

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 12 月 27 日(27.12.2013)



WIPO | PCT



(10) 国際公開番号

WO 2013/191242 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/066947
- (22) 国際出願日: 2013 年 6 月 20 日(20.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-140643 2012 年 6 月 22 日(22.06.2012) JP
- (71) 出願人: 公益財団法人がん研究会 (JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH) [JP/JP]; 〒1358550 東京都江東区有明 3 - 8 - 3 1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 石川 雄一 (ISHIKAWA Yuichi); 〒1358550 東京都江東区有明 3 - 8 - 3 1 公益財団法人がん研究会内 Tokyo (JP). 小野 宏 (ONO Hiroshi); 〒3440062 埼玉県春日部市粕壁東 1 - 1 1 - 1 - 1 3 0 2 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA Akira et al.); 〒1040031 東京都中央区京橋 3 - 3 - 4 京橋日英ビル 4 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: TEST METHOD AND TREATMENT MEANS FOR SMALL CELL LUNG CANCER HAVING POOR PROGNOSIS

(54) 発明の名称: 予後不良の肺小細胞がんの検査方法及び治療手段

(57) Abstract: [Problem] In small cell lung cancer (SCLC), there are a type having poor prognosis and a type having good prognosis. It has been demanded to detect small cell lung cancer at an earlier stage and establish a treatment method for small cell lung cancer. The present invention provides: a test method which can detect small cell lung cancer having poor prognosis; a means for treating small cell lung cancer having poor prognosis; and a method for screening for a drug for treating small cell lung cancer having poor prognosis. [Solution] It is found that HOTAIR (for which cDNA comprises the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1), which is lincRNA, is highly expressed in small cell lung cancer having poor prognosis. The present invention is a diagnosis method for determining whether or not small cell lung cancer is one having poor prognosis, wherein the prognosis of the small cell lung cancer is determined as being poorer when the amount of HOTAIR, which is lincRNA, expressed in a sample of the small cell lung cancer is higher. Further, siRNA which can inhibit the proliferation of small cell lung cancer in which HOTAIR is highly expressed is discovered.

(57) 要約: 【課題】 肺小細胞がん (SCLC) には、予後不良のがんと予後良好のがんがあり、早期の発見と治療方法の確立が求められている。本発明は、予後不良の肺小細胞がんを検出できる検査法、予後不良の肺小細胞がんを治療する手段、及び予後不良の肺小細胞がんを治療するための薬剤をスクリーニングする方法を提供する。【解決手段】 予後不良の肺小細胞がんは lincRNA である HOTAIR (その cDNA は配列番号 1 で表される塩基配列を有する。) が高発現していることを見出した。本発明は、肺小細胞がんが予後不良の肺小細胞がんであるか否かを判断するための診断方法であって、検体である肺小細胞がんにおける、lincRNA である HOTAIR の発現量が、高いほど予後不良であるとする診断方法である。更に、HOTAIR を高発現している肺小細胞がんの増殖を抑制することのできる siRNA を見出した。

WO 2013/191242 A1

明 細 書

発明の名称： 予後不良の肺小細胞がんの検査方法及び治療手段

技術分野

[0001] 本発明は、肺小細胞がんのうち、予後不良の肺小細胞がんを検出できる検査方法及びバイオマーカー、並びに治療手段に関する。

背景技術

[0002] 肺がんは、難治性のがんのひとつで、罹患率と死亡率は、ともに40歳代後半から増加し始め、高齢ほど高くなる。罹患数と死亡数に大きな差はなく、これは、肺がん罹患患者の生存率が低いことと関連しており、有用な検査診断法と治療法の開発が求められている。

肺がんを組織学的に分類すると、小細胞がん (Small cell lung cancer : SCLC) と非小細胞がん (Non-small cell lung cancer: NSCLC) の2つに大別される。大多数を占めるNSCLCは、さらに腺がん、扁平上皮がん、大細胞がん、腺扁平上皮がんなどの組織型に分類される。SCLCは、神経内分泌がんの組織型に分類され、肺がんの約15～20%を占め、一般にNSCLCに比べて転移し易く、増大し易い等の特異な様相を示す。SCLCに対しては、化学療法が主に行われており、通常は手術の対象となりにくいことから、新鮮材料の入手が難しく、研究が遅れがちであるため、SCLCの検査や治療につながるバイオマーカーの探索も進んでいない。

[0003] 近年、数多くのがん関連遺伝子が報告されているが、HOX遺伝子群の一つであるHOXCクラスターからantisenseに転写されるHOTAIRと呼ばれるRNA (以下単に「HOTAIR」という。) は、long intergenic non-coding RNA (lincRNA) と呼ばれるタンパクをコードしていない長鎖非コードRNAで、比較的最近見出されたがん関連遺伝子である。このHOX遺伝子群は、動物の体節をつくる遺伝子群であり、胎児期には体節をつくるのに寄与しているが、がんの発生や進展にも関わっている。また、HOTAIRはHOXDクラスターの遺伝子発現を制御していると考えられている。

原発性乳がん組織や転移性乳がん組織においてHOTAIRの高発現が確認され、原発性乳がん組織におけるHOTAIRの高発現が転移及び死亡の強力な予測因子として考えられている（非特許文献1、特許文献1）。これらの文献において、乳がんセルラインを用いてHOTAIRを強発現させると、PRC（Polycomb repressive complex）依存的に浸潤能や転移能を増進させ、siHOTAIRを用いると逆にこれらが抑制されることが報告されている。

また、HOTAIRは、大腸がんの予後不良や肝がんの転移に関与していることが報告されている（非特許文献2、3）。

なお、がんは臓器特性やフェノタイプ（表現型）によって発現する遺伝子やタンパク質などのバイオマーカーや薬剤感受性が異なるため、検査法や治療法はがん種ごとに検討される必要がある。乳がんの組織型は主に腺がん（浸潤性）、大腸がんは主に上皮性がんと腺がん、肝がんは主に上皮性がんであり、SCLCの組織型とは異なるため、これらの検査法や治療法はSCLCには適用することができないと考えられている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：US 2012/0004278

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Nature. 2010 Apr 15;464(7291):1071-1076

非特許文献2：Cancer Res. 2011 Oct 15;71(20):6320-6326.

非特許文献3：Int Med Res. 2011;39(6):2119-2128.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 肺小細胞がん(SCLC)には、予後不良のがんと予後良好のがんがある（例えば、実施例1、表1を参照のこと）。予後不良の肺小細胞がんは、発見時には既に転移、全身播種している可能性があることが指摘されている。その治療は困難であり、そのため、早期の発見と治療方法の確立が求められている

。

従って、本発明は、肺小細胞がんのうち、予後不良の肺小細胞がんを検出できる検査法とそのバイオマーカーを提供することを目的とする。

更に、本発明は、予後不良の肺小細胞がんの治療剤を提供することを目的とする。

更に、本発明は、予後不良の肺小細胞がんを治療するための薬剤をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、予後不良の肺小細胞がんにlincRNAであるHOTAIRが高発現していることを見出した。更に、HOTAIRを高発現している肺小細胞がんの増殖を抑制することのできるsiRNAを見出した。

即ち、本発明は、肺小細胞がん（SCLC）が予後不良の肺小細胞がんであるか否かを判断するための診断方法であって、検体である肺小細胞がん（SCLC）における、lincRNAであるHOTAIRの発現量を測定することから成り、HOTAIRの発現量が高いほど予後不良であるとする検査方法である。

また、本発明は、肺小細胞がん（SCLC）が予後不良の肺小細胞がんであるか否かを判断するために用いる肺小細胞がん検査診断用バイオマーカーであって、lincRNAであるHOTAIRから成り、lincRNAであるHOTAIRの発現量が、高いほど予後不良であるとする、予後不良肺小細胞がん検査診断用バイオマーカーである。

また、本発明は、この予後不良肺小細胞がん検査診断用バイオマーカーを定量するために使用するためのキットであって、lincRNAであるHOTAIRのcDNA（配列番号1）を定量可能なように増幅するプライマー及びポリメラーゼ、及び/又は該cDNAに対合させるプローブから成るキットである。

[0008] 更に、本発明は、lincRNAであるHOTAIRのcDNAの塩基配列（配列番号1）の801～819番目の塩基配列を含む配列番号1の塩基配列の連続する30塩基以下の塩基配列に相当するオリゴヌクレオチド及びその相補的オリゴヌクレオチドから成る2本鎖RNAを有効成分として含む予後不良肺小細胞

がん増殖抑制剤である。

更に、本発明は、lincRNAであるHOTAIRのcDNAの塩基配列（配列番号1）の801～819番目の塩基配列を含む、配列番号1の塩基配列の連続する30塩基以下の塩基配列に相当するオリゴリボヌクレオチド及びその相補的オリゴリボヌクレオチドから成る2本鎖RNAを含む予後不良肺小細胞がん増殖抑制用キットである。

更に、本発明は、ヒト培養肺小細胞がん細胞を用いて、lincRNAであるHOTAIRの発現の阻害又は抑制について、候補薬剤をスクリーニングすることから成る、予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤のスクリーニング方法である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]小細胞肺がん（SCLC）組織を示す写真である。図の左側のSCLC組織(cancer)は、ほぼ裸核に近く核小体が不明瞭な小型腫瘍細胞のシート状増殖の様相を示し、図の右側の正常組織(normal)は、肺泡構造が明瞭な様相を示す。点線で示す境界に沿って切り取る。

[図2]35人のSCLC患者を、SCLC組織におけるHOTAIR発現レベルに基づいて並べた図である。図中の縦軸はACTBに対するHOTAIRの発現レベルを示す。ACTBは β -アクチンを示す。図中の横線は高HOTAIR発現グループ（n=12）と低HOTAIR発現グループ（n=23）の境界線（HOTAIR/ACTB比=1.368）を示す。

[図3]HOTAIRの発現レベルと臨床的特徴を示す図である。図中、“high-HOTAIR”はHOTAIR/ACTB比が1.368以上の高HOTAIR発現グループ、“low-HOTAIR”はHOTAIR/ACTB比が1.368未満の低HOTAIR発現グループを示す。(A) NAC(-) AC(+)-SCLC患者の肺小細胞がん（SCLC）の無再発率を示す。SCLCが再発するに従って数値（無再発率）は下がる。(B) NAC(-) AC(+)-SCLC患者の肺小細胞がん（SCLC）に対する生存率を示す。SCLCのみの理由により死亡した場合に生存していないとし、SCLC以外の理由により死亡した場合には生存したものとみなす。

[図4](A) qRT-PCRにより調べたSCLC細胞株のHOTAIR発現レベルを示す。HOTAIRの発現量はGAPDHの発現量に対して標準化した。縦軸はGAPDHに対するHOTAIR

の発現量を示す。(B) SBC-3細胞株におけるRNA干渉（#1～#3のsiHOTAIR）によるHOTAIRの発現量の減少を示す。縦軸はGAPDHに対するHOTAIRの発現量を示す。また、siGFPはネガティブコントロールである。(C) RNA干渉によるSBC-3細胞株の増殖の抑制を示す。横軸は培養開始後の経過時間を示し、縦軸は細胞数を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明の一態様は、予後不良の肺小細胞がん（SCLC）を、HOTAIRの発現レベルに基づいて判定する検査方法である。

本発明において「予後不良」とは、SCLCの手術後及び術後化学療法施行後に再発率が高いことをいう。SCLCの予後不良により死に至ることが多い。

[0011] HOTAIRの発現レベルを調べるために、まずSCLCの手術検体からSCLC成分を採取する。

迅速診断とその後の病理診断にて、採取した検体が、肺小細胞がんであることを確認する必要がある。診断方法としては、迅速診断だけでもよいが、迅速診断と病理診断の両方を行うことが好ましい。

迅速診断は、例えば、以下のようにして行う。凍結検体でクライオスタットを用いてスライスし、ヘマトキシリン - エオジン染色を行うことによりSCLC成分を目視にて識別する。SCLCは、正常細胞に比べて小型でほぼ裸核に近く、核小体も不明瞭であり、シート状増殖を示すという特徴があるため、目視にておおよそ識別可能である。

病理診断は、例えば、以下のようにして行う。手術検体をホルマリンで数日間固定し、その後サンプルを切り出す。例えば、肺をCT scan画像と同様におよそ5mmの厚さでスライスして、サンプルを得る。それぞれの面における腫瘍領域と周辺に関連領域を中心に更にブロックサイズに切り分けることが好ましい。こうして作成された検体をパラフィン包埋したものを薄切し、プレパレートを作成する。これらの内、SCLC腫瘍成分を多く含む領域で神経内分泌マーカー（例えば、Chromogranin A, Synaptophysin, NCAM/CD56）の抗体を用いた免疫染色を行い、神経内分泌性を確認する。

[0012] 上記のようにSCLCと判断した検体を、HOTAIRの発現レベルを調べるまで、例えば、次のように保存してもよい。迅速診断時に切り分けた手術検体の一部を研究用としてon iceで検体番号を付与したセラムチューブに3mm角大の組織切片として数個ずつ取り分ける。その後、液体窒素に投入し凍結して、-80℃冷凍庫に保存する。

HOTAIRの発現レベルを調べる際には、この保存しておいた検体を、例えば、次のようにして調製する。この保存検体のセラムチューブを-80℃冷凍庫より出し、チューブ内の組織片を1つ滅菌セッションで取り出し、同じ番号を付与した新たなセラムチューブ内に入れ、直ちに液体窒素に投入する。これを実験室に運び、1症例ずつクライオスタット内に予め用意していたステージの上に置き、蒸留水を検体周囲にまき、アイシングスプレーを用いて凍結させる。これを所定の場所に設置し薄切する。薄切検体はプレパラートに2つほど接着させ、直ちに固定液内（ホルマリン+メタノール1:1溶液）へ投入する。このプレパラートをヘマトキシリン-エオジン染色し、腫瘍領域を特定する。一方で、ステージ上の残りの検体は周囲の凍結蒸留水を可能な限り除去し再びセラムチューブにもどし、直ちに液体窒素へ投入する。その後に、組織からのRNA抽出の際にはこのプレパラートに対応する腫瘍成分をon iceで滅菌したメスで切り分け使用する。

[0013] 本発明の検査方法は、検体である肺小細胞がん（SCLC）における、lincRNAであるHOTAIRの発現量を測定することから成り、HOTAIRの発現量が高いほど予後不良であるとするものである。

本発明で用いられる予後不良肺小細胞がん診断マーカーは、lincRNAであるHOTAIRから成る。

HOTAIRのcDNAは配列番号1で表される塩基配列から成る（NCBI Accession No. : NR_003716.2）。

[0014] 本発明において予後不良肺小細胞がんの判定を行う場合、HOTAIRの発現量は、内部標準遺伝子の発現量に対する相対量として表すことが好ましい。

内部標準となる遺伝子としては、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲ

ナーゼ（「GAPDH」ともいう。）、 β -アクチン（「ACTB」ともいう。）、IP08等が挙げられるが、組織検体を扱う場合に β -アクチン（配列番号2、Genbank Accession No.:NM_001101.3）を、一方、細胞検体を扱う場合にはGAPDH（配列番号3、Genbank Accession No.:NM_002046.3）が好ましい。また、がん組織におけるHOTAIRを調べる場合には、内部標準として β -アクチン遺伝子を用い、がん細胞におけるHOTAIRを調べる場合には、内部標準としてGAPDH遺伝子を用いることが好ましい（BMC Mol Biol. 2008, 9:103）。

[0015] 従って、本発明の検査方法は、更に、肺小細胞がん（SCLC）における、内部標準となる遺伝子の発現量を測定することを含み、内部標準となる遺伝子の発現量に対する、lincRNAであるHOTAIRの発現量が、高いほど予後不良であるとしてもよい。

また、本発明の予後不良肺小細胞がん診断マーカーは、更に、内部標準となる遺伝子から発現するmRNAを含み、内部標準となる遺伝子から発現するmRNAの発現量に対する、lincRNAであるHOTAIR領域の発現量が、高いほど予後不良であるとしてもよい。

予後不良肺小細胞がんの判定を下式のH/R比を用いて行ってもよい。このH/R比が基準より高いと予後不良、基準より低いと良性と判断でき、また、このH/R比が基準より高いほど肺小細胞がんの再発度が高いと判定できる。基準となるH/R比は、本研究の症例におけるROC curveを用いた検討では、例えば、1.368であった。

$$H/R = \text{HOTAIR発現量} / \text{内部標準遺伝子発現量}$$

[0016] HOTAIRと内部標準遺伝子の発現量の検出は、例えば、SYBR Green法やTaqMan法など各種方法を用いたRT-PCR法、Northern blot法、DNAチップ（アフィメトリクス社製等）など、任意の公知の遺伝子発現定量法を用いて行うことができる。

[0017] RT-PCR法の1つであるリアルタイム定量PCR法（qRT-PCR）は微量なDNAを高感度かつ定量的に検出できるという点で好ましい。RT-PCRでは、HOTAIR(lincRNA)を逆転写してfirst strand cDNAを作成し、これを鋳型にHOTAIR cDNAに

特異的なプライマーによりPCR増幅する。逆転写反応は、例えば、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems社) などを用いることができる。リアルタイム定量PCR法 (qRT-PCR) は、例えば、Applied Biosystems社が提供するTaqMan(登録商標) Gene Expression Assaysを利用することができる。増幅産物は、電気泳動等により分離し、定量することもできるが、Applied Biosystems社ABI PRISM 7000 Sequence Detection SystemやRoche社のLC480 systemなどのリアルタイム定量PCR機器を利用して定量することが正確かつ簡便で好ましい。

リアルタイム定量PCR以外に、様々な測定法 (DNAアレイ、ノーザンブロット、ATAC-PCR法など) を用いて、HOTAIR(lincRNA)を定量することができる。

[0018] PCR用プライマーとしては、通常、HOTAIR cDNA (配列番号 1) や内部標準となる遺伝子のポリヌクレオチドの少なくとも50塩基、好ましくは100~1,000塩基のポリヌクレオチド部分を挟む約10~30個程度の塩基配列からなる断片が用いられる。

プローブとしては、通常、配列番号 1 の塩基配列から成るポリヌクレオチド(HOTAIR cDNA)の連続した少なくとも15個の塩基配列からなる断片が用いられる。プローブの塩基配列は通常15~30塩基、好ましくは20~25塩基である。

HOTAIR(lincRNA)又はそのcDNAの発現量を測定するために、DNAアレイやノーザンブロットを用いる場合には、上記プローブ、ATAC-PCR法などを用いる場合には、上記プライマー、リアルタイム定量PCR法を用いる場合には、上記プライマーと上記プローブが用いられている。

[0019] HOTAIRを検出する好ましい方法は、手術腫瘍組織からtotal RNAを抽出し、HOTAIRの上記プライマーを用いてqRT-PCR法で発現状況を確認する。その際、内因性コントロールとして、組織では β -アクチン、細胞ではGAPDHを用いることが好ましい。

HOTAIRの発現量の検出方法は、例えば、以下の工程から成る。

a) 肺小細胞がん (SCLC) 患者の手術検体から、SCLC組織を採取する工程

、

- b) 得られたSCLC組織から、RNAを抽出する工程、
- c) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る工程、
- d) 得られたcDNAから少なくともHOTAIRの一部を増幅する工程、及び
- e) 増幅された少なくともHOTAIRの一部を検出する工程

内部標準遺伝子の発現量を利用する場合には、d～e工程に内部標準遺伝子の増幅及び検出する工程を含み、更に、両発現量を比較する工程を加えればよい。

[0020] 本発明の予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤は、lincRNAであるHOTAIRのsiRNAを有効成分として含む。

このsiRNAは、配列番号1の塩基配列の801～819番目の塩基配列を含む配列番号1の塩基配列中の連続する19塩基を少なくとも含む、配列番号1の塩基配列の連続する30塩基以下、好ましくは27塩基以下、好ましくは23塩基以下の塩基配列に相当するオリゴリボヌクレオチド、その相補的オリゴリボヌクレオチド、又はこれらから成る2本鎖RNAである。

[0021] 本発明で用いるRNA断片としては、標的RNAのセンス又はアンチセンスのものでよいが、これらはRNaseで容易に分解され、また効果が劣ると考えられるため、これらから成る2本鎖RNAが好ましく用いられる。この2本鎖RNAは通常センスとアンチセンスの2本を別々に合成し、それをハイブリダイズさせて2本鎖にして用いられる。

これらの特定の塩基配列に「相当する」オリゴリボヌクレオチドとは、この遺伝子が転写されて生成するlincRNAの、特定の塩基配列に相当する部分に相補的なRNAという意味であり、具体的にはこの特定のDNA配列のTをUに置き換えたものという意味である。

[0022] 本願発明のsiRNAは、ヌクレアーゼによる分解を防ぐ処理を施した修飾RNAであってもよく、例えば、2'-O-メチル化や4'-チオ化したRNAアプタマーなどであってもよい。また、抑制能を良好にするため、siRNAの3'末端にoverhang配列（例えば、dTdT、UU、UG等）を付加してもよい(EMBO J. 20: 6877-6888.

)。

また予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤は、他の公知の腫瘍増殖抑制剤等との合剤であってもよい。本発明の予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤は、このような他の薬剤を含むキットの形態であってもよいし、滅菌等張塩水、防腐剤、緩衝剤などの薬学的に許容される媒体を含有してもよい。

また、siRNAをリポソームなど適当なキャリアーに封入して投与してもよい。

また、本発明の予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤は、上記予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤を製剤化したものを希釈剤などと混合して投与するための注射用キットや、製剤化した個々の製剤を投与するための錠剤用キットなどのキットとして提供してもよい。

[0023] siRNAを細胞に導入する手段については、特に制限はなく、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション、ウイルスベクターを用いる方法などが挙げられるが、リポソーム等に基づく市販のトランスフェクション試薬を用いるのが簡便である。

高純度・高品質のsiRNA(siHOTAIR)を直接体内へ投与する場合や全身投与の場合などには、静脈内投与で行ってもよく、また病巣に対する直接投与の場合には、内視鏡で患部に投与するほか、手術時に病巣に接種することで行ってもよい。

[0024] 予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤は以下の方法によりスクリーニングすることができる。具体的には、本発明の方法は、ヒト培養肺小細胞がん細胞を準備し、この細胞株を候補薬剤の存在下で培養すること等により候補薬剤と肺小細胞がん細胞とを接触させ、lincRNAであるHOTAIRの発現の阻害又は抑制を調べて候補薬剤の一次スクリーニングを行い、その後、候補薬剤によるヒト培養肺小細胞がん細胞の増殖能及び/又は浸潤能の抑制を調べて二次スクリーニングを行う。スクリーニングに用いるSCLC細胞としては、HOTAIR RNAの発現量の高い細胞株が好ましく、このようなSCLC細胞として、例えば、SBC-3細胞株が挙げられる。SBC-3細胞は、HOTAIR RNAの発現量が高いため、予後不

良肺小細胞がんのセルラインに相当すると考えられる。

この方法において、lincRNAであるHOTAIRの発現の阻害又は抑制の程度は、候補薬剤を添加しない対照との比較実験によって判定できる。発現レベルは、肺小細胞がん細胞株から得たtotal RNA又はmRNA又はポリA(+)RNAについて、又は逆転写酵素-PCR (RT-PCR)法によってRNAから合成されたcDNAについて、蛍光又は放射性標識したプローブを用いるハイブリダイゼーション法（例えばノーザンハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、DNAマイクロアレイ、組織マイクロアレイなど）によって決定することができる。

RT-PCR、PCR用プライマー、プローブとしては上記のものを使用できる。

このスクリーニングにおいて、HOTAIRの発現が、候補薬剤無添加の対照と比べて、有意に阻害又は抑制され、さらに、肺小細胞がん細胞の増殖能、浸潤能が抑制された場合に、この候補薬剤を肺小細胞がん転移抑制剤とすることができる。

実施例

[0025] 以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

実施例 1

この実施例で用いた臨床検体を以下のように調整した。

1995年と2010年の間にがん研究会のがん研究所病院で手術を受けた複数のSCLC患者から、手術前に書面によるインフォームドコンセントを得た上で、35のSCLC組織サンプルを得た。また同じ患者から、16の非がん組織サンプルを得た。すべての検体を直ちに液体窒素中で凍結し、-80℃で保存し、RNA抽出を行った。

SCLC組織サンプルの採取は以下のようにして行った。迅速診断のために提出された肺がん組織を含む肺組織を用いて、がん部及び非がん部（がん部より十分に離れた領域）を切除し（図1）、氷上でセラムチューブに入れ、ただちに液体窒素に投入、凍結した。その後の病理診断においてSCLCと診断し

た症例の迅速診断時保存組織切片を用いて以下の検討を行った。なお、RNA抽出前に、すべての迅速診断時保存組織切片を、クライオスタットで再度スライスし、ヘマトキシリン - エオジン染色を行っておき、後でSCLC成分が含まれることを確認した。

[0026] 患者の背景や臨床病理学的因子を表1に示す。

SCLCの再発は、術後経過観察中（術後最長で約15年）の再発精査にて肺および他臓器に新たな病変を認めたものをいい、レトロスペクティブに診療録や画像を検索した。表中、再発した転移先を記載したが、複数に転移したものを含む。

生存又は死亡については、診療録やがん研有明病院病歴室の後追い調査結果（術後最長で約15年）を用いて追跡調査したものを示す。

[0027] また、手術中に迅速診断のために病理部へ検体が提出された時点で、採取、保存しておいた上記の35のSCLCサンプルから、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)を用いてHOTAIR発現レベルを調べた。qRT-PCRは以下のようにして行った。

RNeasyミニキット又はRNeasyミニキットプラス（Qiagen社）を用いて、組織及び細胞からtotal RNAを抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA(R) kit（AB社製、カタログ番号4387406）を用いて、30ngの全RNAからcDNAを生成した。得られたcDNAを45サイクルのPCR増幅を行った後、LightCycler(登録商標)480 SYBR Green I Master protocol（Roche社、カタログ番号4707516）と、下記プライマーを用いてリアルタイムPCR反応を行い、各遺伝子の発現量を調べた。LightCycler(登録商標)480 real time PCR System（Roche社）上の96ウェルプレートの各サンプルの各遺伝子についてそれぞれ3回試験を行った。組織試料及び異種移植片についてHOTAIR RNAの発現量を β -アクチン(ACTB)の発現量に対して標準化した。

プライマー：

HOTAIR (F) : 5'-GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC-3'（配列番号4）

HOTAIR (R) : 5'-ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC-3'（配列番号5）

ACTB (F) : 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3' (配列番号 6)

ACTB (R) : 5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3' (配列番号 7)

[0028] 上記のように、定量RT-PCRを用いて、各新鮮凍結サンプルからRNAを評価した。同じ被験者群の35のSCLC組織と15の非がん組織におけるHOTAIR/ACTB比を調べた(図2)。HOTAIR/ACTB比が1.368より上のレベルを高HOTAIR発現とした。この基準によれば、SCLC患者35人のうち12人はHOTAIRの発現が高いと分類され、23人は低いと分類された。

これら2つのグループの臨床病理学的因子を表1に示す。高HOTAIR発現グループは、低HOTAIR発現グループよりも、より多くの再発と死亡を示した。

[0029] [表1]

		SCLC全体 (n=35)		高HOTAIR発現 (n=12)		低HOTAIR発現 (n=23)	
		number		number		number	
平均年齢		65.8		63.3		67.1	
性別							
	M	25		9		16	
	F	10		3		7	
病理学的段階							
	1a	11		1		10	
	1b	4		2		2	
	2a	7		3		4	
	2b	2		0		2	
	3a	10		6		4	
	3b	1		0		1	
	4	0		0		0	
SCLC再発		15		8 (67%)		7 (30%)	
	brain	6		4		2	
	lung	2		2		0	
	mediastinal LNs	4		3		1	
	stomach	1		0		1	
	liver	3		1		2	
	adrenal gl.	2		1		1	
	others (pleural eff.)	1		0		1	
生存							
	生存	19		5 (42%)		14 (61%)	
	死亡	16		7 (58%)		9 (39%)	
	lung cancer	11		6		5	
	other malignancy	2		1		1	
	other disease	2		0		2	
	unknown	1		0		1	

[0030] 実施例 2

上記35のSCLCサンプルのうち、病理診断で他の組織型を含まない純粋なSCL

C(pure-SCLC)と診断された症例に限定し、且つ、腫瘍の縮小効果を狙って行われる化学療法 (Neo-adjuvant chemotherapy (NAC):ネオアジュバント化学療法) の影響を排除するために、手術前にこの化学療法を行っておらず、手術で腫瘍を取り除いた後に補助療法としての術後化学療法 (Adjuvant chemotherapy(AC):アジュバント化学療法) を行った患者 (NAC(-)AC(+)-SCLC) の18のサンプルについて、高HOTAIR発現グループ(n=8)と低HOTAIR発現グループ(n=10)に分けて、SCLCに起因する患者の死亡及びSCLCの再発について調べた。結果を図3 A及びBに示す。

高HOTAIRグループは、低HOTAIRグループよりも、SCLCの再発が顕著に高く (図3 A)、SCLCに起因する患者の死亡も顕著に高い (図3 B)。

[0031] 実施例3

この実施例で用いた細胞株を以下のように調整した。

SCLC細胞株COLO-668、COR-L51、COR-L88、DMS-79はECACC (The European Collection of Cell Cultures) から得た。SCLC細胞株DMS-53、LU-134A、MS-1、SBC-3、SBC-5、SBC-1、A549とMRC-5は、JCRB (Japanese Collection of Research Bio-resources) 又は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (BRC) から得た。これらの細胞株を、37℃、5%CO₂インキュベーター中で、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、ナカライテスク社 カタログ番号08488-55、500ml) で培養した。このダルベッコ改変イーグル培地は、200mMのL-アラニール-L-グルタミン溶液 (ナカライテスク社 カタログ番号04260-64) 5.0 ml、抗生物質抗真菌混合ストック溶液 (ナカライテスク社 カタログ番号02892-54) 5.5 ml、及びウシ胎児血清 (Biowest社 カタログ番号S1560) 50mlを含む。

[0032] 実施例1と同様に、これら細胞株におけるHOTAIR発現レベルを調べた。HOTAIRの発現量をGAPDHの発現量に対して標準化した。GAPDH用プライマーとして下記のプライマーを用いた。結果を図4 Aに示す。

GAPDH (F) : 5'-CCGGGAACTGTGGCGTGATGG-3' (配列番号8)

GAPDH (R) : 5'-AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTT-3' (配列番号9)

[0033] HOTAIRの発現量が高かったSBC-3細胞株について、HOTAIRのRNA干渉実験を以下のように行った。Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen社製、カタログ番号13778-075) を使用して、製造元の指示に従って、細胞に、HOTAIRを標的とする20nMのsiRNAを導入した。この導入の効率は、標識ポジティブコントロール (BLOCK-IT™のAlexa Fluor(R)赤色蛍光オリゴ (Invitrogen社製、カタログ番号14750-100)) を導入後、細胞を5%CO₂を含む加湿環境下で37℃で72時間インキュベーションした後、蛍光顕微鏡 (ライカDMIRE2) を用いて評価した。その結果、siRNAを20nM (最終濃度) 及びLipofectamine RNAiMAXを1.5μlを用いたが、これはSBC-3を24ウェルベースで分析するために最適な条件と考えられる (形質導入効率: 100%、ノックダウン効率: 50%)。この条件でSBC-3に#1-3 siHOTAIR (下記) を導入し、72時間後に、このsiRNAを導入された細胞からtotal RNAを抽出して、定量RT-PCR解析を行った。比較のため、ネガティブコントロールであるGFP遺伝子について同様にRNA干渉を行った。定量RT-PCRは実施例1と同様にして行った。

#1 siHOTAIR :

センス : 5'-GAACGGGAGUACAGAGAGAUU-3'、(配列番号10、配列番号1の801~819番目に相当する。)

アンチセンス : 3'-UUCUUGCCCUCAUGUCUCUCU-5'

#2 siHOTAIR :

センス : 5'-CCACAUGAACGCCAGAGAUU-3' (配列番号11、配列番号1の840~858番目に相当する。)

アンチセンス : 3'-UUGGUGUACUUGCGGGUCUCU-5'

#3 siHOTAIR :

センス : 5'-UAACAAGACCAGAGAGCUGUU-3' (配列番号12、配列番号1の1005~1023番目に相当する。)

アンチセンス : 3'-UUAUUGUUCUGGUCUCUCGAC-5'

siGFP :

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

アンチセンス : 3' -TTGAUGUUGUCGGUGUUGCAG-5 '

[0034] HOTAIR RNAの発現量を図4 Bに示す。#1-3 siHOTAIR導入により、HOTAIR RNAの発現量が減少したことが分かる。

更に、#1-3 siHOTAIR（下記）を導入後のSBC-3細胞株を37℃、5%CO₂インキュベーター中で、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、ナカライテスクカタログ番号08488-55、500ml）で培養した。このダルベッコ改変イーグル培地は、200mMのL-アラニル-L-グルタミン溶液（ナカライテスク カタログ番号04260-64）5.0 ml及びウシ胎児血清（Biowest社 カタログ番号S1560）50mlを含む。培養開始後、0, 24, 48, 72, 96時間後のそれぞれの時点における細胞数を自動セルカウンター（BioRad社、TC-10）でカウントした。結果を図4 Cに示す。#1 siHOTAIRの導入により、SBC-3細胞株の増殖が抑制されたことが分かる。

請求の範囲

- [請求項1] 肺小細胞がん（SCLC）が予後不良の肺小細胞がんであるか否かを判断するための診断方法であって、検体である肺小細胞がん（SCLC）における、lincRNAであるHOTAIR（そのcDNAは配列番号1で表される塩基配列を有する。）の発現量を測定することから成り、HOTAIRの発現量が高いほど予後不良であるとする検査方法。
- [請求項2] 更に、肺小細胞がん（SCLC）における、内部標準となる遺伝子の発現量を測定することを含み、内部標準となる遺伝子の発現量に対する、lincRNAであるHOTAIRの発現量が、高いほど予後不良であるとする請求項1に記載の検査方法。
- [請求項3] 前記内部標準となる遺伝子が、 β -アクチン又はGAPDHである請求項2に記載の検査方法。
- [請求項4] 肺小細胞がん（SCLC）が予後不良の肺小細胞がんであるか否かを判断するために用いる肺小細胞がん検査診断用バイオマーカーであって、lincRNAであるHOTAIR（そのcDNAは配列番号1で表される塩基配列を有する。）から成り、lincRNAであるHOTAIRの発現量が、高いほど予後不良であるとする、予後不良肺小細胞がん検査診断用バイオマーカー。
- [請求項5] 更に、内部標準となる遺伝子から発現するmRNAを含み、内部標準となる遺伝子から発現するmRNAの発現量に対する、lincRNAであるHOTAIR領域の発現量が、高いほど予後不良であるとする、請求項4に記載の予後不良肺小細胞がん検査診断用バイオマーカー。
- [請求項6] 請求項4に記載の予後不良肺小細胞がん検査診断用バイオマーカーを定量するために使用するためのキットであって、lincRNAであるHOTAIRのcDNA（配列番号1）を定量可能なように増幅するプライマー及びポリメラーゼ、及び/又は該cDNAに対合させるプローブから成るキット。
- [請求項7] lincRNAであるHOTAIRのcDNAの塩基配列（配列番号1）の801～819番

目の塩基配列を含む配列番号 1 の塩基配列の連続する 30 塩基以下の塩基配列に相当するオリゴリボヌクレオチド及びその相補的オリゴリボヌクレオチドから成る 2 本鎖 RNA を有効成分として含む予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤。

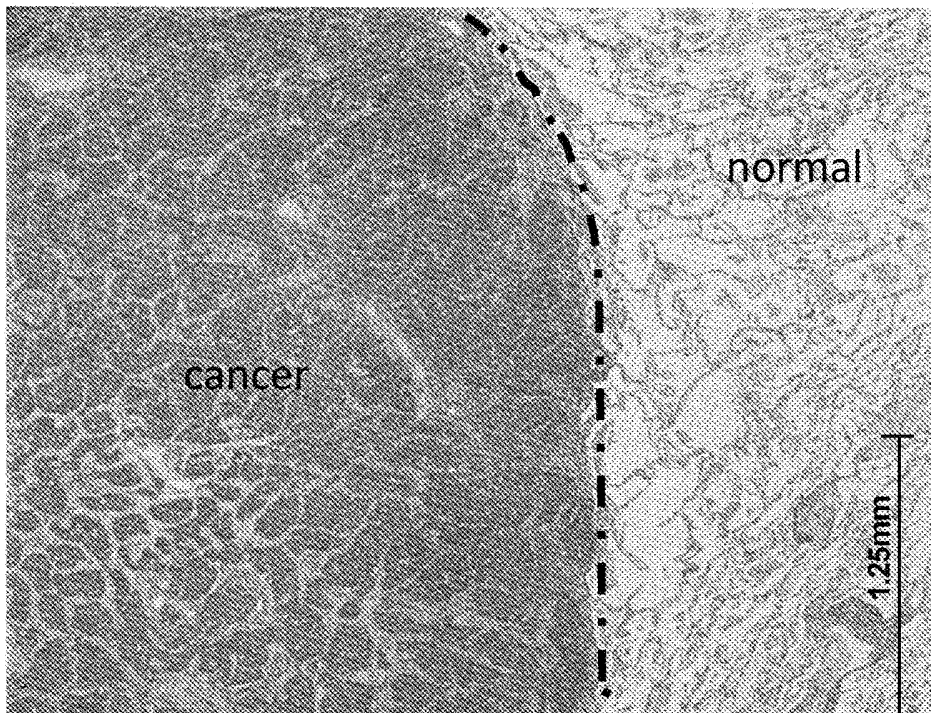
[請求項8] lincRNAであるHOTAIRのcDNAの塩基配列（配列番号 1）の801～819番目の塩基配列を含む、配列番号 1 の塩基配列の連続する 30 塩基以下の塩基配列に相当するオリゴリボヌクレオチド及びその相補的オリゴリボヌクレオチドから成る 2 本鎖 RNA を含む予後不良肺小細胞がん増殖抑制用キット。

[請求項9] ヒト培養肺小細胞がん細胞を用いて、lincRNAであるHOTAIR（そのcDNAは配列番号 1 で表される塩基配列を有する。）の発現の阻害又は抑制について、候補薬剤をスクリーニングすることから成る、予後不良肺小細胞がん増殖抑制剤のスクリーニング方法。

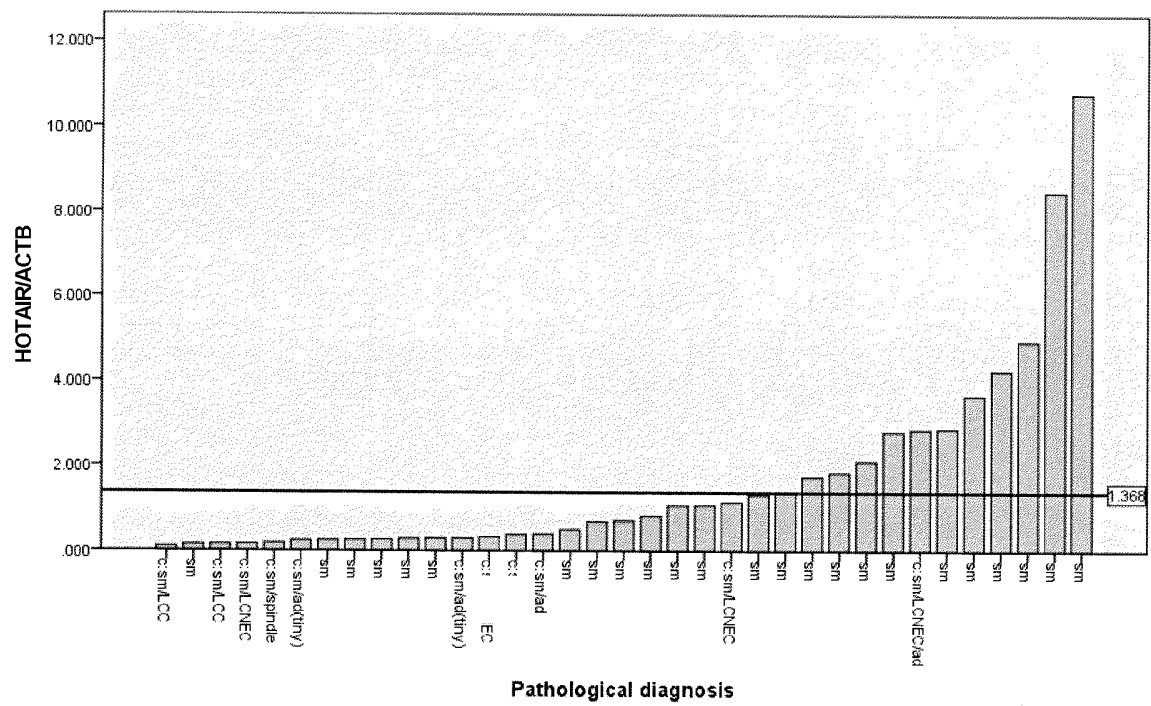
[請求項10] ヒト培養肺小細胞がん細胞株を候補薬剤の存在下で培養し、lincRNAであるHOTAIR（そのcDNAは配列番号 1 で表される塩基配列を有する。）の発現の阻害又は抑制を調べることから成る請求項 9 に記載の方法。

[請求項11] 前記ヒト培養肺小細胞がん細胞株としてSBC-3細胞株を用いる請求項 9 又は 10 に記載の方法。

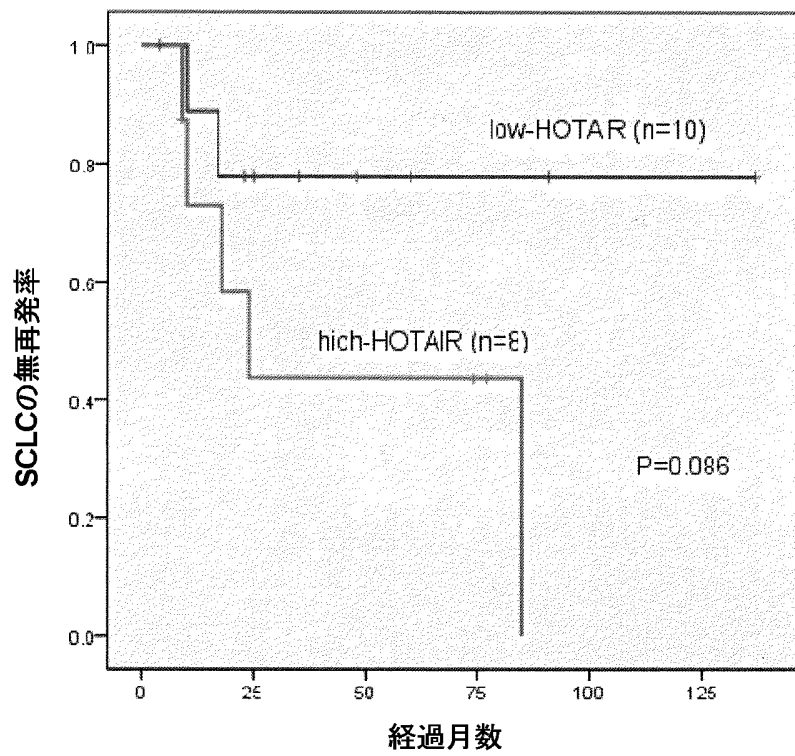
[図1]



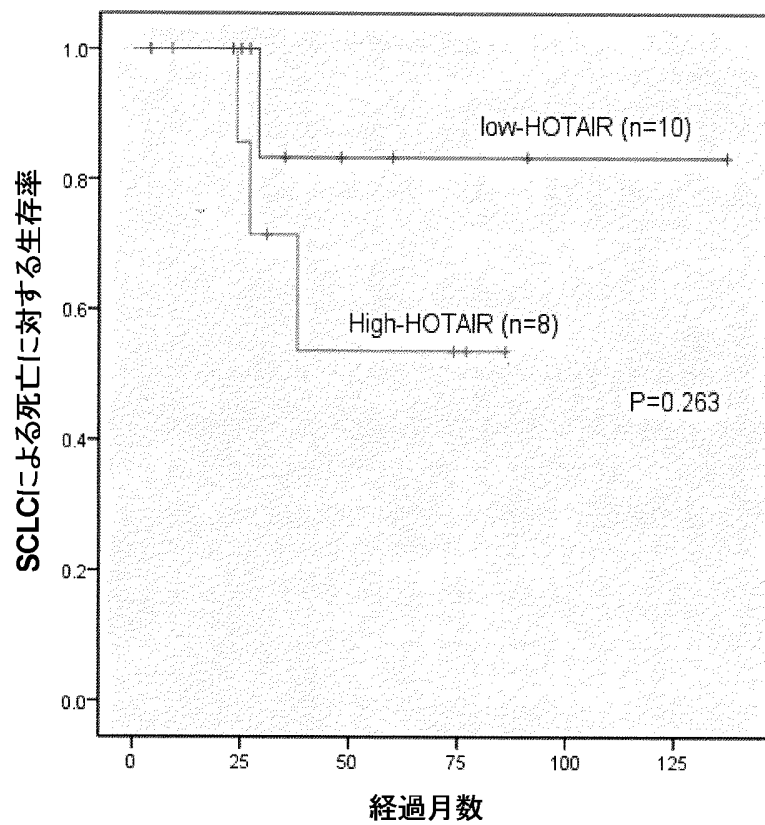
[図2]



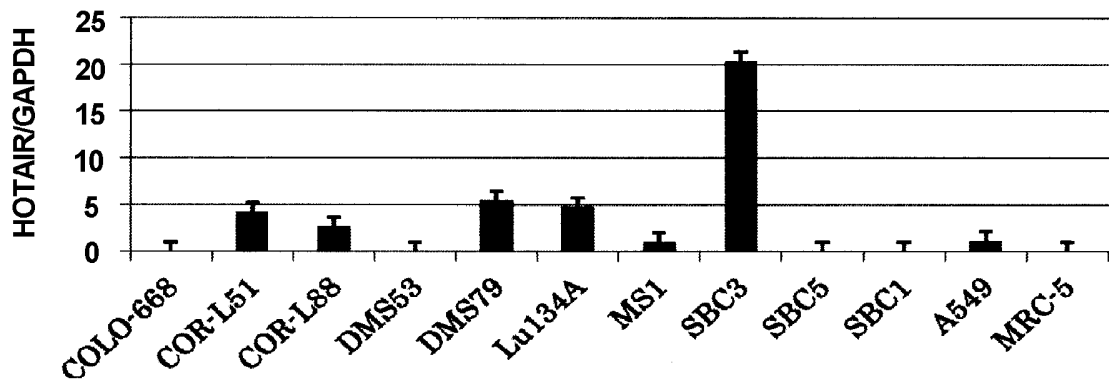
[図3A]



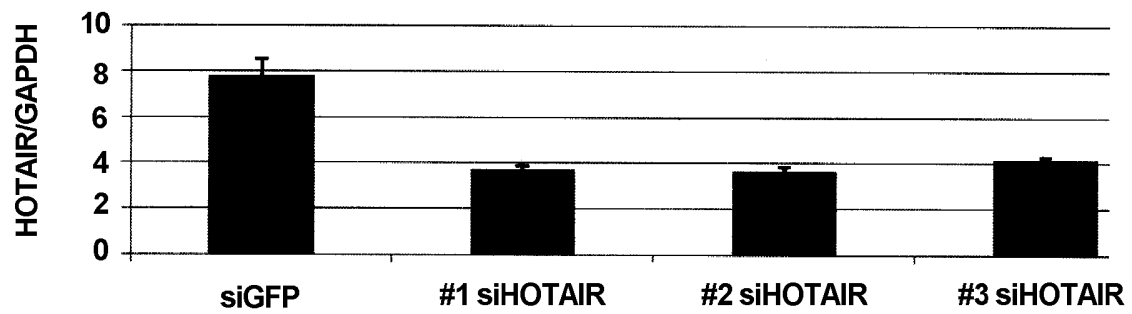
[図3B]



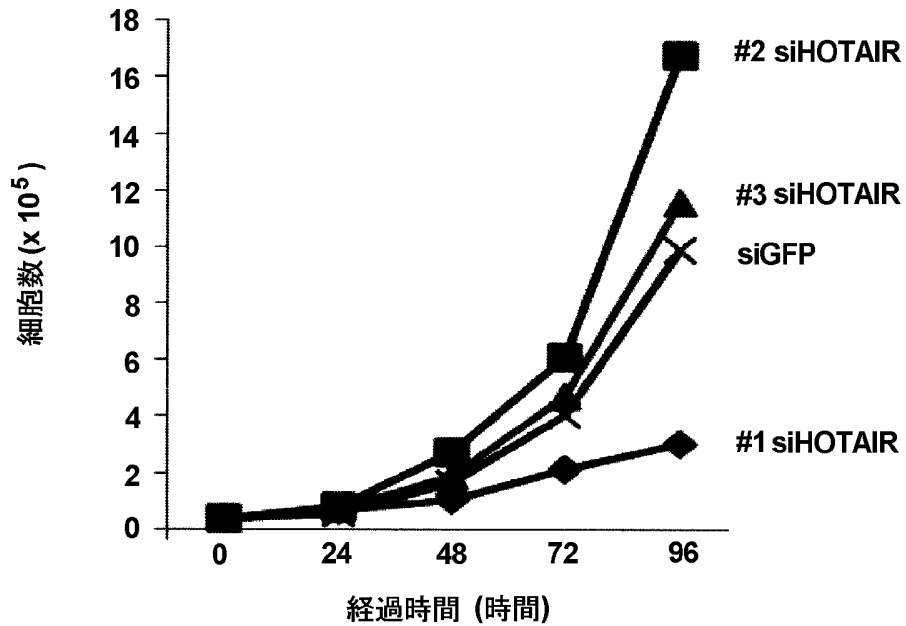
[図4A]



[図4B]



[図4C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066947

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/00-15/90

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), PubMed, G-Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Toshihiko IIZUKA et al., "Haisengan ni Okeru Chosa noncoding RNA no Hatsugen to Idenshi Hen'i, Yogo tonosokan", Nippon Byori Gakkaishi, 26 March 2012 (26.03.2012), vol.101, no.1, page 258 (2-D-11)	4-11
Y	Hiroshi ONO et al., "Haishosaibogan ni Okeru HOTAIR no Hatsugen wa Jutsugo Saihatsu to Kanren shiteiru", Nippon Byori Gakkaishi, 26 March 2012 (26.03.2012), vol.101, no.1, page 258 (2-D-12)	4-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2013 (05.07.13)

Date of mailing of the international search report
16 July, 2013 (16.07.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066947

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database GenBank [online], Accession No. NR_003716.2, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_003716.2 > 24-FEB-2012 uploaded, [retrieved on 2013-07-05] Definition: Homo sapiens HOX transcript antisense RNA (non-protein coding) (HOTAIR), antisense RNA.	4-11
Y	Takara Bio Inc., Tokushu 1 RNAi no Kiso to sono Oyo, BIO VIEW, 2004, no.45, pages 2 to 13	4-11
Y	Nobuyuki HARA et al., "Tokushu/Lung cancer Tissue types and clinical characteristics", Rinsho to Kenkyu, 1997 Nen 6 Gatsu, vol.74, no. 6, pages 1333 to 1336	4-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066947

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066947

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-3
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 3 pertain to diagnostic methods for a human being and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））															
Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(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（I P C））															
Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/00-15/90															
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															
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1 9 2 2 - 1 9 9 6 年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1 9 7 1 - 2 0 1 3 年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1 9 9 6 - 2 0 1 3 年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1 9 9 4 - 2 0 1 3 年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年	日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年	日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年	日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年				
日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年														
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年														
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年														
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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）															
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, G-Search															
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	飯塚 利彦 他, 肺腺癌における長鎖 noncoding RNA の発現と遺伝子変異、予後との 相関 日本病理学会誌, 2012. 03. 26, Vol. 101, No. 1, p. 258 (2-D-11)	4-11													
Y	小野 宏 他, 肺小細胞癌における HOTAIR の発現は術後再発と関連している 日本病理学会誌, 2012. 03. 26, Vol. 101, No. 1, p. 258 (2-D-12)	4-11													
<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。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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）</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「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	「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	「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	「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	「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）	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「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	「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														
「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	「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														
「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）	「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														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 0 5 . 0 7 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 1 6 . 0 7 . 2 0 1 3													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 三原 健治 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 2 9 3 7												

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	Database GenBank [online], Accession No. NR_003716.2, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_003716.2 > 24-FEB-2012 uploaded, [retrieved on 2013-07-05] Definition: Homo sapiens HOX transcript antisense RNA (non-protein coding) (HOTAIR), antisense RNA.	4-11
Y	タカラバイオ株式会社, 特集1 RNA i の基礎とその応用 BIO VIEW, 2004, No. 45, p. 2-13	4-11
Y	原 信之 他, 特集／肺がん 組織型と臨床的特徴 臨床と研究, 1997年6月, 第74巻, 第6号, p. 1333-1336	4-11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1 - 3 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 - 3 はヒトの診断方法に関するものであって、PCT17条(2) (a) (i) 及びPCT規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。