

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-151544

(P2007-151544A)

(43) 公開日 平成19年6月21日(2007.6.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 37/12	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-302935 (P2006-302935)
 (22) 出願日 平成18年11月8日 (2006.11.8)
 (31) 優先権主張番号 特願2005-324121 (P2005-324121)
 (32) 優先日 平成17年11月8日 (2005.11.8)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504147254
 国立大学法人愛媛大学
 愛媛県松山市道後樋又10番13号
 (74) 代理人 110000040
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
 (72) 発明者 中城 公一
 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学医学部内
 (72) 発明者 浜川 裕之
 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学医学部内
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA11 GA13 HA11
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR55 QR62
 QS16 QS25 QS34
 最終頁に続く

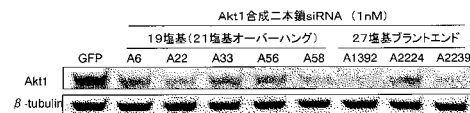
(54) 【発明の名称】 Akt 遺伝子に特異的な s i R N A

(57) 【要約】

【課題】臨床応用可能なAkt遺伝子を標的とするsiRNAの提供を目的とする。

【解決手段】本発明のsiRNAは、Akt1、Akt2及びAkt3遺伝子のいずれかを特異的に標的とする二本鎖siRNAであって、19塩基対と2塩基の3'末端オーバーハングとからなる21塩基の二本鎖siRNA、又は、27塩基対からなるプラントエンドの二本鎖siRNAである。本発明の二本鎖siRNAは、オフターゲット効果及びインターフェロン応答を回避しつつ、Akt1、Akt2及びAkt3遺伝子のいずれかに特異的なRNAiを媒介できるから、例えば、臨床応用が可能であり、Akt1、Akt2又はAkt3を標的分子とした医療や医薬組成物の分野、例えば、口腔癌を含む癌治療に関する治療や医薬組成物の分野で有用である。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 遺伝子のいずれかを特異的に標的とする二本鎖 s i R N A であって、

19塩基対と2塩基の3'末端オーバーハングとからなる21塩基の二本鎖 s i R N A、又は、27塩基対からなるプラントエンドの二本鎖 s i R N A であり、

前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号1から5、10から14、19から23のいずれかであり、

前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号6から8、15から17、24から26のいずれかである二本鎖 s i R N A。

10

【請求項 2】

A k t 1 遺伝子を特異的に標的とする二本鎖 s i R N A であって、

前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号1から5のいずれかであり、

前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号6から8のいずれかである請求項1記載の二本鎖 s i R N A。

【請求項 3】

A k t 2 遺伝子を特異的に標的とする二本鎖 s i R N A であって、

前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号10から14のいずれかであり、

前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号15から17のいずれかである請求項1記載の二本鎖 s i R N A。

20

【請求項 4】

A k t 3 遺伝子を特異的に標的とする二本鎖 s i R N A であって、

前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号19から23のいずれかであり、

前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号24から26のいずれかである請求項1記載の二本鎖 s i R N A。

【請求項 5】

前記3'末端オーバーハング部分の2塩基の配列が、TTである請求項1から4のいずれか一項に記載の二本鎖 s i R N A。

【請求項 6】

前記配列表の配列番号1から8、10から17、19から26の配列において、1又は数個の塩基が修飾され、又は置換、付加若しくは欠失し、かつ、A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 遺伝子のいずれかに特異的なRNA干渉を誘導する請求項1から5のいずれか一項に記載の二本鎖 s i R N A。

30

【請求項 7】

A k t 遺伝子特異的阻害剤であって、請求項1から6のいずれか一項に記載の二本鎖 s i R N A を含み、RNA干渉によりA k t 1、A k t 2 及び A k t 3 遺伝子のいずれかの発現を特異的に阻害するA k t 遺伝子特異的阻害剤。

【請求項 8】

癌治療用の医薬組成物であって、請求項1から6のいずれか一項に記載の二本鎖 s i R N A の少なくとも1つを含む医薬組成物。

40

【請求項 9】

さらに、アテロコラーゲンを含む請求項8記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記癌が、口腔癌又は前立腺癌である請求項8又は9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

A k t 1 遺伝子のA k t 1 m R N A、A k t 1 タンパク質、リン酸化A k t 1 タンパク質、及び、A k t 1 タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される口腔癌の腫瘍マーカーであって、前記A k t 1 m R N A が、G e n B a n k アクセッション番号(2005年10月31日付)がN M _ 0 0 5 1 6 3、N M _ 0 0 1 0 1 4 4 3 1 及びN M _ 0 0 1 0 1 4 4 3 2 からなる群から選択される塩基配列からなるm R N A であり、前記A k

50

t 1 タンパク質が、配列表の配列番号 9 のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、被検試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者における口腔癌の存在を示す口腔癌の腫瘍マーカー。

【請求項 1 2】

A k t 2 遺伝子の A k t 2 m R N A、A k t 2 タンパク質、リン酸化 A k t 2 タンパク質、及び、A k t 2 タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される口腔癌の腫瘍マーカーであって、前記 A k t 2 m R N A が、G e n B a n k アクセション番号 (2 0 0 6 年 8 月 2 0 日付) が N M _ 0 0 1 6 2 6 で表される塩基配列からなる m R N A であり、前記 A k t 2 タンパク質が、配列表の配列番号 1 8 のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、被検試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者における口腔癌の存在を示す口腔癌の腫瘍マーカー。

10

【請求項 1 3】

A k t 3 遺伝子の A k t 3 m R N A、A k t 3 タンパク質、リン酸化 A k t 3 タンパク質、及び、A k t 3 タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される口腔癌の腫瘍マーカーであって、前記 A k t 3 m R N A が、G e n B a n k アクセション番号 (2 0 0 6 年 8 月 2 0 日付) が N M _ 0 0 5 4 6 5 で表される塩基配列からなる m R N A であり、前記 A k t 3 タンパク質が、配列表の配列番号 2 7 のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、被検試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者における口腔癌の存在を示す口腔癌の腫瘍マーカー。

【請求項 1 4】

口腔癌の腫瘍マーカーの使用方法であって、被検試料を準備する準備工程と、前記被検試料中に請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の口腔癌の腫瘍マーカーを検出する検出工程と、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する判定工程とを含む口腔癌の腫瘍マーカーの使用方法。

20

【請求項 1 5】

請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の口腔癌の腫瘍マーカーを検出するための検出キットであって、前記 A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 m R N A のいずれかを検出するためのプローブ及びプライマーの少なくとも一方であるポリヌクレオチド、前記 A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 タンパク質のいずれかを検出するための抗体、並びに、抗 A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 タンパク質抗体のいずれかを検出するための抗原及び抗体からなる群から選択される少なくとも一つを含む検出キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、A k t 遺伝子に特異的な s i R N A に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、RNA 干渉 (R N A i n t e r f e r e n c e : R N A i) 技術は、生命科学研究に頻りに利用され、その有用性は広く確認されている。RNA i とは、二本鎖 RNA によって、その配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象をいう。2001年に21塩基の低分子二本鎖 RNA が哺乳動物細胞内で RNA i を媒介できることが報告されてより (非特許文献 1 参照)、s i R N A (s m a l l i n t e r f e r e n c e R N A) は、標的遺伝子の発現抑制方法として頻用されている。また、より高い RNA i 効果を得るための s i R N A の配列選択基準についても報告されている (非特許文献 2 参照)。RNA i 技術は、医薬品への応用や、癌を含む種々の難治性疾患の治療への応用が期待されている。

40

【0003】

しかしながら、s i R N A を臨床応用する場合、インターフェロン応答の問題がある。すなわち、高濃度の合成 s i R N A を細胞内に導入したり、細胞内において高濃度に s i R N A を発現させたりすると、インターフェロン応答が誘導され非特異的な発現阻害や非

50

特異的な細胞増殖阻害が起こる。現在では、10 nM以上の合成 siRNA を細胞内導入するとインターフェロン応答が誘導されることが知られている。

【0004】

さらに、siRNA を臨床応用する場合、オフターゲット効果の問題がある。すなわち、siRNA は、標的遺伝子の発現を抑制できる優れた技術ではあるが、標的遺伝子以外の類似標的配列を有する遺伝子の発現も抑制することが明らかにされている（非特許文献3参照）。

【0005】

他方、Akt1 遺伝子、Akt2 遺伝子及びAkt3 遺伝子を含むAkt 遺伝子ファミリーは、癌遺伝子としての機能が知られており、種々の癌種においてその発癌、増殖、浸潤、及び転移への関与が示唆されている遺伝子である（非特許文献4）。

10

【0006】

しかしながら、これまでに、Akt1 遺伝子などのAkt 遺伝子ファミリーに特異的な siRNA であって、上述したインターフェロン応答の問題や、オフターゲット効果の問題を回避できる臨床応用可能な siRNA は報告されていない。

【非特許文献1】Elbashir SMら、「Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.」Nature 411 (6836): 494-498, 2001.

【非特許文献2】Reynolds Aら、「Rational siRNA design for RNA interference.」Nat Biotechnol 22 (3): 326-330, 2004.

20

【非特許文献3】Jackson ALら、「Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi.」Nat Biotechnol 21 (6): 635-637, 2003.

【非特許文献4】Vivanco Iら、「The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer.」Nat Rev Cancer 2 (7): 489-501, 2002.

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで、本発明は、Akt1、Akt2 及びAkt3 遺伝子のいずれかを特異的に標的とする臨床応用可能な siRNA の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記目的を達成するために、本発明の siRNA は、Akt1、Akt2 及びAkt3 遺伝子のいずれかを標的とする二本鎖 siRNA であって、19塩基対と2塩基の3'末端オーバーハングとからなる21塩基の二本鎖 siRNA、又は、27塩基対からなるプラントエンドの二本鎖 siRNA であり、前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号1から5、10から14、19から23のいずれかであり、前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号6から8、15から17、24から26のいずれかである二本鎖 siRNA である。なお、本発明の二本鎖 siRNA は、いずれも、Akt 遺伝子ファミリーに特異的なRNAiを媒介するという共通の活性を共有し、かつ、この共通の活性に不可欠な重要な構造要素、すなわち、RNAiを媒介するためのAkt 遺伝子ファミリーに対応する共通した重要な構造要素を共有する。

40

【発明の効果】

【0009】

本発明者らは、まず、口腔癌の治療標的分子について鋭意研究を重ね、Akt1 が口腔癌において、治療標的分子となりうることを見出した。すなわち、ヒト全遺伝子を対象に

50

した網羅的遺伝子発現解析を行い、培養ヒト不死化角化上皮細胞及び正常口腔粘膜組織には発現が認められず、培養ヒト口腔癌細胞及び口腔癌組織においてのみ共通して発現が認められる遺伝子として、Akt1遺伝子を同定した。

【0010】

次に、本発明者らは、Akt1遺伝子のsiRNAについてさらに鋭意研究を重ね、1nMという使用濃度であっても十分にRNAi効果を発揮することにより、インターフェロン応答の誘導回避が可能な二本鎖siRNAを見出した。そして、本発明者らは、Akt1遺伝子のsiRNAについて、BLASTサーチを駆使し、Akt1mRNAの非翻訳領域を含めた全配列より他の遺伝子にホモロジーを示さない配列を標的配列として選択し、オフターゲット効果を回避できる二本鎖siRNAを見出し、本発明に到達した。さらに本発明者らは、Akt1遺伝子のファミリー遺伝子であるAkt2及びAkt3遺伝子についても、1nMという使用濃度であっても十分にRNAi効果を発揮し、かつ、オフターゲット効果を回避できる二本鎖siRNAを見出した。

10

【0011】

本発明の二本鎖siRNAによれば、例えば、1nMという使用濃度であっても十分にRNAi効果を発揮できるから、好ましくは、インターフェロン応答を回避して使用できる。また、本発明の二本鎖siRNAは、Akt1、Akt2及びAkt3遺伝子のいずれかに特異的であるから、好ましくは、オフターゲット効果を回避して使用できる。したがって、本発明の二本鎖siRNAは、好ましくは、臨床応用可能であり、例えば、癌の治療、癌治療の医薬組成物、Akt1、Akt2及びAkt3のいずれかに特異的なAkt

20

【0012】

とりわけ、本発明の二本鎖siRNAがRNAi効果を発揮するAkt1、Akt2及びAkt3遺伝子は口腔癌又は前立腺癌における治療標的分子であるから、本発明の二本鎖siRNAは、好ましくは、口腔癌又は前立腺癌の治療や、口腔癌又は前立腺癌の医薬組成物等に利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の二本鎖siRNAは、一態様として、Akt1遺伝子を特異的に標的とする二本鎖siRNAであって、前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号1から5のいずれかであり、前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号6から8のいずれかである二本鎖siRNAである。なお、この態様の本発明の二本鎖siRNAは、いずれも、Akt1遺伝子に特異的なRNAiを媒介するという共通の活性を共有し、かつ、この共通の活性に不可欠な重要な構造要素、すなわち、RNAiを媒介するためのAkt1遺伝子に対応する共通した重要な構造要素を共有する。

30

【0014】

また、本発明の二本鎖siRNAは、一態様として、Akt2遺伝子を特異的に標的とする二本鎖siRNAであって、前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号10から14のいずれかであり、前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号15から17のいずれかである二本鎖siRNAである。なお、この態様の本発明の二本鎖siRNAは、いずれも、Akt2遺伝子に特異的なRNAiを媒介するという共通の活性を共有し、かつ、この共通の活性に不可欠な重要な構造要素、すなわち、RNAiを媒介するためのAkt2遺伝子に対応する共通した重要な構造要素を共有する。

40

【0015】

さらにまた、本発明の二本鎖siRNAは、一態様として、Akt3遺伝子を特異的に標的とする二本鎖siRNAであって、前記19塩基対の配列が、配列表の配列番号19から23のいずれかであり、前記27塩基対の配列が、配列表の配列番号24から26のいずれかである二本鎖siRNAである。なお、この態様の本発明の二本鎖siRNAは、いずれも、Akt3遺伝子に特異的なRNAiを媒介するという共通の活性を共有し、かつ、この共通の活性に不可欠な重要な構造要素、すなわち、RNAiを媒介するための

50

A k t 3 遺伝子に対応する共通した重要な構造要素を共有する。

【0016】

本発明の21塩基オーバーハング二本鎖 s i R N A において、前記3'末端オーバーハング部分の2塩基の配列は、T T (チミン・チミン)であることが好ましい。

【0017】

本発明の二本鎖 s i R N A は、その他の態様として、前記配列表の配列番号1から8、10から17、19から26の配列において、1又は数個の塩基が修飾され、又は置換、付加若しくは欠失し、かつ、A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 遺伝子のいずれかに特異的な R N A 干渉を誘導する二本鎖 s i R N A である。

【0018】

本発明の A k t 遺伝子ファミリー特異的阻害剤は、R N A 干渉により A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 遺伝子のいずれかの発現を特異的に阻害する A k t 遺伝子ファミリー特異的阻害剤であって、本発明の二本鎖 s i R N A を含む。

【0019】

本発明の医薬組成物は、癌治療用の医薬組成物であって、本発明の二本鎖 s i R N A の少なくとも1つを含む医薬組成物である。本発明の医薬組成物は、さらに、アテロコラーゲンを含むことが好ましい。本発明の医薬組成物において、治療用途の対象となる癌は、特に制限されないが、例えば、口腔癌、前立腺癌等があげられ、中でも、口腔癌であることが好ましい。

【0020】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーは、一態様として、A k t 1 遺伝子の A k t 1 m R N A、A k t 1 タンパク質、リン酸化 A k t 1 タンパク質、及び、A k t 1 タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される口腔癌の腫瘍マーカーであって、前記 A k t 1 m R N A が、G e n B a n k アクセション番号(2005年10月31日付)が N M _ 0 0 5 1 6 3、N M _ 0 0 1 0 1 4 4 3 1 及び N M _ 0 0 1 0 1 4 4 3 2 からなる群から選択される塩基配列からなる m R N A であり、前記 A k t 1 タンパク質が、配列表の配列番号9のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、被検者の口腔由来試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者における口腔癌の存在を示す口腔癌の腫瘍マーカーである。

【0021】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーは、一態様として、A k t 2 遺伝子の A k t 2 m R N A、A k t 2 タンパク質、リン酸化 A k t 2 タンパク質、及び、A k t 2 タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される口腔癌の腫瘍マーカーであって、前記 A k t 2 m R N A が、G e n B a n k アクセション番号(2006年8月20日付)が N M _ 0 0 1 6 2 6 で表される塩基配列からなる m R N A であり、前記 A k t 2 タンパク質が、配列表の配列番号18のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、被検者の口腔由来試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者における口腔癌の存在を示す口腔癌の腫瘍マーカーである。

【0022】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーは、一態様として、A k t 3 遺伝子の A k t 3 m R N A、A k t 3 タンパク質、リン酸化 A k t 3 タンパク質、及び、A k t 3 タンパク質に対する自己抗体からなる群から選択される口腔癌の腫瘍マーカーであって、前記 A k t 3 m R N A が、G e n B a n k アクセション番号(2006年8月20日付)が N M _ 0 0 5 4 6 5 で表される塩基配列からなる m R N A であり、前記 A k t 3 タンパク質が、配列表の配列番号27のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、被検者の口腔由来試料における前記腫瘍マーカーの陽性が、被検者における口腔癌の存在を示す口腔癌の腫瘍マーカーである。

【0023】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーの使用方法は、被検試料を準備する準備工程と、前記被検試料中に本発明の口腔癌の腫瘍マーカーを検出する検出工程と、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する判定工程とを含む口腔癌の腫瘍マーカーの使用方法である。

10

20

30

40

50

【0024】

本発明の検出キットは、口腔癌の腫瘍マーカーを検出するための検出キットであって、前記Akt1、Akt2及びAkt3 mRNAのいずれかを検出するためのプローブ及びプライマーの少なくとも一方であるポリヌクレオチド、前記Akt1、Akt2及びAkt3タンパク質のいずれかを検出するための抗体、並びに、抗Akt1、Akt2及びAkt3タンパク質抗体のいずれかを検出するための抗原及び抗体からなる群から選択される少なくとも一つを含む検出キットである。

【0025】

次に、本発明の二本鎖siRNAについて詳しく説明する。

【0026】

まず、本発明において、「Akt遺伝子」又は「Akt遺伝子ファミリー」とは、前述のとおり癌遺伝子としての機能が知られており、種々の癌種においてその発癌、増殖、浸潤、及び転移への関与が示唆されている遺伝子又は遺伝子ファミリーである（非特許文献4）。本発明において、「遺伝子ファミリー」とは、ゲノム中に存在する共通の祖先を持つ複数の遺伝子群の総称をいい、「Akt遺伝子ファミリー」は、Akt1遺伝子、Akt2遺伝子及びAkt3遺伝子を含む。本発明の二本鎖siRNAの標的となるAkt1遺伝子としては、好ましくは、ヒトAkt1遺伝子であって、その配列は、例えば、GenBankアクセッション番号NM_005163、NM_001014431、及び、NM_001014432等から入手可能である。また、本発明の二本鎖siRNAの標的となるAkt2遺伝子としては、好ましくは、ヒトAkt2遺伝子であって、その配列は、例えば、GenBankアクセッション番号NM_001626等から入手可能である。さらにまた、本発明の二本鎖siRNAの標的となるAkt2遺伝子としては、好ましくは、ヒトAkt2遺伝子であって、その配列は、例えば、GenBankアクセッション番号NM_005465等から入手可能である。

10

20

【0027】

本発明者らは、ヒト全遺伝子に対するマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、培養ヒト不死化角化上皮細胞及び正常口腔粘膜組織には発現が認められず、培養ヒト口腔癌細胞及び口腔癌組織においてのみ共通して発現が認められる遺伝子を探索した。その工程のフロー図を図5に示す。これにより、口腔癌の治療標的分子として、Akt1遺伝子を見出した。さらに、本発明者らは、本発明の二本鎖siRNAによりAkt1遺伝子の発現を阻害すると、培養ヒト口腔癌細胞の増殖は阻害されるが培養ヒト不死化角化上皮細胞の増殖には全く影響を及ぼさないことも見出した。さらにまた、Akt1遺伝子と同じ遺伝子ファミリーであるAkt2遺伝子及びAkt3遺伝子についても、正常口腔粘膜組織に比較して、口腔癌組織において過剰発現する遺伝子であることを見出した。

30

【0028】

本発明において、「siRNA」とは、RNAiを媒介可能な短鎖のRNA分子であって、一般には、21塩基～27塩基の二本鎖低分子RNAをいう。

【0029】

本発明の二本鎖siRNAは、2つの態様があり、第1の態様が、19塩基対と2塩基の3'末端オーバーハングとからなる21塩基の二本鎖siRNAであり、第2の態様が、27塩基対からなる blunt end の二本鎖siRNAである。前記19塩基対及び前記27塩基対の配列を、下記表1A～1Cに示す。これらの表において、左欄が、それぞれのsiRNAのコードネームであり、右欄が、Seq ID、すなわち、配列表の配列番号である。下記表1AがAkt1遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAの表であり、下記表1BがAkt2遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAの表であり、下記表1CがAkt3遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAの表である。

40

【0030】

ここで、「特異的に標的とする」とは、オフターゲット効果がないことをいう。すなわち、Akt1、Akt2及びAkt3遺伝子は上述したとおり同じAkt遺伝子ファミリーに含まれる互いに相同性の高い遺伝子群であるが、標的とするAkt遺伝子以外のAkt

50

tファミリー遺伝子にRNAi効果を及ぼすこと無い非常に高い特異性を示すことをいう。例えば、下記表1AのsiRNAは、Akt1遺伝子の発現に対してのみRNAi効果を発揮し、Akt2及びAkt3遺伝子の発現には影響を及ぼさない。下記表1B及びCに記載のsiRNAも同様に、それぞれ、Akt2及びAkt3遺伝子の発現に対してのみRNAi効果を発揮する。

【0031】

【表1A】

(表1A) Akt1

21塩基 (オーバーハング)	配列	SeqID
A6	GAGCGGGAGGAGUGGACAA	1
A22	CCAUGAAGAUCCUCAAGAA	2
A33	CCAAGGAGAUCAUGCAGCA	3
A56	GGUUUACCCAGUGGGACA	4
A58	GGACAGAGGAGCAAGGUUU	5
27塩基 (プラントエンド)		
A1392	CGCCAAGGAGAUCAUGCAGCAUCGCUU	6
A2224	CCAGGGUUUACCCAGUGGGACAGAGGA	7
A2239	UGGGACAGAGGAGCAAGGUUUAAAUUU	8

10

【0032】

【表1B】

(表1B) Akt2

21塩基 (オーバーハング)	配列	SeqID
B36	CCACAAGCGUGGUGAAUAC	10
B172	GCAGAAUGCCAGCUGAUGA	11
B395	CGACUGAGGAGAUGGAAGU	12
B431	GGGCUAAAGUGACCAUGAA	13
B477	CAAGGGAACCUUUGGCAA	14
27塩基 (プラントエンド)		
B33	GCUCCACAAGCGUGGUGAAUACAUCAA	15
B390	CUCCACGACUGAGGAGAUGGAAGUGGC	16
B475	GGCAAGGGAACCUUUGGCAAAGUCAUC	17

20

30

【0033】

【表1C】

(表1C) Akt3

21塩基 (オーバーハング)	配列	SeqID
C169	GCAAAAUGCCAGUUAUUGA	19
C498	AGAGAAGGCAAGUGGAAAA	20
C941	CACCAGAGGUGUUAGAAGA	21
C1229	GGCAAGAUGUAUAUGAUAA	22
C1321	GCUCAGACUAUUACAUAUA	23
27塩基 (プラントエンド)		
C166	GUGGC AAA AUGCCAGUUA AUGAAAACA	24
C496	CGAGAGAAGGCAAGUGGAAAUAUCUAU	25
C1224	AACUGGCAAGAUGUAUAUGAUAAAAG	26

40

【0034】

本発明の21塩基オーバーハング二本鎖siRNAにおいて、前記3'末端のオーバーハングとは、5'末端から19merが相補的な配列である2本の21merのRNA鎖が対合して二本鎖を形成したとき19塩基対の両端から突出する3'末端の2merの部分をいう。前記3'末端オーバーハングの2塩基の配列は、例えば、両端とも、TT(チ

50

ミン・チミン)が好ましい。なお、前記3'オーバーハングの2塩基の配列は、これに制限されず、RNAi効果や細胞増殖抑制効果に実質的に影響を及ぼさない範囲であれば、任意の天然核酸塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル)、並びに、天然及び人工の公知の修飾塩基であってもよい。また、前記3'末端オーバーハング部分のヌクレオチドは、通常、リボヌクレオチドを使用できるがこれに制限されず、RNAi効果や細胞増殖抑制効果に実質的に影響を及ぼさない範囲であれば、デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、その他の公知のヌクレオチド類似体を使用してもよい。さらに、本発明の21塩基オーバーハング二本鎖siRNAは、必要に応じて、前記3'末端オーバーハングに代えて、5'末端オーバーハングとしてもよい。

【0035】

本発明の21塩基オーバーハング二本鎖siRNAの19塩基対の配列は、Akt1遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAとしては、上記表1Aに記載のとおり、A6、A22、A33、A56及びA58(それぞれ、配列表の配列番号1~5)の5種類が使用できるが、好ましくは、A22及びA58であって、より好ましくは、A58である。また、Akt2遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAとしては、上記表1Bに記載のとおり、B36、B172、B395、B431及びB477(それぞれ、配列表の配列番号10~14)の5種類が使用できるが、好ましくは、B395及びB431であって、より好ましくは、B431である。さらにまた、Akt3遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAとしては、上記表1Cに記載のとおり、C169、C498、C941、C1229及びC1321(それぞれ、配列表の配列番号19~23)の5種類が使用できるが、好ましくは、C169及びC941であって、より好ましくは、C169である。

10

20

【0036】

本発明の27塩基プラントエンド二本鎖siRNAは、27merの相補的な2本のRNA鎖が対合して形成した二本鎖であるから、その末端は平滑である。本発明の27塩基プラントエンド二本鎖siRNAの27塩基対の配列は、Akt1遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAとしては、上記表1Aに記載のとおり、A1392、A2224及びA2239(それぞれ、配列表の配列番号6~8)の3種類が使用できるが、好ましくは、A1392及びA2239であって、より好ましくは、A1392である。また、Akt2遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAとしては、上記表1Bに記載のとおり、B33、B390及びB475(それぞれ、配列表の配列番号15~17)の3種類が使用できるが、好ましくは、B33及びB390であって、より好ましくは、B33である。Akt3遺伝子の特異的に標的とする二本鎖siRNAとしては、上記表1Cに記載のとおり、C166、C496及びC1224(それぞれ、配列表の配列番号24~26)の3種類が使用できるが、好ましくは、C166及びC496であって、より好ましくは、C496である。

30

【0037】

本発明の二本鎖siRNAの塩基対部分の配列(配列表の配列番号1~8、10~17、19~26)は、Akt1遺伝子特異的なRNAiを誘導できる範囲において、1又は数個の塩基が修飾され、又は置換、付加若しくは欠失したものであってもよい。前記数個とは、例えば、2、3、4個である。

40

【0038】

本発明の二本鎖siRNAの製造方法は、インビトロで化学的又は酵素的に合成しても、又は、インビボで合成してもよく、その製法は特に制限されないが、なかでも、従来公知の方法により化学合成して製造することが好ましい。合成二本鎖siRNAであれば、濃度調節が容易となり臨床応用に際してインターフェロン応答の回避が容易となる。また、コンタミネーションの防止が容易であり安全性においても利点がある。例えば、本発明の21塩基オーバーハング二本鎖siRNAのA58を製造する場合、まず、配列表の配列番号5の配列の3'末端に2塩基のオーバーハングを加えた21merのRNA鎖、及び、前記配列番号5の配列の相補配列の3'末端に2塩基のオーバーハングを加えた21

50

merのRNA鎖をそれぞれ化学合成する。次に、前記2本のRNA鎖が対合する条件で対合させ、本発明の2塩基のオーバーハング二本鎖siRNAを得る。使用に際しては、必要に応じて、従来公知の方法により適宜精製することが好ましい。

【0039】

したがって、本発明は、その他の態様として、二本鎖siRNAの製造方法であって、前記二本鎖siRNAが、本発明の二本鎖siRNAであり、配列表の配列番号1~5、10~14、19~23のいずれかの配列及びその相補配列にそれぞれ2塩基のオーバーハングを加えた2本のRNA鎖、又は、配列表の配列番号6~8、15から17、24から26のいずれかの配列及びその相補配列の2本のRNA鎖を合成する合成工程と、合成した前記2本のRNA鎖を対合して二本鎖RNAとする対合工程とを含む製造方法を含む。

10

【0040】

次に、本発明の二本鎖siRNAの使用方法について説明する。本発明の二本鎖siRNAは、インビトロにおいて細胞や組織に対して使用できることに加えて、ヒトに対して臨床応用可能である。ヒトへの投与方法は、特に制限されず、適宜、従来公知のデリバリーシステムを利用できる。なかでも、例えば、口腔癌等のように、直視直達の可能な部位に対しては、例えば、アテロコラーゲンを用いた局所投与方法が好ましい。前記アテロコラーゲンは、例えば、局所止血剤として既に臨床応用されており、また、前記アテロコラーゲンを用いたsiRNAの局所投与方法は、血管内皮増殖因子(VEGF)を分子標的とした動物実験でその有意性が示されている(Takei Yら、Cancer Res 64(10):3365-3370、2004)。

20

【0041】

また、その他のデリバリーシステムとして、生体内での分解を防ぎ、細胞内透過性を高めるための化学修飾(Rossi J J.、Nature 432(7014):155-156、2004; Soutschek Jら、Nature 432(7014):173-178、2004)やカチオニックリポソーム(Yano Jら、Clin Cancer Res 10(22):7721-7726、2004)を用いたデリバリーシステムを利用しても良い。さらに、必要に応じて、本発明の二本鎖siRNAを発現するsiRNA発現ベクターを構築し、遺伝子治療技術を利用したデリバリーシステムを利用することもできる。

30

【0042】

本発明の二本鎖siRNAは、とりわけ、口腔癌の治療や、口腔癌の治療の用途に使用する医薬組成物若しくはそれらの製造に使用することが好ましい。口腔癌とは、一般に、歯肉、舌、頬部、口蓋、口底、唾液腺等の口腔を構成する部位の粘膜により発生する癌をいう。口腔は、摂食、構音等、日常生活を営む上で極めて重要な機能を担っている。手術手技の進歩により進行口腔癌の治療成績は向上しているものの、治療後のQOL(生活の質)の低下は避けられない。したがって、進行口腔癌に対しては特に手術を用いない根治性の高い新規治療法の開発が急務となっている。マウスの骨肉腫及び肝細胞癌のモデルで単一の癌遺伝子の発現を一時的に抑制するのみで、腫瘍細胞の分化誘導による治癒が観察され、癌遺伝子への依存が癌のアキレス腱であることが示された。また、ヒト癌においても、EGFR, Her-2, Bcr-Abl等の単一の癌遺伝子を分子標的とする薬剤が開発され、癌臨床においてその有用性が示されている。本発明においては、Akt1遺伝子を分子標的とする。前述したとおり、Akt1が、少なくとも口腔癌において分子標的となることは、本発明者らが初めて見出した事実である。

40

【0043】

すなわち、本発明の二本鎖siRNAを使用してRNAi効果によりAkt1遺伝子の発現を阻害することで、好ましくは、口腔癌細胞の細胞増殖を抑制できる。これに対し、口腔癌細胞以外の口腔細胞は、本発明の二本鎖siRNAの影響を受けない。なお、Akt1は、口腔癌のみならず、様々な癌種の癌遺伝子として知られているから、本発明の二本鎖siRNAは、口腔癌に限られず、例えば、前立腺癌等の癌治療一般や、癌治療に使

50

用する医薬組成物一般若しくはそれらの製造に使用できる。また、同じ遺伝子ファミリーに属するAkt2遺伝子及びAkt3遺伝子も同様に、口腔癌、前立腺癌等の癌治療一般や、癌治療に使用する医薬組成物一般に使用できる。

【0044】

前述したとおり、従来、siRNAを臨床応用する上で大きな問題が2つあった。すなわち、インターフェロン応答が誘導される問題と、オフターゲット効果の問題である。前記インターフェロン応答を回避するには、細胞内導入濃度を少なくとも10nM未満とする必要があるが、本発明の二本鎖siRNAは、好ましくは、1nMという超低濃度でAkt1、Akt2及びAkt3遺伝子のいずれかに対して十分なRNAi効果を発揮することができる。

10

【0045】

また、前記オフターゲット効果についても、本発明の二本鎖siRNAの標的配列は、BLASTサーチを駆使してAkt1、Akt2及びAkt3 mRNAのそれぞれの非翻訳領域も含めた全配列により他の遺伝子にホモロジーを示さない配列であるため、オフターゲット効果を回避できる。例えば、Akt遺伝子は、Akt1からAkt3まで3種類が知られており、それぞれ、約75%の相同性がある。そして、Akt1からAkt3のすべてを阻害すると、細胞にとって致死的であることが知られている。しかし、本発明の二本鎖siRNAを正常細胞に使用しても影響がなく、オフターゲット効果は回避される。このように、本発明の二本鎖siRNAは、臨床応用における大きな2つの障壁をクリアしており、臨床応用可能である。なお、臨床応用においては、本発明の二本鎖siRNAは、合成二本鎖siRNAであることが好ましい。

20

【0046】

したがって、本発明は、その他の態様として、RNA干渉によりAkt1、Akt2及びAkt3遺伝子のいずれかの発現を特異的に阻害するAkt遺伝子ファミリー特異的阻害剤であって、本発明の二本鎖siRNAを含むAkt遺伝子ファミリー特異的阻害剤を含む。本発明のAkt遺伝子ファミリー特異的阻害剤は、細胞内のAkt1、Akt2及びAkt3遺伝子のいずれか一種類、二種類、又は、全部の発現を特異的にノックダウンするために、インピトク及びインピボで使用できる。その剤形は、特に制限されない。本発明のAkt遺伝子ファミリー特異的阻害剤は、阻害するAkt遺伝子ファミリーの種類に応じて本発明の二本鎖siRNAを一種類、二種類、又は、全種類含むことができる。

30

【0047】

さらに、本発明は、その他の態様として、癌、好ましくは口腔癌又は前立腺癌、より好ましくは口腔癌の治療方法であって、本発明の二本鎖siRNAを使用することを含む癌の治療方法を含む。本発明の治療方法は、既存の放射線及び/又は抗癌剤の使用と本発明の二本鎖siRNAの使用とを併用することを好ましく含む。また、さらにその他の態様として、本発明は、癌、好ましくは口腔癌又は前立腺癌、より好ましくは口腔癌の治療における二本鎖siRNAの使用であって、前記二本鎖siRNAが、本発明の二本鎖siRNAである使用を含む。同様に、本発明の二本鎖siRNAの使用は、既存の放射線及び/又は抗癌剤の使用との併用を好ましく含む。いずれの態様においても、使用する本発明の二本鎖siRNAは、Akt1、Akt2及びAkt3遺伝子を標的とする本発明の二本鎖siRNAのいずれか一種類でもよく、これらを二種類又は三種類を組み合わせ使用してもよい。

40

【0048】

次に、本発明の医薬組成物について説明する。本発明の医薬組成物は、癌治療用の医薬組成物であって、本発明の二本鎖siRNAを含むものである。本発明の組成物に含まれる本発明の二本鎖siRNAは、Akt1、Akt2及びAkt3遺伝子を標的とする本発明の二本鎖siRNAのいずれか一種類でもよく、これらの二種類又は三種類を組み合わせ含んでもよい。本発明の医薬組成物は、さらに、アテロコラーゲンを含むことが好ましい。上述のとおり、本発明の医薬組成物の治療用途の対象となる癌は、特に制限されないが、好ましくは口腔癌又は前立腺癌であって、口腔癌であることがより好ましい。

50

【0049】

本発明の医薬組成物は、さらに、薬学的に許容されるキャリアを含んでもよい。前記薬学的キャリアとしては、特に制限されないが、例えば、本発明の二本鎖 *siRNA* が、標的の部位、組織、細胞等に侵入する効率を高めることができるキャリア、例えば、リポソーム、カチオンリポソーム等があげられる。本発明の医薬組成物の剤形は、特に制限されず、例えば、注射剤、クリーム剤、軟膏、錠剤、懸濁剤等があげられる。また、投与方法も特に制限されず、例えば、注射、経口、局所、鼻内、直腸、静脈内、動脈内投与等があげられる。

【0050】

次に、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーについて説明する。本発明の口腔癌の腫瘍マーカーは、*Akt1* 遺伝子の発現をマーカーとして利用するものである。本発明において、「口腔癌の腫瘍マーカー」とは、口腔癌細胞の目印（マーカー）になる物質であって、口腔癌の診断や治療の判断基準として役立つ物質の総称をいう。本発明の口腔癌の腫瘍マーカーにおいて、マーカーとなる物質は、*Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3* 遺伝子の転写産物である *Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3 mRNA*、前記転写産物の翻訳産物である *Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3* タンパク質、リン酸化 *Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3* タンパク質、*Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3* タンパク質及び/又はリン酸化 *Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3* タンパク質に対する自己抗体の少なくとも一つである。本発明の口腔癌の腫瘍マーカーにおいて、前記「被検試料」とは、特に制限されないが、例えば、リンパ節、唾液、血液等である。本発明の口腔癌の腫瘍マーカーにおいて、腫瘍マーカーが「陽性」であるとは、腫瘍マーカーの測定値が、所定のしきい値より大きい場合のことをいう。前記しきい値は、当該技術分野の当業者であれば、例えば、健常者や良性の腫瘍患者における前記腫瘍マーカーの数値を統計学的に処理した値に基づいて定めることができる。前記しきい値としては、例えば、健常者や良性の腫瘍患者等の平均の値の3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、及びそれ以上の値があげられる。

【0051】

前記 *Akt1 mRNA* の塩基配列は、前述のとおり、GenBankアクセッション番号(2005年10月31日付) NM_005163、NM_001014431及びNM_001014432に登録されている。前記 *Akt1* タンパク質は、配列表の配列番号9のアミノ酸配列からなる *Akt1* タンパク質である。また、前記リン酸化 *Akt1* タンパク質のリン酸化部位は、配列表の配列番号9の第473番目のセリン(Ser473)である。前記 *Akt2 mRNA* の塩基配列は、前述のとおり、GenBankアクセッション番号(2006年8月20日付)がNM_001626に登録されている。前記 *Akt2* タンパク質は、配列表の配列番号18のアミノ酸配列からなる *Akt2* タンパク質である。また、前記リン酸化 *Akt2* タンパク質のリン酸化部位は、配列表の配列番号18の第474番目のセリン(Ser474)である。前記 *Akt3 mRNA* の塩基配列は、前述のとおり、GenBankアクセッション番号(2006年8月20日付)がNM_005465に登録されている。前記 *Akt3* タンパク質は、配列表の配列番号27のアミノ酸配列からなる *Akt3* タンパク質である。また、前記リン酸化 *Akt3* タンパク質のリン酸化部位は、配列表の配列番号27の第472番目のセリン(Ser472)である。前記塩基配列及びアミノ酸配列において、突然変異や遺伝子多型等に起因した1~数個の置換・欠失・付加等の相違があるものであっても、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーに含まれる。前記数個とは、例えば、2、3、4個である。また、前記 *Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3 mRNA* 及び前記 *Akt1*、*Akt2* 又は *Akt3* タンパク質の一部も本発明の口腔癌の腫瘍マーカーに含まれる。

【0052】

次に、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーの使用方法について説明する。本発明の口腔癌の腫瘍マーカーの使用方法としては、特に制限されず、従来公知の腫瘍マーカーと同様の使用方法にて使用できるが、例えば、被検者から被検試料を準備する準備工程と、前記被検試料中に本発明の口腔癌の腫瘍マーカーを検出する検出工程と、前記腫瘍マーカーが陽性

か否かを判定する判定工程とを含む使用方法があげられる。まず、前記準備工程において、被検者から被検試料を準備する。次に、前記検出工程において、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーのマーカー物質であるAkt1、Akt2又はAkt3 mRNA、Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質、リン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質、抗Akt1、Akt2又はAkt3若しくは抗リン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質自己抗体等を、後述するように、それぞれ、例えば、従来公知の方法等を用いて検出し、最後に、前記判定工程において、前記腫瘍マーカーが陽性か否かを判定する。検出対象は1種類に限られず、例えば、Akt1、Akt2及びAkt3のマーカー物質のいずれか2種類又は3種類を組み合わせて使用することも好ましい。

【0053】

10

前記判定工程における本発明の口腔癌の腫瘍マーカーが陽性か陰性かの判定は、前述のとおり、例えば、健常者等の値を基準として設定するしきい値と比較して判定することができる。

【0054】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーにおける前記Akt1、Akt2又はAkt3 mRNAを検出する方法としては、特に制限されないが、前記RNAを定量できる従来公知の方法があげられ、その方法にも特に制限はないが、例えば、*in situ*ハイブリダイゼーション、ノーザンブロッティング、ドットプロット、RNaseプロテクションアッセイ等のほか、マイクロアレイを用いる方法、リアルタイムPCR法等のPCRを利用する方法、前記RNAを直接測定する方法等の迅速な測定が可能な方法があげられる。前記定量は、前記判定工程において前記しきい値との比較ができる相対的な定量であってもよく、例えば、適当な内部標準や外部標準を利用することができる。

20

【0055】

前記マイクロアレイを用いる方法としては、前記Akt1、Akt2又はAkt3 mRNAに対応するプローブが配置されたマイクロアレイを準備し、このマイクロアレイに、前記被検試料中の前記Akt1、Akt2又はAkt3 mRNAを鋳型として調製した標識化ターゲットをハイブリダイズさせ、前記プローブに結合した前記ターゲットの標識シグナルを測定して前記RNA鎖を定量する方法があげられる。前記リアルタイムPCR法としては、例えば、被検試料のトータルRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、このcDNAを鋳型に前記マーカー転写産物領域をPCRで増幅し、リアルタイムモニタリング用試薬を用いて増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングして解析する方法があげられる。また、前記mRNAを直接測定する方法としては、例えば、Invader（登録商標：Third Wave Technologies社）RNAアッセイ等があげられる。ただし、前記Akt1 mRNAを検出する方法としては、これらの方法に限られず、種々の定量方法を適用できる。

30

【0056】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーにおける前記Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質及び/又はリン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質を検出する方法としては、特に制限されないが、例えば、前記Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質及び/又はリン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的測定方法があげられる。前記免疫学的測定方法としては、ウェスタンブロット、ELISA、サンドウィッチELISA、免疫組織化学染色等があげられる。前記抗体は、前記Akt1タンパク質等を用いた従来公知の方法で作製してもよく、市販のものを購入してもよい。前記抗体は、ポリクローナルであっても、モノクローナルであってもよい。

40

【0057】

本発明の口腔癌の腫瘍マーカーにおける前記Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質及び/又はリン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質に対する自己抗体を検出する方法としては、特に制限されないが、例えば、前記自己抗体の抗原であるAkt1、Akt2又はAkt3タンパク質及び/又はリン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質を固相に固定化し、前記自己抗体と抗原抗体反応により複合体を形成させ、さ

50

らに、前記自己抗体に対する標識抗体により前記複合体を検出する方法等が挙げられる。

【0058】

次に、本発明の検出キットについて説明する。本発明の検出キットは、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーの検出するためのキットである。本発明のキットは、第1の態様として、前記マイクロアレイを含む検出キットが挙げられる。検出前記キットには、さらに、被検試料からトータルRNAを調製するプライマーや試薬、ターゲットを調製するための標識化された本発明のプライマーや試薬等を含んでもよい。前記試薬としては、従来公知の試薬が利用でき、例えば、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、標識化合物、バッファー等があげられる。また、本発明の検出キットは、第2の態様として、前述のPCR等の遺伝子増幅技術を用いたAkt1、Akt2又はAkt3 mRNA検出/測定方法に使用するプローブやプライマーを含むキットが挙げられる。これらのプローブやプライマーの配列は、特に制限されず、当業者であれば容易に設定可能である。前記検出キットは、例えば、マイクロアレイを製造する場合や、リアルタイムPCR法により検出する場合に使用できる。さらに、本発明の検出キットは、第3の態様として、Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質に対する抗体を含む検出キットが挙げられ、例えば、ウェスタンブロット、ELISA等の前記ポリペプチドの免疫学的測定に使用できる。第4の態様として、自己抗体の抗原であるAkt1、Akt2又はAkt3タンパク質及び/又はリン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質、並びに、前記自己抗体に対する標識化抗体を含む検出キットが挙げられ、例えば、上述したとおり、自己抗体の免疫学的測定に使用できる。前記自己抗体を検出することで、間接的にAkt1、Akt2又はAkt3遺伝子の発現を検出できる。前記Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質及び/又はリン酸化Akt1、Akt2又はAkt3タンパク質は、固相に固定化されていることが好ましい。本発明の検出キットは、上述のいずれの態様においても取扱説明書を含んでもよい。

【0059】

さらに、本発明は、口腔癌の診断方法であって、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーを使用することを含む口腔癌の診断方法を含む。また、本発明は、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーの使用であって、口腔癌の診断における本発明の口腔癌の腫瘍マーカーの使用を含む。

【0060】

以下に、本発明を実施例を用いて説明する。

【実施例1】

【0061】

前記表1Aの5種類の21塩基オーバーハング二本鎖siRNA(A6、A22、A33、A56及びA58；それぞれ、配列表の配列番号1~5)と、3種類の27塩基プラントエンド二本鎖siRNA(A1392、A2224及びA2239；それぞれ、配列表の配列番号6~8)の8種類の二本鎖siRNAを合成して調製し、それぞれの合成二本鎖siRNAについて、1nMの濃度で使用した場合のAkt1遺伝子に対するRNAi効果及び細胞増殖抑制効果を確認した。具体的には、以下のように行った。

【0062】

合成二本鎖siRNAの調製

前記5種類の21塩基オーバーハング二本鎖siRNA(A6、A22、A33、A56及びA58)は、配列表の配列番号1~5の19塩基の配列及びその相補配列それぞれの3'末端にTT配列からなる2塩基オーバーハング部分を加えたRNA鎖を、定法により化学合成し、それらに対合させて調製した。また、前記3種類の27塩基プラントエンド二本鎖siRNAは、配列表の配列番号6~8の配列及びその相補配列のRNA鎖を定法により化学合成し、それらに対合させて調製した。以下のRNAi効果及び細胞増殖抑制効果の確認に際しては、適宜、HPLC等で精製したものを使用した。

【0063】

細胞及び培養法

RNAi効果の確認には、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株SASに、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入して分離したGFP安定発現株GFP-SAS細胞を用いた。

10

20

30

40

50

前記細胞の培養には、10%ウシ胎児血清(FBS; Biosource International社製)、100 μ g/mlストレプトマイシン、100U/mlペニシリン、0.25mg/mlアンホテリシンB(Invitrogen社製)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; Sigma-Aldrich社製)を増殖培養液として用い、空气中に5%の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、37 $^{\circ}$ Cで行った。

【0064】

合成二本鎖siRNAの細胞内導入

60mm径プラスチックペトリ皿(商標:Falcon、BD Biosciences社製)に、 8×10^5 個の前記GFP-SAS細胞を植え込み、24時間培養後opti-MEM(Invitrogen社製)にて2回洗浄し、1nMの合成二本鎖siRNAを含むLipofectamine 2000(Invitrogen社製)溶液を加えた。5時間後10%FBSを含むDMEMに培地交換した。

【0065】

ウエスタンブロッティング法

上述のとおり、合成二本鎖siRNAを導入後48時間培養した後に、細胞をCellytic Cell Lysis Reagent(Sigma-Aldrich社製)を用いて可溶化した。前記可溶化試料を、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動)にて展開し、Mini-PROTEAN II(Bio-Rad社製)を用いて、2時間PDVF(polyvinylidene difluoride)膜(Millipore社製)に転写した。転写後は、5%スキムミルク(和光純薬社製)を含むT-TBS(25mM Tris-HCl、125mM NaCl、0.1% Tween 20; Sigma-Aldrich社製)にて4 $^{\circ}$ C、1晩ブロッキングした。さらに、一次抗体をブロッキング溶液にて希釈し、室温にて1時間反応させ、前記T-TBS溶液にて3回洗浄後、二次抗体を同様に1時間反応させた。ECL plus キット(Amersham Biosciences社製)にて発色させた後、LAS 3000(富士フィルム社製)を用いてデジタル画像化した。

【0066】

細胞増殖評価法

前記GFP-SAS細胞に前記合成二本鎖siRNAを導入した細胞を、6ウェルマイクロプレート(商標:Falcon、BD Biosciences社製)に 5×10^4 個植え込み、4日間培養した後、0.05%トリプシン-0.53mM EDTA(Invitrogen社製)にて細胞を回収し、Z1 Coulter Counter(Beckman Coulter社製)を用いて細胞数を計測した。

【0067】

RNAi効果についての結果

前記8種類の合成二本鎖siRNAを前記培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株GFP-SASに導入し、上述のとおり、RNAi効果をAkt1タンパク質の発現レベルで評価した。その結果、前記8種類の全ての合成二本鎖siRNAが、1nMの濃度で標的遺伝子Akt1の発現を有意に抑制することが確認された。その結果の一例を図1に示す。同図において、上段が、Akt1タンパク質に対するウエスタンブロッティングの結果を示し、下段が、内部対照マーカである α -チューブリンに対するウエスタンブロッティングの結果を示す。また、同図において、一番左のレーンは、GFP遺伝子に対する合成二本鎖siRNA(21塩基オーバーハング)を導入した場合のコントロールである。同図に示すとおり、前記8種類の中でも、A58、A1392、及びA2239の3種類の合成二本鎖siRNAは、80%以上の顕著なRNAi効果を示した。

【0068】

細胞増殖抑制効果についての結果

前記8種類の合成二本鎖siRNAを前記培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株GFP-SASに導入し、上述のとおり、細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、前記8種類の全ての合成二本鎖siRNAが、1nMの濃度で前記口腔癌細胞の増殖を有意に抑制すること

が確認された。その結果の一例を図 2 に示す。同図において、左 3 レーンは、左から、それぞれ、*siRNA* を導入しなかった場合、*GFP* を標的とした 21 塩基オーバーハング *siRNA* を導入した場合、及び、*GFP* を標的とした 27 塩基プラントエンド *siRNA* を導入した場合のコントロールである。また、同図において、縦軸は、前記 *siRNA* を導入しなかった場合の細胞数を 1 とした場合の相対的な細胞数を示す。同図に示すとおり、前記 8 種類の中でも、A56、A58、及び A1392 の 3 種類の合成二本鎖 *siRNA* は、70% 以上の顕著な口腔癌細胞の増殖抑制効果を示した。

【0069】

上述のとおり、前記 8 種類の合成二本鎖 *siRNA* は、1 nM という超低濃度でも、有意な *Akt1* 遺伝子を標的とした *RNAi* 効果及び口腔癌細胞の増殖抑制効果を示した。そのなかでも、A58 及び A1392 は、とりわけ優れた *RNAi* 効果及び細胞増殖抑制効果を示した。

10

【実施例 2】

【0070】

Akt1 遺伝子が口腔癌に共通して発現しており、*Akt1* タンパク質が口腔癌の腫瘍マーカーとなることを確認した。

【0071】

Akt1 タンパク質の検出

10 種類の口腔癌細胞株における *Akt1* タンパク質を、ウェスタンブロットにより検出した。その結果の一例を図 3 に示す。前記ウェスタンブロットは、定法により行った。同図において、第 1 レーンは、不死化ヒト角化上皮細胞を使用した非口腔癌細胞のコントロールであり、第 2 ~ 11 レーンは、培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株由来の試料である。同図に示すとおり、*Akt1* タンパク質は、口腔癌細胞にのみ共通して発現していた。

20

【0072】

口腔癌組織における *Akt1* タンパク質の免疫組織化学染色

抗 *Akt1* タンパク質抗体を用いて、63 症例の口腔扁平上皮癌組織について定法により免疫組織化学染色し、前記口腔癌組織における *Akt1* の陽性率を確認した。前記免疫組織化学染色の一例を図 4 に示す。同図において左図は、正常口腔粘膜を使用したコントロールである。前記口腔癌組織における *Akt1* 陽性率の結果を下記表 2 に示す。同表のとおり、免疫組織化学染色による *Akt1* の陽性率は 90% を超えており、本発明の口腔癌の腫瘍マーカーは、極めて有用であることが確認された。

30

【0073】

【表 2】

(表2)			
	Akt1陽性	Akt1陰性	計
症例数	59 (94%)	4 (6%)	63 (100%)

【実施例 3】

【0074】

上記表 1 A に示す *Akt1* 遺伝子を標的とした 8 種類の合成二本鎖 *siRNA* の口腔癌細胞浸潤増殖抑制効果を確認した。すなわち、 5×10^4 個の *GFP-SAS* 細胞を 0.5 ml のコラーゲンゲルに封入したのち、1 nM の濃度で合成 *siRNA* を細胞内に導入した。4 日間培養したのち、コラゲナーゼでコラーゲンゲルを分解し、細胞を回収し、細胞数を計測した。その結果を図 6 に示す。同図に示すとおり、前記 8 種類の合成二本鎖 *siRNA* はすべて有意に口腔癌細胞の浸潤増殖を抑制できることが示された。

40

【実施例 4】

【0075】

上記表 1 A に示す *Akt1* 遺伝子を標的とした 8 種類の合成二本鎖 *siRNA* のインビボにおける抗腫瘍活性の効果をヌードマウス背部皮下腫瘍モデルを用いて確認した。すなわち、*GFP-SAS* 細胞 1×10^6 個を 6 週齢雄の *Balb/C* ヌードマウス背部皮下に移植して腫瘍形成を確認した後、合成二本鎖 *siRNA* をアテロコラーゲン (商品名:

50

A t e l o G e n e、高研社製)と混合して投与した。前記投与は、腫瘍周囲に注入する局所投与(6日間隔、3回)と静脈内投与(4日間隔、3回)の2つの方法で行った。腫瘍体積を長径×短径×高さ×0.5236の計算式を用いて算出し、合成二本鎖 s i R N A の抗腫瘍活性を評価した。

【0076】

A k t 1 遺伝子を標的とした合成二本鎖 s i R N A として A 2 2 及び A 5 8 を用い、対照として s i R N A を導入しない偽処理(-)及び G F P を標的とした 2 1 塩基オーバーハング s i R N A をコントロールとして用いた場合の結果を図7及び図8に示す。図7は局所投与の結果であり、図8は全身投与(静脈投与)の結果である。図7(A)に示すとおり、A 2 2 及び A 5 8 を局所投与した場合、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞の腫瘍形成を著しく抑制できることが確認された。図7(B)は、ヌードマウスの背部の脊椎を挟んで左右に腫瘍を形成させ、左側に A 5 8、右側にコントロールを局所投与した結果の一例を示す写真である。図7(B)に示すとおり、A k t 1 遺伝子を標的とした本発明の合成二本鎖 s i R N A の抗腫瘍活性は視覚的にも明らかであった。図8(A)に示す全身投与の結果も同様に A 2 2 及び A 5 8 が腫瘍形成を著しく抑制できたことを示す。図8(B)は形成された腫瘍を取り出して大きさを計測した写真であって、上段は光学写真、下段は G F P の蛍光を撮影した写真である。このように局所投与及び全身投与のいずれの場合も A k t 1 遺伝子を標的とした本発明の合成二本鎖 s i R N A は、優れた抗腫瘍活性を示した。これらの結果は、本発明の合成二本鎖 s i R N A の癌治療への臨床応用が可能であることを示す。

10

20

【実施例5】

【0077】

前記表1Bの5種類の21塩基オーバーハング二本鎖 s i R N A (B 3 6、B 1 7 2、B 4 3 1、B 4 7 7;それぞれ、配列表の配列番号10~14)と、3種類の27塩基プラントエンド二本鎖 s i R N A (B 3 3、B 3 9 0、B 4 7 5;それぞれ、配列表の配列番号15~17)の8種類の二本鎖 s i R N A を合成して調製し、それぞれの合成二本鎖 s i R N A について、1 n M の濃度で使用した場合の A k t 2 遺伝子に対する R N A i 効果及び細胞増殖抑制効果を2種類のヒト口腔癌細胞株(G F P - A C C 2 及び G F P - A C C M)において確認した。

【0078】

使用したいずれの口腔癌細胞株も実施例1の G F P - S A S 株と同様に緑色蛍光タンパク質(G F P)遺伝子を導入して分離した G F P 安定発現株である。これらの細胞における1 n M の濃度で使用した場合の A k t 2 遺伝子に対する R N A i 効果及び細胞増殖抑制効果の結果の一例を図9(G F P - A C C 2 細胞株)及び図10(G F P - A C C M 細胞株)に示す。なお、これらの図には、B 3 6、B 1 7 2、B 3 9 5、B 4 3 1 及び B 4 7 7 についての結果のみを示す。両図において上段の棒グラフは前記口腔癌細胞株の肝細胞増殖因子依存性浸潤増殖に対する本発明の A k t 2 標的 s i R N A による細胞増殖抑制効果を示し、下段の写真は A k t 2 タンパク質のウェスタンブロットの結果であって R N A i 効果を示す。これらの結果が示すとおり、本発明の A k t 2 遺伝子を標的とした s i R N A は、口腔癌細胞において R N A i 効果及び細胞増殖抑制効果を発揮しうることが示された。

30

40

【実施例6】

【0079】

前記表1Cの5種類の21塩基オーバーハング二本鎖 s i R N A (C 1 6 9、C 4 9 8、C 9 4 1、C 1 2 2 9、C 1 3 2 1;それぞれ、配列表の配列番号19~23)と、3種類の27塩基プラントエンド二本鎖 s i R N A (C 1 6 6、C 4 9 6、C 1 2 2 4;それぞれ、配列表の配列番号24~26)の8種類の二本鎖 s i R N A を合成して調製し、実施例5と同様にして、1 n M の濃度で使用した場合の A k t 3 遺伝子に対する R N A i 効果及び細胞増殖抑制効果を確認した。

【0080】

50

1 n Mの濃度で使用した場合のA k t 3 遺伝子に対するR N A i 効果及び細胞増殖抑制効果の結果の一例を図1 1 (G F P - A C C 2 細胞株) 及び図1 2 (G F P - A C C M 細胞株) に示す。なお、これらの図には、C 1 6 9、C 4 9 8、C 9 4 1、C 1 2 9 9 及びC 1 3 2 1 についての結果のみを示す。両図において上段の棒グラフは前記口腔癌細胞株の肝細胞増殖因子依存性浸潤増殖に対する本発明のA k t 3 標的s i R N A による細胞増殖抑制効果を示し、下段の写真はA k t 3 タンパク質のウェスタンブロットの結果であってR N A i 効果を示す。これらの結果が示すとおり、本発明のA k t 3 遺伝子を標的としたs i R N A は、口腔癌細胞においてR N A i 効果及び細胞増殖抑制効果を発揮しうることを示された。

【実施例7】

10

【0081】

A k t 2 及びA k t 3 遺伝子が口腔癌に共通して発現又は過剰発現しており、A k t 2 及びA k t 3 タンパク質が口腔癌の腫瘍マーカーとなりうることを確認した。

【0082】

その結果を図1 3 に示す。図1 3 (A) は、A k t 2 及びA k t 3 タンパク質のウェスタンブロットの結果であって、唾液腺の正常組織及び正常上皮細胞ではA k t 2 及びA k t 3 タンパク質が検出されないのに対し、ヒト口腔癌細胞株(ヒト唾液腺癌細胞株)であるG F P - A C C 2 及びG F P - A C C M 細胞ではA k t 2 及びA k t 3 タンパク質が過剰発現されていることを示す。また、図1 3 (B) は、実際に6 症例の口腔癌患者の正常粘膜部(N) 及び患部(T) 試料を用いてそれぞれA k t 2 及びA k t 3 タンパク質の過剰発現をウェスタンブロットで検出した結果の一例を示す。この6 症例においては、A k t 2 及びA k t 3 タンパク質の(過剰) 発現は、それぞれ、1 0 0 % 及び5 0 % の陽性率を示した。

20

【実施例8】

【0083】

前記表1 B の5 種類の2 1 塩基オーバーハング二本鎖s i R N A (B 3 6、B 1 7 2、B 4 3 1、B 4 7 7 ; それぞれ、配列表の配列番号1 0 ~ 1 4) と、3 種類の2 7 塩基プラントエンド二本鎖s i R N A (B 3 3、B 3 9 0、B 4 7 5 ; それぞれ、配列表の配列番号1 5 ~ 1 7) の8 種類の二本鎖s i R N A を合成して調製し、ヒト前立腺癌細胞株(P C - 3) の細胞について、1 n M の濃度で使用した場合のA k t 2 遺伝子に対するR N A i 効果及び細胞増殖抑制効果を確認した。培地としてダルベッコ改変イーグル培地に換えてR P M I 培地(S i g m a - A l d r i c h 社製) を用いた他は実施例1 と同様にして行った。

30

【0084】

その結果の一例を図1 4 に示す。図1 4 (A) は、P C - 3 細胞内のA k t 2 タンパク質をウェスタンブロットで確認した結果の一例を示す図である。なお、実施例1 と同様に内部対照マーカーとして α -チューブリンを使用したを図示していない。図1 4 (B) は、B 3 3、B 3 6、B 1 7 2 について前立腺癌細胞増殖抑制効果を定量化したグラフである。これらの図に示すとおり、A k t 2 遺伝子を標的とした本発明の二本鎖s i R N A はすべて8 0 % 以上の顕著なR N A i 効果と十分な前立腺癌細胞増殖抑制効果を示した。

40

【実施例9】

【0085】

前記表1 C の5 種類の2 1 塩基オーバーハング二本鎖s i R N A (C 1 6 9、C 4 9 8、C 9 4 1、C 1 2 2 9、C 1 3 2 1 ; それぞれ、配列表の配列番号1 9 ~ 2 3) と、3 種類の2 7 塩基プラントエンド二本鎖s i R N A (C 1 6 6、C 4 9 6、C 1 2 2 4 ; それぞれ、配列表の配列番号2 4 ~ 2 6) の8 種類の二本鎖s i R N A を合成して調製し、ヒト前立腺癌細胞株(P C - 3) の細胞について、1 n M の濃度で使用した場合のA k t 3 遺伝子に対するR N A i 効果及び細胞増殖抑制効果を確認した。培地としてダルベッコ改変イーグル培地に換えてR P M I 培地(S i g m a - A l d r i c h 社製) を用いた他は実施例1 と同様にして行った。

50

【 0 0 8 6 】

その結果の一例を図 1 5 に示す。図 1 5 (A) は、P C - 3 細胞内の A k t 3 タンパク質をウェスタンブロットで確認した結果の一例を示す図である。なお、実施例 1 と同様に内部対照マーカーとして β -チューブリンを使用したを図示していない。図 1 5 (B) は、C 1 6 9、C 1 2 2 4、C 1 3 2 1 について前立腺癌細胞増殖抑制効果を定量化したグラフである。これらの図に示すとおり、A k t 3 遺伝子を標的とした本発明の二本鎖 s i R N A はすべて 8 0 % 以上の顕著な R N A i 効果と十分な前立腺癌細胞増殖抑制効果を示した。

【 実施例 1 0 】

【 0 0 8 7 】

A k t 1、A k t 2、及び、A k t 3 標的 s i R N A の前立腺癌に対する併用効果

本発明の A k t 1、A k t 2、及び、A k t 3 を標的とした s i R N A のうち少なくとも 2 種類を併用すると、それぞれ単独で使用する場合よりも効率的に前立腺癌の細胞増殖を抑制できることを確認した。A k t 1 を標的とした s i R N A として上記表 1 A の A 2 2 3 9 の s i R N A を使用し、A k t 2 を標的とした s i R N A として上記表 1 B の B 4 7 7 の s i R N A を使用し、A k t 3 を標的とした s i R N A として上記表 1 C の C 1 3 2 1 の s i R N A を使用した場合の結果の一例を図 1 6 に示す。同図の結果では A k t 2 を標的とした s i R N A が著しい細胞増殖抑制効果を示すが、例えば、これとともに A k t 1 及び/又は A k t 3 を標的とした s i R N A を用いれば、単独で得られる効果よりも一層優れた細胞増殖抑制効果が得られることが確認された。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 8 8 】

以上説明したとおり、本発明の二本鎖 s i R N A は、オフターゲット効果及びインターフェロン応答を回避しつつ、A k t 1、A k t 2 又は A k t 3 遺伝子特異的な R N A i を媒介できるから、例えば、臨床応用が可能であり、A k t 1、A k t 2 又は A k t 3 を標的分子とした医療や医薬組成物の分野、例えば、口腔癌を含む癌治療に関する治療や医薬組成物の分野で有用である。その他、本発明の二本鎖 s i R N A は、例えば、学術及び基礎医学的研究開発分野においても有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 8 9 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の二本鎖 s i R N A の A k t 1 遺伝子を標的とした R N A i 効果をウェスタンブロットングで確認した結果の一例である。

【 図 2 】 図 2 は、本発明の二本鎖 s i R N A の口腔癌細胞増殖抑制効果を確認した結果の一例である。

【 図 3 】 図 3 は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における A k t 1 タンパク質を検出したウェスタンブロットの結果の一例である。

【 図 4 】 図 4 は、正常口腔粘膜（左図）及び口腔扁平上皮癌（右図）について、抗 A k t 1 抗体を用いて免疫組織化学染色をした写真の一例である。

【 図 5 】 図 5 は、口腔癌における治療標的分子として A k t 1 遺伝子を同定した工程を説明するフロー図である。

【 図 6 】 図 6 は、本発明の二本鎖 s i R N A の口腔癌細胞浸潤増殖抑制効果を確認した結果の一例である。

【 図 7 】 図 7 は、本発明の二本鎖 s i R N A の局所投与による抗腫瘍活性を確認した結果の一例である。

【 図 8 】 図 8 は、本発明の二本鎖 s i R N A の全身（静脈）投与による抗腫瘍活性を確認した結果の一例である。

【 図 9 】 図 9 は、本発明の二本鎖 s i R N A の A k t 2 遺伝子を標的とした R N A i 効果及び口腔癌細胞増殖抑制効果を確認した結果の一例である。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、本発明の二本鎖 s i R N A の A k t 2 遺伝子を標的とした R N A i 効果及び口腔癌細胞増殖抑制効果を確認した結果のその他の例である。

10

20

30

40

50

【図 1 1】図 1 1 は、本発明の二本鎖 s i R N A の A k t 3 遺伝子を標的とした R N A i 効果及び口腔癌細胞増殖抑制効果を確認した結果の一例である。

【図 1 2】図 1 2 は、本発明の二本鎖 s i R N A の A k t 3 遺伝子を標的とした R N A i 効果及び口腔癌細胞増殖抑制効果を確認した結果のその他の例である。

【図 1 3】図 1 3 は、正常細胞及び口腔癌細胞における A k t 2 及び A k t 3 タンパク質の発現を確認した結果の一例である。

【図 1 4】図 1 4 は、本発明の合成二本鎖 s i R N A の A k t 2 遺伝子を標的とした R N A i 効果 (A) 及び前立腺癌細胞増殖抑制効果 (B) を確認した結果の一例である。

【図 1 5】図 1 5 は、本発明の合成二本鎖 s i R N A の A k t 3 遺伝子を標的とした R N A i 効果 (A) 及び前立腺癌細胞増殖抑制効果 (B) を確認した結果の一例である。

【図 1 6】図 1 6 は、A k t 1、A k t 2 及び A k t 3 遺伝子を標的とした本発明の合成二本鎖 s i R N A の前立腺癌細胞増殖抑制における併用効果を確認した結果の一例である。

10

【配列表フリーテキスト】

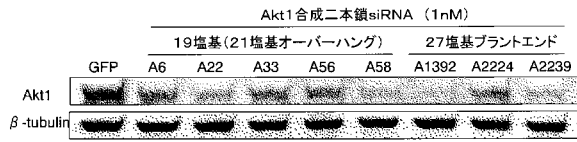
【 0 0 9 0 】

配列番号 1	オーバーハング s i R N A	A 6
配列番号 2	オーバーハング s i R N A	A 2 2
配列番号 3	オーバーハング s i R N A	A 3 3
配列番号 4	オーバーハング s i R N A	A 5 6
配列番号 5	オーバーハング s i R N A	A 5 8
配列番号 6	ブラントエンド s i R N A	A 1 3 9 2
配列番号 7	ブラントエンド s i R N A	A 2 2 2 4
配列番号 8	ブラントエンド s i R N A	A 2 2 3 9
配列番号 1 0	オーバーハング s i R N A	B 3 6
配列番号 1 1	オーバーハング s i R N A	B 1 7 2
配列番号 1 2	オーバーハング s i R N A	B 3 9 5
配列番号 1 3	オーバーハング s i R N A	B 4 3 1
配列番号 1 4	オーバーハング s i R N A	B 4 7 7
配列番号 1 5	ブラントエンド s i R N A	B 3 3
配列番号 1 6	ブラントエンド s i R N A	B 3 9 0
配列番号 1 7	ブラントエンド s i R N A	B 4 7 5
配列番号 1 9	オーバーハング s i R N A	C 1 6 9
配列番号 2 0	オーバーハング s i R N A	C 4 9 8
配列番号 2 1	オーバーハング s i R N A	C 9 4 1
配列番号 2 2	オーバーハング s i R N A	C 1 2 2 9
配列番号 2 3	オーバーハング s i R N A	C 1 3 2 1
配列番号 2 4	ブラントエンド s i R N A	C 1 6 6
配列番号 2 5	ブラントエンド s i R N A	C 4 9 6
配列番号 2 6	ブラントエンド s i R N A	C 1 2 2 4

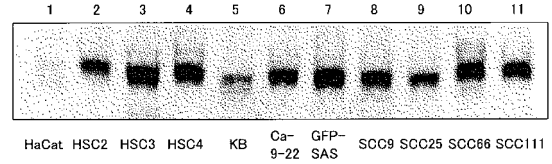
20

30

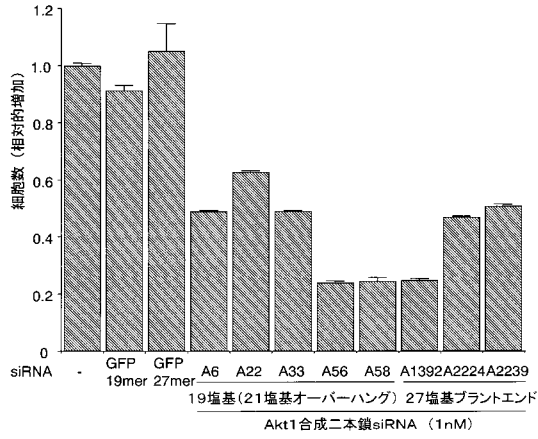
【 図 1 】



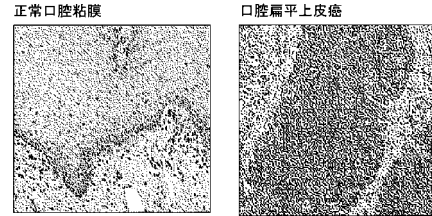
【 図 3 】



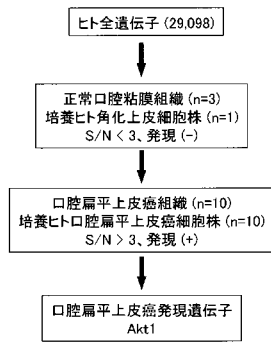
【 図 2 】



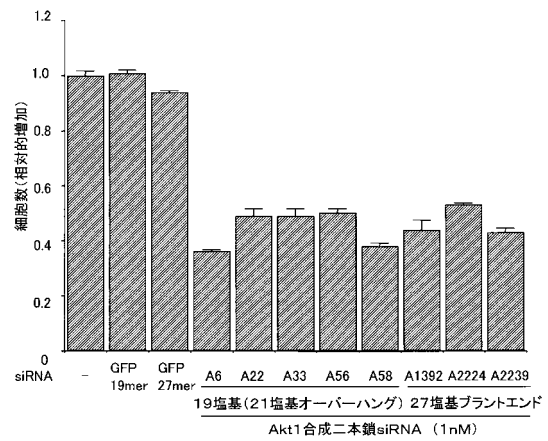
【 図 4 】



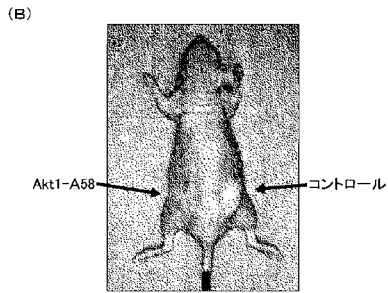
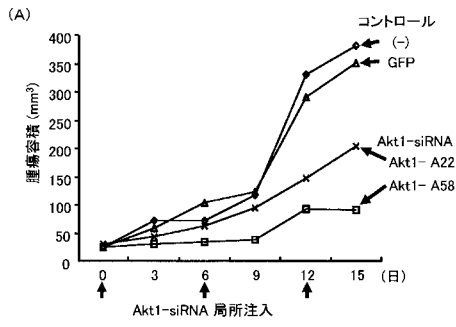
【 図 5 】



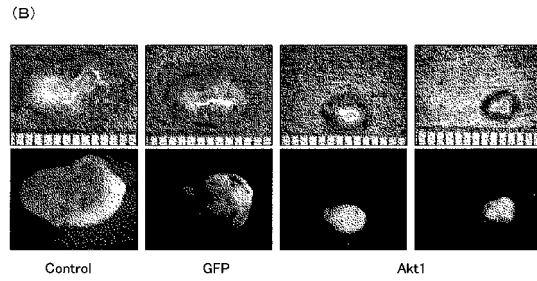
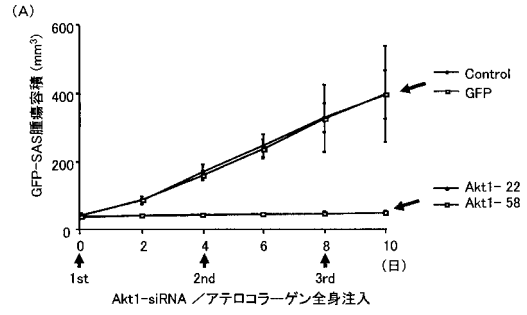
【 図 6 】



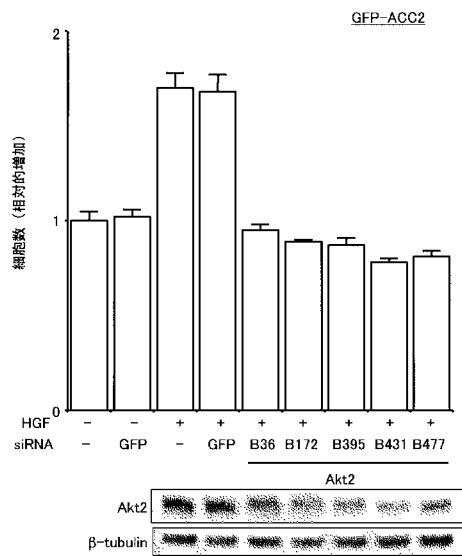
【 図 7 】



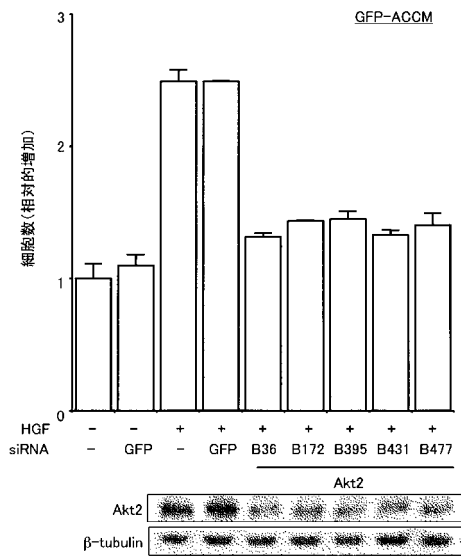
【 図 8 】



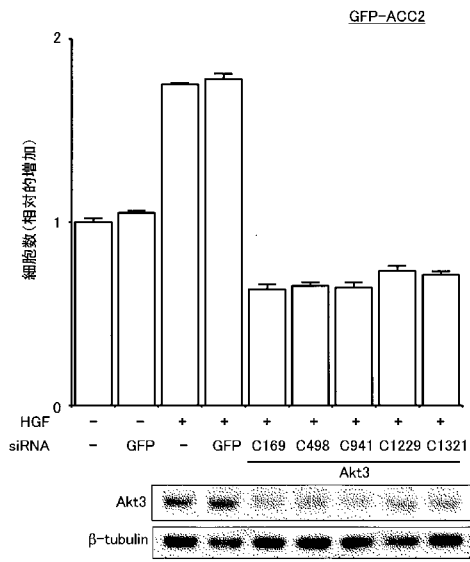
【 図 9 】



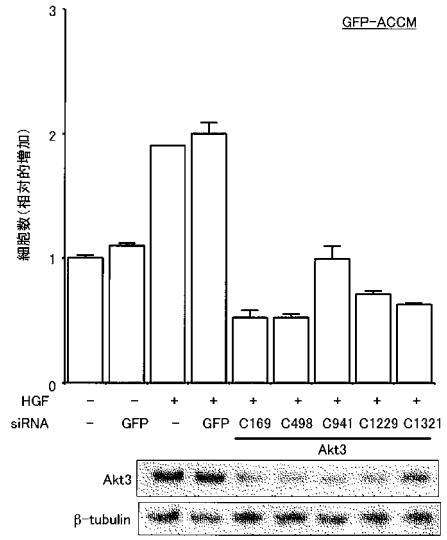
【 図 10 】



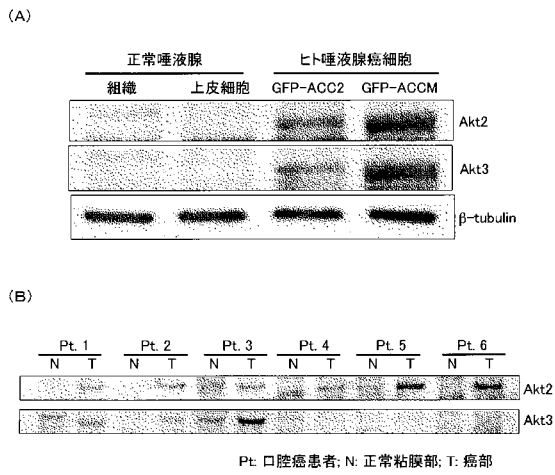
【 図 1 1 】



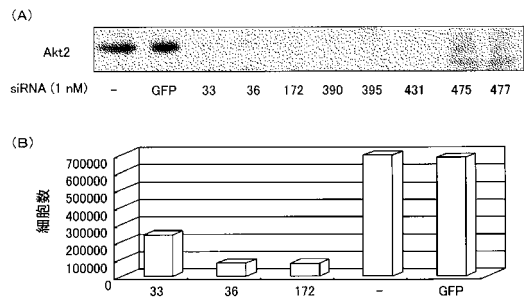
【 図 1 2 】



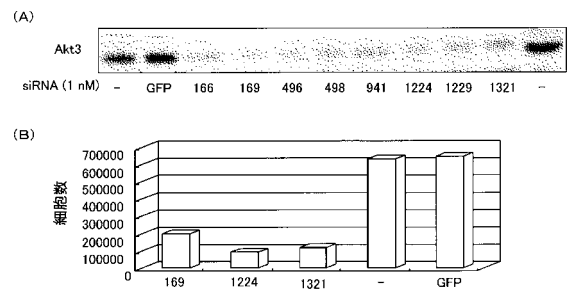
【 図 1 3 】



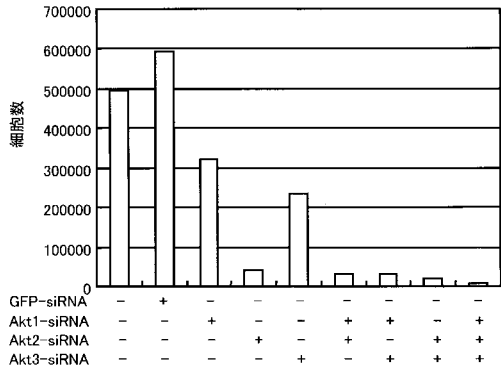
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

2007151544000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	N	
		G 0 1 N 33/574	A	

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA13 BA44 DC50 NA14 ZB26 ZB262
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA05 NA14 ZB26