共局在した(図14)。逆に、6%の細胞のみが、GFP標識Dcp1aとP-ボディ特異的マーカーとN-Rh-PEとの間に共局在性を示した(図10e~f)。同様に、GFP-GW182およびRFP標識Dcp1a(RFP-Dcp1a)は、3%の細胞のみにおいて共局在した(図10g~h)。免疫蛍光により、内在性GW182病巣が、内在性Dcp1a病巣よりも頻りにMVBマーカーCD63と共局在し(図15)、同様に、あまり大きくない差であるが、N-Rh-PE標識HeLa細胞においてGFP-GW182、GFP-Ago2およびDcp1a-GFPのそれぞれの局在化の間でも観察された(図16)ことが確認された。ストレス顆粒がGW182不含60であるという以前の実証に一致して、ストレス顆粒の誘導も抑制も、単球中におけるMVBとのGFP-GW182の共局在性を変化させなかった(図17)。したがって、MVBと共局在するAgo2およびGW182病巣は、P-ボディおよびストレス顆粒とは異なる細胞下構造を規定する。本発明者らは、Ago2会合RNAサイレンシング成分の少なくとも2つの細胞プールが存在すると推論する。「GW」ボディを規定する一方のプールは、GW182が多く、Dcp1aが少なく、しばしばMVBと会合する。第2のプールは、非膜性で、Dcp1aが多く、GW182が少なく、P-ボディと一般に定義される構造と同じである。

【0209】

MVBとのGW182、Ago2およびDcp1aの相対的共局在性は、膜画分中におけるそれらの存在および分泌されたエキソソーム様小胞内への組み込み(またはその欠如)に非常に一致する。したがって、MVBは、miRNA媒介遺伝子サイレンシングの機能的部位を構成する可能性がある。本発明者らは、miRNA前駆体転写物、パッセンジャー鎖またはmiRNA分解産物とは対照的に、必ずしも以前のqRT-PCRまたはDNAチップ解析において区別されなかったエキソソーム様小胞中における成熟miRNAの存在を最初にアッセイした([53]、Valadi, H.ら、Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 9、654~9頁(2007)[61])。単球エキソソーム様小胞から単離される19~33nt RNA画分を配列決定に供した。6986のゲノムがマッチする配列の中で、17%が公知のmiRNAであった(図11a)。以前のqRT-PCR研究に一致して、小胞および全細胞から単離される成熟miRNAのクローニング頻度([53]、Taylor, D.D.およびGercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol Oncol 110、13~21頁(2008)[62])および長さは同様であり(図11b~c、データ示さず)、同様に、miRNAパッセンジャー鎖(0.793%対0.558%)およびステムループ(3.48%対1.85%)を、エキソソーム様画分および細胞画分にお

いて、非常に低いが同等の頻度でクローン化した。単球エキソソーム様小胞中に多い *let-7a* の解析 (図 11c) は、膜が、RNAse 治療に対して成熟 *miRNA* を保護することをさらに示した (図 18)。したがって、精製エキソソーム様小胞は、高レベルの *GW182* および低レベルの *AgO2* に加えて一本鎖成熟 *miRNA* を含む。

【0210】

AgO2 および *GW182* 等、*let-7a* 抑制 *mRNA* を膜会合することを確立したので (図 9f ~ g)、本発明者らは、エキソソームに対するそれらの標的化の可能性をさらに試験した。しかし、著しいことに、*let-7a* 抑制 *mRNA* は、単球の精製エキソソーム様小胞において顕著に少なく示された (図 11d)。神経膠芽細胞腫のエキソソーム *mRNA* 含量に対する全細胞の比較 [53] は、公知の *miRNA* 標的転写物が、検出されたすべての *mRNA* と比較してエキソソーム中において少なく示されることを同様に明らかにした (図 11d、図 19)。逆に、ハウスキーピング遺伝子 *mRNA* は、*miRNA* 媒介抑制をあまり受けず (Farh, K. K. ら、The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310、1817 ~ 21 頁 (2005) [63])、エキソソーム中において濃縮される (図 11d)。エキソソーム中において *miRNA* 標的が少なく示されることは、*miRNA* 媒介 *mRNA* 分解から生じる可能性が低く、前記減少は、通常、標的 *mRNA* (あるとしても) の非常により小さい画分に影響を及ぼし、MVB や分泌小胞とは異なる DCP1a 会合 P-ボディにおいて生じる (Eulalio, A. ら、Target-specific requirements for enhancers of decapping in *miRNA*-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21、2558 ~ 70 頁 (2007) [64]) (図 9d および 10ef)。したがって、*miRNA* 抑制転写物は、*GW182* および *AgO2* 会合膜画分において濃縮されると共に、エキソソーム様小胞から選択的に除外されると思われる。本発明者らはこうして、MVB に選別されかつエキソソーム/リソソーム経路を介してさらに分泌または代謝回転される膜結合 *AgO-miRNA-mRNA* サイレンシング複合体から *GW182* のプールが特異的に解離することを予想した。

【0211】

主要な MVB 選別機構は、ESCRT 複合体によるユビキチン化タンパク質の認識に依存する。*AgO2* は、公知でないユビキチン化タンパク質で精製され (Matsumoto, M. ら、Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics* 5、4145 ~ 51 頁 (2005) [65])、ユビキチンは、密度によって単離される幾つかの *AgO* 複合体に見出される (Hock, J. ら、Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing *mRNA* protein complexes in human cells. *EMBO Rep* 8、1052 ~ 60 頁 (2007) [66])。GW-ボディ成分がユビキチン化され、したがって MVB に選別されるのかを決定するため、サイレンシング因子を総タンパク質抽出物から免疫沈降し、ユビキチン化タンパク質とのそれらの会合または直接的なユビキチン化を試験した。抗 Ub 抗体は、*GW182* 抗血清と反応するタンパク質を (わずかにより小さい大きさではあるが) 免疫沈降させ、抗 *GW182* 抗体は、*GW182* の大きさに一致するユビキチン化タンパク質を免疫沈降させた (図 12a)。したがって、*GW182* は、ユビキチン化される、かつ/またはユビキチン化タンパク質と相互作用する。主に *GW182* を認識すると共に、使用する *GW182* 抗血清は、Ge-1 に対する抗体をも含む (Bloch, D. B.、Gulick, T.、Bloch, K. D. および Yang, W. H. Processing body autoantibodies reconsidered. *Rna* 12、707 ~ 9 頁 (2006) [67])。しかし、*GW182* とは対照的に、Ge-1 は、ユビキチン化タンパク質の中で検出されず、DCP1a でもなかったが (図 12a)、このことは分泌エキソソーム中にお

けるそれらの非存在と一致する。MVBへのユビキチン化GW182のESCRT依存選別は、vps36、ts g 101、Ali x (エキソソーム中において見出されるか、または通常のMVB生合成/機能に必要とされる)およびHrs (MVBの中の腔内小胞蓄積に必要 (Razi, M. および Futter, C. E. Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. Mol Biol Cell 17, 3469~83頁 (2006) [68]))を含むESCRT成分のsiRNA媒介ノックダウンの結果によってさらに支持された。実際、HrsおよびAli xサイレンシングは、Dcp1aではなくGW182の細胞含量を特異的に増加させたが、このことは、エキソソーム分泌および/またはGW182のリソソーム分解におけるこれらの2種のタンパク質の可能な役割を示す (図12b)。注目すべきは、報告されるように [18]、vps36およびAli xのRNAiは、それぞれMVBの大きさを増大させ、かつ核周囲MVB分布を増強し、MVBへのGFP-GW182の局在化は、これらの治療により (図12c)、そしてts g 101またはHrsのノックダウンの際 (データ示さず) に不変のままだった。

【0212】

MVBへのGW182選別がRNAサイレンシングに関連したのならば、ESCRT成分のノックダウンは、miRNA活性に支障を来すと考えられるであろう。二重ルシフェラーゼアッセイにおいて、Ali x、Hrsおよびvps36のRNAiは、単球 (図12d) およびHeLa細胞 (2つの独立したsiRNA/遺伝子、図21) の両方におけるlet-7a活性を、GW182AのsiRNA媒介ノックダウンと同じ程度に実際に阻害した (約20%、他 (Liu, J. ら、A role for the P-body component GW182 in microRNA function. Nat Cell Biol 7, 1261~6頁 (2005) [70]))によって観察される通り)。逆に、EGFR分解 [20] に必要な初期エンドソーム [68] またはPTPN23の中の液胞ドメインを形成するts g 101のノックダウンによってほとんどまたは全く効果が得られなかった (図12d、図21)。上記のsiRNA治療のいずれも、let-7a蓄積 (図12b、右のパネル) に影響を及ぼさなかった。同様の実験を、エキソソームおよび単球には存在しないmiR-206を発現するプラスミド (または対照miRNA) で行った (図12c)。エストロゲン受容体α転写物 (確認されたmiR-206標的) の3'UTRを有するホタルルシフェラーゼmRNAを発現する第2のプラスミドをトランスフェクションした。let-7aと同様に、ts g 101やPTPN23ではなく、Ali xまたはHrsのノックダウンは、miR-206の比活性を阻害した (図12e、図21)。本発明者らは、ESCRTの統合性の変化が、おそらくMVBへのGW182の選別による干渉によって、一般にmiRNA機能に支障を来すと結論する。

【0213】

スポンジ体およびER様区画は、翻訳調節mRNAまたは選択P-ボディ成分が会合する膜区画の例である (Decker, C. J. および Parker, R. CAR-1 and trailer hitch: driving mRNP granule function at the ER? J Cell Biol 173, 159~63頁 (2006) [72])。本発明者らは、特異的miRNA経路成分、成熟miRNAおよびmiRNA抑制転写物は、著しくMVBを含む細胞膜上に物理的にかつ機能的に集合することを示す。したがって、本発明者らは、各種の哺乳類の細胞型において一般に検出され、かつ以前は「GW」-ボディと定義されたGW182凝集体が、必ずというわけではないが、しばしば、MVBに相当することを提案する。MVBとP-ボディ特異的成分Dcp1aとの間の限定された共局在性は、本発明者らおよび他が見出したDcp1aとのGW182の不完全な会合と同時に起こる (Buchet-Poyau, K. ら、Identification and characterization of human Mex 3 proteins, a novel family of evol

10

20

30

40

50

utionarily conserved RNA binding proteins differentially localized to processing bodies. *Nucleic Acids Res* 35、1289～300頁(2007) [73]、Vasudevan, S., Tong, Y. および Steitz, J. A. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7、1545～9頁(2008) [74]。さらに、Dcp1aではなく、GW182は、miRNAに誘導された翻訳活性化の間にFXR1およびAgo2と部分的に共局在する(Vasudevan, S. および Steitz, J. A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute2. *Cell* 128、1105～18頁(2007) [75]) が、このことは、GFP-Ago2凝集体の有意部分が、単球およびHeLa細胞中におけるGW-ボディと局在するという本発明者らの発見に一致する。しかし、本発明者らは、一貫して、Dcp1a、GW182およびMVBが明らかに共局在する一部のHeLa細胞を観察したが、このことはまた、他(Sen, G. L. および Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7、633～6頁(2005) [76])により為された観察をも支持する。これらの差の基礎となり得る1つの主要な要素は、miRNA活性が、P-ボディではなくGW-ボディと同期して細胞周期に依存する方法で調節されると思われ[74]、その結果、培養細胞の中のサイクル進行の差が、有意な標識化不均質性を生じる可能性があるということである。

【0214】

それらはMVBに会合するにもかかわらず、miRNA抑制mRNAおよび大部分のAgo2はエキソソームから除外される。逆に、GW182は、それらの小胞中において選択的に濃縮される。本発明者らの解釈は、Ago、miRNA、mRNAおよびGW182を含有する膜結合型RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)の高解離速度が、複数回のmRNA抑制(インビトロでのRISCの公知の生化学的特徴)にインビボで必要であることを伴う[26]。これらの高オフ率は、MVBへのユビキチン結合GW182分子の特異的な - および、おそらく連続的な - ESCRT依存性除去により付与され得るが、これにより、エキソソーム内へのそれらのその後の分泌、および/または、リソソームにおける分解が可能になる。この仮説に対して黙示的には、GW182は、miRNA媒介サイレンシングにおいて律速であるべきであり、このことは、GW182がノックダウンされる場合、mRNAに結合するAgo2がもはや抑圧的でないという最近の実証により支持される(Li, S. ら、Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing. *J Cell Sci* 121、4134～44頁(2008) [78])。多少のmiRNA負荷Ago2が、最近AGOアンカーと同定されたGW-反復と直接相互作用する可能性が高いので、GW182のESCRT依存性選別に結びつくRISCを作製しないこと、および再度作製することは、中程度の部分のAgo2および成熟miRNAがエキソソーム中にも分割されることをさらに満たす(EI-Shami, M. ら、Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 21、2539～44頁(2007) [79])。前記モデルはまた、支障を来すESCRT統合性が、MVBへのGW182の共局在性を変化させることなくmiRNA機能を混乱させる理由、およびGW182レベルがAlixまたはHrsノックダウンの際に増加する理由をも説明しており、分泌/分解の低下は、細胞膜におけるGW182の蓄積を引き起こし、それは、サイレンシング複合体の提案されたター

ンオーバーに同時に支障を来す。MVBにおけるmiRNA複合体の再利用はまた、同時期の研究(Le eら参照)とも完全に一致しており、このことは、MVB輸送経路が、miRNAまたはsiRNAによるショウジョウバエAgosの効率的な負荷に必要とされることを示唆する。しばしばパラログス因子により、ESCRT経路の明瞭な分岐は各種MVB機能を制御する。故に、PTPN23は、EGFRのライゲーション後の分解を制御するが、一方でAli xは、それに対する効果を少ししか有さない(Doyotte, A., Mironov, A., McKenzie, E. およびWoodman, P. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 105, 6308~13頁(2008)[71])。逆に、Ali xサイレンシングはMVBおよびmiRNA活性に対するGW182選別に支障を来すが、一方でPTPN23ノックダウンはそうではない。したがって、それらの制御的なEGFR下方制御から区別されるESCRT成分の特異的なサブセットは、本明細書で報告されるプロセスに関与すると思われる。

【0215】

miRNA作用の、さらなる、以前に特性が評価されていない部位としてMVBを同定することは、MVB会合miRNA活性とP-ボディ-会合miRNA活性との間に機能的区別が為されるのかについての問題を喚起する。本発明者らの結果は、抑制mRNAの翻訳阻害または貯蔵が大部分は膜のGW-ボディで生じるが、一方でmRNA分解が細胞質P-ボディにおいて起きることを示す。ショウジョウバエ細胞における以前の研究は、GW182が、mRNA分解機構の非存在下で遺伝子発現を抑制することが可能であり、かつ、GW182が、polyAテールのないmRNAを非発現化することが可能であることを実際に示す(Eulalio, A., Huntzinger, E. およびIzaurralde, E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. Nat Struct Mol Biol 15, 346~53頁(2008)[80])。翻訳抑制は、Ge-1およびDcp1aが欠失した細胞において持続し、増強される可能性があることから、P-ボディから独立して生じることが示唆されたが[13]、このことは、翻訳抑制機構がMVBで少なくとも部分的に集合してGW-ボディを形成する可能性があることを意味する。これはまた、miRNA媒介翻訳抑制が検出可能P-ボディの非存在下で機能することができる理由について説明することも可能である(Chu, C. Y. およびRana, T. M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. PLoS Biol 4, e210(2006)[81])。

【実施例3】

【0216】

標的器官または標的細胞へのsiRNA、miRNAまたは関連分子の送達速度および/または効率の決定方法

siRNA/miRNAまたはその阻害剤による動物または患者の治療の約12時間~4日後に、siRNAまたはmiRNAが標的とする組織または細胞を排出する部位からの血清、上清または体液(例えば、前立腺または腎臓標的siRNA用尿試料)の採取の第一段階を実現する。

【0217】

次いで、100~400gで5分間の低速の遠心分離による細胞材料および他の大きな材料の除去を行う。上清を回収する。

【0218】

例えば8000~12000gで30分間の第2の遠心分離により、大きなデブリ、小

胞および他の微粒子の除去を行う。あるいは、このステップを、例えば $0.22 \mu\text{M}$ 、 $0.45 \mu\text{M}$ または最高 $1 \mu\text{M}$ フィルタカットオフを用いるサイズ排除濾過と置き換える。フィルタを通過する材料を回収する。

【0219】

小さい小胞またはエキソソームをペレット化するため、 $70000 \sim 120000 \text{ g}$ で1時間の最後の遠心分離を用いる。

【0220】

小胞またはエキソソームにおいて濃縮される分子に結合する抗体または他の分子を使用して、例えば抗CD63、抗MHCクラスI、またはビーズもしくは他の容易に精製される構造に結合するスフィンゴミエリン結合分子を使用して、いずれかのステップ（開始時、ステップ後、1、2、3または4）で小胞をさらに精製する。

10

【0221】

Trizol 抽出等の方法によりRNAを単離する。グリコーゲン、酵母tRNAまたは他の材料の添加によりRNA沈殿を増強する。

【0222】

siRNA / miRNA 治療またはその阻害剤が標的とする特異的mRNA（および、場合によっては対照RNA）を、定量的リアルタイムPCRまたは同様の結果を伴う他の方法により定量する。

【0223】

mRNAの量を、対照RNAまたはエキソソーム量（例えば、スフィンゴミエリン、CD63の量）の測度に正規化する。あるいは、siRNA / miRNA または阻害剤を小胞において直接定量する。

20

【0224】

特異的mRNAの量を、siRNA / miRNA またはその阻害剤による患者または動物の治療の前または後に行う同様の測定と、または治療されないもしくはプラセボ分子で治療された動物もしくは患者とさらに比較し、それにより標的器官または標的細胞へのsiRNA、miRNA または関連分子の送達速度および/または効率を決定することを可能にする。あるいは、特異的mRNAのレベルを、siRNA が送達されない細胞、例えば白血球における同じmRNAのレベルと比較する。

【0225】

このプロトコルを、miRNA またはmRNAの発現レベルまたは存在と関連する患者の診断または予後を得るためにも用いる。

30

【実施例4】

【0226】

診断または治療のための候補分子のスクリーニング方法

miRNA / siRNA を模倣するか、または阻害する分子を、本発明を使用するそれらの標的および標的外の効果についてスクリーニングすることができる。

【0227】

治療状態に近い組織または細胞を、miRNA / siRNA または阻害剤で治療する。

【0228】

約8時間～4日間の期間の後に、エキソソーム様小胞を組織または細胞から精製し（実施例3のプロトコルに従って）、最適な全細胞および/または膜画分を同じ組織または細胞から調製する。

40

【0229】

ダウンスホモジナイゼーションにより細胞を溶解することによって膜画分を調製する。続いて核除去後上清（約 1000 g 、5分間）を約 $10000 \text{ g} \sim 100000 \text{ g}$ で遠心分離する。次いでペレット化材料を膜画分として使用する。あるいは、密度勾配における遠心分離、または電氣的勾配における単離を、膜画分の単離に用いる。

【0230】

Trizol 抽出等の方法により各種試料からRNAを単離する。

50

【 0 2 3 1 】

好ましくは、S o l e x a 配列決定やマイクロアレイ等、並行して多数のRNAの解析を可能にする方法により、RNA量を解析する。

【 0 2 3 2 】

各RNAの比または他の比較発現を、エキソソーム、全細胞および/または膜画分の中で確立する。比は、小分子RNAによるRNAの標的化を示す。細胞および/または膜画分と比較したエキソソーム中におけるRNAの減少は、それがmiRNA/siRNAにより標的とされることを示す。幾つかの例において、試料の種類(エキソソーム様小胞、全細胞、膜画分)の内の1種だけを使用してmiRNA/siRNA標的を決定することが可能である。

10

【 0 2 3 3 】

治療された、および治療されていない細胞における各RNAの比の比較は、所定のRNAがmiRNA/siRNAにより標的とされる信頼度をさらに増加させる。

【 0 2 3 4 】

以前のステップからmiRNA/siRNAにより標的とされる可能性のあるRNAを、miRNA/siRNA標的部位の存在について検討する。所定のRNAがmiRNA/siRNAにより標的とされる信頼度をさらに増強するため、小分子RNA配列を有するヌクレオチド2~7「シード領域」のマッチの探索を用いる。

【 0 2 3 5 】

保持されたRNAは、興味の対象の小分子RNAの標的であると考えられる。

20

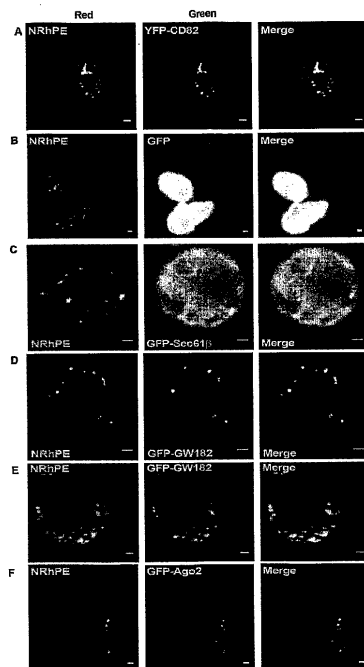


Fig. 1 (cont.)

【 図 1 - 3 】

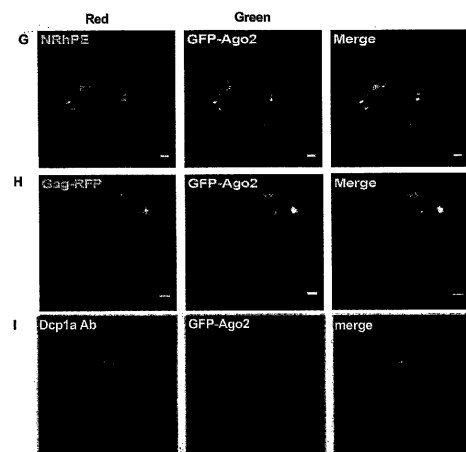
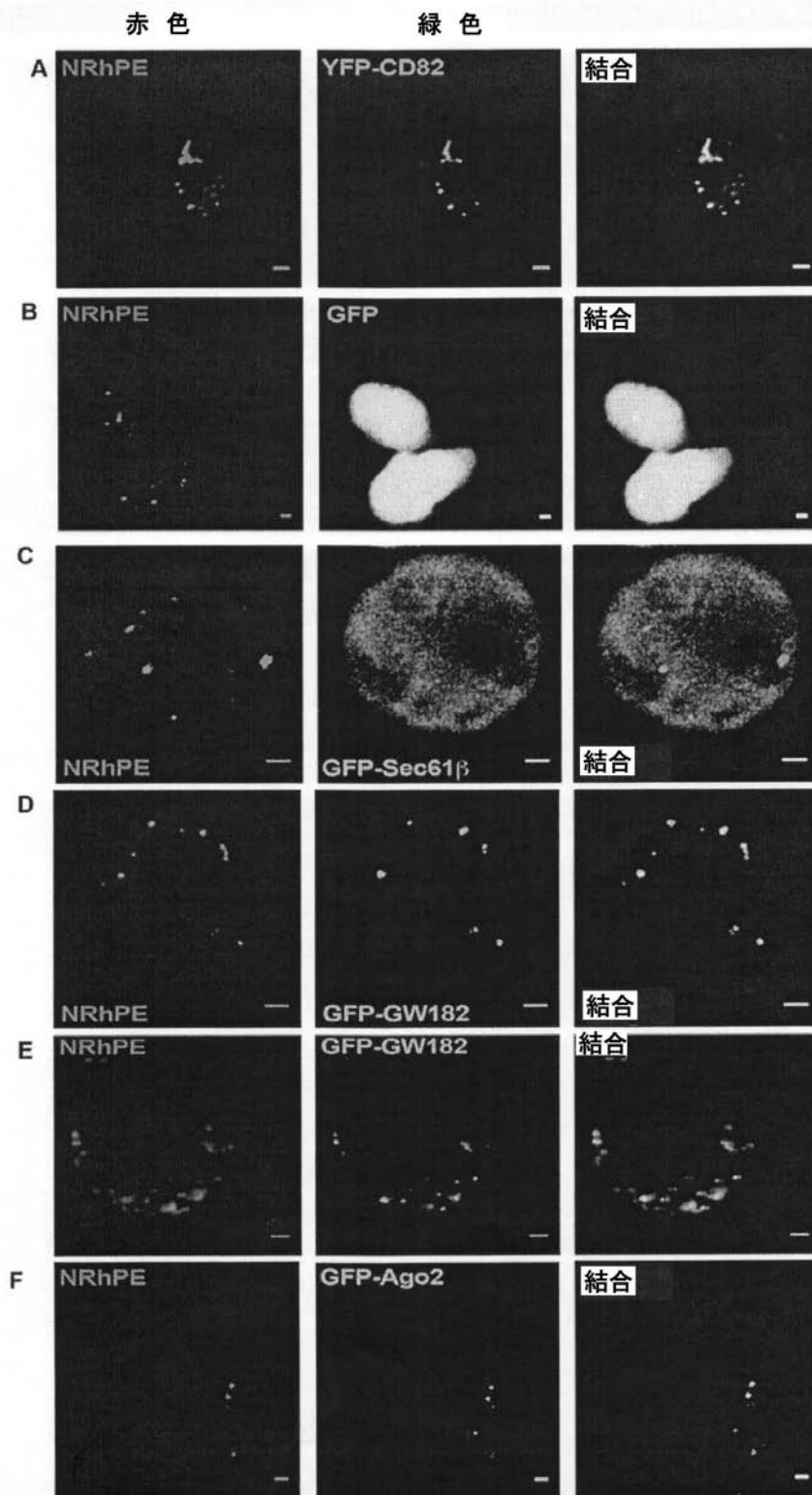
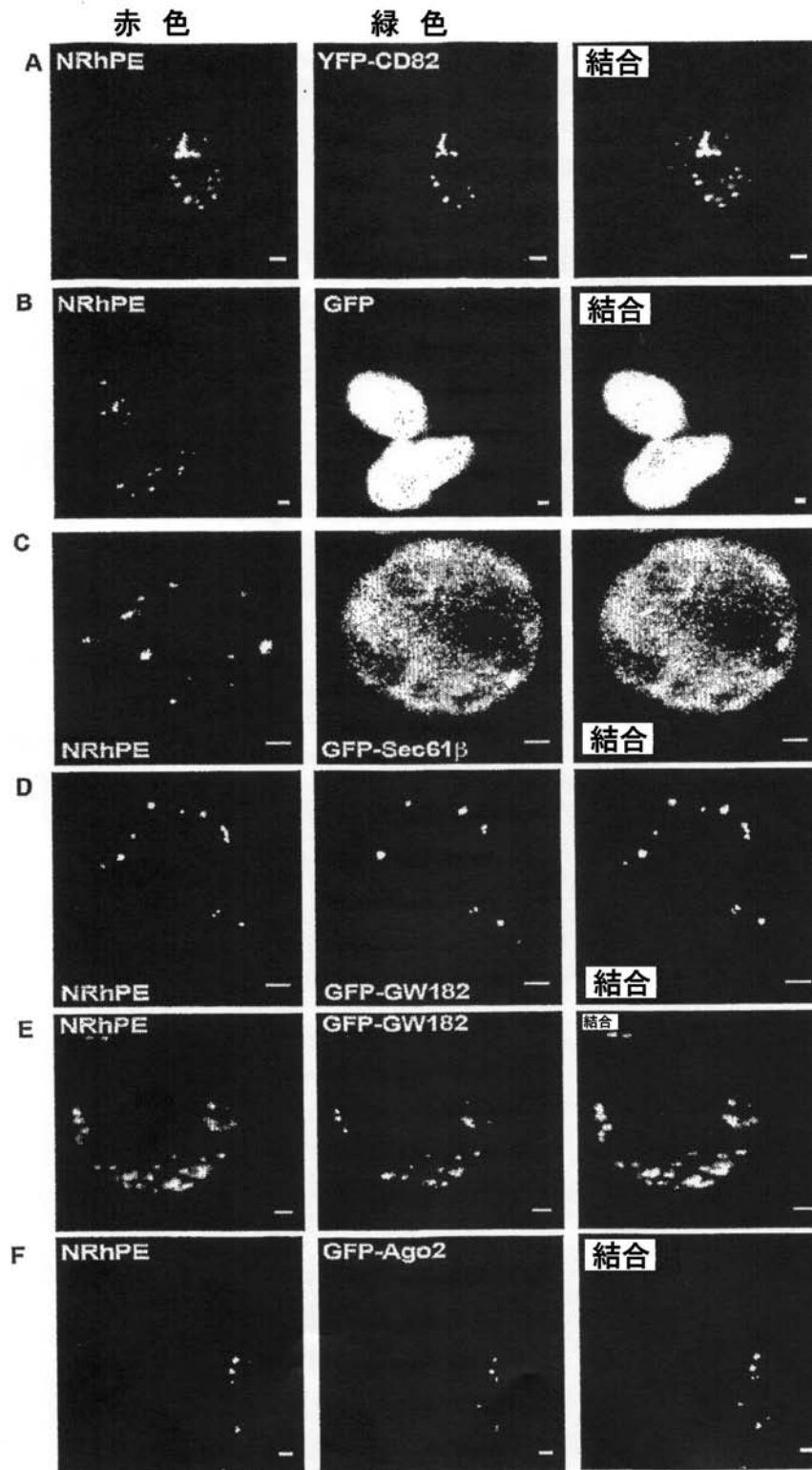


Fig. 1 (cont.)

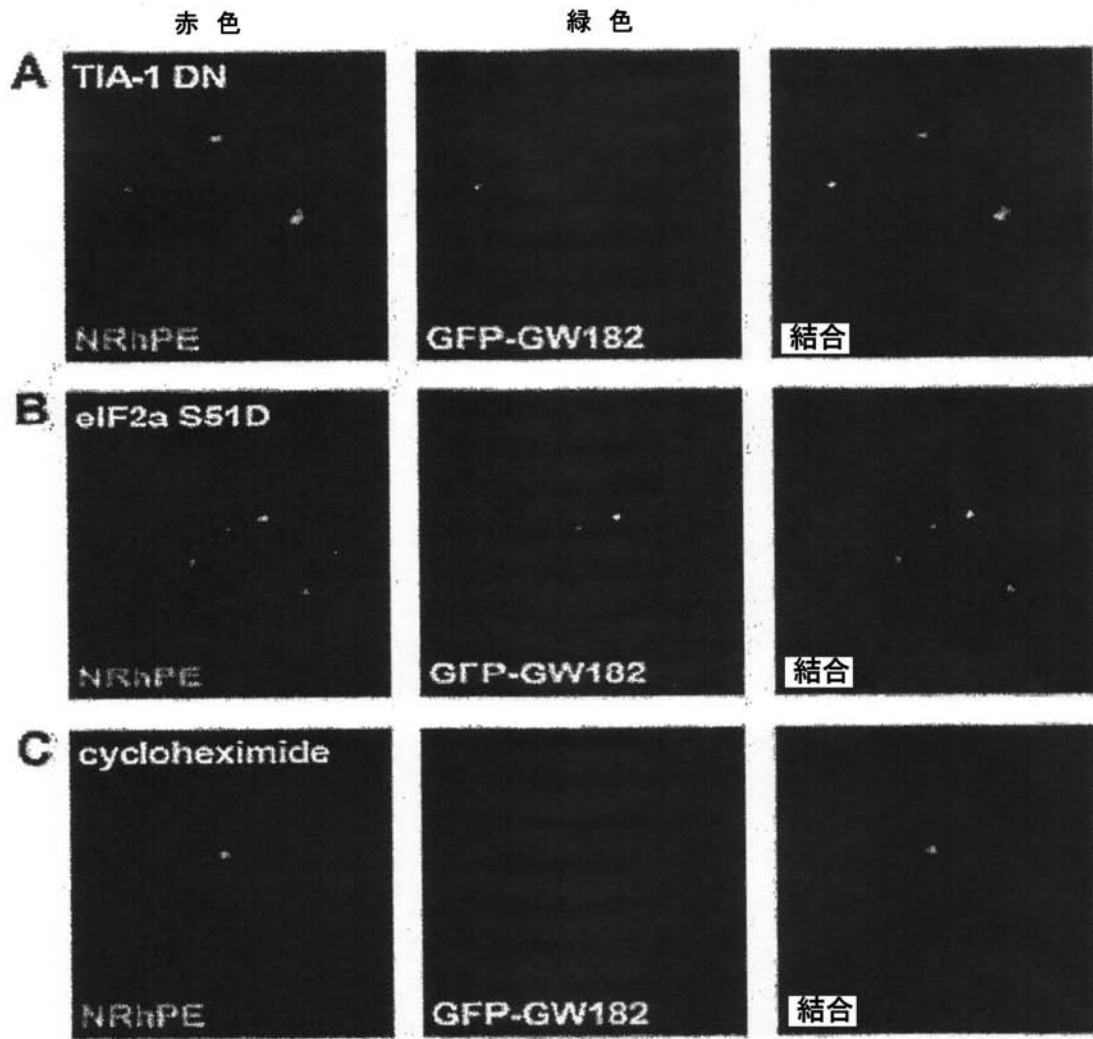
【図 1】



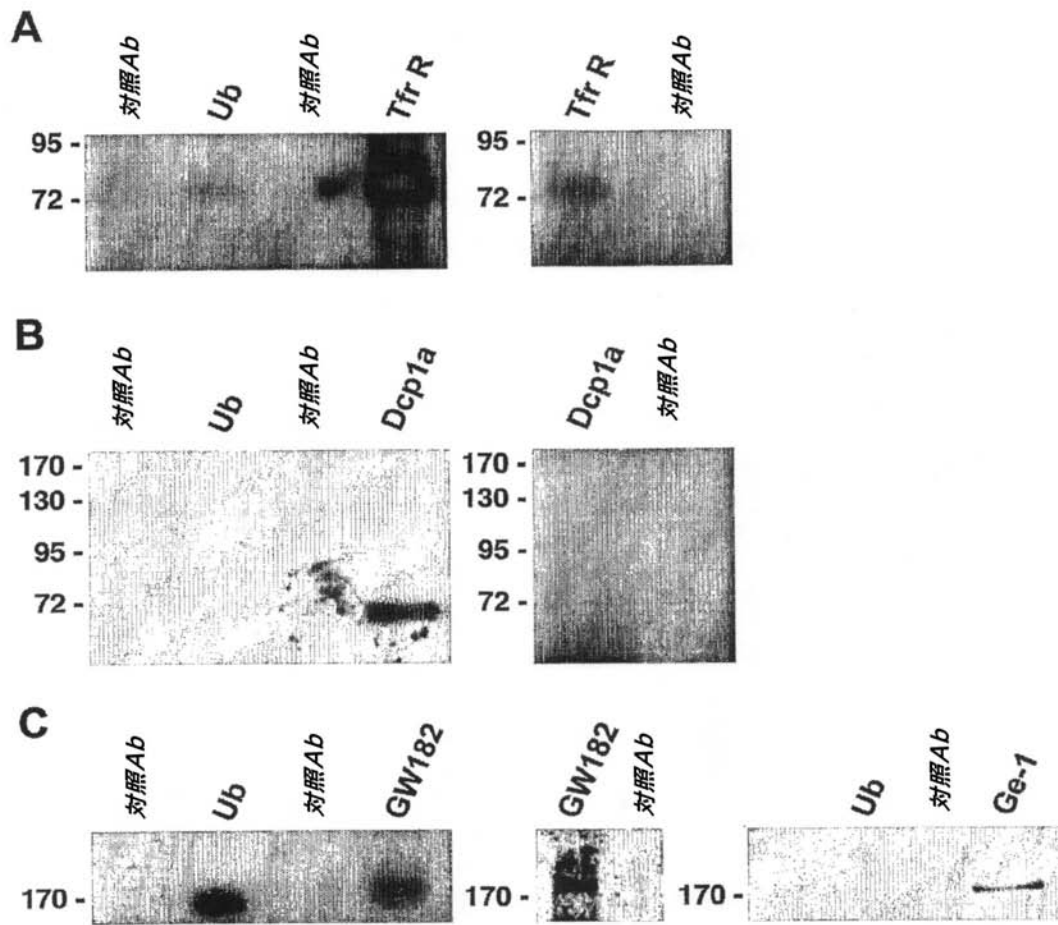
【図 1 - 2】



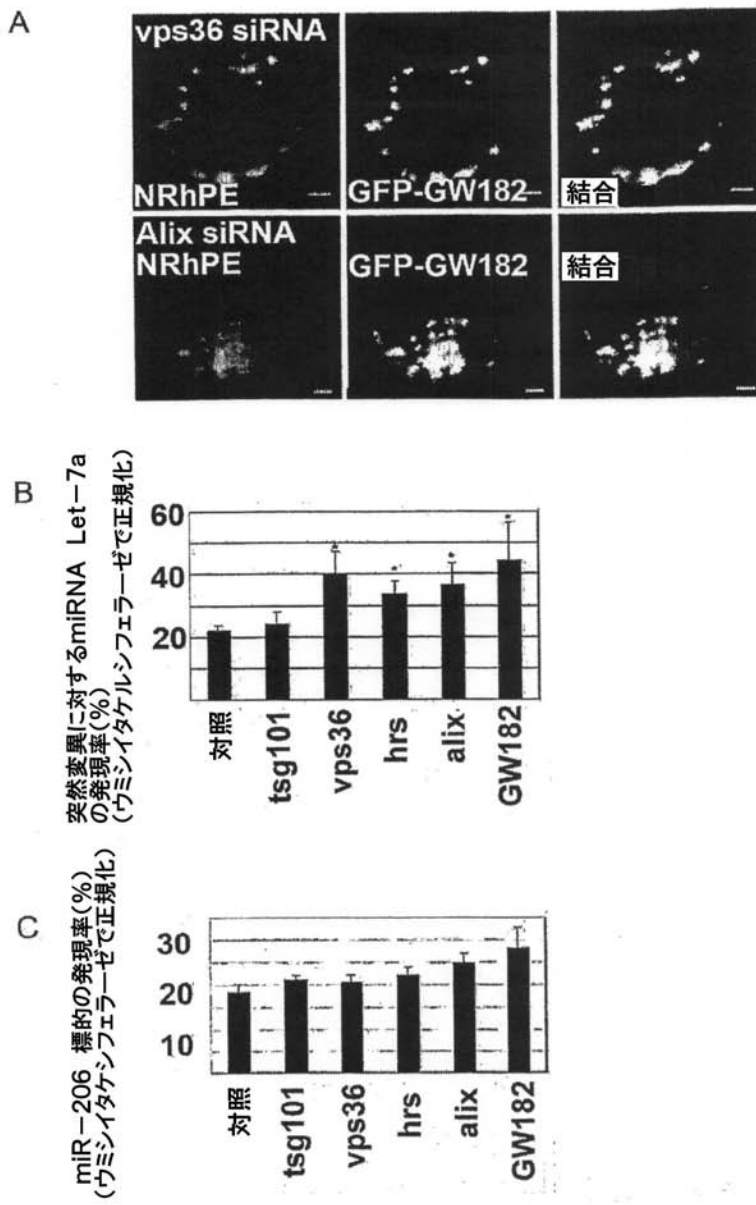
【 図 2 】



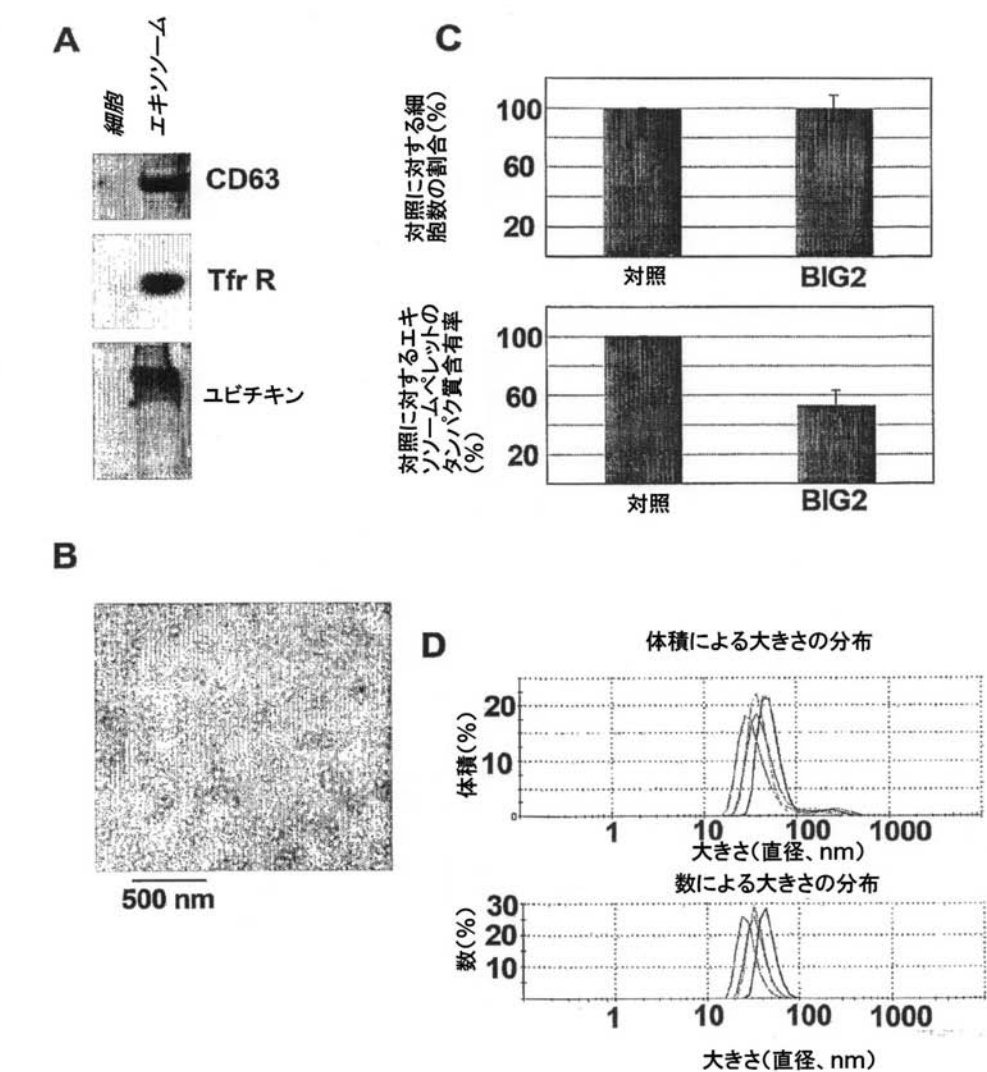
【 図 3 】



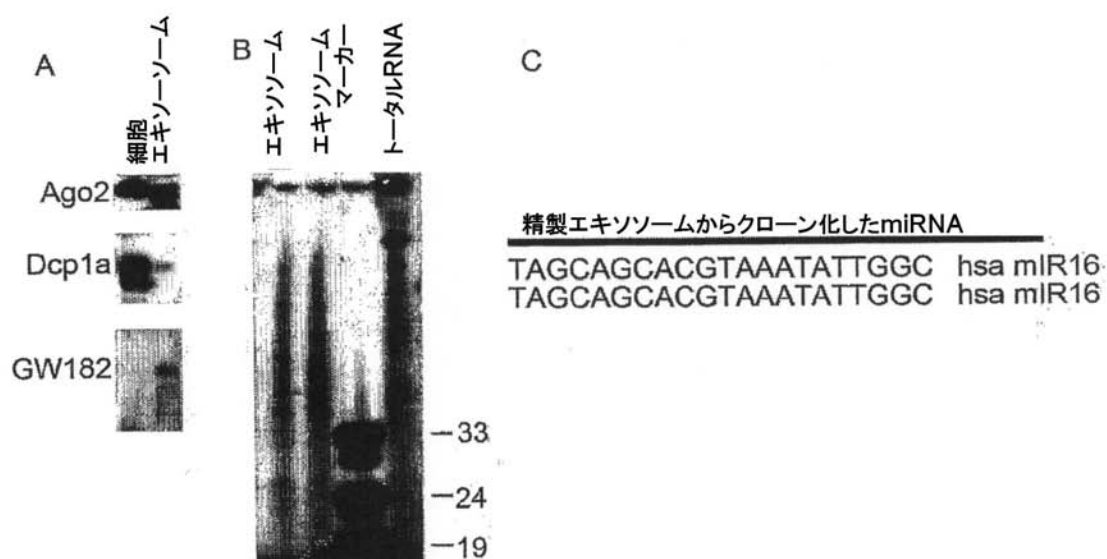
【 図 4 】



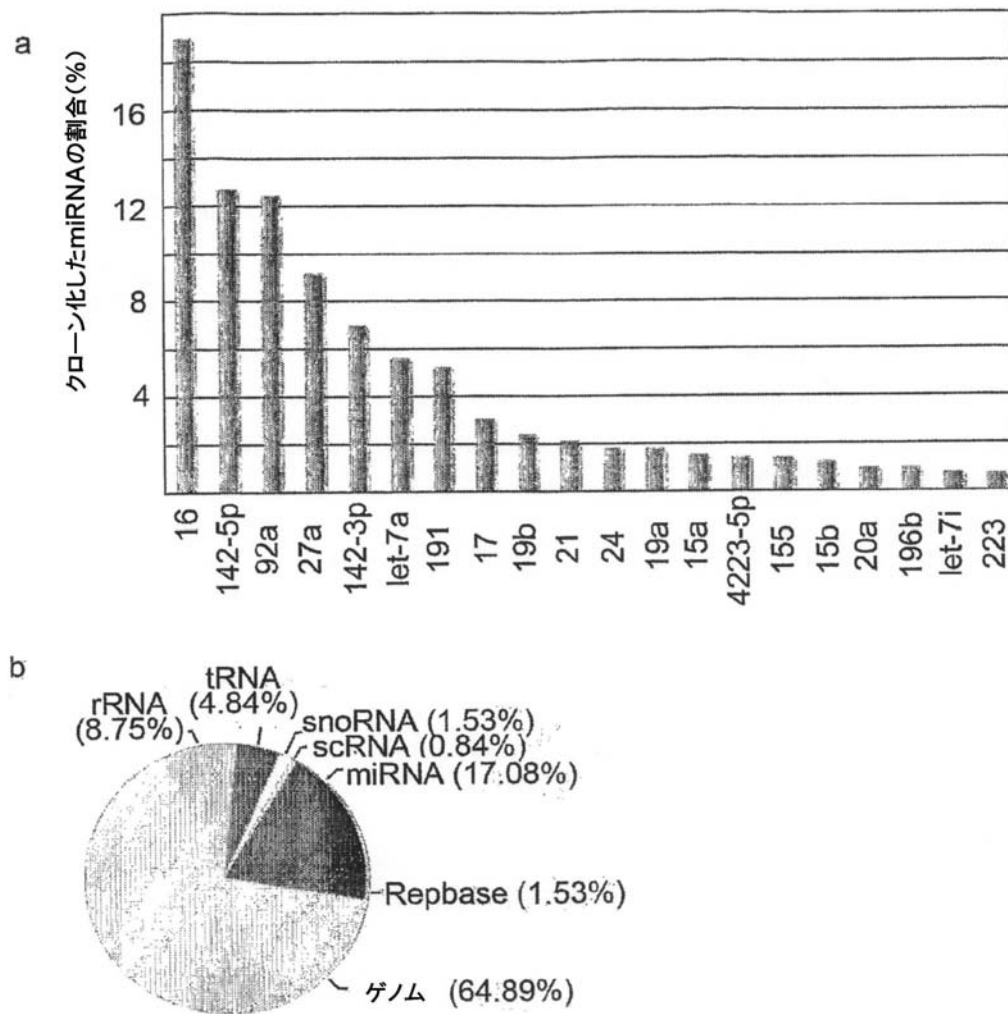
【 図 5 】



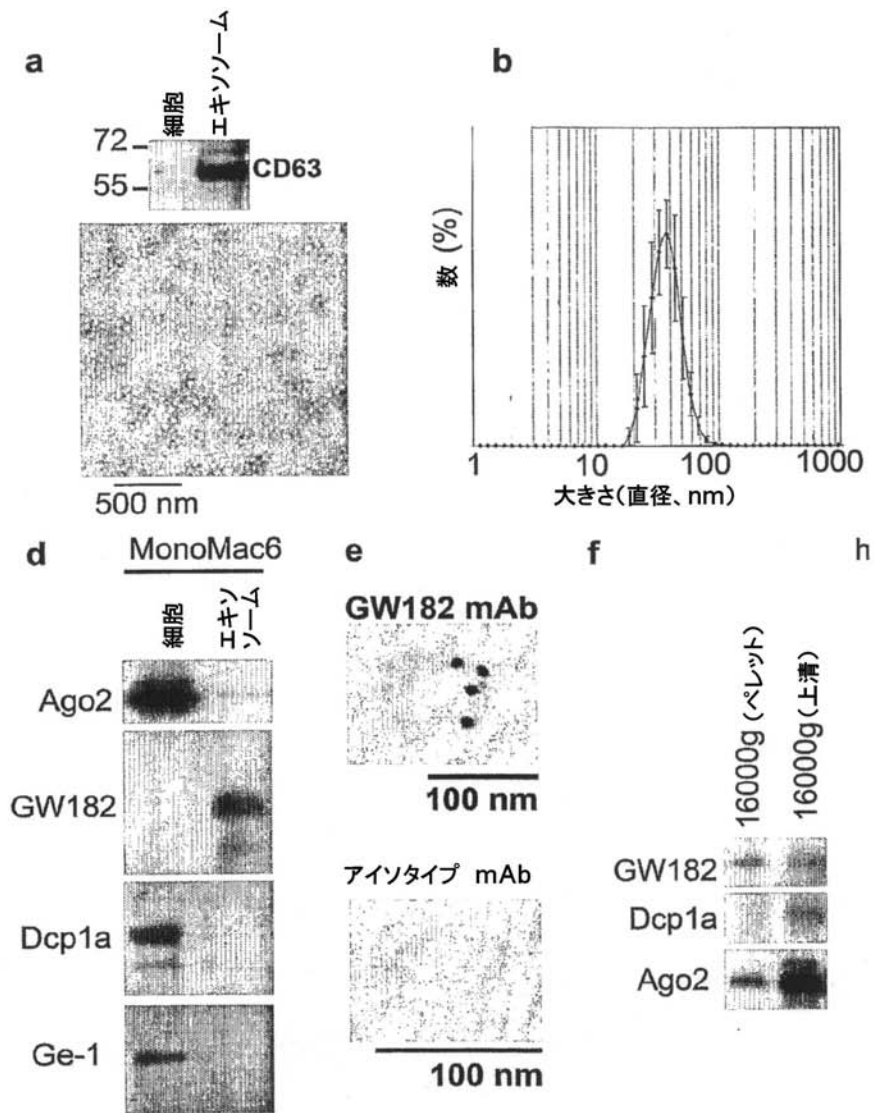
【 図 6 】



【 図 7 】

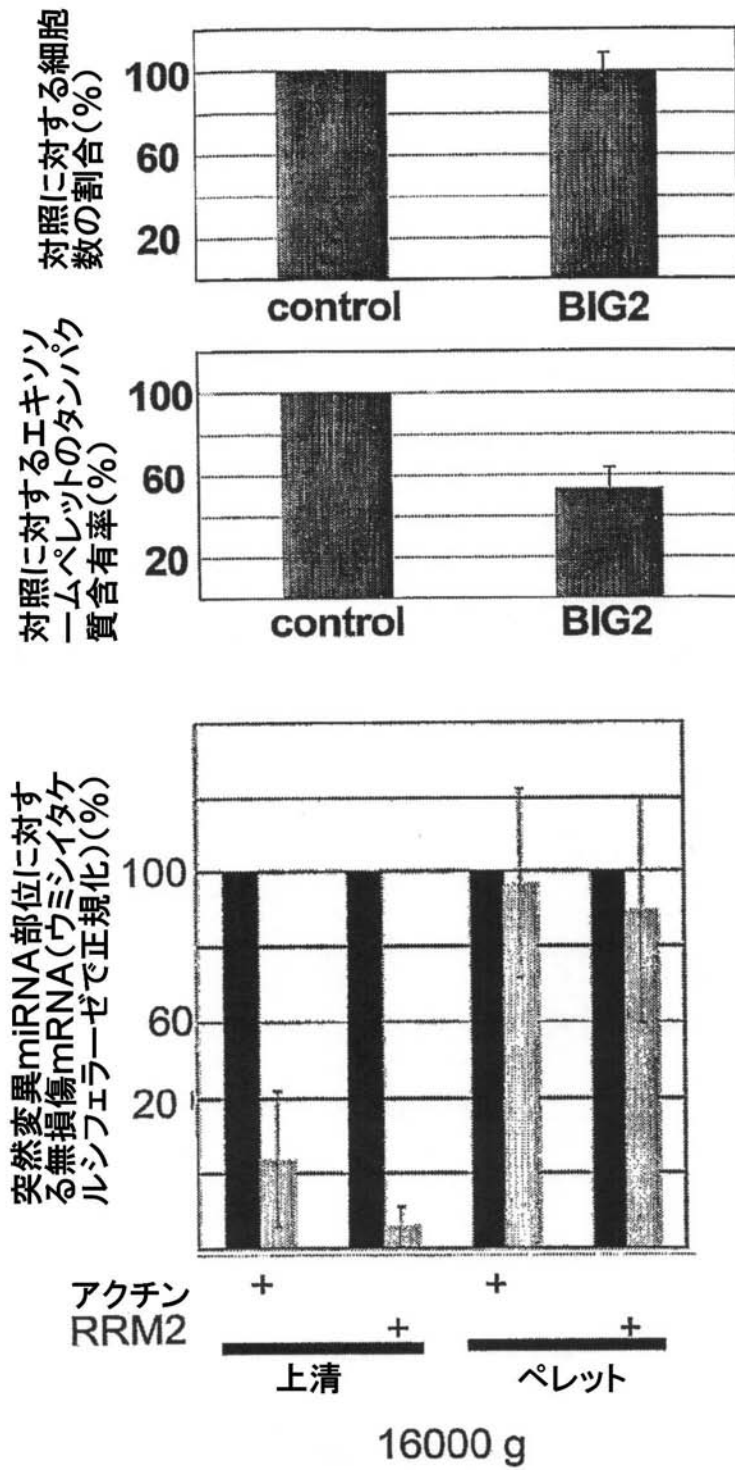


【図 9】



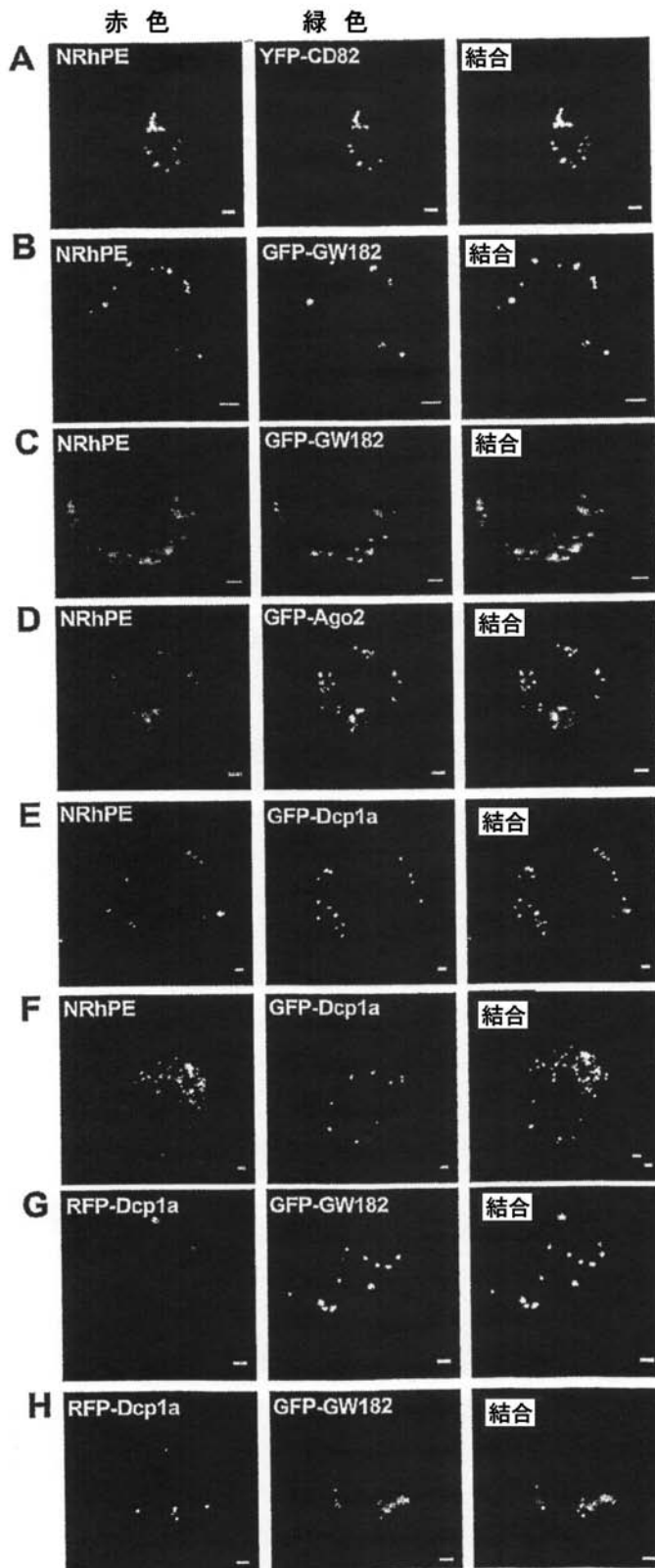
【図 9 - 3】

c. およびh.

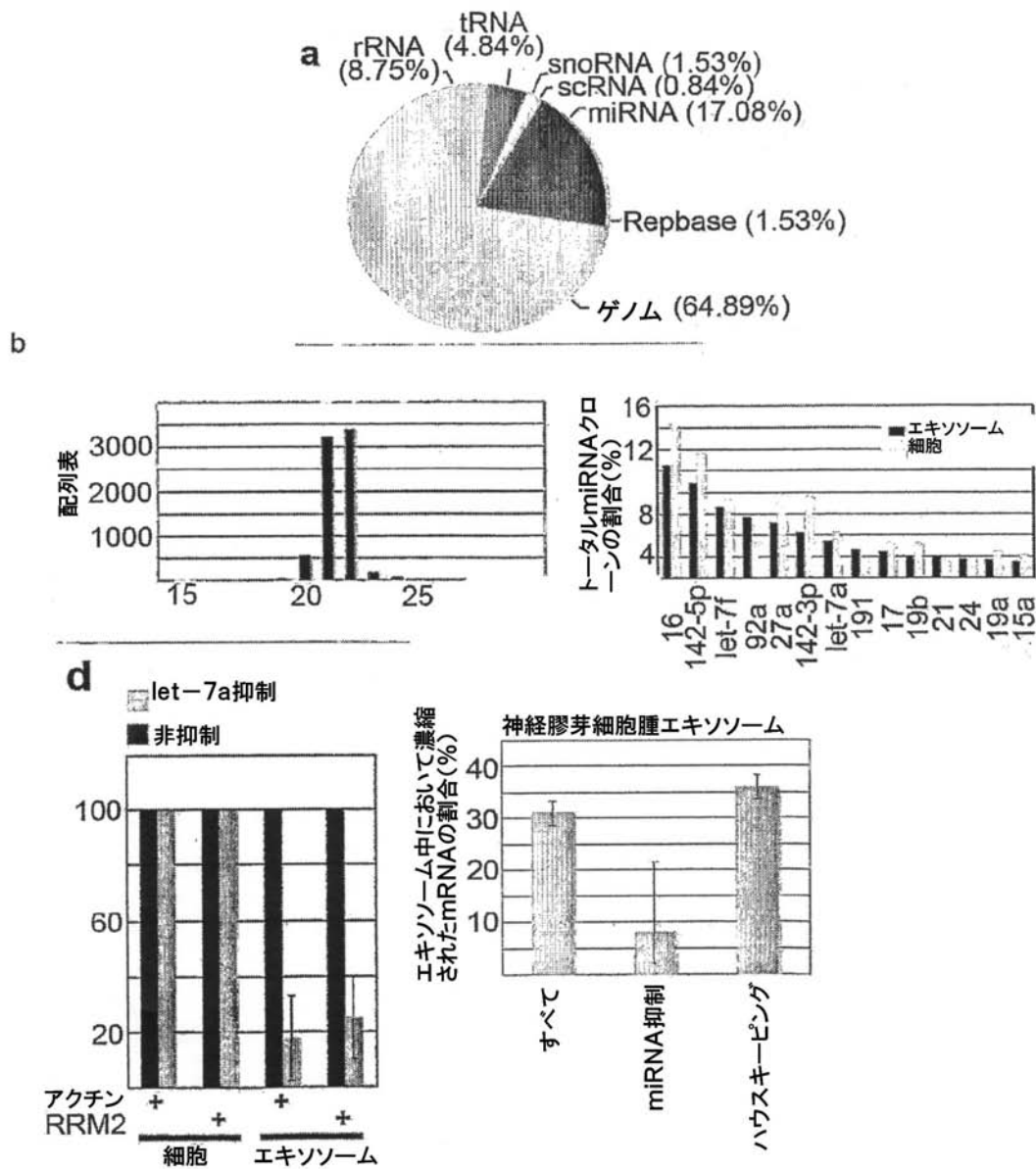


(続き)

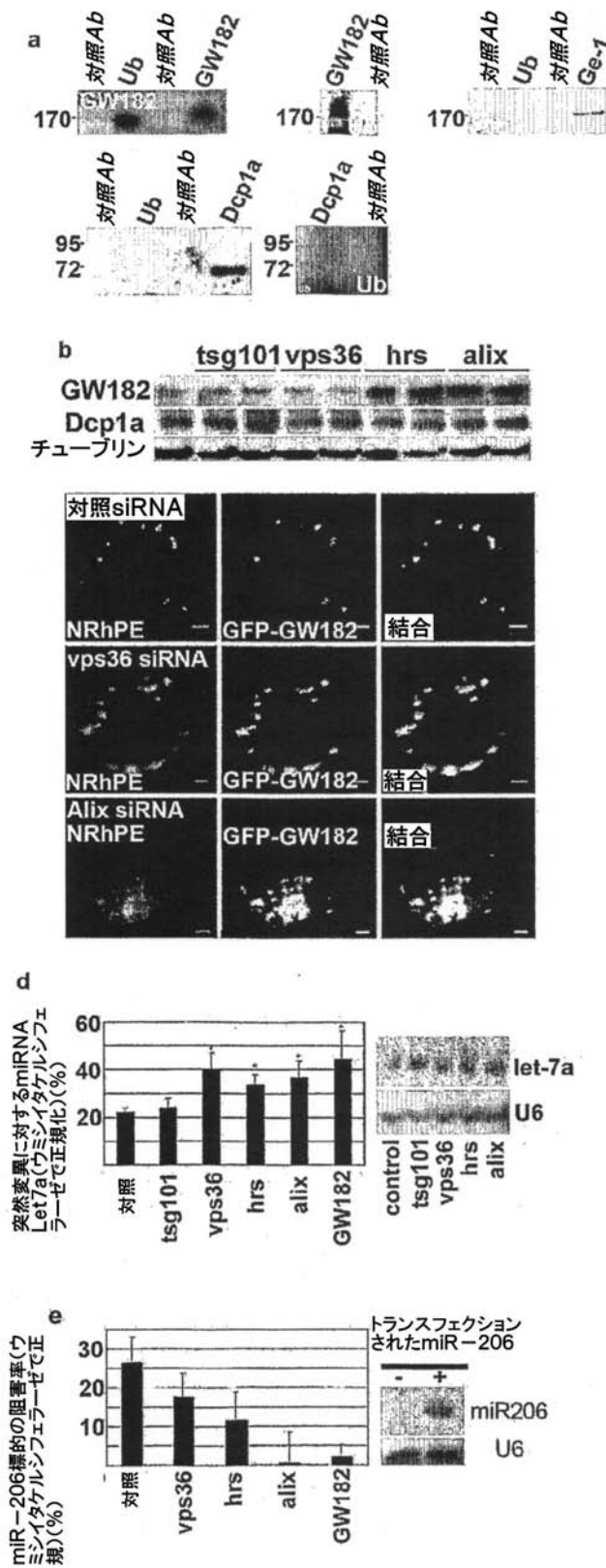
【図 10】



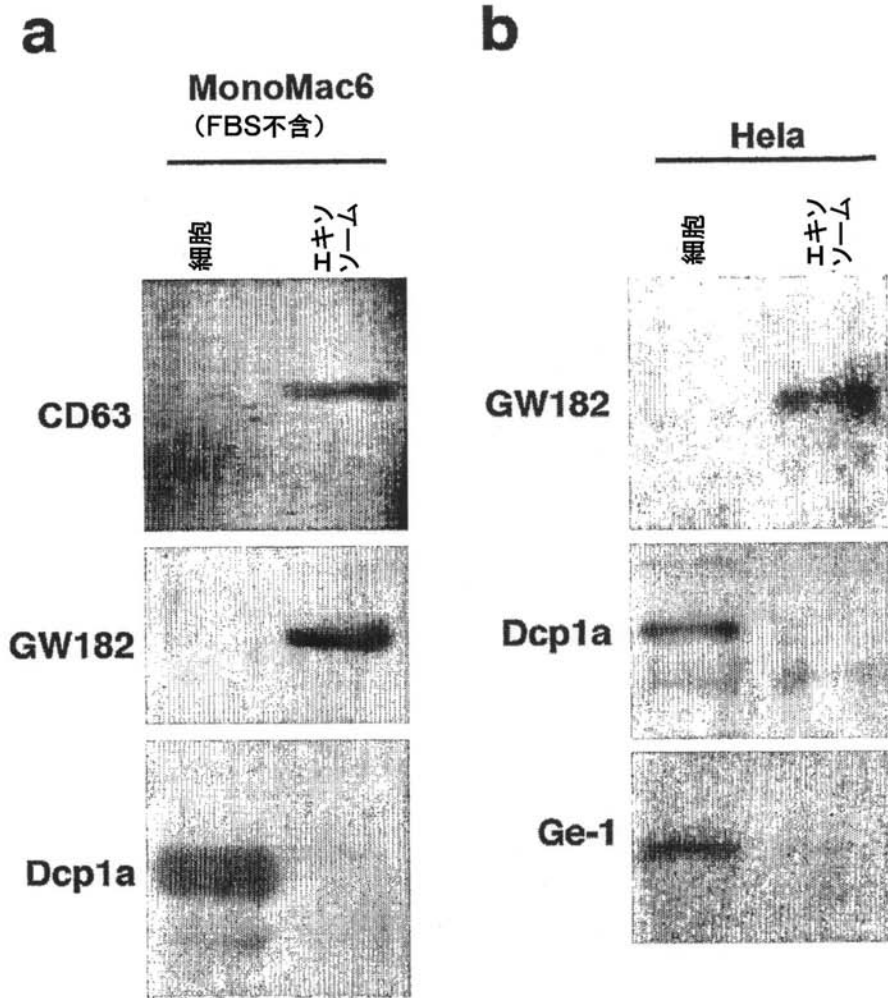
【図 1 1】



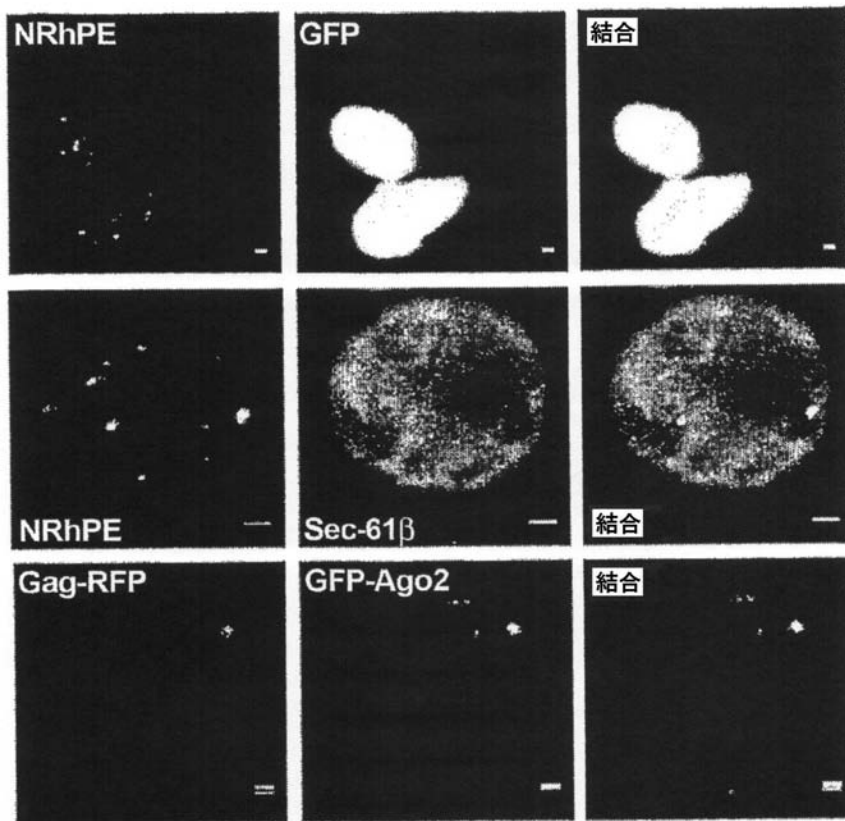
【 図 1 2 】



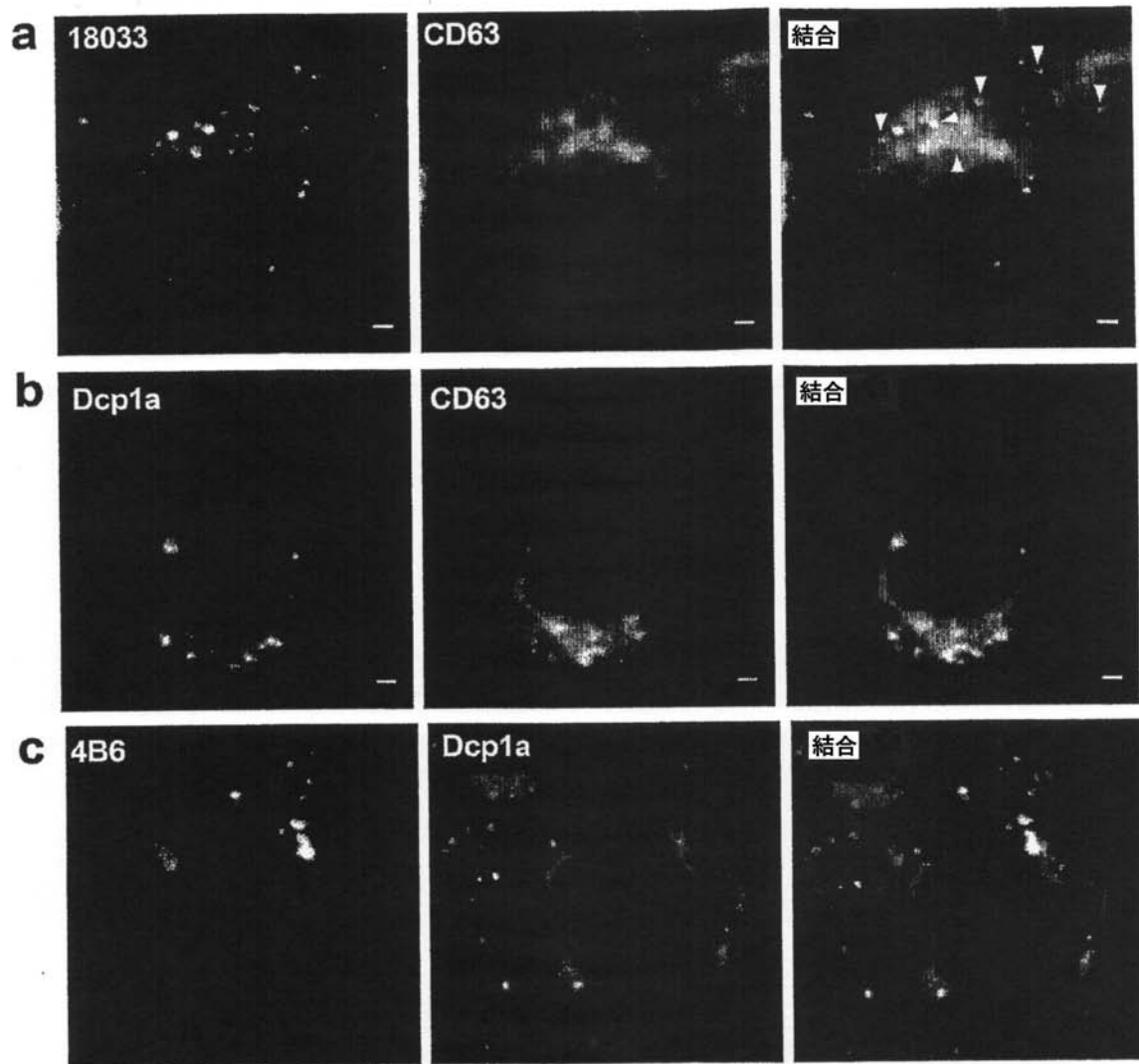
【 図 1 3 】



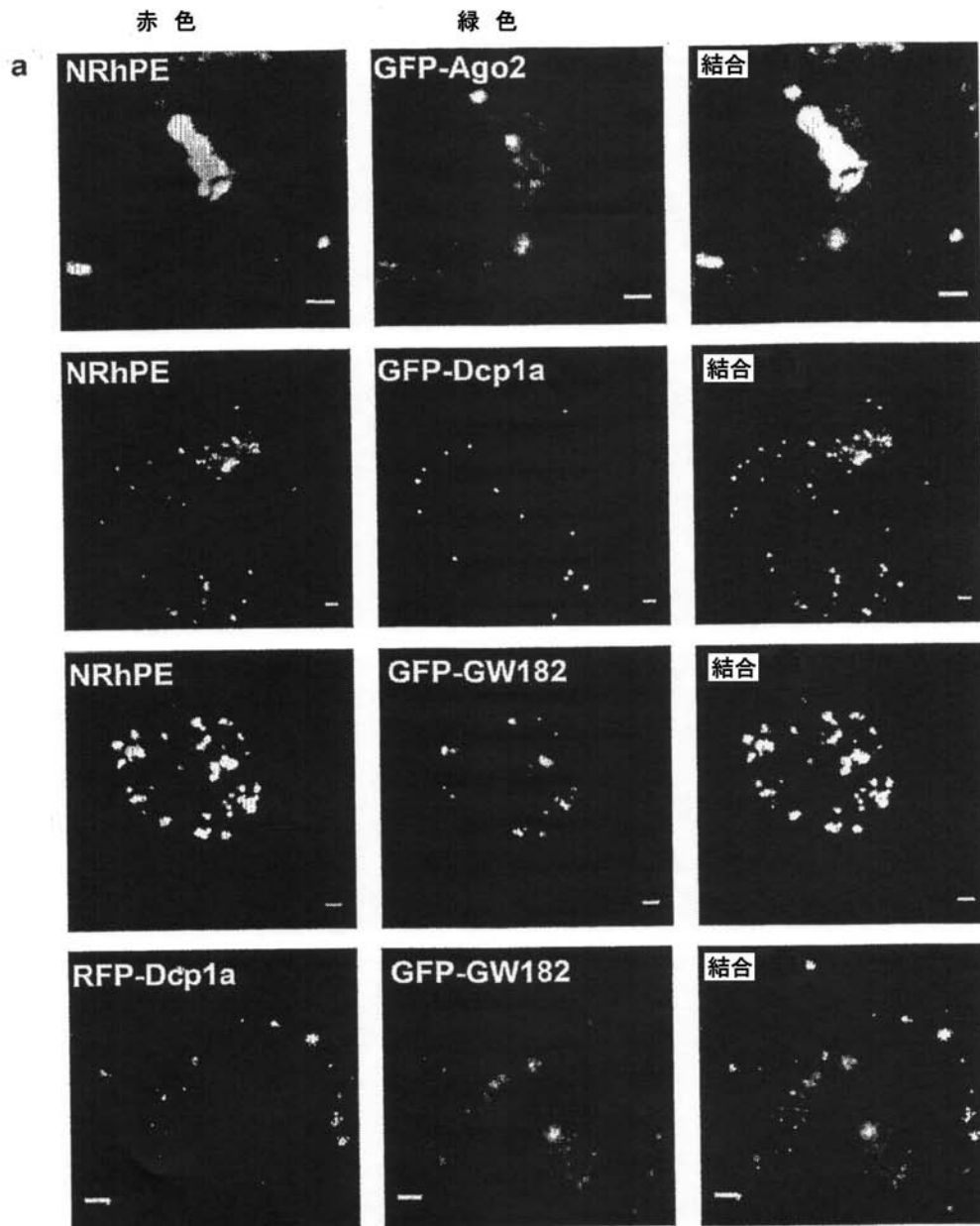
【 図 1 4 】



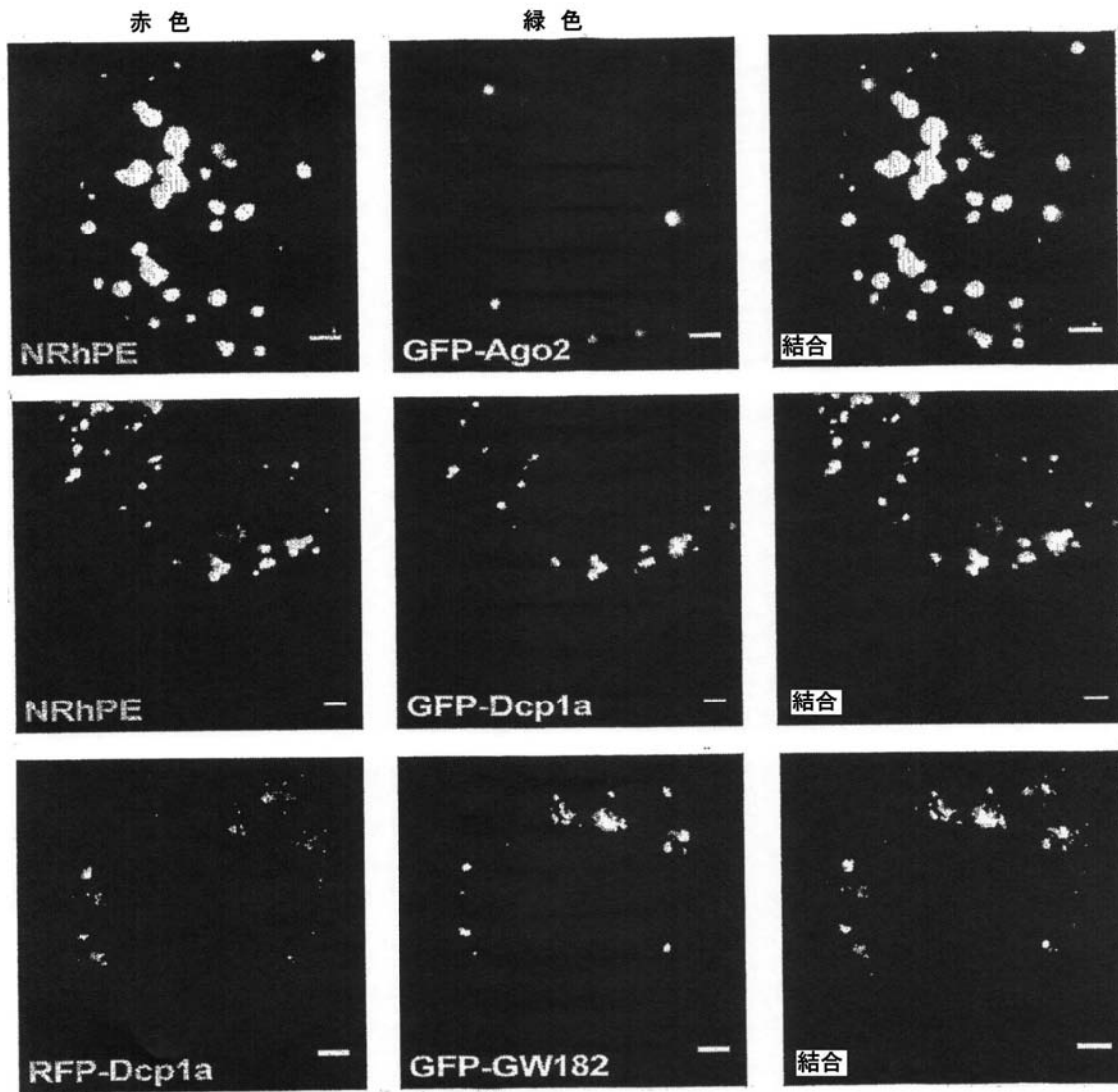
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

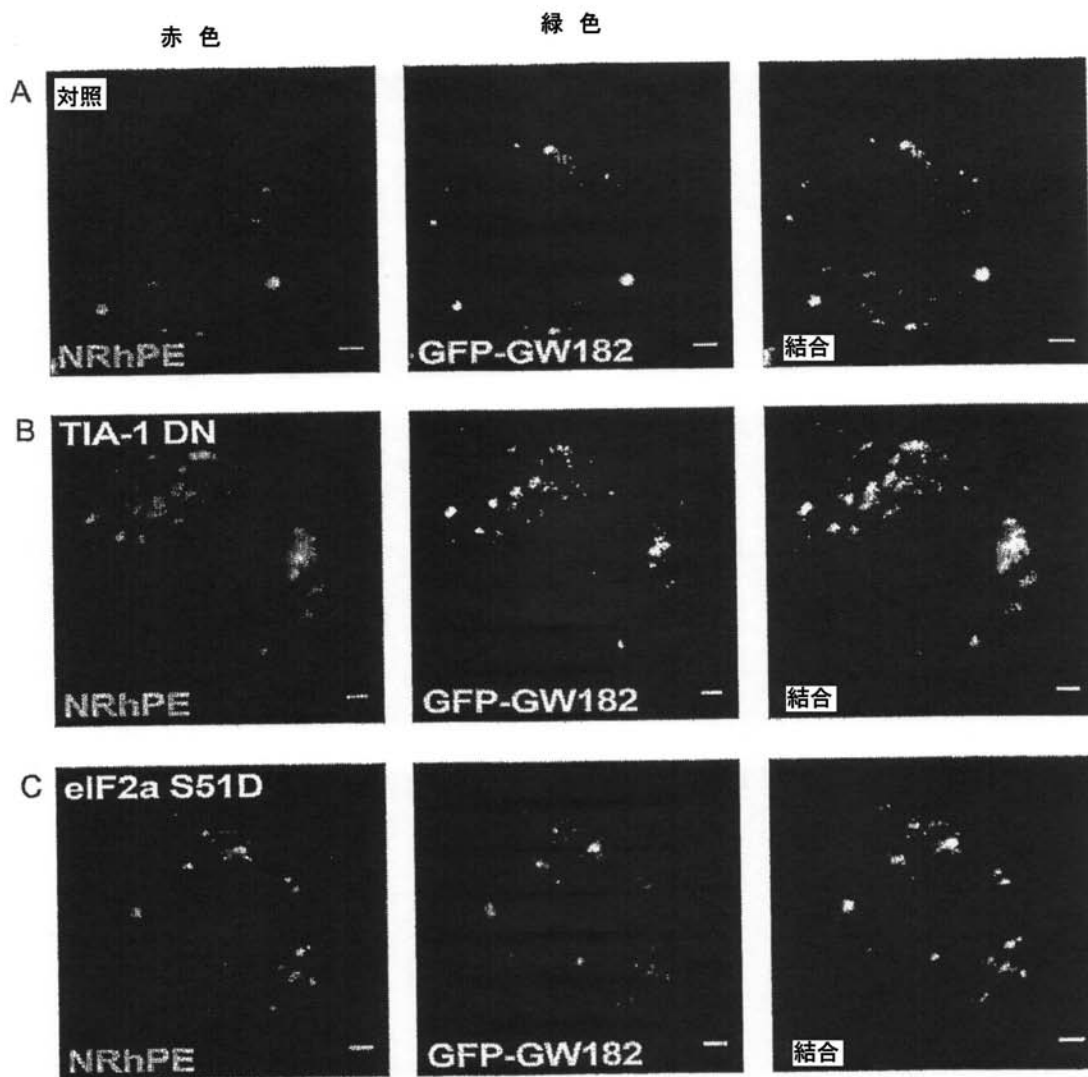


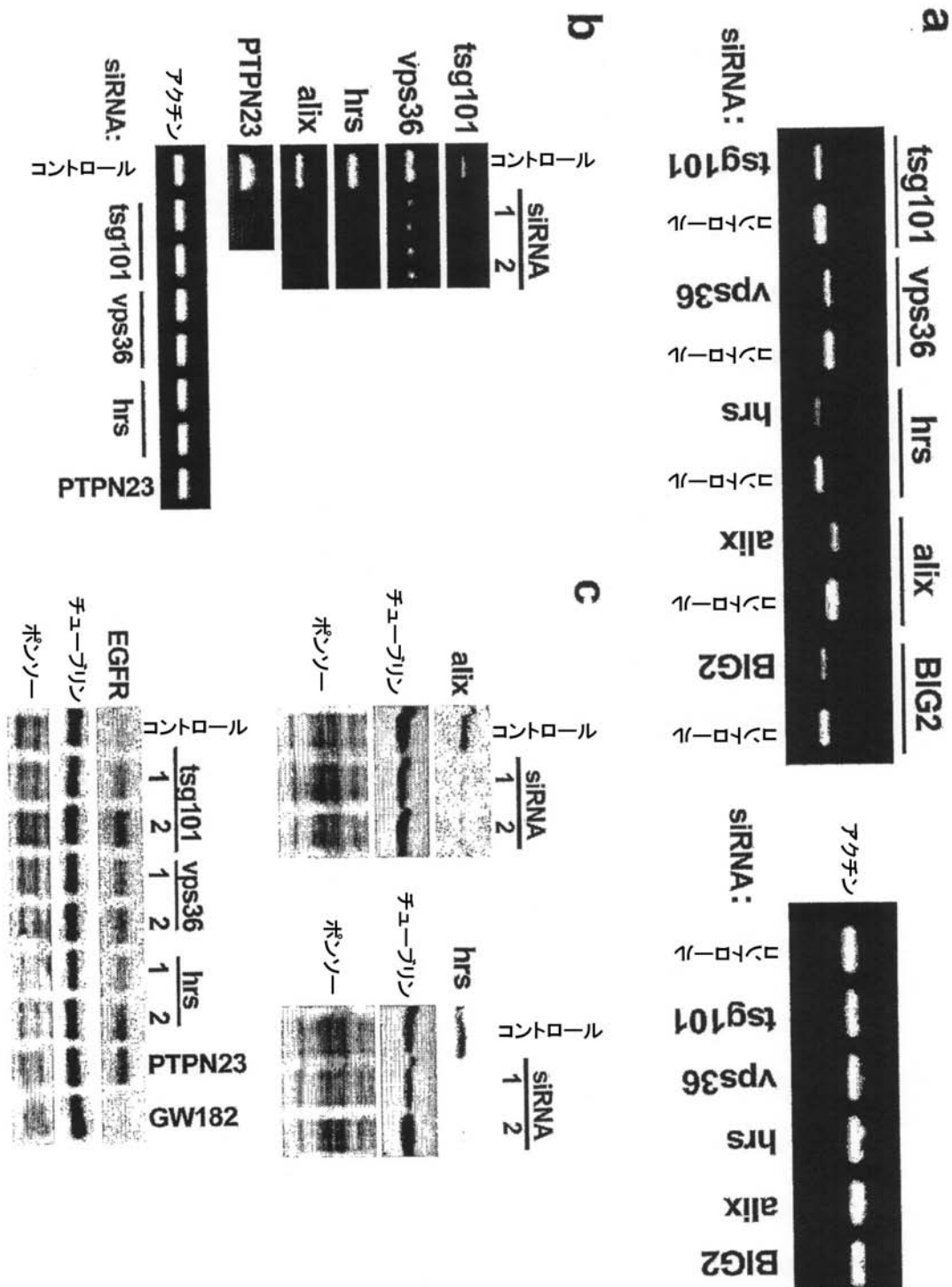
【図 16 - 2】



(続き)

【 図 1 7 】

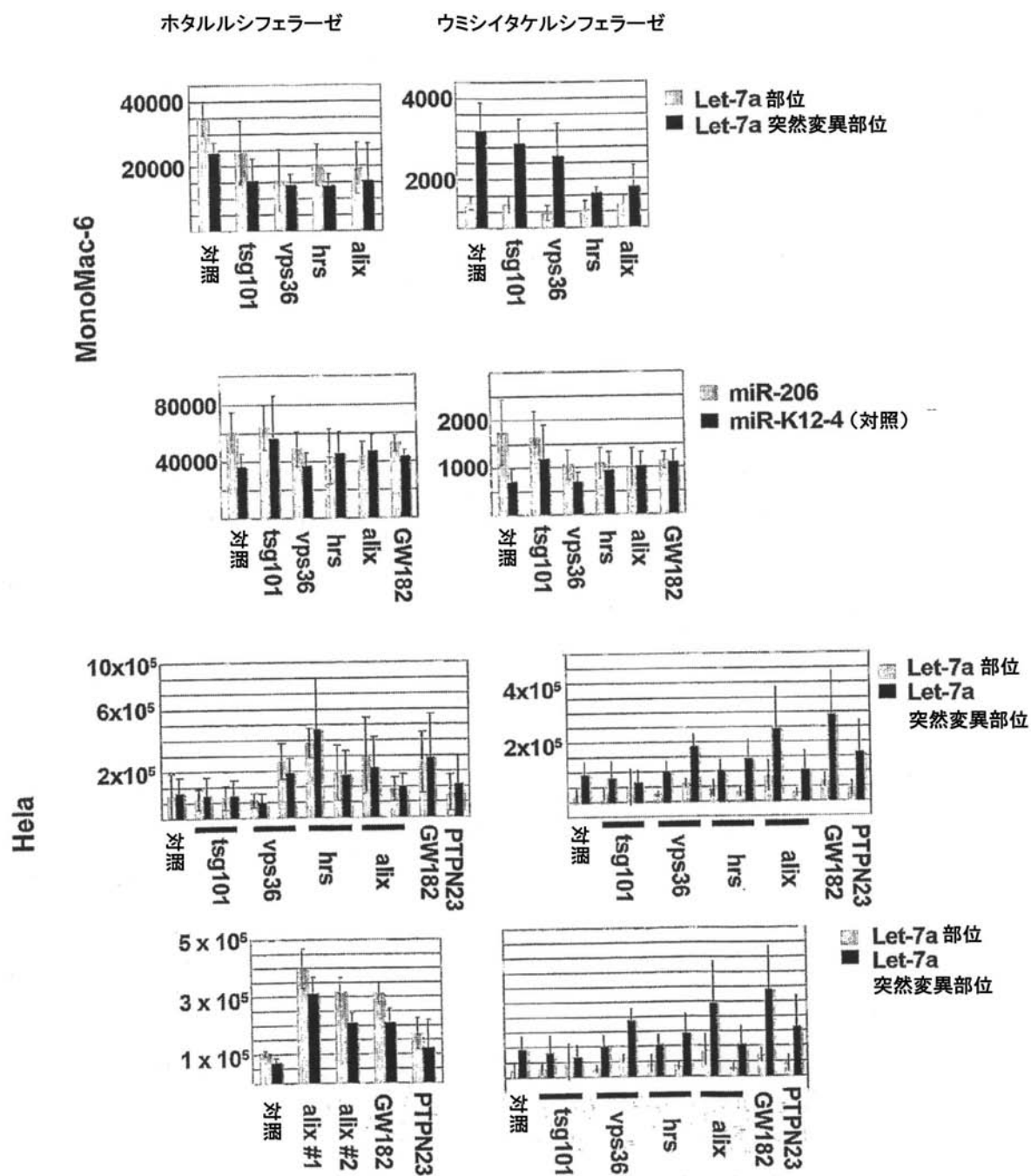




【図 19】

遺伝子名	細胞 (平均)	微小胞 (平均)	比	miRNA	
SMAD1	3540	11706	7.6504	miR-26a	赤色
PLAG1	726	1799	4.8036	miR-26a	
TPM1	4065	10708	2.6988	miR-21	
GLCC11	1129	3120	1.3247	miR-21	
ACTA2	17257	34651	0.3258	miR-21	
CCND1	631	709	0.2624	[16-1]	
BTG2	664	1042	0.1375	hsa-miR-21	
VEGF	1607	674	-0.0452	[20a]/[20b]/[93]/miR-16	
SERBP1	3244	547	-0.0496	[miR-26a]	
FAM3C	2478	1214	-0.0578	miR-21	
E2F1	1503	1247	-0.1388	miR-20a/[20a]/[93]	
PDCD4	706	348	-0.1623	miR-21	
HMGA2	440	65	-0.1650	let-7a	
CCND1	1656	1614	-0.1656	[16-1]	
FAM3C	1572	973	-0.1727	miR-21	
SOC55	1597	27	-0.2338	miR-21	
HMGA2	1147	31	-0.4062	let-7a	
KRAS	1145	72	-0.4220	let-7a	
RP2	2473	131	-0.4617	miR-21	
VEGF	526	261	-0.5299	[20a]/[20b]/[93]/miR-16	
CFL2	2905	30	-0.5467	miR-16	緑色
SERBP1	9585	7525	-0.6672	[miR-26a]	
FAM3C	8881	2052	-0.6790	miR-21	
KRAS	3140	509	-0.7108	let-7a	
SP3	3814	272	-0.7210	[miR-27a]	
CGI-38	1317	1028	-0.7868	miR-16	
SERBP1	19223	15636	-0.8434	[miR-26a]	
SESN1	299	89	-0.8970	miR-21	
CDK6	509	238	-0.8978	miR-21	
CFL2	3629	536	-1.0180	miR-16	
CDK6	6505	462	-1.0287	miR-21	
TPM1	12051	7879	-1.0307	miR-21	
PDCD4	397	46	-1.0518	miR-21	
SP1	325	67	-1.3641	[miR-27a]	
SGK3	333	86	-1.4327	miR-21	
NFIB	1760	358	-1.4467	miR-21	
KRAS	573	71	-1.8748	let-7a	
SMAD1	3598	191	-2.0002	miR-26a	
CCND1	3453	912	-2.6113	[miR-16-1]	
BMPR2	448	60	-2.8130	miR-21	
SERBP1	8293	1868	-2.9226	[miR-26a]	
NRAS	916	138	-2.9549	let-7a	
BMPR2	586	228	-2.9767	miR-21	
BCL2	658	52	-5.3855	miR-15b/miR-16	
NFIB	774	380	-6.6727	miR-21	
GLCC11	663	36	-11.1893	miR-21	

【配列表】
2011524164000001.app



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/005878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALADI H. ET AL.: "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells" NATURE CELL BIOLOGY, vol. 9, no. 6, June 2007 (2007-06), pages 654-659, XP002546815 cited in the application the whole document	1,3,4, 12,20
P, X	WO 2009/015357 A (UNIV. LOUISVILLE RES. FOUND. [US]; TAYLOR D.D.; GERCEL-TAYLOR C.) 29 January 2009 (2009-01-29) the whole document	1,16
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 September 2009		01/10/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Macchia, Giovanni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/005878

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LOTVALL J. AND VALADI H.: "Cell to cell signalling via exosomes through esRNA" CELL ADHESION & MIGRATION, vol. 1, no. 3, 2007, pages 156-158, XP002546816 the whole document	
A	SMALHEISER NEIL R.: "Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system." BIOLOGY DIRECT, vol. 2, 2007, pages 35(1)-35(15), XP002546817 ISSN: 1745-6150 the whole document	
T	GIBBINGS DERRICK J. ET AL.: "Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity." NATURE CELL BIOLOGY, vol. 11, no. 9, September 2009 (2009-09), pages 1143-1149, XP002546818 ISSN: 1476-4679 the whole document	
T	LEE YOUNG SIK ET AL.: "Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking." NATURE CELL BIOLOGY, vol. 11, no. 9, September 2009 (2009-09), pages 1150-1156, XP002546819 ISSN: 1476-4679 the whole document	
T	SIOMI H. AND SIOMI M.C.: "RISC hitches onto endosome trafficking." NATURE CELL BIOLOGY, vol. 11, no. 9, September 2009 (2009-09), pages 1049-1051, XP002546820 ISSN: 1476-4679 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/005878

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009015357 A	29-01-2009	AU 2008279016 A1	29-01-2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
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 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 37/00	1 0 2	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ヴォワンヌ、オリビエール

フランス国 ストラスブール エフ - 6 7 0 0 0、リュ デ ジュイフ 2 5

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB20 CA25 CB01 CB03 CB07 DA14 FB02 FB03
 4B024 AA01 CA11 DA02 EA04 EA10
 4B063 QA01 QQ53 QR35 QS25 QS34
 4C084 AA01 AA19 BA46 NA13
 4C086 AA01 AA02 EA16

专利名称(译)	内溶酶体和分泌小泡 (外来体样) 在基于小分子RNA的治疗和诊断以及小分子RNA实验研究中的应用		
公开(公告)号	JP2011524164A	公开(公告)日	2011-09-01
申请号	JP2011512239	申请日	2009-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	伊格纳西奥中心纳尔多乌拉尔彩虹士余青TAFE麦克风保存NTT耶鲁ES		
申请(专利权)人(译)	全国中心李四拉Rushierushiyu青色TAFE麦克风 (保存NV ALE ES)		
[标]发明人	ギビングデルリック ヴォワンヌオリビエール		
发明人	ギビング、デルリック ヴォワンヌ、オリビエール		
IPC分类号	C12N15/113 C12Q1/68 A61K31/7105 A61K48/00 A61K38/00 A61K45/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 G01N37/00 C12N15/11		
CPC分类号	A61P3/00 C12N15/111 C12N2310/14 C12N2310/141 C12N2320/10 C12N2320/12 C12N2320/32		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.G C12Q1/68.A A61K31/7105 A61K48/00 A61K37/02 A61K45/00 G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA14 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/EA10 4B063/QA01 4B063/QQ53 4B063/QR35 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA01 4C084/AA19 4C084/BA46 4C084/NA13 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16		
代理人(译)	斋藤孝弘		
优先权	61/059354 2008-06-06 US 61/153324 2009-02-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及确定siRNA，miRNA或相关分子向靶器官或靶细胞递送的速率和/或效率的方法，试剂盒，RNA，小分子RNA如miRNA，siRNA和piRNA，mRNA或非编码RNA并且蛋白质或脂质的使用参与内溶酶体系统的形成以调节活性和/或细胞间迁移。其特别包括在用于确定用siRNA和/或miRNA治疗剂治疗的效率的方法中鉴定miRNA或siRNA治疗剂的靶标的方法，或者用于检查胎儿基因型和/或确定该病症特征的方法。

【 図 1 - 3 】

