

(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3月11日(11.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2010/026660 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/713 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/066155
- (22) 国際出願日: 2008年9月8日(08.09.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人福岡大学(Fukuoka University) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 白澤 専二(SHIRASAWA, Senji) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 藤本 崇宏(FUJIMOTO, Takahiro) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 角田 俊之(TSUNODA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 土井 圭子(DOI, Keiko) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 小柳 緑(KOYANAGI, Midori) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 筒井 知, 外(TSUTSUI, Satoru et al.); 〒8120011 福岡県福岡市博多区博多駅前3-30-15 ライオンズマンション博多1308号 Fukuoka (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, 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.
- (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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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: RNA CAPABLE OF INHIBITING EXPRESSION OF ZFAT GENE

(54) 発明の名称: Z F A T 遺伝子発現抑制RNA

(57) Abstract: Disclosed is RNA capable of inhibiting the expression of ZFAT gene, which is siRNA composed of sense RNA for a sequence comprising contiguous 20 to 30 nucleotides, preferably 23 to 27 nucleotides, lying within ZFAT mRNA and antisense RNA for a sequence complementary to the aforementioned sequence, or shRNA comprising double-stranded RNA (dsRNA) formed by linking the sense RNA to the antisense RNA via a loop sequence. The RNA capable of inhibiting the expression of ZFAT gene can decrease the cell growth rate of a cancer cell or the like and induce the apoptosis of a cell such as a cancer cell through the inhibition of the expression of ZFAT gene. The RNA can also inhibit an immune response through the inhibition of the expression of ZFAT gene. Therefore, the RNA is particularly useful for the development of a molecule-targeting therapeutic agent for a cancer cell or an immunosuppressant agent.

(57) 要約: この発明に係る Z F A T 遺伝子発現抑制RNAは、Z F A T mRNAの連続する20~30塩基、好ましくは23~27塩基の配列のセンスRNAおよび該配列と相補的な配列のアンチセンスRNAからなるsiRNAまたは該センスRNAと該アンチセンスRNAとをループ配列で結合した2本鎖RNA(dsRNA)からなるshRNAである。この発明のZ F A T 遺伝子発現抑制RNAは、Z F A T 遺伝子の発現を抑制することにより、癌細胞等の細胞増殖率を減少すると共に、癌細胞等の細胞のアポトーシスを誘導し、またZ F A T 遺伝子の発現抑制により、免疫応答の阻害をする。したがって、この発明のZ F A T 遺伝子発現抑制RNAは、特に癌細胞に対する分子標的治療薬または免疫抑制剤の開発に有用である。



WO 2010/026660 A1

## 明 細 書

## ZFAT遺伝子発現抑制RNA

## 技術分野

[0001] この発明は、ZFAT遺伝子発現抑制RNAに関し、更に詳細には、細胞の増殖抑制またはアポトーシス(細胞死)を誘導するZFAT遺伝子の発現抑制RNAならびにそれを含む発現ベクター、およびそれらを用いたZFAT遺伝子の発現抑制方法ならびにZFAT遺伝子発現抑制による細胞の増殖抑制方法またはアポトーシス誘導方法、およびZFAT遺伝子の発現抑制RNAを含む医薬組成物に関するものである。

## 背景技術

[0002] 細胞の増殖・アポトーシス・分化などに関わる分子の同定および分子機序の理解は、細胞の悪性化とその細胞病態の理解に通じるものがある。特定の遺伝子あるいはシグナル経路を絞った分子機能改変(分子標的)は、細胞の動態を人為的に制御し、病態を正常化する方法の一つである。

[0003] これまで抗がん剤としては天然物質や化合物などが使用されているが、欠点としては、がん細胞ばかりではなく、正常細胞にも作用することにより引き起こされる重篤な副作用が挙げられる。近年では、副作用軽減のための分子標的薬の臨床応用が試みられているが、未だ効果・副作用の面から十分な薬剤は開発されていないのが現状である。

[0004] 自己免疫甲状腺疾患関連遺伝子として同定された遺伝子ZFAT(zinc-finger gene in autoimmune thyroid disease susceptibility region;別名ZNF406)は、1243アミノ酸残基からなる蛋白質をコードし、1個のATフックドメインと18個のZnフィンガードメインを有するZnフィンガー蛋白質である。マウス組織におけるZFAT蛋白質の分布は、胸腺と脾臓に強く発現し、発現細胞はBリンパ球とTリンパ球に限られているという特徴がある(非特許文献1)。しかし、ZFAT蛋白質の機能については未だ明らかとなっていない。

[0005] 有効な遺伝子機能解析方法としてRNAi(RNA interference)が注目されている。このRNAiは、遺伝子と相同な、センスRNAとアンチセンスRNAからなる2本鎖RN

A(double-stranded RNA:dsRNA)が、その遺伝子の転写産物(mRNA)相同部分を破壊し、それと同じ配列を持つ遺伝子の発現、つまりタンパク質合成を抑制する現象である(例えば、非特許文献2、3、4参照)。つまり、このRNAiは、配列が知られている標的遺伝子のmRNAをノックアウト(破壊)することによりその遺伝子の機能を探索することができる画期的な方法といえる。

[0006] また、このRNAiは、細胞レベルで確認できるため、動物を使用して確認する従来の遺伝子ノックアウト法に比べ、非常に簡単でかつ安価であり、その上短時間で結果が得られるという大きな利点がある。さらに、RNAi法は、その他にも、低濃度でも効果が期待でき、またmRNAを破壊するだけであるので、ゲノム遺伝子そのものには全く影響を及ぼさない、などの利点もある。

非特許文献1:Koyanagi, M., Nakabayashi, K., Fujimoto, T., Gu, N., Baba, I., Takashima, Y., Doi, K., Harada, H., Kato, N., Sasazuki, T., and Shirasawa, S. (2008) Genomics 91, 451-457

非特許文献2:Fire, A/, et al: Nature (1998) 391:806-811

非特許文献3:Ui-Tei, K., , et al:FEBS Lett (2000) 479:79-82

非特許文献4:Elbashir S M., et al:Nature (2001) 411:494-498

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] そこで、本発明者らは、ZFAT遺伝子について鋭意検討・研究した結果、ZFAT蛋白質が、ヒト白血病細胞株および免疫応答時(芽球化刺激時)に強く発現していることから、癌および免疫反応に重要な機能を果たすという仮定のもと、RNAiの手法を利用してさらなる解析を行った。そこで、本発明者らは、ZFAT遺伝子と相同なセンスRNAとアンチセンスRNAとからなる2本鎖RNAであるsiRNA(small interfering RNA)を調製して、そのsiRNAがZFAT遺伝子の発現抑制をすることを見出した、また、このZFAT遺伝子の発現を抑制することにより、癌細胞においてアポトーシスを誘導するとともに、ナイーブCD4陽性T細胞における免疫応答を阻害することを見出した。これらの結果、本発明者らは、このZFAT遺伝子発現抑制RNAは、ZFAT遺

伝子の量と機能を抑制することによって、より選択性の高い分子標的治療剤または免疫抑制剤として使用できる可能性のあることを見出して、この発明を完成した。

[0008] したがって、この発明は、ZFAT遺伝子と相同なセンスRNAとアンチセンスRNAからなる2本鎖RNAであるZFAT遺伝子発現抑制RNAを提供することを目的としている。

[0009] この発明は、その好ましい態様として、ZFAT mRNAの連続する20～30塩基、好ましくは23～27塩基の配列のセンスRNAおよび該配列と相補的な配列のアンチセンスRNAを含む2本鎖RNAまたは該センスRNAと該配列と相補的な配列のアンチセンスRNAとをスペーサーオリゴヌクレオチドで結合し、ヘアピン構造を形成するshRNAを含むZFAT 遺伝子発現抑制RNAが提供することを目的としている。

[0010] この発明は、その別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAを発現する発現ベクターを提供することを目的としている。

[0011] また、この発明は、その別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを細胞に導入することにより、細胞中のZFAT遺伝子の発現を抑制することからなるZFAT遺伝子発現抑制方法を提供することを目的としている。

[0012] さらに、この発明は、その別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを細胞に導入することにより、がん細胞などの細胞の増殖を抑制することからなる細胞増殖抑制方法およびがん細胞などの細胞のアポトーシスを誘導することからなるアポトーシス誘導方法を提供することを目的としている。

[0013] さらにまた、この発明は、その別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを細胞に導入することにより、上記ZFAT遺伝子発現を抑制することにより、細胞における免疫応答を阻害することから、生体に対する免疫抑制方法をを提供することを目的としている。

[0014] また、この発明は、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを有効成分として含有する医薬組成物およびがん細胞の増殖を抑制もしくはアポトーシスを誘導することにより、また細胞における免疫応答を阻害することにより、癌などの疾患の治療もしくは予防に有効な医薬組成物を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

- [0015] これらの目的を達成するために、この発明は、ZFAT mRNAの連続する20～30塩基、好ましくは23～27塩基の配列からなるセンスRNAおよび該配列と相補的な配列からなるアンチセンスRNAを含む2本鎖RNAからなるZFAT遺伝子発現抑制RNAが提供することを目的としている。
- [0016] なお、本明細書において「2本鎖RNA」とは、ZFAT mRNAの連続する20～30塩基、好ましくは23～27塩基の配列からなるセンスRNAおよび該配列と相補的な配列からなるアンチセンスRNAからなるsiRNAおよび該センスRNAと該センスRNAと相補的な配列のアンチセンスRNAとをスペーサーオリゴヌクレオチドからなるループ配列で結合し、ヘアピン構造を形成するshRNAばかりではなく、該siRNAまたはshRNAを含むdsRNAをも包含する意味で使用されているものと理解すべきである。したがって、本明細書において、用語「ZFAT遺伝子発現抑制RNA」、「2本鎖RNA」、「siRNA」、「shRNA」およびこれらに関連する用語は互換的な意味で使用していて、これらの用語を単独にもしくはいくつかと組み合わせて使用した場合でも、特に限定する必要がある場合を除いて、これらの用語を全て包含した意味で使用されているものと理解すべきである。
- [0017] この発明は、その別の好ましい態様として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAが、そのそれぞれの鎖の3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した2本鎖RNAからなるZFAT遺伝子発現抑制RNAを提供する。
- [0018] この発明は、その更に好ましい態様として、ZFAT遺伝子発現抑制RNAが、ZFAT mRNAの連続する20～30塩基、好ましくは23～27塩基の配列のセンスRNAおよび該配列と相補的な配列のアンチセンスRNAからなるsiRNAまたは該センスRNAと該アンチセンスRNAとをループ配列で結合した2本鎖RNAからなるshRNAであるZFAT遺伝子発現抑制RNAを提供する。
- [0019] この発明は、別の好ましい態様として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAが、配列番号1と2、配列番号3と4、配列番号5と6もしくは配列番号7と8で表される塩基配列を有するヒトZFAT遺伝子(hZFAT) siRNA または配列番号17と16、配列番号19と18、もしくは配列番号21と20で表される塩基配列を有するマウスZFAT遺伝子(mZFAT) siRNAからなるZFAT遺伝子発現抑制RNAを提供する。

- [0020] この発明は、別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAを発現する発現ベクターを提供する。
- [0021] この発明は、別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを細胞に導入することにより、細胞中のZFAT遺伝子の発現を抑制することからなるZFAT遺伝子発現抑制方法を提供する。
- [0022] この発明は、更に別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを細胞に導入することにより、細胞の増殖を抑制することからなる細胞増殖抑制方法および細胞のアポトーシスを誘導することからなるアポトーシス誘導方法を提供する。
- [0023] この発明は、更に別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを細胞に導入することにより、ZFAT遺伝子の発現抑制により、生体内における免疫応答を阻害すること免疫抑制方法を提供する。
- [0024] この発明は、更に別の形態として、上記ZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは上記発現ベクターを有効成分として含有する医薬組成物およびがん細胞の増殖抑制またはアポトーシス誘導により、または生体における免疫応答阻害により、癌などの疾患の治療もしくは予防に有用な医薬組成物を提供する。

### 発明の効果

- [0025] この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAまたはその発現ベクターは、生体内において、ZFAT遺伝子の発現抑制をするとともに、その発現抑制により、がん細胞などの細胞増殖抑制、もしくはアポトーシス誘導、または免疫応答阻害という効果を有している。したがって、この発明は、がん細胞などの細胞の増殖抑制効果、もしくはアポトーシス誘導効果、または免疫抑制効果を有する医薬組成物を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

- [0026] [図1]ヒトZFAT遺伝子のsiRNAの配列を示す説明図。  
[図2]細胞内におけるヒトZFAT蛋白質発現を示す図(図2A)およびsiRNAによる発現抑制を示す図(図2B)。  
[図3]細胞内におけるヒトZFAT遺伝子発現抑制による細胞増殖率を示す図。

[図4]プロピジウムヨウダイト染色でsiRNAの細胞周期に対する影響を示した図。

[図5]細胞内におけるヒトZFAT遺伝子発現抑制によるアポトーシス誘導を示す図。

[図6]細胞内におけるヒトZFAT遺伝子発現抑制によるアポトーシス誘導に対するカスパーゼ3(caspase 3)の活性化を示す図。

[図7]細胞内におけるヒトZFAT遺伝子発現抑制によるアポトーシス誘導に対するカスパーゼ8(caspase 8)およびカスパーゼ9(caspase 9)の活性化を示す図。

[図8]カスパーゼ抑制剤でのZFAT遺伝子発現抑制によるアポトーシス誘導抑制を示す図。

[図9]細胞におけるZFAT遺伝子発現抑制時での細胞周期への影響を示す図。

[図10]マウスZFAT遺伝子のsiRNAおよびshRNAの配列を示す説明図。

[図11]マウスZFAT遺伝子のshRNAを導入したshRNAレンチウイルスの構造を示すマップ図。

[図12]図11のshRNAレンチウイルスによるZFAT遺伝子発現抑制を示す図。

[図13]ZFAT遺伝子発現抑制によるカスパーゼ9の活性誘導を示す図。

[図14]ZFAT遺伝子発現抑制によるCD3抗体/CD28抗体刺激後のT細胞数の減少を示す図。

### 発明を実施するための最良の形態

[0027] この発明に係るZFAT遺伝子の発現抑制RNAは、ZFAT遺伝子と相同なセンスRNAとアンチセンスRNAとからなる2本鎖RNAからなるオリゴヌクレオチドから構成されている。具体的には、この発明のZFAT遺伝子の発現抑制RNAは、ZFAT mRNAの連続する塩基配列からなるセンスRNAおよび該センスRNAと相補的な配列からなるアンチセンスRNAを含む2本鎖RNAからなるZFAT遺伝子発現抑制RNAである。

[0028] つまり、この発明のZFAT遺伝子の発現抑制RNAは、ZFAT mRNAの連続する塩基配列からなるセンスRNAおよび該センスRNAと相補的な配列からなるアンチセンスRNAを含む2本鎖RNAからなるsiRNAまたは該センスRNAとアンチセンスRNAとがループ配列を介して連結しているステムループ構造を有し、かつ該センスRNAの3'末端とアンチセンスRNAの5'末端がループ配列(ヘアピンループ配列)を介

して連結されている構造をしているとともに、生体内において生体内酵素により切断されてsiRNAを産生できるshRNAを包含するものとする。さらに、この発明のZFAT遺伝子の発現抑制RNAは、該siRNAまたはshRNAを含む2本鎖RNA(dsRNA)をも包含しているものとする。

[0029] 更に具体的には、この発明のZFAT遺伝子の発現抑制RNAは、基本的には、互いに相補の2本鎖RNAからなるオリゴヌクレオチドであり、この一方のセンスRNAは、標的となるZFAT遺伝子の構造遺伝子部分に対応するmRNA中の塩基配列における、任意の配列からなる領域を含んでいる。この領域の選定においては、GC含量が、例えば、30～60%程度、好ましくは50%程度以下になる領域を選定するのがよく、またセンスRNAの塩基長は、例えば、ZFAT mRNAの20～30塩基、好ましくは23～27塩基の連続する配列を選定するのがよい。これに対して、そのRNAの他方のアンチセンスRNAは、上記センスRNAと相補の塩基配列を有し、このセンスRNAまたはアンチセンスRNAは、その3'末端に1～6個までの塩基の付加配列を有していてもよい。

[0030] 図1に示すように、この発明に係るZFAT遺伝子の発現抑制RNAであるsiRNAは、例えば、ヒトZFAT遺伝子(NM\_020863)の塩基配列200番目から連続する25個の塩基配列に相同の25塩基長のセンスRNA(配列番号1)とアンチセンスRNA(配列番号2)とからなる2本鎖RNA(ZFAT #1)、319番目から連続する25個の塩基配列に相同の25塩基長のセンスRNA(配列番号3)とアンチセンスRNA(配列番号4)とからなる2本鎖RNA(ZFAT #2)、3062番目から連続する25個の塩基配列に相同の25塩基長のセンスRNA(配列番号5)とアンチセンスRNA(配列番号6)とからなる2本鎖RNA(ZFAT #4)または3367番目から連続する25個の塩基配列に相同の25塩基長のセンスRNA(配列番号7)とアンチセンスRNA(配列番号8)とからなる2本鎖RNA(ZFAT #5)から選択するのが好ましい。しかし、siRNAは、上記配列に限定されるものではなく、siRNAとしての作用効果を発揮するものであればいずれも使用することができ、かつ、この発明の範囲に包含されるものである。

[0031] 上記配列番号1～8のそれぞれで表されるsiRNAの塩基配列は下記の通りである。



配列番号1:5' - A CGG CCA UCU UUA UGU GUA AAU GUU -  
3'

配列番号2:5' - A ACA UUU ACA CAU AAA GAU GGC CGU  
-3'

配列番号3:5' - C CUU AGG CCU CUG AGU ACA CCU GAA -  
3'

配列番号4:5' - U UCA GGU GUA CUC AGA GGC CUA AGG  
-3'

配列番号5:5' - G GGA AGC AGU UUA AGU GCA CGG UGU  
-3'

配列番号6:5' - A CAC CGU GCA CUU AAA CUG CUU CCC -  
3'

配列番号7:5' - U GGC UUG AAG GUG GUG GAA AUU GAU  
-3'

配列番号8:5' - A UCA AUU UCC ACC ACC UUC AAG CCA -  
3'

[0032] なお、コントロールとして、それぞれ対応するsiRNA配列と異なる、下記の構造を有するスクランブル配列を調製した。配列番号1および2で表されるZFAT #1に対するコントロール配列として、それぞれ配列番号9および10で表されるScramble #1、配列番号3および4で表されるZFAT #2に対するコントロール配列として、それぞれ配列番号11および12で表されるScramble #2、配列番号5および6で表されるZFAT #4に対するコントロール配列として、それぞれ配列番号13および14で表されるScramble #4、配列番号7および8で表されるZFAT #5に対するコントロール配列として、それぞれ配列番号15および16で表されるScramble #5を合成した。

[0033] 配列番号9: 5' - A CGA CCU UUA UGU GUA UAA UCG GU  
U - 3'

配列番号10:5' - A ACC GAU UAU ACA CAU AAA GGU CGU

−3

配列番号11:5′ − C CUC CGG GUC UAU GAC CAC UAU GAA

−3′

配列番号12:5′ − U UCA UAG UGG UCA UAG ACC CGG AGG

−3′.

配列番号13:5′ − G GGA CGU UGA AUG UGC ACG GAA UGU

−3′

配列番号14:5′ − A CAU CCC GUG CAC AUU CAA CGU CCC

−3′

配列番号15:5′ − A UCG AAU AUU CCC AAC CCU UAC CCA

−3′

配列番号16:5′ − U GGG UAA GGG UUG GGA AUA UUC GAU

−3′

[0034] また、この発明には、マウスZFAT遺伝子(NM\_198644)からのsiRNAも含まれ、例えば、図10に示すように、マウスZFAT遺伝子の塩基配列231番目からの塩基配列に相同のセンスRNA(231 Sense(5′−3′):配列番号17)とアンチセンスRNA(231 Anti-sense(5′−3′):配列番号18)とからなるsiRNA(mZFAT 231 siRNA)、塩基配列740番目からの塩基配列に相同のセンスRNA(740 Sense(5′−3′):配列番号19)とアンチセンスRNA(740 Anti-sense(5′−3′):配列番号18)とからなるsiRNA(mZFAT 740 siRNA)、塩基配列740番目からの塩基配列に相同のセンスRNA(740 Sense(5′−3′):配列番号20)とアンチセンスRNA(740 Anti-sense(5′−3′):配列番号18)とからなるsiRNA(mZFAT 740 siRNA)、または塩基配列3469番目からの塩基配列に相同のセンスRNA(3469 Sense(5′−3′):配列番号21)とアンチセンスRNA(3469 Anti-sense(5′−3′):配列番号22)とからなる siRNA(mZFAT 3469 siRNA)などが挙げられる。

[0035] 配列番号17~22で表されるマウスZFAT遺伝子からのsiRNAの塩基配列は下記の通りである。

配列番号17: 5' - CAGUCAGAACUCGUGACCCACGUUU - 3'

配列番号18: 5' - AAACGUGGGUCACGAGUUCUGACUG - 3'

配列番号19: 5' - CAGCGUGGUCUUAACUGCUCAUGAA - 3'

配列番号20: 5' - UUCAUGAGCAGUUAAGACCACGCUG - 3'

配列番号21: 5' - CCGCUGUGAAUAUCCUGCAGCAGAU - 3'

配列番号22: 5' - AUCUGCUGCAGGAUAUUCACAGCGG - 3'

[0036] これらのうち、配列番号17~20で表されるmZFAT siRNAに対するそれぞれ対応するネガティブコントロールとして、下記塩基配列を有するコントロールセンスRNA (配列番号23および25)とアンチセンスRNA (配列番号24および26)を調製した。

配列番号23: 5' - CAGAGAACUCGUGACCCACGUCUUU - 3'

配列番号24: 5' - AAAGACGUGGGUCACGAGUUCUCUG - 3'

配列番号25: 5' - CAGUGGUAUUCGUCAACUCUGCGAA - 3'

配列番号26: 5' - UUCGCAGAGUUGACGAAUACCACUG - 3'

[0037] 上記に示したように、この発明のZFAT遺伝子の発現抑制RNAは、生体内において細胞内酵素(ダイサー)で切断されてsiRNAを産生する低分子二重鎖ヘアピンRNA (shRNA)を包含する。このshRNAは、2本鎖部分を含みセンスRNAとアンチセンスRNAがループ配列を介して連結しているステムループ構造を有するとともに、センス RNAの3'末端とアンチセンスRNAの5'末端がループ配列(ヘアピンループ配列)を介して連結されている構造をしている。なお、ヘアピンループ配列は限定されないが、約4~7塩基からなる配列、例えばCGAAなどが挙げられる。

[0038] この発明のshRNAとしては、例えば、図10に示すように、マウスZFAT遺伝子の塩基配列556番目からの塩基配列に相同のセンスRNA (556 Top (5' - 3')):配列番号27)とアンチセンスRNA (556 Bottom (5' - 3')):配列番号28)とからなる shRNA (mZFAT shRNA #1)などが挙げられる。また、そのネガティブコントロールとして、センスRNA (Control Top (5' - 3')):配列番号29)とアンチセンスRNA (Control Bottom (5' - 3')):配列番号30)とからなるshRNAを調製した。

[0039] この発明のマウス ZFAT遺伝子のsiRNA としては、例えば、図10に示すように、マウスZFAT遺伝子の塩基配列556番目からの塩基配列に相同のセンスRNA (55

6 Top:配列番号27)とアンチセンスRNA(556 Bottom:配列番号28)とからなる siRNA (mZFAT siRNA1)などが挙げられる。また、そのネガティブコントロールとして、下記塩基配列を有するコントロールセンスRNA(556 Control Top:配列番号29)とコントロールアンチセンスRNA(556 Control Bottom:配列番号30)とからなるsiRNA (mZFAT shRNA2)を調製した。

[0040] 上記 shRNA(配列番号27および28)ならびにそのネガティブコントロール2本鎖 RNA(配列番号29および30)の塩基配列は下記の通りである。

配列番号27:

5' - CACCGCAAGCACATCTGCATCATTGCGAACAAATGATGCAGAT  
GTGCTTGC - 3'

配列番号28:

5' - AAAAGCAAGCACATCTGCATCATTGTTTCGCAATGATGCAGAT  
GTGCTTGC - 3'

配列番号29:

5' - CACCAAGACAATCGGCTGCTCTGATCGAAATCAGAGCAGCCG  
ATTGTCTT - 3'

配列番号30:

5' - AAAAAAGACAATCGGCTGCTCTGATTTTCGATCAGAGCAGCCG  
ATTGTCTT - 3'

[0041] 上記塩基配列中、左側の下線部分の塩基配列はセンスDNAを表し、左側の下線部分の塩基配列はアンチセンスDNAを表し、センスDNAとアンチセンスDNA間の塩基配列はループ配列を表し、センスDNAの5'側末端の配列はBsmB1結合配列を表している。

[0042] 上記塩基配列で表されるこの発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAは、例えば、上記センスRNAおよびアンチセンスRNAをそれぞれ当該技術分野で公知の方法で化学合成し、化学合成したセンスRNAおよびアンチセンスRNAを公知の方法でアニーリングし、精製することによって調製することができる。

[0043] この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAは、ZFAT遺伝子の発現抑制しようと

する生体内、例えば、細胞、組織、個体などにZFAT遺伝子発現抑制RNAを発現できる発現ベクターによって導入することができる。かかる発現ベクターで生体内に導入されたZFAT遺伝子発現抑制RNAは、生体内において発現されてZFAT遺伝子の発現を抑制する。なお、この発明のZFAT遺伝子発現抑制RNAは、そのまま細胞などの生体に導入することができるか、持続的効果の点では、発現ベクターによる導入が好ましい。

[0044] この発明に係る発現ベクターは、常法に従って調製することができる。タンデムタイプの発現ベクター場合は、PCRによってセンスならびにアンチセンス配列を含むプライマーによりプロモーター部分を増幅し、増幅断片を制限酵素で切断後、ベクターのプロモーター、例えばU6プロモーターの下流に挿入することにより調製することができる。このタンデムタイプのsiRNA発現ベクターは、細胞内で2つのU6プロモーターからセンスRNAとアンチセンスRNAとが転写される。一方、ステムループの発現ベクターの場合、センスRNAとアンチセンスRNAに対応するDNAをそれぞれ合成し、該センスRNAとアンチセンスRNAとをループ配列で連結した構造を有するセンスループ-アンチセンス配列を含むオリゴヌクレオチドからなる2本鎖RNAのテンプレートDNAを合成アニールし、このテンプレートDNAを発現ベクターのプロモーター、例えばU6プロモーター、H1プロモーター等のPolIII系プロモーターの下流に挿入することにより調製することができる。このようにして発現ベクターに組み込まれたテンプレートDNAは、細胞内でRNAポリメラーゼによりショートヘアピン型RNA (shRNA) が転写されて、細胞内酵素でプロセッシングを受けてsiRNAを産生することができる。また、ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクターなどのベクターを用いることができる。プラスミドベクターとしては、例えば、pBA siベクター、pSUPERベクターなどを用いるのがよく、ウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどを用いるのがよい。

[0045] この発明においては、上記センスとアンチセンスDNAを、それぞれ異なる発現ベクターに導入し、細胞内で別々に発現させて、細胞内においてアニールさせsiRNAを生成させるようにしてもよい。これらの発現ベクターを用いる場合には、生体内あるいは細胞内で持続的にsiRNAを産生させることが可能になりより好ましい。

- [0046] この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAがRNAi(RNA干渉)により標的遺伝子の発現を抑制(サイレンシング)する程度は、該RNAを導入しない場合に比べて、標的遺伝子のmRNAまたは蛋白質の発現量が、100%抑制されるのが特に好ましいが、100%抑制されない場合であっても、その目的や用途などによっては、その標的遺伝子の発現が抑制されていると判断できる程度であればよいので、特にその程度は限定されるものではない。なお、mRNAも蛋白質も、その発現量は常法に従って測定することができ、例えば、mRNAの場合には、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCTなど、また蛋白質の場合には、ウェスタンブロッティング、ELISAなどによって測定できる。
- [0047] この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAは、癌細胞においてZFAT蛋白質の発現を抑制するとともに(図2B)、ZFAT遺伝子の発現抑制により癌細胞の細胞増殖率が低下していることから癌細胞増殖を抑制することができる(図3)。このように癌細胞におけるZFAT遺伝子の発現が抑制されることにより、アポトーシスが引き起こされ(図5~8)、また細胞周期に影響を及ぼし、フローサイトメトリーにおけるsubG1ならびにearlyS分画の増加を惹起している(図4、9)。
- [0048] また、この発明において、ZFAT siRNAの標的部位により、アポトーシスおよび細胞周期に対する効果に違いが認められる(図1~9)ことから、この発明のZFAT遺伝子発現抑制RNAは、ZFAT遺伝子の量と機能を抑制することができる抑制剤として、より高い選択性を有する癌の分子標的治療剤として使用できることを示している。
- [0049] さらに、この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAは、マウス末梢血のナイーブCD4陽性T細胞において、抗CD3および抗CD28抗体により、免疫応答時(芽球化刺激を与えた時)に、ZFAT遺伝子発現を抑制すると、コントロールに対してアポトーシスを誘導するカスパー(saspase)9を著しく活性化することを示している(図12、13)。その後、この細胞の生存細胞数が、コントロールに対して著しく減少する(図14)ことから、活性化誘導性T細胞アポトーシスに対する感受性が增大していることが示唆されている。この結果から、この発明のZFAT遺伝子発現抑制RNAは、ZFAT遺伝子の量と機能を抑制することができる免疫抑制剤として使用できることを示している。

[0050] したがって、この発明は、別の実施形態として、この発明のZFAT遺伝子発現抑制RNAを有効成分として含有するZFAT遺伝子発現を抑制することができる分子標的治療剤や免疫抑制剤などの医薬組成物を提供する。また、この発明の医薬組成物は、ZFAT遺伝子発現抑制RNAを有効成分として含有するという観点から、かかるZFAT遺伝子発現抑制RNAを導入したZFAT遺伝子発現抑制RNA発現ベクターもその範疇に包含される。

[0051] この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAまたはそれを発現する発現ベクターを分子標的治療剤や免疫抑制剤などの医薬組成物として適用する場合には、この発明のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたはそれを発現するベクターは、様々な製剤形態で経口投与または非経口投与することが可能である。経口投与のための製剤形態としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤など、また非経口投与のための製剤形態としては、例えば、注射剤、外用剤、坐剤などが挙げられる。経口投与または非経口投与にするかどうかは、その用途などにより適宜選択するのがよい。かかる医薬製剤は、公知の薬学的に許容される担体、例えば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、乳酸ナトリウム、硫酸、水酸化ナトリウム等の希釈剤、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等のpH調整剤ならびに緩衝剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸、チオ乳酸等の安定化剤などを適宜選択して使用することによって製剤化することができる。さらに、等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、マンニトールまたはグリセリンをさらに含有していてもよい。また、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等を安定化剤として使用してこともできる。投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象または患者の年齢、体重、症状などによって異なり一概に規定できないが、通常、1日投与用量として、数mg～2g程度、好ましくは数10mg程度を、1日1回から数回に分けて投与することができる。

[0052] この発明の医薬組成物は、生体内での安定性や体内へのデリバリー方法として、リポソームなどのデリバリー担体、部位特異的な抗体または細胞種特異的な機能性ペプチドとの結合などの技術を応用して、製剤化することができる。また、細胞内への取り込みを促進するため、この発明のRNAまたはその発現ベクターを、該RNAまたはベクターを含むリポソームとして調製して用いることもできる。

[0053] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、この実施例は、この発明を具体的に説明するための例示だけに過ぎず、この発明を一切限定するものではない。

### 実施例 1

[0054] ヒトZFAT(NM\_\_020863)およびマウスZFAT(NM\_\_198644)における二本鎖RNAは次のようにして調製した。まず、その二本鎖RNAを構成するセンスRNAとアンチセンスRNAとを、リボヌクレオシド3'-ホスホロアミダイトを用いて、市販のDNA/RNAシンセサイザー(Applied Biosystems 394型)でオリゴリボヌクレオチドそれぞれ化学合成した。合成終了後、合成したオリゴヌクレオチドが結合したCPG(Controlled Pore Glass)を濃アンモニア水:エタノール(3:1v/v)混液で室温2時間処理してオリゴリボヌクレオチドをCPG樹脂から切り出し、更に55°Cで16時間加温した。その後、溶媒を留去し、残渣に1M TBAF(テトラブチルアンモニウムフルオリド)/THF(テトラヒドロフラン)溶液を加え、37°Cで16時間攪拌した。これに0.1Mトリエチルアンモニウムアセテート(pH 7.0)を添加後、5% - 40%アセトニトリル、50mMトリエチルアンモニウムピカルボネート水溶液の溶媒を用いた濃度勾配によりカラムクロマトグラフィーで分離した。約30%濃度のアセトニトリルで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、これに0.01N塩酸を加え攪拌し、ジメトキシトリチル基を除去した。続いて、0.1Nアンモニア水で中和し、水層を酢酸エチルで洗浄し、溶媒留去後、滅菌水に溶解した。この画分中のオリゴリボヌクレオチドを逆相HPLCで分離して分取後、さらにイオン交換HPLCで分離・分取し、精製した。得られたオリゴヌクレオチドを後述の実験に供した。なお、その配列は、Block-it RNAi designer(Invitrogen)にて決定し、常法に従ってアニーリングおよび精製をして各配列番号で表される塩基配列を持つsiRNAおよびshRNAを調製した。



## 実施例 2

[0055] 図11で示すshRNA発現ベクターは次のようにして構築した。pLenti6/V5-DEST (Invitrogen Cat. no. 43-0315)のClaIとSalIサイトにヒトU6プロモーター (Gene bank accession #M14486 gene sequence 65-329)を挿入し、SalIとMluI サイトにU6-termを挿入し、pLenti6-U6+termとした。さらにBsmBIで切断することで2本鎖合成オリゴヌクレオチドDNAのクローニングサイトとした。BsmBI切断部位とアニーリングしたオリゴヌクレオチドを結合させるため各オリゴヌクレオチドにはTop鎖の5'側にCACCC配列を、Bottom鎖の5'側にAAAA配列を付した。ループ配列(5'-CGAA-3')を挟んでセンスRNAとアンチセンスRNA(各21塩基)を配し、配列決定にはBlock-iT U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen Cat. no. K4944-00)のマニュアルを参照した。TopおよびBottom配列をアニーリング後、T4リガーゼにてライゲーションし、サブクローニングした。なお、ネガティブコントロールとしては、Control Top配列(配列番号29)およびControl Bottom配列(配列番号30)からなるeGFPshRNAを使用した。

## 実施例 3

[0056] ヒト末梢血から分離されたBリンパ球ならびにTリンパ球および、その他の白血球画分から抽出された蛋白質をウェスタンブロット解析で調べた。

ヒト末梢血をフィコール遠心分離にかけ、白血球を回収し、さらにMACSシステム(Miltenyi Biotec社製)のヒトCD19磁気ビーズ(Miltenyi Biotec社製)およびヒトCD3磁気ビーズ(Miltenyi Biotec社製)でそれぞれBならびにTリンパ球を連続的に分離した。素通り画分を非BならびにT細胞とした。これらの細胞のウェスタンブロット解析の結果、ZFAT蛋白質がヒト末梢血由来のBリンパ球およびTリンパ球で発現していることを確認した(図2A)。

## 実施例 4

[0057] MOLT-4細胞に実施例で作製したsiRNAオリゴヌクレオチド2種(ZFAT#1ならびにZFAT#2)およびその対照siRNAオリゴヌクレオチド2種(Scramble#1ならびにScramble#2)を導入し、24時間後時点および48時間後時点で抽出した蛋白質をウェスタンブロット解析で調べた。MOLT-4細胞はRPMI-1640(GIBCO

)に10%ウシ血清を添加した培地中で37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。siRNAオリゴヌクレオチドの導入は、MicroPorator MP-100(Digital Bio)を使用を行い、細胞1×10<sup>6</sup>個に100pmolのsiRNAを導入した。蛋白質抽出は、50mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5%デオキシコレート(deoxycholate)、0.1% SDS、プロテアーゼ・インヒビター・カクテルを用いて行なった。また、抗体は非特許文献1で作成された抗ZFATウサギポリクローナル抗体を使用した。このウェスタンブロット解析の結果、siRNAオリゴヌクレオチド2種(ZFAT #1ならびにZFAT #2)によって、MOLT-4細胞においてZFAT発現が抑制されていることを確認した(図2B)。

### 実施例 5

[0058] ZFAT発現抑制によってMOLT-4細胞増殖率の低下が見られるかどうかを調べた。

実施例1で作製したsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT #1, ZFAT #2, Scramble #1, Scramble #2)をMOLT-4細胞にそれぞれ導入後、24ウェルプレートに5×10<sup>4</sup>個/ウェルで播種し、細胞数をcell counting kit(DOJIN)で経時的(24、48ならびに72時間時点)に測定した。その結果を図3に示す。図中の結果から、ZFAT発現抑制群は、対照と比較して細胞増殖率が低下していることを確認した。

### 実施例 6

[0059] ZFAT発現抑制細胞における細胞周期の解析(Sub-G1期の増加)を行った。

実施例1で作製したsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT #1, ZFAT #2, Scramble #1, Scramble #2)をMOLT-4細胞にそれぞれ導入後、48時間時点で、70%エタノール固定(48時間、-20°C)した。細胞を1 μg/ml RNaseにて37°Cで1時間処理後、プロピジウムヨウダイド(10 μg/ml, propidium iodide)染色し、フローサイトメーターでDNA量を測定して細胞周期解析を行った。その結果、ZFAT発現抑制細胞群は、対照と比較してSub-G1期の割合が増加していたが、その他の細胞周期には差は認められなかった(図4)。

### 実施例 7

[0060] 本実施例では、ZFAT発現抑制細胞におけるアポトーシス誘導について調べた。

実施例1で作製したsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT # 1, ZFAT # 2, Scramble # 1, Scramble # 2)をMOLT-4細胞にそれぞれ導入後、24時間および48時間時点でアネキシンV染色を行い、TACS Annexin V Kit (TREVIGEN)を用いてアネキシンV陽性細胞をフローサイトメーターでアポトーシス陽性細胞数を測定した。その結果、図5に示すように、ZFAT発現抑制細胞群は、対照と比較して有意なアポトーシスの増加が認められた。

### 実施例 8

[0061] 本実施例では、ZFAT発現抑制細胞における活性型カスパーゼ3(caspase3)が検出されるかどうかを調べた。

実施例1で作製したsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT # 1ならびに ZFAT # 2)およびそれらのそれぞれのスクランブル配列(Scramble # 1ならびにScramble # 2)をMOLT-4細胞にそれぞれ導入後、24および48時間時点で細胞を回収し、抗活性型カスパーゼ3抗体による染色を行い、Active Caspase-3 PE MAb Apoptosis Kit (BD Pharmingen)を用いてカスパーゼ3陽性細胞をフローサイトメーターで検出した。ZFAT発現抑制細胞群は、対照と比較して陽性細胞数の増加が認められた(図6)。この結果、ZFAT発現抑制細胞における活性型カスパーゼ3が検出されたことから、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路が存在することが認められた。このことから、ZFAT発現抑制細胞におけるアポトーシスは、カスパーゼ3の活性化を介して誘導されていることが確認された。

### 実施例 9

[0062] 本実施例では、ZFAT発現抑制細胞におけるカスパーゼ8(caspase 8)活性およびカスパーゼ9(caspase 9)活性を測定した。

実施例1で作製されたsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT # 1ならびにZFAT # 2)およびそれらのそれぞれのスクランブル配列(Scramble # 1ならびに Scramble # 2)をMOLT-4細胞にそれぞれ導入後、48時間時点でCaspase-Glo 8 Assay (Promega)または Caspase-Glo 9 Assay (Promega)を用いてカスパーゼ8(図7A)またはカスパーゼ9(図7B)の活性を測定した。その結果、ZFAT発現抑制細胞群は、対照と比較してcaspase 8およびcaspase 9の活性の増加が認められ

た。このことから、ZFAT発現抑制によるアポトーシスは、カスパーゼ8およびカスパーゼ9の活性化を介して誘導されることが顕著に確認された。

#### 実施例 10

[0063] 本実施例では、ZFAT発現抑制によって引き起こされるアポトーシスは、カスパーゼ阻害剤Z-VADによって阻害されるかどうかを調べた。

カスパーゼ阻害剤Z-VADあるいはその対照としてのDMSO存在下において実施例1で作製されたsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT # 2またはScramble # 2)をMOLT-4細胞に導入し、24時間時点でアネキシンV染色によるアポトーシス陽性細胞測定を行った。その結果、カスパーゼ阻害剤Z-VADの存在下においてアポトーシスは有意に抑制されていることが観察された(図8A)。

[0064] カスパーゼ阻害剤Z-VADあるいはその対照としてのDMSO存在下において実施例1で作製されたsiRNAオリゴヌクレオチド(ZFAT # 1, ZFAT # 2, Scramble # 1, Scramble # 2)をそれぞれMOLT-4細胞に導入し、細胞数をcell counting kit (DOJIN)で経時的に測定した。その結果、ZFAT発現抑制による増殖抑制は、Z-VADにより完全に阻害されていることが観察された(図8B)。

#### 実施例 11

[0065] 本実施例では、ZFATのC末端領域を標的としたZFAT siRNAによるZFAT抑制時での細胞周期解析を行った。

ZFATのC末端領域を標的とした実施例1で作製したhZFAT siRNA # 5(コントロールとしてScramble配列)をそれぞれMOLT4細胞に導入し、48時間後、抗ZFAT抗体(M16)を用いて免疫染色し、FACS caliber(BD Biosciences)で測定した結果、ZFAT siRNAによるZFATの発現抑制が確認された(図9A)。免疫染色は、ZFAT特異的抗体(M16)にて免疫染色(1:100)し、抗ラットalexa 488抗体にて検出した(1:200)。

[0066] また、ZFATのC末端領域を標的としたZFAT siRNA # 5(コントロールとしてScramble配列)をそれぞれMOLT4細胞に導入し、48時間後にBrdU Flow kit(BD Pharmingen)による細胞周期解析を行った。この解析結果は、ZFAT抑制時ではコントロールに対して、早期S期への移行を抑制することを示している(図9B)。

## 実施例 12

[0067] 本実施例は、実施例2で構築したshRNA発現ベクターの形質導入について調べたものである。実施例1で合成したオリゴヌクレオチドDNAをアニーリングにより2本鎖合成オリゴヌクレオチドDNAに調製後、構築したベクター (pLenti6-U6+term) にクローニングし、ViraPower<sup>TM</sup>パッケージングプラスミド (Invitrogen) とともに リオフェクタミン<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen) で293FT細胞にトランスフェクトした。48時間後にウイルスを含む培養上清を回収し、タイターを測定後、CD4陽性細胞に形質導入した。CD4陽性細胞は、マウスCD4 (L3T4) 磁気ビーズを用いてマウス脾細胞から分離した。

分離したCD4陽性細胞は、IL-7 (5ng/ml) 含有RPMI-1640培地 (10%FCS、50  $\mu$  M 2-ME) にて72時間培養後、ポリブレン (polybrene) 8ug/mlで3時間処理し、MOI=1のウイルス上清にて形質導入した。IL-7は継続して投与した。さらに72時間後に抗CD3抗体 (145-2C11; BD Pharmingen) でコーティング (1ug/ml) したプレートにCD4陽性細胞を播種し、抗CD28抗体 (37.51; BD Pharmingen) を含まれるRPMI-1640にて刺激を開始した。

## 実施例 13

[0068] 本実施例では、実施例2で作成したshRNA発現ベクターによるZFAT発現抑制を調べた。CD4陽性細胞にshRNA発現ベクターの形質導入48時間後、抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激し、2日後の抗ZFAT抗体 (m16) による免疫染色像とDAPI像による核染色を行った。コントロール (eGFP shRNA) に対して、ZFAT shRNAではZFATの発現が抑制された (図12)。ZFATの発現部位は主に核であり、細胞質のほとんどのシグナルは非特異的であると考えられる。コントロールでは核のシグナルが観察されたのに対して、ZFAT shRNAでは核のシグナルはほとんど観察されなかった。

## 実施例 14

[0069] 本実施例では、CD4陽性細胞の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激時における実施例2で作成したshRNA発現ベクターによるZFAT発現抑制の影響を調べた。CD4陽性細胞にshRNA発現ベクターの形質導入72時間後、抗CD3抗体および抗C

D28抗体刺激し、0、24時間後のDAPI像および免疫染色像を調べた(図13)。コントロール(eGFP shRNA)では刺激後カスパーゼ9(caspase 9)の活性は誘導されなかったが、ZFAT shRNAでは、24時間後に明らかなカスパーゼ9の活性化が認められた。このことから、ZFAT shRNAは、ZFATの発現・機能の抑制が活性化誘導性T細胞アポトーシスに対する感受性を増大することが示唆される。なお、CD4陽性細胞は、マウスCD4(L3T4)磁気ビーズ(Miltenyi Biotec社製)を用いて、マウス脾細胞から分離した。また、CD4陽性細胞の抗CD3抗体および抗CD28抗体による刺激は、抗CD3抗体(145-2C11;BD Pharmingen)をプレートにコーティング(1ug/ml)した後、PBS(-)で洗浄し、CD4陽性細胞を抗CD28抗体(37.51;BD Pharmingen)(5ug/ml)が含まれるRPMI-1640(10%FCS、50μM 2-ME)にて、37°Cで培養して行った。なお、免疫染色は、CYTOSPIN4(Thermo)にて浮遊細胞をスライドグラスに塗抹後、10%ホルマリン固定した。ZFAT特異的抗体(M16)およびcaspase-9 activation state antibody(Anti-vimentin fragment)にて免疫染色(1:200)し、抗ラットalexa 488抗体および抗ラビットalexa 546抗体にて検出した(1:200)。核染色はDAPI(1:200)にて行った。

#### 実施例 15

[0070] 本実施例では、実施例12と同様のCD4陽性細胞の抗CD3抗体および抗CD28抗体刺激時における実施例2で作成したshRNA発現ベクターによるZFAT発現抑制のT細胞数に対する影響を調べた。CD4陽性細胞にshRNA発現ベクターの形質導入後、抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激し、72時間後の光学顕微鏡像を調べた。その結果、コントロールに比べ、ZFAT shRNAでは細胞数が減少しており、ZFAT発現抑制によりアポトーシスが誘導されることが示唆された(図14)。

#### 産業上の利用可能性

[0071] この発明に係るZFAT遺伝子発現抑制RNAおよびそれを含む発現ベクターは、例えば、細胞、組織、個体などの発現を抑制しようとする生体内に導入することによって、ZFAT遺伝子の発現を抑制するとともに、アポトーシスを誘導することができる。したがって、この発明のZFAT遺伝子発現抑制RNAは、ZFAT遺伝子の発現抑制により、癌などの病気の予防や治療用医薬組成物としてばかりではなく、選択性がより

高い分子標的治療剤または免疫抑制剤としても使用することができる。

## 請求の範囲

- [1] ZFAT mRNAの連続する20～30塩基の配列のセンスRNAおよび該配列と相補的な配列のアンチセンスRNAを含む2本鎖RNAからなることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- [2] 請求項1に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記センスRNAの塩基配列がZFAT mRNAの連続する23～27塩基からなることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- [3] 請求項1または2に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記2本鎖RNAが、そのそれぞれの鎖の3'端に1～6個のヌクレオチドを付加した2本鎖RNAであることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- [4] 請求項1ないし3のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記ZFAT遺伝子発現抑制RNAが、ZFAT mRNAの連続する20～30塩基の配列のセンスRNAおよび該配列と相補的な配列のアンチセンスRNAからなるsiRNAまたは該センスRNAと該アンチセンスRNAとをループ配列で結合したshRNAであることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- [5] 請求項4に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記センスRNAの塩基配列がZFAT mRNAの連続する23～27塩基からなることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- [6] 請求項4または5に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記ループ配列が1～6塩基のスペーサーオリゴヌクレオチドからなり、センスRNAとアンチセンスRNAとを結合し、ヘアピン構造を形成していることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- [7] 請求項1ないし6のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記2本鎖が、配列番号1および2でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセンスRNA、配列番号3および4でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセンスRNA、配列番号5および6でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセンスRNA、もしくは配列番号7および8でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセ



ンスRNAとからなるヒトZFAT遺伝子(hZFAT) siRNA、または配列番号17および16でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセンスRNA、配列番号19および18でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセンスRNAもしくは配列番号21および20でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンスRNAおよびアンチセンスRNAからなるmZFAT siRNAであることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。

配列番号1:5' - A CGG CCA UCU UUA UGU GUA AAU GUU -  
3'

配列番号2:5' - A ACA UUU ACA CAU AAA GAU GGC CGU  
-3'

配列番号3:5' - C CUU AGG CCU CUG AGU ACA CCU GAA -  
3'

配列番号4:5' - U UCA GGU GUA CUC AGA GGC CUA AGG  
-3'

配列番号5:5' - G GGA AGC AGU UUA AGU GCA CGG UGU  
-3'

配列番号6:5' - A CAC CGU GCA CUU AAA CUG CUU CCC -  
3'

配列番号7:5' - U GGC UUG AAG GUG GUG GAA AUU GAU  
-3'

配列番号8:5' - A UCA AUU UCC ACC ACC UUC AAG CCA -  
3'

配列番号17:5' - CAGUCAGAACUCGUGACCCACGUUU -3'

配列番号18:5' - AAACGUGGGUCACGAGUUCUGACUG -3'

配列番号19:5' - CAGCGUGGUCUUAACUGCUCAUGAA -3'

配列番号20:5' - UUCAUGAGCAGUUAAGACCACGCUG -3'

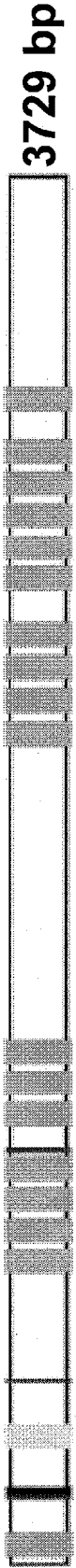
配列番号21:5' - CCGCUGUGAAUAUCCUGCAGCAGAU -3'

配列番号22:5' - AUCUGCUGCAGGAUAUUCACAGCGG -3'

- [8] 請求項4ないし6のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAにおいて、前記shRNAが、配列番号27および26でそれぞれ表される下記塩基配列を有するセンス RNAおよびアンチセンスRNAとからなることを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制RNA。
- 配列番号27:  
5' - CACCGCAAGCACATCTGCATCATTGCGAACAATGATGCAGAT  
GTGCTTGC - 3'
- 配列番号28:  
5' - AAAAGCAAGCACATCTGCATCATTGTTCGCAATGATGCAGAT  
GTGCTTGC - 3'
- [9] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAを発現することを特徴とする発現ベクター。
- [10] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは請求項9に記載の発現ベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のZFAT遺伝子の発現を抑制することを特徴とするZFAT遺伝子発現抑制方法。
- [11] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは請求項9に記載の発現ベクターを細胞に導入することにより、該細胞の増殖を抑制することを特徴とする細胞増殖抑制方法。
- [12] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは請求項9に記載の発現ベクターを細胞に導入することにより、該細胞のアポトーシスを誘導することを特徴とするアポトーシス誘導方法。
- [13] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは請求項9に記載の発現ベクターを細胞に導入することにより、生体内における免疫応答を阻害することを特徴とする免疫抑制方法。
- [14] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは請求項9に記載の発現ベクターを有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。
- [15] 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のZFAT遺伝子発現抑制RNAまたは請求項9に記載の発現ベクターが、細胞増殖を抑制またはアポトーシスの誘導により、ま

たは免疫応答阻害により、癌などの疾患の治療もしくは予防をすることができる有効成分として含有されていることを特徴とする医薬組成物。

[ 1 ]



3729 bp

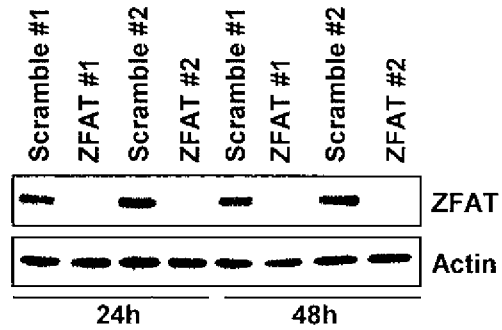
- 200-319- 1142- 3062- 3367-  
ZFAT#1 ZFAT#2 ZFAT#5
- 200 Sense(5'-3') A CGG CCA UCU UUA UGU GUA AAU GUU
- 200Anti-sense(5'-3') A ACA UUU ACA CAU AAA GAU GGC CGU
- 200 control Sense(5'-3') A CGA CCU UUA UGU GUA UAA UCG GUU
- 200 control Anti-sense(5'-3') A ACC GAU UAU ACA CAU AAA GGU CGU
- 319 Sense(5'-3') C CUU AGG CCU CUG AGU ACA CCU GAA
- 319Anti-sense(5'-3') U UCA GGU GUA CUC AGA GGC CUA AGG
- 319 control Sense(5'-3') C CUC CGG GUC UAU GAC CAC UAU GAA
- 319 control Anti-sense(5'-3') U UCA UAG UGG UCA UAG ACC CGG AGG
- 3062 Sense(5'-3') G GGA AGC AGU UUA AGU GCA CGG UGU
- 3062Anti-sense(5'-3')A CAC CGU GCA CUU AAA CUG CUU CCC
- 3062 control Sense(5'-3') G GGA CGU UGA AUG UGC ACG GAA UGU
- 3062 control Anti-sense(5'-3') A CAU UCC GUG CAC AUU CAA CGU CCC
- 3367 Sence(5'-3') UGGCUUGAAGGUGGGAAAUUGAU
- 3367 Anti-sence(5'-3') AUCAAUUUCCACCACCUUCAAGCCA
- 3367 control Sense(5'-3') AUCGAAUUAUCCCAACCCUUACCCA
- 3367 control Anti-sense(5'-3') UGGGUAAAGGUUGGGAAUUAUCCGAU

[図2]

ヒト末梢血

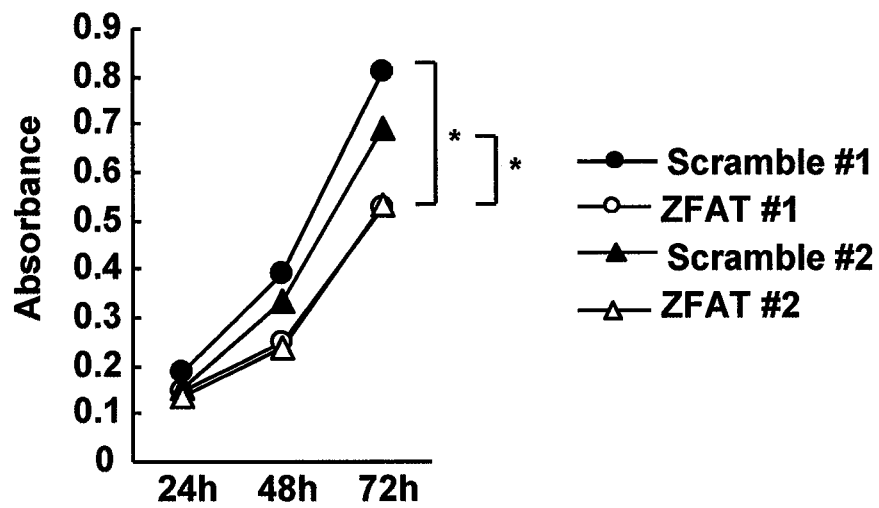


MOLT-4細胞でのsiRNAによるZFAT発現抑制

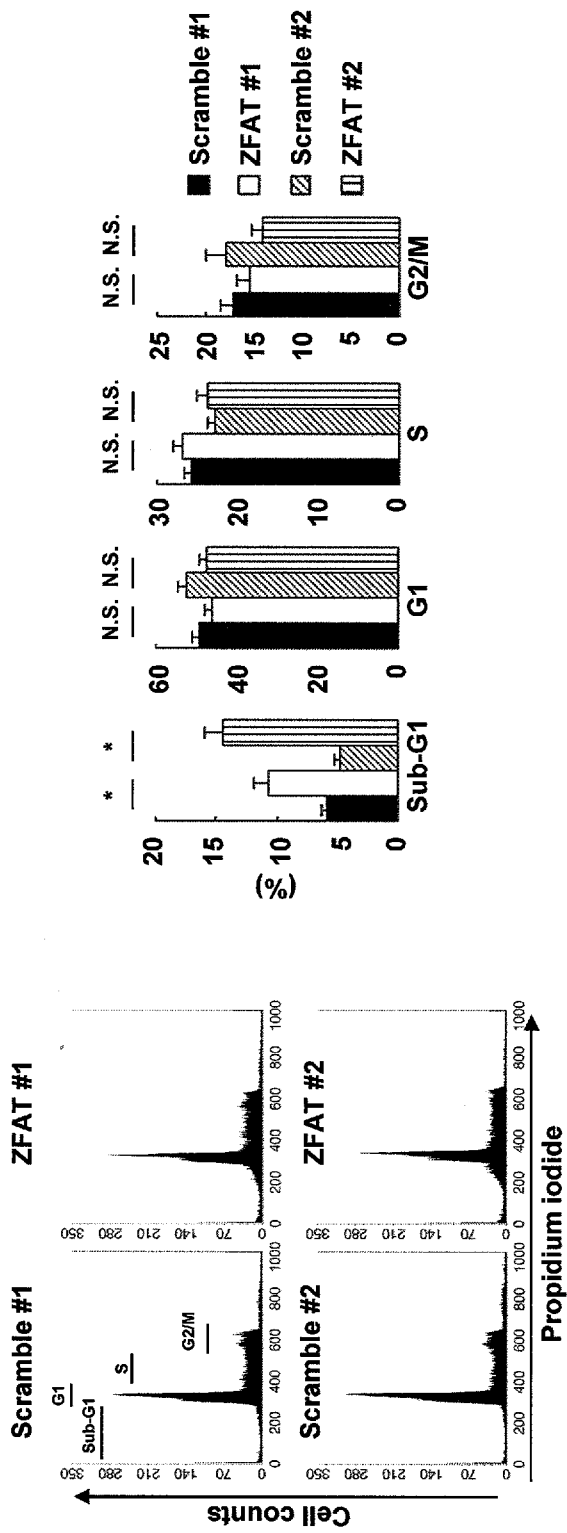


[図3]

増殖曲線

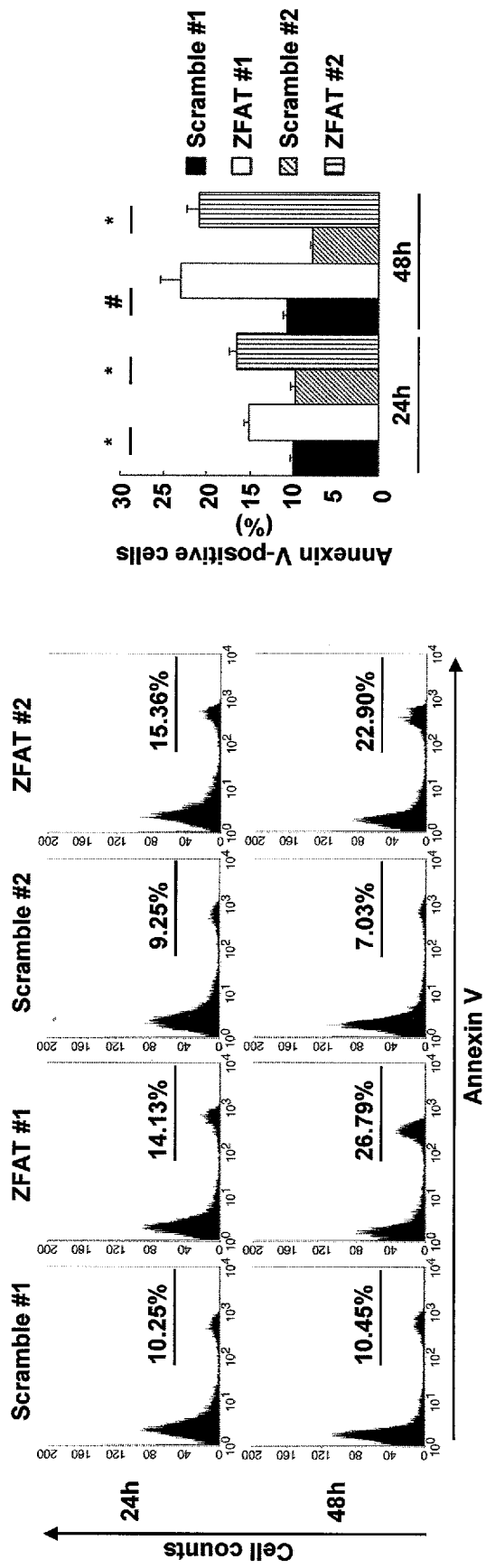


[圖4]

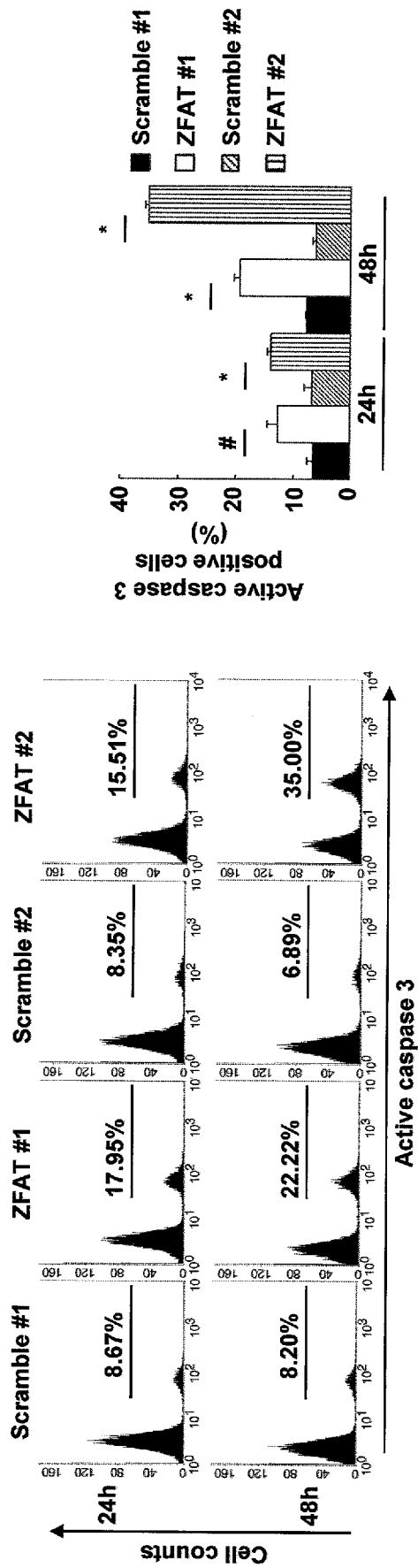


[図5]

Annexin V 染色によるアポトーシス細胞検出

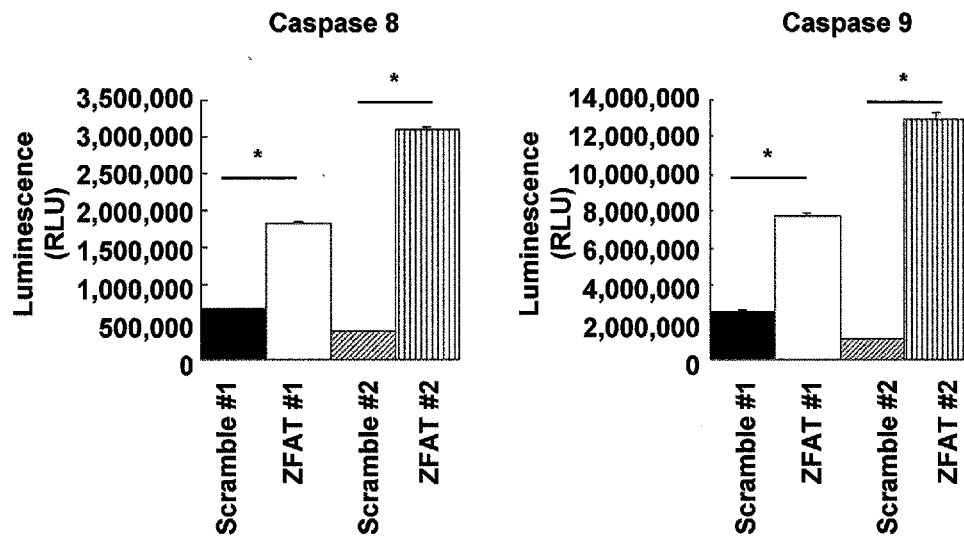


[図6]

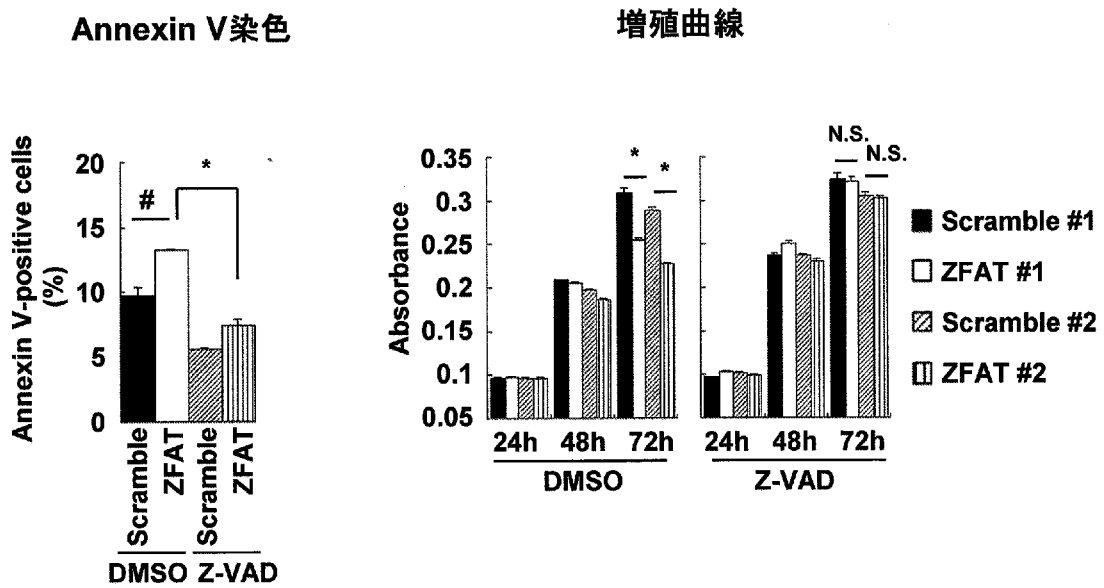




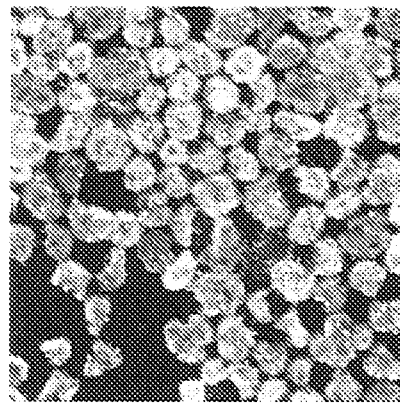
[図7]



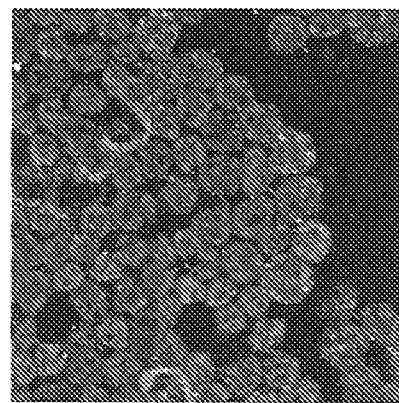
[図8]



[図9]

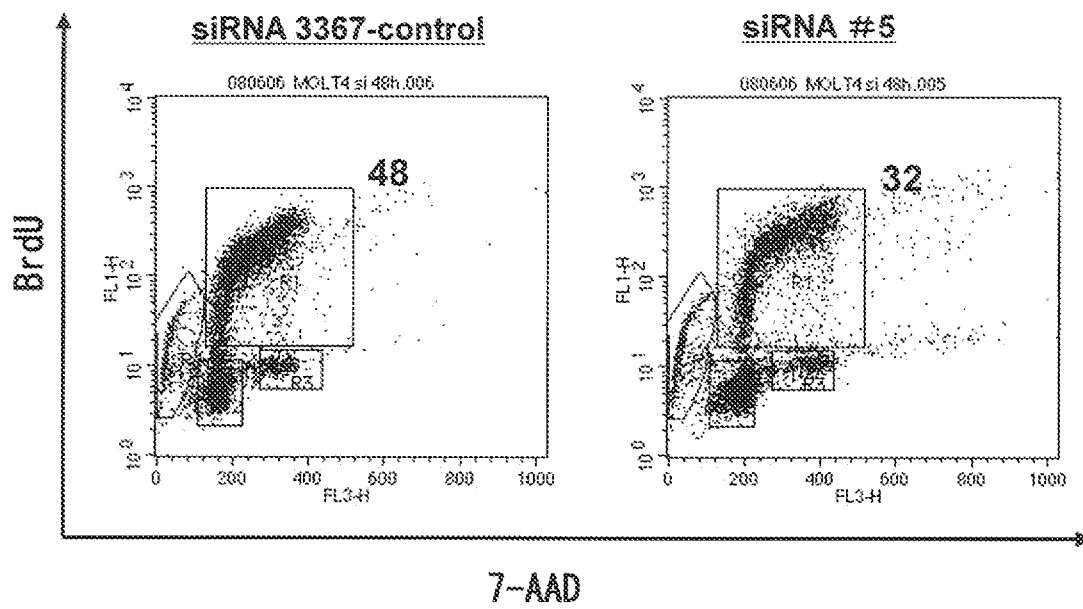


Control siRNA

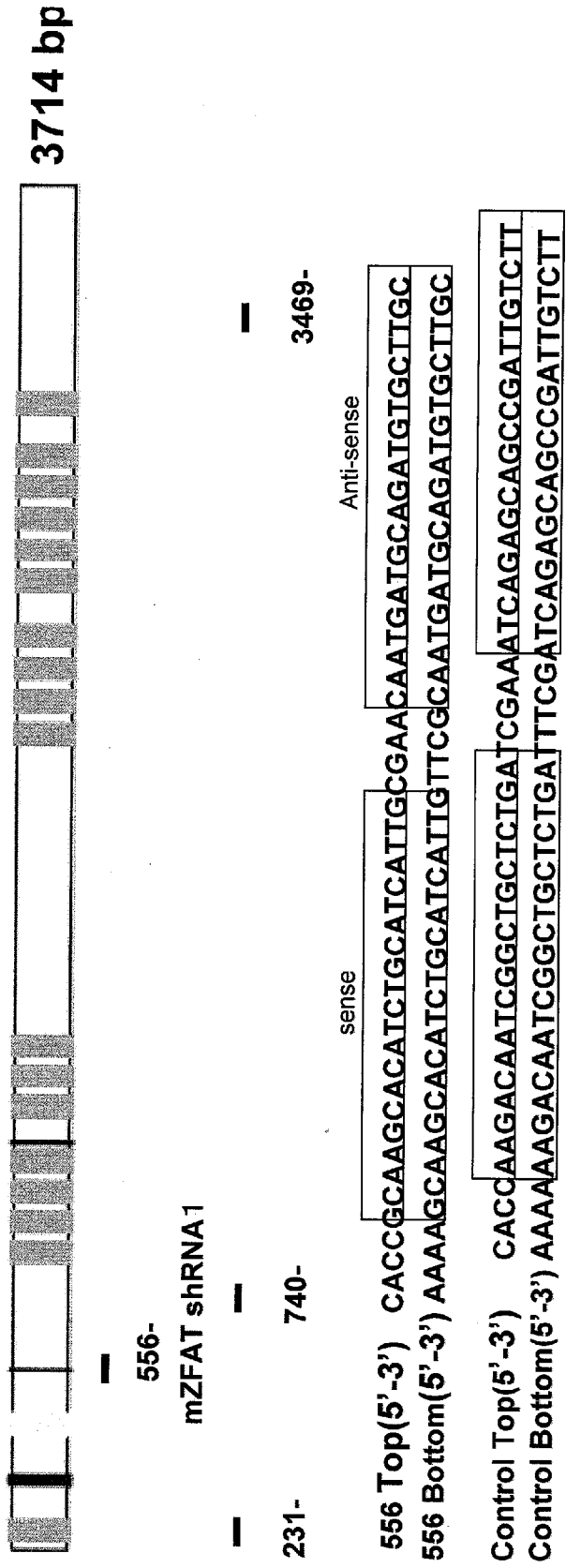


hZFAT siRNA #5

MOLT4 ZFAT-siRNA (48h)



[図]10



**shRNA**

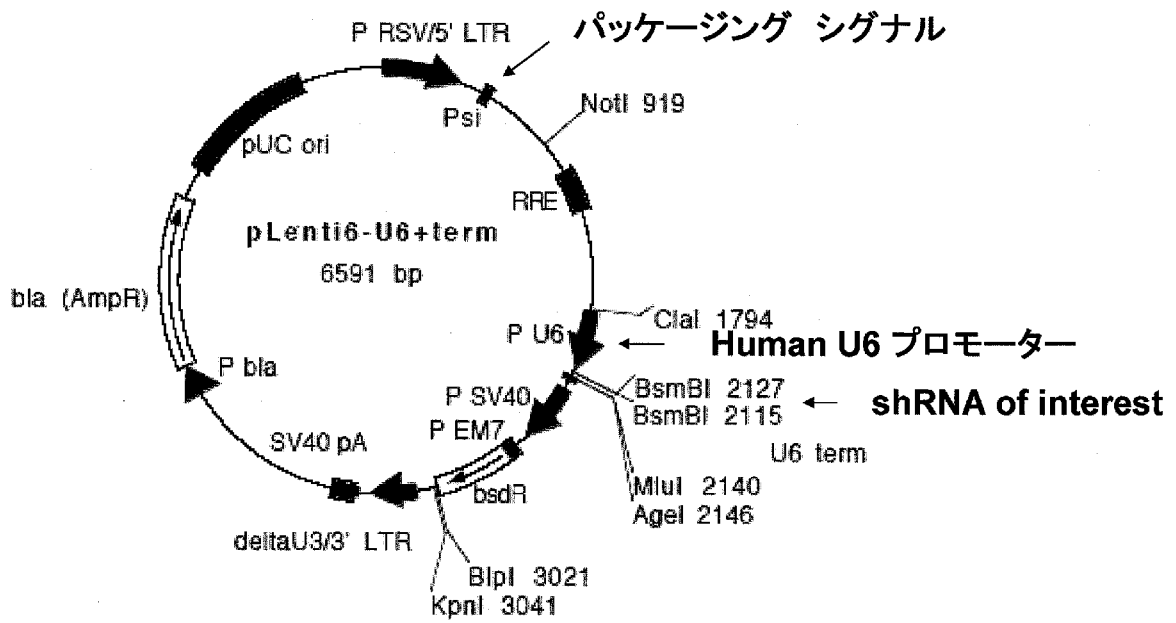
556-  
mZFAT shRNA 1

231- 740- 3469-  
sense Anti-sense  
556 Top(5'-3') CACCGCAAGCACATCTGCAATCATTGCGAAACAATGATGCAGATGTGCTTGG  
556 Bottom(5'-3') AAAAGCAAGCACATCTGCAATCTGCGAAATGATGCAGATGTGCTTGG  
Control Top(5'-3') CACCAAGACAATCGGCTGCTCTGATCGAAATCAGAGCAGCCGATGTCTT  
Control Bottom(5'-3') AAAAAGACAATCGGCTGCTCTGATTCGATCAGAGCAGCCGATGTCTT

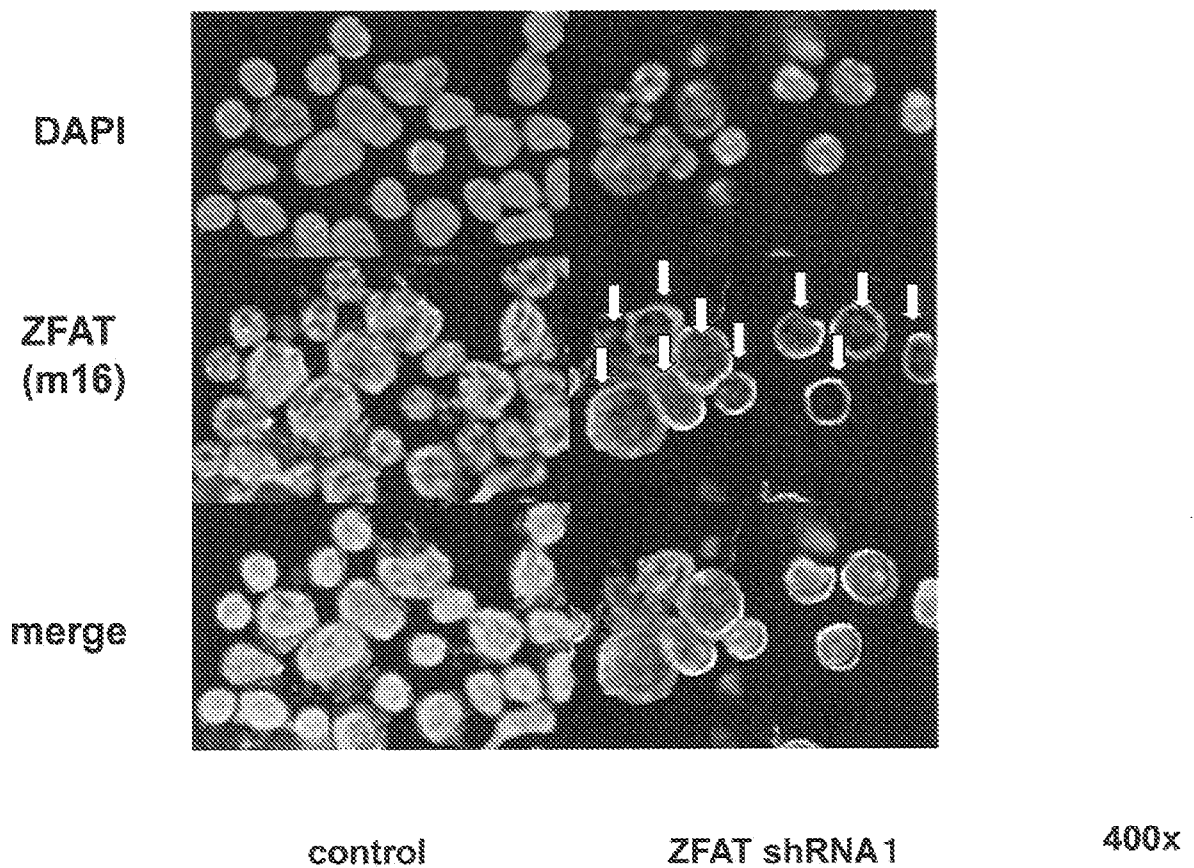
**SiRNA**

赤: BsmB1 結合配列 緑: ループ配列  
231 Sense(5'-3') CAGUCAGAACUCGUGACCCACGUGUU  
231 Anti-sense(5'-3') AAACGUGGGUCACGAGUUCUGACUG  
231 control Sense(5'-3') CAGAGAACUCGUGACCCACGUCUUU  
231 control Anti-sense(5'-3') AAAGACGUGGGUCACGAGUUCUCUG  
740 Sense(5'-3') CAGCGUGGUCUUAAUCUGCCUAUGAA  
740 Anti-sense(5'-3') UUCAUGAGCAGUUAAAGACCCACGUCUG  
740 cont Sense(5'-3') CAGUGGUUUUCGUCACUCUGCCGAA  
740 cont Anti-sense(5'-3') UUCGCAGAGUUGACGAAUACCACUG  
3469Sense(5'-3') CCGCUGUGAAUAUCCUGCAGCAGAU  
3469Anti-sense(5'-3') AUCUGCUGCAGGAUAUUCACAGCGG

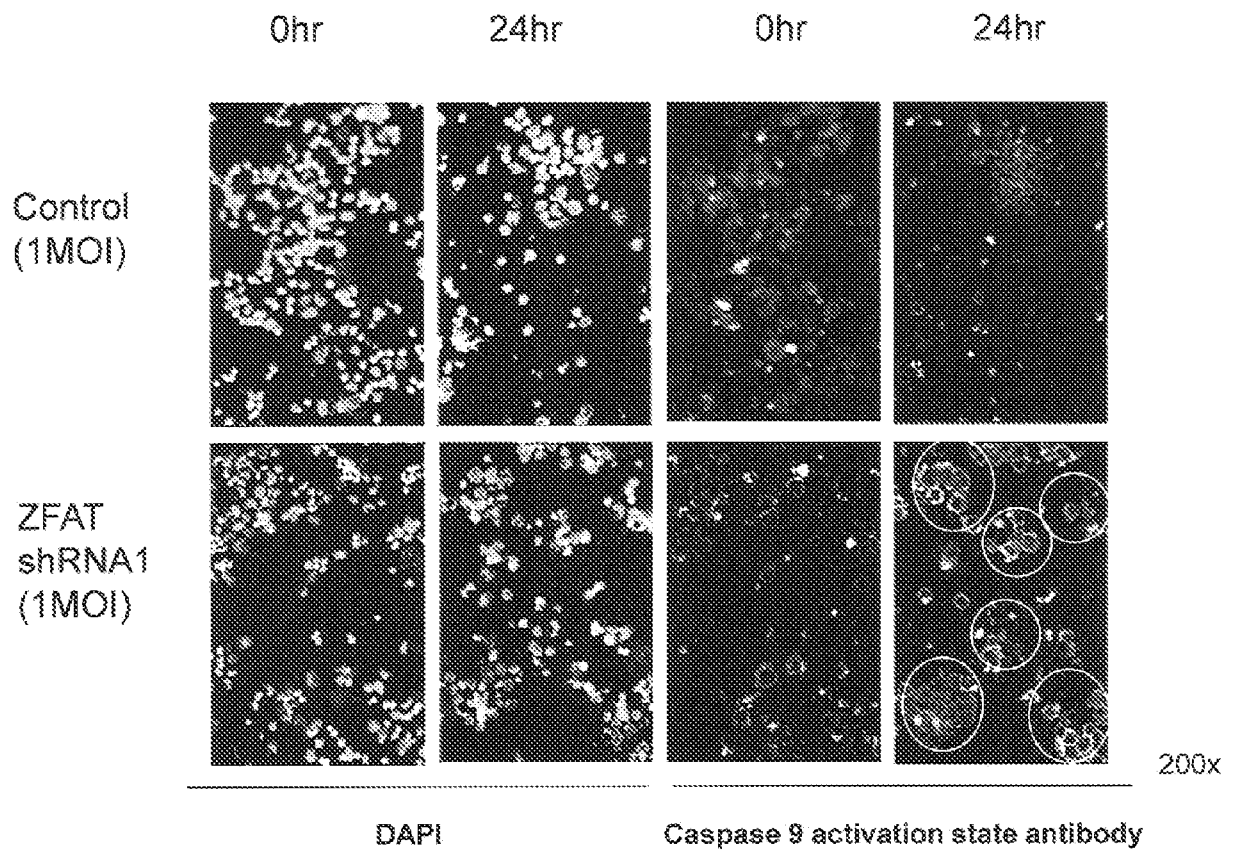
[図11]



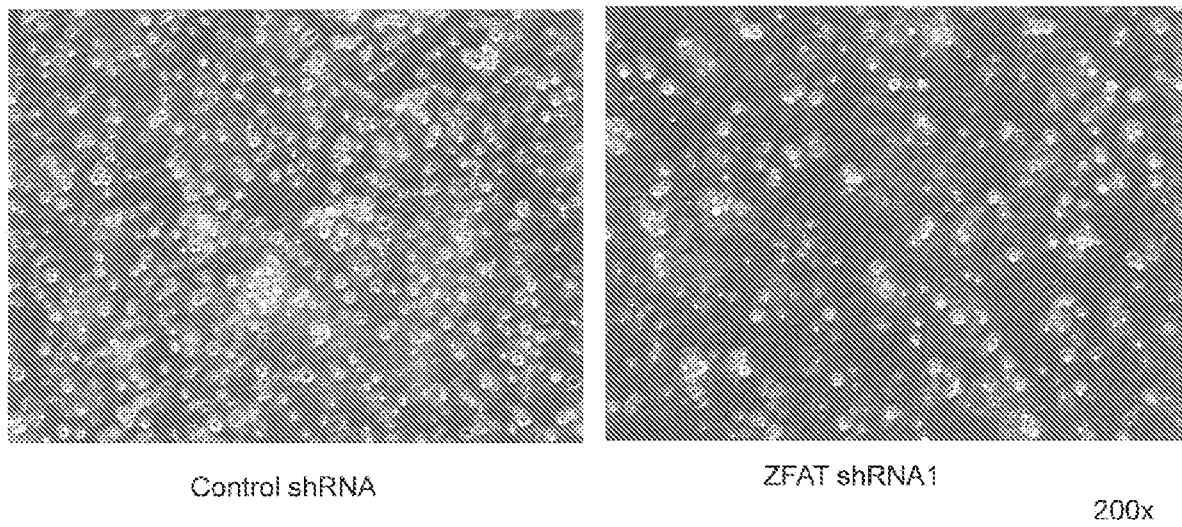
[図12]



[図13]



[図14]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066155

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, A61K31/713(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, A61P37/06(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)

C12N15/09, A61K31/713, A61P35/00, A61P37/06

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 practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	KOYANAGI M et al., ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes, Genomics, 2008.05, Vol.91, No.5, pp.451-457	<u>1-10, 14</u> 11-13, 15
A	SHIRASAWA S et al., SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease, Hum. Mol. Genet., 2004, Vol.13, No.19, pp.2221-2231	1-15
A	Kazuhiko NAKABAYASHI et al., "Men'ekikei Tensha Kanren Inshi ZFAT no Tensha Network no Kaimei", Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics Program · Shorokushu, 2007, Vol.52, page 118	1-15

 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 September, 2008 (18.09.08)Date of mailing of the international search report  
30 September, 2008 (30.09.08)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/066155

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Emi KANNO et al., "Jiko Men'eki Shikkan Kanjusei Idenshi Tagata ga Men'eki Kanren Idenshi no Hatsugen ni Ataeru Eikyo", Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics Program · Shorokushu, 2007, Vol.52, page 162	1-15
A	Senji SHIRASAWA et al., "Jiko Men'ekisei Kojosen Shikkan Kanjusei Idenshi no Tansaku", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2005, Vol.50, No.16, pages 2097 to 2102	1-15
A	Naoya TOCHIO et al., "Jiko Men'ekisei Kojosen Shikkan(AITD) ni Kakawaru ZFAT Tanpakushitsu no Kozo · Kino Kaiseki", Seikagaku, Shoroku CD, 2007, p.4P-1079	1-15
A	Yuta KOCHI, "Kansetsu Rheumatism Kanren Idenshi no Dotei to sono Kino Kaiseki, Sogo Kanren no Kenkyu, Kansetsu Pheumatism Kanren Idenshi no Dotei to sono Kino Kaiseki, Sogo Kanren no Kenkyu", Heisei 19 Nendo Sokatsu · Buntan Kenkyu Hokokusho, 09 May, 2008 (09.05.08), (received date), pages 12 to 14	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/06(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. C12N15/09, A61K31/713, A61P35/00, A61P37/06

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

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)  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CA(STN), REGISTRY(STN), JSTPlus(JDreamII)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

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 請求の範囲の番号
X A	KOYANAGI M et al., ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes, Genomics, 2008.05, Vol.91, No.5, pp.451-457	1-10, 14 11-13, 15
A	SHIRASAWA S et al., SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease, Hum. Mol. Genet., 2004, Vol.13, No.19, pp.2221-2231	1-15

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。

<p>* 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</p>	<p>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                  「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 18.09.2008	国際調査報告の発送日 30.09.2008
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 山形 亜希子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



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 請求の範囲の番号
A	中林一彦ほか, 免疫系転写関連因子 Z F A T の転写ネットワークの 解明, 日本人類遺伝学会大会プログラム・抄録集, 2007, Vol. 52, p. 118	1-15
A	菅野栄美ほか, 自己免疫疾患感受性遺伝子多型が免疫関連遺伝子の 発現に与える影響, 日本人類遺伝学会大会プログラム・抄録集, 2007, Vol. 52, p. 162	1-15
A	白澤専二ほか, 自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子の探索, 蛋白質 核酸 酵素, 2005, Vol. 50, No. 16, pp. 2097-2102	1-15
A	栃尾尚哉ほか, 自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) に関わる ZFAT タンパク 質の構造・機能解析, 生化学, 抄録 C D, 2007, p. 4P-1079	1-15
A	高地雄太, 関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析, 相互関 連の研究, 関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関 連の研究 平成 1 9 年度 総括・分担研究報告書, 2008. 05. 09 (受 入日), pp. 12-14	1-15