

(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  
2014年7月24日(24.07.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/112144 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/113 (2010.01) C12N 9/12 (2006.01)  
A61K 31/7115 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
A61K 31/7125 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/069541
- (22) 国際出願日: 2013年7月18日(18.07.2013)
- (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 2013-004750 2013年1月15日(15.01.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者: 谷 時雄(TANI, Tokio); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 井手上 賢(IDEUE, Takashi); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 大澤 健一(OSAWA, Kenichi); 〒1620065 東京都新宿区住吉町1-1-1 OSKビル60
- 5 大澤国際特許外国法事務弁護士事務所 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, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

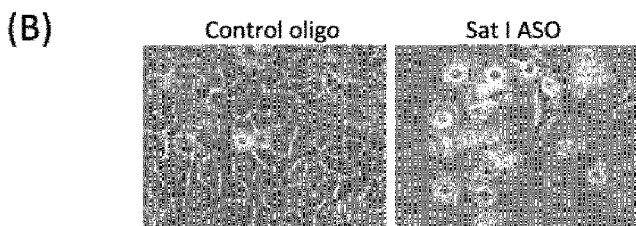
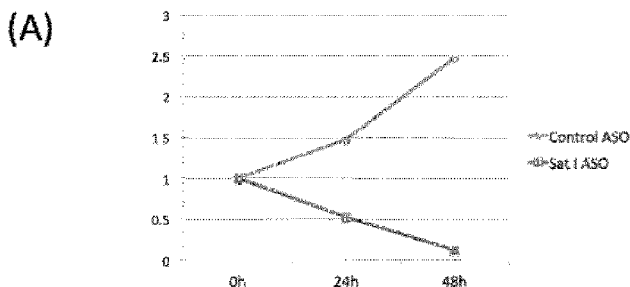
規則 4.17 に規定する申立て:  
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

[続葉有]

(54) Title: NUCLEIC ACID ANTICANCER AGENT TARGETING SATELLITE NONCODING RNA DERIVED FROM CHROMOSOME CENTROMERE, AND METHOD USING ANTICANCER AGENT

(54) 発明の名称: 染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAを標的とした核酸抗癌剤、及び該抗癌剤を用いる方法

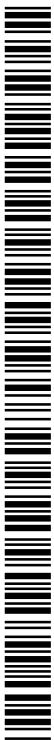
[図3]



(57) Abstract: A purpose of the present invention is to provide a novel aurora B kinase function inhibitor. Another purpose of the present invention is to provide a novel nucleic acid anticancer agent. Provided are a novel aurora B kinase function inhibitor and a novel nucleic acid anticancer agent targeting a satellite noncoding RNA derived from a chromosome centromere. The aforesaid aurora B kinase function inhibitor and nucleic acid anticancer agent comprise an antisense oligonucleotide that has a sequence being complementary to a part of a satellite noncoding RNA derived from a chromosome centromere.

(57) 要約: 本発明は、新たなオーロラBキナーゼの機能阻害剤を提供することを目的とする。本発明はまた、新たな核酸抗癌剤を提供することを目的とする。本発明により、染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAを標的とした、新たなオーロラBキナーゼの機能阻害剤及び核酸抗癌剤が提供され

た。該オーロラBキナーゼの機能阻害剤及び核酸抗癌剤は、染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAの一部に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。



WO 2014/112144 A1

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))

## 明 細 書

発明の名称：

染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAを標的とした核酸抗癌剤、及び該抗癌剤を用いる方法

### 技術分野

[0001] 本発明は新たな核酸抗癌剤及びそれを用いる方法に関する。より具体的には、本発明は、染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAの一部に相補的な配列を含むDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物、特に抗癌組成物、及び該アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて癌を治療する方法に関する。

### 背景技術

[0002] オーロラキナーゼは、酵母からヒトに至るまで、生物種を越えて幅広く保存された染色体分配制御に必須なセリン・スレオニンリン酸化酵素である。オーロラキナーゼは、癌細胞の多くで高発現しており、遺伝子不安定性や腫瘍の進行を誘発するなど、発癌に深く関わる分裂期キナーゼとして知られている。動物細胞においては、オーロラA、オーロラB、及びオーロラCの3種類が存在する。オーロラAは、紡錘体形成の制御に、オーロラBは、染色体キネトコアへの紡錘体結合制御や細胞質分裂に必須なキナーゼとして機能している。また、オーロラキナーゼは、細胞分裂期の各ステップにおいて、キネトコア（動原体）が形成されるセントロメアなど特有な染色体領域に局在し、その特異的局在が活性制御に重要な役割を果たす。また、マウスにおいて、セントロメア領域に存在するマイナーサテライトの転写物が、オーロラBキナーゼの制御に関与しているとの報告がある（非特許文献1：Federica F. et al. Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 15, 5071-5080）

[0003] これらオーロラキナーゼの阻害剤（ATPの拮抗結合阻害低分子化合物）は、近年、新しい将来性ある抗癌剤として大変大きな注目を浴びている。実際、既に新規抗癌剤として臨床試験が開始されているオーロラキナーゼ阻害

化合物が存在し、例えば、MLN8237 (alisertib) やVX-680などをあげることができる。これらの阻害化合物は、全てオーロラキナーゼのA T P結合部位に対して拮抗的に結合する低分子阻害化合物であるが、結合特異性の問題から、オーロラキナーゼ以外のキナーゼも阻害する可能性があり、問題視されている。

[0004] オーロラキナーゼの機能阻害は、有糸分裂期のみに作用するので、細胞分裂を短時間に繰り返さない正常組織の細胞に対する阻害作用は低く、増殖が旺盛な癌細胞に選択的に強く影響を与えることが予測されるが、一方、A T P拮抗型の阻害化合物は、特異性が高い場合でも、細胞内に多量存在するオーロラキナーゼ以外の細胞内キナーゼ（例えば、スプライシング因子のリン酸化に関わるClkやSRPK1などのキナーゼ）にも作用する可能性があるという問題点がある。

[0005] そこで、従来のA T Pの拮抗結合阻害低分子化合物に比べて、上記問題点、例えば正常細胞への影響が少ない或いは無い、オーロラBキナーゼを選択的に阻害する又は抗癌性をもつ化合物が望まれていた。

[0006] また、染色体セントロメア領域にあるサテライトIIから転写される転写産物（RNA）が、膵臓癌及び上皮癌において過剰発現していることが報告されている（非特許文献2：David T. Ting, et al, Science 331, 593 (2011)）。

[0007] なお、本発明の核酸がターゲットしているセントロメア由来のサテライトIノンコーディングRNA（本明細書中では、satellite I ncRNA 又はsatellite I RNAとも記す）は、ヒト染色体セントロメア領域から転写されるnon-coding RNA（mRNAとは異なり、タンパク質情報を持たないRNA）であるが、その生物学的機能についてはほとんど知られていない。

[0008] また、DNA/RNAキメラオリゴヌクレオチドとしては、2本鎖ポリヌクレオチドのアンチセンス鎖がDNAとRNAのキメラである2本鎖ポリヌクレオチド（特許文献1）や、RNAの一部のリボヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドに置換したRNA（特許文献2）が報告されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0009] 特許文献1：特許第3803318号公報

特許文献2：特開2008-125374号公報

### 非特許文献

[0010] 非特許文献1：Federica F., et al. Nucleic Acids Research, 2009, Vol. 37, No. 15, 5071-5080.

非特許文献2：David T. Ting, et al, Science 331, 593 (2011).

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAを標的とした、新たな核酸抗癌剤及びそれを用いる方法を提供することを目的とする。本発明はまた、染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAの一部に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物、特には、オーロラBキナーゼの機能阻害剤及び／又は抗癌剤を提供することを目的とする。

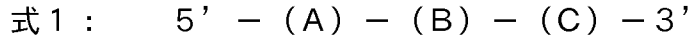
### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、ヒトのセントロメア由来のサテライトIノンコーディングRNA (satellite I ncRNA) に対するアンチセンス配列を有する核酸 (DNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド) が、細胞内でオーロラキナーゼを選択的に阻害できることを初めて見だし、本発明を完成した。さらに本発明者らは、satellite I ncRNAに対するアンチセンス配列を有する核酸 (DNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド) が、がん細胞の染色体分裂異常を引き起こすことを見だし、本発明を完成した。

[0013] 本発明は、以下を含むものである。

(1) 以下の式1で表されるDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌ

クレオチド、



ここで、Aは、少なくとも2以上（好ましくは2～5）のリボヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドであり、Bは、配列番号1（satellite I RNA 配列:単一ユニット171塩基）の配列（又はその亜種の配列）の一部と相補的な配列を含む、少なくとも5以上（好ましくは10～20）のデオキシリボヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドであり、Cは、少なくとも2以上（好ましくは2～5）のリボヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドである、

ここで、前記AおよびCは、それぞれ、その一部のリボヌクレオチドが安定化のために修飾されており、かつ、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、A、B及びCを構成するヌクレオチドが、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、又はホスホラミデートのいずれかのヌクレオチド間結合で結合したオリゴヌクレオチドである。

(2) 前記式1のBが、配列番号1の配列の一部である連続する少なくとも6つのオリゴヌクレオチドと相補的な配列を含む、前記(1)に記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(3) 前記式1において、Bのヌクレオチド数が10～20である前記(1)又は(2)に記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(4) 前記式1において、AおよびCのヌクレオチド数が2～5である、前記(1)～(3)のいずれかに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(5) 前記修飾されてもよいリボヌクレオチドが、2'-O-メチル置換された又は2'-フルオロ置換されたリボヌクレオチドである、前記(1)～(4)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(6) 前記A、B及びCを構成するヌクレオチドが、ホスホロチオエート

ヌクレオチド間結合で結合した、前記（１）～（５）のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

（７） 前記Bが、配列番号2で示される下記配列

5' - A C A A A A G A G - 3'

を含む、前記（１）～（６）のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

（８） 前記式1が、下記配列（配列番号3）

5' - m A \* m U \* m U \* m C \* m C \* A \* C \* A \* A \* A \* A \* A \* G \* A \* G \* m U \*  
m G \* m U \* m U \* m U \* - 3'

（ここで、mは、2'-O-メチル置換による修飾を表し、\*は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合をしめす）

で示される前記（１）に記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

（９） 前記（１）～（８）のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むオーロラBキナーゼの活性阻害剤。

（１０） 前記（１）～（８）のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むセントロメア局在化阻害剤。

（１１） 前記（１）～（８）のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む抗癌核酸医薬組成物。

（１２） さらに他の抗癌剤を含む、前記（１１）に記載の医薬組成物。

（１３） 癌又は癌の疑いがある対象に、前記（１）～（８）のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することを含む、癌を治療するための方法であって、該オリゴヌクレオチドがオーロラBキナーゼの活性及び／又はセントロメア局在化を阻害する方法。

（１４） 前記投与が、静脈内投与、皮下投与又は動脈内投与である、前記（１３）に記載の方法。

（１５） さらに、スプライシング因子であるDHX38/Prp16、DHX8/HRH1、及びSAP155から選ばれる少なくとも一つをターゲットとするsiRNAを投与するこ

とを含む、前記（13）または（14）に記載の方法。

### 発明の効果

[0014] 本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、新たな作用機序のオーロラキナーゼ阻害剤として有用である。本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、新たな細胞増殖阻害剤として有用であり、新たな抗癌剤となり得る。

### 図面の簡単な説明

[0015] [図1]上段は、Satellite I RNA（単一ユニット171塩基）の塩基配列を示したものである。下線は、実施例で標的とした領域を示す。下段は、実施例で用いたアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列を示す。下線部分はDNAであり、その他は修飾RNAを示す。図中、mは、2'-O-メチル修飾を示し、\*は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を示す。

[図2]抗Aurora B抗体を用いた免疫共沈実験の結果を示す。レーン1は分子量マーカー、レーン2及び5は、免疫沈降を行わずに細胞より回収した全RNA、レーン3及び6は、抗Aurora B抗体で免疫沈降させたRNA、レーン4及び7は、ノーマルIgGで免疫沈降させたRNAの結果を示す。上段は、Satellite Iのプライマーを、下段は、GAPDHのプライマーを用いてRT-PCRを行った結果である。

[図3]Satellite I ncRNAノックダウンによるHeLa細胞増殖を検討した結果を示している。Aは、本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド（Sat I ASO）でノックダウンしたHeLa細胞の相対増殖曲線を示しており、Bは、顕微鏡写真を示している。

[図4]Satellite I ncRNAノックダウンしたHeLa細胞のDAPIによる核染色の結果を示している。左側は、コントロールオリゴヌクレオチドを用いた結果であり、右側は本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた結果である。上段と下段は、顕微鏡視野内の異なる細胞を示す。

[図5]Satellite I ncRNAノックダウンしたHeLa細胞でのsatellite I ncRNAの発現を、RT-PCR解析した結果を示している。



[図6]Satellite I ncRNAノックダウンしたHeLa細胞内のsatellite I RNAをin situ hybridizationにより可視化した結果を示している。上段が、未処理のHeLa細胞を示しており、下段が、Satellite I ncRNAノックダウンしたHeLa細胞を示している。

[図7]Satellite I ncRNAノックダウンによるオーロラキナーゼのリン酸化活性への影響を検討した結果を示している。

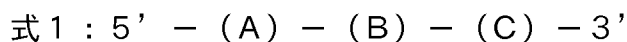
[図8]抗DHX38抗体を用いた免疫共沈実験の結果を示している。レーン1は分子量マーカー、レーン2及び6は、免疫沈降を行わずに細胞より回収した全RNA、レーン3及び7は、オーロラB抗体で免疫沈降させたRNA、レーン4及び8は、抗DHX38抗体で免疫沈降させたRNA、レーン5及び9は、ノーマルIgGで免疫沈降させたRNAの結果を示す。最上段はM期停止細胞を用いてSatellite Iのプライマーを、2段目は非同調細胞を用いてSatellite Iのプライマーを、3段目及び最下段はGAPDHのプライマーを用いてRT-PCRを行った結果である。

[図9]DHX38/Prp16、DHX8(DDX8)/HRH1及びSAP155のそれぞれを、siRNAを用いてノックダウンしたHeLa細胞のDAPIによる核染色の結果を示している。

### 発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は以下に記載の態様に限定されるものではない。

本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の式1で表されるオリゴヌクレオチドであり、satellite I RNAの一部と相補的な配列を含むデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド(DNA)と、その5'末端及び3'末端にリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド(RNA)が連結した配列を有する。



このようにDNAの両端にRNAを結合することにより、DNaseに対する耐性が高くなり、血中や細胞内でも安定に存在できる。

[0017] ここで、A及びCは、それぞれ、少なくとも2以上のリボヌクレオチドか

らなるオリゴヌクレオチドである。A及びCを構成するリボオリゴヌクレオチド数の上限に特に制限はないが、十分な効果が得られかつ合成や使用上の観点より、好ましくは2～5である。A又はCを構成するリボヌクレオチドは、少なくともその一部が修飾されており、例えば、2' - O - メチル置換又は2' - フルオロ置換を挙げることができるが、これに限定されるものではない。A又はCのリボヌクレオチドが修飾されることにより、DNase等の核酸分解酵素に対する耐性が向上し、血中や細胞内でも安定に存在できる。

また、A及びCは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、又はホスホラミデートのいずれかのヌクレオチド間結合、好ましくはホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合したオリゴヌクレオチドであり、それにより、細胞内での核酸分解酵素に対する耐性が向上し安定に存在できる。

本発明においては、ターゲット (satellite I RNA) の一部と相補的な配列であるDNAの両端に、修飾されたりボヌクレオチド、好ましくは2' - O - メチル基置換されたりボヌクレオチドのみからなる2～5の塩基数のRNAを有するDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドが好適に用いられる。

[0018] 前記式1において、Bは、配列番号1に示されるsatellite I RNAの配列（又はその亜種の配列）の一部と相補的な配列を含み、少なくとも5以上のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。Bを構成するデオキシリボオリゴヌクレオチド数の上限は、特に制限はないが、十分な効果が得られかつ合成や使用上の観点より、好ましくは20である。Bは、好ましくは、その一部に、ヒトのsatellite I RNAの一部である連続する少なくとも5、好ましくは6以上の塩基数からなる配列と相補的な配列を含む。

また、Bは、好ましくはホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、又はホスホラミデートのいずれかのヌクレオチド間結合、特に好ましくはホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合したオリゴ

ヌクレオチドであり、それにより、細胞内での核酸分解酵素に対する耐性が向上し安定に存在できる。

本発明においては、ターゲット (satellite I RNA) の一部と完全に相補する少なくとも6塩基数の配列を含むホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合したDNAの両端に、修飾されたりボヌクレオチド、好ましくは2'-O-メチル基置換されたりボヌクレオチドのみからなる2~5の塩基数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合したRNAを、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合したDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドが好適に用いられる。

[0019] 本明細書において、「satellite I RNAの配列 (又はその亜種の配列)」および「satellite I RNAの配列又はその亜種の配列」は、互いに置き換え可能で用いられ、その亜種の配列とは、human alphoid repetitive DNA もしくは human alpha satellite DNAとして、GenBank、EMBL-Bank、またはDDBJ 核酸配列データベースに登録されているDNA配列に対応するRNA配列の全部又は一部であって、配列番号1に記載の配列と少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有する配列を含む意味であり、例えば、GeneBankのAccession No. M15484~M15495、M21702~M21729、M21746、M22267~M22297、M28031~M28040、M28426、X13630~X13657、X14266~X14278、AJ130751~AJ130762、AJ131207~AJ131208、M27771~M27780の配列、EMBL-BankのAccession No. AJ001558、Z12004の配列に対応するRNA配列をあげることができる。

[0020] 本発明において、Bは、特に好ましくは、配列番号2に示される配列 (5'-ACAAAAGAG-3') を含むDNAであり、更には、前記配列を含むホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合されたDNAが最も好ましい。

[0021] 本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、化学合成により製造できる。化学合成は、通常のDNAオリゴヌクレオチドの合成方法とRNAオリゴヌクレオチドの合成方法を適宜組み合わせることによ

り行うことができる。例えば、DNA合成機を用いて、ホスホトリエステル法又はホスホロアミダイド法により合成することができる。また、修飾されたRNAや、ホスホチオエートヌクレオチド間結合したRNAやDNAも化学合成により製造できる。

[0022] 別の観点より、本発明はまた、前記DNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、オーロラBキナーゼの活性阻害剤及び/又はオーロラBキナーゼのセントロメア局在化阻害剤である。本発明の前記DNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、オーロラBキナーゼと結合するsatellite I ncRNA と結合することにより、オーロラBキナーゼの活性を阻害するとともに、オーロラBキナーゼのセントロメアへの局在化を阻害する。

[0023] 本発明はさらに、前記DNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む癌に対する核酸医薬組成物である。本発明のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、癌で高発現しているオーロラBキナーゼの機能を、活性及びセントロメアへの局在化の2つの側面から阻害することにより、がん細胞に対して抗癌性を示す。

本発明の抗癌性医薬組成物を用いることができる癌腫は特に限定されないが、例えば、乳癌、肺癌、前立腺癌、直腸癌、食道癌、胃癌、膀胱癌、膵臓癌、子宮頸癌、頭部及び頸部の癌、脳の癌、卵巣癌、メラノーマ、リンパ腫をあげることができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは他の抗癌剤（例えば、化学療法剤）と併用して使用することができ、また、本発明の抗癌核酸医薬組成物はさらに、他の抗癌剤（例えば、化学療法剤）を含むことができる。他の抗癌剤としては、例えば、EGFR阻害剤（例えば、Erlotinib）、Bortezomib、nutlin-3やTaxotereをあげることができるが、これらには限定されない。他の抗癌剤と併用する場合は、同時投与及び種々の順序での連続投与を含む。

また本発明の医薬組成物は、経口的、局所的、非経口的に投与することができ、好ましくは、非経口的投与、例えば、静脈内投与、皮下投与又は動脈

内投与である。投与されるアンチセンスオリゴヌクレオチド量は、患者の状態及び対象とする癌の種類に応じて、適宜選択される。

[0024] 本発明者らは、染色体セントロメア機能の解析途上で、核内に局在する satellite I ncRNA がオーロラ B キナーゼと複合体を形成していることを発見した。そこで、satellite I ncRNA の機能を解明するため、satellite I ncRNA に結合する（ハイブリダイズする）相補的な塩基配列を持つ DNA/RNA キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入することにより、核内に存在する RNase H 活性で satellite I ncRNA を分解させ、その機能をロックダウンする解析を行った。その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドの結合によって satellite I ncRNA の機能が阻害された細胞では細胞分裂に異常が生じ、培養癌細胞 (HeLa 細胞) の増殖を強く停止した。また、ロックダウン細胞では、オーロラ B キナーゼの分裂期特有な染色体セントロメアへの局在が異常となることが明らかとなった。これらのことより、オーロラ B キナーゼの酵素活性や細胞内分布制御に必須な RNA 因子である satellite I ncRNA を機能阻害することにより、癌細胞の増殖停止や死滅を引き起こすことができることが示された。

[0025] このように、本発明の DNA/RNA キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、塩基対合を介して極めて高い特異性で satellite I ncRNA のみに作用できるので、従来のオーロラキナーゼの阻害剤 (ATP の拮抗結合阻害低分子化合物) に比べ、細胞内でオーロラキナーゼを選択的に阻害できる利点がある。

さらに、オーロラキナーゼによる染色体分離の制御には、その酵素活性だけでなく、細胞分裂の進行に伴ってオーロラキナーゼがセントロメアに分布 (局在化) することも極めて重要である。satellite I ncRNA はオーロラキナーゼの細胞内分布制御にも関わっている。従って、本発明による、satellite I ncRNA を標的とした機能抑制は、従来のオーロラキナーゼ酵素活性抑制型の抗癌剤とは作用機作が全く異なる新しいものであり、オーロラキナーゼの活性阻害のみならず、細胞内でのセントロメア局在化をも阻害する作用を併

せ持ち、新たな抗癌剤として有用である。

[0026] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

## 実施例

[0027] 実施例 1 : DNA / RNA キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド (Sat I RNA ASO) の調製

図 1 上段に、染色体セントロメアのSatellite I ncRNAの繰り返し構造の単位の配列を示す。下線部分は、今回の実験で標的とした領域を示している。

図 1 下段に示すアンチセンスオリゴヌクレオチドを、INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT)に依頼し合成した。RNAは、2' -O-メチル基で置換されたアデニン、グアニン、シトシン、及びウラシルを用いた。また、RNA及びDNAは、全ての塩基は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合により結合させた。

[0028] 実施例 2 : 免疫共沈実験

以下の方法により、オーロラBキナーゼとSatellite I ncRNAが結合していることを確認した。

(1) Satellite I RNA のRT-PCR

HeLa細胞からTrizol試薬 (Invitrogen) を用いてTotal RNAを回収した。Total RNA 1 $\mu$ gからPrimeScript II 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis Kit (TaKaRa) を用いてcDNAを合成した。合成したcDNAの1/10量を用いてPCRを行った。逆転写およびPCR反応に用いたPrimerの配列を以下に示す。コントロールとして、GAPDHを用いた。

[0029] プライマー配列 :

M13 SatI p4n Rev (配列番号 4) :

5' - CCGTAAAACGACGGCCAGCTTCTGTCTAGTTTTTATGTGAAGATA -3'

SatI p4n F (配列番号 5) : 5' - CATTCTCAGAACTTCTTTGTGATGTG -3'

M13 (配列番号 6) : 5' - CCGTAAAACGACGGCCAG -3'

GAPDH-3 (配列番号7) : 5'-CTGGGCTACACTGAGCAC -3

GAPDH-4 (配列番号8) : 5'-GGTCCACCACCCTGTTGC -3'

[0030] (2) Satellite I ncRNA の免疫沈降解析

HeLa細胞を二重チミジンブロック法にてG1/S期に同調後、100 ng/ml Nocodazol (SIGMA) を加えてM期ブロック (分裂期で細胞周期を停止) した。M期ブロックしたHeLa細胞 $1 \times 10^7$  cellを1 mlのLysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF 0.5% NP40)に懸濁し、氷上で10分静置した後に、4°C 15,000 rpm 10分遠心し、上精を回収した。上精にDynabeads-Protein G (Invitrogen)に結合させた抗Aurora B抗体 (Santa Cruz : ARK-2(H-75) sc-25426) を加え、4°Cにて 3時間反応した。BeadsをLysis bufferで4回洗浄し、Trizol試薬 (Invitrogen) を用いて共沈したRNAを回収した。その後、上記(1)の方法と同様にしてRT-PCRを行った後、ゲル電気泳動を行った。コントロールとして、normal IgG抗体を用いた。結果を図2に示す。

図2に示すように、レーン3 (IP: Aurora B抗体) を用いたものは、Satellite I ncRNAのバンドが確認でき、オーロラBキナーゼとsatellite I ncRNAが共沈し、両者が結合していることが確認された。なお、コントロールとして、normal IgGを用いたものは、オーロラBキナーゼと共沈せず、結合は確認されなかった。

このことから、オーロラBキナーゼとsatellite I ncRNAが特異的に結合していることが示された。

[0031] 実施例3 : Satellite I ncRNAノックダウンによる細胞増殖阻害

(1) Sat I RNA ASO のHeLa細胞への導入 (トランスフェクション)

HeLa細胞 $5 \times 10^5$  cellに、実施例1で調製したアンチセンスオリゴヌクレオチド (Sat I RNA ASO) 500 pmolをLipofectamin2000 (Invitrogen) を用いて導入した。48時間培養した後に、再度Sat I RNA ASO 500 pmolを導入し、さらに48時間培養した。コントロールとして、ランダムな配列を持つオリゴヌクレオチドを用いた。

結果を図3に示す。図3 (A) は、Satellite I ncRNAノックダウンによる

HeLa細胞の相対増殖曲線を示しており、コントロールオリゴヌクレオチドでは増殖に全く影響がないが、Satellite I ncRNAを標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理すると、多くの細胞が48時間で死滅した。

図3(B)は、オリゴヌクレオチド導入48時間後の細胞写真である。コントロールオリゴヌクレオチドでは、HeLa細胞が良く増殖しているが、Satellite I ncRNAアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞群では、殆どの細胞が死滅していることが確認された。

[0032] 実施例4 : Satellite I ncRNAノックダウンした細胞のDAPIによる核染色

実施例3で得られたHeLa細胞を、DAPIにより核染色を行った。結果を図4に示す。ノックダウンされた細胞では、細胞分裂が正常に起こらず、葡萄房様小核と呼ばれる無数の小さな核を持つ細胞の出現が確認された。

[0033] 実施例5 : Satellite I RNA ノックダウンのRT-PCR解析による検証

実施例2(1)と同様にして、実施例1で調製したSat I RNA ASOを導入したHeLa細胞からTrizol試薬 (Invitrogen) を用いてTotal RNAを回収し、Satellite I RNA 量のRT-PCR解析を行った。結果を図5に示す。図中の矢印は、ノックダウン検証実験において、RT-PCRによりRNAの検出に用いたプライマー配列部分を示す。3'側プライマーには、M13タグ配列を附加することでPCR反応時の特異性をあげた。

Sat I RNA ASO によるノックダウンを行うと、Satellite I RNA量が減少することが確認された。一方、GAPDH mRNA量に変化は生じなかった。

[0034] 実施例6 : Satellite I ncRNAノックダウンのin situ hybridizationによる検証

実施例1で調製したSat I RNA ASO によりノックダウンしたHeLa細胞内のsatellite I RNAを、以下の手順に従い、in situ hybridizationにより可視化した。

(1) Sat I RNA の蛍光in situ hybridization

カバーガラス上に培養したHeLa細胞を、4% パラフォルムアルデヒド/PBS溶液で室温10分間固定し、プレハイブリダイゼーション溶液 (2xSSC, 1xデンハ



ルト溶液, 50% ホルムアミド, 10mM EDTA, 100 $\mu$ g/ml yeast tRNA, 0.01% Tween 20) 中にて55 $^{\circ}$ Cにて 2時間保温した。RNAプローブは、DIG RNA Labeling kit (Roche)を用いて調製した。ハイブリダイゼーション溶液 (プレハイブリダイゼーション溶液+ 5% デキストランサルフェート) にRNAプローブを懸濁し、HeLa細胞に加え55 $^{\circ}$ Cにて 一晩保温した。プローブとハイブリダイゼーションさせたHeLa細胞をWash buffer (2xSSC, 50% ホルムアミド, 0.01% Tween 20)で2回洗浄(55 $^{\circ}$ C 30分)した。過剰量のRNAプローブはNTET buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 500mM NaCl, 0.1% Tween 20) 中にて10 $\mu$ g/ml RNase Aで55 $^{\circ}$ C 1時間処理して分解した。その後細胞を1次洗浄液 (2xSSC, 0.01% Tween 20) および2次洗浄液 (0.1xSSC, 0.01% Tween 20) で、それぞれ2回ずつ洗浄(55 $^{\circ}$ C 30分)した。細胞を1x Roche Blocking Reagent (Roche)/TBST (Tris-buffered saline, 0.01% Tween20)にて、室温で1時間 Blockingした後、Blocking Reagentに希釈した抗DIG- mouse IgG(Roche)と室温で1時間反応させた。細胞をTBSTで3回洗浄(室温15分)した後に、抗mouse Ig抗体- Rhodaminと室温1時間反応させ、TBSTで3回洗浄(室温15分)した後に封入して蛍光を観察した。結果を図6に示す。写真は視野内4箇所 of 細胞を示す。

上段に示した未処理の HeLa 細胞で観察されるように、通常、サテライト I RNAは核内でドット状に分布している (恐らく染色体セントロメア領域に集積していると思われる)。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドでノックダウンすると、ドット状のシグナルが消失し、サテライト I RNAが分解されていることが示唆された。

[0035] 実施例7 : Satellite I ncRNAノックダウンによるオーロラキナーゼのリン酸化活性への影響

染色体分離においてキネトコアとスピンドルの結合を制御するオーロラBキナーゼは、活性化に伴い、自己リン酸化 (自分自身のリン酸化) を行う。また、同時に基質タンパク質であるHistone H3 やCENPAタンパク質のリン酸化を行って染色体分離を制御する。

そこで、オーロラA、オーロラB、ヒストンH3のリン酸化を、HeLa細胞を用

いて、satellite I RNAをアンチセンスオリゴヌクレオチドによってノックダウンしWestern blot 解析を行うことにより検証した。Western blot 解析は、それぞれのリン酸化タンパク質特異的抗体 ( $\alpha$ Phospho-Aurora A、 $\alpha$ Phospho-Aurora B、 $\alpha$ Phospho-Histone H3 S10) とタンパク質の全体量を検出する通常の抗体 ( $\alpha$ Aurora B、 $\alpha$ Histone H3、 $\alpha$ GAPDH) を用いて行った。結果を図7に示す。

オーロラBキナーゼ及びオーロラAキナーゼの自己リン酸化活性の上昇、基質タンパク質の一つである Histone H3 のリン酸化活性の上昇が検出された (10番目のセリン残基のリン酸化 : Histone H3 S10)。この結果は、satellite I RNAがオーロラBキナーゼ (及びオーロラAキナーゼ) のリン酸化活性制御に関わっていることを示唆している。

[0036] 実施例8 : スプライシング因子とsatellite 1 ncRNAとの結合の検討

実施例2と同様にして、免疫共沈実験を行った。但し、抗Aurora B抗体の代わりに、スプライシング因子DHX38の免疫沈降解析では、非同調HeLa細胞 (M期ブロックにない細胞) の抽出液を用い、抗DHX38抗体で沈降させ、RNAを回収した。

結果を図8に示す。M期停止HeLa細胞抽出液もしくは非同調HeLa細胞抽出液を用いて、オーロラB抗体もしくはDHX38抗体で免疫沈降させると、それぞれ、サテライト I RNAと一緒に沈降してくることが示された。これらの結果から、オーロラBはM期細胞において、スプライシング因子DHX38/Prp16 は間期細胞においてサテライト I ncRNAと結合していることが示唆された。一方、GAPDH mRNAはサテライト I RNAと結合しなかった。

[0037] 実施例9 : スプライシング因子の細胞分裂への関与に関する検証

HeLa間期細胞において、satellite I ncRNAと結合が見られたスプライシング因子DHX38/Prp16、及びDHX38/Prp16と同様にスプライシング反応に関わる複合体スプライソソームの構成成分であるDHX8/HRH1及びSAP155を、それぞれ、以下に示す配列のsiRNAを用いてノックダウンした。siRNAは、株式会社RNAiに依頼して合成した。

## DHX38/Prp16

センス（配列番号 9）：5' -CCAAACUGGGAGAUUAAUdTdT-3'

アンチセンス（配列番号 10）：5' -AUUUAUUCUCCCAGUUUGGdTdT-3'

## DHX8/HRH1

センス（配列番号 11）：5' -GCUUUAUGCCCAGCGCAGdTdT-3'

アンチセンス（配列番号 12）：5' -CUGCGCUGGGCAUUAAGCdTdT-3'

## SAP155

センス（配列番号 13）：5' -GCAUAGGCGGACCAUGAUAdTdT-3'

アンチセンス（配列番号 14）：5' -UAUCAUGGUCCGCCUAUGCdTdT-3'

上記配列中、dTはデオキシチミジンを表す。

[0038] 結果を図9に示す。その結果、satellite I ncRNAをノックダウンした細胞と同様な染色体分離異常に起因する細胞分裂の破綻（葡萄状房核の出現）が観察された。これらの結果は、一部のスプライシング因子がsatellite I ncRNAを介して、染色体分離の制御にも関わっている可能性を示唆している。

[0039] 以上のように、オーロラBキナーゼに結合するsatellite I ncRNAを、高効率で機能阻害するDNA/RNAアンチセンスオリゴヌクレオチドは、既存のオーロラキナーゼATP拮抗型阻害剤よりも特異性が高く、また高効率で癌細胞の分裂増殖を阻害できる新規な抗癌核酸医薬として有用である。

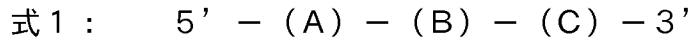
[0040] 上記の記載は、本発明の目的及び対象を単に説明するものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。添付の特許請求の範囲から離れることなしに、記載された実施態様に対しての、種々の変更及び置換は、本明細書に記載された教示より当業者にとって明らかである。

### 産業上の利用可能性

[0041] 本発明のセントロメア由来のサテライトIノンコーディングRNA（satellite I ncRNA）に対するアンチセンス配列を有する核酸は、新たなオーロラB阻害剤として、また新たな抗癌核酸医薬として有用である。

## 請求の範囲

[請求項1] 以下の式1で表されるDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド、



ここで、Aは、少なくとも2以上のリボヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドであり、Bは、配列番号1で示されるsatellite RNA配列又はその亜種の配列の一部と相補的な配列を含む、少なくとも5以上のデオキシリボヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドであり、Cは、少なくとも2以上のリボヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドである、

ここで、前記AおよびCは、それぞれ、その一部のリボヌクレオチドが安定化のために修飾されており、かつ、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、A、B及びCを構成するヌクレオチドが、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、又はホスホラミデートのいずれかのヌクレオチド間結合で結合したオリゴヌクレオチドである。

[請求項2] 前記式1のBが、配列番号1の配列の一部である連続する少なくとも6つのオリゴヌクレオチドと相補的な配列を含む、前記(1)に記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項3] 前記式1において、Bのヌクレオチド数が10~20である前記(1)又は(2)に記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項4] 前記式1において、AおよびCのヌクレオチド数が2~5である、前記(1)~(3)のいずれかに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項5] 前記修飾されてもよいリボヌクレオチドが、2'-O-メチル置換された又は2'-フルオロ置換されたリボヌクレオチドである、前記(1)~(4)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチ

センスオリゴヌクレオチド。

[請求項6] 前記A、B及びCを構成するヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合で結合した、前記(1)～(5)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項7] 前記Bが、配列番号2で示される下記配列

5' - A C A A A A A G A G - 3'

を含む、前記(1)～(6)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項8] 前記式1が、下記配列(配列番号3)

5' - m A \* m U \* m U \* m C \* m C \* A \* C \* A \* A \* A \* A \* A \* G \* A \* G \* m U \* m G \* m U \* m U \* m U - 3'

(ここで、mは、2'-O-メチル置換による修飾を表し、\*は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合をしめす)

で示される請求項1に記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項9] 前記(1)～(8)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むオーロラBキナーゼの活性阻害剤。

[請求項10] 前記(1)～(8)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むセントロメア局在化阻害剤。

[請求項11] 前記(1)～(8)のいずれか一つに記載のDNA/RNAキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む抗癌核酸医薬組成物。

[請求項12] さらに他の抗癌剤を含む、前記(11)に記載の医薬組成物。

[図1]

**Satellite I p4n 1/4 (S67971)  
171bp**

cauucucaga aacuucuuug ugaugugucc auucaacuca cagaguugaa ccuuucuuuu  
 gauagagcag uuuugaaaca cucuuuuugu agaaucugca aguggauuu uggagcgcuu  
 ugaggccuau gguggaaaag gaaauaucuu cacauaaaa cuagacagaa g

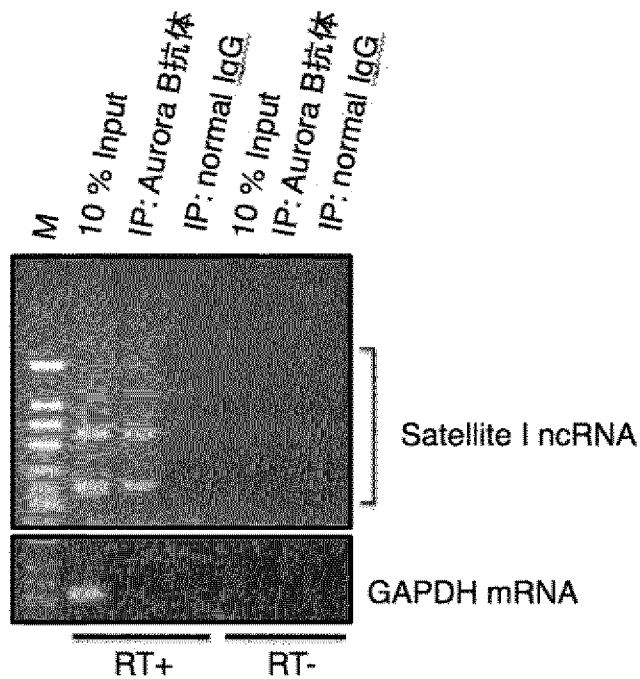
Antisense oligo

5'-mA\*mU\*mU\*mC\*mC\*A\*C\*A\*A\*A\*A\*A\*G\*A\*G\*mU\*mG\*mU\*mU\*mU\*-3'

m:2'-O-methyl

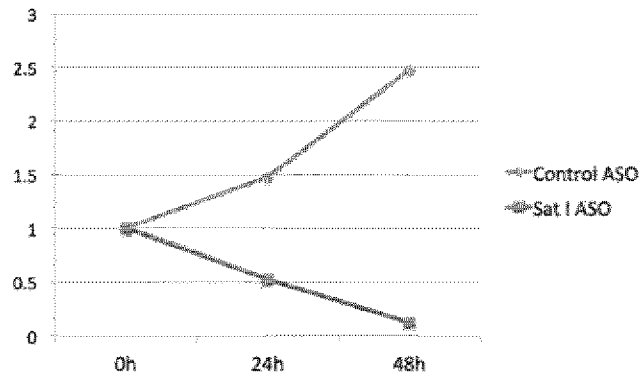
\*: phosphorothioates

[図2]

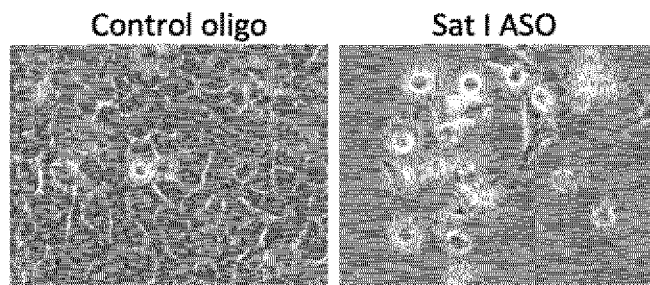


[図3]

(A)

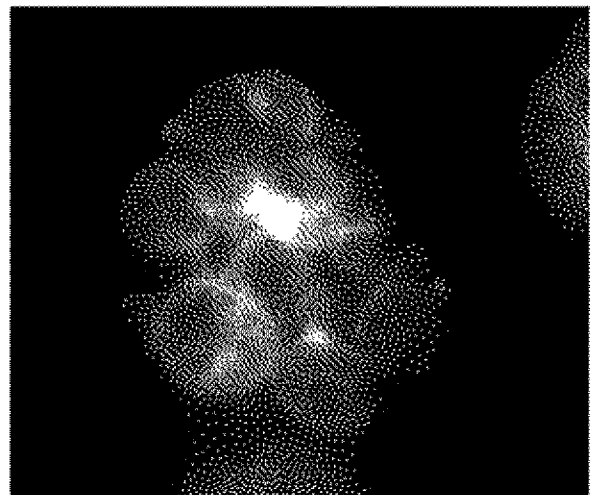
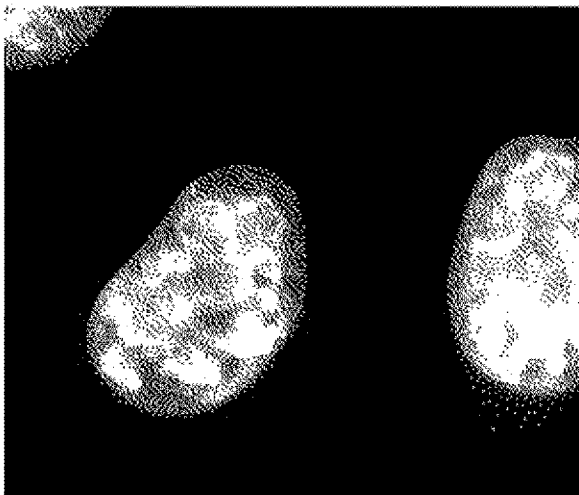
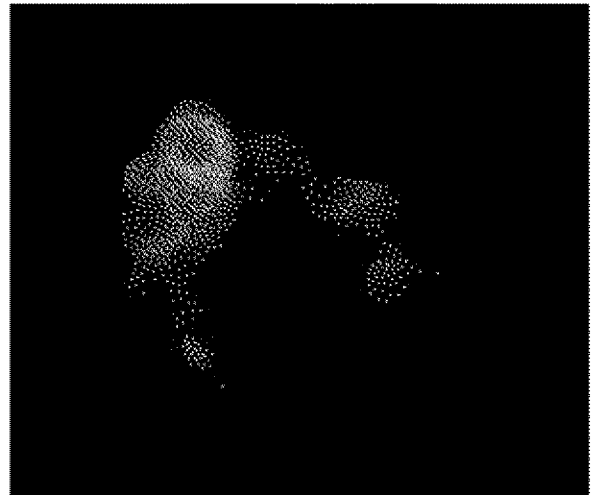
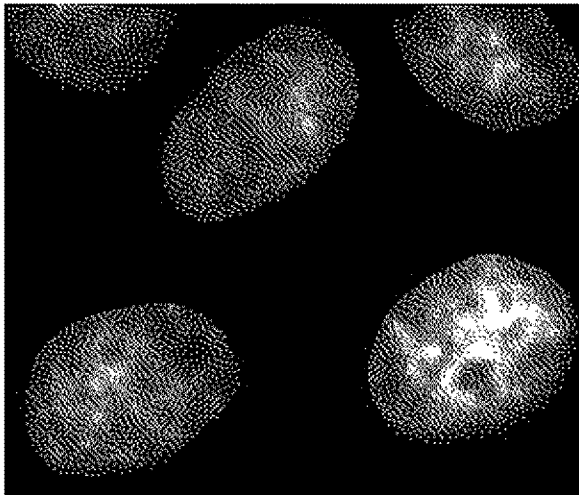


(B)



[図4]

Control

 $\Delta$ Satellite I

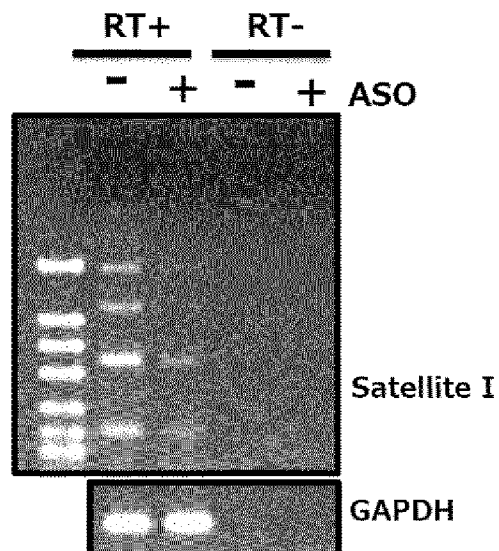
[図5]

Satellite I

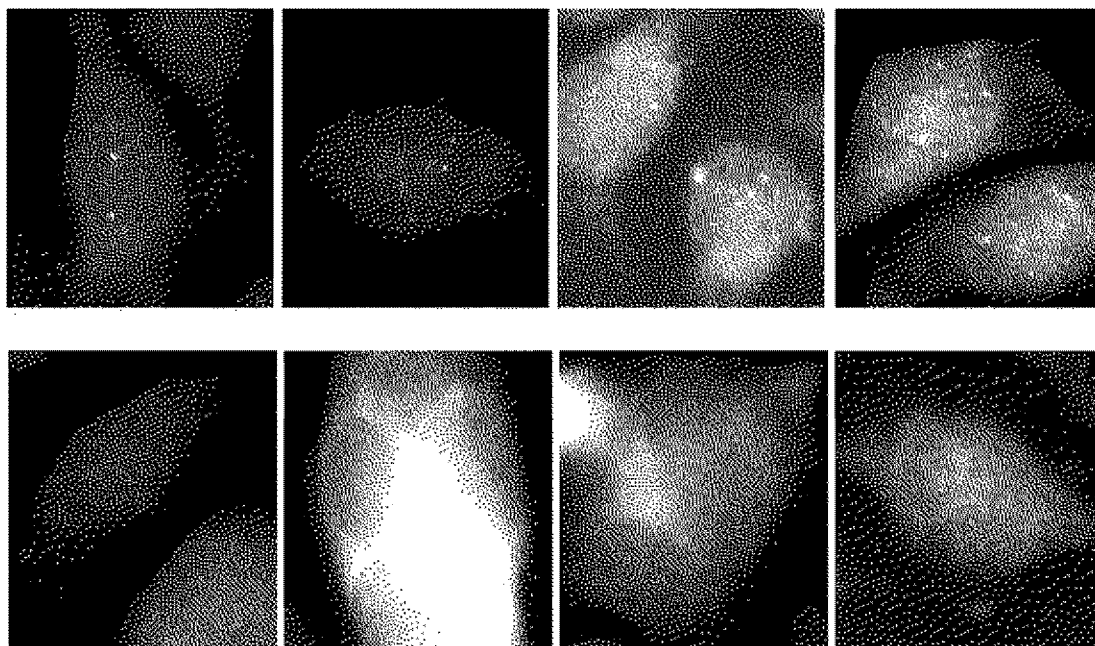
171bp

cauucucaga aacuucuuug ugaugugucc  
 auucaacuca cagaguugaa ccuucuuuu  
 gauagagcag uuuugaaaca cucuuuuugu  
 agaaucugca aguggauuu uggagcgcuu  
 ugaggccuau gguggaaaag gaaauaucuu  
 cacauaaaa cuagacagaa g

M13タグ配列

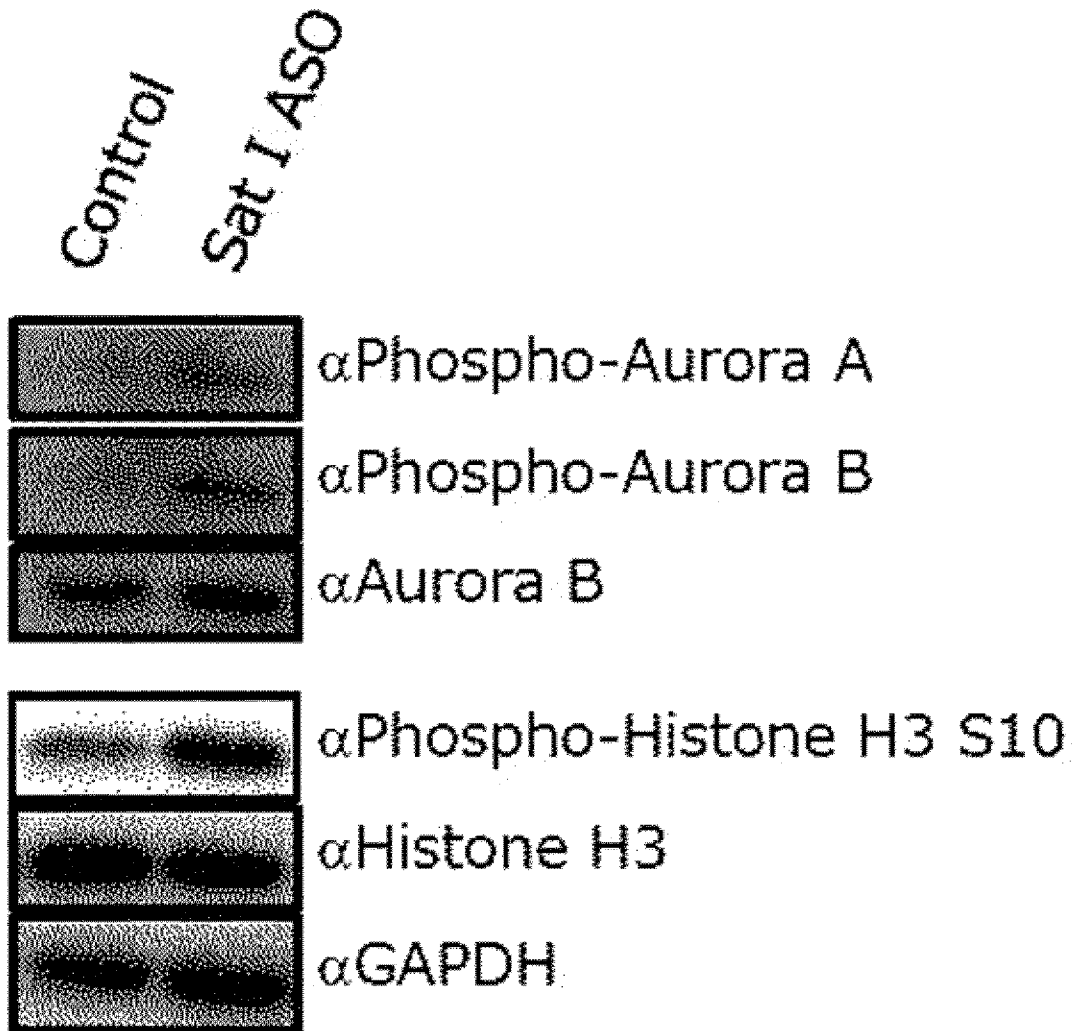


[図6]

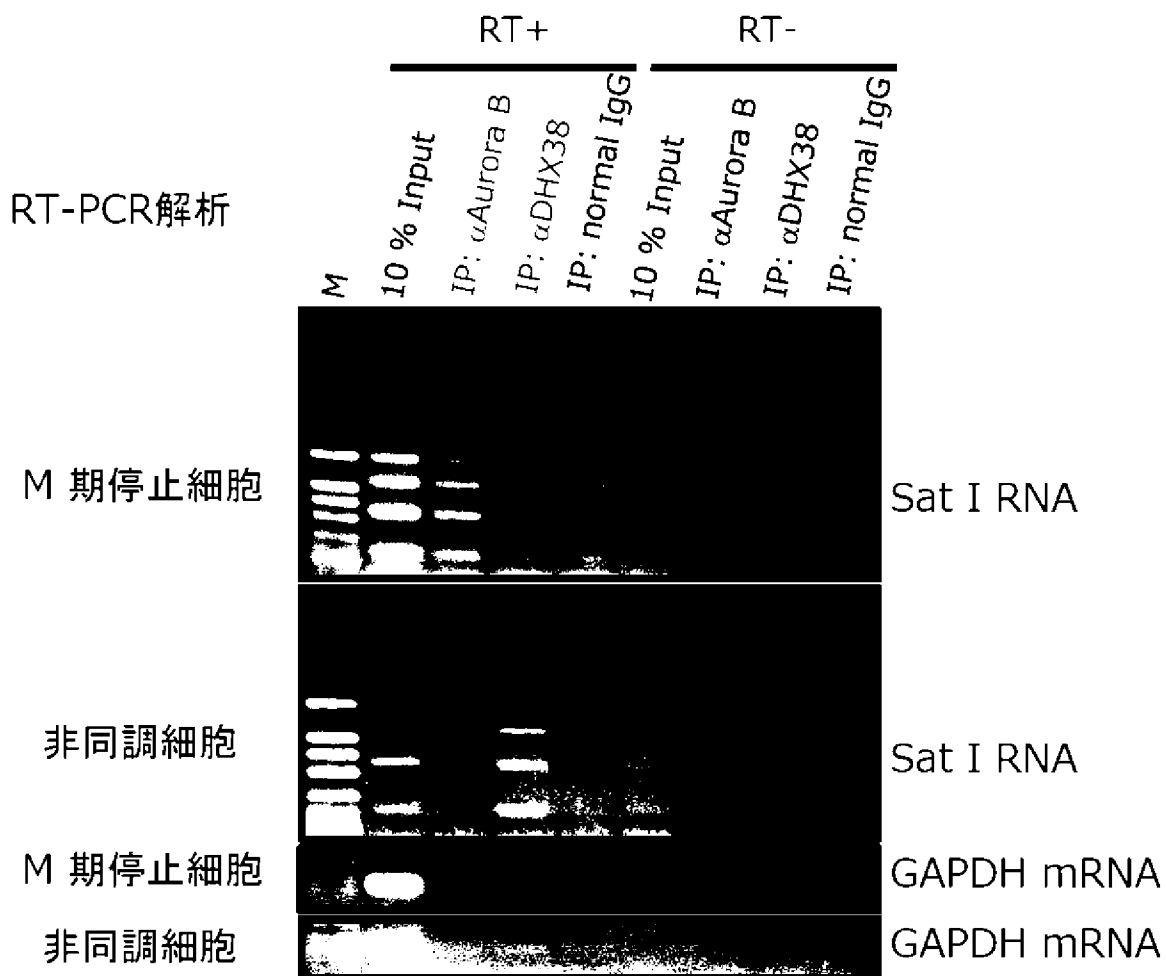




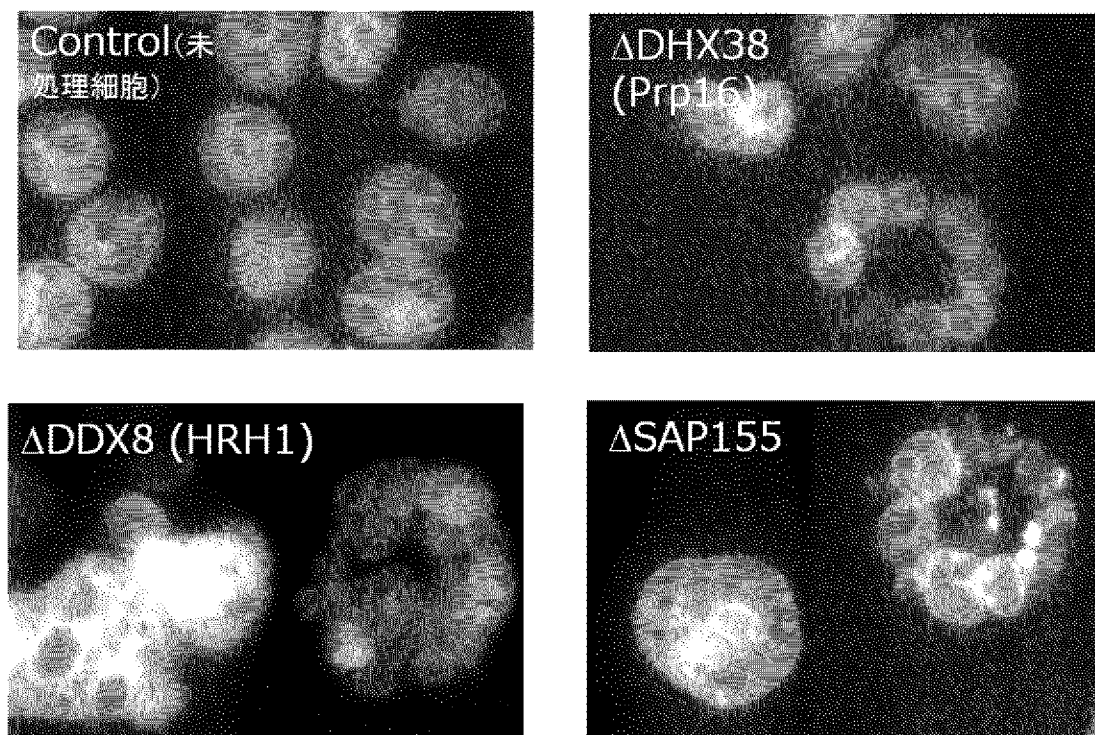
[図7]



[図8]



[図9]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2013/069541

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
*C12N15/113(2010.01) i, A61K31/7115(2006.01) i, A61K31/7125(2006.01) i, C12N9/12(2006.01) i, C12N15/09(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)  
*C12N15/113, A61K31/7115, A61K31/7125, C12N9/12, C12N15/09*

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)  
*CA/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CiNii, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq*

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Takeshi IDEUE et al., "Functional analysis of centromeric ncRNA regulating chromosome segregation in mammalian cells", Dai 14 Kai The RNA Society of Japan Nenkai Yoshishu, 2012, page 44, 0-11.	1-12
Y	Masatoshi MUTAZONO et al., "Centromere Heterochromatin Keisei ni Okeru dg ncRNA Intron no Yakuwari", Dai 14 Kai The RNA Society of Japan Nenkai Yoshishu, 2012, page 145, P-33	1-12
Y	FERRI, F. et al., Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase, Nucleic Acids Res., 2009, Vol.37, No.15, pages 5071-5080.	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 16 August, 2013 (16.08.13)	Date of mailing of the international search report 27 August, 2013 (27.08.13)
---	--

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069541

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	D'AIUTO, L. et al., Cloning and comparative mapping of a human chromosome 4-specific alpha satellite DNA sequence, GENOMICS, 1993, Vol.18, pages 230-235.	1-12
A	MOHUCZY, D. and PHILLIPS, M. I., Designing antisense to inhibit the renin-angiotensin system, Mol. Cell Biochem., 2000, Vol.212, pages 145-153.	1-12
A	GREEN, D. W. et al., Antisense oligonucleotides: an evolving technology for the modulation of gene expression in human disease, J. Am. Coll. Surg., 2000, Vol.191, No.1, pages 93-105.	1-12
A	JP 2005-503142 A (Isis Pharmaceuticals Inc.), 03 February 2005 (03.02.2005), entire text & JP 2009-55925 A & JP 2013-66480 A & JP 2006-522586 A & JP 2010-193894 A & JP 2013-66488 A & US 2003/0087853 A1 & US 2003/0215943 A1 & US 2008/0242629 A1 & US 2004/0214325 A1 & US 2005/0009088 A1 & US 2006/0009410 A1 & US 2010/0331390 A1 & EP 1419168 A & EP 2174945 A1 & EP 2336145 A1 & EP 1569695 A & EP 2336318 A1 & EP 2336319 A1 & WO 2003/011887 A2 & WO 2003/097662 A1 & WO 2004/044181 A2	1-12
A	JP 2006-511207 A (Pharmacia Corp.), 06 April 2006 (06.04.2006), entire text & EP 1543159 A & WO 2004/021978 A2	1-12
A	WO 2004/026343 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 01 April 2004 (01.04.2004), entire text & US 2006/0258602 A1 & EP 1550463 A1	1-12
A	BASSETT, E. A. et al., Epigenetic centromere specification directs aurora B accumulation but is insufficient to efficiently correct mitotic errors, J. Cell Biol., 2010, Vol.190, No.2, pages 177-185.	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7115(2006.01)i, A61K31/7125(2006.01)i, C12N9/12(2006.01)i, C12N15/09(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. C12N15/113, A61K31/7115, A61K31/7125, C12N9/12, 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		
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/MEDLINE/BIOSIS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、PubMed、CiNii、GenBank/EMBL/DDBJ/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 請求項の番号
Y	井手上賢 他, 哺乳動物の染色体分離を制御するセントロメア由来 n c R N A の解析, 第 1 4 回日本 R N A 学会年会要旨集, 2012, page 44, 0-11.	1-12
Y	牟田園正敏 他, セントロメアヘテロクロマチン形成における d g n c R N A イントロンの役割, 第 1 4 回日本 R N A 学会年会要旨集, 2012, page 145, P-33.	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 16.08.2013	国際調査報告の発送日 27.08.2013	
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) 白井 美香保 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4502

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	FERRI, F. et al., Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase, <i>Nucleic Acids Res.</i> , 2009, Vol.37, No.15, pages 5071-5080.	1-12
Y	D' AIUTO, L. et al., Cloning and comparative mapping of a human chromosome 4-specific alpha satellite DNA sequence, <i>GENOMICS</i> , 1993, Vol.18, pages 230-235.	1-12
A	MOHUCZY, D. and PHILLIPS, M. I., Designing antisense to inhibit the renin-angiotensin system, <i>Mol. Cell Biochem.</i> , 2000, Vol.212, pages 145-153.	1-12
A	GREEN, D. W. et al., Antisense oligonucleotides: an evolving technology for the modulation of gene expression in human disease, <i>J. Am. Coll. Surg.</i> , 2000, Vol.191, No.1, pages 93-105.	1-12
A	JP 2005-503142 A (アイシス・ファーマシューティカルス・インコーポレーテッド) 2005.02.03, 全文 & JP 2009-55925 A & JP 2013-66480 A & JP 2006-522586 A & JP 2010-193894 A & JP 2013-66488 A & US 2003/0087853 A1 & US 2003/0215943 A1 & US 2008/0242629 A1 & US 2004/0214325 A1 & US 2005/0009088 A1 & US 2006/0009410 A1 & US 2010/0331390 A1 & EP 1419168 A & EP 2174945 A1 & EP 2336145 A1 & EP 1569695 A & EP 2336318 A1 & EP 2336319 A1 & WO 2003/011887 A2 & WO 2003/097662 A1 & WO 2004/044181 A2	1-12
A	JP 2006-511207 A (ファルマシア・コーポレーション) 2006.04.06, 全文 & EP 1543159 A & WO 2004/021978 A2	1-12
A	WO 2004/026343 A1 (住友製薬株式会社) 2004.04.01, 全文 & US 2006/0258602 A1 & EP 1550463 A1	1-12
A	BASSETT, E. A. et al., Epigenetic centromere specification directs aurora B accumulation but is insufficient to efficiently correct mitotic errors, <i>J. Cell Biol.</i> , 2010, Vol.190, No. 2, pages 177-185.	1-12