

(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1月14日(14.01.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/005055 A1

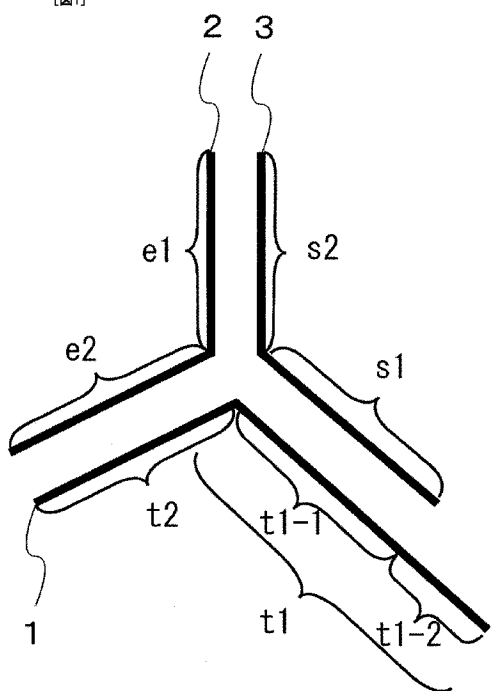
- (51) 国際特許分類:
C07H 21/04 (2006.01) *C07H 21/02* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/062535
- (22) 国際出願日: 2009年7月9日(09.07.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-178693 2008年7月9日(09.07.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 公立大学法人大阪市立大学 (OSAKA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5588585 大阪府大阪市住吉区杉本3丁目3番138号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 立花亮 (TACHIBANA Akira) [JP/JP]; 〒5588585 大阪府大阪市住吉区杉本3丁目3番138号 公立大学法人大阪市立大学内 Osaka (JP). 田辺利住
- (74) 代理人: 加藤敬子 (KATO Keiko); 〒5420081 大阪府大阪市中央区南船場2丁目3番4号 日宝長堀ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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, 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,

[続葉有]

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE STRUCTURE, AND METHOD FOR REGULATION OF GENE EXPRESSION

(54) 発明の名称: オリゴヌクレオチド構造体および遺伝子発現制御方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is an oligonucleotide structure which can distinguish between a normal cell and an abnormal cell such as a cancer cell and can act only in an abnormal cell. The oligonucleotide structure comprises three oligonucleotide chains, i.e., a trigger chain, an effector chain and a support chain, wherein each of the three oligonucleotide chains is bound to the other two chains so as to form a structure like a three-way joint, and wherein the trigger chain has a site capable of recognizing the sequences of other polynucleotide chains on the outside of a site that is bound to the support chain.

(57) 要約: 正常細胞と癌細胞などの異常細胞とを区別して異常細胞内でのみ機能する、オリゴヌクレオチド構造体を提供する。本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する。

WO 2010/005055 A1

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).

— 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))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

オリゴヌクレオチド構造体および遺伝子発現制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、RNA干渉、RNA干渉阻害、miRNA、miRNA阻害、デコイ核酸、SNP検出などに有効に使用できる、オリゴヌクレオチド構造体および遺伝子発現制御方法に関する。

背景技術

[0002] ガンやエイズなどの難病を効率的に治療する医薬の開発は、ライフサイエンスの分野における大きな課題の一つである。ポストゲノム時代において、遺伝子の発現を制御することが新たな難病の治療法として着目されている。

[0003] 遺伝子治療としては、従来、アンチセンスやデコイでタンパク質の発現を制御したり、ゲノムの修復を行ったり、欠損もしくは損傷している遺伝情報を外来遺伝子の形で入れて、タンパク質の発現を誘発することが行われてきた。また、最近では、遺伝情報の発現をコントロールするRNA、いわゆるRNA干渉（RNAi）やmiRNAを利用した遺伝子治療も注目を集めている。

[0004] RNAiやmiRNAは、ガイド鎖RNAとパッセンジャー鎖RNAまたはmiRNAとmiRNA*とが互いに結合して形成されたdsRNAを、細胞内へ導入することによって、当該dsRNAと相同な配列を持つmRNAが分解されるなどして、遺伝子の発現を抑制するという現象をいう（例えば、非特許文献1～4参照）。

[0005] しかし、RNAiやmiRNAを用いて発現抑制する場合には、以下のような問題がある。RNAiやmiRNAは、原理的には、dsRNAと相同な配列を持つmRNAに結合する。しかし、一塩基置換がされたmRNAに対しても、同様に結合する。このため、正常遺伝子と異常遺伝子との配列差がわずかしかない場合には、正常細胞中で正常なmRNAを分解などしてし

まうという問題がある。このように、RNA i / miRNA 医薬は副作用が大きいという問題がある。

[0006] また、RNA i 効率を上げるために、修飾したポリヌクレオチドを用いるなどが行われている（例えば、特許文献1参照）。

[0007] 近年の研究から、短いRNAが2本鎖 siRNA として機能する以外に、1本鎖のままダイサーに取込まれたり、1本鎖として別の機能を持つことが知られつつある（例えば、非特許文献5参照）。

[0008] さらに、近年 iPS 細胞（人工多能性幹細胞）、ES 細胞（胚性幹細胞）などの幹細胞を用いて、臓器・組織などを分化させる再生医療が注目されている。しかし、全ての iPS 細胞や ES 細胞が所望の細胞に分化するわけではない。分化・誘導された細胞群には、未分化の幹細胞や所望の細胞に分化しなかった細胞が含まれている。多種の細胞が存在することで、最終的に癌化するなどの問題を生ずるおそれがある。例えば、再生医療で移植される細胞群中に未分化の細胞が0.01%混入すると、腫瘍を形成する可能性が指摘されている。このため、幹細胞から分化・誘導された細胞群から未分化の幹細胞や所望の細胞に分化しなかった細胞を除去することが試みられている。

[0009] 例えば、分化・誘導された細胞群に含まれる所望の細胞の細胞表面抗原マーカーに蛍光標識抗体でラベルしたものを、セルソーターによって分離することが試みられている。しかし、この方法では、セルソーターが高価である、目的細胞を選別するための細胞表面抗原マーカーが容易に見つからないなどの問題がある。このため、分化・誘導された細胞群から所望の細胞を容易に分離することができる方法を開発することが望まれている。

非特許文献1: Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998) Nature, 391, 806-811.

非特許文献2: Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and

Tuschl, T. (2001) Nature, 411, 494-498

非特許文献3: Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) Science, 296, 550-553.

非特許文献4: Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. and Conklin, D. S. (2002) Genes Dev, 16, 948-958.

非特許文献5: Lima WF, Murray H, Nichols JG, Wu H, Sun H, Prakash TP, Berdeja AR, Gaus HJ, Crooke ST., J Biol Chem. 2009 Jan 23; 284 (4) : 2535-48. Epub 2008 Nov. 18. Links

特許文献1: 特表2007-531520号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] すなわち、本発明は、上記問題に鑑みなされたものであり、その目的は、正常細胞と癌細胞などの異常細胞とを区別して異常細胞内あるいは正常細胞内でのみ機能する、オリゴヌクレオチド構造体および遺伝子発現制御方法を提供することを目的とする。
- [0011] また、本発明の別の目的は、多種類の細胞が含まれる細胞群から所望の細胞を容易に選択・分離することができる、オリゴヌクレオチド構造体および遺伝子発現制御方法を提供することを目的とする。
- [0012] さらに、本発明の別の目的は、一塩基置換体の検出をする新たな一塩基置換体の検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討をした結果、以下のオリゴヌクレオチド構造体および遺伝子発現制御方法を見出し、本発明を完成

した。すなわち、本発明は以下の通りである。

- [0014] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する。
- [0015] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、上記のような三方向ジョイント（Three Way Junction、以下、「TWJ」ということもある）構造を有する。また、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有している。前記トリガー鎖が、他のポリヌクレオチドの配列を認識すると、サポート鎖と他のポリヌクレオチドの交換反応を生ずる。この交換反応により、前記三方向ジョイント構造は崩壊して、オリゴヌクレオチド構造体は、トリガー鎖と他のポリヌクレオチドの結合体、エフェクター鎖と、サポート鎖とに分割される。
- [0016] ここで、エフェクター鎖を標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するように設計しておく。例えばRNA_iにおいて、ガイド鎖RNAになる鎖とするなどである。これにより、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物と結合できるエフェクター鎖を細胞内で得ることができる。
- [0017] なお、本明細書中で、「実質的に同一の塩基配列」には、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の塩基配列と完全に相補的な塩基配列、DNA配列とRNA配列、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の塩基配列の変異鎖などを含む。
- [0018] また、上記したようにトリガー鎖は、他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する。さらに、トリガー鎖とサポート鎖とが結合している部分の塩基配列は、他のポリヌクレオチドにより鎖の交換反応が生ずる部分である。したがって、トリガー鎖の一部を、例えば癌細胞などの異常細胞内で発

現し、正常細胞内で発現しない遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するように設計しておく。このような構成とすることで、本発明のオリゴヌクレオチド構造体を所望の細胞内でのみ崩壊させることができる。一方、トリガー鎖の一部を、正常細胞内または幹細胞から分化した細胞群中の所望の細胞内で発現し、異常細胞内または所望の細胞に分化していない細胞内で発現しない遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するように設計しておいてもよい。このような構成とすることで、正常細胞または幹細胞から分化した細胞群中の所望の細胞のみを生存させることができる。

[0019] この構造によれば、例えばトリガー鎖に結合するオリゴヌクレオチドが、異常細胞内で特異的に発現するものであれば、異常細胞内でのみ三方向ジョイント構造を分解させて、エフェクター鎖が1本鎖となる。エフェクター鎖は、1本鎖のままであっても、例えばアンチセンスや1本鎖機能性RNAとして機能させることができる。また、エフェクター鎖に相補的に結合する他の1本鎖が存在すれば、2本鎖となり、例えばRNAiとして機能する。また、トリガー鎖結合する他の1本鎖は、トリガー鎖と、相同でなければ鎖の交換反応は起こらない。すなわち、三方向ジョイント構造を分解しない。このため、正常なポリヌクレオチドと異常なポリヌクレオチドとの塩基配列の差が一塩基置換であっても、両者を区別できる。また、本発明のオリゴヌクレオチド構造体を用いれば、SNPsなどの検出にも用いることができる。

[0020] 前記エフェクター鎖は、相補性を有するオリゴヌクレオチドと二本鎖を形成するとよい。前記トリガー鎖が結合する他のポリヌクレオチドの配列がそれぞれ異なるトリガー鎖を有する二種のオリゴヌクレオチド構造体から、得られるエフェクター鎖同士から二本鎖を形成するとよい。特に、前記他のポリヌクレオチドの配列が、異なる遺伝子由来のものであると好ましい。

[0021] また、本発明の遺伝子発現抑制方法は、トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイン

ト構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する、オリゴヌクレオチド構造体を細胞、あるいは組織に導入し、他のポリヌクレオチドが存在する細胞、あるいは組織においてのみ、前記三方向ジョイント構造の崩壊を生じさせ、1本鎖エフェクター鎖を得る、ことにより行う。

[0022] 前記エフェクター鎖は、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有する。

[0023] 前記オリゴヌクレオチド構造体と共に、このオリゴヌクレオチド構造体のエフェクター鎖と相補的に結合するオリゴヌクレオチドを導入し、前記三方向ジョイント構造の崩壊を生じた細胞、あるいは組織内で、生じた1本鎖エフェクター鎖とオリゴヌクレオチドとが二本鎖を形成するものであってもよい。

[0024] エフェクター鎖の塩基配列が同一で、トリガー鎖が認識する他のポリヌクレオチドが異なる二種類のオリゴヌクレオチド構造体を細胞、あるいは組織に導入し、前記トリガー鎖が認識する他のポリヌクレオチドが二種類存在する細胞、あるいは組織においてのみ、前記二種類のオリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造を崩壊させ、生じたエフェクター鎖同士が二本鎖を形成するものであってもよい。

[0025] 本発明の一塩基置換体の検出方法は、トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する、オリゴヌクレオチド構造体と、他のポリヌクレオチドまたは他のポリヌクレオチドの一塩基置換体とを混合し、前記オリゴヌクレオチド構造体の崩壊の有無により、他のポリヌクレオチドの一塩基置換体を検出する。

[0026] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体を用いると、トリガー鎖の前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部

位に同一な他のポリヌクレオチドが存在すれば、オリゴヌクレオチド構造体が崩壊する。一方、他のポリヌクレオチドの一塩基置換体の場合は、トリガー鎖に結合できないので、オリゴヌクレオチド構造体が崩壊しない。したがって、オリゴヌクレオチド構造体の崩壊の有無を確認することで、一塩基置換体を検出することができる。

発明の効果

[0027] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する。この構造により、正常細胞または幹細胞から分化した細胞群中の所望の細胞と、異常細胞または所望の細胞に分化していない細胞などとを区別していずれかの細胞内でのみ三方向ジョイント構造を分解させ、エフェクター鎖を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1] 図1は、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の概念を説明する図である。

[図2] 図2は、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の崩壊の機構を説明する図である。

[図3] 図3は、TWJ、TWJ no tail、TWJ mutant tail、siRNA、核酸成分を導入していない（図中、「none」）ものの、KDRのmRNAの相対量を示すグラフである。

[図4] 図4は、Native-PAGEの結果を示す写真である。

[図5] 図5は、図5は、長さの異なるmRNA相当配列が、TWJ構造体の崩壊に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である、

[図6] 図6は、長さの異なるmRNA相当配列が、一塩基置換認識能に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である。

[図7] 図7は、一塩基置換の位置が異なるmRNA相当配列が、一塩基置換認識能に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である。

[図8] 図8は、一塩基置換の位置が3であるmRNA相当配列とこれに相補的な配列を有するトリガー鎖が、TEJ崩壊に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である。

[図9] 図9は、GFP発現株とGFP非発現株において、カスパーゼに対するsiRNAの効果を評価したグラフである。

[図10] 図10は、GFP mRNAに反応し、カスパーゼ3または8のsiRNAを放出するTWJ構造体を説明する図である。

[図11] 図11は、GFP発現株とGFP非発現株において、カスパーゼに対するsiRNAを放出するTWJ構造体の効果を評価したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0029] 以下に、本発明を詳細に説明する。

図1は、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の概念を説明する図である。

[0030] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体を構成するオリゴヌクレオチドは、DNA、RNAのいずれでもよく、またDNAとRNAのキメラであっても、さらに化学修飾をしたものであってもよい。

[0031] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、トリガー鎖1と、エフェクター鎖2と、サポート鎖3との3本のオリゴヌクレオチドで構成されている。図1に示すように、トリガー鎖1と、エフェクター鎖2と、サポート鎖3鎖とは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と相補的に結合して三方向ジョイント構造を形成している。具体的には、トリガー鎖1のt2部位とエフェクター鎖2のe2部位とが、エフェクター鎖2のe1部位とサポート鎖3のs2部位とが、サポート鎖3のs1部位とトリガー鎖1のt1-1部位とがそれぞれ結合している。これらの結合は、相補的な結合でなくてもよく、その一部が結合したものであればよい。

[0032] トリガー鎖のt1部位は、他のポリヌクレオチドと相同配列を有する。この配列により、他のポリヌクレオチドが相補的に結合し、オリゴヌクレオチ

ド構造体の三方向ジョイント構造を崩壊させることができる。また、トリガー鎖1のt1部位には、サポート鎖3と結合せず、他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位t1-2が存在する。このt1-2に特定のポリヌクレオチドが結合することで、鎖の交換反応が起こり、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造が崩壊する。

[0033] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造を崩壊させるためには、トリガー鎖1のt1部位は、ガン細胞などの異常細胞内で特異的に発現するmRNAの一部と相補的に結合する塩基配列を有する。あるいは、正常細胞内または幹細胞から分化した細胞群中の所望の細胞内で発現するmRNAの一部と相補的に結合する塩基配列を有するものであってもよい。また、このようなmRNAが、トリガー鎖1のt1部位を認識し、オリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造を完全に崩壊させるためには、t1-2部位は、6~20塩基の配列であればよい。一方、オリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造の崩壊をコントロールさせるためには、t1-2部位は、4塩基程度であればよい。あるいは、トリガー鎖と相補的に結合するmRNA塩基配列を調整して上記範囲にしてもよい。トリガー鎖1のt1部位に結合するmRNAは、後述するエフェクター鎖2が結合するmRNAと同一のmRNAであってもよく、異なるmRNAであってもよい。同一のmRNAである場合には、トリガー鎖1のt1部位に結合するmRNAの部位と、エフェクター鎖2が結合するmRNAの部位が異なるように、塩基配列を決定すればよい。

[0034] エフェクター鎖2は、オリゴヌクレオチド構造体の崩壊後にRNAiなどの機能を奏する元となるオリゴヌクレオチドである。エフェクター鎖2は、全体で(e1部位+e2部位)21~30塩基程度のオリゴヌクレオチドである。エフェクター鎖2のe1部位またはe2部位は、6~7塩基以上であればよい。エフェクター鎖2とトリガー鎖1との結合は、上記トリガー鎖1と特定のオリゴヌクレオチドとの結合により分解する程度の弱い結合になるように、エフェクター鎖2のe2部位の配列に対して、トリガー鎖1のt2

部位を設計すればよい。

[0035] エフェクター鎖2は、オリゴヌクレオチド構造体の崩壊後に標的遺伝子または標的遺伝子転写産物に対して何らかの機能を奏する配列である。このため、エフェクター鎖2は、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の実質的に同一の塩基配列を有する必要がある。標的遺伝子または標的遺伝子転写産物は、本発明のオリゴヌクレオチド構造体を使用する目的に応じて適宜選択すればよい。例えば、ガン細胞で特異的に発現しているガン遺伝子などである。あるいは、正常細胞内のみ発現している遺伝子や幹細胞から分化した細胞群中の所望の細胞内でのみ発現している遺伝子などであってもよい。

[0036] サポート鎖3は、上記エフェクター鎖2とトリガー鎖1とにそれぞれ結合をし、三方向ジョイント構造を形成する。サポート鎖3のs1部位は、三方向ジョイント構造を維持する程度以上に相補的にトリガー鎖1のt1-1部位に結合している。また、サポート鎖3とエフェクター鎖2との間の結合は、三方向ジョイント構造の崩壊に伴い、分裂できる程度の弱さを有する結合である。

[0037] 次に、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の崩壊の機構を図2を用いて説明する。

図2(a)に示すように、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の近傍に上記トリガー鎖1と相補的に結合する部位を有するポリヌクレオチド4(図2の例では、mRNA)が存在すると、トリガー鎖1の他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位t1-2を認識し、サポート鎖3との間で交換反応が起こる。この交換反応により、三方向ジョイント構造が崩壊する。

[0038] 上記した三方向ジョイント構造の崩壊により、トリガー鎖1と、エフェクター鎖2と、サポート鎖3とは、それぞれ分離する。これにより、1本鎖のエフェクター鎖が得られる。1本鎖のエフェクター鎖は、このままで、例えばアンチセンスや1本鎖機能性RNAとして機能させることができる。また、一塩基置換体を検出する場合は、エフェクター鎖は特に機能を有しない。

- [0039] 三方向ジョイント構造の崩壊後に、1本鎖のエフェクター鎖2と相補的なオリゴヌクレオチド2'が存在すると、エフェクター鎖2と相補的なオリゴヌクレオチド2'とは二本鎖を形成する。エフェクター鎖がRNAまたはRNAとDNAとのキメラの場合は、形成された2本鎖オリゴヌクレオチドが*siRNA*としてRNA*i*機構を介してこれと相同な配列を持つmRNAを分解する。
- [0040] この1本鎖のエフェクター鎖2と相補的に結合する他のオリゴヌクレオチド2'は、オリゴヌクレオチド構造体と同時に加えたものでも、細胞内に存在するオリゴヌクレオチドでもよい。好ましくは、エフェクター鎖2と相補的に結合するオリゴヌクレオチド2'は、別のオリゴヌクレオチド構造体のエフェクター鎖2由来のものであればよい。細胞内でのRNA*i*などをより効果的に行うことができるからである。
- [0041] 一方、図2(b)に示すように、上記トリガー鎖1と相補的に結合する部位を有するポリヌクレオチドが存在しないと、三方向ジョイント構造は崩壊しない。したがって、本発明では、トリガー鎖1およびこのトリガー鎖と相補的に結合する部位を有するポリヌクレオチドの選択が重要となる。トリガー鎖と相補的に結合する部位を有するポリヌクレオチドが、例えばガン細胞など特定の細胞内にのみ存在するものを選択することにより、特定の細胞内でのみ、三方向ジョイント構造を崩壊させることができる。また、一塩基置換されたポリヌクレオチドの場合には、鎖の交換反応が生じないので、三方向ジョイント構造は崩壊しない。
- [0042] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、1種類で使用してもよいが、複数種のオリゴヌクレオチド構造体を使用してもよい。特に、鎖の交換反応によりトリガー鎖に結合する前記他のポリヌクレオチドの塩基配列が異なるものを用いると好ましい。例えば、本発明のオリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造を崩壊させたい細胞内で特異的に発現する、異なる遺伝子A、Bが存在する場合に、一のオリゴヌクレオチド構造体のトリガー鎖に遺伝子AのmRNAの少なくとも一部に相補的に結合する配列を設け、他のオリ

ゴヌクレオチド構造体のトリガー鎖に遺伝子BのmRNAの少なくとも一部に相補的に結合する配列を設けるなどである。この構成により、遺伝子A、Bが発現している場合にのみ、エフェクター鎖から2本鎖を形成することができる。

[0043] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体の細胞、組織、あるいは個体への導入する対象となるのは、標的遺伝子とその細胞内でRNAに転写、またはタンパク質に翻訳され得るものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、本発明の対象となる被導入体は、細胞、組織、あるいは個体を意味する。本発明に用いられる細胞としては、生殖系列細胞、体性細胞、分化全能細胞、多分化能細胞、分割細胞、非分割細胞、実質組織細胞、上皮細胞、不滅化細胞、または形質転換細胞等何れのものであってもよい。具体的には、例えば、幹細胞のような未分化細胞、幹細胞から分化・誘導された細胞群、器官または組織由来の細胞あるいはその分化細胞等が挙げられる。組織としては、単一細胞胚または構成性細胞、または多重細胞胚、胎児組織等を含む。また、上記分化細胞としては、例えば、脂肪細胞、繊維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、神経細胞、グリア、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、ケラチン生成細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞および内分泌線または外分泌腺の細胞等が挙げられる。

[0044] 本発明で被導入体として用いられる個体として、具体的には、植物、動物、原生動物、ウィルス、バクテリア、または真菌種に属するもの等が挙げられる。植物は単子葉植物、双子葉植物または裸子植物であってよく、動物は、脊椎動物または無脊椎動物であってよい。本発明の被導入体として好ましい微生物は、農業で、または工業によって使用されるものであり、そして植物または動物に対して病原性のものである。真菌には、カビ及び酵母形態両方での生物体が含まれる。脊椎動物の例には、魚類、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、マウス、ラット、サル及びヒトを含む哺乳動物が含まれ、無脊椎動物には、線虫類及び他の虫類、キイロショウジョウバエ (D r o

s o p h i l a)、および他の昆虫が含まれる。

- [0045] 被導入体へのオリゴヌクレオチド構造体の導入法としては、被導入体が細胞、あるいは組織の場合は、カルシウムフォスフェート法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、ウィルス感染、2本鎖ポリヌクレオチド溶液への浸漬、あるいは形質転換法等が用いられる。また、胚に導入する方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション法、あるいはウィルス感染等が挙げられる。被導入体が植物の場合には、植物体の体腔または間質細胞等への注入または灌流、あるいは噴霧による方法が用いられる。また、動物個体の場合には、経口、局所、（皮下、筋肉内及び静脈内投与を含む）非経口、経腔、経直腸、経鼻、経眼、腹膜内投与等によって全身的に導入する方法、あるいはエレクトロポレーション法やウィルス感染等が用いられる。経口導入のための方法には、オリゴヌクレオチド構造体を生物の食物と直接混合することができる。さらに、個体に導入する場合には、例えば埋め込み長期放出製剤等として投与することや、オリゴヌクレオチド構造体を導入した導入体を摂取させることにより行うこともできる。
- [0046] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体を用いると、所定の場所で、所望のオリゴヌクレオチドを得て、所望のオリゴヌクレオチドを利用するものであれば、いかなる目的にも使用できる。例えば、以下の目的に使用できる。
- [0047] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体において、得られる1本鎖のエフェクター鎖2が、RNAの場合は、相補的に結合する他のオリゴヌクレオチド2'がRNAの場合は、2本鎖RNAとしてRNAiを引き起こすことができる。
- [0048] または、本発明のオリゴヌクレオチド構造体において、得られる1本鎖のエフェクター鎖2が、修飾RNAの場合は、1本鎖修飾RNAとして、siRNA、miRNAの機能を阻害することができる。
- [0049] または、本発明のオリゴヌクレオチド構造体において、得られる1本鎖のエフェクター鎖2が、DNAの場合は、2本鎖DNAとしてデコイ核酸として機能させることができる。

- [0050] あるいは、本発明のオリゴヌクレオチド構造体において、エフェクター鎖、サポート鎖の末端に、三方向ジョイント構造が崩壊した際に発色する蛍光色素などを付加しておいて、一塩基置換の検出に用いることもできる。あるいは、電気泳動などで三方向ジョイント構造の崩壊の有無を確認することで、一塩基置換の検出に用いることもできる。
- [0051] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、一塩基置換されたオリゴヌクレオチドでは、三方向ジョイント構造が崩壊しない。これにより、特定のオリゴヌクレオチドを所望の細胞内でのみ機能させることができる。このように、本発明のオリゴヌクレオチド構造体を用いると、正常細胞と異常細胞とを区別できる。あるいは、幹細胞から分化・誘導された細胞群から所望の細胞に分化した細胞のみを選択することができる。
- [0052] しかも、本発明のオリゴヌクレオチド構造体は、単純な3本の短い配列が結合した構造をしている。この結果、毒性はないと考えられる。
- [0053] また、本発明のオリゴヌクレオチド構造体を用いれば、正常細胞内での三方向ジョイント構造の崩壊を抑制できる。このため、従来問題とされたRNA i 医薬の副作用を軽減できる。
- [0054] 本発明のオリゴヌクレオチド構造体において、有効なトリガー鎖と、エフェクター鎖とを選択し、これと結合できるサポート鎖を設計することで、遺伝子が関与する疾病や個人の遺伝型が影響する疾病に対しても柔軟に対応できる。

実施例

- [0055] 以下本発明を詳細に説明するため実施例を挙げて説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

- [0056] (実施例1)

[細胞内におけるRNA i の発生の評価]

ヒト乳がん由来細胞(MCF-7細胞)におけるRNA i の発生を評価した。具体的には、エフェクター鎖として、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEG

F) の mRNA の一部に対応する DNA を用い、トリガー鎖として、VEGF の受容体の一つである KDR (2 型受容体) の DNA を用いた。VEGF は、多くのガン細胞が産生しており、血管をガン組織に誘導する因子である。さらに、ガン細胞自身がこの増殖因子に反応して、増殖することが知られている。KDR は、血管内皮細胞やガン細胞などの細胞表面などにあり、VEGF と結合する。

[0057] 図 1 に示す三方向ジョイント構造を有するオリゴヌクレオチド構造体 (以下、「TWJ 構造体」という)、およびオリゴヌクレオチド構造体がトリガー鎖を認識する部位 t 1 - 2 の配列がトリガー鎖を認識できない配列にした、三方向ジョイント構造を有するオリゴヌクレオチド構造体 (以下、「TWJ mutant tail」という)、オリゴヌクレオチド構造体がトリガー鎖を認識する部位 t 1 - 2 を有さない三方向ジョイント構造を有するオリゴヌクレオチド構造体 (以下、「TWJ no tail」という) を作製した。作製したオリゴヌクレオチドの配列を表 1 に示す。

[表1]

<p>TWJ</p> <p>エフェクター鎖 (配列番号 1)</p> <p>5' -UAUCCGGACUGGUAGCCGCUU-3' (RNA)</p> <p>サポート鎖 (配列番号 2)</p> <p>5' -GATGAGATCGAGTACATCTTCTACCAGTCCGGATA-3' (DNA)</p> <p>トリガー鎖 (配列番号 3)</p> <p>5' -AAGCGGAAGATGTACTCGATCTCATCAGGGTACTCC-3' (DNA)</p> <p>エフェクター鎖と相補的な結合をする鎖 (配列番号 4)</p> <p>5' -GCGGCUACCAGUCCGGAUAAUU-3' (RNA)</p>
<p>TWJ mutant tail</p> <p>トリガー鎖以外は TWJ のそれに同じ</p> <p>トリガー鎖</p> <p>5' -AAGCGGAAGATGTACTCGATCTCATCCATCGGACTG-3' (DNA) (配列番号 5)</p>
<p>TWJ no tail</p> <p>トリガー鎖以外は TWJ のそれに同じ</p> <p>トリガー鎖</p> <p>5' -AAGCGGAAGATGTACTCGATCTCATC-3' (DNA) (配列番号 6)</p>

[0058] 上記作製したオリゴヌクレオチド構造体及びエフェクター鎖 (配列番号 1) と、配列番号 4 で示す RNA を用いて作製した siRNA (以下、「siRNA」という) と、をそれぞれヒト乳がん由来細胞 (MCF-7 細胞) に導入した。24 時間後、全 RNA を抽出した。KDR の cDNA を作製し、リアルタイム PCR (polymerase chain reaction、ポリメラーゼ連鎖反応) により、mRNA の相対量を調べた。結果を図 3 に示す。図 3 は、TWJ、TWJ no tail、TWJ mutant tail、siRNA、核酸成分を導入していない (図中、「none」) もの、KDR の mRNA の相対量を示すグラフである。

[0059] 図 3 から、TWJ は明らかに RNA i を引き起こし、KDR の mRNA を

減少させていることがわかる。一方、TWJ no tailおよびTWJ mutant tailは、これらはKDRのmRNAを減少させておらず、RNAiをほとんど引き起こしていないことがわかる。このことから、本発明のオリゴヌクレオチド構造体を用いると、RNAiを引き起こすことができることがわかった。

[0060] (実施例2)

[電気泳動におけるオリゴヌクレオチド構造体の崩壊の評価]

図1に示す三方向ジョイント構造を有するオリゴヌクレオチド構造体（以下、「TWJ構造体」という）が出来ているかどうか、およびmRNA相当配列によって、その構造が崩壊しているかどうか検討をした。作製したオリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。

[表2]

TWJ	
エフェクター鎖	
5' -TATCCGGACTGGTAGCCGCTT-3'	(DNA) (配列番号7)
サポート鎖	
5' -GATGAGATCGAGTACATCTTCTACCAGTCCGGATA-3'	(DNA) (配列番号8)
トリガー鎖	
5' -AAGCGGAAGATGTACTCGATCTCATCAGGGTACTCC-3'	(DNA) (配列番号9)
エフェクター鎖と相補的な結合をする鎖	
5' -GCGGCTACCAGTCCGGATATT-3'	(DNA) (配列番号10)
構造体を崩壊させる鎖 (mRNA相当鎖)	
5' -GGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3'	(DNA) (配列番号11)

[0061] 実験は、エフェクター鎖、サポート鎖、トリガー鎖、構造体を崩壊させる鎖 (mRNA相当鎖)、エフェクター鎖に相補的な鎖 (エフェクター鎖とともにsiRNA相当二本鎖を生成する鎖) うちから以下のような組み合わせを混合し、30分後Native-PAGEによって分析した。結果を、図4に示す。図4は、Native-PAGEの結果を示す写真である。

[0062] 図4において、各レーンは以下のものを示す。

aのレーン： エフェクター鎖、サポート鎖、トリガー鎖

bのレーン： エフェクター鎖、サポート鎖、トリガー鎖、mRNA相当鎖、エフェクター鎖に相補的な鎖

cのレーン： エフェクター鎖、サポート鎖、トリガー鎖、エフェクター鎖に相補的な鎖

dのレーン： エフェクター鎖、エフェクター鎖に相補的な鎖

[0063] 図4から、aのレーンでは100bp超の位置にTWJのバンドが確認された。構造体が生成していることがわかった。

[0064] また、bのレーンではmRNA相当鎖の添加により、mRNA相当鎖とトリガー鎖からなるバンドがCの位置（図中、白い楕円で囲んだ領域）に強く検出され、構造体が崩壊していることがわかった。同時に、放出されたエフェクター鎖とエフェクター鎖に相補的な鎖からなるsiRNA相当二本鎖がAの位置（図中、白い楕円で囲んだ領域）に強く検出された。

[0065] cのレーンではmRNA相当鎖を加えていないので、TWJ構造体がほとんど残っていた。また、bのレーンと同量のエフェクター鎖に相補的な鎖を加えているにも関わらず、siRNA相当二本鎖はほとんど検出されず（Bの位置（図中、白い楕円で囲んだ領域））、エフェクター鎖がTWJ構造体から放出されていないことがわかった。

[0066] dのレーンはb及びcのレーンで加えたエフェクター鎖、エフェクター鎖に相補的な鎖が全量siRNA相当二本鎖を生成した場合のポジティブコントロールを示す。

[0067] （実施例3）

[TWJ構造のトリガー鎖に結合するポリヌクレオチドの長さの評価]

図1に示す三方向ジョイント構造を有するTWJ構造体を作製し、mRNA相当配列の長さが、TWJ構造体の崩壊に対する、mRNA相当配列の長さの影響を検討した。具体的には、エフェクター鎖として、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth fa

actor: VEGF) の mRNA の一部に対応する DNA を用い、トリガー鎖として、VEGF の受容体の一つである KDR (2 型受容体) の DNA を用いた。作製したオリゴヌクレオチドの配列を表 3 に示す。各配列中のアンダーラインは、TWJ 構造体の 1 本鎖の部分または 1 本鎖の部分の相補鎖を意味する。

[表3]

TWJ	配列 (5'-3')	塩基数
エフェクター鎖	5'- <u>ggtatccggactggtagccgctt</u> -3'	23 (配列番号12)
サポート鎖	5'-gatgagatcgagtacatcttaccagtcggata-3'	33 (配列番号13)
トリガー鎖	5'-aagcggctaagatgactcgaatc <u>atcagggtactcctggaag</u> -3'	44 (配列番号14)
(underlineはTWJ一本鎖部分)		
mRNA相当鎖 (5'-3')		
16nt	<u>cttccaggagtaccctgatgagatcgagtacatctt</u>	36 (配列番号15)
12nt	<u>caggagtaccctgatgagatcgagtacatctt</u>	32 (配列番号16)
08nt	<u>agtaccctgatgagatcgagtacatctt</u>	28 (配列番号17)
04nt	<u>ccctgatgagatcgagtacatctt</u>	24 (配列番号18)
00nt	<u>gatgagatcgagtacatctt</u>	20 (配列番号19)
(underlineはTWJ一本鎖部分の相補鎖)		

[0068] 図5は、長さの異なる mRNA 相当配列が、TWJ 構造体の崩壊に及ぼす影響を評価した結果を示す図である。まず、図5に示すように、mRNA 相当配列の長さ n が異なる ($n=0, 4, 8, 12, 16$) mRNA 相当配列と TWJ 構造体とを $1 \mu\text{M}$ ずつ混合し、30分後 Native-PAGE によって分析した。図5は、Native-PAGE の結果を示す写真である。図中、Mレーンは標準物質を、TWJレーンは、TWJ 構造体自体を、 $n=0, 4, 8, 12, 16$ レーンはそれぞれ mRNA 相当配列の長さが異なるものと TWJ 構造体とを混合して反応させたものを電気泳動させた結果を示す。

[0069] 図5から、 $n=0$ のときは、TWJ 構造体が全く崩壊しなかったことがわかる。すなわち、mRNA 相当鎖が、トリガー鎖の有する、サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を認識できないため、TWJ 構造体が全く崩壊しなかった。

[0070] 図5から、 $n = 4$ のときは、TWJ構造体（図中、「A」で示す）とTWJ構造体の崩壊断片（図中、「B」で示す）の両方のバンドが観察された。このことから、 $n = 4$ のときは、TWJ構造体のトリガー鎖とmRNA相当鎖との結合が十分でなく、TWJ構造体を完全に崩壊することができないことがわかった。この結果、 $n = 4$ 程度であれば、TWJ構造体の崩壊をコントロールすることができることがわかる。

図5から、 $n = 8$ 以上のときは、TWJ構造体は完全に崩壊していることがわかる。

[0071] （実施例4）

[一塩基置換認識能の評価]

図1に示す三方向ジョイント構造を有するTWJ構造体を作製し、mRNA相当配列の長さが、一塩基置換認識能に対する、mRNA相当配列の長さの影響を検討した。具体的には、エフェクター鎖として、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor：VEGF）のmRNAの一部に対応するDNAを用い、トリガー鎖として、VEGFの受容体の一つであるKDR（2型受容体）のDNAを用いた。作製したオリゴヌクレオチドの配列を表4に示す。各配列中のアンダーラインは、TWJ構造体の1本鎖の部分または1本鎖の部分の相補鎖を意味する。

[表4]

TWJ	配列(5'-3')	塩基数
エフェクター鎖	5'-ggatccggactgtagccgctt-3'	23(配列番号20)
サポート鎖	5'-gatgagatcgagtacatcttaccagtcggata-3'	33(配列番号21)
トリガー鎖	5'-aagcggctaagatgtactcgatctcatcagggtactcctggaag-3'	44(配列番号22)
(underlineはTWJ一本鎖部分)		
mRNA相当鎖(5'—3')		
16nt	<u>cttccaggagtaccct</u> gatgagatcgagtacatctt	36(配列番号23)
16nt01mut	<u>cttccaggagtacc</u> Agatgagatcgagtacatctt	36(配列番号24)
16nt03mut	<u>cttccaggagtac</u> Gctgatgagatcgagtacatctt	36(配列番号25)
16nt-01mut	<u>cttccaggagtaccct</u> Catgagatcgagtacatctt	36(配列番号26)
16nt-03mut	<u>cttccaggagtaccct</u> gaAgatgagatcgagtacatctt	36(配列番号27)
08nt	<u>agtaccct</u> gatgagatcgagtacatctt	28(配列番号28)
08nt01mut	<u>agtacc</u> Agatgagatcgagtacatctt	28(配列番号29)
08nt03mut	<u>agtac</u> Gctgatgagatcgagtacatctt	28(配列番号30)
00nt	gatgagatcgagtacatctt	20(配列番号31)
(underlineはTWJ一本鎖部分の相補鎖, 大文字は一塩基置換の部位)		

[0072] 図6は、長さの異なるmRNA相当配列が、一塩基置換認識能に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である。まず、図6に示すように、mRNA相当配列の長さn（nは、トリガー鎖1のt1-2部位に結合するmRNAの部位）と一塩基置換の位置が異なるmRNA相当配列とTWJ構造体とを1μMずつ混合し、30分後Native-PAGEによって分析した。結果を、図6に示す。図6は、Native-PAGEの結果を示す写真である。図中、Mレーンは標準物質を、TWJレーンは、TWJ構造体自体を、各レーンにおいて、上側の数字は、nの長さを、下側の数字は、一塩基置換の位置を示す。また、「-」は、一塩基置換を含まないものを示す。一塩基置換の位置を示す数字で、正の数字は、トリガー鎖1のt1-2部位に結合するmRNAの部位に一塩基置換が存在することを、負の数字は、トリガー鎖1のt1-1部位に結合するmRNAの部位に一塩基置換が存在することを意味する。また、正負は、トリガー鎖1のt1-1部位とt1-2部位との境から起算する。

[0073] 図6から、n=8のときは、一塩基置換の位置（1の位置）によってTW

J構造体が崩壊することがわかる。一塩基置換の位置が3の位置にあるときは、TWJ構造体は崩壊していない。一方、 $n=16$ のときは、一塩基置換の位置に関わらず、TWJ構造体が崩壊することがわかる。すなわち、mRNA相当鎖のトリガー鎖と相補的に結合する部位の長さが $n=8$ 程度であれば、一塩基置換認識能があることがわかった。

[0074] (実施例5)

[一塩基置換認識能の位置特異性の評価]

図1に示す三方向ジョイント構造を有するTWJ構造体を作製し、mRNA相当配列に含まれる一塩基置換の位置が、一塩基置換認識能に対する、影響を検討した。具体的には、エフェクター鎖として、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) のmRNAの一部に対応するDNAを用い、トリガー鎖として、VEGFの受容体の一つであるKDR (2型受容体) のDNAを用いた。作製したオリゴヌクレオチドの配列を表5に示す。各配列中のアンダーラインは、TWJ構造体の1本鎖の部分または1本鎖の部分の相補鎖を意味する。

[表5]

TWJ	配列(5'-3')	塩基数	
エフェクター鎖	5'- <u>ggatccggactgtagccgctt</u> -3'	23 (配列番号32)	
サポート鎖	5'-gatgagatcga ^A gtacatcttaccagtccgata-3'	33 (配列番号33)	
トリガー鎖	5'-aagcggctaagatg ^T actcga ^T tcatcagggtactcctggaag-3'	44 (配列番号34)	
(underlineはTWJ一本鎖部分)			
mRNA相当鎖(5'-3')			レーン
08nt00	<u>agtaccctgatgagatcga</u> gtacatctt	28 (配列番号35)	match
08nt01 mut	<u>agtacc</u> ^A gatgagatcga ^A gtacatctt	28 (配列番号36)	1
08nt02 mut	<u>agtacc</u> ^G gatgagatcga ^G gtacatctt	28 (配列番号37)	2
08nt02 mutT	<u>agtacc</u> ^T gatgagatcga ^T gtacatctt	28 (配列番号38)	2'
08nt03 mut	<u>agtac</u> ^G ctgatgagatcga ^G gtacatctt	28 (配列番号39)	3
08nt04 mut	<u>agta</u> ^G cctgatgagatcga ^G gtacatctt	28 (配列番号40)	4
08nt04 mutT	<u>agta</u> ^T cctgatgagatcga ^T gtacatctt	28 (配列番号41)	4'
08nt05 mut	<u>agt</u> ^T ccctgatgagatcga ^T gtacatctt	28 (配列番号42)	5
08nt06 mut	<u>agA</u> accctgatgagatcga ^A gtacatctt	28 (配列番号43)	6
08nt07 mut	<u>a</u> Ctaccctgatgagatcga ^C gtacatctt	28 (配列番号44)	7
08nt08 mut	<u>T</u> gtaccctgatgagatcga ^T gtacatctt	28 (配列番号45)	8
(underlineはTWJ一本鎖部分の相補鎖, 大文字は一塩基置換の部位)			

[0075] 図7は、一塩基置換の位置が異なるmRNA相当配列が、一塩基置換認識能に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である。まず、表5に示すようにmRNA相当配列の長さ $n=8$ (n は、トリガー鎖1のt1部位に結合するmRNAの部位)であり、塩基置換の位置が異なるmRNA相当配列とTWJとを $1\mu\text{M}$ ずつ混合し、30分後Native-PAGEによって分析した。結果を、図7に示す。図7中、matchは、トリガー鎖1のt1部位と相補的に結合するmRNA相当配列を、1~8は、表5に示す一塩基置換体を、2'、4'は、2、4の一塩基置換体と同一の位置で異なるリボ核酸を導入した一塩基置換体を示す。

[0076] 図7から、 $n=8$ のときは、一塩基置換が3の位置の置換体は、TWJ構造体が崩壊していないことがわかる。一塩基置換が1、2の位置の置換体は、TWJ構造体が残存しているが、TWJ構造体がほぼ崩壊していることがわかる。このことから、一塩基置換の位置にもよるが、TWJ構造体を用いれば、一塩基置換認識能があることがわかった。

[0077] 表5に示すTWJ構造体のトリガー鎖において、表6に示すようにmRNA相当配列の位置3に相補的なトリガー鎖を作製して、上記と同様の実験を行った。配列中のアンダーラインは、TWJ構造体の1本鎖の部分を意味する。

[表6]

改変トリガー鎖 5'-aagcggctaagatgtactcgatctcatcagCgtactcctggaag-3' 44(配列番号46)

[0078] 図8は、一塩基置換の位置が3であるmRNA相当配列とこれに相補的な配列を有するトリガー鎖が、TEJ構造体崩壊に及ぼす影響を評価した結果を示す写真である。図8中、Mレーンは標準物質を、レーン1は、TWJ構造体を、レーン2は、TWJ構造体とmRNA相当配列とを混合して反応させたものを示す。図8から、TWJ構造体が崩壊していることがわかる。す

なわち、TWJ構造体を用いれば、一塩基置換認識能があることがわかった。

[0079] (実施例6)

[細胞選択性の評価]

(カスパーゼ8またはカスパーゼ3のsiRNAによるノックダウンの確認)

Fasリガンドは受容体Fasに結合すると細胞にアポトーシスを誘導するサイトカイン=デス因子である。具体的には、Fasリガンドは細胞表面層の受容体Fasに結合して、カスパーゼ8を活性化する。次にカスパーゼ8はカスパーゼ3を活性化し、アポトーシスを引き起こす。このとき、カスパーゼ8または3が細胞内になれば、この細胞はFasリガンドによるアポトーシスに耐性となる。

[0080] ヒト培養細胞株HEK293T (GFP (緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein)) 非発現株) およびそれにGFPを恒常発現させた株 (GFP発現株) を用い、表7に示すカスパーゼ8および3に対するsiRNA (siCasp8およびsiCasp3、各33 microm)、コントロールとしてGFPに対するsiRNA (siGFP、33 microm)、トランスフェクション剤だけ (Lipo)、無添加 (none) をそれぞれの細胞株にトランスフェクションした。2日後、Fasリガンドを (25 ng/ml) を添加した。1日後、細胞の生死をWSTで常法によりアッセイした。

[表7]

siCasp8 (下記のパッセンジャー鎖とガイド鎖をアニーリングさせてある)
ヒトカスパーゼ8 パッセンジャー鎖 5'-GGAGCUGCUCUCCGAAUUTT-3' T: deoxyThymidine (配列番号47)
ヒトカスパーゼ8 ガイド鎖 5'-AAUUCGGAAGAGCAGCUCCCC-3' (配列番号48)

siCasp3 (下記のパッセンジャー鎖とガイド鎖をアニーリングさせてある)
ヒトカスパーゼ3 パッセンジャー鎖 5'-CUGGACUGUGGCAUUGAGAUU-3' (配列番号49)
ヒトカスパーゼ3 ガイド鎖 5'-UCUCA AUGCCACAGUCCAGCG-3' (配列番号50)

[0081] 図9は、GFP発現株とGFP非発現株において、カスパーゼに対するsiRNAの効果を評価したグラフである。図中、横軸において、FasL+はFasリガンドを添加したもの、FasL-はFasリガンドを添加しなかったものを示し、縦軸は細胞のWST活性を示す。図9から、GFP発現、非発現株にかかわらず、Fasリガンドを入れた細胞のWST活性は入れない場合の半分以下であった。一方、カスパーゼに対するsiRNAを入れた場合もGFP発現、非発現株にかかわらず、Fasリガンドを入れない場合とほぼ同等であった。すなわち、カスパーゼに対するsiRNAは細胞内でカスパーゼのmRNAをノックダウンしていることが示唆された。

[0082] (TWJ構造体の設計)

GFPのmRNAを認識する部位を有するトリガー鎖と、カスパーゼ8または3に対するsiRNAを放出するエフェクター鎖(下記表8に示す「ガイド鎖」)を有するTWJ構造体を設計した。このTWJ構造体を用いると、細胞がGFPを発現していると、GFP mRNAによって、TWJ構造体が崩壊し、カスパーゼ8または3に対するsiRNAを放出し、カスパーゼ8または3をノックダウンする。これにより、Fasリガンドによるアポトーシス誘導に耐性となる。一方、GFP非発現細胞ではGFP mRNAが存在しないので、TWJ構造体は崩壊しない。すなわち、siRNAは放出せず、アポトーシスに感受性である。このため、Fasリガンドによって細胞死が起こる。

[0083] 具体的には、表8に示す配列を有するTWJ構造体を作製した。トリガー鎖は、GFP mRNAの219-240または543-565の位置と相補的になるようにしてあり、これらの部位に反応して崩壊する。これらの組み合わせで、計4種類のTWJ構造体を設計した。表中、TWJ casp8 219とは、図10に示すように、GFP mRNA 219-に反応し、カスパーゼ8のsiRNAを放出するTWJ構造体を意味する。

[表8]

ヒトカスパーゼ8パッセンジャー鎖 5'-GGAGCUGCUCUCCGAAUUTT-3' T: deoxyThymidine (配列番号51)

ヒトカスパーゼ3パッセンジャー鎖 5'-CUGGACUGUGGCAUUGAGAUAU-3' (配列番号52)

ヒトカスパーゼ8ガイド鎖 5'-AAUUCGGAAGAGCAGCUCCCC-3' (配列番号53)

ヒトカスパーゼ3ガイド鎖 5'-UCUCAUUGCCACAGUCCAGCG-3' (配列番号54)

・TWJcasp8 219(下記の鎖と上記カスパーゼ 8 ガイド鎖を混ぜ、電気泳動で精製したもの)

GFP219tohCasp8サポート鎖 cccgaccacatgaaggctcttccgaattt (配列番号55)

GFP219tohCasp8トリガー鎖 ggggagctcttcatgtgtcgggtagcgggt (配列番号56)

・TWJcasp8 543(下記の鎖と上記カスパーゼ 8 ガイド鎖を混ぜ、電気泳動で精製したもの)

GFP543tohCasp8サポート鎖 cagcagaacacccccagctcttccgaattt (配列番号57)

GFP543tohCasp8トリガー鎖 ggggagcttgggggtgttctgctgtagtgga (配列番号58)

・TWJcasp3 219(下記の鎖と上記カスパーゼ 3 ガイド鎖を混ぜ、電気泳動で精製したもの)

GFP219tohCasp3サポート鎖 cccgaccacatgaagtgtggcattgagat (配列番号59)

GFP219tohCasp3トリガー鎖 cgtggaccttcatgtgtcgggtagcgggt (配列番号60)

・TWJcasp3 543(下記の鎖と上記カスパーゼ 3 ガイド鎖を混ぜ、電気泳動で精製したもの)

GFP543tohCasp3サポート鎖 cagcagaacacccccatgtggcattgagat (配列番号61)

GFP543tohCasp3トリガー鎖 cgctggactgggggtgttctgctgtagtgga (配列番号62)

[0084] (TWJ構造体による細胞選択的生存)

ヒト培養細胞株HEK293T(GFP非発現株)およびそれにGFPを恒常発現させた株(GFP発現株)を用い、4種類のTWJ構造体+パッセンジャー鎖(各33 μM)、コントロールとしてトランスフェクション剤だけ(Lipo)、無添加(none)をそれぞれの細胞株にトランスフェクションした。2日後、FasLigandを(25 ng/ml)を添加した。1日後、細胞の生死をWSTで常法によりアッセイした。結果を図11に示す。

[0085] 図11は、GFP発現株とGFP非発現株において、カスパーゼに対するsiRNAを放出するTWJ構造体の効果を評価したグラフである。図中、横軸において、FasL+はFasリガンドを添加したもの、FasL-はFasリガンドを添加しなかったものを示し、縦軸は細胞のWST活性を示す。図11から、GFP非発現株では、TWJ構造体の有無にかかわらず、Fasリガンドを添加するとアポトーシスが誘導し、WST活性は半分程度

になった。一方、GFP発現株ではTWJ構造体を入れないコントロールでは同様にアポトーシスが誘導された。しかし、TWJ構造体添加後、Fasリガンドを入れたものは(TWJ casp3 219を除き)細胞が死んでおらず、アポトーシスしていない、すなわち選択的に生存していることがわかった。

[0086] 以上より、本発明のTWJ構造体を用いると、GFP mRNAがあると生存し、ないとアポトーシスが誘導され死に至るという細胞選択性を有することが示された。

符号の説明

- [0087]
- 1 トリガー鎖
 - 2 エフェクター鎖
 - 2' エフェクター鎖に相補的なオリゴヌクレオチド
 - 3 サポート鎖
 - 4 トリガー鎖に相補的に結合する部位を有するポリヌクレオチド

請求の範囲

- [請求項1] トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、
- 前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、
- 前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する、オリゴヌクレオチド構造体。
- [請求項2] 前記三方向ジョイント構造は、前記トリガー鎖に結合する前記他のポリヌクレオチドにより崩壊する、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド構造体。
- [請求項3] 前記エフェクター鎖は、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有する、請求項1または2に記載のオリゴヌクレオチド構造体。
- [請求項4] 前記エフェクター鎖は、相補性を有するオリゴヌクレオチドと二本鎖を形成する、請求項1ないし3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド構造体。
- [請求項5] 前記トリガー鎖が結合する他のポリヌクレオチドの配列がそれぞれ異なるトリガー鎖を有する二種類のオリゴヌクレオチド構造体から、得られるエフェクター鎖同士から二本鎖を形成する、請求項1ないし3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド構造体。
- [請求項6] 前記他のポリヌクレオチドの配列が異なる遺伝子由来のものである、請求項5に記載のオリゴヌクレオチド構造体。
- [請求項7] トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する、オリゴヌクレオチド

構造体を細胞、あるいは組織に導入し、

他のポリヌクレオチドが存在する細胞、あるいは組織においてのみ、前記三方向ジョイント構造の崩壊を生じさせ、1本鎖エフェクター鎖を得る、

遺伝子発現抑制方法。

[請求項8] 前記エフェクター鎖は、標的遺伝子または標的遺伝子転写産物の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有する、請求項7に記載の遺伝子発現抑制方法。

[請求項9] 前記オリゴヌクレオチド構造体と共に、このオリゴヌクレオチド構造体のエフェクター鎖と相補的に結合するオリゴヌクレオチドを導入し、

前記三方向ジョイント構造の崩壊を生じた細胞、あるいは組織内で、生じた1本鎖エフェクター鎖とオリゴヌクレオチドとが二本鎖を形成する、請求項7または8に記載の遺伝子発現抑制方法。

[請求項10] エフェクター鎖の塩基配列が同一で、トリガー鎖が認識する他のポリヌクレオチドが異なる二種類のオリゴヌクレオチド構造体を細胞、あるいは組織に導入し、

前記トリガー鎖が認識する他のポリヌクレオチドが二種類存在する細胞、あるいは組織においてのみ、前記二種類のオリゴヌクレオチド構造体の三方向ジョイント構造を崩壊させ、

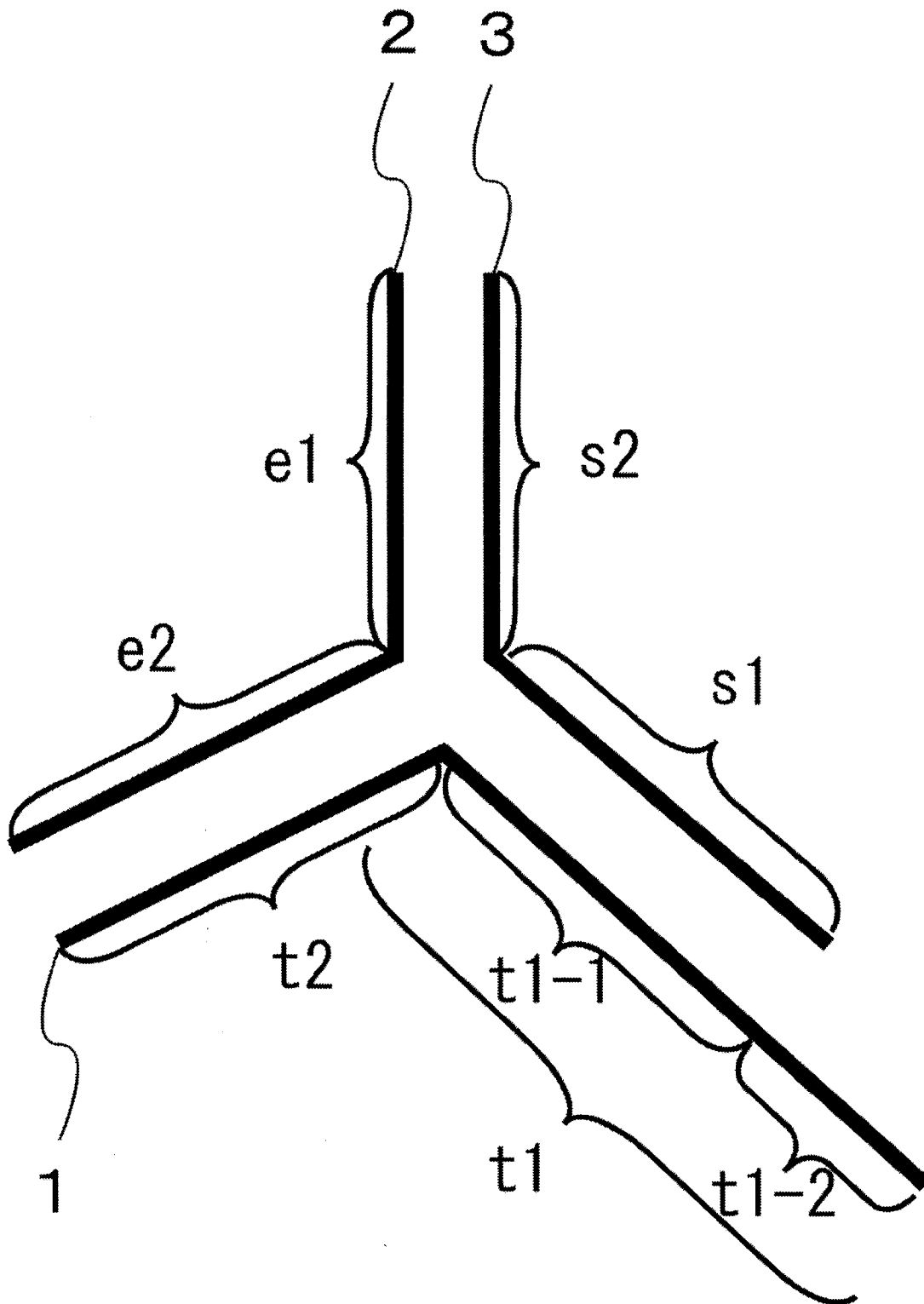
生じたエフェクター鎖同士が二本鎖を形成する、請求項9に記載の遺伝子発現抑制方法。

[請求項11] トリガー鎖と、エフェクター鎖と、サポート鎖との3本のオリゴヌクレオチドで構成され、前記3本のオリゴヌクレオチドは、それぞれの鎖が、他の2本の鎖と結合して三方向ジョイント構造を形成し、前記トリガー鎖は、前記サポート鎖の結合している部位の外側に他のポリヌクレオチドの配列を認識する部位を有する、オリゴヌクレオチド構造体と、他のポリヌクレオチドまたは他のポリヌクレオチドの一塩

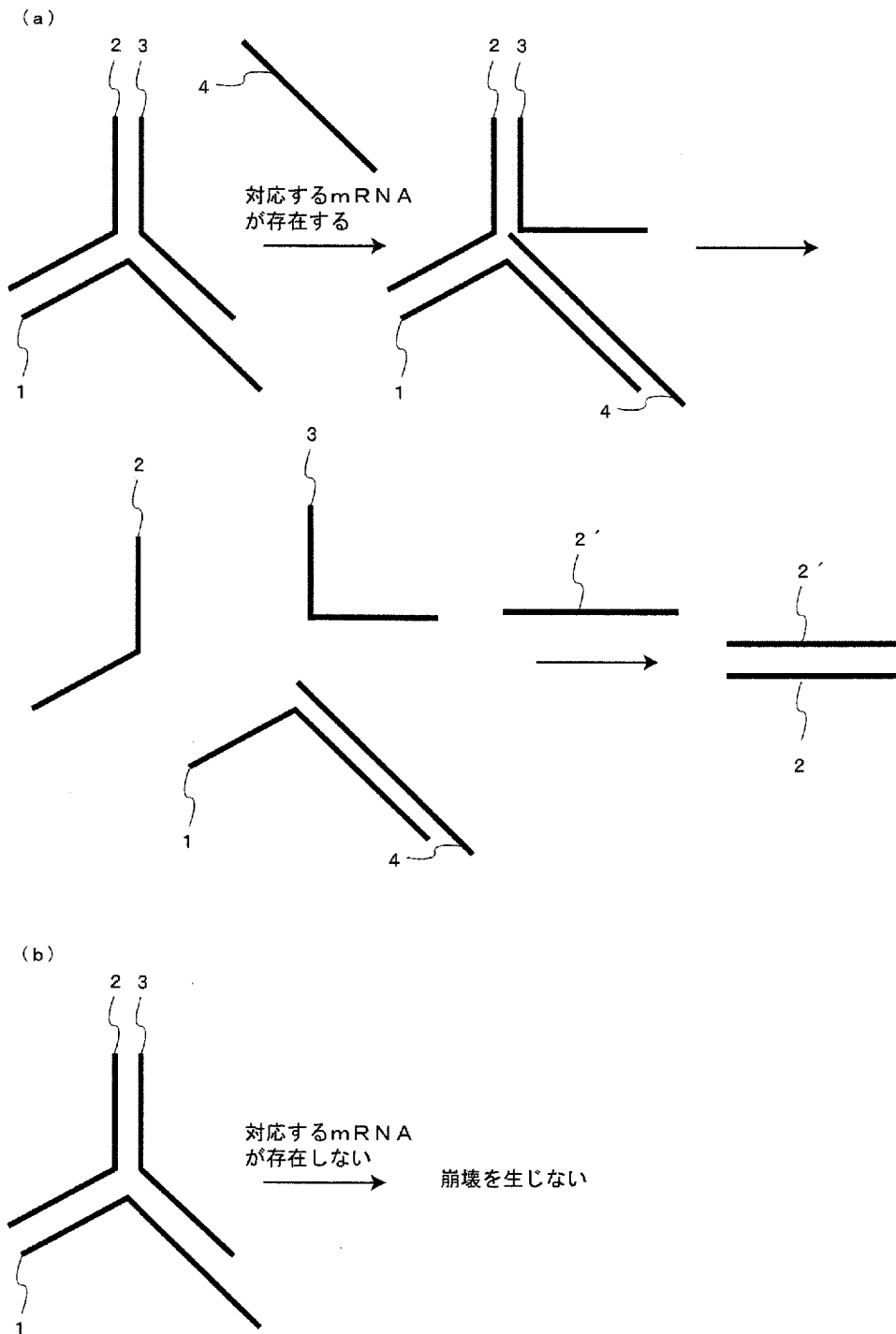
基置換体とを混合し、

前記オリゴヌクレオチド構造体の崩壊の有無により、他のポリヌクレオチドの一塩基置換体を検出する、一塩基置換体の検出方法。

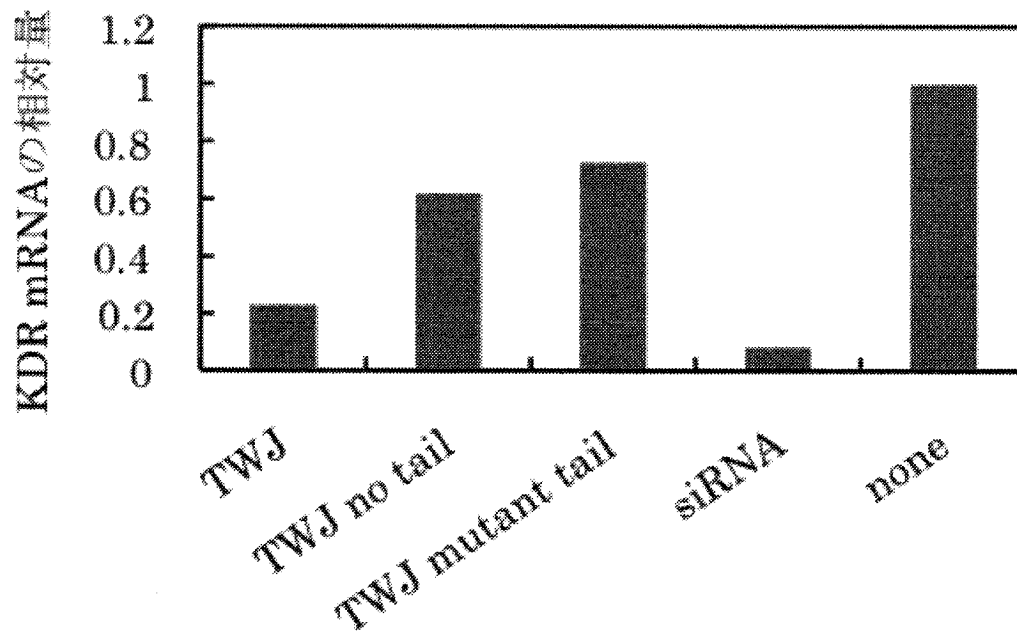
[図1]



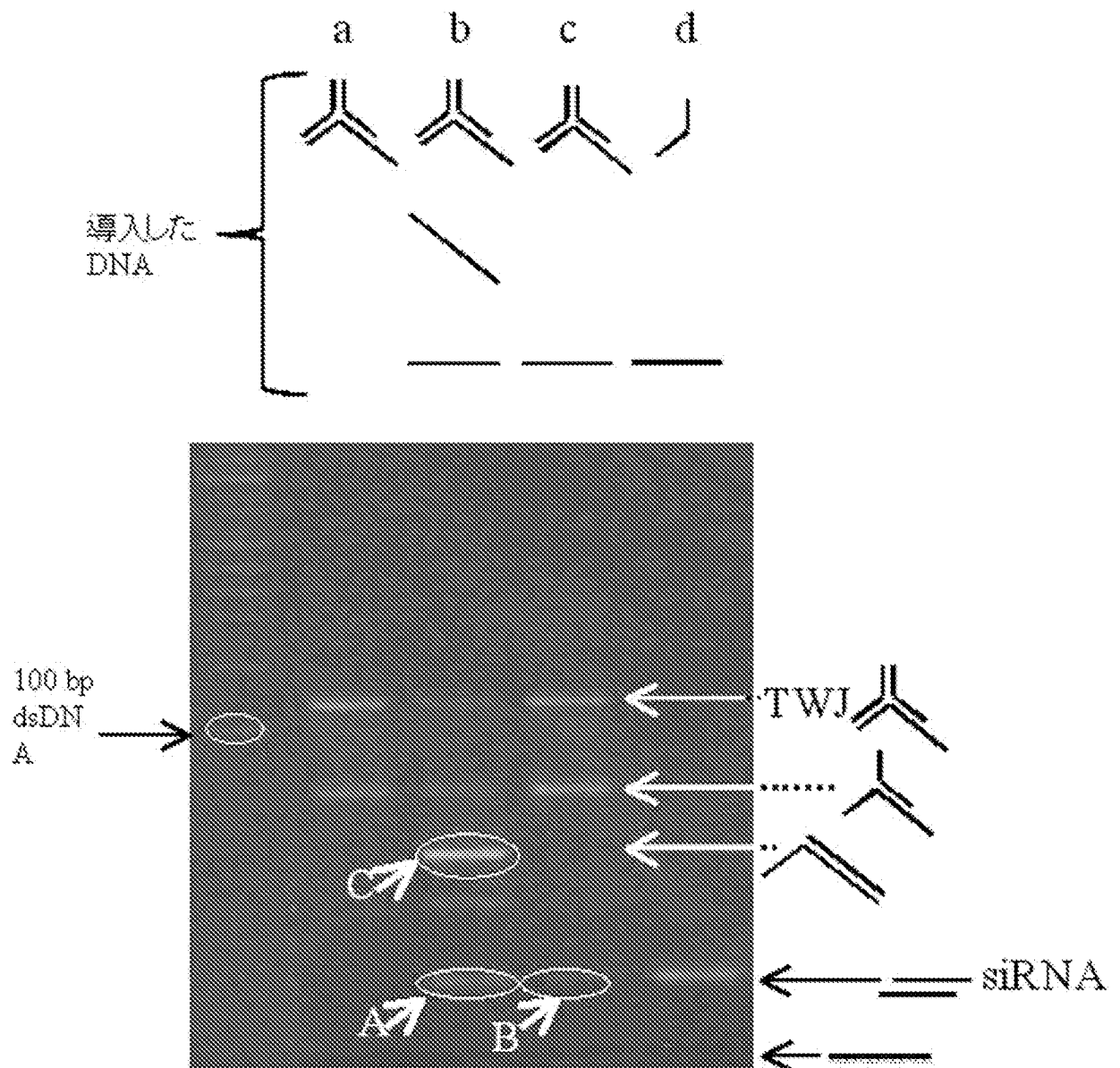
[図2]



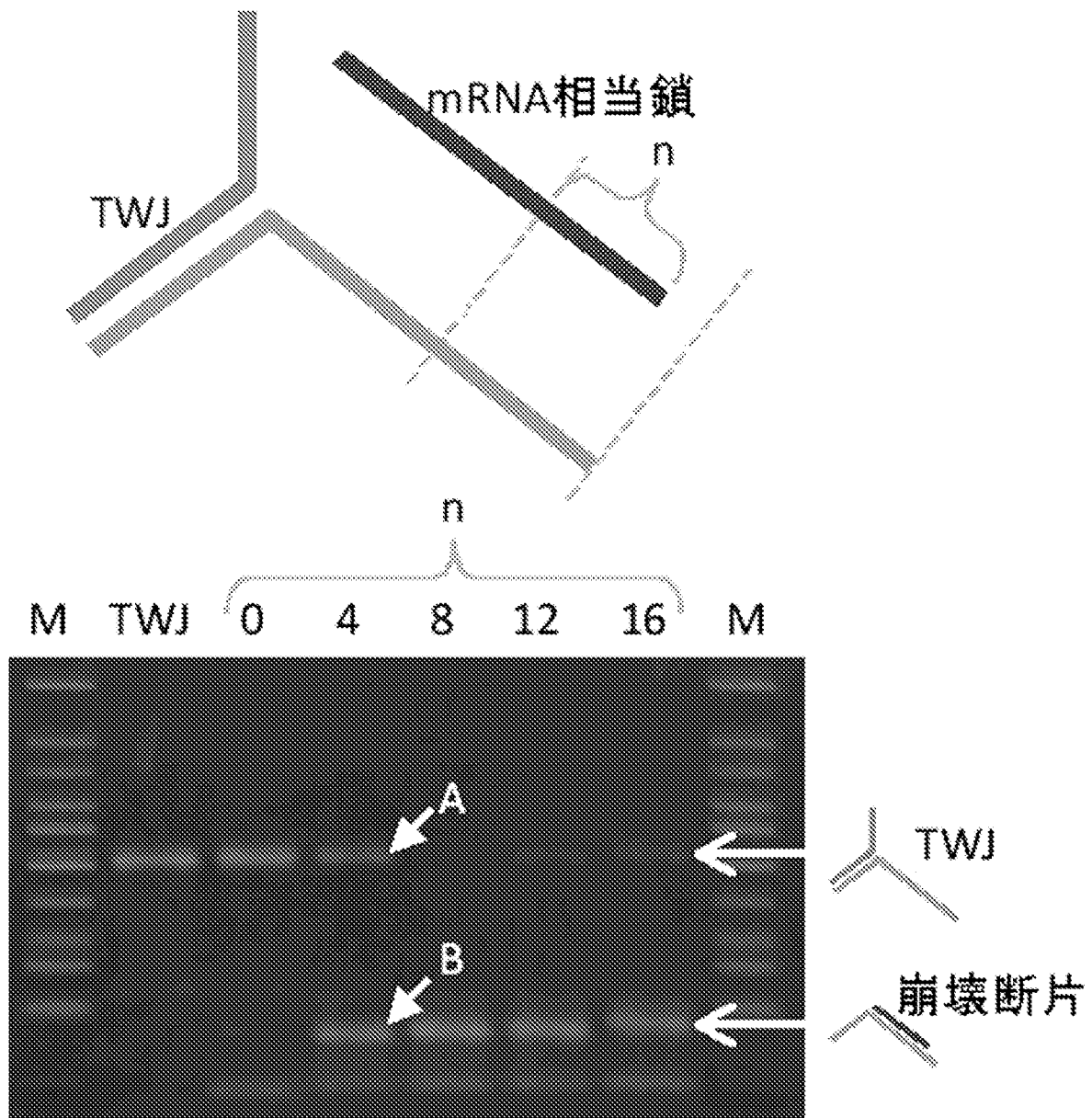
[図3]



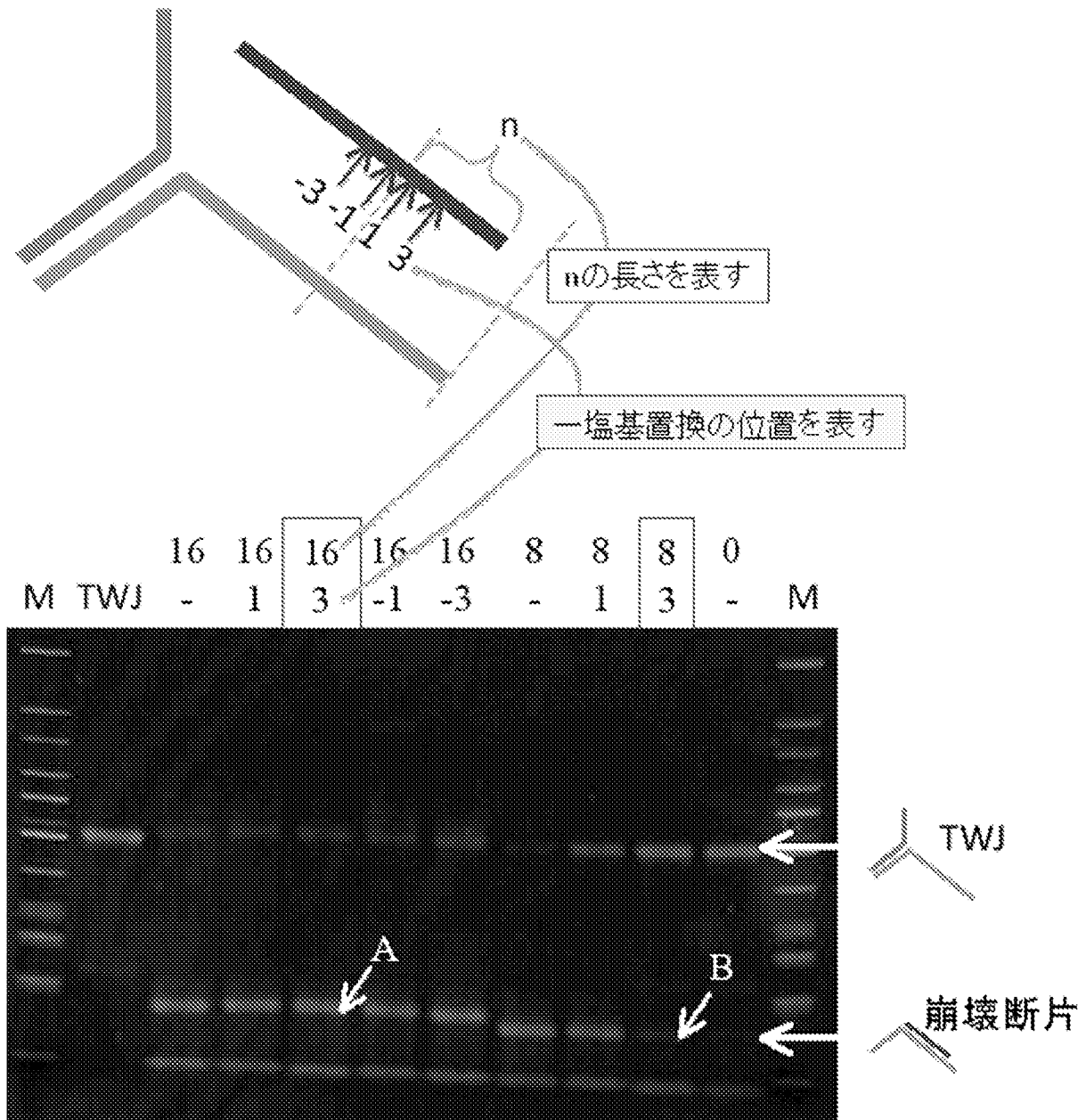
[図4]



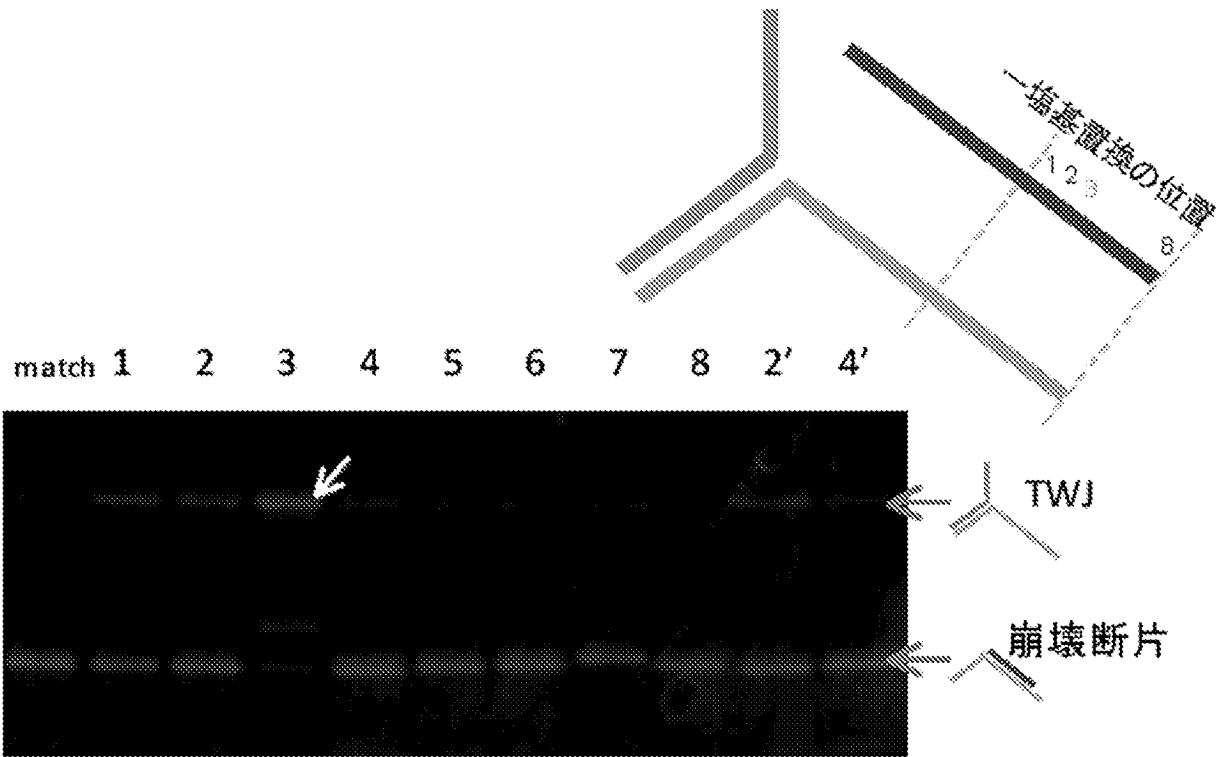
[图5]



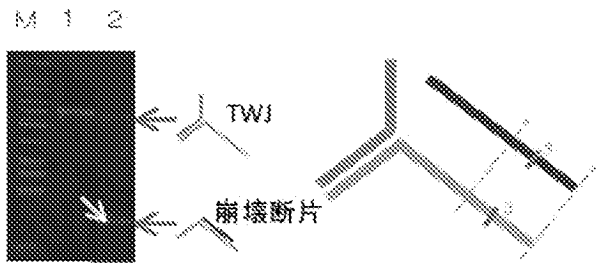
[図6]



[図7]

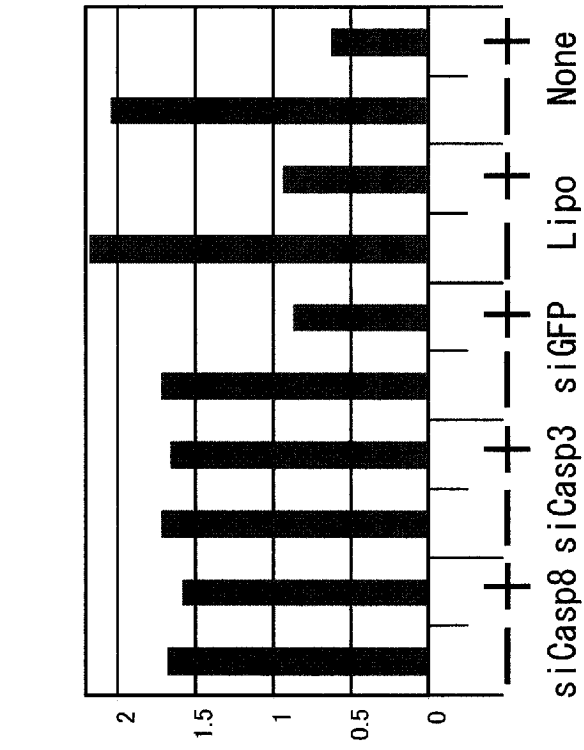


[図8]

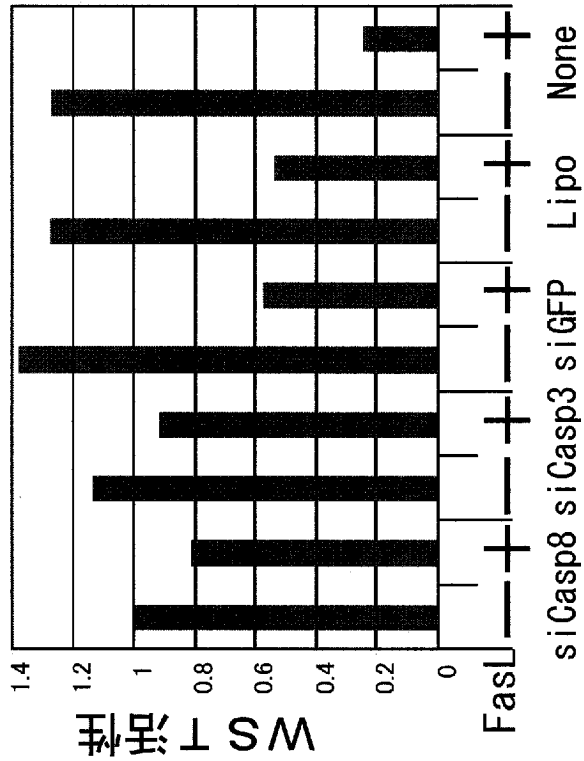


[図9]

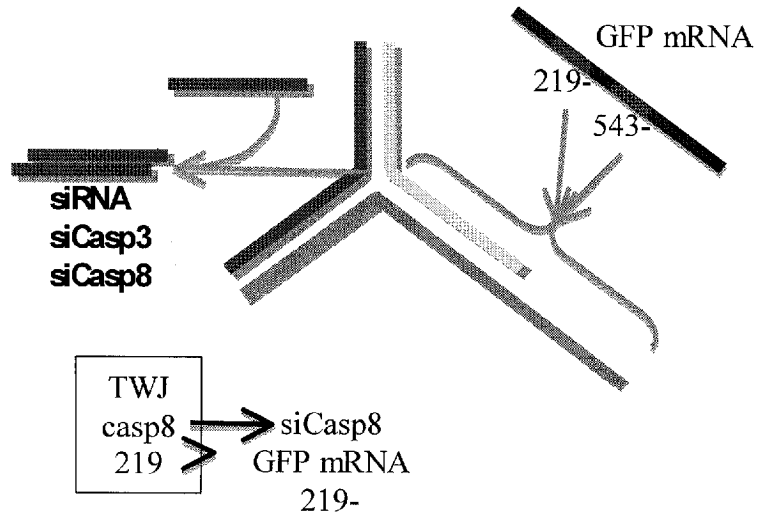
GFP非発現株



GFP発現株

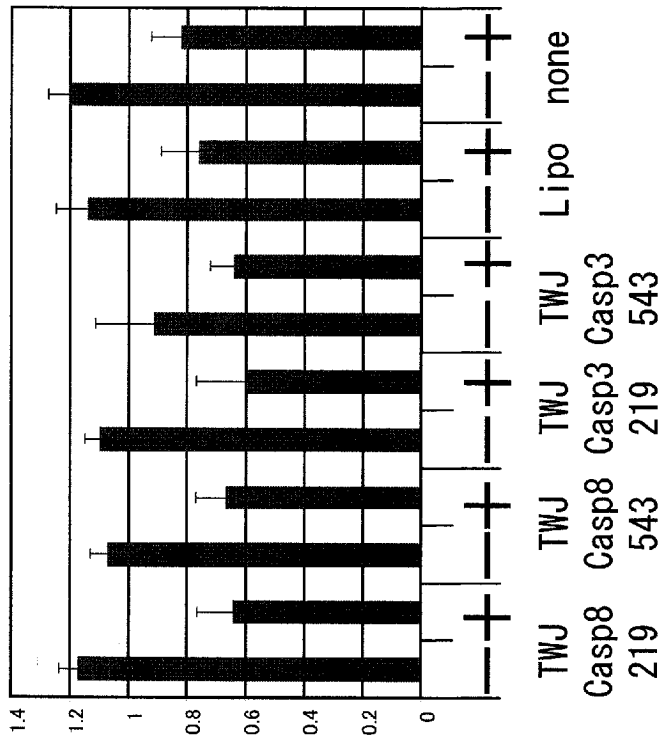


[図10]

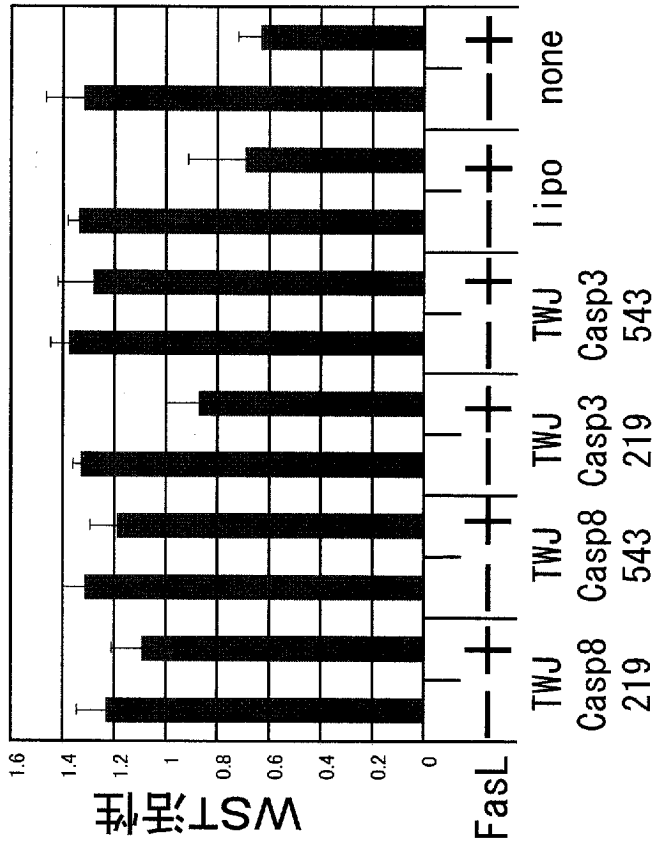


[図11]

GFP非発現株



GFP発現株



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/062535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07H21/04(2006.01) i, A61K31/7088(2006.01) i, A61K48/00(2006.01) i,
A61P35/00(2006.01) i, C07H21/02(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/68
(2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H21/04, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C07H21/02, C12N15/09,
C12Q1/68

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 1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPlus/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.
A	EP 1243659 A1 (Center for Advanced Science and Technology Incubation, Ltd.), 25 September, 2002 (25.09.02), & US 2003/0170650 A1 & WO 2001/044509 A1 & DE 60027322 D & DE 60027322 T & AU 1891701 A & CA 2394428 A	1-6, 11
A	US 2005/0019916 A1 (Milan N. Stojanovic), 27 July, 2005 (27.07.05), & US 2006/0204977 A1	1-6, 11
A	STODDARD, C.D. et al, Ligand-dependent folding of the three-way junction in the purine riboswitch, RNA, 2008 April, Vol.14, No.4, p.675-684	1-6, 11

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 30 July, 2009 (30.07.09)	Date of mailing of the international search report 11 August, 2009 (11.08.09)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/062535

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	YEH, H.-C. et al, Tunable blinking kinetics of Cy5 for precise DNA quantification and single-nucleotide difference detection, Biophysical Journal, 2008 July, Vol.95, No.2, p.729-737	1-6,11
A	ROSSI, J.J., Partnering Aptamer and RNAi Technologies, Molecular Therapy, 2006, Vol.14, No.4, p.461-462	1-6,11
A	WO 2006/001810 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), 05 January, 2006 (05.01.06), & JP 2006-528492 A & JP 2008-528037 A & US 2005/0136430 A1 & US 2005/0256071 A1 & US 2008/0234217 A1 & EP 1649019 A & EP 1841868 A & WO 2006/081546 A2 & CA 2560631 A & CN 1849396 A & CA 2595896 A	1-6,11
A	AN, C.-I. et al, Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction, RNA, 2006, Vol.12, No.5, p.710-716	1-6,11
A	WO 2006/042112 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), 20 April, 2006 (20.04.06), & JP 2008-515405 A & US 2006/0088864 A1 & EP 1799825 A & WO 2006/086669 A2 & CN 101072874 A	1-6,11
A	WO 2007/136833 A2 (CODON DEVICES, INC.), 29 November, 2007 (29.11.07), & WO 2007/136833 A3	1-6,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/062535

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.: 7-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07H21/04(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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. C07H21/04, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C07H21/02, C12N15/09, C12Q1/68

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	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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)

CAPlus/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
A	EP 1243659 A1 (Center for Advanced Science and Technology Incubation, Ltd.) 2002.09.25, & US 2003/0170650 A1 & WO 2001/044509 A1 & DE 60027322 D & DE 60027322 T & AU 1891701 A & CA 2394428 A	1-6, 11
A	US 2005/0019916 A1 (Milan N. Stojanovic) 2005.07.27, & US 2006/0204977 A1	1-6, 11

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

30.07.2009

国際調査報告の発送日

11.08.2009

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)

瀬下 浩一

4 P

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

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
A	STODDARD,C.D. et al, Ligand-dependent folding of the three-way junction in the purine riboswitch, RNA, 2008 April, Vol.14, No.4, p.675-684	1 - 6 , 1 1
P A	YEH,H.-C. et al, Tunable blinking kinetics of Cy5 for precise DNA quantification and single-nucleotide difference detection, Biophysical Journal, 2008 July, Vol.95, No.2, p.729-737	1 - 6 , 1 1
A	ROSSI,J.J., Partnering Aptamer and RNAi Technologies, Molecular Therapy, 2006, Vol.14, No.4, p.461-462	1 - 6 , 1 1
A	WO 2006/001810 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2006.01.05, & JP 2006-528492 A & JP 2008-528037 A & US 2005/0136430 A1 & US 2005/0256071 A1 & US 2008/0234217 A1 & EP 1649019 A & EP 1841868 A & WO 2006/081546 A2 & CA 2560631 A & CN 1849396 A & CA 2595896 A	1 - 6 , 1 1
A	AN,C.-I. et al, Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction, RNA, 2006, Vol.12, No.5, p.710-716	1 - 6 , 1 1
A	WO 2006/042112 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2006.04.20, & JP 2008-515405 A & US 2006/0088864 A1 & EP 1799825 A & WO 2006/086669 A2 & CN 101072874 A	1 - 6 , 1 1
A	WO 2007/136833 A2 (CODON DEVICES, INC.) 2007.11.29, & WO 2007/136833 A3	1 - 6 , 1 1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 7-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項7-10は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。