

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/088853

発行日 平成27年4月27日 (2015. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成25年6月20日 (2013. 6. 20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/08	
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2013-549158 (P2013-549158)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2012/078245  
 (22) 国際出願日 平成24年10月31日 (2012.10.31)  
 (31) 優先権主張番号 特願2011-274897 (P2011-274897)  
 (32) 優先日 平成23年12月15日 (2011.12.15)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

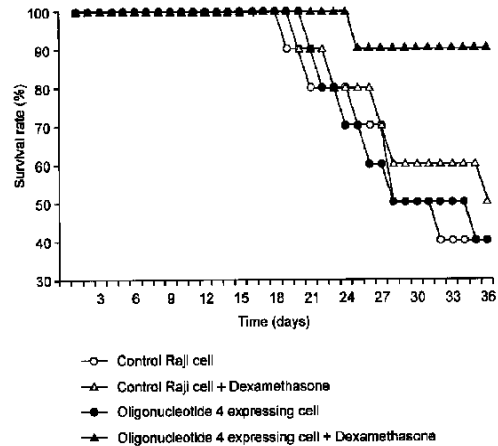
(71) 出願人 504132881  
 国立大学法人東京農工大学  
 東京都府中市晴見町 3-8-1  
 (74) 代理人 100079049  
 弁理士 中島 淳  
 (74) 代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (74) 代理人 100099025  
 弁理士 福田 浩志  
 (72) 発明者 田中 あかね  
 東京都府中市晴見町 3-8-1 国立大学  
 法人東京農工大学内  
 (72) 発明者 松田 浩珍  
 東京都府中市晴見町 3-8-1 国立大学  
 法人東京農工大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド、グルココルチコイド感受性増強剤、医薬組成物、及び発現ベクター

(57) 【要約】

生体内において、グルココルチコイド受容体遺伝子のプレmRNAとセリン/アルギニンリッチ蛋白質30c (SRp30c)との結合を妨げるオリゴヌクレオチドである。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生体内において、グルココルチコイド受容体遺伝子のプレmRNAとセリン/アルギニンリッチ蛋白質30c(SRp30c)との結合を妨げるオリゴヌクレオチド。

**【請求項 2】**

配列番号22に示す塩基配列の連続する一部に相補的な15~50塩基長の塩基配列である、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

**【請求項 3】**

前記配列番号22に示す塩基配列の連続する一部は、アデニンとグアニンの合計のモル比が50%以上の塩基配列である、請求項2に記載のオリゴヌクレオチド。

10

**【請求項 4】**

配列番号1に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、  
配列番号2に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、  
配列番号3に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、  
配列番号4に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、及び、  
配列番号5に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、  
のいずれかである、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

**【請求項 5】**

請求項1~請求項4に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種を有効成分として含むグルココルチコイド感受性増強剤。

20

**【請求項 6】**

請求項1~請求項4に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種を含む医薬組成物。

**【請求項 7】**

請求項1~請求項4に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種を含む発現ベクター。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、オリゴヌクレオチド、グルココルチコイド感受性増強剤、医薬組成物、及び発現ベクターに関する。

30

**【背景技術】****【0002】**

グルココルチコイドは、副腎皮質で作られるホルモンの一種であり、代謝や免疫に関与する。グルココルチコイドは、強い消炎作用及び免疫抑制作用を有することから、その人工合成物がアレルギー疾患や自己免疫性疾患の治療薬として使用されてきた。

また、グルココルチコイドは、がん化したリンパ球に対して増殖抑制作用を有することから、その人工合成物がリンパ腫及びリンパ性白血病の化学療法に用いられてきた。骨髄抑制や激しい消化器症状などの副作用がグルココルチコイド投与で発現することは非常に稀であることから、グルココルチコイドはリンパ腫及びリンパ性白血病に対して必須の治療薬である。

40

**【0003】**

様々な疾患に使用されてきたグルココルチコイドであるが、患者の中にはグルココルチコイドに対する耐性を発現する症例があり、グルココルチコイドが効かないことがある。グルココルチコイド耐性は、喘息患者の5~10%、リウマチ患者の約30%、炎症性腸疾患患者の20~50%、小児の急性リンパ性白血病患者の10~25%にも上ると報告されており、グルココルチコイド耐性を解除する技術の開発が待たれている。

**【0004】**

グルココルチコイド受容体(Glucocorticoid receptor、GR)については、下記の知見が得られている。

50

G R は、グルココルチコイドと結合すると、核内で転写因子として働く。

ヒト G R 遺伝子の塩基配列は既知である (NR3C1、Gene ID : 2908、NCBI Reference Sequence : NC\_000005.9)。ヒト G R 遺伝子には 9 個のエキソンが存在し、エキソン 9 (塩基数 4 1 1 1) の内部の選択的スプライシングによって、2 つのスプライシングバリエーション、G R と G R が作られる。

G R は、エキソン 1 ~ 9 が連結した成熟 m R N A から翻訳される、7 7 7 アミノ酸残基の蛋白質である。G R はリガンド依存的に核内移行し、転写因子として働く。

G R は、エキソン 1 ~ 8 とエキソン 9 の一部 (エキソン 9 の 5 ' 末端側から 2 6 3 1 ~ 4 1 1 1 番目) とが連結した成熟 m R N A から翻訳される、7 4 2 アミノ酸残基の蛋白質である。G R はリガンド結合ドメインの一部が欠損しており、リガンド結合能を有しない。G R は、核内において、リガンドと結合した G R と競合的に拮抗し、G R の転写因子活性を阻害する。

10

#### 【 0 0 0 5 】

細胞のグルココルチコイド耐性に関しては、下記の報告がなされている。

イヌのリンパ腫及び白血病に由来する細胞株 (C L - 1 細胞、G L - 1 細胞) において、Nuclear factor- B (N F - B) の機能を阻害することでグルココルチコイド耐性が解除され、グルココルチコイド添加によって細胞増殖が抑制されることが報告されている (例えば、文献 1 参照)。このことから、N F - B の機能を阻害すると細胞内の G R の発現量が増加し、グルココルチコイドの細胞増殖抑制作用が細胞に及びやすくなるものと考えられた。

20

また、ヒトのパーキットリンパ腫由来の R a j i 細胞及び急性リンパ性白血病患者の末梢血由来細胞において、s i R N A を用いて N F - B の機能を阻害すると、グルココルチコイド耐性が解除されることと、G R の発現量が増加することが報告されている (例えば、文献 2 参照)。このことから、細胞内において G R の発現量が増加することで、グルココルチコイド耐性が解除される可能性が示唆された。

#### 【 0 0 0 6 】

G R の発現に関しては、下記の報告がなされている。

大腸癌細胞株 (H T - 2 9 細胞) 及び乳癌細胞株 (M C F - 7 細胞) において、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A や酪酸ナトリウム、及び D N A メチル基転移酵素の阻害剤である 5 - アザ - 2 ' - デオキシシチジンが、G R の発現量を増加させ G R の発現量を減少させることが報告されている (例えば、文献 3 参照)。そのとき同時にセリン / アルギニンリッチ蛋白質 (Serine/arginine-rich protein、S R 蛋白質) の 1 種である A S F / S F 2 の発現量が増加していることから、A S F / S F 2 は、G R の m R N A のスプライシング制御に関与している可能性が示唆された。S R 蛋白質はスプライシング因子であり、細胞の核内でプレ m R N A から成熟 m R N A へのスプライシングを制御する蛋白質である。

30

ほかに、2 8 人の健康なボランティアの末梢血白血球における m R N A の発現量を比較した研究で、S R 蛋白質の 1 種であるセリン / アルギニンリッチ蛋白質 3 0 c (Serine/arginine-rich protein 30c、S R p 3 0 c) の発現量と、G R と G R との発現量比 (G R / G R ) に負の相関関係があることが報告されている (例えば、文献 4 参照)。

40

さらに、好中球様細胞株 (レチノイン酸によって刺激された P L B - 9 8 5 細胞) において、S R p 3 0 c 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すると、G R の m R N A 発現量が減少し G R の m R N A 発現量が増加することが報告されている (例えば、文献 5 参照)。

また、G R 遺伝子には A G G A C という 5 塩基が比較的高い頻度で存在することが見出され、S R p 3 0 c の認識配列と予想された (例えば、文献 6 参照)。

#### 【 0 0 0 7 】

以上の知見から、G R 遺伝子のエキソン 9 内部の選択的スプライシングは、S R 蛋白質の 1 種である S R p 3 0 c によって制御されているものと考えられる。即ち、G R のプレ m R N A のエキソン 9 には、S R p 3 0 c が結合する部位が存在し、S R p 3 0 c はこの

50

部位に結合して、GRのプレmRNAをGRの成熟mRNAへとスプライシングさせているものと考えられる。

ただし、SRp30cの機能阻害によって細胞のグルコルチコイド感受性が実際に変化するかについては、これまで報告がなく、不明である。

【0008】

ところで、SR蛋白質のリン酸化を抑制することで、その機能を阻害する技術が開示されている。例として、SR蛋白質のリン酸化酵素の阻害剤であるイソニコチンアミド化合物SRPIN340を抗ウイルス剤として用いる技術が開示されている（例えば、文献7及び文献8参照）。

【0009】

文献1：Matsuda A, et al. Res. Vet. Sci., 2010, 89(3):378-382.

文献2：Matsuda A, et al. The 14th International Congress of Immunology, Aug. 2010, Volume 22, Supplement number 1, p. v8.

文献3：Piotrowska H, et al. Arch. Med. Res., 2009, 40:156-162.

文献4：Watanuki T, et al. J. Affect. Disord., 2008, 110(1-2):62-69.

文献5：Xu Q, et al. J. Biol. Chem., 2003, 278:27112-27118.

文献6：Paradis C, et al. RNA, 2007, 13:1287-1300.

文献7：Karakama Y, et al. Antimicrob. Agents Chemother., 2010, 54(8):3179-318.

文献8：国際公開第2005/063293号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

SR蛋白質リン酸化酵素の阻害剤によってSR蛋白質のリン酸化を抑制する手段（例えば、文献7及び文献8参照）では、特定のSR蛋白質の活性を制御することは難しく、あらゆるSR蛋白質の活性を抑制してしまうおそれがある。

また、SRp30cは、GRのほかに、性腺刺激ホルモン受容体のスプライシングにも関与することが知られており、SRp30cのみの活性を抑制した場合でも、生体の恒常性を乱す可能性は否定できない。

副作用を起こすことなく細胞のグルコルチコイド感受性を上げるには、SRp30cが担っているGRスプライシングパリアント制御を選択的に阻害する技術が要求される。

【0011】

本発明は、上記状況のもとになされた。

上記状況のもと、細胞のグルコルチコイド感受性を上げる活性を有する新規な化合物が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記課題を解決するための具体的手段は、以下のとおりである。

<1> 生体内において、グルコルチコイド受容体遺伝子のプレmRNAとセリン/アルギニンリッチ蛋白質30c (SRp30c)との結合を妨げるオリゴヌクレオチド。

<2> 配列番号22に示す塩基配列の連続する一部に相補的な15~50塩基長の塩基配列である、前記<1>に記載のオリゴヌクレオチド。

<3> 前記配列番号22に示す塩基配列の連続する一部は、アデニンとグアニンの合計のモル比が50%以上の塩基配列である、前記<2>に記載のオリゴヌクレオチド。

<4> 配列番号1に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、配列番号2に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、配列番号3に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、配列番号4に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、及び、配列番号5に示す塩基配列であるオリゴヌクレオチド、のいずれかである、前記<1>に記載のオリゴヌクレオチド。

<5> 前記<1>~<4>に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種を有効成分として含むグルコルチコイド感受性増強剤。

10

20

30

40

50

< 6 > 前記 < 1 > ~ < 4 > に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種を含む医薬組成物。

< 7 > 前記 < 1 > ~ < 4 > に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種を含む発現ベクター。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、細胞のグルココルチコイド感受性を上げる活性を有するオリゴヌクレオチドが提供される。

また、本発明によれば、前記オリゴヌクレオチドを有効成分として含むグルココルチコイド感受性増強剤が提供される。

また、本発明によれば、前記オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物が提供される。

さらに、本発明によれば、前記オリゴヌクレオチドを発現する発現ベクターが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】実施例 2 における細胞増殖抑制率を示すグラフである。

【図 2】実施例 2 における細胞増殖抑制率を示すグラフである。

【図 3】実施例 2 における細胞増殖抑制率を示すグラフである。

【図 4】実施例 2 における細胞増殖抑制率を示すグラフである。

【図 5】実施例 2 における細胞増殖抑制率を示すグラフである。

【図 6】実施例 4 における細胞増殖抑制率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下に、本発明の実施の形態について順次説明する。なお、これらの説明および実施例は本発明を例示するものであり、本発明の範囲を制限するものではない。

本明細書において「~」を用いて示された数値範囲は、「~」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

【0016】

<オリゴヌクレオチド>

本発明のオリゴヌクレオチドは、生体内において、グルココルチコイド受容体遺伝子 (GR 遺伝子) のプレ mRNA と、セリン/アルギニンリッチ蛋白質 30c (Serine/arginine-rich protein 30c, SRp30c) との結合を妨げるオリゴヌクレオチドである。

前記オリゴヌクレオチドは、グルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor, GR) のプレ mRNA が GR の成熟 mRNA へとスプライシングされることを阻害するので、GR の GR に対する相対的な発現量を増加させると考えられる。その結果、細胞のグルココルチコイド感受性が上昇すると考えられる。

【0017】

GR のプレ mRNA のエキソン 9 に存在し SRp30c が結合する部位 (スプライス要素) の候補として、GR のプレ mRNA のエキソン 9 の連続する一部であって、アデニン (A) とグアニン (G) の合計のモル比が 50% 以上である塩基配列が挙げられる。

SR 蛋白質は A 及び / 又は G が豊富な塩基配列と結合しやすいと考えられており、SR 蛋白質の 1 種である SRp30c も、A 及び / 又は G が豊富な塩基配列と結合しやすいと考えられる。したがって、GR のプレ mRNA のエキソン 9 の連続する一部であって、アデニンとグアニンの合計のモル比が 50% 以上である塩基配列は前記スプライス要素である可能性が高い。

【0018】

上記を理由に、ヒト GR 遺伝子 (NR3C1, Gene ID: 2908, NCBI Reference Sequence: NC\_000005.9) のエキソン 9 から、アデニンとグアニンの合計のモル比が 50% 以上 (好ましくは 60% 以上) である例えば 15 ~ 50 塩基長の塩基配列を選択し、この塩基配列に相補的な 15 ~ 50 塩基長の塩基配列を本発明のオリゴヌクレオチドとしてよい。

10

20

30

40

50

このオリゴヌクレオチドは、前記スプライス要素に完全に若しくは部分的に重なってGRのプレmRNAに結合するか、または前記スプライス要素に十分に近い位置でGRのプレmRNAに結合するものと考えられる。そのため、SRp30cと前記スプライス要素との結合が阻害され、GRの成熟mRNAの作製が阻害され、GRのGRに対する相対的な発現量が増加するものと考えられる。その結果、細胞のグルコルチコイド感受性が上がるものと考えられる。

【0019】

配列番号22に示す塩基配列は、ヒトGR遺伝子の塩基番号156091～157582に相当し、即ち、ヒトGR遺伝子のエキソン9の一部（エキソン9の5'末端側から2620～4111番目）に相当する。GRは、GRのプレmRNAのエキソン1～8とエキソン9の一部（ヒトにおいては、エキソン9の5'末端側から2631～4111番目）とが連結した成熟mRNAから翻訳される蛋白質である。したがって、ヒトGRのプレmRNAの配列番号22に示す塩基配列内に、前記スプライス要素が存在すると考えられる。

上記を理由に、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号22に示す塩基配列の連続する一部に相補的な15～50塩基長の塩基配列であることが好ましい。

さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号22に示す塩基配列の連続する一部であってアデニンとグアニンの合計のモル比が50%以上（より好ましくは60%以上）である塩基配列に相補的な、15～50塩基長の塩基配列であることがより好ましい。

【0020】

本発明のオリゴヌクレオチドは、以下のオリゴヌクレオチド1、オリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3、オリゴヌクレオチド4、及びオリゴヌクレオチド5のいずれかであることが好ましい。オリゴヌクレオチド1～5は、細胞のグルコルチコイド感受性を上げる活性を有する。

【0021】

オリゴヌクレオチド1：配列番号1に示す塩基配列（5'-CTTTCTGGTTTTAAACCACATAACATTCCTATA-3'）であるオリゴヌクレオチド。

配列番号1の塩基配列は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の連続する一部（エキソン9の5'末端側から2626～2656番目）に相補的な塩基配列である。

【0022】

オリゴヌクレオチド2：配列番号2に示す塩基配列（5'-AAAAAGGGCACAGCTTCTTTTCCCATTTAATGAAA-3'）であるオリゴヌクレオチド。

配列番号2の塩基配列は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の連続する一部（エキソン9の5'末端側から2796～2829番目）に相補的な塩基配列である。

【0023】

オリゴヌクレオチド3：配列番号3に示す塩基配列（5'-TAAGATGACTTTCCTTTCCCCACGTATCCT-3'）であるオリゴヌクレオチド。

配列番号3の塩基配列は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の連続する一部（エキソン9の5'末端側から2830～2860番目）に相補的な塩基配列である。

【0024】

オリゴヌクレオチド4：配列番号4に示す塩基配列（5'-TTTGTCCCCATTATATAGCATT-3'）であるオリゴヌクレオチド。

配列番号4の塩基配列は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の連続する一部（エキソン9の5'末端側から3730～3752番目）に相補的な塩基配列である。

【0025】

オリゴヌクレオチド5：配列番号5に示す塩基配列（5'-CAGATTTTTTTTATTATGATGT-3'）であるオリゴヌクレオチド。

配列番号5の塩基配列は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の連続する一部（エキソン9の5'末端側から4080～4100番目）に相補的な塩基配列である。

【0026】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド 1 ~ 5 は、前記スプライス要素に完全に若しくは部分的に重なって G R の プレ m R N A に結合するか、または前記スプライス要素に十分に近い位置で G R の プレ m R N A に結合するものと考えられる。そのため、S R p 3 0 c と前記スプライス要素との結合が阻害され、G R の成熟 m R N A の作製が阻害され、G R の G R に対する相対的な発現量が増加するものと考えられる。その結果、細胞のグルコシルコイド感受性が上がるものと考えられる。

オリゴヌクレオチド 1 ~ 5 は、その塩基配列から、G R の プレ m R N A のエキソン 9 の特定部位に配列特異的に結合するものと考えられる。そのため、オリゴヌクレオチド 1 ~ 5 は、S R p 3 0 c 以外の S R 蛋白質の機能には影響を及ぼさず、また、S R p 3 0 c が制御しているスプライシングのうち、G R のエキソン 9 以外のスプライシングには影響を

10

#### 【 0 0 2 7 】

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド 1、オリゴヌクレオチド 2、オリゴヌクレオチド 3、オリゴヌクレオチド 4、及びオリゴヌクレオチド 5 のいずれかと相同性が認められるオリゴヌクレオチドも包含される。

例えば、オリゴヌクレオチド 1 と相同性が認められるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド 1 と同等程度の作用を示せばよく、好ましくは 8 0 % 以上の相同性、より好ましくは 9 0 % 以上の相同性、更に好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有する。オリゴヌクレオチド 2、オリゴヌクレオチド 3、オリゴヌクレオチド 4、及びオリゴヌクレオチド 5 のいずれかと相同性が認められるオリゴヌクレオチドについても、上記と同様である。

20

相同性は、例えば、汎用されている相同性検索アルゴリズムである B L A S T ( Basic Local Alignment Search Tool ) ( N C B I、又は Altschul, S. F. et al. J. Mol. Biol., 215:403-410(1990) ) を用いた配列比較で決定することができる。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド 1 と同等程度の作用を示すものであれば、配列番号 1 と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドも包含される。

配列番号 1 と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド 1 と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは 1 5 ~ 4 5 塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが 1 5 塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的 m R N A との結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが 4 5 塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、2 0 ~ 4 0 塩基長がより好ましく、2 2 ~ 3 8 塩基長が更に好ましく、2 3 ~ 3 5 塩基長が特に好ましく、2 4 ~ 3 0 塩基長が最も好ましい。

30

#### 【 0 0 2 9 】

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド 2 と同等程度の作用を示すものであれば、配列番号 2 と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドも包含される。

40

配列番号 2 と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド 2 と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは 1 5 ~ 5 0 塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが 1 5 塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的 m R N A との結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが 5 0 塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、2 0 ~ 4 5 塩基長がより好ましく、2 5 ~ 4 0 塩基長が更に好ましく、2 8 ~ 3 8 塩基長が特に好ましく、3 0 ~ 3 4 塩基長が最も好ましい。

#### 【 0 0 3 0 】

50

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド3と同等程度の作用を示すものであれば、配列番号3と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドも包含される。

配列番号3と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド3と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは15~45塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが15塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが45塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、20~40塩基長がより好ましく、22~38塩基長が更に好ましく、23~35塩基長が特に好ましく、24~30塩基長が最も好ましい。

10

#### 【0031】

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド4と同等程度の作用を示すものであれば、配列番号4と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドも包含される。

配列番号4と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド4と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは12~35塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが12塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが35塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、15~32塩基長がより好ましく、18~30塩基長が更に好ましく、20~28塩基長が特に好ましく、22~25塩基長が最も好ましい。

20

#### 【0032】

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド5と同等程度の作用を示すものであれば、配列番号5と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドも包含される。

配列番号5と相補的な塩基配列であるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド5と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは12~35塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが12塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが35塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、15~30塩基長がより好ましく、16~25塩基長が更に好ましく、18~23塩基長が特に好ましく、20~22塩基長が最も好ましい。

30

#### 【0033】

オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行うことができる。

40

前記ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19mM~約40mM、好ましくは約19mM~約20mMで、温度が約50~約70、好ましくは約60~約65の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65の場合が好ましい。

#### 【0034】

本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド1、オリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3、オリゴヌクレオチド4、及びオリゴヌクレオチド5のいずれかにお

50



いて塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドも包含される。

例えば、オリゴヌクレオチド1において塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド1と同等程度の作用を示せばよく、塩基の欠失、置換又は付加の位置は特に限定されない。オリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3、オリゴヌクレオチド4、及びオリゴヌクレオチド5のいずれかにおいて塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドについても、上記と同様である。

#### 【0035】

オリゴヌクレオチド1において、欠失した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～15塩基であり、好ましくは1塩基～10塩基であり、より好ましくは1塩基～5塩基である。置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～10塩基であり、好ましくは1塩基～5塩基であり、より好ましくは1塩基又は2塩基である。付加した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～15塩基であり、好ましくは1塩基～10塩基であり、より好ましくは1塩基～5塩基である。

10

オリゴヌクレオチド1において塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド1と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは20～40塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが20塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが40塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、22～38塩基長がより好ましく、23～35塩基長が更に好まし、24～30塩基長が特に好ましい。

20

#### 【0036】

オリゴヌクレオチド2において、欠失した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～15塩基であり、好ましくは1塩基～10塩基であり、より好ましくは1塩基～5塩基である。置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～10塩基であり、好ましくは1塩基～5塩基であり、より好ましくは1塩基又は2塩基である。付加した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～15塩基であり、好ましくは1塩基～10塩基であり、より好ましくは1塩基～5塩基である。

30

オリゴヌクレオチド2において塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド2と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは20～45塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが20塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが45塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、25～40塩基長がより好ましく、28～38塩基長が更に好まし、30～34塩基長が特に好ましい。

#### 【0037】

オリゴヌクレオチド3において、欠失した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～15塩基であり、好ましくは1塩基～10塩基であり、より好ましくは1塩基～5塩基である。置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～10塩基であり、好ましくは1塩基～5塩基であり、より好ましくは1塩基又は2塩基である。付加した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基～15塩基であり、好ましくは1塩基～10塩基であり、より好ましくは1塩基～5塩基である。

40

オリゴヌクレオチド3において塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド3と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは20～40塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが20塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNA

50

との結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが40塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、22~38塩基長がより好ましく、23~35塩基長が更に好まし、24~30塩基長が特に好ましい。

#### 【0038】

オリゴヌクレオチド4において、欠失した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基~15塩基であり、好ましくは1塩基~10塩基であり、より好ましくは1塩基~5塩基である。置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基~10塩基であり、好ましくは1塩基~5塩基であり、より好ましくは1塩基又は2塩基である。付加した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基~15塩基であり、好ましくは1塩基~10塩基であり、より好ましくは1塩基~5塩基である。

10

オリゴヌクレオチド4において塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド4と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは15~32塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが15塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが32塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、18~30塩基長がより好ましく、20~28塩基長が更に好まし、22~25塩基長が特に好ましい。

20

#### 【0039】

オリゴヌクレオチド5において、欠失した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基~15塩基であり、好ましくは1塩基~10塩基であり、より好ましくは1塩基~5塩基である。置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基~10塩基であり、好ましくは1塩基~5塩基であり、より好ましくは1塩基又は2塩基である。付加した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、例えば1塩基~15塩基であり、好ましくは1塩基~10塩基であり、より好ましくは1塩基~5塩基である。

オリゴヌクレオチド5において塩基が欠失、置換又は付加したオリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチド5と同等程度の作用を示せば特に限定されない。当該オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは15~30塩基長である。当該オリゴヌクレオチドの長さが15塩基長以上であると、配列非特異的な結合が起こりにくく、また、標的mRNAとの結合の安定性が高い。他方、当該オリゴヌクレオチドの長さが30塩基長以下であると、細胞内及び核内に移行しやすい。上記観点から、当該オリゴヌクレオチドの長さは、16~25塩基長がより好ましく、18~23塩基長が更に好まし、20~22塩基長が特に好ましい。

30

#### 【0040】

本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴDNA及びオリゴRNAのみならず、ホスホロチオエートオリゴDNA及びホスホロチオエートオリゴRNAであってよい。

ホスホロチオエートヌクレオチドは、ヌクレオチド間の結合部位にあるリン酸基の酸素原子が硫黄原子で置換されたヌクレオチドである。ホスホロチオエートヌクレオチドは、各種の核酸分解酵素に対して耐性があることから、ヌクレオチドよりも安定性が高く好ましい。

40

本発明のオリゴヌクレオチドは、安定性の観点から、オリゴDNAが好ましく、ホスホロチオエートオリゴDNAがより好ましい。

#### 【0041】

本発明のオリゴヌクレオチドは、通常のオリゴヌクレオチド合成の方法に従って化学合成することで得ることができる。

また、オリゴヌクレオチド1は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から2626~2656番目の配列を含む部位を鋳型にして、適当なプライマーを用いてPCR法に

50

より合成できる。

オリゴヌクレオチド 2 は、ヒト GR 遺伝子のエキソン 9 の 5' 末端側から 2796 ~ 2829 番目の配列を含む部位を鋳型にして、適当なプライマーを用いて PCR 法により合成できる。

オリゴヌクレオチド 3 は、ヒト GR 遺伝子のエキソン 9 の 5' 末端側から 2830 ~ 2860 番目の配列を含む部位を鋳型にして、適当なプライマーを用いて PCR 法により合成できる。

オリゴヌクレオチド 4 は、ヒト GR 遺伝子のエキソン 9 の 5' 末端側から 3730 ~ 3752 番目の配列を含む部位を鋳型にして、適当なプライマーを用いて PCR 法により合成できる。

オリゴヌクレオチド 5 は、ヒト GR 遺伝子のエキソン 9 の 5' 末端側から 4080 ~ 4100 番目の配列を含む部位を鋳型にして、適当なプライマーを用いて PCR 法により合成できる。

#### 【0042】

本発明において、オリゴヌクレオチドについて言う「細胞のグルココルチコイド感受性を上げる活性」とは、当該オリゴヌクレオチドを細胞に接触させた場合、当該オリゴヌクレオチドを細胞に接触させない場合に比して、細胞のグルココルチコイドに対する感受性を上げる活性をいう。

オリゴヌクレオチドが「細胞のグルココルチコイド感受性を上げる活性」を有するか否かは、当該オリゴヌクレオチドとグルココルチコイドとを細胞に接触させた場合と細胞に接触させない場合とについて、細胞増殖率を比較することで確認できる。例えば、リンパ腫またはリンパ性白血病に由来する細胞に当該オリゴヌクレオチドを導入し、当該細胞の培地にグルココルチコイドを添加して、細胞増殖率が低下することで確認できる。

#### 【0043】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該オリゴヌクレオチドを含む培地で細胞を培養することで、細胞への導入が可能である。このとき、オリゴヌクレオチドとリポフェクタミンとを混合して用いることで、細胞への導入効率を上げることができる。ほかに、電気穿孔法によっても細胞への導入効率を上げることができる。

#### 【0044】

<グルココルチコイド感受性増強剤>

本発明のグルココルチコイド感受性増強剤は、薬学的に許容し得る媒質中に、本発明のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種を有効成分として含む。

前記グルココルチコイド感受性増強剤の投与により、細胞における GR の GR に対する相対的な発現量を増やすことができる。このため、前記グルココルチコイド感受性増強剤は、生体のグルココルチコイド感受性を増強させる薬剤として用いることができる。

#### 【0045】

前記グルココルチコイド感受性増強剤の調製に用いられる媒質および製剤用添加物の種類は、特に制限されない。媒質としては、固体媒質（例えば、ゼラチン、乳糖）及び液体媒質（例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液）が挙げられる。製剤用添加物としては、界面活性剤（例えば、糖類、多価アルコール、多価アルコールエステル）、緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム）等が挙げられる。

#### 【0046】

前記グルココルチコイド感受性増強剤は、静脈内投与するのに適した液体媒質に、本発明のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種を適量含有させたものが好ましい。この場合、前記グルココルチコイド感受性増強剤の投与は、適用対象者の静脈内に注射または点滴することにより行われる。

前記グルココルチコイド感受性増強剤は、保存安定性の観点からは、凍結乾燥された状態も好ましい。この場合は用時に液体媒質に溶かして用いればよい。

#### 【0047】

前記グルココルチコイド感受性増強剤は、通常、副腎皮質ホルモンであるグルココルチ

10

20

30

40

50

コイドと共に用いられる。両者を共に用いる場合、前記グルココルチコイド感受性増強剤は、グルココルチコイドと同時に投与してもよく、グルココルチコイドの投与前に或いはグルココルチコイドの投与後に投与してもよい。

共に用いられるグルココルチコイドは、天然物の精製物でもよく、人工合成物であるステロイド剤（例えば、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン等）でもよい。

【0048】

前記グルココルチコイド感受性増強剤は、喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患、リウマチや炎症性腸疾患などの自己免疫性疾患、リンパ腫、リンパ性白血病などのステロイド剤の投与対象となりうる全ての患者に投与することができる。

前記グルココルチコイド感受性増強剤は、上記の患者でグルココルチコイド耐性になっている患者に使用するほか、グルココルチコイド耐性になっていない患者にも使用できる。この場合、グルココルチコイド投与量の減量が可能になるという点で有用である。

10

【0049】

前記グルココルチコイド感受性増強剤は、対象となる疾患の種類や重傷度などにもよるが、成人1回当たりの有効量として0.01mg/kg～100mg/kgの投与が好ましく、0.1mg/kg～30mg/kgの投与がより好ましい。投与回数に特に制限はなく、1回投与で用いてもよく、反復投与で用いてもよく、持続投与で用いてもよい。投与間隔および投与期間は、臨床所見、画像所見、血液所見、併存する疾患、既往歴などに応じて、当業者が選択できる。

【0050】

前記グルココルチコイド感受性増強剤の使用は、ヒトでの使用に限定されない。ウシ、ウマ、ヒツジ等の家畜や、イヌ、ネコ、サル等のペット等に用いてもよい。

20

【0051】

前記グルココルチコイド感受性増強剤に有効成分として含まれるオリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド1、オリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3、オリゴヌクレオチド4、及びオリゴヌクレオチド5からなる群から選択される少なくとも1種が好ましい。

オリゴヌクレオチド1～5は、GRのpre-mRNAにおけるエキソン9の特定部位に配列特異的に結合し、SRp30cと前記スプライス要素との結合を選択的に阻害するものと考えられる。そのため、オリゴヌクレオチド1～5の少なくとも1種を有効成分として含むグルココルチコイド感受性増強剤は、生体へ投与しても副作用の懸念が少ない。

30

【0052】

< 医薬組成物 >

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容し得る媒質中に、本発明のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種を含む。

前記医薬組成物は、細胞におけるGRのGRに対する相対的な発現量を増やし、生体のグルココルチコイド感受性を増強させる医薬組成物を提供するものである。

【0053】

前記医薬組成物の調製に用いられる媒質および製剤用添加物の種類は、特に制限されない。媒質および製剤用添加物としては、前記グルココルチコイド感受性増強剤について既述した固体媒質、液体媒質、界面活性剤、緩衝剤などが挙げられる。

40

【0054】

前記医薬組成物は、アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、がん、内分泌疾患、精神疾患、感染症、外傷などの各種の疾患や身体損傷の治療のために使用することができる。なかでも、前記医薬組成物は、アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、リンパ腫、リンパ性白血病などのステロイド剤の投与対象となりうる患者に好適である。

前記医薬組成物は、血管内投与、膀胱投与、腹腔内投与、局所投与等の方法で患者に投与することができる。

したがって、前記医薬組成物によれば、各種の疾患や身体損傷（例えば、アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、がん、内分泌疾患、精神疾患、感染症、外傷など）の治療方法が

50

提供される。当該治療方法は、各種の疾患や身体損傷（例えば、アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、がん、内分泌疾患、精神疾患、感染症、外傷など）の患者に、前記医薬組成物を投与することを含む。当該治療方法において「治療」とは、症状の改善であればよく、重症化の抑制や症状の軽減若しくは緩和もこの用語に包摂される。

【0055】

前記医薬組成物は、副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドと共に用いることができる。両者を共に用いる場合、前記医薬組成物は、グルココルチコイドと同時に投与してもよく、グルココルチコイドの投与前に或いはグルココルチコイドの投与後に投与してもよい。

共に用いられるグルココルチコイドは、天然物の精製物でもよく、人工合成物であるステロイド剤（例えば、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン等）でもよい。

【0056】

前記医薬組成物の使用は、ヒトでの使用に限定されない。ウシ、ウマ、ヒツジ等の家畜や、イヌ、ネコ、サル等のペット等に用いてもよい。

【0057】

前記医薬組成物に含まれるオリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド1、オリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3、オリゴヌクレオチド4、及びオリゴヌクレオチド5からなる群から選択される少なくとも1種が好ましい。

オリゴヌクレオチド1～5は、GRのプレmRNAにおけるエキソン9の特定部位に配列特異的に結合し、SRp30cと前記スプライス要素との結合を選択的に阻害するものと考えられる。そのため、オリゴヌクレオチド1～5の少なくとも1種を有効成分として含む医薬組成物は、生体へ投与しても副作用の懸念が少ない。

【0058】

<発現ベクター>

本発明の発現ベクターは、本発明のオリゴヌクレオチドを含み、本発明のオリゴヌクレオチドの発現に用いられる。前記発現ベクターは、本発明のオリゴヌクレオチド（好ましくはDNA）を一方の鎖に含む二本鎖ヌクレオチド（好ましくは二本鎖DNA）を、任意のベクターに挿入することにより得ることができる。

【0059】

前記二本鎖ヌクレオチドを挿入するためのベクターは、宿主細胞中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（例えば、pUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えば、YEp13、YEp24、YCp50等）などが挙げられ、ファージDNAとしてはファージDNA（例えば、Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、gt10、gt11、ZAP等）が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルス等の動物ウイルス由来のベクター、パキユロウイルスなどの昆虫ウイルス由来のベクターを用いることもできる。

【0060】

オリゴヌクレオチド1を一方の鎖に含む二本鎖ヌクレオチドは、例えば、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から2626～2656番目を鋳型にして、適当な制限酵素部位を含むプライマーを用いて、PCR法により合成できる。

オリゴヌクレオチド2のオリゴヌクレオチドを一方の鎖に含む二本鎖ヌクレオチドは、例えば、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から2796～2829番目を鋳型にして、適当な制限酵素部位を含むプライマーを用いて、PCR法により合成できる。

オリゴヌクレオチド3を一方の鎖に含む二本鎖ヌクレオチドは、例えば、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から2830～2860番目を鋳型にして、適当な制限酵素部位を含むプライマーを用いて、PCR法により合成できる。

オリゴヌクレオチド4を一方の鎖に含む二本鎖ヌクレオチドは、例えば、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から3730～3752番目を鋳型にして、適当な制限酵素

10

20

30

40

50

部位を含むプライマーを用いて、PCR法により合成できる。

オリゴヌクレオチド5を一方の鎖に含む二本鎖ヌクレオチドは、例えば、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から4080~4100番目を鋳型にして、適当な制限酵素部位を含むプライマーを用いて、PCR法により合成できる。

そして、このようにして得た二本鎖ヌクレオチドを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入すれば、前記発現ベクターが得られる。

【実施例】

【0061】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はその趣旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0062】

<実施例1>

[GR及びGRの発現量の検討]

[オリゴヌクレオチドの用意]

細胞内に導入するオリゴヌクレオチドとして、オリゴヌクレオチド1、オリゴヌクレオチド2、オリゴヌクレオチド3、オリゴヌクレオチド4、及びオリゴヌクレオチド5を用意した。これらのオリゴヌクレオチドは、常法の化学合成によって得た。これらの塩基配列を表1に示す。

【0063】

【表1】

オリゴヌクレオチド	塩基配列 (5' → 3')	エキソン9中の対応位置	塩基数	配列番号
1	CTTTCTGGTT TTAACCACAT AACATTCTAT A	2626-2656	31	1
2	AAAAGGGCAC AGCTTCTTTT GCCATTTAAT GAAA	2796-2829	34	2
3	TAAGATGACT TTCTTTTCCC CCACGTATCC T	2830-2860	31	3
4	TTTGTCCCA TTATATAGCA TTT	3730-3752	23	4
5	CAGATTTTT TATTATGATG T	4080-4100	21	5

【0064】

表1において、「エキソン9中の対応位置」とは、ヒトGR遺伝子のエキソン9（塩基数4110）において、各オリゴヌクレオチドに相補的な塩基配列が存在する位置（エキソン9の5'末端側から数えた塩基番号）である。換言すれば、例えば、オリゴヌクレオチド1の塩基配列は、ヒトGR遺伝子のエキソン9の5'末端側から2626~2656番目の塩基配列に相補的な塩基配列である。

【0065】

[細胞の培養]

実験には、ヒトのパーキットリンパ腫由来のRaji細胞（Japan Health Science Foundation製）を用いた。

Raji細胞は、10%牛胎児血清（FBS）（Filtoron製）、100U/mlのペニシリン及び100µg/mlのストレプトマイシンを含むRPMI1640培地（Gibco製）を用いて、37℃/5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で培養し維持した。

【0066】

[オリゴヌクレオチドの細胞内への導入]

2×10<sup>6</sup>個のRaji細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）にて洗浄後、Amacell line Nucleofector Kit V（Lonza製）のトランスフェクション用試薬100µlに懸濁した。オリゴヌクレオチドを300nMの濃度となるように添加した後、速やかにNucleofector I device（Lonza製）を用いて電気穿孔法による細胞内への導入を行なった。

濃度依存性を確かめる実験においては、オリゴヌクレオチドの濃度を5nM、10nM

、50 nM、100 nM、及び500 nMとした。

Raji細胞は、前記培地で24時間培養した後、以降の各種実験に供した。

【0067】

〔GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量の測定〕

オリゴヌクレオチドを導入したRaji細胞における、GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量を、RT-PCR法及びPCR法により測定した。内在性コントロールとしては、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現量を測定した。

Raji細胞はPBSで洗浄した後、FastPure RNA Kit (Takara bio製)を用いてRNAを抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara bio製)を用いて逆転写反応を行なった。得られたcDNAは、Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen製)及び目的遺伝子に特異的なPCR用プライマー(表2にその塩基配列を示す)を用いて増幅した。PCR条件は、初回解離処理を94℃で2分間行ない、解離(94℃、30秒間)、アニーリング(55℃、30秒間)、伸長(72℃、1分間)を35サイクル行なった。さらに最終伸長を72℃で4分間行なった。

【0068】

【表2】

用途	名称	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
GR $\alpha$ 検出用 プライマー	GR $\alpha$ -Fw	CTATGCATGA AGTGGTTGAA AA	6
	GR $\alpha$ -Rv	TTTCAGCTAA CATCTCGGG	7
GR $\beta$ 検出用 プライマー	GR $\beta$ -Fw	GAAGGAAACT CCAGCCAGAA	8
	GR $\beta$ -Rv	CCACATAACA TTTTCATGCA TAGA	9
GAPDH検出用 プライマー	GAPDH-Fw	ATGGCCTTCC GTGTTCTAC	10
	GAPDH-Rv	TGATGTCATC ATACTTGGCA GG	11

【0069】

PCR後、エチジウムブロマイド添加2%アガロースゲルによる二次元電気泳動でDNAを分離し、バンドの輝度をイメージアナライザー Gel Print 2000i/VGA (Genomic Solutions製)によって数値化した。

オリゴヌクレオチド1~5のいずれかを導入したRaji細胞における、GAPDH、GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量を表3に示す。表3中の「GR $\alpha$ /GR $\beta$ の相対値」は、オリゴヌクレオチドを導入していない細胞における「GR $\alpha$ の発現量をGR $\beta$ の発現量で除した値」を1としたときの相対値である。

また、濃度を変えてオリゴヌクレオチド1を導入したRaji細胞における、GAPDH、GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量を表4に示す。

なお、各実験は3回行った。表3及び表4にはその平均を示す。

【0070】

【表 3】

オリゴヌクレオチド	GAPDH	GR $\alpha$	GR $\beta$	GR $\alpha$ / GAPDH	GR $\beta$ / GAPDH	GR $\alpha$ / GR $\beta$ の相対値
—	2927.753	2742.743	4686.844	0.938	1.600	1
1	3033.167	3278.767	4611.084	1.082	1.519	1.213
2	3169.938	3340.440	4641.922	1.054	1.467	1.226
3	3128.467	3177.814	4596.457	1.015	1.471	1.182
4	2991.776	3157.440	4592.806	1.057	1.533	1.173
5	3087.403	3210.228	4516.989	1.041	1.461	1.210

10

【0071】

【表 4】

オリゴヌクレオチド1の添加量[ $\mu$ M]	0	5	10	50	100	500
GAPDH	3199.355	3255.648	3125.355	2754.991	2861.698	2974.113
GR $\alpha$	2838.719	2945.841	2745.770	2992.790	2655.770	2626.527
GR $\beta$	4032.255	3634.619	3284.891	3244.062	3306.770	3117.062
GR $\alpha$ / GAPDH	0.887	0.905	0.879	1.086	0.928	0.883
GR $\beta$ / GAPDH	1.260	1.116	1.051	1.178	1.156	1.048
GR $\alpha$ / GR $\beta$	0.704	0.810	0.836	0.923	0.803	0.843

20

【0072】

表3に明らかなように、オリゴヌクレオチド1～5のいずれかを導入した細胞では、「GR $\alpha$  / GR $\beta$  の相対値」が1.1を超えていた。このことから、これらのオリゴヌクレオチドを細胞内に導入することにより、細胞のグルココルチコイド感受性が上昇する可能性が示唆された。

30

表4に明らかなように、オリゴヌクレオチド1は、濃度依存的にGR $\alpha$  の発現量を低下させた。

【0073】

&lt;実施例2&gt;

〔オリゴヌクレオチド導入細胞のグルココルチコイド感受性の検討〕

〔オリゴヌクレオチド1導入細胞〕

オリゴヌクレオチド1の導入による細胞のグルココルチコイド感受性の変化を検討するため、5-プロモ-2-デオキシウリジン(BrdU)取り込み試験を行い、細胞増殖の定量を行った。グルココルチコイドとしてデキサメサゾン(Biomol製)を使用し、デキサメサゾンの濃度は、0 $\mu$ M(添加なし)、0.1 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、5 $\mu$ M、及び10 $\mu$ Mとした。

40

【0074】

細胞周期を同期化するため、Raji細胞を血清の入っていないRPMI1640培地中で12時間培養した後、血清の入ったRPMI1640培地に再懸濁し96穴プレートに播種した。

デキサメサゾンの添加後22時間培養し、BrdUを添加してさらに2時間培養した。遠心分離した後、上清を捨て、乾燥させ固定した後、ペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体と1時間、室温で反応させた。その後、PBSで3回洗浄し、テトラメチルベンジディ

50



ンを加え、適度な発色が得られた段階で $H_2SO_4$  (1 M) を添加して反応を停止した。よく攪拌した後、プレートリーダーによって450 nmで吸光度を測定した。その結果を表5に示す。

【0075】

デキサメサゾンを追加していないRaji細胞を対照として、前記吸光度の相対比によって細胞増殖抑制率(%)を算出した。その結果を表6及び図1に示す。ここで、統計学的有意差の判定には、一元配置分散分析法及び多重比較法を用いた。多重比較としてはTukey法を使用した。危険率 $P < .05$  (vsオリゴヌクレオチド無添加)を有意な差とした。

なお、各実験は3回行った。表5及び表6にはその平均を示す。

【0076】

【表5】

オリゴヌクレオチドの導入		-					
デキサメサゾン添加量[ $\mu M$ ]		0	0.1	0.5	1	5	10
BrdU 取り込み	平均	0.552	0.475	0.461	0.479	0.422	0.418
	SE	0.015	0.049	0.026	0.064	0.013	0.023
オリゴヌクレオチドの導入		オリゴヌクレオチド1					
デキサメサゾン添加量[ $\mu M$ ]		0	0.1	0.5	1	5	10
BrdU 取り込み	平均	0.556	0.372	0.286	0.292	0.271	0.279
	SE	0.026	0.030	0.013	0.047	0.024	0.005

【0077】

【表6】

オリゴヌクレオチドの導入		-				
デキサメサゾン添加量[ $\mu M$ ]		0.1	0.5	1	5	10
細胞増殖 抑制率	平均[%]	13.445	16.217	12.647	23.343	23.877
	SE	11.108	6.713	13.622	3.532	6.240
オリゴヌクレオチドの導入		オリゴヌクレオチド1				
デキサメサゾン添加量[ $\mu M$ ]		0.1	0.5	1	5	10
細胞増殖 抑制率	平均[%]	32.874	48.364	47.553	50.624	49.526
	SE	5.620	3.005	7.501	6.646	2.988

【0078】

表5、表6及び図1に明らかなように、オリゴヌクレオチド1を導入したRaji細胞では、オリゴヌクレオチドを導入していないRaji細胞に比べて、デキサメサゾンの添加により、BrdUの取り込み量が有意に低下し、また、細胞増殖抑制率が有意に増加し

10

20

30

40

50

た。このことから、オリゴヌクレオチド1を導入することにより、細胞のグルココルチコイド感受性が上昇したことが分る。

したがって、本発明によれば、細胞のグルココルチコイド感受性を上げる活性を有するオリゴヌクレオチドを提供できる。

【0079】

[オリゴヌクレオチド2～5導入細胞]

上記と同様にしてBrdU取り込み試験を行い、オリゴヌクレオチド2～5いずれかの導入による細胞のグルココルチコイド感受性の変化を検討した。細胞増殖抑制率(%)を表7及び図2～図5に示す。なお、各実験は4回行い、表7にはその平均を示す。

【0080】

【表7】

オリゴヌクレオチドの導入		—			
デキサメサゾン添加量[ $\mu$ M]		0.1	0.5	1	5
細胞増殖抑制率	平均[%]	13.184	17.615	22.210	21.718
	SE	3.691	5.538	3.414	3.052
オリゴヌクレオチドの導入		オリゴヌクレオチド2			
デキサメサゾン添加量[ $\mu$ M]		0.1	0.5	1	5
細胞増殖抑制率	平均[%]	10.541	19.044	22.769	36.402
	SE	5.440	4.688	4.165	7.216
オリゴヌクレオチドの導入		オリゴヌクレオチド3			
デキサメサゾン添加量[ $\mu$ M]		0.1	0.5	1	5
細胞増殖抑制率	平均[%]	16.924	34.134	37.164	48.256
	SE	5.330	3.814	3.389	5.871
オリゴヌクレオチドの導入		オリゴヌクレオチド4			
デキサメサゾン添加量[ $\mu$ M]		0.1	0.5	1	5
細胞増殖抑制率	平均[%]	12.464	23.397	28.863	28.061
	SE	8.029	5.302	7.617	5.887
オリゴヌクレオチドの導入		オリゴヌクレオチド5			
デキサメサゾン添加量[ $\mu$ M]		0.1	0.5	1	5
細胞増殖抑制率	平均[%]	29.842	26.632	32.895	36.053
	SE	2.049	3.688	2.101	1.926

【0081】

表7及び図2～図5に明らかなように、オリゴヌクレオチド2～5のいずれかを導入したRaji細胞では、オリゴヌクレオチドを導入していないRaji細胞に比べて、デキ

10

20

30

40

50

サメサゾンによる細胞増殖抑制率が有意に増加した。このことから、オリゴヌクレオチド 2 ~ 5 のいずれかを導入することにより、細胞のグルココルチコイド感受性が上昇したことが分る。

したがって、本発明によれば、細胞のグルココルチコイド感受性を上げる活性を有するオリゴヌクレオチドを提供できる。

【 0 0 8 2 】

< 実施例 3 >

〔エストロゲン受容体の発現量の検討〕

エストロゲン受容体 (ER) には 2 つのスプライシングバリエーション、ER $\alpha$  と ER $\beta$  が存在する。ER の mRNA のスプライシング制御に、SRP30c が関与することが知られている。

オリゴヌクレオチド 1 を導入した Raji 細胞における、ER $\alpha$  及び ER $\beta$  の発現量を、RT-PCR 法及び PCR 法により測定した。

【 0 0 8 3 】

実施例 1 における [細胞の培養] 及び [オリゴヌクレオチドの細胞内への導入] と同様にして、オリゴヌクレオチド 1 を導入した Raji 細胞を得た。なお、オリゴヌクレオチド 1 の細胞内への導入時の濃度は、300 nM とした。

【 0 0 8 4 】

〔エストロゲン受容体の発現量の測定〕

Raji 細胞は PBS で洗浄した後、FastPure RNA Kit (Takara bio 製) を用いて RNA を抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara bio 製) を用いて逆転写反応を行なった。得られた cDNA は、Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen 製) 及び目的遺伝子に特異的な PCR 用プライマー (表 8 にその塩基配列を示す) を用いて増幅した。PCR 条件は、初回解離処理を 94 °C で 2 分間行ない、解離 (94 °C、30 秒間)、アニーリング (55 °C、30 秒間)、伸長 (72 °C、1 分間) を 35 サイクル行なった。さらに最終伸長を 72 °C で 4 分間行なった。

内在性コントロールとして、配列番号 10 及び 11 の PCR プライマーを用いて GAPDH の発現量を測定した。

【 0 0 8 5 】

【表 8】

用途	名称	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
ER $\alpha$ 検出用 プライマー	ER $\alpha$ -Fw	CCTACTACCT GGAGAACGAG	12
	ER $\alpha$ -Rv	CTCTTCGGTC TTTTCGTATG	13
ER $\beta$ 検出用 プライマー	ER $\beta$ -Fw	AAAAGAATCA TTCAATGACA	14
	ER $\beta$ -Rv	ATTAACACCT CCATCCAACA	15

【 0 0 8 6 】

PCR 後、エチジウムブロマイド添加 2 % アガロースゲルによる二次元電気泳動で DNA を分離し、バンドの輝度をイメージアナライザー Gel Print 2000i/VGA (Genomic Solutions 製) によって数値化した。

オリゴヌクレオチド 1 を導入した Raji 細胞における、GAPDH、ER $\alpha$  及び ER $\beta$  の発現量を表 9 に示す。表 9 中の「ER $\alpha$  / ER $\beta$  の相対値」は、オリゴヌクレオチドを導入していない細胞における「ER $\alpha$  の発現量を ER $\beta$  の発現量で除した値」を 1 としたときの相対値である。

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

【表 9】

オリゴヌクレオチド	GAPDH	ER $\alpha$	ER $\beta$	ER $\alpha$ / GAPDH	ER $\beta$ / GAPDH	ER $\alpha$ / ER $\beta$	ER $\alpha$ / ER $\beta$ の相対値
—	2832.941	2152.648	1271.527	0.760	0.449	1.693	1
1	2476.113	2201.941	1299.820	0.889	0.525	1.694	1.001

## 【0088】

10

表 9 に明らかなように、オリゴヌクレオチド 1 を導入しても、「ER $\alpha$  / ER $\beta$  の相対値」がほぼ 1 であった。このことから、オリゴヌクレオチド 1 を細胞に導入しても、ER の mRNA のスプライシング制御に影響を及ぼさないことが分る。

## 【0089】

< 実施例 4 >

〔オリゴヌクレオチドの抗腫瘍効果の検討〕

〔オリゴヌクレオチド 4 発現用ベクターの作製〕

オリゴヌクレオチド 4 をベクターへ挿入するため、表 10 に示すオリゴヌクレオチドを用意した。

## 【0090】

20

## 【表 10】

用途	名称	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
ベクターへの挿入	ON4-Sense	GATCCATTTG TCCCATTAT ATAGCATTTT TTG	16
	ON4-Antisense	AATTCAAAAA ATGCTATATA ATGGGGACAA ATG	17

## 【0091】

30

上記の 2 種類のオリゴヌクレオチド、ON4-Sense 及び ON4-Antisense をそれぞれ 50  $\mu$ M となるように混和し、アニーリング処理 (95 $^{\circ}$  で 30 秒、続いて 72 $^{\circ}$  で 2 分間、続いて 37 $^{\circ}$  で 2 分間、続いて 25 $^{\circ}$  で 2 分間) を行い、二本鎖 DNA を作製した。この二本鎖 DNA を以降の実験に使用するまで -20 $^{\circ}$  で保管した。

## 【0092】

RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen vector (Takara bio 製) と上記二本鎖 DNA を混和し、Ligation kit (Takara bio 製) を用いてライゲーションを行った。同様に、キットに付属のコントロール DNA も RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen vector とのライゲーションを行い、陰性コントロール用のベクターとした。

表 11 に示すプライマーを用いて PCR を行い、上記ベクターと二本鎖 DNA がライゲーションされ環状プラスミド (プラスミドベクター) が作製されたことを確認した。

40

## 【0093】

## 【表 11】

用途	名称	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
PCR用プライマー	ON4-Fw	ATGGACTATC ATATGCTTAC CGTA	18
	ON4-Rv	TAATGACCCC GTAATTGATT	19

## 【0094】

50

上記で得たプラスミドベクターをHIT competent cells HIT-DH5a (RBC Bioscience製) と混和し、4 で5分間保持した後、寒天培地に播種し、37 で18時間の培養を行った。

発生した大腸菌コロニーを採取し、表11に示すプライマーを用いてPCRを行い、プラスミドベクターが大腸菌に導入されていることを確認した。

【0095】

上記プラスミドベクターを導入した大腸菌を液体培地に播種し、37 で16時間の培養を行った後、Endofree plasmid purification kit (Qiagen製)を用いてプラスミドベクターを抽出した。表11に示すプライマーを用いてPCRを行い、目的のプラスミドベクターが抽出されたことを確認した。

10

【0096】

上記プラスミドベクターとpCMV-VSV-G envelope vector (Cell Biolabs製)をFuGene HD transfection reagent (Roche製)を用いてPlatinum-GP retroviral packaging cell line (Cell Biolabs製)に導入し、レトロウイルスベクターを作製した。このレトロウイルスベクターを含む培養上清を回収しフィルトレーション後、-20 で保管した。

【0097】

[オリゴヌクレオチド4発現Raji細胞の作製]

上記培養上清を含む培地でRaji細胞を48時間培養し、レトロウイルスベクターをRaji細胞に感染させ、オリゴヌクレオチド4を恒常的に発現するRaji細胞(この細胞は、蛍光タンパク質ZsGreenによって標識されている。)を作製した。

20

そして、ZsGreen陽性細胞をFACSソーティングにより分取した。

【0098】

[GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量の測定]

実施例1における[GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量の測定]と同様にして、オリゴヌクレオチド4発現Raji細胞における、GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量を測定した。内在性コントロールとしては、GAPDHの発現量を測定した。

GAPDH、GR $\alpha$ 及びGR $\beta$ の発現量を表12に示す。表12中の「GR $\alpha$ /GR $\beta$ の相対値」は、コントロールRaji細胞における「GR $\alpha$ の発現量をGR $\beta$ の発現量で除した値」を1としたときの相対値である。なお、実験は3回行い、表12にはその平均を示す。

30

【0099】

【表12】

細胞種	GAPDH	GR $\alpha$	GR $\beta$	GR $\alpha$ /GAPDH	GR $\beta$ /GAPDH	GR $\alpha$ /GR $\beta$ の相対値
コントロールRaji細胞	6748.018	2309.506	4552.624	0.342	0.675	1
オリゴヌクレオチド4発現Raji細胞	6428.135	4803.456	1866.325	0.747	0.290	5.074

40

【0100】

表12に明らかなように、オリゴヌクレオチド4を恒常的に発現させると、GR $\alpha$ の発現量が増加し、GR $\beta$ の発現量が減少することが確認された。

【0101】

[グルココルチコイド感受性の検討]

オリゴヌクレオチド4発現Raji細胞のグルココルチコイド感受性を検討するため、実施例2と同様にしてBrdU取り込み試験を行い、細胞増殖の定量を行った。デキサメサゾンの濃度は、0 $\mu$ M(添加なし)及び5 $\mu$ Mとした。吸光度の測定結果を表13に示

50

す。なお、各実験は3回行い、表13にはその平均を示す。

【0102】

【表13】

細胞種		コントロールRaji細胞		オリゴヌクレオチド4 発現Raji細胞	
デキサメサゾン 添加量[ $\mu$ M]		0	5	0	5
BrdU 取り込み	平均	1.14	1.07	1.13	0.58
	SE	0.04	0.05	0.01	0.08

10

【0103】

表13に明らかなように、オリゴヌクレオチド4発現Raji細胞では、コントロールRaji細胞に比べて、デキサメサゾンの添加によりBrdUの取り込み量が有意に低下した。このことから、オリゴヌクレオチド4の恒常的な発現により、グルココルチコイド感受性が高まることが確認された。

【0104】

20

[in vivo 試験]

6週齢のSCIDマウス( $n=10$ )に、オリゴヌクレオチド4発現Raji細胞及びコントロールRaji細胞をそれぞれ $1 \times 10^7$ 細胞/匹、腹腔内に接種し、デキサメサゾン15mg/kgを毎日、腹腔内投与して観察した。生存率(%)を表14に示し、生存曲線を図6に示す。

【0105】

【表 1 4】

日 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
コントロール Raji細胞	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
コントロール Raji細胞 +デキサメサゾン	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞 +デキサメサゾン	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
日 数	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
コントロール Raji細胞	100	100	100	100	100	100	90	90	80	80	80	80
コントロール Raji細胞 +デキサメサゾン	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	80	80
オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞	100	100	100	100	100	100	100	100	90	80	80	70
オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞 +デキサメサゾン	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
日 数	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
コントロール Raji細胞	70	70	70	50	50	50	50	40	40	40	40	40
コントロール Raji細胞 +デキサメサゾン	80	80	70	60	60	60	60	60	60	60	60	50
オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞	70	60	60	50	50	50	50	50	50	50	40	40
オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞 +デキサメサゾン	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90

10

20

30

40

## 【 0 1 0 6】

表 1 4 及び図 6 に明らかなように、コントロール R a j i 細胞を接種したマウスと、オリゴヌクレオチド 4 発現 R a j i 細胞を接種したマウスとは、同程度の致死率であった。コントロール R a j i 細胞を接種したマウスにデキサメサゾン投与しても、マウスの生存率を上昇させなかったが、オリゴヌクレオチド 4 発現 R a j i 細胞を接種したマウスにデキサメサゾン投与すると、マウスの生存率を顕著に上昇させた。

## 【 0 1 0 7】

50

## &lt; 実施例 5 &gt;

## 〔オリゴヌクレオチドのブロック活性の検討〕

オリゴヌクレオチド 4 によって SRp30c と GR の プレ mRNA との結合が阻害されていることを確認するため、RNA クロマチン免疫沈降反応を行った。

## 【0108】

## 〔RNA クロマチン免疫沈降反応〕

オリゴヌクレオチド 4 発現 Raji 細胞及びコントロール Raji 細胞を 1%ホルムアルデヒドで固定し、核酸とタンパク質をクロスリンケージさせた。

各細胞を洗浄後、RNA ChIP-IT kit (Active motif 製) を用いて、細胞の溶解、DNase 処理、及び抗 RNase 処理を行い、抗 SRp30c 抗体と protein G magnetic beads (以下「ビーズ」) で免疫沈降反応 (4 で 4 時間の反応) を行った。 10

続いて、ビーズを回収し洗浄し、脱クロスリンケージ処理を行った。

表 15 に示すプライマーを使用し、RT-PCR 法及び PCR 法により、SRp30c と結合していた GR の プレ mRNA を検出した。PCR 条件は、初回解離処理を 94 で 2 分間行ない、解離 (94、30 秒間)、アニーリング (55、30 秒間)、伸長 (72、1 分間) を 35 サイクル行なった。さらに最終伸長を 72 で 4 分間行なった。

なお、表 15 に示すプライマーは、GR の プレ mRNA の一部であって、ヒト GR 遺伝子の塩基番号 152873 ~ 153556 に対応する部位を増幅するように設計した。

## 【0109】

## 【表 15】

20

用途	名称	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
PCR用 プライマー	Pre-mRNA-Fw	GAGGGAAGGA AACTCCAGCC AGAA	20
	Pre-mRNA-Rv	TTTCAGCTAA CATCTCGGGG	21

## 【0110】

PCR 後、エチジウムブロマイド添加 2% アガロースゲルによる二次元電気泳動で DNA を分離し、バンドの輝度をイメージアナライザー Gel Print 2000i/VGA (Genomic Solutions 製) によって数値化した。陽性コントロールの輝度を 1 としたときの相対値を表 1 30 6 に示す。なお、実験は 3 回を行い、表 16 にはその平均を示す。

## 【0111】

## 【表 16】

	陽性コントロール	コントロール Raji細胞	オリゴヌクレ オチド4発現 Raji細胞
平均	1	1.156	0.398
SE	0	0.130	0.124

40

## 【0112】

表 16 に明らかなように、オリゴヌクレオチド 4 発現 Raji 細胞からの抽出物においては、SRp30c と結合していた GR の プレ mRNA の量が有意に低かった。オリゴヌクレオチド 4 発現 Raji 細胞においては、SRp30c と GR の プレ mRNA の結合が阻害されていることが確認された。

## 【0113】

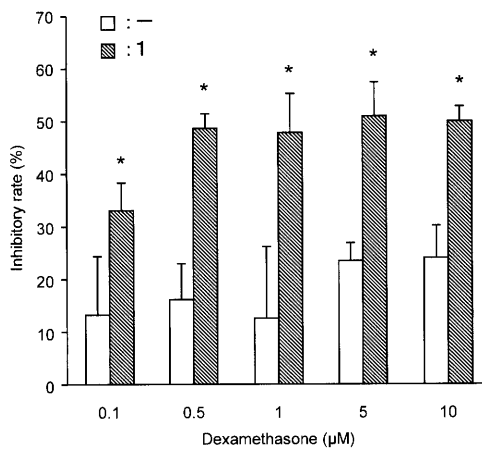
2011年12月15日に出願の日本国出願番号第2011-274897号の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願 50

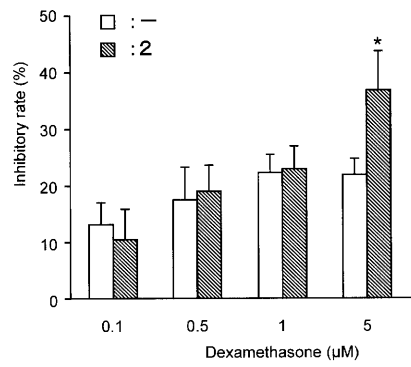


、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

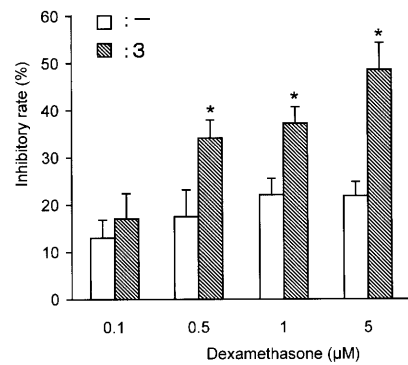
【 図 1 】



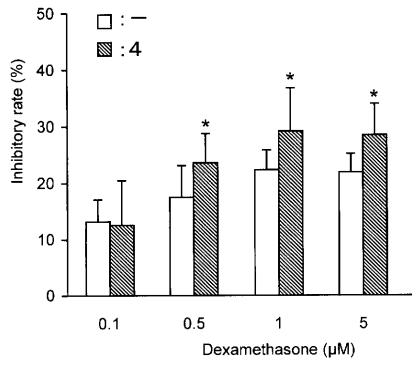
【 図 2 】



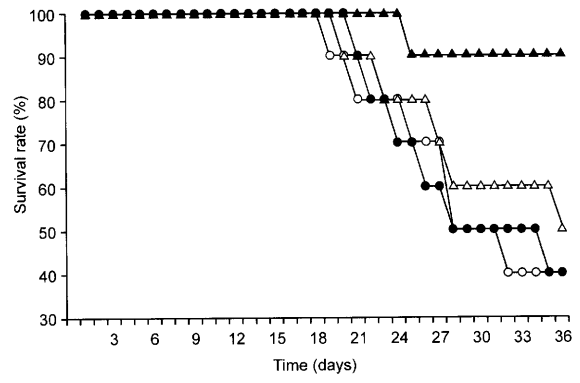
【 図 3 】



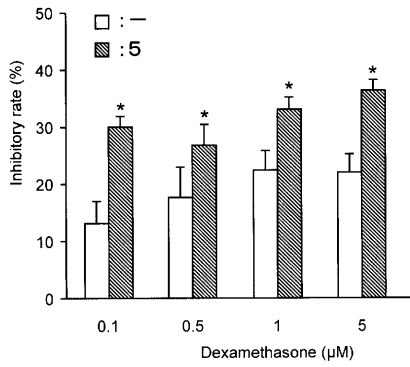
【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 5 】



- Control Raji cell
- △ Control Raji cell + Dexamethasone
- Oligonucleotide 4 expressing cell
- ▲ Oligonucleotide 4 expressing cell + Dexamethasone

【 配列表 】

2013088853000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078245

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/113, A61K31/7088, A61P29/00, A61P35/02, A61P37/06, A61P37/08, C12N15/09  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>	<b>Relevant to claim No.</b>
<u>Y</u> A	XU Q. et al., 'Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils', J Biol Chem, 2003, Vol. 278, No.29, p.27112-27118	<u>1-3, 5-7</u> 4
<u>Y</u> A	PARADIS C. et al., 'hnRNP I/PTB can antagonize the splicing repressor activity of SRp30c', RNA, 2007, Vol.13, No.8, p.1287-1300	<u>1-3, 5-7</u> 4
<u>Y</u> A	WANG Y. et al., 'Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1', J Biol Chem, 2005, Vol.280, No.14, p.14230-14239	1-3, 5-7 4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 03 December, 2012 (03.12.12)		Date of mailing of the international search report 11 December, 2012 (11.12.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078245

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

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-508527 A (Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development L.L.C.), 05 March 2009 (05.03.2009), & US 2007/0066557 A1 & US 2010/0222412 A1 & EP 1941040 A & EP 2368988 A1 & WO 2007/035759 A1	1-7
A	JP 2005-525829 A (Pharmacia Corp.), 02 September 2005 (02.09.2005), & EP 1534728 A & WO 2003/099215 A2	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/078245	
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, A61K31/7088(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(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, A61K31/7088, A61P29/00, A61P35/02, A61P37/06, A61P37/08, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed			
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 A	XU Q. et al., 'Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils', J Biol Chem, 2003, Vol. 278, No. 29, p. 27112-27118	1-3, 5-7 4	
Y A	PARADIS C. et al., 'hnRNP I/PTB can antagonize the splicing repressor activity of SRp30c', RNA, 2007, Vol. 13, No. 8, p. 1287-1300	1-3, 5-7 4	
<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		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 03.12.2012		国際調査報告の発送日 11.12.2012	
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) 伊藤 良子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3644

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 8 2 4 5
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 A	WANG Y. et al., 'Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1', J Biol Chem, 2005, Vol.280, No.14, p.14230-14239	1-3, 5-7 4
A	JP 2009-508527 A (ジョンソン・アンド・ジョンソン・ファーマシユーチカル・リサーチ・アンド・デベロップメント・エルエルシー) 2009.03.05, & US 2007/0066557 A1 & US 2010/0222412 A1 & EP 1941040 A & EP 2368988 A1 & WO 2007/035759 A1	1-7
A	JP 2005-525829 A (ファルマシア・コーポレーション) 2005.09.02, & EP 1534728 A & WO 2003/099215 A2	1-7

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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, 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

(72) 発明者 松田 彬

東京都府中市晴見町 3 - 8 - 1 国立大学法人東京農工大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA12 DA03 EA04 HA17

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZB08 ZB11 ZB13 ZB26 ZB27

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。