明　細　書

発明の名称 ： マイクロRNAを用いた心筋細胞の増殖方法

技術分野

[0001] 本発明は、マイクロRNAを用いた心筋細胞の増殖方法、心臓疾患治療用ベクター及び心臓疾患治療用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 成体における心筋細胞は、細胞分裂能を失っているため、虚血や心筋炎等の各種ストレスに曝されることにより一旦壊死又は喪失すると、補充されることがない。その結果、残存する心筋細胞は代償性に肥大することにより、心機能を保とうとするが、その状態が持続し、心筋組織の許容範囲を超えてしまうと、更なる心筋細胞の疲弊や死滅が起こり、最終的には心筋機能の低下、即ち心不全を呈するようになる。

[0003] 心不全をはじめとする心臓疾患は、日本国の死亡原因の第2位となっている。また、心臓疾患患者の予後は極めて悪く、5年生存率は50%程度に過ぎない。そのため、有効な心不全治療法の開発は、医療福祉並びに医療経済の観点から、極めて有益であるものと考えられる。

[0004] これまで心不全治療薬としては、心筋の収縮力を増加させるジギタリス製剤やキサンチン製剤等の強心剤が使用されてきたが、これらの薬剤を長期投与すると、むしろ病態を悪化させる場合もあることが知られている。また、最近では、β遮断薬やACE阻害薬等、交感神経系やレニン－アンジオテンシン系の亢進による過剰な心臓負荷を軽減する薬剤による治療が主流になってきているが、これらは対症的治療法に過ぎず、傷害を受けた心組織そのものを回復させるものではない。

[0005] 一方、心臓移植は重症心不全に対する根本的な治療法であるが、臓器提供者の不足や医療倫理、患者の肉体的又は経済的負担の重さ等の問題から、一般的な治療法として本法を用いることは難しい。

[0006] マイクロRNA（以下「miRNA」という）は、細胞内に存在する長さ21～25塩

基の非コードRNAである。線虫から哺乳類まで幅広く保存されており、生体内の様々な遺伝子の発現調節において重要な役割を担っている分子として近年注目されている。

[0007] miRNAは、ゲノムDNA上に存在するmiRNA遺伝子から、まず数百～数千塩基程度のmiRNA一次転写産物（pri-miRNA）として転写される。次いで、核内でDroshaと呼ばれるRNase III酵素によってプロセシングされ、約70塩基程度のヘアピン構造を有する前駆体miRNA（pre-miRNA）となる。その後Exportin-5によって核から細胞質に輸送され、Dicerと呼ばれるRNase III酵素によってプロセシングを受けて、21～25塩基の二本鎖の成熟型miRNA（mature miRNA）となる。成熟型miRNAは、そのうちの一本鎖がRNA誘導性抑制複合体（RISC）と呼ばれるタンパク質と複合体を形成し、相補的配列を持つ標的遺伝子のmRNAに結合し、標的遺伝子の発現を抑制することが知られている（非特許文献1、2）。

[0008] miRNAは1つの生物種あたり1000種類程度存在していると推測され、それぞれが複数の標的遺伝子の発現を調節し、タンパク質をコードする遺伝子全体の約1/3を制御していると言われている（非特許文献3）。また、miRNAは発生、分化、ウイルス感染の際の生体反応等に関与することが明らかになってきており、ヒトの疾患との関連も示唆されている。特に癌とmiRNAの関係に関しては、正常組織と癌組織で発現様式が異なるmiRNAが多く存在することから、発癌過程へのmiRNAの関与が強く示唆されており、発癌を促進するmiRNA、腫瘍を抑制するmiRNAの両方の存在が報告されている（非特許文献4、5、6）。

[0009] また、心臓疾患関連としては、正常心臓と病態心臓におけるmiRNAの発現プロファイル解析が多くの研究グループによって報告されている。その一部は具体的な機能も解析されており、例えば、心肥大ではmiR-195の発現が増加しており、当該miRNAを強制発現させたトランスジェニックマウスでは、心臓が肥大し、拡張型心筋症や心不全を引き起こすこと（特許文献1、非特許文献7）、また、心肥大で発現が減少しているmiRNAであるmiR-1は心筋細胞の増殖を抑制すること（特許文献2、非特許文献8）等が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：WO2009/062169

特許文献2：WO2006/107826

非特許文献

[0011] 非特許文献1：He & Hannon, Nature Reviews Genetics, 5: 522-531, (2004)

非特許文献2：Bartel, Cell, 116:281-297, (2004)

非特許文献3：Berezikov et al., Cell, 120:21-24, (2005)

非特許文献4：Esquela-Kerscher & Slack, Nature Reviews Cancer, 6:259-269, (2006)

非特許文献5：Kent & Mendell, Oncogene, 25:6188-6196, (2006)

非特許文献6：Zhang et al., Developmental Biology, 302:1-12, (2007)

非特許文献7：van Rooij et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103:18255-18260, (2006)

非特許文献8：Zhao et al., Cell, 129: 303-317, (2007)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、心筋細胞の増殖を促進するmiRNAを同定し、当該miRNAを用いた心筋細胞の増殖方法、心臓疾患治療用ベクター及び心臓疾患治療用医薬組成物等を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0013] 上記課題を解決するために、本発明者らは、心筋細胞の増殖を調節する因子としてマイクロRNA（以下「miRNA」という）に着目して研究を行い、心筋細胞の増殖を調節するmiRNAに関する解析を行った。そして、鋭意研究の結果、本発明者らは、心筋細胞の増殖を調節する複数のmiRNAを特定することに成功し、本発明を完成するに到った。

[0014] 本発明の第1の態様として、本発明者らは、心筋細胞の増殖促進作用を有す

るmiRNAを提供する。より具体的には、本発明のmiRNAには、以下の態様が含まれる：

（1-1）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNA。

（1-2）miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（1-1）に記載のmiRNA。

（1-3）miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、上記（1-1）又は（1-2）に記載のmiRNA。

（1-4）SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（1-3）に記載のmiRNA。

（1-5）SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（1-3）に記載のmiRNA。

[0015] 本発明の第2の態様として、本発明者らは、（a）上述した心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を使用して、心臓疾患を治療するための医薬組成物、（b）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、個体の心臓の障害部位に導入することにより、当該部位において心筋細胞を増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法、（c）心臓疾患の治療のための医薬の製造のための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸の使用、又は（d）心臓疾患の治療において使用するための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸、として記載することができる、心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAの医薬用途についての発明を提供する。本発明において「miRNAを規定する核酸」という場合、（i）成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質、又は（ii）成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質を生体内又は細胞内において発現させるための発現ベクターのことをいう。

[0016] 上述した態様のうち（a）の医薬組成物の発明に関して、より具体的には、このような医薬組成物には、以下の態様が含まれる：

（2-a-1）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を含む、心臓疾患治療用医薬組成物。

（2-a-2）miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-a-1）に記載の医薬組成物。

（2-a-3）miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、上記（2-a-1）又は（2-a-2）に記載の医薬組成物。

（2-a-4）SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-a-3）に記載の医薬組成物。

（2-a-5）SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-a-3）に記載の医薬組成物。

（2-a-6）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、心筋細胞に導入及び発現させるための発現ベクター又はリポソームとして含む、上記（2-a-1）～（2-a-5）のいずれか１項に記載の医薬組成物。

（2-a-7）ベクターが、ウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターである、上記（2-a-6）に記載の医薬組成物。

（2-a-8）ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；別名、センダイウイルス）ベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ニワトリポックスウイルスベクター、パポバウイルスベクターから選択されるものである、上記（2-a-7）に記載の医薬組成物。

（2-a-9）miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む

、miRNA誘導体である、上記（2-a-1）～（2-a-8）のいずれか１項に記載の医薬組成物。

（2-a-10）心臓疾患が、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎又は慢性心不全である、上記（2- a-1）～（2-a-9）のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[0017] また、上述した態様のうち（b）の治療方法の発明に関して、より具体的には、このような治療方法には、以下の態様が含まれる：

（2-b-1）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、個体の心臓の障害部位に導入することにより、当該部位において心筋細胞を増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法。

（2-b-2）miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-b-1）に記載の治療方法。

（2-b-3）miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、上記（2-b-1）又は（2-b-2）に記載の治療方法。

（2-b-4）SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-b-3）に記載の治療方法。

（2-b-5）SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-b-3）に記載の治療方法。

（2-b-6）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸の、個体の心臓の障害部位への導入を発現ベクター又はリポソームにより行う、上記（2-b-1）～（2-b-5）のいずれか１項に記載の治療方法。

（2-b-7）ベクターが、ウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターである、上記（2-b-6）に記載の治療方法。

（2-b-8）ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイル

ス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；別名、センダイウイルス）ベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ニワトリポックスウイルスベクター、パポバウイルスベクターから選択されるものである、上記（2-b-7）に記載の治療方法。

（2-b-9）miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む、miRNA誘導体である、上記（2-b-1）～（2-b-8）のいずれか１項に記載の治療方法。

（2-b-10）心臓疾患が、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎又は慢性心不全である、上記（2-b-1）～（2-b-9）のいずれか１項に記載の治療方法。

[0018] また、上述した態様のうち（c）の使用の発明に関して、より具体的には、このような使用には、以下の態様が含まれる：

（2-c-1）心臓疾患治療用医薬組成物の製造のための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸の使用。

（2-c-2）miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-c-1）に記載の使用。

（2-c-3）miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、上記（2-c-1）又は（2-c-2）に記載の使用。

（2-c-4）SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-c-3）に記載の使用。

（2-c-5）SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-c-3）に記載の使用。

（2-c-6）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、心筋細

胞に導入及び発現させるための発現ベクター又はリポソームとして含む、上記（2-c-1）～（2-c-5）のいずれか１項に記載の使用。

（2-c-7）ベクターが、ウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターである、上記（2-c-6）に記載の使用。

（2-c-8）ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；別名、センダイウイルス）ベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ニワトリポックスウイルスベクター、パポバウイルスベクターから選択されるものである、上記（2-c-7）に記載の使用。

（2-c-9）miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む、miRNA誘導体である、上記（2-c-1）～（2-c-8）のいずれか１項に記載の使用。

（2-c-10）心臓疾患が、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎又は慢性心不全である、上記（2- c-1）～（2-c-9）のいずれか１項に記載の使用。

[0019] 更に、上述した態様のうち（d）の核酸の発明に関して、より具体的には、このような核酸には、以下の態様が含まれる：

（2-d-1）心臓疾患の治療において使用するための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸。

（2-d-2）miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-d-1）に記載の核酸。

（2-d-3）miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、上記（2-d-1）又は（2-d-2）に記載の核酸。

（2-d-4）SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物

質である、上記（2-d-3）に記載の核酸。

（2-d-5）SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（2-d-3）に記載の核酸。

（2-d-6）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、心筋細胞に導入及び発現させるための発現ベクター又はリポソームとして含む、上記（2-d-1）～（2-d-5）のいずれか１項に記載の核酸。

（2-d-7）ベクターが、ウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターである、上記（2-d-6）に記載の核酸。

（2-d-8）ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；別名、センダイウイルス）ベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ニワトリポックスウイルスベクター、パポバウイルスベクターから選択されるものである、上記（2-d-7）に記載の核酸。

（2-d-9）miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む、miRNA誘導体である、上記（2-d-1）～（2-d-8）のいずれか１項に記載の核酸。

（2-d-10）心臓疾患が、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎又は慢性心不全である、上記（2- d-1）～（2-d-9）のいずれか１項に記載の核酸。

[0020] 本発明の第3の態様として、本発明者らは、上述した心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を使用した、心筋細胞の増殖方法を提供する。より具体的には、このような心筋細胞の増殖方法には、以下の態様が含まれる：

（3-1）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、心筋細胞に導入して発現させることを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

（3-2）miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異

体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（3-1）に記載の方法。

（3-3）miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、上記（3-1）又は（3-2）に記載の方法。

（3-4）SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（3-3）に記載の方法。

（3-5）SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、上記（3-3）に記載の方法。

（3-6）心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、発現ベクター又はリポソームを用いて心筋細胞へ導入することを含む、上記（3-1）～（3-5）のいずれか1項に記載の方法。

（3-7）ベクターが、ウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターである、上記（3-6）に記載の方法。

（3-8）ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；別名、センダイウイルス）ベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ニワトリポックスウイルスベクター、パポバウイルスベクターから選択されるものである、上記（3-7）に記載の方法。

（3-9）miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む、miRNA誘導体である、上記（3-1）～（3-8）のいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

[0021] 本発明に係るmiRNAを用いることにより、心筋細胞の増殖方法、心臓疾患治療用ベクター及び心臓疾患治療用医薬組成物を提供することができる。本発明に係る心筋細胞の増殖方法を用いれば、従来法よりも効率的に心筋細胞の

細胞分裂を誘導し、細胞を増殖させることができ、当該方法により作製された心筋細胞は、各種薬剤のスクリーニング用及び移植治療用の細胞として利用することができる。また、当該方法を遺伝子治療に応用することにより、心筋細胞の壊死や欠失等に起因する心臓疾患の再生医療的治療の可能性が得られた。本発明に係るmiRNAは、心筋細胞に対して顕著に増殖活性を示すことが明らかになった。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]図1は、実施例2において、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、miR-373（SEQ ID NO: 9）をトランスフェクションした初代培養心筋細胞におけるKi67陽性心筋細胞率を示す図である。Ki67は、細胞核タンパク質であり、増殖細胞を検出するためのマーカーとして用いらるタンパク質である。

[図2]図2は、実施例3において、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、miR-373（SEQ ID NO: 9）を発現する組換えアデノウイルスを感染させた初代培養心筋細胞におけるKi67陽性心筋細胞率を示す図である。Noneは未処理を示す。

[図3-1]図3-1は、実施例4において、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、miR-373（SEQ ID NO: 9）をトランスフェクションした初代培養心筋細胞におけるリン酸化ヒストンH3（H3P）陽性心筋細胞率を示す図である。

[図3-2]図3-2は、実施例4において、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、miR-373（SEQ ID NO: 9）を発現する組換えアデノウイルスを感染させた初代培養心筋細胞におけるH3P陽性心筋細胞率を示す図である。Noneは未処理を示す。

[図3-3]図3-3は、実施例4において、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、miR-373（SEQ ID NO: 9）を発現する組換えアデノウイルスを感染させた初代培養心筋細胞を抗H3P抗体、抗TroponinT抗体、DAPIで免疫染色した細胞の顕微鏡写真である。H3P:緑、TroponinT:赤、DAPI:青

[図4]図4は、実施例5において、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、miR-373（SEQ ID NO: 9）を発現する組換えアデノウイルスを生体内においてラット心臓に感染させた心臓組織切片におけるKi67陽性心筋細胞率を示す図である。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明の実施において、分子生物学、微生物学、細胞生物学及び組換えDNA技術等の一般的方法及び従来技術について、当業者は、特に示されなければ、当該分野の標準的な参考書籍を参照し得る。これらには、例えば、Molecular Cloning：A Laboratory Manual 第3版（Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）；Current Protocols in Molecular biology（Ausubelら編、John Wiley & Sons, 1987）；Methods in Enzymologyシリーズ（Academic Press）；PCR Protocols: Methods in Molecular Biology（Bartlett & Striling編、Humana Press, 2003）；Animal Cell Culture: A Practical Approach 第3版（Masters編、Oxford University Press, 2000）；Antiboides：A Laboratory Manual（Harlowら & Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987）を参照できる。また、本明細書において参照される細胞培養、細胞生物学実験のための試薬及びキット類は市販されており（Sigma社、Aldrich社、Invitrogen/GIBCO社、Clontech社、Stratagene社等から）容易に入手することができる。

[0024] 本発明は、第1の態様として、心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを提供する。

[0025] 本発明は、第2の態様として、上述した心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を使用して、心臓疾患を治療するための医薬組成物；心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、個体の心臓の障害部位に導入することにより、当該部位において心筋細胞を増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法；心臓疾患治療用医薬組成物の製造のための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸の使用；そして心臓疾患の治療において使用するための、心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定

する核酸；もまた提供する。

[0026] 本発明は、第3の態様として、上述した心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を使用した、心筋細胞の増殖方法を提供する。

[0027] 心筋細胞

本発明に係る方法を用いて増殖させる対象とする心筋細胞は、一般に、成体型心筋細胞、幼体型心筋細胞、並びに胎児型心筋細胞のすべての発生段階の心筋細胞を含んでもよい。そして、本発明においては、哺乳動物の心臓組織内に存在する心筋細胞を直接の対象とすることができるが、本発明の第1の態様及び第3の態様においては、生体外の培養心筋細胞等を使用することもできる。

[0028] 本発明において、生体外の培養心筋細胞としては、どのような供給源由来の心筋細胞であっても使用することができ、例えば、生体心臓組織から酵素処理等の種々の方法により分離した心筋細胞、又はそれを適当な培養条件下で1～5日間程度培養した初代培養細胞も用いることができる。具体的な心筋細胞の培養法は数多くの参考文献に記載されているが、代表的な方法としては、Chienの方法及びその変法（Chien et al., The Journal of Clinical Investigation, 75:1770-1780, (1985)；Meidell et al., American Journal of Physiology, 251:H1076-H1084, (1986)；Tamamori et al., American Journal of Physiology, 275:H2036-H2040, (1998)）等を使用することができる。

[0029] また、培養心筋細胞としては、上記の例に限らず、各種幹細胞から分化誘導して得られた心筋細胞もまた含まれる。本発明の実施に用いられる幹細胞とは、試験管内培養下で心筋細胞様形質を有する細胞に分化し得る性質を有した細胞を意味し、具体的には、既に培養細胞として広く使用されているマウス、サル、ヒト等の哺乳動物由来の胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）等の多能性幹細胞を挙げることができる。これらの細胞の作製、継代、保存法については、既に標準的なプロトコールが確立されており、当業者は、複数の参考書籍、例えば、Manipulat

ing the Mouse Embryo : A laboratory manual (Hoganら編、Cold Spring Harbor Laborayory Press, 1994) や、Embryonic Stem Cells (Turksen編、Humana Press, 2002) 、及び複数の参考文献 (Matsui et al., Cell, 70:841-847, (1992) ; Shamblott et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95:13726-13731, (1998) ; Okita et al., Nature, 448:313-317, (2007) ; Takahashi et al., Cell, 131:861-872, (2007)) を参照することにより、これらの多能性幹細胞を容易に使用することができる。本発明に用いることができる幹細胞は、上述した幹細胞に限らず、ES細胞と類似の形質を有する幹細胞であればいずれであっても使用することができる。この場合、ES細胞と類似の形質とは、ES細胞に特異的な表面 (抗原) マーカーの存在やES細胞特異的な遺伝子の発現、更にはテラトーマ (teratoma) 形成能やキメラマウス形成能といった、ES細胞に特異的な細胞生物学的性質をもって定義することができる。

[0030] また、ES細胞と類似の形質を有さない細胞又は多能性幹細胞ではない細胞であっても、少なくとも試験管内培養下で心筋細胞様形質を有する細胞に分化し得る性質を有した細胞であれば、本発明に記載の方法を用いることができる。この様な細胞の例として、骨髄細胞に由来する骨髄間葉系幹細胞 (Bruder et al., USP 5,736,396 ; Pittenger et al., Science, 284:143-147, (1999)) やCMG細胞 (Makino et al., The Journal of Clinical Investigation, 103:697-705, (1999) ; WO01/048151) 、筋組織に由来するSpoc細胞 (WO03/035382) 等の細胞を例として挙げることができる。

[0031] 本発明において、幹細胞から心筋細胞を作製する培養法としては、心筋細胞の分化誘導に適した方法であれば、いずれの培養法であっても用いることができる。具体的な分化誘導法については、既に複数の方法が確立されており、当業者であれば、例えば、Embryonic Stem Cells (Turksen編、Humana Press, 2002) の様な参考書籍や、複数の参考文献 (Klug et al., The Journal of Clinical Investigation, 98:216-224, (1996) ; Wobus et al., Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 29:1525-1539, (1997) ; Kehat e

t al., The Journal of Clinical Investigation, 108:407-414, (2001); Xu et al., Circulation Research, 91:501-508, (2002); Takahashi et al., Circulation, 107:1912-1916, (2003); Field et al., USP 6,015,671; Xu et al., WO03/06950) を参照することにより、幹細胞から心筋細胞を分化誘導することができる。

[0032] マイクロRNA (miRNA)

本発明は、心筋細胞の増殖促進作用を有するマイクロRNA (miRNA) を提供する。本発明に係るmiRNAとしては、心筋細胞の増殖を促進するものであれば、どのようなmiRNAであってもよく、上記心筋細胞を増殖させるために使用することができる。

[0033] 本発明において、miRNAとは哺乳類を含む真核生物で非常に多く発現しているタンパク質をコードしない小さなRNAのことであり、発生、分化、増殖など様々な生命現象に関与していると考えられている。本発明において使用することができるmiRNAとしては、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質が含まれる。本発明に係るmiRNAは、一本鎖であってもよいし、二本鎖であってもよい。

[0034] 本発明において、成熟型miRNAとは完全にプロセシングされたmiRNAのことであり、15から30ヌクレオチドの長さ（多くは21から25ヌクレオチドの長さ）である。成熟型miRNAは、成熟型miRNA分子の5’側の1から12までのヌクレオチドのうちの少なくとも6個の連続するヌクレオチドを共有する（当該ヌクレオチド部分は「シード領域」とも呼ばれる（Brennecke et al., PLoS Biology, 3:e85, (2005)）、一群のmiRNAからなるmiRNAファミリーを構成することができる。従って、miRNAファミリーには、成熟型miRNAの5’領域が同一であるが、3’側は異なる、複数の成熟型miRNAが含まれる。同じmiRNAファミリーに属していれば3’側領域の核酸配列が異なっていても同様の機能を有することは、例えば、Bagpipe 3’UTR中にある1か所の8-merのシード領域の配列（シード配列）に関して報告されており（Brennecke et al., PLoS Biology, 3:e85, (2005)）、この事例の場合、前述した1か所の8-merのシード領域の

配列が結合する配列と相補的な配列を5’領域に共有するmiRNAファミリーを構成するmiRNAの中の2つの異なるmiRNAが、3’側が異なるにも拘わらず、8-merターゲットを含むレポーター遺伝子の発現を抑制できることが報告されている。

[0035] miRNAの前駆体とは、成熟型miRNAの前駆体RNAである。成熟型miRNAを作製する過程において、生細胞内においては、miRNAは、ゲノムDNA上に存在するmiRNA遺伝子から、まず数百～数千塩基程度のmiRNA一次転写産物（pri-miRNA）が転写され、それが核内でDroshaと呼ばれるRNase III酵素によってプロセシングされ、約70塩基程度のヘアピン構造を有する前駆体miRNA（pre-miRNA）となる。従って、本発明においてmiRNAの前駆体という場合、miRNA一次転写産物（pri-miRNA）及び前駆体miRNA（pre-miRNA）が含まれる。

[0036] miRNA変異体とは、生体が元々持っている成熟型miRNA又は成熟型miRNAの前駆体と比較して、1又は数個のヌクレオチドが欠失、置換、挿入又は付加されたmiRNAである。ここで数個とは、例えば7～6個まで、好ましくは5～4個まで、更に好ましくは3～1個までである。上述したように、miRNAファミリーを構成する成熟型miRNA分子の5’側には、「シード領域」が存在し、同じmiRNAファミリーに属していれば3’側領域の核酸配列が異なっていても同様の機能を有する。従って、miRNA変異体は、成熟型miRNAのシード領域以外の部分において、ヌクレオチドが欠失、置換、挿入又は付加されたmiRNAであることが好ましい。

[0037] miRNA類似物質とは、内在性の成熟型miRNA又は成熟型miRNAの前駆体を模倣するように合成されたmiRNAである。当該物質は市販されており（例えば、Ambion社から）容易に入手することができる。

[0038] 本発明のmiRNAは、その安定性を高めるために、例えば、核酸誘導体及び／又は改変型ヌクレオシド間結合を有する核酸が用いられる。これらの核酸誘導体は、公知のものを適宜選択して用いることができる。具体的には、例えば、メチルホスホネート（methylphosphonate）、ホスホロチオエート（phosphorothioate）、ホスホロジチオエート（phosphorodithioate）、ホスホラ

ミデート（phosphoramidate）、ホスホトリエステル(phosphotriester)、スルホン(sulfone)、シロキサン（siloxane）、カルボネート（carbonate）、カルボキシメチルエステル（carboxymethylester）、アセトアミデート（acetamidate）、カルバメート(carbamate)、チオエーテル（thioether）、架橋型ホスホラミデート（bridged phosphoramidate）、架橋型メチレンホスホネート（bridged methylene phosphonate）、架橋型ホスホロチオエート（bridged phosphorothioate）、ジメチレン-スルフィド(dimethylene-sulfide)、ジメチレン-スルホキシド(dimethylene-sulfoxide)、ジメチレン-スルホン(dimethylene-sulfone)、2'-O-アルキル(2'-O-alkyl)、及び2'-デオキシ-2'-フルオロホスホロチオエート(2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate)のヌクレオシド間結合を含む核酸等が挙げられる（Uhlmann & Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584, (1990)、Schneider et al., Tetrahedron Letters, 31:335-338, (1990)）。更には、Locked Nucleic Acid（Koshkin et al., Journal of the American Chemical Society, 120:13252-13253 (1998)）やENA（US7335765）等の誘導体も挙げられる。このような核酸誘導体及び／又は改変型ヌクレオシド間結合を有するmiRNAを、本発明においてはmiRNA誘導体と呼ぶ。miRNA誘導体には、成熟型miRNAの誘導体、miRNAの前駆体の誘導体、miRNA変異体の誘導体、及びmiRNA類似物質の誘導体が含まれる。

[0039] 本発明において使用することができるmiRNAは、例えば、公知の手法を用いて、天然物から単離することにより、化学的に合成することにより、又は遺伝子組換え技術的に産生させることにより取得することができ、また、市販品として入手することもできる。例えば、成熟型miRNAは、Sanger miRbaseに登録されており、この登録されている全てのmiRNAは、Ambion社、Qiagen社、Sigma社、Thermo Scientific社等から入手することができる。

[0040] miRNAを生体内の細胞又はin vitroにおける細胞の細胞内に送達するための手段としては、発現ベクター又はリポソームなど、当該技術分野において通常使用されている遺伝子送達手段のいずれであっても使用することができる。上記の成熟型miRNA又はmiRNAの前駆体は、オリゴ核酸若しくは誘導体の形

で使用することも可能であるが、その発現効率や効果持続期間等の面から、発現ベクターに組み込んだ形で使用することが好ましい。

[0041] 遺伝子送達手段として発現ベクターを使用する場合、miRNAを発現し得るプロモーターを有したものであればどのようなものであってもよく、ウイルス性発現ベクター又は非ウイルス性の発現ベクターを使用することができる。

[0042] ウイルス性発現ベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、日本血球凝集性ウイルス（HVJ；別名、センダイウイルス）、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、ニワトリポックスウイルス、SV40を代表とするパポバウイルス等に由来するベクターが例示されるが、好ましくは、アデノウイルスベクターやAAVベクター、HVJベクター、又はレンチウイルスベクターを使用することによって、効率的な遺伝子導入と導入した遺伝子の高レベル発現を行うことができる。

[0043] これらのウイルスベクターによる遺伝子の導入は、哺乳動物の細胞に遺伝子を導入する最も強力な方法の一つであり、事実上、全ての種類のヒト細胞及び多くの非ヒト細胞に導入するために使用できる。

[0044] また、これらのウイルスによる感染は細胞周期に依存しないため、様々な初代培養細胞系及び形質転換細胞系で遺伝子を発現させることができる。特に心筋細胞のようにDNA合成や細胞分裂を起こさない細胞でも効率良く遺伝子導入ができる。感染後に多くの細胞が組換えDNA（又はRNA）のコピーを複数受け取ることから、導入された遺伝子は一時的に高レベルに発現する。

[0045] アデノウイルスベクターやHVJベクター等の場合、通常、DNA/RNAは細胞質にとどまり、核に取りこまれることはない。そのため、これらのウイルスベクターを使用した場合には、外来遺伝子が宿主細胞ゲノムに組込まれた時にランダムに発生する突然変異誘発性のエラーは殆ど生じないという利点もある。

[0046] 本発明の好ましい形態の1つとして用いられるアデノウイルスベクターは、ヒト胎児腎臓293細胞又は大腸菌を宿主とした相同組換えを用いた方法（Miyake et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the Uni

ted States of America, 93:1320-1324, (1996)) や、簡単なin vitroライゲーションによる方法 (Mizuguchi & Kay, Human Gene Therapy, 9:2577-2583, (1998)) により調製することができる。

[0047] アデノウイルスは二本鎖DNAゲノムを有するDNAウイルスの一つであり、最も良く研究されているのは、ヒトのアデノウイルス5型と2型である。これらの野生型アデノウイルスのE1及びE3遺伝子の大部分を欠失することにより、複製能のないウイルスベクターを作製することができ、ウイルス粒子形成に有害な作用を及ぼすことなく、数kbの外来DNAを挿入することが可能となる。当該組換えアデノウイルスは、転写調節因子であるE1遺伝子を欠いているが、挿入した遺伝子特異的な転写ユニットによって、標的細胞の増殖や、その他のウイルス遺伝子の有無に依存せずに、挿入した目的遺伝子のみを発現させることができる。

[0048] アデノ随伴ウイルス (AAV) は、パルボウイルス科に属する約4.7 kbの一本鎖DNAウイルスであり、1型から12型の血清型のAAVが知られている。AAVベクターは両端のITR (Inverted terminal repeat) にはさまれたRep (複製や組み込みに関与) とCap (カプシド) を目的遺伝子と置換することで作られる。このベクターをRep、Capを発現するプラスミドと共に293細胞に導入し、さらにアデノウイルスをヘルパーウイルスとして感染させ、核内に蓄積された組換えアデノ随伴ウイルスベクターを調整する。最近ではE1A、E1Bを発現する293細胞にE2A、E4、VAを発現するプラスミドを導入することでヘルパーウイルスを必要としない方法も開発されている。

[0049] センダイウイルス (Sendai virus ; SeV) はパラミクソウイルス属に属するげっ歯類のウイルスであり、別名、日本血球凝集性ウイルス (Hemagglutinating Virus of Japan ; HVJ) とも呼ばれる。 SeVのゲノムはマイナス一本鎖RNA (mRNAと相補的) からなり、核蛋白 (NP) 、核蛋白リン酸化酵素 (P) 、ウイルス表面裏打ち蛋白 (M) 、赤血球凝集蛋白 (HN) 、膜融合蛋白 (F) 、及びRNA合成酵素 (L) の6つの遺伝子をコードする。SeVはHN (hemaglutination-neuraminidase) 蛋白により宿主細胞のシアル酸に吸着・分解することによ

り結合し、ゲノムを細胞質内に注入する。細胞内に移行したウイルスゲノムは自らがコードするL蛋白の働きにより遺伝子の転写・複製を行う。このステップは通常のウイルスと異なり細胞質で行われ、ウイルスゲノムが核内に移行することはない。

[0050] SeVベクターは、導入細胞内でのベクターの自律複製に必要なN、P、L遺伝子以外のF、HN、M遺伝子を一つもしくは複数欠損させることにより、非伝播性ベクターとして作製することができる。F遺伝子欠失型ベクターは、バクテリオファージT7由来RNAポリメラーゼにより認識されるT7プロモーター下流に組換えベクターcDNAを挿入したプラスミド、T7プロモーター支配下でのN、P、F、L発現プラスミド、さらにT7 RNAポリメラーゼ発現組換えワクチニアウイルスを用い、サル腎由来LLC-MK2細胞に導入することにより作製されるが、最近では、6種のプラスミド（T7プロモーター下流に組換えベクターcDNAを挿入したプラスミドとCAGプロモーター支配下でのN、P、L、F、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子発現プラスミド）のトランスフェクションのみによる簡便な作製法も可能となっている。

[0051] アデノウイルスベクター及び他のウイルスベクターの総説、並びに作製法や使用法に関して、当業者は、複数の参考書籍を参照することができる。例えば、Gene Therapy Protocols: Methods in Molecular Medicine (Robbins編、Humana Press, 1997)、Gene Transfer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic Implications (March編、Kluwer Academic Publishers, 1997)、Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Curiel & Douglas編、Academic Press, 2002) 等を挙げることができる。また、アデノウイルスベクターを作製するためのキットも市販されており（Invitrogen社のViraPower™アデノウイルス発現システム（#K4930）、タカラバイオ社のAdenovirus Expression Vector Kit (#6170) 等から）容易に入手することができ、本発明の実施に利用可能である。

[0052] また、AAVベクターやSeVベクターを作製するためのキットも市販されており（AAV Helper-Freeシステム（Stratagene社；#240071）、組換えセンダイ

ウイルスミニベクター調製キット（MBL社；DV-0001）等）、容易に入手することができ、本発明の実施に利用可能である。

[0053] 非ウイルス性発現ベクターとしては、例えば、SV（Simian virus）40ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス（Cytomegaro virus；CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus）プロモーター等のウイルスに由来するプロモーター、β-アクチン・プロモーター、EF（elongation factor）1α・プロモーター等、トリβ-アクチン・プロモーターにCMVのエンハンサー及びウサギβ-グロビン遺伝子のポリA付加シグナル配列を組み込んだハイブリッド・プロモーターであるCAGプロモーター（Niwa et al., Gene, 108:193-199, (1991)）、及びPol.IIIプロモーターであるU6又はH1プロモーター等を有するベクターが挙げられるが、これらのベクターに限定されない。これらのプロモーターを利用可能な発現ベクターは、市販されており（Ambion社、Invitrogen社、TAKARA BIO社等から）容易に入手することができる。

[0054] 上記の遺伝子又は遺伝子ベクターの導入のための方法としては、公知の方法が全て使用可能であり、例えばリン酸カルシウムや電気パルスを用いたトランスフェクション法や、リポソーム等に目的の遺伝子を封入した上で細胞にトランスフェクションする方法、及びレトロウイルスやアデノウイルス等のウイルスベクターに目的の遺伝子を組み込み、当該組換えウイルスを細胞に感染させる方法等が挙げられる。この場合、ウイルスベクターとは、ウイルスDNA又はRNAの全長若しくは一部を欠損・変異させた核酸配列に、目的とする遺伝子を組み込み、発現することができる様にした構築物である。

[0055] リポソームの具体例としては、N-[2,3-（ジオレイルオキシ）プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）やジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）等を含む脂質製剤を使用することができる。

[0056] 具体的なmiRNAの取得

本発明者らは、心筋細胞に導入した際に顕著なBrdUの取り込み能力を示すか否かに基づいて、成熟型miRNAのライブラリーを検索したところ、心筋細胞

の増殖促進作用を有する成熟型miRNAとして、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、及びmiR-373（SEQ ID NO: 9）等を見出し、これらをさらなる実験に使用した。

[0057] 本発明において使用することができる好ましいmiRNAとして、これらの成熟型miRNAの前駆体もまた、含まれる。例えば、成熟型miRNAの前駆体としては、各miRNAのmiRNA一次転写産物（pri-miRNA）又は前駆体miRNA（pre-miRNA）等を例として挙げることができる。その具体例としては、例えば、前述した具体的な成熟型miRNAをコードする遺伝子の一次転写産物（pri-miRNA）である、以下のものが、本発明において使用することができる好ましいmiRNAに含まれる：mir-148a（miR-148aの前駆体、SEQ ID NO: 4）、mir-148b（miR-148bの前駆体、SEQ ID NO: 6）、mir-152（miR-152の前駆体、SEQ ID NO: 8）、及びmir-373（miR-373の前駆体、SEQ ID NO: 10）。

[0058] [表1]

miRNA名	配列	SEQ ID NO
miR-148a	ucagugcacu acagaacuuu gu	3
mir-148a	gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac uuugucuc	4
miR-148b	ucagugcauc acagaacuuu gu	5
mir-148b	caagcacgau uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucucugaa agucagugca ucacagaacu uugucucgaa agcuuucua	6
miR-152	ucagugcaug acagaacuug g	7
mir-152	uguccccccc ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag cagucagugc augacagaac uugggcccgg aaggacc	8
miR-373	gaagugcuuc gauuuugggg ugu	9
mir-373	gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug ggguguccc	10

本発明において使用することができるmiRNAには、上記の表1に示した成熟型miRNA及び前駆体miRNAの変異体や類似物質、又は上記の表1に示したmiRNAの前駆体以外のmiRNAの前駆体（例えば、miRNA一次転写産物（pri-miRNA）など）及びその変異体や類似物質も含まれる。

[0059] 例えば、本発明において使用することができる成熟型miRNAであるmiR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）及びmiR-152（SEQ ID NO: 7）は、それぞれのmiRNAの5'側に共通のシード配列、ucagugca（SEQ ID NO: 1）を有し、miR-148ファミリーを構成する。以下にmiR-148ファミリーに属するmiRNAの各配列を並べて示す。保存されているシード配列に下線を付す。

[0060] miR-148a：<u>ucagugca</u>cuacagaacuuugu（SEQ ID NO: 3）

miR-148b：<u>ucagugca</u>ucacagaacuuugu（SEQ ID NO: 5）

miR-152：<u>ucagugca</u>ugacagaacuugg（SEQ ID NO: 7）。

[0061] 従って、本発明のmiRNAの一つとして、ucagugca（SEQ ID NO: 1）からなるシード配列を5'末端に含む成熟型miRNA若しくは当該miRNAの前駆体、又はそれらの変異体若しくは類似物質が含まれる。これらのmiRNAには、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択されるmiRNAが含まれる。例えば、成熟型miRNAであるmiR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、及びmiR-152（SEQ ID NO: 7）の前駆体としては、各miRNAのpri-miRNA、pre-miRNA等が挙げられる。その具体例としては、例えば、それぞれ下記のSEQ ID NO: 4、6そして8で表される前駆体が挙げられる。

[0062] ヒトmir-148a：gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac uuugucuc（SEQ ID NO: 4）

ヒトmir-148b：caagcacgau uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucucugaa agucagugca ucacagaacu uugucucgaa agcuuucua（SEQ ID NO: 6）

ヒトmir-152：uguccccccc ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag

cagucagugc augacagaac uugggcccgg aaggacc（SEQ ID NO: 8）。

[0063] また、本発明おいて使用することができる別の成熟型miRNAであるmiR-373は、そのmiRNAの5’側に共通のシード配列、gaagugcu（SEQ ID NO: 2）を有し、miR-373ファミリーを構成する。miR-373ファミリーに属するmiRNAの配列を示す。シード配列に下線を付す。

[0064] miR-373：gaagugcuucgauuuuggggugu（SEQ ID NO: 9）。

[0065] 従って、本発明のmiRNAの一つとして、gaagugcu（SEQ ID NO: 2）からなるシード配列を5’末端に含む成熟型miRNA若しくは当該miRNAの前駆体、又はそれらの変異体若しくは類似物質が含まれる。これらのmiRNAには、miR-373（SEQ ID NO: 9）及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択されるmiRNAが含まれる。例えば、成熟型miRNAであるmiR-373（SEQ ID NO: 9）の前駆体としては、そのmiRNAのpri-miRNA、pre-miRNA等が挙げられる。その具体例としては、例えば、下記のSEQ ID NO: 10で表される前駆体が挙げられる。

[0066] ヒトmiR-373：gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug gggugucccc（SEQ ID NO: 10）。

[0067] この様にして得られた本発明に係るmiRNAは、心筋細胞に対して顕著に増殖活性を示すことが明らかになった。

なお、本発明に係るmiRNAは、正常細胞の株化細胞であるMRC-5（ヒト胎児肺由来）細胞、WI-38（ヒト胎児肺由来）細胞及びMC3T3-E1（マウス頭蓋冠由来）細胞等に対しては、有意な増殖促進活性を示さなかった。

[0068] 遺伝子治療法としての適用

本発明の別の態様として、本発明の実施に用いる、ウイルスベクター又は非ウイルス性ベクターなどの発現ベクターであって心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を含むもの（以下、単に「遺伝子発現ベクター」という）、好ましくはウイルスベクター、更に好ましくはアデノウイルスベクター又はHVJベクター、AAVベクター、レンチウイルスベクター等を含む、遺伝子治療用医薬組成物が提供される。遺伝子発現ベクター中に含まれるm

iRNAを規定する核酸は、既に説明した「具体的なmiRNAの取得」の項において説明されたmiRNAを規定する核酸であればどのようなものであってもよい。この遺伝子治療用医薬組成物は、心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を含むことから、miRNAの作用により、心筋再生薬又は心臓疾患治療薬として用いることができる。治療の対象となる心臓疾患としては、心筋細胞の衰弱、機能停止又は死滅を伴うものであれば特にこれを限定しないが、具体例としては心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、慢性心不全等を挙げることができる。

[0069] 医薬組成物の剤形は特に限定されず、慣用的方法により製剤化することができる。例えば、滅菌水や緩衝化生理食塩水等の薬学的に受容可能な薬剤キャリアや希釈液中に、本発明の遺伝子発現ベクターを含む注射可能な調製物の形態であってもよい。薬剤キャリアとしては、その他に適当な安定剤（例えば、ヌクレアーゼ阻害剤等）、キレート剤（例えば、EDTA等）、及び／又はその他の助剤も含むことができる。上記成分を含む医薬組成物は、必要に応じてろ過等の方法により滅菌し、無菌アンプル等の容器に満たすことができる。

[0070] 本発明の医薬組成物の投与量は、患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路等の条件に応じて適宜増減して用いる必要があるが、当業者であれば、必要な用量を適宜、設定することが可能である。一般的には、成人1回当たりは有効成分のDNA量として1.0μg/kg～1.0 g/kg程度の範囲であり、好ましくは10μg/kg～100 mg/kg程度の範囲である。又、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを用いる場合、ウイルスの最終的な力価は、好ましくは10^{7}～10^{13}pfu/mL、更に好ましくは10^{9}～10^{12} pfu/mLであることが望ましい。

[0071] 本発明の医薬組成物は、遺伝子発現ベクターが非ウイルス性ベクターに基づくものである場合に特に、リポソームとの複合体として供給してもよい。この様な形態によって、特に心筋細胞において高いトランスフェクション効率を実現できる可能性がある。リポソームの具体例としては、N-［2,3-（ジオレイルオキシ）プロピル］-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTM

A）やジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）等を含む多くの新しい脂質製剤が開発され、様々な細胞系を用いたトランスフェクションが試験されている（Banerjee, Journal of BiomaterialsApplications, 16:3-21, (2001)；Maurer et al., Expert Opinion on Biological Therapy, 1:923-947, (2001)）。また、HVJ由来の融合形成性エンベロープを持つ融合形成性ウイルスリポソームを用いた方法、いわゆるHVJ-リポソーム法（Yonemitsu et al., International Journal of Oncology, 12:1277-1285, (1998)；Kaneda et al., Molecular Medicine Today, 5:298-303, (1999)）も有効である。これらの核酸導入を目的としたリポソームは市販されており、特にmiRNAの導入を対象としたものとしては、Lipofectamine RNAi MAX（Invitrogen社）、Oligofectamine（Invitrogen社）、siLentFect（BIO-RAD社）、HiPerFect（Qiagen社）等が利用できる。

[0072] 上記の遺伝子発現ベクター又はそれを含む医薬組成物は、心臓疾患患者の心臓の全体に導入しても良いが、障害部位に限局した導入を行うことが好ましい。本発明において障害部位とは、個体（ヒト又は非ヒト動物：以下同じ）における心筋細胞が衰弱、機能停止若しくは死滅した部位及びその近傍領域、又は個体における心筋細胞の衰弱、機能低下の進行若しくは死滅が予想される部位を意味する。この場合、遺伝子発現ベクター又はそれを含む医薬組成物を障害部位に導入する方法としては、浸透ポンプや浸透チューブ等を用いて、製剤を連続的に障害部位へ輸送することも可能であるが、開胸した上で注射器を用いて直接的に心臓に注入する方法や、X線透視下でカテーテルを用いて経血管的（間接的）に注入する方法等も挙げることができる。

[0073] 経血管的方法は遺伝子の導入を心臓に限局できるため好ましいが、この場合、遺伝子発現ベクター又はそれを含む医薬組成物は、血管内に注入し、血流を介して心筋細胞に輸送することもできるし、心筋層内に直接注入して心筋細胞と接触させることも可能である。この様なカテーテル等を用いた外科的手術手技は、当該分野で公知であり、参考書籍として、例えば、Gene Transfer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic

Implications（March編、Kluwer Academic Publishers, 1997）や、Vascular Surgery 第5版（Rutherford, W.B. Saunders, 2000）、Textbook of Interventional Cardiology 第4版（Topol 編、W.B. Saunders, 2002）等の成書を挙げることができる。また、上記の方法を実施するために用いるカテーテルは市販されており（Boston Scientific社、Edwards Lifesciences Corporation社等から）容易に入手することができる。

[0074] 本発明の方法により増殖させた心筋細胞の利用

本発明に係る方法により増殖させた心筋細胞は、引き続き、公知の方法による細胞回収、分離、精製法を用いることにより、高純度の心筋細胞を効率的かつ多量に得ることができる。この様にして得られた心筋細胞を以下、本発明により調製された心筋細胞と呼ぶ。

[0075] 心筋細胞の精製方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができるが、その具体的例として、フローサイトメーターや磁気ビーズ、パンニング法等の抗原－抗体反応に準じた方法や、ショ糖、パーコール等の担体を用いた密度勾配遠心による細胞分画法を挙げることができる。

[0076] また、別の心筋細胞選別法としては、前もって心筋細胞ソースとなる動物又はES細胞等の幹細胞の遺伝子に、人為的に薬剤耐性や異所性タンパク質の発現能を付与する様な修飾を加え、これらの指標をもとに心筋細胞を選択的に回収する方法が挙げられる。例えば、Field及び共同研究者らは、α型ミオシン重鎖プロモーターの制御下でネオマイシン（G418）耐性遺伝子を発現し得る遺伝子カセットを、マウスES細胞に導入することにより、そのES細胞が心筋細胞に分化し、それに伴いα型ミオシン重鎖遺伝子を発現した時のみ、G418を添加した培地中で生存し得る系を構築し、この方法によりG418耐性細胞として選別された細胞は、99%以上の確率で心筋細胞であることを報告している（USP 6,015,671；Klug et al., The Journal of Clinical Investigation, 98:216-224, (1996)）。

[0077] 本発明のまた別の態様として、本発明により調製された心筋細胞は、各種

生理活性物質（例えば、薬物）や機能未知の新規遺伝子産物等の薬理評価及び活性評価に有用である。例えば、心筋細胞の機能調節に関する物質や薬剤、又は心筋細胞に対して毒性や傷害性を有する物質や薬剤のスクリーニングに利用することができる。さらなる態様では、本発明により調製された心筋細胞を含む評価キットは、上記スクリーニングのために有用である。

[0078] スクリーニングに供する被験物質としては、培養系に添加できるものであれば種類を問わず、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチド、遺伝子、ウイルス、細胞、細胞培養液、微生物培養液等が挙げられる。遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス等のウイルスベクターを用いて培養系に添加する方法、又はリポソーム等に封入して培養系に添加する方法等が挙げられる。

[0079] 被験物質の評価は、心筋細胞機能の質的又は量的な変化を測定することで行なうことができる。心筋細胞の生存性を一例として挙げると、本発明により調製された心筋細胞を、適切な細胞密度になるように培養プレートに播種し、血清を含まない培地で培養すると細胞死（アポトーシス）を誘導することができるが、その際、適当量の被験物質を培地中に添加し、心筋細胞の生存率又は死亡率を測定すれば良い。心筋細胞の生存率又は死亡率の測定方法としては、トリパンブルー等の色素の取り込みを指標とした肉眼的な観察によるものでも良いし、脱水素酵素の活性（還元活性）を指標とした方法、さらにはアポトーシス細胞に特異的なカスパーゼ活性やアネキシンVの発現を指標とした方法を用いても良い。当該メカニズムを利用したキットは市販されており（Sigma社、Clonetech社、Promega社等から）容易に入手することができる。

[0080] 上記スクリーニング方法により得られた物質や薬剤は、心筋細胞の分化誘導作用や機能調節作用を有するため、例えば心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、慢性心不全等の心臓疾患予防薬又は治療薬として用いることができる。これら化合物は新規な化合

物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

[0081] また、本発明により調製された心筋細胞は、心筋再生又は心臓疾患治療用の移植用細胞として用いることができる。心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、慢性心不全等を挙げることができる。移植用細胞としては、本発明により調製された心筋細胞を高純度で含むものであれば、細胞を培地等の水性担体に浮遊させたもの、細胞を生体分解性基質等の固相担体に包埋したもの、あるいは単層もしくは多層の心筋細胞シート（Shimizu et al., Circulation Research, 90:e40-e48, (2002)）に加工したもの等、どの様な形状のものでも用いることができる。

[0082] 上記の移植用心筋細胞を障害部位に移植する方法としては、開胸し、注射器を用いて直接心臓に注入する方法、心臓の一部を外科的に切開して移植する方法、さらにはカテーテルを用いた経血管的方法により移植する方法等（Murry et al., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 67:519-526, (2002) ; Menasche, The Annals of Thoracic Surgery, 75:S20-S28, (2003) ; Dowell et al., Cardiovascular Research, 58:336-350, (2003)）が挙げられるが、特にこれを限定しない。この様な方法により、胎児心臓から回収した心筋細胞を心障害動物の心臓に移植すると、きわめて良い治療効果を示すことが報告されている（Menasche, The Annals of Thoracic Surgery, 75:S20-S28, (2003) ; Reffelmann et al., Heart Failure Reviews, 8:201-211, (2003)）。ES細胞由来の心筋細胞は、胎児心臓由来の心筋細胞ときわめてよく似た形質を呈している（Maltsev et al., Mechanisms of Development, 44:41-50, (1993) ; Maltsev et al., Circulation Research, 75:233-244, (1994)）。また、実際にES細胞由来の心筋細胞を成体心臓に移植した動物実験例では、胎児心筋を移植した例とほぼ変わらない、極めて高い生着性を示すことも確認されている（Klug et al., The Journal of Clinical Investigation, 98:216-224, (1996)）。そのため、心筋細胞の疲弊及び脱落に起因する上記の心臓疾患において、本発明記載の方法により調製した心筋細胞

を、病的心臓組織に補充的に移植することにより、心機能の改善を促すことが期待できる。

実施例

[0083] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、以下の実施例は本発明の単なる例示を示すものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0084] 実施例1：初代培養心筋細胞を用いたBrdU取り込みを指標としたmiRNAライブラリースクリーニング

生後2～4日目のラット（Wistar系、清水実験材料株式会社より入手）から心臓を摘出し、コラゲナーゼ処理により得られた細胞群からパーコール濃度勾配遠心分離（細胞を懸濁した密度1.082 g/mLのパーコール溶液を密度1.050 g/mL、1.060 g/mLのパーコール溶液に重層し、4℃、3000 rpm（2000 G）25分遠心）により心筋細胞画分を回収した。このようにして得た心筋細胞は、5%子牛血清（FCS；SAFC Bioscience社）を添加したイーグル最小培地（ナカライテスク社）に懸濁後、培養用ディッシュに播種し、炭酸ガスインキュベータ中、37℃で培養した。このようにして調製した心筋細胞（96 wellプレートあたり15,000 cells/well）に対して、Pre-miR™ miRNA Precursor Library-HumanV2（Ambion：miRBase Sequence Database Version 8.0に収載の328個のヒト成熟型miRNAをミミックするようにデザインされたライブラリー）各2 pmolをLipofectamine™ RNAiMAX（Invitrogen）を用いてトランスフェクションし、2日後に細胞増殖ELISA、BrdU化学発光キット（Roche）を用いてBrdUの取り込み量を測定し、陰性対照であるPre-miR™ miRNA Precursor Molecule－Negative control #1（Ambion）添加群におけるBrdUの取り込み量と比較して、顕著に高いBrdUの取り込み効果を呈したものを、DNAの合成能を顕著に促進する候補miRNAとして選択した。当該試験において、上記の候補miRNAの例として、miR-148a、miR-148b、miR-152及びmiR-373を選抜することができた。

[0085]

[表2]

miRNA	SEQ ID NO	BrdU値
miR-148a	3	2.7
miR-148b	5	2.3
miR-152	7	2.6
miR-373	9	2.9

実施例2：初代培養心筋細胞におけるmiRNA強制発現による細胞周期進行マーカーの解析

心筋細胞（24 wellプレートあたり100,000 cells/well）に対して、実施例１で得られた候補miRNA、miR-148a、miR-148b、miR-152及びmiR-373のヒト成熟型miRNAをミミックするようにデザインされたPre-miR™ miRNA Precursor Moleculeと陰性対照のNegative control #1（全てAmbion）1 pmolをLipofectamine™RNAiMAX（Invitrogen）を用いてトランスフェクションし、トランスフェクション2～4日後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。

[0086] 次に抗Ki67抗体（ThermoSCIENTIFIC）（1：200希釈）及び抗TroponinT抗体（Thermo SCIENTIFIC）（1：200希釈）を反応させた後、Alexa Fluor™標識抗体（Alexa-488及びAlexa-568；Molecular Probes）（ともに1：400希釈）を用いて染色した。また、細胞核は4',6-ヂアミジン-2'-フェニルインドールジハイドロクロライド（4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride：DAPI）溶液（1μg/mL）で染色した。

[0087] 上記方法にて免疫染色を行った細胞について、心筋細胞中のKi67陽性率をIn Cell Analyzer1000（GE Healthcare社）を用いて計測した。Ki67核タンパク質は細胞周期のすべてのサイクルにおいて増殖している細胞で発現することから（Scholzen & Gerdes, Journal of Cellular Physiology, 182:311-22, 2000）、細胞周期が進行している細胞を検出するために用いた。

[0088] この結果を図1に示した。

[0089] この結果より、Negative control #1を使用した場合と比較して顕著な心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAとしてmiR-148a、miR-148b、miR-152及びm

iR-373を同定した。

[0090] 実施例3　初代培養心筋細胞におけるアデノウイルス発現miRNA強制発現による細胞周期進行マーカーの解析

miR-148a、miR-152、miR-373を発現させるためのアデノウイルスベクターとしては、ViraPower™ Adenoviral Expression System（Invitrogen社）を用いて作製した。即ち、それぞれのmiRNAの前駆体配列及び隣接した数百ヌクレオチドを含むヒトゲノムDNA断片を、ヒトゲノムDNAを鋳型として以下に示すプライマーを用いたPCRにより増幅した。

[0091] hsa-miR-148a-F：5’-caccgaacacacctgcaggaagaaact-3’（SEQ ID NO: 11）

hsa-miR-148a-R：5’-gttcccatttacagggtttaaccca-3’（SEQ ID NO: 12）

hsa-miR-152-F：5’-caccgtcccagactcggctcccatca-3’（SEQ ID NO: 13）

hsa-miR-152-R：5’-actcgaggtggacaccctgtgt-3’（SEQ ID NO: 14）

hsa-miR-373-F：5’-caccgtgaccaaggggctgtatgca-3’（SEQ ID NO: 15）

hsa-miR-373-R：5’-ctgcccaccccagaatatgcca-3’（SEQ ID NO: 16）。

[0092] これらのPCR産物をpENTR/D-TOPOベクター（Invitrogen社）に挿入し、その塩基配列の確認を行い、Gateway system（Invitrogen社）を用いてpAd/CMV/V5-DESTベクター（Invitrogen社）に組み換え、pAd/CMV-miR-148a、pAd/CMV-miR-152、及びpAd/CMV-miR-373 を作製した。次にこれらのベクターを制限酵素PacIで切断し、ヒト腎臓由来の293A細胞へLipofectamine2000（Invitrogen社）を用いてトランスフェクションすることにより、組換えアデノウイルスAd-miR-148a、Ad-miR-152、及びAd-miR-373を作製した。　上記の方法で作製した組換えアデノウイルスは、CMVプロモーターの制御下で各挿入miRNAの前駆体が発現する構築になっており、哺乳動物細胞内で高発現させることが可能である。哺乳動物に発現したmiRNAの前駆体は哺乳動物の細胞内の酵素群により機能的な成熟型miRNAとなる。

[0093] また、この実験において、市販のLacZ発現のための組換えアデノウイルス、Ad-LacZ（タカラバイオ株式会社）を使用した。

[0094] 引き続き、各組換えウイルスについて高力価ウイルス液の調製を行い、調製したウイルス液の力価は293A細胞を用いてプラーク・アッセイにより決定し、いずれも10^9～10^{10} pfu/mLの範囲内であった。なお、本明細書において、細胞当たりに感染させる生ウイルス粒子数を、以下、感染多重度（multiplicity of infection；moi）で表記する。即ち、1つの細胞に1個のウイルス粒子を感染させた場合を、moi＝1と表す。

[0095] また、調製した各組換えウイルスを心筋細胞にmoi＝10～1000で添加し、2日後にmiRNeasy mini kit（Qiagen社）を用いてmiRNAを含む全RNAを回収した。その全RNA 10 ngを用いて、TaqMan MicroRNA reverse transcription kit（Applied Biosystems社）とTaqMan MicroRNA Assay（Applied Biosystems社）に付属のそれぞれのmiRNAに特異的な逆転写用プライマーを用いてcDNAを合成し、引き続きTaqMan MicroRNA Assay（Applied Biosystems社）に付属のそれぞれのmiRNAに特異的な順方向及び逆方向プライマーとTaqManプローブを用いて、Applied Biosystems 7900HT Fast Real time PCR systemにてリアルタイムPCR法を行い、成熟型miRNAとしての発現量を定量した。

[0096] 内在性コントロールとしてRNU6Bを用い、発現量を標準化した。その結果、ウイルスの用量依存的に成熟型miRNAが発現していることを確認した。

[0097] このようにして調製した組換えウイルスAd-miR-148a、Ad-miR-152及びAd-miR-373と陰性対照としてAd-LacZを、心筋細胞（24 wellプレートに100,000 cells/well）に、moi＝10～100で添加し、2～4日後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。

[0098] 次に抗Ki67抗体（ThermoSCIENTIFIC社）（1：200希釈）及び抗TroponinT抗体（ThermoSCIENTIFIC社）（1：200希釈）を反応させた後、Alexa Fluor™標識抗体（Alexa-488及びAlexa-568；Molecular Probes）（ともに1：400希釈）を用いて染色した。また、細胞核はDAPI溶液（1μg/mL）で染色した。

[0099] 上記方法にて免疫染色を行った細胞について、心筋細胞中のKi67陽性率をIn Cell Analyzer1000を用いて計測した。

[0100] この結果を図2に示した。この図においてNoneは未処理を示す。

[0101] この結果より、miR-148a、miR-152及びmiR-373のいずれの場合においても、陰性対照（LacZ）の場合と比較して、細胞周期進行マーカーであるKi67が陽性となり心筋細胞の細胞周期が亢進され、心筋細胞の増殖促進作用を有することが確認された。

[0102] 実施例4 初代培養心筋細胞におけるmiRNA強制発現またはアデノウイルス発現miRNA強制発現による細胞分裂マーカーの解析

実施例2と同様の方法で、miR-148a、miR-148b、miR-152、miR-373及び陰性対照としてNegative control #1を心筋細胞にトランスフェクションした。また、実施例3と同様の方法でAd-miR-148a、Ad-miR-152及びAd-miR-373と陰性対照のAd-LacZを、心筋細胞に添加した。それぞれ、添加後2～3日後に細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した。

[0103] 次に抗リン酸化ヒストンH3（H3P）抗体（MILLIPORE社）（1：200希釈）及び抗TroponinT抗体（ThermoSCIENTIFIC社）（1：200希釈）を反応させた後、Alexa Fluor™標識抗体（Alexa-488及びAlexa-568；Molecular Probes）（ともに1：400希釈）を用いて染色した。また、細胞核はDAPI溶液（1μg/mL）で染色した。

[0104] 上記方法にて免疫染色を行った細胞について、心筋細胞中のH3P陽性率をIn Cell Analyzer1000を用いて計測した。ヒストンH3のSer-10のリン酸化は細胞の有糸分裂時に見られるクロマチンの凝集と密接に関連していることから（Adamas,R, The Journal of Cell Biology, 153: p. 865-880, 2001）、細胞分裂のマーカーとして用いた。

[0105] この結果を図3-1、図3-2に示した。この図においてNoneは未処理を示す。また、上記免疫染色を行った細胞の顕微鏡写真を図3-3に示した。

[0106] この結果より、miR-148a、miR-152及びmiR-373のいずれの場合においても、図3-1の場合には陰性対照（Negative control #1）と比較して、図3-2の場合には陰性対照（Ad-LacZ）と比較して、細胞分裂マーカーであるH3Pが陽性となり、有糸分裂中および細胞質分裂に進んでいる細胞が観察されることから、心筋細胞の細胞分裂が亢進しており、これらのマイクロRNAは心筋細胞の

増殖促進作用を有することが確認された。

[0107] 実施例5：生体内における心筋細胞の増殖可能性の検討

miR-148a、miR-152、miR-373の発現が、生体内における心筋細胞の増殖を起こすかどうかを確認するために、実施例3で調製した組換えウイルスAd-miR-148a、Ad-miR-152及びAd-miR-373（それぞれ1×10^9pfu/mL）を、Wistar系ラット（250～300ｇ）を開胸して目視にて心尖部（apical region）の計4ヵ所に30G注射針を用いて総量200μL注入した。陰性対照としては、miR-141を使用することとし、目的とする配列を、実施例3の方法にしたがって、ヒトゲノムDNAを鋳型として以下に示すプライマー：

hsa-miR-141-F：5’-caccgcagggatcctgggcctga-3’（SEQ ID NO: 17）

hsa-miR-141-R：5’-cgggaagacaatggaggtgcct-3’（SEQ ID NO: 18）

を用いたPCRにより増幅し、このPCR産物を実施例3に記載の通りに用いてAd-miR-141を作製し、Ad-miR-141（1×10^9pfu/mL）を、Wistar系ラット（250～300ｇ）を開胸して目視にて心尖部（apical region）の計4ヵ所に30G注射針を用いて総量200μL注入した。

[0108] 注入後4日間経過後、4%パラホルムアルデヒドを灌流して心臓組織を固定化し、切片を作製し、抗Ki67抗体（ThermoSCIENTIFIC社）（1：500希釈）及び抗TroponinT抗体（ThermoSCIENTIFIC社）（1：600希釈）を反応させた後、Alexa FluorTM標識抗体（Alexa-488及びAlexa-568；Molecular Probes）（ともに1：400希釈）を用いてそれぞれ緑色及び赤色に染色視覚化した。また、細胞核はDAPIを用いて青色に染色視覚化した。

[0109] 染色した心臓組織切片は蛍光顕微鏡を用いて観察し、DAPIとTroponin Tの共陽性細胞を心筋細胞、Ki67とTroponin Tの共陽性細胞を細胞周期が進行している心筋細胞とし、細胞周期が進行している心筋細胞の割合を測定した。各個体で測定する細胞数は300以上とした。その結果を図４に示した。図4において、miR-148a、miR-152又はmiR-373のアデノウイルスを感染させた心臓では、Ki67陽性心筋細胞の割合が明らかに増加していることが分かった。一方、陰性対照であるmiR-141のアデノウイルスを感染させた心臓では、Ki67陽

性心筋細胞はほとんど認められなかった。

[0110] この結果より、生体内においてもmiR-148a、miR-152及びmiR-373を発現させることにより、細胞周期進行マーカーであるKi67が陽性となり、心筋細胞の細胞周期が亢進され、増殖能を獲得したことが示された。

配列表フリーテキスト

[0111] SEQ ID NO: 1：miR-148ファミリーの5’側に共通のシード配列；

SEQ ID NO: 2：miR-373ファミリーの5’側に共通のシード配列；

SEQ ID NO: 11：miR-148a遺伝子のコード領域を増幅するためのフォワードプライマー、hsa-miR-148a-F；

SEQ ID NO: 12：miR-148a遺伝子のコード領域を増幅するためのリバースプライマー、hsa-miR-148a-R；

SEQ ID NO: 13：miR-152遺伝子のコード領域を増幅するためのフォワードプライマー、hsa-miR-152-F；

SEQ ID NO: 14：miR-152遺伝子のコード領域を増幅するためのリバースプライマー、hsa-miR-152-R；

SEQ ID NO: 15：miR-373遺伝子のコード領域を増幅するためのフォワードプライマー、hsa-miR-373-F；

SEQ ID NO: 16：miR-373遺伝子のコード領域を増幅するためのリバースプライマー、hsa-miR-373-R；

SEQ ID NO: 17：miR-141遺伝子のコード領域を増幅するためのフォワードプライマー、hsa-miR-141-F；

SEQ ID NO: 18：miR-141遺伝子のコード領域を増幅するためのリバースプライマー、hsa-miR-141-R；

その他の配列については、表1を参照。

請求の範囲

[請求項1] 心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を含む、心臓疾患治療用医薬組成物。

[請求項2] miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、請求項1に記載の医薬組成物。

[請求項3] miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

[請求項4] SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a（SEQ ID NO: 3）、miR-148b（SEQ ID NO: 5）、miR-152（SEQ ID NO: 7）、及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、請求項3に記載の医薬組成物。

[請求項5] SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373（SEQ ID NO: 9）及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、請求項3に記載の医薬組成物。

[請求項6] 心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、心筋細胞に導入及び発現させるための発現ベクターとして含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項7] ベクターが、ウィルスベクターである、請求項6に記載の医薬組成物。

[請求項8] miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む、miRNA誘導体である、請求項1～7のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項9] 心臓疾患が、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎又は慢性心不全である請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項10] 心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、個体の

心臓の障害部位に導入することにより、当該部位において心筋細胞を増殖させることを特徴とする心臓疾患の治療方法。

[請求項11] 心臓疾患治療用医薬組成物の製造のための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸の使用。

[請求項12] 心臓疾患の治療において使用するための心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸。

[請求項13] 心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、心筋細胞に導入して発現させることを特徴とする心筋細胞の増殖方法。

[請求項14] miRNAが、成熟型miRNA及び当該miRNAの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] miRNAが、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質である、請求項13又は14に記載の方法。

[請求項16] SEQ ID NO: 1からなるシード配列を含む物質が、miR-148a (SEQ ID NO: 3) 、miR-148b (SEQ ID NO: 5) 、miR-152 (SEQ ID NO: 7) 、及びそれらの前駆体、並びにそれらの変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、請求項15に記載の方法。

[請求項17] SEQ ID NO: 2からなるシード配列を含む物質が、miR-373 (SEQ ID NO: 9) 及びその前駆体、並びにその変異体及び類似物質からなる群から選択される物質である、請求項15に記載の方法。

[請求項18] 心筋細胞の増殖促進作用を有するmiRNAを規定する核酸を、発現ベクターを用いて心筋細胞へ導入することを含む、請求項13～17のいずれか1項に記載の方法。

[請求項19] ベクターが、ウィルスベクターである、請求項18に記載の方法。

[請求項20] miRNAが、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合、少なくとも一つの修飾糖部分、少なくとも一つの修飾塩基、又はこれらの組合せを含む、miRNA誘導体である、請求項13～19のいずれか1項に記載の方法。