

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2010年10月21日(21.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2010/119698 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 45/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/002764
- (22) 国際出願日: 2010年4月16日(16.04.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2009-099861 2009年4月16日(16.04.2009) JP  
特願 2009-140088 2009年6月11日(11.06.2009) JP  
特願 2009-270157 2009年11月27日(27.11.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人 慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 座間猛 (ZAMA, Takeru) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 齋藤康一郎 (SAITO, Koichiro) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 平沢晃 (HIRASAWA, Akira) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 稲垣康治 (INAGAKI, Koji) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: HEAD-AND-NECK TUMOR PROLIFERATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 頭頸部腫瘍増殖抑制剤

(57) Abstract: Disclosed are a novel head-and-neck tumor proliferation inhibitor, a novel head-and-neck tumor metastasis inhibitor, and a novel pharmaceutical composition for treating the head and the neck. The inhibitors and the pharmaceutical composition are characterized by utilizing an inhibitor of micro RNA of which the expression is increased in head-and-neck tumor and/or a promoter of micro RNA of which the expression is decreased in head-and-neck tumor. Preferred examples of micro RNA of which the expression is increased in head-and-neck tumor include miR-455-3p, miR-455-5p, miR-130b, miR-130b\*, miR-801, miR-196a, miR-21 and miR-31. Preferred examples of micro RNA of which the expression is decreased in head-and-neck tumor include miR-133b, miR-145 and miR-375.

(57) 要約: 本発明の目的は、新たな頭頸部腫瘍増殖抑制剤、頭頸部腫瘍転移抑制剤、及び、頭頸部治療用医薬組成物を提供することにある。本発明は、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び/又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を利用することを特徴とする。頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAとしては、miR-455-3p、miR-455-5p、miR-130b、miR-130b\*、miR-801、miR-196a、miR-21、miR-31を好適に例示することができ、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAとして、miR-133b、miR-145、miR-375を好適に例示することができる。



WO 2010/119698 A1

## 明 細 書

**発明の名称**：頭頸部腫瘍増殖抑制剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、概して、細胞生物学及び分子生物学の分野に関する。より詳細には、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA（microRNA；miRNA）の阻害物質、及び／又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍増殖抑制剤、頭頸部腫瘍転移抑制剤、並びに、頭頸部腫瘍治療用医薬組成物に関する。

### 背景技術

[0002] 頭頸部腫瘍は、耳、鼻、咽頭、喉頭、頸部あるいは口腔等にできる腫瘍であるが、特に悪性腫瘍は50歳以上の男性に多く、全悪性腫瘍の6%を占める。罹患率は年齢と共に高率となり、全世界では65万人以上が罹患し、そのうち35万人が原病死している。中でも喉頭がんは、頭頸部の悪性腫瘍においては最も多い疾患であり、年間死亡数の将来予測では、死亡者数が増加することが予測される（非特許文献1参照）。

[0003] 頭頸部腫瘍の診断は内視鏡検査及び各種画像検査（CT、MRI、PET等）を用いた病期診断と生検による組織診断によってなされ、これらをもとに良性腫瘍では根治可能な一次的摘出術が行われる一方、悪性腫瘍に対しては手術・放射線治療・化学療法が行われ、進行がんの場合はそれらを組み合わせる必要があるとされている。しかし、頭頸部腫瘍に対する手術は頭頸部、顔面を整容的に著しく損なう上、発声・嚥下等の身体的機能にも高度の影響を及ぼし、身体的・心理的に侵襲が大きく、それ故、患者のQOL（Quality of Life）の大幅な低下を来す。そしてこれらの治療を組み合わせたとしても、治療効果は決して高いとは言えず、進行がんでは5年生存率はわずか30%程度に留まっている（非特許文献2参照）。

[0004] マイクロRNAは細胞内に存在し、タンパクへの翻訳がなされない、長さ22塩基程度の1本鎖RNAである（非特許文献3参照）。1993年に線

虫において、2001年には脊椎動物でも発見され、種を越えて保存されている。現在、ヒトゲノム上には1000近くのマイクロRNAの存在が予測され、これまでに800以上のヒトマイクロRNAがクローニングされている。また、マイクロRNAは、ゲノム上のタンパク翻訳領域の30%に対し、mRNAに結合することで遺伝子制御を行っていると考えられており（非特許文献4参照）、それ故、マイクロRNAの機能破綻が各種の疾患を引き起こす可能性がある。以上の事実から、最近マイクロRNAを用いた遺伝子診断法、疾患の病型判定、予後予測あるいは医薬品開発が期待され、欧米では、マイクロRNAの機能解析と医療への応用が試みられている。また、がん・悪性腫瘍に関しても、その発症・進展に関しては、これまでがん遺伝子、がん抑制遺伝子の関与が知られているが、マイクロRNAによっても制御されることが明らかとなっており、腫瘍の発現、進行、転移のいずれの制御にも関わっているとされている。これらを用いたマイクロRNA医薬の開発はいくつか進められているものの（例えば、miR-34を利用した大腸がん細胞増殖抑制剤；特許文献1参照）、非常に立ち後れているという現状がある。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開2008-239596号公報

#### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：「がん・統計白書」、大島明ら、2004年6月発行、篠原出版新社

非特許文献2：Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(4): 489-501.

非特許文献3：Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. microRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer.* 2008; 122(5):969-977.

非特許文献4：Zeng Y, Yi R, Cullen BR. miRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(12):13744-13749.

ci2003; 100: 9779-9784.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明の課題は、新たな頭頸部腫瘍増殖抑制剤、頭頸部腫瘍転移抑制剤、及び、頭頸部治療用医薬組成物を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、これまでに、頭頸部腫瘍の1種である喉頭がんの組織に特異的に発現しているマイクロRNAを明らかにすべく、喉頭組織におけるマイクロRNAの発現プロファイルの構築を既に行っている（特願2008-243306号参照）。その結果、喉頭の非がん部である正常組織あるいは炎症組織と比較して、喉頭がん組織に特徴的な発現傾向を示すマイクロRNAを見出した。その中でも、miR-196aは非がん部と比較して特に顕著な発現の増加を認め、miR-133b及びmiR-375は、非がん部と比較して特に顕著な発現の低下を認めた。そこで、これらのマイクロRNAを、喉頭がんを含めた頭頸部腫瘍に対する新しい治療分子標的と考え、株化した頭頸部がん細胞として、喉頭がん細胞であるJHU011に加え、同じく頭頸部の重層扁平上皮がん細胞である2種類のがん細胞株（Ca9-22：口腔がん、SAS：舌がん）を用いて、前述のマイクロRNAの生物学的意義の解析を試みることにした。

- [0009] この解析の前提として、まず、Ca9-22ならびにSASにおける上記3種類のマイクロRNAの発現量を、喉頭の非がん組織をコントロールとして比較検討した（後述の参考例1参照）。その結果、Ca9-22では、miR-196aがコントロールと比較して約65倍に発現が増加しており、miR-133bはコントロールと比較して約64分の1に発現が低下していた。また、miR-375においては、発現が認められなかった。同様に、SASにおいても、miR-196aがコントロールと比較して、約88倍に発現が増加しており、miR-133b及びmiR-375はコントロールと比較して、各々約19分の1及び約148分の1に発現が低下していた。すなわち、miR-196aは、頭頸部腫瘍において発現が増

加するマイクロRNAであり、miR-133b及びmiR-375は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAであることが確認された。

[0010] 次いで、本発明者らは、前述の3種類の頭頸部がん細胞株及びF a D u細胞（下咽頭がん細胞株）の合計4種類の頭頸部がん細胞株に対して、miR-196a（頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA）の阻害物質や、miR-133bやmiR-375（頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNA）の模倣物質を導入したところ、前述の4種類の頭頸部がん細胞の増殖が抑制されること、及び、miR-196aの阻害物質を、頭頸部腫瘍モデルマウスに投与したところ腫瘍の増殖や転移が抑制されること等を見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、（1）頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び／又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍治療用医薬組成物や、（2）頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び／又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍増殖抑制剤や、（3）頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質が、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAのアンチセンス核酸であることを特徴とする上記（2）に記載の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や、（4）頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質が、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの模倣物質であることを特徴とする上記（2）又は（3）に記載の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や、（5）頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAが、miR-455-3p、miR-455-5p、miR-130b、miR-130b\*、miR-801、miR-196a、miR-21及びmiR-31からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであり、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAが、miR-133b、miR-145及びmiR-375からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであることを特徴とする上記（2）～（4）のいずれかに記載の頭頸部腫瘍増殖抑制剤に関する。

[0012] また、本発明は、(6) 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び/又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍転移抑制剤や、(7) 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質が、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAのアンチセンス核酸であることを特徴とする上記(6)に記載の頭頸部腫瘍転移抑制剤や、(8) 頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質が、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの模倣物質であることを特徴とする上記(6)又は(7)に記載の頭頸部腫瘍転移抑制剤や、(9) 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAが、miR-455-3p、miR-455-5p、miR-130b、miR-130b\*、miR-801、miR-196a、miR-21及びmiR-31からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであり、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAが、miR-133b、miR-145及びmiR-375からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであることを特徴とする上記(6)～(8)のいずれかに記載の頭頸部腫瘍転移抑制剤に関する。

### 発明の効果

[0013] 本発明によれば、頭頸部腫瘍に対して増殖抑制効果を示す、頭頸部腫瘍増殖抑制剤、頭頸部腫瘍に対して転移抑制効果を示す、頭頸部腫瘍転移抑制剤、及び、頭頸部腫瘍治療用医薬組成物等を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0014] [図1] 図1A: JHU-011細胞に、INHNC(ネガティブコントロール)又はINH196a(miR-196aのアンチセンス配列からなるRNA)をトランスフェクションした後、培養し、培養3日目と5日目に細胞数を測定した結果を示す。なお、白丸でドットしたグラフはINHNCの結果を示し、黒丸でドットしたグラフはINH196aの結果を示す。図1Bの左パネル: JHU-011細胞に、INHNC又はINH196aをトランスフェクションした後、3日培養した細胞の生細胞由来プロテアーゼの相対活性を示す図である。なお、パネル中の左の棒グラフはINHNC群の結果を

示し、右の棒グラフはINH 196 a群の結果を示す。図1Bの右パネル：JHU-011細胞に、INH NC又はINH 196 aをトランスフェクションした後、3日培養した細胞の死細胞由来プロテアーゼの相対活性を示す図である。なお、パネル中の左の棒グラフはINH NC群の結果を示し、右の棒グラフはINH 196 a群の結果を示す。図1Cの左パネル：JHU-011細胞に、INH NCをトランスフェクションした後、3日培養した細胞をHoechst染色し、それを蛍光顕微鏡で観察した様子を示す図である。図1Cの右パネル：JHU-011細胞に、INH 196 aをトランスフェクションした後、3日培養した細胞をHoechst染色し、それを蛍光顕微鏡で観察した様子を示す図である。

[図2] 図2の左パネル：JHU-011細胞に、MIM NC（ネガティブコントロール）をトランスフェクションした後、5日培養した細胞をHoechst染色し、それを蛍光顕微鏡で観察した様子を示す図である。図2の右パネル：JHU-011細胞に、MIM 375（miR-375の模倣遺伝子）をトランスフェクションした後、5日培養した細胞をHoechst染色し、それを蛍光顕微鏡で観察した様子を示す図である。

[図3] 図3Aの左パネル：がん細胞の移植から9週間後におけるINH NC投与群のマウスの腫瘍の外観を示す図である。この図では、中心に壊死を伴う腫瘍の増大が認められた。図3Aの右パネル：がん細胞の移植から9週間後におけるINH 196 a投与群のマウスの腫瘍の外観を示す図である。図3B：頭頸部腫瘍モデルマウスに、INH 196 aを投与した群、又は、INH NCを投与した群における、相対腫瘍体積（%）の推移を示す図である。なお、ここでいう相対腫瘍体積（%）とは、マウスへのがん細胞の移植から1週間後における各群の腫瘍体積の平均値を100%としたときの、各群の相対腫瘍体積（%）の平均値をいう。また、白丸でドットしたグラフはINH NC群の結果を示し、黒丸でドットしたグラフはINH 196 aの結果を示す。

[図4] 図3の実験における両群の頭頸部腫瘍モデルマウス（移植から3ヶ月後

) の腫瘍組織から作製した組織切片について、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) を行った結果を示す図である。図 4 A 及び B は、INH 196 a 投与群の結果を示し、図 4 C 及び D は、INH NC 投与群の結果を示す。

[図5] 図 5 A ~ D : 図 3 の実験における両群の頭頸部腫瘍モデルマウス (移植から 3 ヶ月後) の頸部リンパ節組織から作製した組織切片について、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) を行った結果を示す図である。図 5 A 及び B は、INH 196 a 投与群の結果を示し、図 5 C 及び D は、INH NC 投与群の結果を示す。図 5 E : 図 3 の実験における両群の頭頸部腫瘍モデルマウス (移植から 3 ヶ月後) から摘出した頸部リンパ節における転移の有無の割合を示す。なお、左の棒グラフは INH NC 投与群の結果を示し、右の棒グラフは INH 196 a 投与群の結果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0015] 本発明の頭頸部腫瘍治療用医薬組成物や、頭頸部腫瘍増殖抑制剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤としては、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA の阻害物質 (以下、「本発明における阻害物質」ともいう)、及び/又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNA の促進物質 (以下、「本発明における促進物質」ともいう) を含有している限り特に制限されず、上記の「頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA」としては、miR-455-3p (マイクロRNA-455-3p) (配列番号 1)、miR-455-5p (マイクロRNA-455-5p) (配列番号 2)、miR-130b (マイクロRNA-130b) (配列番号 3)、miR-130b\* (マイクロRNA-130b\*) (配列番号 4)、miR-801 (マイクロRNA-801) (配列番号 5)、miR-196a (マイクロRNA-196a) (配列番号 6)、miR-21 (マイクロRNA-21) (配列番号 7) 及び miR-31 (マイクロRNA-31) (配列番号 8) を好適に例示することができ、中でも、miR-196a をより好適に例示することができ、上記の「頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNA」としては、miR-133b (マイクロRNA-133b) (配列番号 9)、miR-145 (マイクロRNA-145) (配列番号 10) 及び miR-375



(マイクロRNA-375) (配列番号 11) を好適に例示することができ、中でもmiR-133b及びmiR-375をより好適に例示することができる。後述の実施例の結果から明らかなように、本発明における阻害物質や促進物質は、頭頸部腫瘍の増殖抑制効果や転移抑制効果を有しているため、頭頸部腫瘍治療用医薬組成物や頭頸部腫瘍増殖抑制剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤として使用することができる。なおmiR-455-3p、miR-455-5p、miR-130b、miR-130b\*、miR-801、miR-196a、miR-21及びmiR-31の発現が頭頸部腫瘍において増加していること、並びに、miR-133b、miR-145及びmiR-375の発現が頭頸部腫瘍において低下していることは、前述の特願2008-243306号にも開示されている。

[0016] 上記の「頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA」とは、頭頸部の正常組織等の非がん組織における発現と比較して、頭頸部腫瘍において発現が増加しているマイクロRNAを意味し、上記の「頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNA」とは、頭頸部の正常組織等の非がん組織における発現と比較して、頭頸部において発現が低下しているマイクロRNAを意味する。なお、ある特定のマイクロRNAが、頭頸部の正常組織等の非がん組織における発現と比較して、頭頸部腫瘍において発現が増加するか又は低下するかは、後述の参考例1や、前述の特願2008-243306号の出願明細書に開示された方法（マイクロアレイ法や定量PCR法）により確認することができる。また、本明細書における「頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA」としては、「頭頸部腫瘍において特異的に発現が増加するマイクロRNA」であることが好ましく、本明細書における「頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNA」としては、「頭頸部腫瘍において特異的に発現が低下するマイクロRNA」であることが好ましい。

[0017] また、上記の「頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質」とは、かかるマイクロRNAに直接的若しくは間接的に結合するか、又は、かかるマイクロRNAを直接的又は間接的に分解することによって、かかるマイクロRNAの作用を阻害する物質を意味する。かかる本発明にお

ける阻害物質の好ましい例としては、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAに直接的に結合することによって、かかるマイクロRNAの作用を阻害する物質を挙げることができ、中でも、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAに直接的に結合することによって、かかるマイクロRNAの作用を阻害する核酸を好適に挙げることができ、中でも、かかるマイクロRNAに対するアンチセンス核酸をより好適に挙げることができ、中でも、かかるマイクロRNAに対するアンチセンスDNAやRNAをさらに好適に挙げることができ、中でも、配列番号1に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-455-3pのアンチセンスRNA）、配列番号2に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-455-5pのアンチセンスRNA）、配列番号3に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-130bのアンチセンスRNA）、配列番号4に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-130b\*のアンチセンスRNA）、配列番号5に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-801のアンチセンスRNA）、配列番号6に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-196aのアンチセンスRNA）、配列番号7に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-21のアンチセンスRNA）、配列番号8に示される配列のアンチセンス配列からなるRNA（miR-31のアンチセンスRNA）をさらにより好適に挙げることができ、中でも、miR-196aのアンチセンスRNAを特に好適に挙げることができる。なお、上記の本発明における阻害物質としては、頭頸部腫瘍において発現が増加する1種のマイクロRNAの阻害物質を用いてもよいが、頭頸部腫瘍増殖抑制効果や頭頸部腫瘍転移抑制効果をより確実に得たり、より多く得る観点から、頭頸部腫瘍において発現が増加する2種以上のマイクロRNAの阻害物質を併用することが好ましい。また、頭頸部腫瘍増殖抑制効果に着目した頭頸部腫瘍増殖抑制剤と、頭頸部腫瘍転移抑制効果に着目した頭頸部腫瘍転移抑制剤とで、用いるマイクロRNAの阻害物質は異なってもよい。

[0018] 上記の「かかるマイクロRNAの作用を阻害する物質」であるかどうかは

、例えば、後述の実施例 1 における頭頸部扁平上皮がん細胞株の増殖アッセイにおいて、その物質をいずれかの頭頸部扁平上皮がん細胞株にトランスフェクション等により導入した場合に、細胞増殖抑制効果が認められるかどうかや、後述の実施例 2 における頭頸部腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* 増殖アッセイにおいて、その物質を頭頸部腫瘍モデルマウスの腫瘍形成部に接種した場合に、腫瘍増殖抑制効果が認められるかどうかを調べることによって判別することができる。

[0019] 上記の「頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロ RNA の促進物質」とは、かかるマイクロ RNA に直接的若しくは間接的に結合することによって、かかるマイクロ RNA の作用を上昇させる物質か、又は、かかるマイクロ RNA の模倣物質を意味する。かかるマイクロ RNA の模倣物質とは、マイクロ RNA のヌクレオチド配列において 1 若しくは 2 個以上のヌクレオチドが欠失、置換、若しくは付加された RNA を含み、かつ、頭頸部腫瘍増殖抑制効果や頭頸部腫瘍転移抑制効果を有する物質を意味し、便宜上、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロ RNA 自身も含む趣旨である。かかる本発明における促進物質の好ましい例としては、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロ RNA の模倣物質を挙げることができ、中でも、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロ RNA を模倣した核酸を好適に挙げることができ、中でも、かかる RNA 自身を含む物質をより好適に挙げることができ、中でも、かかる RNA とそれに相補的な RNA 配列とからなる二重鎖 RNA をさらに好適に挙げることができ、中でも、miR-133b の RNA 配列（配列番号 9）とそれに相補的な RNA 配列とからなる二重鎖 RNA、miR-145 の RNA 配列（配列番号 10）とそれに相補的な RNA 配列とからなる二重鎖 RNA、miR-375 の RNA 配列（配列番号 11）とそれに相補的な RNA 配列とからなる二重鎖 RNA をさらに好適に挙げることができ、中でも、miR-375 の RNA 配列とそれに相補的な RNA 配列とからなる二重鎖 RNA を特に好適に挙げることができる。なお、上記の本発明における促進物質としては、頭頸部腫瘍において発現が低下する 1 種のマイクロ RNA の促進物質

を用いてもよいが、頭頸部腫瘍増殖抑制効果や頭頸部腫瘍転移抑制効果をより確実に得たり、より多く得る観点から、頭頸部腫瘍において発現が低下する2種以上のマイクロRNAの阻害物質を併用することが好ましい。また、頭頸部腫瘍増殖抑制効果に着目した頭頸部腫瘍増殖抑制剤と、頭頸部腫瘍転移抑制効果に着目した頭頸部腫瘍転移抑制剤とで、用いるマイクロRNAの促進物質は異なってもよい。

[0020] 本発明における阻害物質や促進物質の頭頸部腫瘍増殖抑制効果の程度としては、特に制限されないが、後述の実施例1における頭頸部扁平上皮がん細胞株の増殖アッセイにおいて、いずれかの頭頸部扁平上皮がん細胞株において、10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上の細胞増殖抑制効果を好適に例示することができる。また、後述の実施例2における頭頸部腫瘍モデルマウスを用いたin vivo増殖アッセイにおいて、がん細胞の移植から12週間後における相対腫瘍体積(%)が、ネガティブコントロール投与群の相対腫瘍体積(%)に対して割合として50%以下、好ましくは35%以下、より好ましくは25%以下、さらに好ましくは20%以下の頭頸部腫瘍増殖抑制効果を好適に例示することができる。また、本発明における阻害物質や促進物質の頭頸部腫瘍転移抑制効果の程度としては、特に制限されないが、後述の実施例4のリンパ節組織の病理学的観察において、頸部リンパ節への転移が生じない程度の頭頸部腫瘍転移抑制効果を好適に例示することができる。

[0021] 本明細書中のマイクロRNAの由来となる生物としては、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、サル、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等の哺乳動物を好適に例示ことができ、中でもヒト、マウスをより好適に例示ことができ、特にヒトを好適に例示することができる。なお、前述の配列番号1~11の配列は全てヒト由来のマイクロRNAである。また、マイクロRNAの配列は特に哺乳動物間では保存性が高く、上記のマイクロRNAはヒト以外の哺乳動物においてもヒトと同様の発現プロファイルを示すと考えられる。また、ヒト以外の上記の各生物か

らのマイクロRNAの配列は、GenBank等のデータベースに登録されている情報に基づいて確認又は特定することができる。

[0022] また、本明細書における「頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNA」には、かかるマイクロRNAのヌクレオチド配列において、1若しくは2個以上のヌクレオチドが欠失、置換、若しくは付加されたRNAからなり、かつ、頭頸部の正常組織等の非がん組織と比較して、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAが便宜上含まれる。また、本明細書における「頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNA」には、かかるマイクロRNAのヌクレオチド配列において、1若しくは2個以上のヌクレオチドが欠失、置換、若しくは付加されたRNAからなり、かつ、頭頸部の正常組織等の非がん組織と比較して、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAが便宜上含まれる。上記の「1若しくは2個以上」としては、1～5個が好ましく、1～3個がより好ましく、1～2個が特に好ましく、1個がさらに好ましい。なお、上記の欠失等されたヌクレオチド配列からなるRNAが、頭頸部の正常組織等の非がん組織と比較して、頭頸部腫瘍組織において発現が増加するか又は低下するかは、例えば後述のマイクロアレイ法や定量PCR法により容易に確認することができる。

[0023] 本発明の頭頸部腫瘍増殖抑制剤は、所望の頭頸部腫瘍増殖抑制効果を有している限り、本発明における阻害物質及び／又は促進物質の他に、他の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や抗がん剤等の任意成分を含んでいてもよい。また、頭頸部腫瘍転移抑制剤は、所望の頭頸部腫瘍転移抑制効果を有している限り、本発明における阻害物質及び／又は促進物質の他に、他の頭頸部腫瘍転移抑制剤等の任意成分を含んでいてもよい。さらに、頭頸部腫瘍治療用医薬組成物は、所望の頭頸部腫瘍増殖抑制効果及び／又は頭頸部腫瘍転移抑制効果を有している限り、本発明における阻害物質及び／又は促進物質の他に、他の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や抗がん剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤等の任意成分を含んでいてもよい。なお、本発明の頭頸部腫瘍抑制剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤や頭頸部腫瘍治療用医薬組成物には、本発明における阻害物質と本発明におけ

る促進物質を両方含んでいてもよい。また、頭頸部腫瘍治療用医薬組成物には、頭頸部腫瘍増殖抑制効果に優れた本発明における阻害物質及び／又は本発明における促進物質と、頭頸部腫瘍転移抑制効果に優れた本発明における阻害物質及び／又は本発明における促進物質とを併せて含有することが、より優れた頭頸部腫瘍治療効果を得る観点から好ましい。

[0024] 本発明の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤や頭頸部腫瘍治療用医薬組成物に含有される本発明における阻害物質や促進物質は、常法によって適宜の製剤とすることができる。製剤の剤型としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、優れた頭頸部腫瘍増殖抑制効果や頭頸部腫瘍転移抑制効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。前述の液剤の製造方法としては、例えば本発明における阻害物質や促進物質を溶剤と混合する方法や、さらに懸濁化剤や乳化剤を混合する方法を好適に例示することができる。以上のように、本発明における阻害物質や促進物質を製剤とする場合には、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤、吸着剤、甘味剤、希釈剤などの任意成分を配合することができる。

[0025] また、本発明における阻害物質や促進物質が核酸、特にアンチセンスRNAや二重鎖RNAである場合は、RNA等の核酸用のキャリアーを用いることが好ましく、かかるキャリアーとしては、アテロコラーゲン（前述の特許文献1参照）や、コレステロール分子（NATURE, Vol 438, 1 December 2005, p685-689; NATURE, Vol 452, 17, April 2008, p896-900参照）を好適に例示することができる。これらのキャリアーを用いて、本発明における阻害物質や促進物質を静脈内注射するなどすれば、本発明における阻害物質や促進物質を頭頸部腫瘍組織の細胞内にまで輸送することができる。

[0026] 本発明の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤や頭頸部腫瘍治療用医薬組成物の投与方法としては、所望の頭頸部腫瘍増殖抑制効果や所望の

頭頸部腫瘍転移抑制効果が得られる限り特に制限されず、静脈内注射による投与や、頭頸部腫瘍部分又はその周辺部分への注射による投与等を例示することができる。また、本発明の頭頸部腫瘍増殖抑制剤や頭頸部腫瘍転移抑制剤や頭頸部腫瘍治療用医薬組成物の投与量や投与回数や投与濃度は、投与対象の頭頸部腫瘍の状態や投与対象の体重等に応じて、適宜調節することができる。

[0027] 本明細書中の「頭頸部腫瘍」の種類としては、頭頸部がん（初発又は再発）、頭頸部異形成、頭頸部ポリープを例示することができ、頭頸部がん（初発又は再発）、頭頸部異形成を好適に例示することができ、頭頸部がん（初発又は再発）をより好適に例示することができ、初発の頭頸部がんをさらに好適に例示することができる。また、本明細書中の頭頸部腫瘍における頭頸部としては、口唇・口腔、鼻・副鼻腔、唾液腺、耳・側頭骨、頭蓋底等の頭部や、咽頭、喉頭、食道、甲状腺等の頸部を挙げることができるが、頸部を好適に例示することができ、中でも喉頭をより好適に例示することができる。頭頸部の腫瘍は、多くの場合、喉頭がん同様その組織型が扁平上皮細胞由来と考えられるため、本発明における阻害物質や促進物質は、喉頭がんや口腔がん以外の頭頸部腫瘍に対しても、増殖抑制剤や転移抑制剤や治療用医薬組成物として使用することができる。なお、本発明における特定の阻害物質や特定の促進物質は、すべての頭頸部腫瘍に対して増殖抑制効果や転移抑制効果を示すとは限らないが、多くの頭頸部腫瘍に対して増殖抑制効果や転移抑制効果を示す。したがって、本発明における阻害物質や促進物質の中から、増殖抑制のターゲットである頭頸部腫瘍に対して増殖抑制効果や転移抑制効果を示すものを適宜選択することにより、その頭頸部腫瘍に対する増殖抑制剤や転移抑制剤や治療用医薬組成物を容易に作製することができる。

[0028] また、本発明には、「本発明における阻害物質及び／又は促進物質を哺乳動物に投与する工程を含む頭頸部腫瘍増殖抑制方法」や、「本発明における阻害物質及び／又は促進物質を哺乳動物に投与する工程を含む頭頸部腫瘍転移抑制方法」や、「本発明における阻害物質及び／又は促進物質を哺乳動物

に投与する工程を含む頭頸部腫瘍の予防・治療方法」や、「頭頸部腫瘍増殖抑制剤、頭頸部腫瘍転移抑制剤又は頭頸部腫瘍治療用医薬組成物の製造における、本発明における阻害物質及び／又は促進物質の使用」や、「頭頸部腫瘍増殖抑制又は頭頸部腫瘍転移抑制における、本発明における阻害物質及び／又は促進物質の使用」や、「頭頸部腫瘍の治療における、本発明における阻害物質及び／又は促進物質の使用」も含まれる。

[0029] [参考例 1]

[頭頸部扁平上皮がん細胞株におけるマイクロRNAの発現解析]

後述の実施例 1 記載の増殖アッセイの前提として、その増殖アッセイに用いる頭頸部扁平上皮がん細胞株につき、miR-196a、miR-133b、miR-375の3種類のマイクロRNAに関する発現解析を行なった。具体的には、以下のような方法で行なった。

[0030] まず、頭頸部腫瘍の1種である頭頸部扁平上皮がん細胞株として、Ca9-22（口腔がん細胞株）、SAS（舌がん細胞株）、JHU-011（喉頭がん細胞株）の3種類を用意した。次いで、mirVana miRNA Isolation Kit（Applied Biosystems社製）を添付のプロトコールにしたがって用いて、前述の各細胞から、マイクロRNAを含むトータルRNAを抽出した。抽出した各トータルRNA及びTaqMan（登録商標）MicroRNA Assays（Applied Biosystems社製）を用いて、リアルタイムPCR法により、miR-196a、miR-133b、miR-375の発現量の定量を行なった。定量の方法は、添付のプロトコールに記載の方法にしたがった。リアルタイムPCRに用いたTaqMan probeとしては、miR-196a、miR-133b、miR-375につき、それぞれPart Number 4373104、4373172、4373027のプローブ（Applied Biosystems社製）を用いた。コントロールとして、喉頭の非がん組織由来のトータルRNAについても、同様の方法により、miR-196a、miR-133b、miR-375の発現量の定量を行なった。その結果、Ca9-22では、miR-196aがコントロールと比較して約65倍に発現が増加しており、miR-133bはコントロールと比較して約64分の1に発現が低下していた。また、miR-375においては、発現が認められなかった。同様に



、S A Sにおいても、miR-196aがコントロールと比較して、約88倍に発現が増加しており、miR-133b及びmiR-375はコントロールと比較して、各々約19分の1及び約148分の1に発現が低下していた。すなわち、miR-196aは、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAであり、miR-133b及びmiR-375は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAであることが確認された。この結果は、特願2008-243306号で確認された結果と同様であった。

### 実施例 1

#### [0031] [頭頸部扁平上皮がん細胞株の増殖アッセイ]

頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質や、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質について、頭頸部腫瘍の増殖抑制効果を調べるために、頭頸部扁平上皮がん細胞株の増殖アッセイを行なった。具体的には以下のような方法を用いた。

[0032] まず、頭頸部扁平上皮がん細胞株で発現が増加傾向を示したmiR-196aに対しては、かかるマイクロRNAの阻害物質として、miR-196aのRNA配列（配列番号6）に相補的な配列（miR-196aのアンチセンス配列）からなるRNA（INH 196a、dharmacon社製）を用いた。また、頭頸部扁平上皮がん細胞株で発現が減少傾向を示したmiR-133bやmiR-375に対しては、かかるマイクロRNAの促進物質として、それぞれのマイクロRNAの模倣核酸、すなわち、miR-133bについては、miR-133bのRNA配列（配列番号9）とそれに相補的なRNA配列とからなる二重鎖RNA（MIM 133b、dharmacon社製）を、miR-375については、miR-375のRNA配列（配列番号11）とそれに相補的なRNA配列とからなる二重鎖RNA（MIM 375、dharmacon社製）を用いた。また、ネガティブコントロールとしては、ヒト、マウス、ラットの既知のマイクロRNAと相同でない*C. elegans*由来の配列を用い、阻害物質のネガティブコントロール（INH NC、dharmacon社製）、ならびに模倣物質のネガティブコントロール（MIM NC、dharmacon社製）を用意した。

[0033] JHU-011細胞に対して、24wellプレートに1ウェルあたり20,000個の細胞をまき、その翌日、INH 196aあるいはINH NCをトランスフェクションした。その後、5日間の培養において、3日目と5日目に0.4%トライパンプルー染色し、細胞数をCountess（登録商標、Invitrogen社製）にて測定した。結果、培養5日目の時点で、INH 196a群では細胞数 $22.67 \pm 3.06 \times 10^4$ 個/mlであったのに対し、INH NC群では細胞数 $44.33 \pm 6.66 \times 10^4$ 個/mlであり、INH 196a群では、INH NC群と比較して、細胞数の増殖が有意に抑制されていた（t検定にて、 $p < 0.01$ ）（図1A）。

[0034] 次に、これらに関しては、生細胞数と死細胞数を同時に評価するために、MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay（Promega社製）を用いて各々の相対的細胞数を評価した。このアッセイは、異なる2つのプロテアーゼである、生細胞由来プロテアーゼならびに死細胞由来プロテアーゼの活性を測定することで、各々生細胞数と死細胞数を同一ウェル内で測定する手法である。生細胞由来プロテアーゼはインタクトな生細胞内に限定されるため、このアッセイにおける細胞透過性のペプチド基質GF-AFCが生存細胞を透過し切断される際、生細胞数に比例した蛍光シグナルを生じることを利用して検出できる。また、死細胞由来プロテアーゼは、細胞膜に損傷を受けた細胞から漏出され、培地中でも活性を有するため、細胞非透過性蛍光ペプチドAAFR110を基質に用いることで、蛍光法により死細胞数に比例したシグナルとして検出できる。具体的には、JHU-011細胞に対して、96wellプレートに1ウェルあたり5,000個の細胞をまき、その翌日、INH 196aあるいはINH NCをトランスフェクションした。3日後、上記生細胞由来プロテアーゼと死細胞由来プロテアーゼの各々の活性を測定し、INH NCをトランスフェクションした細胞由来の蛍光度の平均値を1として、生細胞および死細胞数の蛍光シグナルの相対値を算出した。結果、INH NCをトランスフェクションした場合と比較して、INH 196aをトランスフェクションした場合において、生細胞数の抑制（INH NC群

:  $1 \pm 0.019$ 、INH 196 a群:  $0.584 \pm 0.029$ 、t検定で  $p < 0.01$ ) と、死細胞数の促進 (INH NC群:  $1 \pm 0.025$ 、INH 196 a群:  $1.692 \pm 0.059$ 、t検定で  $p < 0.01$ ) を認めた (図1B)。

[0035] Ca9-22細胞に対して、96wellプレートに5,000個の細胞をまき、その翌日、INH 196 a、MIM 133 b、MIM 375、INH NC、MIM NCを常法にしたがって、それぞれ5 pmolをトランスフェクションした。その後、それらの各細胞を5日間培養し、それらの各細胞数を計測した。培養後の細胞数の測定は、WSTアッセイを利用し、細胞内酵素 (ミトコンドリアデヒドロゲナーゼ) の酵素活性を指標として間接的に評価することにより行なった。Ca9-22細胞における増殖アッセイの結果、INH 196 aをトランスフェクションした場合については、INH NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数はほとんど変わらなかったものの、MIM 133 bやMIM 375をトランスフェクションした場合については、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数は減少傾向にあり、特にMIM 375をトランスフェクションした場合は、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数が42.1% (t検定にて、 $p < 0.01$ ) も減少していた。

[0036] また、SAS細胞に対しても同様の増殖アッセイを行なった結果、INH 196 aをトランスフェクションした場合については、INH NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数はほとんど変わらず、また、MIM 375をトランスフェクションした場合については、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数はほとんど変わらなかったものの、MIM 133 bをトランスフェクションした場合については、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数が35.1% (t検定にて、 $p < 0.01$ ) も減少していた。

[0037] さらに、JHU-011細胞に対しても同様の増殖アッセイを行なった結

果、INH 196 aをトランスフェクションした場合については、INH NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数が20.0%も減少していた。また、MIM 133 bやMIM 375をトランスフェクションした場合については、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数は減少傾向にあり、特にMIM 375をトランスフェクションした場合は、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、培養後の細胞数が29.2%も減少していた。

[0038] なお、JHU-011細胞に関しては、細胞の増殖抑制効果を別の手法でも確認するために、INH 196 a、MIM 375、INH NC、MIM NCをトランスフェクションした後、Hoechst染色し、それらを蛍光顕微鏡で観察した。Hoechst染色は蛍光色素であるHoechstが核の二重鎖DNAに結合し、紫外線波長で励起されることにより青色の蛍光を発することを利用した染色法であり、これにより細胞数を直接視認することができる点で、細胞数を間接的に評価するWSTアッセイよりも精度は高い。このHoechst染色によると、INH 196 aあるいはMIM 375をトランスフェクションした場合の、各々3日後（図1C）、5日後（図2）の細胞増殖抑制効果は、WSTアッセイの結果から算出した細胞増殖抑制効果に一致した結果となっていた。

[0039] そこで、この手法を利用して、細胞増殖抑制効果の定量化を以下のように行なった。まず、Ca9-22細胞、SAS細胞、JHU-011細胞に加え、扁平上皮がん細胞株であるFadu細胞（下咽頭がん細胞株）をスライドガラス（BD BioCoat（登録商標）、BD Falcon社製）上で培養し、24時間後、Lipofectamine（登録商標）2000（Invitrogen社製）を用いて、INH 196 a、MIM 133 b、MIM 375、コントロールとしてINH NC、MIM NCをそれぞれトランスフェクションした。その後、3日間培養し、核染色をHoechst33258にて行い、鏡検像の細胞染色領域を、画像解析ソフト（Image-Pro Plus（登録商標））を用いて計測した。結果、Ca9-22細胞において、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、

MIM 375をトランスフェクションすることで40.3%の細胞数減少をみた。また、SAS細胞においては、MIM NCをトランスフェクションした場合と比較して、MIM 133bをトランスフェクションすることで23.1%の細胞数減少をみた。さらに、JHU-011細胞ならびにFaDu細胞においては、コントロールをトランスフェクションした場合と比較して、INH 196a (JHU-011細胞: 38.5%の細胞数減少、FaDu細胞: 53.6%の細胞数減少)、MIM 133b (JHU-011細胞: 38.8%の細胞数減少、FaDu細胞: 27.3%の細胞数減少)、MIM 375 (JHU-011細胞: 49.9%の細胞数減少、FaDu細胞: 57.9%の細胞数減少)をトランスフェクションしたいずれの場合においても細胞数の減少を認めた。

- [0040] 以上の一連の結果から、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質や、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質は、頭頸部腫瘍の増殖抑制効果を有していることが示された。

## 実施例 2

- [0041] [頭頸部腫瘍モデルマウスを用いたin vivo増殖アッセイ]

頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質が、in vivoにおいても頭頸部腫瘍の増殖抑制効果を有しているかを調べるために、in vivo増殖アッセイを行った。具体的には以下のような方法を用いた。

- [0042] 10匹の6週齢ヌードマウスの頸部に、喉頭がん由来のヒト扁平上皮がん細胞JHU-011をそれぞれ $5 \times 10^6$ 個異種移植し、頭頸部腫瘍モデルマウスを作製した。移植から7日目(D7)に、頭頸部腫瘍モデルマウスの頸部に腫瘍が形成されたことを確認した後、これらの頭頸部腫瘍モデルマウスを2群に分けて、片方の1群を前述のINH 196a投与群(miR-196a inhibitor) (n=5)とし、もう片方の群を前述のネガティブコントロール投与群(inhibitor negative control) (n=5)とした。JHU-011の移植から7日目(D7)、13日目(D13)、19日目(D19)に、INH 196a投与群には、1 nmolのINH 196a (10  $\mu$ MのDharm

acon micro RNAを0.1 ml)と0.1 mlのAtelocollagen (AteloGene (登録商標) 株式会社高研社製)との混合物を、ネガティブコントロール投与群には、1 nmolのinhibitor negative control (10  $\mu$ MのDharmacon micro RNAを0.1 ml)と0.1 mlのAtelocollagen (AteloGene (登録商標)、株式会社高研社製)との混合物を、腫瘍周囲に局所投与した。すべての頭頸部腫瘍モデルマウスの腫瘍径(縦・横・高さ)を、移植から1週間後(1W)、3週間後(3W)、6週間後(6W)、9週間後(9W)、12週間後(12W)に計測し、縦・横・高さの積を体積比として両群で比較した。9週間後(9W)の腫瘍を観察した結果を図3A(左:ネガティブコントロール投与群、右:INH 196a投与群)に示す。また、1週間後(1W)における各群の腫瘍体積の平均値を100%としたときの、各群の相対腫瘍体積(%)の平均値の推移を図3Bに示す。以上、miR-196aの阻害物質の投与によって、頭頸部腫瘍モデルマウスにおける腫瘍の増大が顕著に(図3A)、かつ有意に(\* $p < 0.05$ ) (図3B)抑制されることが明らかとなり、in vivoにおいても、頭頸部腫瘍の増殖抑制効果が得られることが示された。

### 実施例 3

[0043] [頭頸部腫瘍モデルマウスにおける腫瘍組織の病理学的観察]

実施例2のin vivo増殖アッセイにおいて、移植から3ヶ月後における両群の頭頸部腫瘍モデルマウスの腫瘍組織から腫瘍を摘出し、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋し、組織標本作製した。この組織標本について、ヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)を行い、組織形態を観察した。その結果を図4A~Dに示す。図4Aは、INH 196a投与群の腫瘍組織の組織標本の観察結果を示し、図4Bは、その一部(図4A中の四角で囲われた部分)の拡大図を示す。また、図4Cは、ネガティブコントロール投与群の腫瘍組織の組織標本の観察結果を示し、図4Dは、その一部(図4C中の四角で囲われた部分)の拡大図を示す。ネガティブコントロール投与群では、一部壊死を伴うがん細胞(燕麦型の細胞)の増殖が認められたのに対し

(図4C及びD)、INH 196a投与群では、腫瘍内部に組織球の増生が認められるものの、がん細胞の存在は確認されなかった(図4A及びB)。この結果から、miR-196aの阻害物質の投与による頭頸部腫瘍の増殖抑制効果は、病理学的にも裏付けられた。

#### 実施例 4

[0044] [頭頸部腫瘍モデルマウスにおけるリンパ節組織の病理学的観察]

実施例2のin vivo増殖アッセイにおいて、移植から3ヶ月後における両群の頭頸部腫瘍モデルマウスの頸部リンパ節を摘出し、10%ホルマリン固定、パラフィン包埋し、組織標本を作製した。この組織標本について、ヘマトキシリン・エオシン染色(HE染色)を行い、組織形態を観察した。その結果を図5A~Dに示す。図5Aは、INH 196a投与群の頸部リンパ節の組織標本の結果を示し、図5Bは、その一部(図5A中の四角で囲われた部分)の拡大図を示す。また、図5Cは、ネガティブコントロール投与群の頸部リンパ節の組織標本の結果を示し、図5Dはその一部(図5C中の四角で囲われた部分)の拡大図を示す。ネガティブコントロール投与群では、がん細胞(燕麦型の細胞)が増殖し、がんの転移が認められたのに対し(図5C及びD)、INH 196a投与群では、がん細胞の存在は確認されず、がんの転移は認められなかった(図5A及びB)。また、上記両群の腫瘍モデルマウス各々2匹から頸部リンパ節を複数摘出し、組織学的にがんの転移の有無を検討したところ、ネガティブコントロール投与群では83%の頸部領域リンパ節(locoregional lymph node)に転移が認められたのに対し、INH 196a投与群では、50%のリンパ節に認める程度であった(図5E)。以上の結果から、miR-196aの阻害物質の投与により、頭頸部腫瘍の増殖だけでなく、リンパ節転移も抑制し得ることが病理学的に示された。

#### 産業上の利用可能性

[0045] 本発明は、腫瘍の増殖抑制や腫瘍の転移抑制による頭頸部腫瘍治療の分野に特に有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び／又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍治療用医薬組成物。
- [請求項2] 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び／又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍増殖抑制剤。
- [請求項3] 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質が、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAのアンチセンス核酸であることを特徴とする請求項2に記載の頭頸部腫瘍増殖抑制剤。
- [請求項4] 頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質が、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの模倣物質であることを特徴とする請求項2又は3に記載の頭頸部腫瘍増殖抑制剤。
- [請求項5] 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAが、miR-455-3p、miR-455-5p、miR-130b、miR-130b\*、miR-801、miR-196a、miR-21及びmiR-31からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであり、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAが、miR-133b、miR-145及びmiR-375からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであることを特徴とする請求項2～4のいずれかに記載の頭頸部腫瘍増殖抑制剤。
- [請求項6] 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質、及び／又は、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質を含有する頭頸部腫瘍転移抑制剤。
- [請求項7] 頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAの阻害物質が、頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAのアンチセンス核酸であることを特徴とする請求項6に記載の頭頸部腫瘍転移抑制剤。
- [請求項8] 頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの促進物質が、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAの模倣物質であるこ

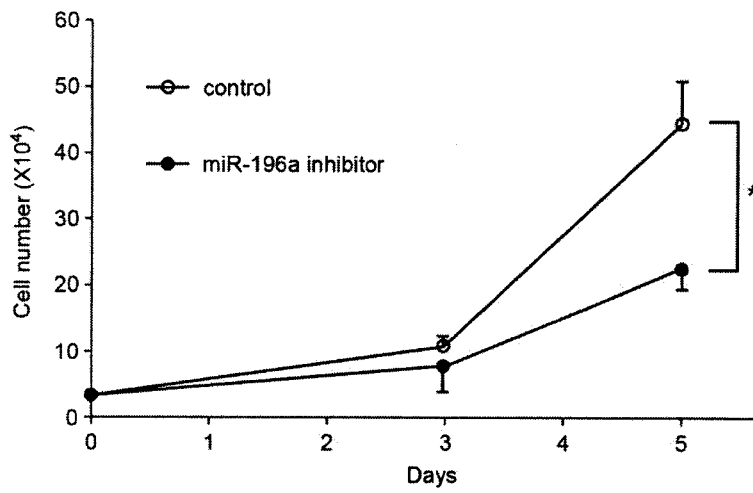
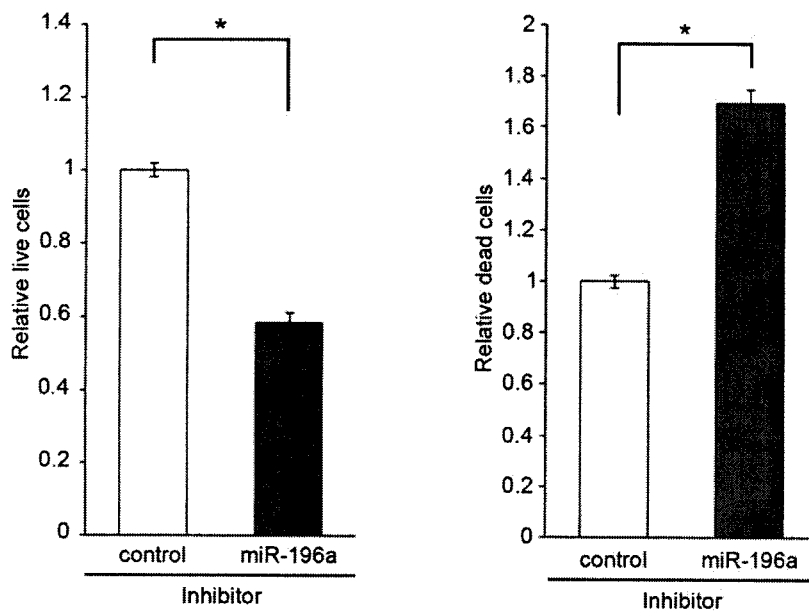
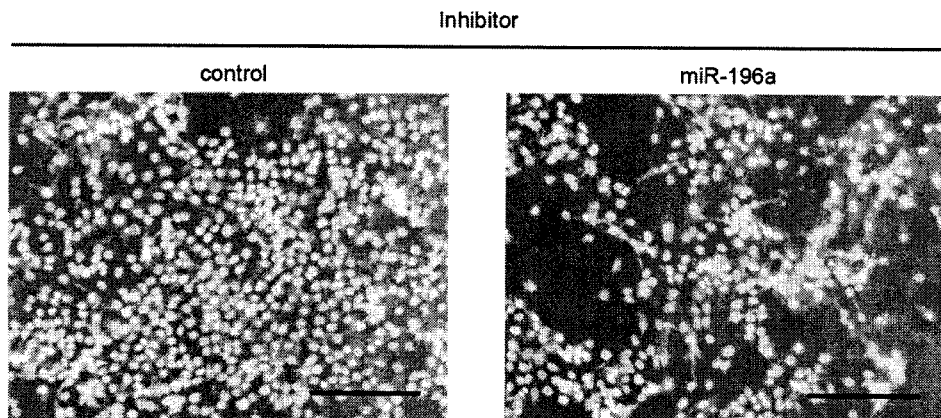


とを特徴とする請求項6又は7に記載の頭頸部腫瘍転移抑制剤。

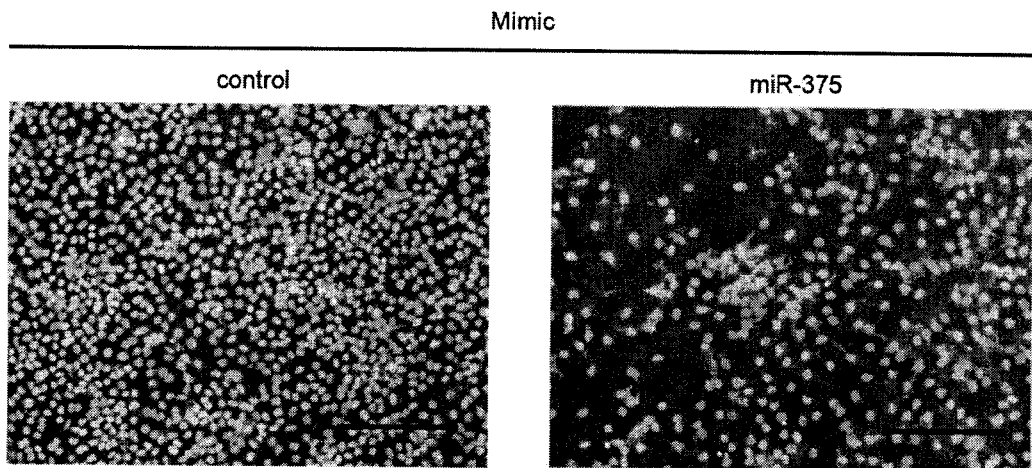
[請求項9]

頭頸部腫瘍において発現が増加するマイクロRNAが、miR-455-3p、miR-455-5p、miR-130b、miR-130b\*、miR-801、miR-196a、miR-21及びmiR-31からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであり、頭頸部腫瘍において発現が低下するマイクロRNAが、miR-133b、miR-145及びmiR-375からなるマイクロRNA群から選ばれる1又は2種以上のマイクロRNAであることを特徴とする請求項6～8のいずれかに記載の頭頸部腫瘍転移抑制剤。

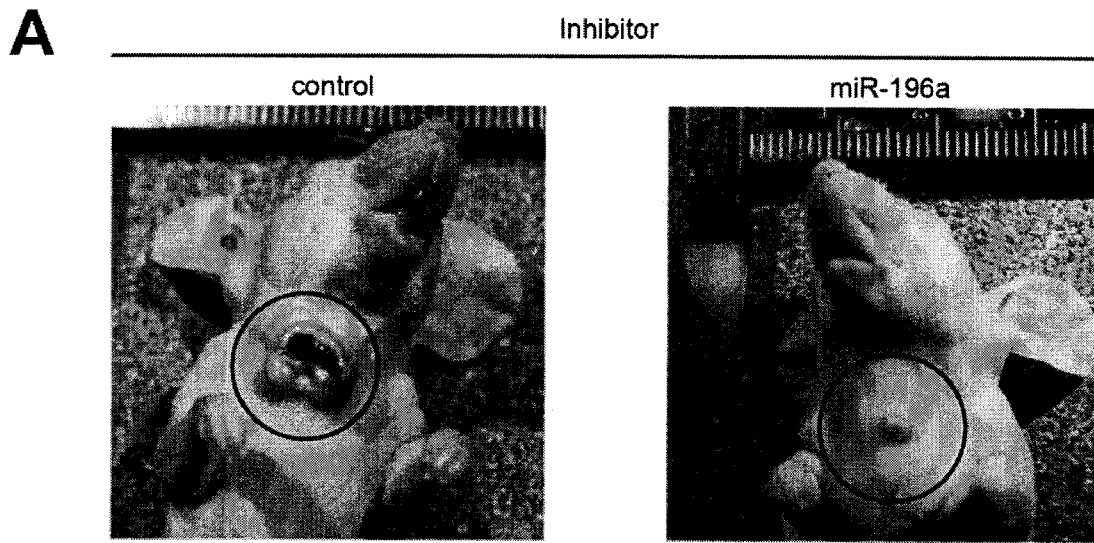
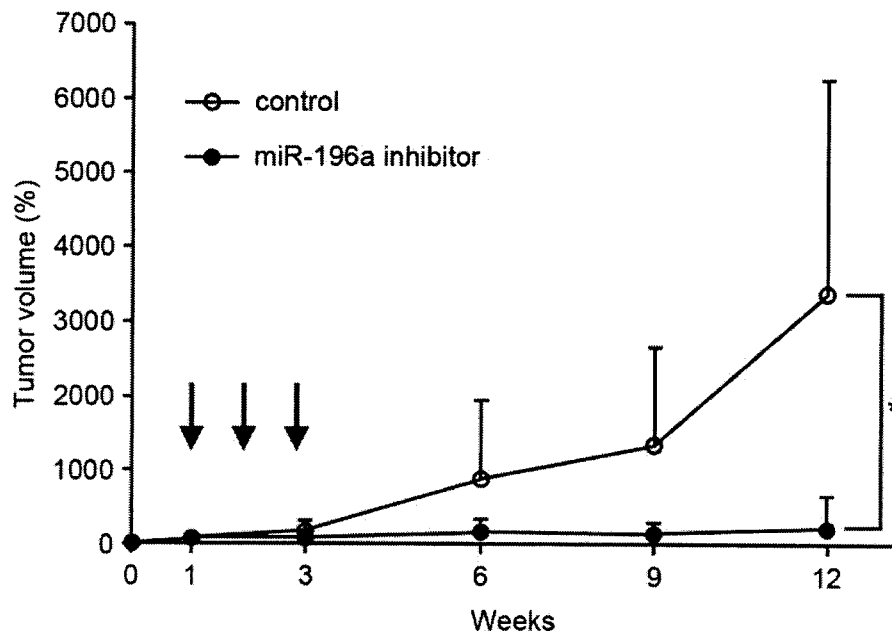
[圖1]

**A****B****C**

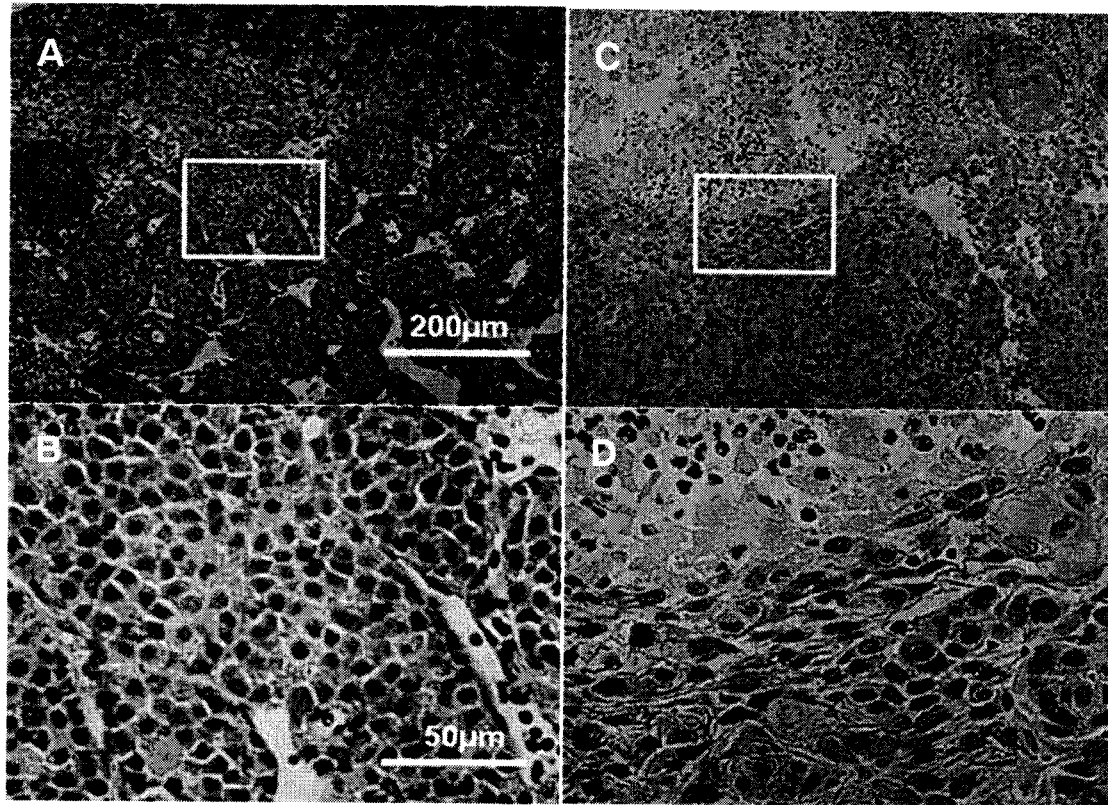
[図2]



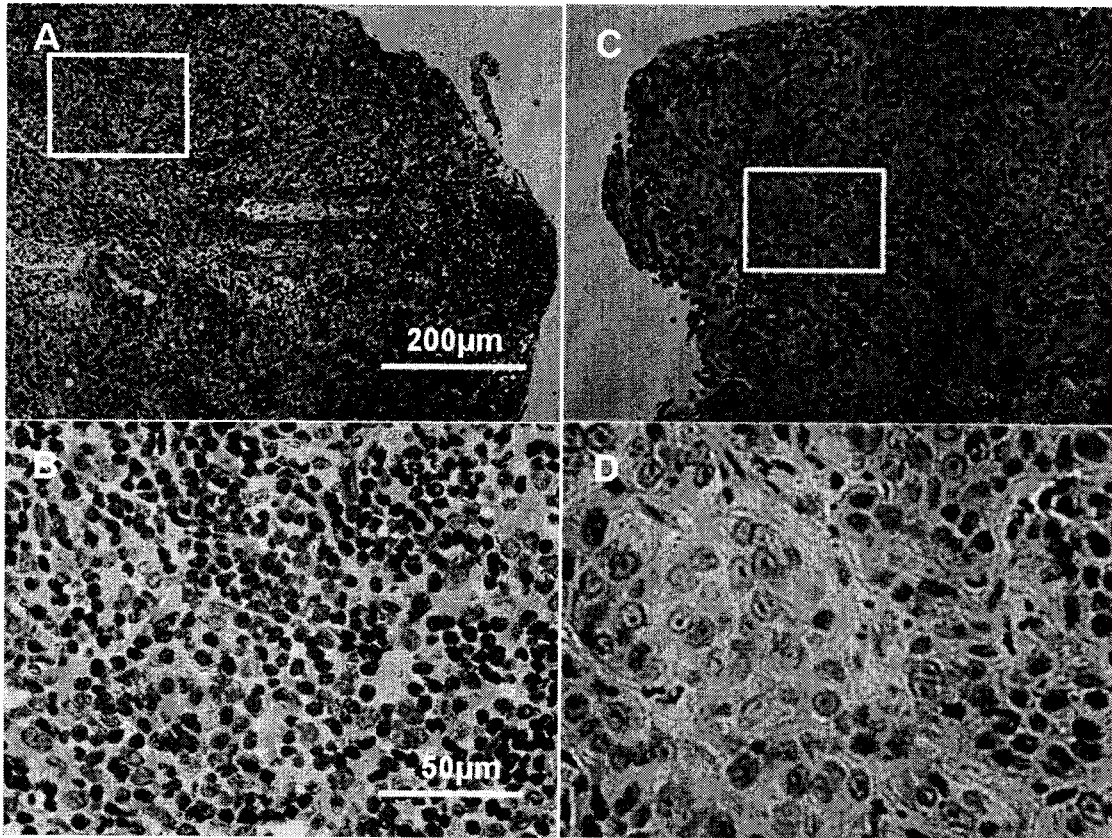
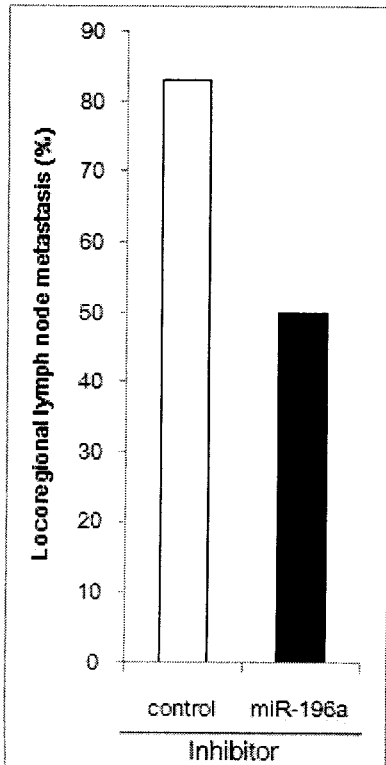
[圖3]

**B**

[図4]



[図5]

**E**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/002764

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,  
A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

A61K45/00, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/04, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/094545 A2 (UNIV OHIO STATE RES FOUND), 07 August 2008 (07.08.2008), claim 18 & US 2010/0048681 A            & EP 2109687 A & CA 2674895 A                & CN 101627134 A & JP 2010-516291 A	1-9
Y	WO 2007/081740 A2 (UNIV OHIO STATE RES FOUND), 19 July 2007 (19.07.2007), claim 14; paragraph [0098] & JP 2009-531019 A            & US 2008/0306006 A1 & EP 1969147 A                & CA 2633754 A & AU 2007205163 A            & CN 101389770 A	1-9

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 application or patent 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
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 July, 2010 (06.07.10)

Date of mailing of the international search report  
20 July, 2010 (20.07.10)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002764

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ken'ichi KOSAKI et al., "Koku Henpei Johi Gan ni Oite DNA Methyl-ka ni yori Hatsugen Yokusei sareru Gan Yokusei microRNA no Tanri", Nihon Gan Gakkai Gakujutsu Sokai Kiji, 25 August 2007 (25.08.2007), vol.66, page 419	1, 2, 4-6, 8, 9
Y	TRAN, N. et al, MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines, Biochem Biophys Res Commun, 2007.04.09, Vol.358, No.1, p.12-7, Abstract, Fig. 1B	1-9
X	HIYOSHI, Y. et al, MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma, Clin Cancer Res, 2009. 03.15, Vol.15, No.6, p.1915-22, Abstract, Fig.1, Fig.3	1-3, 5-7, 9
P, X	JP 2009-171876 A (Fuji Film Kabushiki Kaisha), 06 August 2009 (06.08.2009), claims 1, 7, 8, 12; paragraphs [0052] to [0054]; fig. 4A to C & US 2009/0202624 A1 & EP 2088208 A1	1, 2, 4-6, 8, 9
P, A	WO 2009/150839 A1 (Keio University), 17 December 2009 (17.12.2009), entire text & JP 2010-94122 A	1-9
E, X	WO 2010/050328 A1 (Japan as Represented by President of National Cancer Center), 06 May 2010 (06.05.2010), claim 11; paragraph [0041] (Family: none)	6, 8, 9



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/04, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)  
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2008/094545 A2 (UNIV OHIO STATE RES FOUND) 2008.08.07, 請求項 18 & US 2010/0048681 A & EP 2109687 A & CA 2674895 A & CN 101627134 A & JP 2010-516291 A	1-9
Y	WO 2007/081740 A2 (UNIV OHIO STATE RES FOUND) 2007.07.19, 請求項 14, [0098] & JP 2009-531019 A & US 2008/0306006 A1 & EP 1969147 A & CA 2633754 A & AU 2007205163 A & CN 101389770 A	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.07.2010

国際調査報告の発送日

20.07.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

9829

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	小崎健一ら, 口腔扁平上皮癌においてDNAメチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA の単離, 日本癌学会学術総会記事, 2007.08.25, Vol.66, p.419	1, 2, 4-6, 8, 9
Y	TRAN,N. et al, MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines, Biochem Biophys Res Commun, 2007.04.09, Vol.358, No.1, p.12-7, Abstract, Fig.1B	1-9
X	HIYOSHI,Y. et al, MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma, Clin Cancer Res, 2009.03.15, Vol.15, No.6, p.1915-22, Abstract, Fig.1, Fig.3	1-3, 5-7, 9
P, X	JP 2009-171876 A (富士フィルム株式会社) 2009.08.06, 請求項 1, 7, 8, 12, [0052]-[0054], 図 4A-C & US 2009/0202624 A1 & EP 2088208 A1	1, 2, 4-6, 8, 9
P, A	WO 2009/150839 A1 (学校法人 慶應義塾) 2009.12.17, 全文 & JP 2010-94122 A	1-9
E, X	WO 2010/050328 A1 (国立がんセンター総長が代表する日本国) 2010.05.06, 請求項 11, [0041] (ファミリーなし)	6, 8, 9