

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2005-526233
(P2005-526233A)**

(43) 公表日 **平成17年9月2日(2005.9.2)**

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 E	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-557518 (P2003-557518)	(71) 出願人	591183991
(86) (22) 出願日	平成14年12月30日 (2002.12.30)		ダナーファーバー キャンサー インステ イテュート, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月20日 (2004.8.20)		DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INCORPOR ATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/041795		アメリカ合衆国 02115 マサチュー セッツ, ボストン, ビニー ストリート 44
(87) 国際公開番号	W02003/057159	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成15年7月17日 (2003.7.17)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/345,740	(74) 代理人	100108774
(32) 優先日	平成13年12月31日 (2001.12.31)		弁理士 橋本 一憲
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳房上皮細胞によるソライアシン発現を用いた方法

(57) 【要約】

本発明は高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)の診断方法を特徴とする。本方法では：(1) 高悪性度DCISを持つと疑われる、または持つリスクのある被験者の体液（例、血液または尿）におけるHID-5のレベル；または(2) 高悪性度DCISを持つと疑われる、または持つリスクのある被験者に由来する乳房組織におけるHID-5遺伝子の発現レベルを測定する。また、本発明は、DCIS細胞におけるHID-5蛋白質の発現を阻害する方法、および高悪性度DCISを持つと疑われる、または持つリスクのある被験者を治療する方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を持つと疑われるまたはそのリスクを持つ被験者を同定する段階；および

(b) 被験者に由来する体液、洗浄液、または吸引液の試料においてソライアシンのレベルを測定する段階

を含む診断方法であって、

ソライアシンの対照レベルと比較して、試料中のソライアシンレベルが上昇する場合、被験者が高悪性度DCISを持つことを示す方法。

【請求項2】

体液が血液である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

体液が尿である、請求項1記載の方法。

【請求項4】

洗浄液が乳管洗浄液である、請求項1記載の方法。

【請求項5】

吸引液が乳頭吸引液である、請求項1記載の方法。

【請求項6】

(a) 高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を持つと疑われるまたはそのリスクを持つ被験者を同定する段階；および

(b) 被験者に由来する乳房組織の試料においてソライアシン遺伝子の発現レベルを測定する段階

を含む診断方法であって、

対照のソライアシン遺伝子発現レベルと比較して、試料中のソライアシン遺伝子発現レベルが上昇する場合、被験者が高悪性度DCISを持つことを示す方法。

【請求項7】

ソライアシン遺伝子の発現レベルが、乳房組織の試料中のソライアシンレベルの関数として決定される、請求項6記載の方法。

【請求項8】

ソライアシン遺伝子の発現レベルが、乳房組織の試料中のソライアシンmRNAのレベルの関数として決定される、請求項6記載の方法。

【請求項9】

ソライアシン転写物にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入する段階を含む、非浸潤性乳管癌(DCIS)中でソライアシン発現を阻害する方法であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞中でソライアシン発現を阻害する方法。

【請求項10】

導入段階が、細胞に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与および細胞によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの取り込みを含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

導入段階が、アンチセンスオリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列に機能的に連結した転写調節要素(TRE)を含む核酸を細胞へ投与する段階を含み、細胞内におけるヌクレオチド配列の転写物がアンチセンスオリゴヌクレオチドを生産する、請求項9記載の方法。

【請求項12】

細胞が哺乳類のものである、請求項9記載の方法。

【請求項13】

哺乳類がヒトである、請求項9記載の方法。

【請求項14】

(a) 高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を持つと疑われるまたはそのリスクを持つ被験者を同定する段階；および

10

20

30

40

50

(b) ソライアシン結合物質を被験者に投与する段階を含む、被験者中で高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)の進行を阻害する方法。

【請求項15】

ソライアシン結合物質が、ソライアシンに結合する抗体である、請求項14記載の方法。

【請求項16】

(a) DCISを持つと同定された被験者に由来する乳房組織の試料を提供する段階；および
(b) 試料中でソライアシンを試験する段階を含む、中悪性度DCISまたは低悪性度DCISから高悪性度DCISを区別する方法であって、試料中に検出可能なレベルのソライアシンが存在する場合、被験者が高悪性度DCISを持つことを示す方法。

10

【請求項17】

(a) ソライアシンを含む試料を提供する段階；
(b) 被験物質を試料に接触させる段階；および
(c) 被験物質がソライアシンに結合するかどうかを決定する段階を含むソライアシン結合物質を同定する方法であって、被験物質が抗体ではない方法。

【請求項18】

(a) (i) アポトーシスのリスクのある細胞、または(ii)アポトーシスのリスクのある細胞を持つ被験者を同定する段階；および
(b) 細胞にソライアシンを投与する段階を含む、アポトーシスを阻害する方法。

20

【請求項19】

ソライアシンをコードする核酸を細胞または細胞の近傍に送達することによって、ソライアシンが投与される、請求項18記載の方法。

【請求項20】

ソライアシンが精製されたソライアシンである、請求項18記載の方法。

【請求項21】

細胞の近傍に、(1) ソライアシンをコードする核酸でトランスフェクトされ、かつ(2) ソライアシンを分泌する組換え細胞を導入することによって、ソライアシンが投与される、請求項18記載の方法。

【請求項22】

(a) 細胞をアポトーシスの標的として同定する段階；および
(b) 細胞にソライアシン結合物質を投与する段階を含む、細胞のアポトーシス感受性を高める方法。

30

【請求項23】

細胞が哺乳類のものである、請求項22記載の方法。

【請求項24】

物質が抗体である、請求項22記載の方法。

【請求項25】

感受性細胞においてアポトーシスを促進する第2の物質を細胞に投与する段階をさらに含む、請求項22記載の方法。

40

【請求項26】

(a) 被験者が乳癌を持つと同定する段階；および
(b) 被験者に由来する体液、洗浄液、または吸引液の試料において、ソライアシンに結合する抗体の存在を試験する段階を含むスクリーニング方法であって、試料中に抗体が存在する場合、被験者がHID-5またはHID-5のペプチド断片のワクチン接種の潜在的候補であることを示す方法。

【請求項27】

体液が血液である、請求項26記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本願は、開示全体が参照として本明細書に組み入れられる、2001年12月31日に出願された仮特許出願第60/345,740号の優先権を主張するものである。

【0002】

連邦政府の支援による研究または開発に関する陳述

本願に記述される研究は、国立衛生研究所の国立癌研究所の助成金（番号P50 CA89393-01）による援助を部分的に受けた。したがって、政府は、本発明に関して一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明は、癌の診断および治療、ならびに特に乳癌の治療と診断に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

乳癌は、西洋の女性の癌に関連する死亡の2番目に多い原因となっている。米国のみでも、年間175,000例以上が新しく乳癌と診断されている。乳癌の自然経過は、一定の臨床および病理段階を順次たどる進行を示し、最初は良性で、その後、非定型過剰増殖、そして非浸潤性癌腫、浸潤性の癌腫へと進行し、最後に転移性疾患となる。非浸潤性乳管癌 (ductal carcinoma: DCIS) は、浸潤性乳管癌の前駆状態である。したがって、DCISのための信頼できる検査があることが重要である。

【発明の開示】

【0005】

概要

本発明は、ヒトの高悪性度DCISにおいて、本発明者らがHID-5 (high in DCIS-5)と命名した蛋白質の発現レベルが上昇しているという所見に基づく。この蛋白質は、ソライアシン (psoriasin) としても知られる。低悪性度および中等度の悪性度のDCISでは、発現したとしてもHID-5遺伝子の発現量は非常に低い。また、発明者らはHID-5が乳癌細胞で分泌されることも発見した。したがって、本発明は高悪性度のDCISを診断および治療する方法に関する。

【0006】

より具体的には、本発明は診断方法を特徴とする。本発明は：(a) 高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を持つまたはそのリスクを持つと疑われる被験者を同定する段階；および (b) 被験者に由来する体液（例、血液または尿）、洗浄液（例、乳管洗浄液）、または吸引液（例、乳頭吸引液）の試料において、ソライアシンのレベルを測定する段階を含む。対照のソライアシンレベルと比較して、試料中のソライアシンレベルが上昇していれば、被験者は高悪性度DCISを持つことの指標となる。

【0007】

診断方法も、本発明に含まれる。本方法は：(a) 高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を持つまたはそのリスクを持つと疑われる被験者を同定する段階；および (b) 被験者の乳房組織の試料において、ソライアシン遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む。対照のソライアシン遺伝子の発現レベルと比較して、試料においてソライアシン遺伝子の発現レベルが上昇していれば、被験者は高悪性度DCISを持つことの指標となる。ソライアシン遺伝子の発現レベルは、乳房組織の試料におけるソライアシンレベル、または乳房組織の試料におけるソライアシンmRNAのレベルのいずれかの関数として決定できる。

【0008】

本発明の別の局面は、非浸潤性乳管癌(DCIS)細胞において、ソライアシンの発現を抑制する方法である。本方法は、ソライアシン転写物にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入し、アンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞中のソライアシンの発現を阻害することを含む。導入段階は：(a) アンチセンスオリゴヌクレオチドを細

10

20

30

40

50

胞へ投与し、細胞がアンチセンスオリゴヌクレオチドを取り込む段階；または (b) アンチセンスオリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列に機能的に連結した転写調節要素(TRE)を含む核酸を細胞へ投与し、細胞中でヌクレオチド配列が転写されアンチセンスオリゴヌクレオチドが生産される段階を含む。細胞は哺乳類、例えばヒトのものであってもよい。

【0009】

また、本発明には、被験者において高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)の進行を阻害する方法も含まれる。本方法は：(a) 高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を持つまたはそのリスクを持つと疑われる被験者を同定する段階；および (b) 被験者にソライアシン結合物質を投与する段階が含まれる。ソライアシン結合物質は、たとえば、ソライアシンに結合する抗体であって

10

【0010】

本発明は、中悪性度DCISまたは低悪性度DCISから高悪性度非浸潤性乳管癌(DCIS)を区別する方法も特徴とする。本方法は、(a) DCISを持つと同定された被験者に由来する乳房組織の試料を提供する段階；および (b) 試料中でソライアシンを試験する段階を含む。試料中にソライアシンが検出可能なレベル存在すれば、被験者が高悪性度DCISを持つことの指標となる。

【0011】

本発明の別の局面には、ソライアシン結合物質の同定方法がある。本方法は、(a) ソライアシンを含む試料を提供する段階；および (b) 被験物質を試料に接触させる段階；および (c) 被験物質がソライアシンに結合したかどうかを決定する段階を含む。本方法では、被験物質は抗体ではない。

20

【0012】

本発明は、アポトーシスを阻害する方法も含む。本方法は：(a) (i) アポトーシスのリスクにある細胞、または (ii) アポトーシスのリスクにある細胞を持つ被験者を同定する段階；および (b) 細胞にソライアシンを投与する段階を含む。ソライアシンは、細胞または細胞の近傍に、(a) ソライアシンをコードする核酸；または (b) 精製されたソライアシンを送達することによって投与できる。または、ソライアシンは、細胞の近傍に、(1) ソライアシンをコードする核酸でトランスフェクトされた、かつ (2) ソライアシンを分泌する組換え細胞を導入することによっても投与できる。

30

【0013】

さらに本発明は、細胞をアポトーシスに、より感受性にする方法も特徴とする。本方法は、(a) アポトーシスの標的としての細胞を同定する段階；および (b) ソライアシン結合物質を細胞に投与する段階を含む。細胞は、哺乳類中であってよく、物質は抗体でよい。本方法は、さらに感受性細胞中でアポトーシスを促進する第2の物質を細胞に投与する段階を含んでもよい。

【0014】

別の局面では、本発明はスクリーニング方法を含む。本方法は：(a) 乳癌の患者を同定する段階、および (b) 被験者に由来する体液(例、血液)、洗浄液、または吸引液の試料において、ソライアシンに結合する抗体の存在を検定する段階を含む。試料中に抗体が存在すれば、被験者がHID-5またはHID-5のペプチド断片によるワクチン接種の潜在的候補であることの指標となる。

40

【0015】

他に規定がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明に関して当業者が一般的に理解しているのと同じ意味を持つ。齟齬が生じた場合には、定義を含め、本明細書が優先する。以下に好ましい方法および材料を説明するが、本発明の実施または検定には、本明細書に記述された方法および材料と同様または同等なものが使用できる。本明細書に記述される全ての出版物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照としてその全体が本明細書に組み入れられる。本明細書に開示される材料、方法、および実施例は、説明のためのものであり、制限する意図はない。

50

【0016】

本発明の他の特徴および利点、例えば、高悪性度DCISの診断は、以下の記述、図面、および特許請求の範囲より明らかになると思われる。

【0017】

詳細な説明

本発明者らは、遺伝子発現の連続分析法 (Serial Analysis of Gene Expression: SAGE) によって、HID-5/ソライアシンが、正常乳房上皮および中悪性度のDCISと比較して、高悪性度のDCIS細胞中で異なる様式で高度に発現されていることを発見した。染色体展開および間期核のFISH解析では、高悪性度のDCIS細胞中でのHID-5発現の上昇は、遺伝子増幅のためではないことが示された。原発性乳癌のパネルのリアルタイムPCR解析では、正常な乳房上皮よりも、同じ患者の高悪性度および中悪性度の腫瘍中にHID-5 mRNAが存在することが示された。mRNAインサイチュウハイブリダイゼーションでは、HID-5 mRNAは、高悪性度のDCIS細胞中では検出されたが、低または中悪性度のDCIS細胞でも、正常乳房上皮でも検出されなかった。

10

【0018】

正常乳房上皮MCF10A細胞のインビトロ実験で、(a) HID-5蛋白質発現は、低血清濃度の培地中で、コンフルエント条件および懸濁培養で細胞を増殖させると大きくアップレギュレーションされ；および (b) HID-5 mRNA発現は、コンフルエント条件および懸濁培養で細胞を増殖させると、大きくアップレギュレーションされたことが示された。血清無添加、コンフルエント条件、および細胞固定の欠如によってG1期停止およびアポトーシスも誘導されるため、これらの条件で生存している細胞は、アポトーシスに対して比較的耐性である。したがって、HID-5はG1期停止およびアポトーシスに対する相対的耐性に関与している可能性がある。

20

【0019】

MDA-MB-468乳癌細胞および血清無添加MCF10A細胞において、HID-5特異的抗体によって核および細胞質の染色が観察された。さらに、MDA-MB-468細胞の細胞溶解物および培地を試験したところ、HID-5が細胞内で発現し、さらに分泌されていることが示された。

【0020】

免疫化学分析では、低および中悪性度の乳癌ならびに正常乳房上皮に対して、いくつもの高悪性度の乳癌でHID-5発現が上昇していることが示された。

30

【0021】

これらのデータは、本発明の以下の方法の基礎を提供する。

【0022】

診断アッセイ法

本発明は、診断アッセイ法を特徴とする。アッセイ法は：(1) 高悪性度のDCIS細胞はHID-5蛋白質およびHID-5 mRNAを高レベルで発現するが、正常乳房細胞ならびに低および中悪性度の乳癌細胞は、HID-5蛋白質およびHID-5 mRNAを有意に低いレベルまたは検出できないレベルで発現する；および (2) HID-5蛋白質は乳癌細胞によって分泌されるという知見に基づく。これらの知見は、高悪性度のDCISを診断するためのアッセイ法の基礎となる。アッセイ法は、単独で使用、または好ましくは高悪性度のDCISを検定するための他の手順と併用できる。

40

【0023】

本発明のアッセイ法では：(1) HID-5蛋白質またはHID-5 mRNAの存在またはレベルが試験されるか；または (2) 体液 (例、尿、唾液、精液、血液、または血液由来の血清もしくは血漿)；乳管洗浄液、肺洗浄液、胃洗浄液、直腸もしくは結腸洗浄液、または膣洗浄液のような洗浄液；乳頭吸引液のような吸引液；または細胞培養の上清のような液体などの、液体試料中のHID-5蛋白質のレベルが測定される。細胞中のHID-5 mRNAの存在の検定またはレベルの測定のためには、細胞を溶解し、当技術分野で周知の様々な方法のうち任意の方法によって、溶解液から全RNAを精製または半精製できる。特定のmRNA転写物を検出する方法またはそのレベルを測定する方法は、当業者に周知である。そのようなアッセ

50

イ法には、検出可能な標識をしたHID-5特異的DNAまたはRNAプローブを用いたハイブリダイゼーションアッセイ法、および適当なHID-5特異的オリゴヌクレオチドプライマーを利用した定量的または半定量的RT-PCR法が含まれるがこれらに限定されない。細胞溶解物中でmRNAを定量する他の方法には、RNA保護アッセイ法および遺伝子発現の連続分析法(SAGE)法が含まれる。または、たとえば、組織切片または未溶解細胞懸濁液、および検出可能な標識(例、蛍光または酵素)をしたDNAまたはRNAプローブを用いて、定性的、定量的、または半定量的インサイチューハイブリダイゼーションアッセイ法が実行できる。

【0024】

細胞中で対象蛋白質(例、HID-5)を検出またはレベルを測定する方法は、当技術分野で周知である。そのような方法の多くは、蛋白質に特異的に結合する抗体(例えば、ポリクローナル抗体またはmAb)を利用する。そのようなアッセイ法では、抗体自身またはそれに結合する二次抗体を検出可能なように標識できる。または、抗体にビオチンを結合させ、検出可能に標識したアビジン(ビオチンに結合する蛋白質)を用いて、ビオチン化抗体の存在を検出できる。当業者に周知のこれらの手法の組み合わせ(「マルチレイヤー」アッセイ法を含む)を用いて、アッセイ法の感度を増強できる。これらのアッセイ法のうちいくつかは(例、免疫組織化学法または蛍光フローサイトメトリー)は、組織学的切片または未溶解細胞懸濁液に使用できる。液体試料中でHID-5を検出するための以下に記述する方法は、細胞溶解液中でHID-5を検出するためにも使用できる。

10

【0025】

液体試料中で(上記)HID-5を検出する方法は、基本的に対象試料にHID-5と結合する抗体を接触させ、試料中の成分に対する抗体の結合を調べるものである。そのようなアッセイ法では、抗体は検出可能に標識されている必要はなく、HID-5に結合する二次抗体なしで使用できる。たとえば、表面プラズモン共鳴の現象を利用して、適当な固相基質に結合したHID-5特異的抗体を試料に暴露させる。HID-5が固相基質上の抗体に結合すると、表面プラズモン共鳴の強度に変化が起き、これを適当な装置、例、Biacore装置(Biacore International AB, Rapskatan, Sweden)などを用いて、定性的または定量的に検出できる。

20

【0026】

さらに、液体試料中におけるHID-5検出アッセイ法では、たとえば、(a) 検出可能に標識した単一のHID-5特異的抗体；(b) 非標識HID-5特異的抗体および検出可能に標識した二次抗体；または(c) ビオチン化HID-5特異的抗体および検出可能に標識したアビジンを用いることもできる。また、細胞中の蛋白質の検出のために上述したように、当業者に周知のこのような手法(「マルチレイヤー」アッセイ法を含む)の組み合わせを用いて、アッセイ法の感度を増強できる。これらのアッセイ法では、たとえば、液体試料の一部を「スポット」するか、試料または試料の一部が電気泳動で分離された電気泳動ゲルをプロットングすることによって、HID-5を含むと考えられる試料または試料の一部を、ナイロンまたはニトロセルロース膜のような固相基質上に固定できる。その後、固相基質上のHID-5の存在または量を、上述のような形のHID-5特異的抗体、および必要ならば、検出可能な標識をした二次抗体またはアビジンを用いてアッセイする。

30

【0027】

本発明は「サンドイッチ」アッセイ法も特徴とする。サンドイッチアッセイ法では、上述のような方法によって固相基質上に試料を固定する代わりに、固相基質を試料に暴露する前に、当技術分野で周知の様々な方法のうち任意のものを用いて、固相基質に第2の(「捕獲」)HID-5特異的抗体(ポリクローナルまたはmAb)を結合させることによって、試料中に存在する可能性のある任意のHID-5を固相基質上に固定できる。第2のHID-5特異的抗体の結合した固相基質に試料を暴露することによって、試料(またはその一部)中の任意のHID-5は固相基質上の第2のHID-5特異的抗体に結合する。その後、単一のHID-5特異的抗体を用いて上述したのと本質的に同じ方法によって、HID-5特異的「検出」抗体を用いて、結合した第2のHID-5特異的抗体に結合したHID-5の存在または量を測定できる。このようなサンドイッチアッセイ法では、捕獲抗体は、検出抗体と同一のエピトープ(またはポリクローナル抗体の場合にはエピトープの範囲)に結合してはならない。したがって、

40

50

捕獲抗体としてmAbが使用される場合には、検出抗体は：(a) 捕獲mAbが結合するエピトープと完全に物理的に分離しているか、部分的に重複するだけのいずれかのエピトープに結合する別のmAb；または (b) 捕獲mAbが結合するエピトープ以外に、またはこのエピトープ以外にも結合するポリクローナル抗体のいずれかでよい。一方で、捕獲抗体としてポリクローナル抗体が使用される場合には、検出抗体は、(a) 捕獲ポリクローナル抗体が結合するすべてのエピトープと完全に物理的に分離しているか、部分的に重複するのいずれかのエピトープに結合するmAb；または (b) 捕獲ポリクローナル抗体が結合するエピトープ以外に、またはこのエピトープ以外にも結合するポリクローナル抗体のいずれかでよい。捕獲抗体および検出抗体を用いたアッセイ法には、サンドイッチELISAアッセイ法、サンドイッチウェスタンブロットアッセイ法、およびサンドイッチ免疫磁気検出アッセイ法が含まれる。 10

【0028】

捕獲抗体を結合できる適当な固相基質には、マイクロタイタープレートのウェルのプラスチック底および壁、ナイロンまたはニトロセルロース膜のような膜、ポリマー性（例えば、アガロース、セルロース、またはポリアクリルアミドが含まれるがこれらに限定されない）ビーズまたは粒子が含まれるが、これらに限定されない。そのようなビーズまたは粒子に結合したHID-5特異的抗体は、HID-5の免疫親和性精製にも使用できる。

【0029】

検出可能な標識を検出または定量するための方法は標識の性質に依存し、当技術分野で周知である。適当な標識には、放射性核種（例、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、または ^{14}C ）、蛍光部分（例えば、フルオレセイン、ローダミン、またはフィコエリスリン）、発光部分（例、Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CAの提供するQdot（商標）ナノ粒子）、規定の波長の光を吸収する化合物、または酵素（例、アルカリ性ホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）が含まれるがこれらに限定されない。適当な酵素が触媒する反応産物は、蛍光、発光、または放射性である可能性があるがこれらに限定されず、可視光または紫外線を吸収する可能性がある。検出器の例には、X線フィルム、放射能カウンター、シンチレーションカウンター、分光光度計、比色計、蛍光計、照度計、および濃度計が含まれるがこれらに限定されない。 20

【0030】

高悪性度DCISを診断するアッセイ法では、例えば、高悪性度のDCISを持つまたはそのリスクを持つと考えられる患者の血清中のHID-5の濃度を、例えば乳癌を持たない被験者、低悪性度の乳癌患者、中悪性度の乳癌患者、またはそのような被験者の任意の組み合わせの対照群の血清中のHID-5濃度の平均と比較する。対照群の平均濃度と比較して、患者の血清中のHID-5の濃度が有意に高ければ、その患者が高悪性度のDCISを持つ指標となる。または、患者が明らかに乳癌を持っていない時に得られていた血清の試料がある場合には、被験血清試料中のHID-5の濃度を以前に得られていた試料中の濃度と比較できる。被験血清試料中の濃度が上昇していれば、患者が高悪性度DCISを持つ指標となる。 30

【0031】

上記の診断アッセイ法は血清を用いたアッセイ法であるが、本明細書に記載される任意の他の液体試料を用いてもアッセイ法は実施できる。また、上述の患者および被験者は、ヒトである必要はない。例えば、非ヒト霊長類（例、サル）、ウマ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、イヌ、モルモット、ハムスター、ラット、ウサギ、またはマウスでもよい。 40

【0032】

実施例2に記述されるSAGE解析では、正常乳房上皮細胞および中悪性度のDCIS細胞と比較して、高悪性度のDCIS細胞でカルグラニユリン（calgranulin）B/S100A9およびコネキシン43の発現がアップレギュレーションされていることが示されたので、上述の任意の方法を改変して、被験乳房細胞におけるカルグラニユリンB/S100A9およびコネキシン43の検出および/または測定を行なって、高悪性度のDCISを診断することもできる。

【0033】

以下のデータは、特定の乳癌患者でHID-5発現がアップレギュレーションされているこ 50

とを示す。したがって、HID-5に対する自己免疫反応を示すことのできる患者では、HID-5またはHID-5の1つもしくは複数のペプチド断片による免疫が、有効な免疫療法になる可能性がある。特定の作用機序に縛られることはないが、そのような療法の治療効果は、HID-5ペプチド断片に特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)またはHID-5に特異的な中和抗体の作用による可能性がある。したがって、本発明は、HID-5に特異的な抗体の存在について乳癌患者をスクリーニングする方法も特徴とし、HID-5特異的な抗体の存在は、患者がHID-5特異的な免疫療法の恩恵を得られることを示す。抗体の存在を調べる方法は当技術分野で周知であり、HID-5を検定する上述のアッセイ法のいくつかの自明な改変を含む。そのようなアッセイ法では、被験者から得られた試料(例、任意の上述の体液、洗浄液、または吸引液)に、HID-5またはHID-5断片を接触させ、HID-5またはHID-5断片に対する抗体の結合を、上述の任意の検出法を用いて検定する。

10

【0034】

細胞中でHID-5の発現を阻害する方法

本発明には、細胞中でHID-5の発現を阻害する方法も含まれる。そのような方法の1つでは、(a) アンチセンスオリゴヌクレオチド、または (b) 細胞中でアンチセンスRNAに転写される核酸配列に機能的に連結した転写調節要素(TRE)を含む核酸を、細胞中に導入する。アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびアンチセンスRNAは、HID-5転写物にハイブリダイズし、細胞中でHID-5の発現を阻害する効果を持つ。細胞中でHID-5発現を阻害すると、細胞の増殖および/または生存が阻害できる。したがって、本方法は癌細胞(例、乳癌細胞)の増殖および/または生存を阻害する上で有用であり、癌の治療に応用できる。本方法は、例えば、高悪性度の乳癌細胞、例えば、高悪性度DCISまたは高悪性度の浸潤性乳癌の治療に使用できる。

20

【0035】

一般的に、アンチセンス化合物は、例えば、RNAアーゼ-Hを介する標的mRNAの分解、mRNAの5'キャッピングへの干渉、5'キャップをマスクすることによる標的mRNAへの翻訳因子の結合の阻害、またはmRNAポリアデニル化の阻害によって、標的mRNA分子の翻訳に直接干渉する。蛋白質発現への干渉は、アンチセンス化合物が標的mRNAにハイブリダイズすることに起因する。アンチセンス化合物との相互作用のために、対象となる標的mRNA上の特定の標的部位を選択する。したがって、例えば、ポリアデニル化の改変のためには、mRNA標的上の好ましい標的部位は、ポリアデニル化シグナルまたはポリアデニル化部位である。mRNAの安定性の低下または分解のためには、不安定化配列が、好ましい標的部位である。1つまたは複数の標的部位が同定された場合に、標的部位に対して所望の効果を得るために十分な相補性のある(即ち、生理的条件下で十分に、十分な特異性をもってハイブリダイズする)オリゴヌクレオチドを選択する。

30

【0036】

本発明に関して、「オリゴヌクレオチド」という用語は、RNA、DNA、またはそのいずれかの類似体のオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語には、天然に存在する核酸塩基、糖、およびヌクレオシド間(骨格)共有結合から構成されるオリゴヌクレオチドが含まれる。通常のRNAおよびDNAの結合または骨格は、3'から5'へのホスホジエステル結合である。しかしこの用語は、天然に存在する成分のみを含むオリゴヌクレオチドと同様な機能を持つ、天然に存在しない成分のみから構成される、またはそれを一部含むオリゴヌクレオチドも指す。そのような修飾された置換オリゴヌクレオチドは、例えば、細胞の取り込みの上昇、標的配列への親和性の向上、およびヌクレアーゼ存在下での安定性の上昇のような、望ましい性質のために、天然型よりも好まれる場合がしばしばある。類似体では、核となる塩基(ピリミジンまたはプリン)構造は、一般的に保存されているが、(1)糖は修飾されているか、別の成分で置換され、および/または(2)核酸塩基間の結合は修飾されている。非常に有用であることが証明された1つの核酸類似体のクラスは、蛋白質核酸(PNA)と呼ばれる。PNA分子中では、糖の骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置換されている。塩基は保持されており、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接結合している。本発明で有用なPNAおよび他の類似体は、米国特許第6,210,289号に詳細

40

50

に記述されている。

【0037】

本発明で使用するアンチセンスオリゴマーは、一般に約8~約100(例えば、約14~約80、または約14~約35)の核酸塩基(または核酸塩基が天然に存在するときはヌクレオシド)を含む。

【0038】

アンチセンスオリゴヌクレオチド自身を細胞に導入するか、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸配列(TREに機能的に連結)を含む発現ベクターを細胞中に導入できる。後者の場合、発現ベクターによって生産されるオリゴヌクレオチドは、RNAオリゴヌクレオチドであり、このRNAオリゴヌクレオチドは全て天然に存在する成分から構成される。

10

【0039】

本発明の方法は、インビトロまたはインビボであってもよい。本方法をインビトロで、例えば、細胞増殖または細胞生存の基礎科学研究に使用すると、有用である。インビトロ法では、適当な細胞(例、HID-5発現細胞)を(a)アンチセンスオリゴヌクレオチド、または(b)アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸配列を含む発現ベクターと、様々な濃度で様々な時間にわたってインキュベートできる。当技術分野で周知の他のインキュベーション条件(例、温度または細胞濃度)も変化させることができる。HID-5発現の阻害は、例えば本明細書で開示されたような、当技術分野で周知の方法を用いて調べられる。しかし、本発明の方法は、好ましくはインビボである。

20

【0040】

本明細書では「予防」は疾病(例、DCISのような乳癌)の症状を完全に防ぐこと、疾病の症状の発現の遅延、またはその後発現した疾病の症状の重症度の低下を意味し得る。「防ぐこと」は、疾病(例、乳癌)の症状が本質的に存在しないことを意味する。本明細書では、「治療」は疾病の症状が完全になくなるか、または疾病の症状の重症度が低下することを意味し得る。「予防的」療法は、予防および/または治療的な療法である。

【0041】

アンチセンス法は、一般に、癌細胞(例、乳癌細胞)の増殖を阻害する、および/または生存を阻害する治療または予防である。単独または他の薬剤および/または放射線療法と組み合わせて、哺乳類被験者(例、ヒト乳癌患者)に投与できる。

30

【0042】

アンチセンスオリゴヌクレオチド自体を投与する場合は、薬学的に許容される担体(例、生理的食塩水)中に懸濁し、経口、直腸内、腔内、鼻腔内、胃内、気管内、もしくは肺内投与、または皮下、筋肉内、くも膜下、腹腔内、静脈内注射できる。また、腫瘍の外科的切除後に、残る腫瘍細胞を殺すために、腫瘍細胞、例えば、腫瘍または腫瘍床に直接送達することもできる。必要な用量は、選択した投与経路;製剤の性質;患者の疾病の性質;患者の体格、体重、体表面積、年齢、および性別;投与される他の薬剤;および担当医の判断によって異なる。適当な用量は、一般に0.01 mg/kg~100 mg/kgである。様々な化合物が利用でき、投与経路によって効率が異なることを考えると、必要な用量には大きな差異が予測される。例えば、経口投与には、静脈内注射による投与よりも、高い用量が必要だと考えられる。用量レベルの差異は、当技術分野で周知の、標準的な経験的最適化経路を用いて、調節できる。投与は単回または複数回(例、2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150またはそれ以上)投与であり得る。適当な送達媒体(例、ポリマー性微粒子または移植可能な装置)中にポリペプチドを被包すると、特に経口投与で、送達効率が上昇する可能性がある。

40

【0043】

アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする核酸配列(TREに機能的に連結)を含む発現ベクターを被験者に投与する場合は、コード配列の発現は、被験者の体の任意の細胞に行なわせることができる。しかし好ましくは、発現は、増殖および/または生存を阻害することが望まれる腫瘍細胞の近傍の細胞で行なわせると考えられる。コード配列の発現

50

は、腫瘍細胞自身に行なわせることができる。これは、例えば、当技術分野で周知の、ポリマー性の生分解性微粒子またはマイクロカプセル送達装置を用いて行なうことができる。

【0044】

核酸の取り込みを行なう別の方法は、標準的な方法で調製されたりポソームを用いることである。ベクターは、これらの送達媒体中に単独で組み込むか、組織特異的または腫瘍特異的抗体と共に組み込むことができる。または、静電気または共有結合によってポリ-L-リジンに結合したプラスミドまたは他のベクターを含む分子結合物を調製することもできる。ポリ-L-リジンは、標的細胞上の受容体に結合するリガンドに結合し得る (Cristianoら (1995), J. Mol. Med. 73:479)。または、組織特異的ターゲティングは、当技術分野で周知の、組織特異的転写/翻訳調節要素 (TRE)、例えば、プロモーターおよびエンハンサーを利用して行なえる。筋肉内、皮内、または皮下の部位への「裸のDNA」の送達 (送達媒体なし) は、インビボ発現を行なうためのもう1つの手段である。

10

【0045】

エンハンサーは、時間、場所、およびレベルの点で発現特異性を提供する。プロモーターとは異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在すれば、転写開始部位から様々な距離に存在しつつ機能できる。エンハンサーは、転写開始部位の下流に存在することもできる。コード配列をプロモーターの制御下に置くためには、ペプチドまたはポリペプチドの翻訳のリーディングフレームの翻訳開始部位の位置を、プロモーターの1から約50ヌクレオチド下流 (3') の間に置くことが必要である。発現ベクターのコード配列は、転写終結領域に機能的に連結される。

20

【0046】

上記の転写/翻訳調節要素は、遺伝子発現を駆動するまたは制御する、当業者に周知の誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、および他の要素を含むが、これらに限定されない。そのような調節要素には、サイトメガロウイルスhCMV前初期遺伝子、SV40アデノウイルスの初期および後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージAの主要オペレーターおよびプロモーター領域、fdコート蛋白質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター、および酵母接合因子のプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0047】

適当な発現ベクターには、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、弱毒ワクシニアウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスのような、プラスミドおよびウイルスベクターが含まれる。

【0048】

ポリヌクレオチドは、薬学的に許容される担体中で投与できる。薬学的に許容される担体は、ヒトに投与するのに適した生体適合性媒体、例えば、生理食塩水またはリポソームである。治療に有効な量は、治療された動物中で、医学的に望ましい結果 (例、癌細胞の増殖および/または生存の低下) を生じることのできるポリヌクレオチド量である。医学分野で周知のように、任意の1人の患者のための用量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与する特定の化合物、性別、投与時間および経路、一般的健康状態、ならびに同時に投与される別の薬剤を含む、多くの要素に依存する。用量は様々であるが、好ましいポリヌクレオチド投与量は、約 10^6 から約 10^{12} ポリヌクレオチド分子コピーである。この用量は、必要ならば繰り返し投与できる。投与経路は上記の任意のものでよい。

40

【0049】

HID-5 DNAに相同の二本鎖干渉RNA (RNAi)も、細胞中でHID-5の発現を低下させるために使用できる。例、Fireら (1998) Nature 391:806-811; RomanoおよびMasino (1992) Mol. Microbiol. 6:3343-3353; Cogoniら (1996) EMBO J. 15:3153-3163; CogoniおよびMasino (1999) Nature 399:166-169; MisquittaおよびPaterson (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1451-1456; およびKennerdellおよびCarthew (1998) Cell 95:1017-1026を参照されたい。

50

【0050】

RNAiのセンスおよびアンチセンス鎖は、当技術分野で周知の手順を用いて、化学合成および酵素的連結を用いて、個々に作製できる。例えば、各鎖は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を上昇するもしくはセンスおよびアンチセンス鎖に形成される2本鎖の物理的安定性を上昇させるようにデザインされた様々な修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホチオネート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチド）を用いて、化学的に合成できる。センスまたはアンチセンス鎖は、センスまたはアンチセンス方向に標的HID-5配列（全長または断片）がサブクロニングされた発現ベクターを用いて、生物学的にも生産できる。センスおよびアンチセンスRNA鎖は、本明細書で開示される任意の癌細胞にdsRNAを送達する前に、インビトロでアニールさせる。または、インビボでも起き得る。

10

【0051】

二本鎖RNA干渉は、別々のプロモーターからセンスRNAおよびアンチセンスRNAが転写され得るポリヌクレオチド、または単一のプロモーターからセンスおよびアンチセンス配列の両方を含む単一のRNA分子が転写されるポリヌクレオチドを、癌細胞に導入することによっても行なうことができる。

【0052】

当業者は、上述のアンチセンス法と同様にRNAi法はインビトロおよびインビボであり得ることを理解すると思われる。また、送達方法および条件ならびにRNAi法を使用可能な動物種は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのものと同一である。

20

【0053】

本発明のアンチセンスおよびRNAi法は、様々な種、例、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、およびマウスに適用できる。

【0054】

実施例2に記述されるSAGE分析では、正常乳房上皮細胞および中悪性度DCIS細胞と比較して、高悪性度DCIS細胞において、HID-5/ソライアシンに加え、カルグラニユリンB/S100A9およびコネキシン43の発現もアップレギュレーションされていることが示された。したがって、本発明はHID-5発現の阻害について上述されたのと同じ目的のために、カルグラニユリンB/S100A9および/またはコネキシン43発現を阻害する方法も特徴とする。関連する方法は、高悪性度乳癌においてHID-5発現を阻害する上述の方法の明らかな変法である。

30

【0055】

受動免疫保護

本明細書では、「受動免疫保護」は、高悪性度乳癌、例えば、高悪性度DCISを持つ、持つと疑われる、または持つリスクのある被験者に、1つまたは複数のHID-5結合物質を投与することを意味する。したがって、受動免疫保護は、予防的および/または治療的であり得る。本明細書では、「HID-5-結合物質」は、HID-5に結合し、それにより、HID-5が高悪性度乳癌細胞（例えば、高悪性度DCIS細胞）のような細胞の増殖および/または生存を増強する能力を阻害する物質である。「阻害」という用語は、「完全阻害」および「部分的阻害」を含む。本発明に有用なHID-5結合物質は、HID-5が細胞の増殖および/または生存を増強する能力を、少なくとも20%（例、少なくとも：20%；30%；40%；50%；60%；70%；80%；90%；95%；98%；99%；99.5%；または100%）阻害できる。HID-5結合物質は、例えば、可溶性型の（細胞に結合していない）HID-5受容体またはHID-5特異的抗体であり得る。

40

【0056】

抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体でよい；いずれのタイプの抗体の生産方法も、当技術分野で周知である。抗体は、いずれのクラス（例、IgM、IgG、IgA、IgD、またはIgE）でもよく、本明細書に挙げられた任意の動物種でも作製できる。好ましくはIgG抗体である。ヒトおよび非ヒト部分を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗

50

体のような、HID-5特異的組換え抗体も、本発明の方法で使用できる。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、Robinsonら、International Patent Publication PCT/US86/02269号；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi、欧州特許出願第171,496号；Morrisonら、欧州特許出願第173,494号；Neubergerら、国際公開公報第86/01533号；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許出願第125,023号；Betterら(1988) Science 240, 1041-43；Liuら(1987) J. Immunol. 139, 3521-26；Sunら(1987) PNAS 84, 214-218；Nishimuraら(1987) Canc. Res. 47, 999-1005；Woodら(1985) Nature 314, 446-49；Shawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80, 1553-59；Morrison, (1985) Science 229, 1202-07；Oiら(1986) BioTechniques 4, 214；Winter, 米国特許第5,225,539号；Jonesら(1986) Nature 321, 552-25；Veroeyanら(1988) Science 239, 1534；およびBeidlerら(1988) J. Immunol. 141, 4053-60に記述されるような方法を用いて、当技術分野で周知の組換えDNA技術によって生産できる。

【0057】

HID-5に結合する抗体の抗原結合ドメインの少なくとも機能的部分を含む抗体断片および誘導体も、本発明に有用である。分子の結合ドメインを含む抗体断片は、周知の技術で作製できる。そのような断片には：抗体分子のペプシン消化で生産できるF(ab')₂断片；F(ab')₂断片のジスルフィド結合の還元によって作製できるFab断片；およびパインおよび還元剤で抗体分子を処理して作製できるFab断片が含まれるが、これらに限定されない。例えばNational Institutes of Health, 1 Current Protocols In Immunology, Coliganら編、2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991)を参照されたい。抗体断片にはFv断片、すなわち定常領域のアミノ酸残基がほとんどまたは全くない抗体産物も含まれる。一本鎖Fv断片(scFv)は、scFvが由来する抗体の重鎖および軽鎖の両方の可変領域を含む一本鎖ポリペプチドである。そのような断片は、例えば、参照としてその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第4,642,334号に記述されるようにして生産できる。ヒトの被験者では、抗体は異なる動物種で元々作製されたモノクローナル抗体の「ヒト化」されたものでよい。

【0058】

HID-5結合物質は、本明細書に記述される任意の種に投与できる。HID-5結合物質は好ましくはそれが投与される被験者と同じ種であるが、必ずしもそうでなくてもよい。単一のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を投与することもできるし、2つまたはそれ以上(例、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, または20)のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を投与してもよい。HID-5結合物質は、HID-5発現阻害剤(上記)の前、後、またはそれと同時に被験者に投与できる。

【0059】

必要なHID-5結合物質の用量は、投与経路、製剤の性質、患者の疾病の性質、患者の体格、体重、体表面積、年齢、および性別、他に投与される薬剤、ならびに担当医の判断によって異なる。適当な用量は0.01~100.0 mg/kgの範囲である。HID-5結合物質は、本明細書で開示される任意の経路で投与できるが、通常は静脈内、筋肉内、または皮下に投与される。利用できるHID-5結合物質(例、HID-5特異的抗体)の種類および様々な投与経路の効率の違いを考慮すると、必要な用量は大きく異なる。用量レベルの差異は、当技術分野で周知のように、標準的な経験的最適化経路を用いて調節できる。投与は単回または複数回(例、2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150, またはそれ以上)投与であり得る。

【0060】

化合物または抗体が特定の疾病を治療または予防するかどうかを試験する方法は、当技術分野で周知である。治療効果を検定する場合は、疾病(例、DCISのような乳癌)の症状を示している被験者群を、上述の任意の方法を用いて、HID-5発現阻害剤またはHID-5結合物質で処理する。やはり疾病の症状を示している対照群は、プラセボを用いて、同じ方法で処理する。被験者群で疾病の症状の消失または低下があれば、その化合物または抗体が、効果的な治療薬であることを示す。疾病のリスクを持つ被験者に対して同じ方法を適用することにより、化合物および抗体の予防薬としての有効性が試験できる。この場合、疾

病症状の発現の予防または遅れを検定する。

【0061】

本発明は、以下の実施例によって説明されるが、限定されるわけではない。

【0062】

実施例

実施例1、材料および方法

細胞株および培養条件

MDA-MB468およびMCF10A細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection: ATCC; Manassas, VA) から入手し、それぞれ10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む McCoy 培地 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) および 20 ng/ml 上皮成長因子、100 ng/ml コレラ毒素、0.01 mg/ml インスリン、および 500 ng/ml ハイドロコルチゾンを添加した 5% ウマ血清を含む DMEM/F12 培地 (Life Technologies) 中で維持した。サブコンフルエントおよびコンフルエントの培養条件での HID-5/ソライアシン発現に対する血清除去の効果を決定するために、MCF10A細胞は 0.2% 血清を含む DMEM/F12 培地に切り換え、示された時間の間インキュベートした。コンフルエントの効果は、MCF10A細胞を、頻繁 (隔日) に培地交換しながら示された時間の間コンフルエント条件で維持することによって分析した。懸濁培養については、MCF10A細胞をトリプシン処理し、新しい培地に再懸濁し (1.75×10^5 細胞/ml 培地)、ポリ-2-ヒドロキシ-エチルメタクリレート (Aldrich, St. Louis, MO) でコートした (1 mg/cm²、100% エタノール中) ペトリ皿に播き、示された時間インキュベートした。

【0063】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗 HID-5/ソライアシン抗体の作製

ウサギポリクローナル抗 HID-5 抗体は、ヒト HID-5 のアミノ酸 83 ~ 100 位に対応する合成ペプチド

(TDYHKQSHGAAPCSGGSQ) (配列番号: 3)

で免疫することによって作製した。図 4A は、全長のヒト HID-5 のアミノ酸配列 (配列番号: 1)、図 4B は全長のヒト成熟 HID-5 をコードする cDNA のヌクレオチド配列 (配列番号: 2) を示す。マウスモノクローナル抗体の作製のために、PCR で生成した全長ヒト HID-5 をコードする BamHI-HindIII cDNA 断片を pQE-30 (Qiagen Sciences, Germantown, MD) の BamHI-HindIII 部位にサブクローニングし、N 末端にヘキサヒスチジン配列を持つ HID-5 をコードする構築物が得られた。この蛋白質を M15 [pREP4] 細菌で発現させ、変性尿素緩衝液と NiNTA ビーズ (Qiagen Sciences) を用いて均一になるまで精製した。結合した蛋白質は 50 mM Tris pH 7.5, 500 mM イミダゾール、100 mM EDTA, 1M NaCl, 10% グリセロール、1 mM DTT で溶出した。Imgenex, San Diego, CA と共同で、この蛋白質を用いて BALB/c マウスを過剰免疫し、これは HID-5 特異的モノクローナル抗体を生産するための抗体産生細胞の供給源となった。得られた抗 HID-5 モノクローナル抗体は、Imgenex から市販されている。

【0064】

ウェスタンブロット分析、免疫組織化学、および組織マイクロアレイ

細胞溶解物のウェスタンブロット分析および免疫組織化学は、以前に記述されたようにして (Kropf ら (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9796-9801; Leach ら (1998) Cancer Res. 56:235-240)、抗 CD45 汎白血球 (Dako, Glostrup, Denmark)、抗エストロゲン受容体 (ER)、抗 erbB2、および抗 HID-5 (クローン 1068-1; 図 2A の右パネル中の「CI 1」) 抗体を用いて実施した。組織マイクロアレイは、Imgenex から購入するか、以前記述されたようにして (Kononen ら (1998) Nat. Med. 4:844-847) 作製した。

【0065】

蛍光インサイチュアハイブリダイゼーション (FISH)、リアルタイム PCR、ノーザンブロット、および mRNA インサイチュアハイブリダイゼーション

正常ヒト男性から得られた末梢血リンパ球から調製された分裂中期の染色体調製物の FISH 解析は、以前に記述されたようにして行なった (Ney ら (1993) Mol. Cell. Biol. 13:56

10

20

30

40

50

04-5612)。バラバラにしたホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織の中間期核を調製し、以前に記述されたようにしてFISHを実施した(19950 Mod. Pathol. 8:183-186)。中期染色体および間期核は、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸(DAPI)を用いて、対比染色した。レーザーキャプチャマイクロダイセクション、リアルタイムPCR分析、RNA単離、およびノーザンブロット分析は、以前に記述されたようにして実施した(Kropら(2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9796-9801)。³³P標識のセンス(対照)またはアンチセンスHID-5リボプローブを用いたmRNAインサイチュウハイブリダイゼーションは、以前に記述されたようにして実施した(Rosenら(1999) Mol. Cell. 4:611-617)。

【0066】

実施例2. DCISおよび乾癬病変で異常発現する遺伝子

SAGEライブラリーの作製は、以前に記述されている(例、Porterら(2001) Cancer Res. 61:5697-5702)。2つの正常乳房上皮試料(「正常1」および「正常2」)から作製されたSAGEライブラリー、エストロゲン受容体(ER)発現、中悪性度DCIS細胞(IM DCIS (ER+))およびER非発現、高悪性度DCIS(HG DCIS (ER))を比較したところ、HID-5は最も大きく異なって発現された転写物の1つであり、高悪性度DCISにおいて最も豊富なmRNAの1つであることが分かった(表1)。ソライアシンmRNAをコードする遺伝子から転写されるmRNAに加えて、別のS100蛋白質であるS100A9も、高悪性度DCISで高度に発現されていた(表1)。いずれの遺伝子も、染色体1の長腕(q)に存在し、その発現は乾癬性のケラチノサイトで共にアップレギュレーションされている。

10

【0067】

(表1) 乾癬性ケラチノサイトおよび高悪性度DCISで異常発現する遺伝子

20

SAGE タグ	配列番号	遺伝子	ユニゾンID	正常1	正常2	HG DCIS (ER-)	IM DCIS (ER+)
GAGCAGCGCC	4	ソライアシン/S100A7	112408	10	0	568	1
GTGGCCACGG	5	カルグラニユリンB/S100A9	112405	16	16	111	0
TGTTCTGGAG	6	コネキシン43	74471	1	2	28	1
TGGAAGCACT	7	インターロイキン8	624	205	196	4	21
CGAATGTCCT	8	ケラチン6	91539	29	27	0	0
CTATAGCATA	9	アンウェイレギュリン	1257	16	13	0	1
GGCACCTCAG	10	インターロイキン6	93913	17	2	0	0
GTGGCCCACG	11	インターロイキン6受容体	193400	5	3	0	0
CCTGTAATCC	12	SCCA1	227948	0	0	3	0

10

20

30

40

SCCA1 : 扁平上皮細胞癌抗原 -1(Squamous Cell Carcinoma Antigen-1)

【 0 0 6 8 】

他の大きく異なって発現される遺伝子の染色体上の位置、および乾癬性病変に關与する遺伝子の発現レベルが調べられた(表1)。驚くべきことに、高悪性度DCISで特異的に過剰発現している遺伝子のかなりの部分(信頼できるマッピングが行われた遺伝子46のうち13)は、染色体1の長腕に存在していた(表1)。染色体1の構造的異常は、乳癌において最もよく見られる細胞遺伝学的異常の1つであり、上皮の分化に關与するいくつかの遺伝

50

子は、染色体1qにマッピングされる (Volzら (1993) *Genomics* 18:92-99; Tirkkonenら (1998) *Genes Chrom. Cancer* 21:177-184)。

【0069】

高悪性度DCISにおけるこれらの13の遺伝子の過剰発現が染色体1qの異数性/アネソミー (aneusomy)のためであるかどうかを決定するために、それぞれソライアシンおよびエフリン (ephrin)A4遺伝子を含む2つの重複しないBAC (細菌人工染色体) をプローブとして使用して、FISH解析が行われた。解析は、正常個体の中期展開とSAGEに使用されたDCISの間期核で行われた (データは示さず)。中期展開解析によってHID-5/ソライアシン遺伝子が、染色体1の長腕のバンドq21の位置であることが確認された後、DCIS腫瘍組織から得られる間期核を、遺伝子を含むBACとハイブリダイズさせた (データは示さず)。調べた核の31/33 (94%) で2つのハイブリダイゼーションシグナルが認められたが、これは試験されたゲノム領域が正常なコピー数と一致する。この結果は、高悪性度DCIS病変におけるソライアシン/HID-5の異常発現は、ソライアシン/HID-5遺伝子座の増幅によって起きたものではないことを示す。

【0070】

ソライアシンに加えて、乾癬性ケラチノサイトでアップレギュレーションされることが知られている他のいくつかの遺伝子も、高悪性度DCISにおいて異常発現していた (表1) (Celisら (1990) *Electrophoresis* 11:242-254; Labartheら (1998) *J. Invest. Dermatol.* 11:72-76; Rivasら (1997) *J. Invest. Dermatol.* 108:188-194)。これらの遺伝子には、S100A9、コネキシン43、インターロイキン6および8、インターロイキン6受容体、アンフィレギュリン (amphiregulin)、およびケラチン6をコードするものが含まれていた。SCC A1 (扁平上皮細胞癌抗原1) mRNA発現も、高悪性度DCISでわずかにアップレギュレーションされていたが、このmRNAの数が少ないため、検出された差異には統計的有意差は見られなかった。高悪性度DCISおよび乾癬性ケラチノサイト中でのこれらの遺伝子の異常発現は、この両方の病変に特徴的である、過剰増殖、異常分化、またはリンパ球浸潤のためである可能性がある (Bosら (1999) *Immunol. Today* 20:40-46; Pageら (2000) *Curr. Opin. Oncol.* 12:526-531)。

【0071】

実施例3. インビボおよびインビトロの乳房上皮細胞におけるHID-5/ソライアシン発現

原発性乳癌においてHID-5/ソライアシンの発現を評価するために、LCM (レーザーキャプチャマイクロダイセクション (Laser Capture Microdissection)) で精製した11の原発腫瘍および対応する正常乳房上皮試料のリアルタイムPCR分析を行なった (図1A)。このようにして、患者の各腫瘍試料は、同一の患者の正常な乳房上皮と比較された。全ての症例で、インサイチューの、ER発現、プロゲステロン受容体発現、低悪性度病変 (試料57) および浸潤性のER発現、プロゲステロン受容体発現、中悪性度病変 (試料65) を除いて、HID-5/ソライアシン mRNAレベルは、対応する正常乳房上皮と比較して、有意に (10倍) 上昇していた (図1A)。

【0072】

高悪性度DCIS上皮細胞におけるHID-5/ソライアシン発現を細胞レベルで確認するため、2つの低、2つの中、および2つの高悪性度DCIS腫瘍ならびに対応する正常上皮のmRNAインサイチューハイブリダイゼーション分析が行われた (図1Bおよびデータは示さず)。HID-5/ソライアシンは2つの高悪性度コメドDCISの腫瘍細胞によって、高度に及び特異的に発現されていた (図1B)。反対に、低および中悪性度DCISならびに正常乳房上皮細胞では、ハイブリダイゼーションシグナルは検出されなかった (図1Bおよびデータは示さず)。

【0073】

HID-5/ソライアシン蛋白質の発現を分析するために、ヒトHID-5/ソライアシンに特異的なポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製し、解析した。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれも、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で約11 kDaの単一バンドとして移動する組換えおよび内在性HID-5/ソライアシン蛋白質に結合した (図2A)。MCF10A細胞の様々な増殖条件下でHID-5/ソラ

イアシン発現が検出できるかどうかを調べるために、一連の実験が行われた。MCF10A細胞は、低密度の指数増殖期の培養ではHID-5/ソライアシン発現を示さない（または非常に低レベル）、正常不死化ヒト乳房上皮細胞である。高悪性度DCISおよび乾癬性皮膚病変でインピボで起きている条件を模倣するために、MCF10A細胞は低濃度の血清（高レベル(5%)に対して0.2%）を含む培地およびコンフルエント（低密度に対して）条件で培養された。低血清濃度およびコンフルエント条件（血清濃度には依存しない）で培養された細胞は、HID-5/ソライアシン蛋白質レベルの劇的なアップレギュレーションを示した（図2B）。最も高いHID-5/ソライアシン蛋白質レベルは、無血清で培養したコンフルエントな細胞（図2B）で観察された。

【0074】

細胞外マトリックスからの細胞の分離の影響は、MCF10A細胞を数日間懸濁培養することによって調べた。細胞固定の欠如も、HID-5/ソライアシン蛋白質レベルを劇的に増加させた（図2C）。ノーザンブロット分析では、細胞懸濁およびコンフルエントによるHID-5/ソライアシン発現が、mRNAレベルで起きていることが示された（図2D）。MCF10A細胞の細胞周期分析では、血清枯渇、コンフルエント、および細胞固定の欠如によって、最終的にG1期停止、および引き続いてアポトーシスが誘導されることが分かった（データは示さず）。これらの細胞外シグナルによってHID-5/ソライアシン発現が劇的にアップレギュレーションされることは、HID-5/ソライアシンがこれらの細胞過程の調節に参与している可能性を示す。興味深いことに、乾癬性病変に由来するケラチノサイトは、正常皮膚に由来するケラチノサイトと比較して、アポトーシスに抵抗性であることが示されている（Wronne-Smithら(1997) *Am J. Pathol.* 151:1321-1329）。高悪性度DCIS腫瘍は、アポトーシス率が高く（Pageら(2000) *Curr. Opin. Oncol.* 12:526-531）、生存している腫瘍細胞はアポトーシスに比較的抵抗である可能性がある。

【0075】

実施例4. HID-5/ソライアシンは部分的に分泌される細胞質蛋白質である

HID-5/ソライアシン蛋白質の細胞内局在性を決定するために、図2Aで「CI 1」と呼ばれるモノクローナル抗HID-5/ソライアシン抗体を用いて、MDA-MB468乳癌細胞および指数増殖期および無血清培養したMCF10A細胞の免疫組織化学を行なった（図3A）。MDA-MB468細胞および無血清培養のMCF10A細胞において、核および細胞質染色の両方が観察されたが、陰性対照抗血清でも指数増殖するMCF10A細胞でも、染色は見られなかった（図3A）。以前の結果では、ソライアシンは膀胱癌患者の尿で検出され、シグナルペプチドを含まないにもかかわらず乾癬性ケラチノサイトによって部分的に分泌されることが示されている（Madsenら(1991) *J. Invest. Dermatol.* 97:701-712; Ostergaardら(1999) *Electrophoresis* 20:349-354）。HID-5/ソライアシンが乳癌細胞によっても分泌されるかどうかを決定するために、抗HID-5/ソライアシンポリクローナル抗体を用いて、MDA-MB468細胞の細胞溶解物および培養培地の免疫沈降を行なった。免疫沈降物はSDS-PAGEで分離し、ポリクローナル抗HID-5抗体を用いてウェスタンブロットで分析した。HID-5/ソライアシン蛋白質は、細胞溶解物および培養培地の両方から抗HID-5抗体を用いて沈降したが（「HID-5」）、対照の免疫前血清では、蛋白質の沈降はなかった（「P.I.」）（図3B）。したがって、HID-5/ソライアシン蛋白質は、乳癌細胞から部分的に分泌または放出される。したがって、乳癌患者の体液（例、血液および尿）中で検出可能である可能性が高い。そのような体液中でのHID-5の検出は、高悪性度の乳癌、例えば、高悪性度DCISの試験方法となり得る。

【0076】

実施例5. 原発性乳癌におけるHID-5/ソライアシン蛋白質レベルの免疫組織化学分析

HID-5/ソライアシン蛋白質のインピボ発現を分析するために、モノクローナル抗HID-5/ソライアシン抗体を用いて、ホルマリン固定、パラフィン包埋乳癌の免疫組織化学分析を行なった。染色の信頼性を評価するために、以前にmRNAインサイチュウハイブリダイゼーションでHID-5/ソライアシンを発現することが示されている高悪性度のコメドDCIS腫瘍を分析した。抗HID-5抗体を用いると腫瘍細胞では強い免疫組織化学染色が検出されたが（「HID-5」）、アイソタイプ対照血清を用いても染色は見られなかった（「対照」）（図3

10

20

30

40

50

C)。

【0077】

2つの組織マイクロアレイを試験した。アレイ1は正常乳房組織の5種類の試料および原発性浸潤性乳癌の30種類の試料(低、中、および高悪性度それぞれ10種類)から構成され、アレイ2は6種類の正常乳房組織試料、3種類の良性過剰増殖病変試料、および49種類の原発性浸潤性乳管癌試料から構成される。2つのアレイの模式図は図3Eに示されている。アレイ1では、各腫瘍試料3パンチ(水平の列)がスライドに固定され、腫瘍は組織学的悪性度(低、中、および高悪性度腫瘍)にしたがって分類されている。アレイ1の腫瘍試料は、ER (ER) およびerbB2の発現、ならびにCD45汎白血球抗原に特異的な抗体を用いて白血球の存在についても分析された。アレイ2では、最初の垂直の列は正常乳房組織6試料、良性過剰増殖病変3試料、および空のスポット(線影をつけて示す)を含む。アレイ2の試料は、ER、プロゲステロン受容体(PR)、およびp53の発現について分析した。代表的な腫瘍の染色は、図3Dに示されており、結果は図3Eにまとめられている。

10

【0078】

予想通り、低悪性度腫瘍は大部分ER陽性、erbB2陰性、およびCD45低レベルであり、高悪性度腫瘍は大部分ER陰性、erbB2陽性、およびCD45高レベルだった。いずれの正常乳房組織試料でも、良性過剰増殖病変でも、有意なHID-5/ソライアシン発現は見られなかった(図3E)。HID-5/ソライアシン陽性の浸潤性腫瘍は、大部分ER陰性だった。調べた78個の腫瘍のうちで、38個はHID-5/ソライアシン陽性(15 ER+および23 ER-)で、40個はHID-5/ソライアシン陰性(26 ER+および14 ER-)だった。これらの結果から、HID-5/ソライアシン陽性腫瘍はER陰性である可能性が高い($P=0.04$, フィッシャーの直接法)。低悪性度腫瘍の3つのパンチの1つでは、高レベルのHID-5/ソライアシンが観察された(図3E、アレイ1);しかし、この腫瘍は高悪性度DCIS病変であることが後にわかった。

20

【0079】

HID-5/ソライアシンはリンパ球の正の化学走性誘因物質だと推定されており、乾癬皮膚および高悪性度DCIS病変のいずれも、しばしばリンパ球の浸潤が見られる(Bosら(1999) Immunol. Today 20:40-46; Pageら(2000) Curr. Opin. Oncol. 12:526-531)。CD45染色によって示されるリンパ球の浸潤は、高悪性度腫瘍では頻繁に見られるが、CD45とHID-5/ソライアシン陽性との間に明確な関連は見られなかった(図3E)。これは試料数が比較的少ないためか、癌が浸潤性であり非浸潤性でないためかである可能性がある。

30

【0080】

HID-5/ソライアシンの発現が乳癌の組織病理学的または臨床的特徴と相関するかどうかを決定するために、722個の乳癌の免疫組織化学的分析が別途に行われた。全体として、腫瘍の約30%はHID-5/ソライアシン陽性だった。免疫組織化学的データの統計分析では、HID-5/ソライアシンは非浸潤性および原発性浸潤腫瘍と、遠隔転移では統計的な有意差があることが示された。具体的には、非浸潤および原発性浸潤腫瘍は、遠隔転移よりもHID-5/ソライアシン陽性である可能性が高い($p=0.008$)。原発性浸潤乳癌におけるHID-5/ソライアシン発現のロジスティック回帰モデル分析では、HID-5/ソライアシンの陽性と、エストロゲン受容体の欠如(オッズ比(OR)=6.25および尤度比(LR)= $p=0.001$)、組織学的高悪性度(OR=20.85、LR $P=0.0007$)、および4の陽性リンパ節(OR=10.025, LR $p=0.01$)の間に統計的に有意な正の相関が示された。すなわち、HID-5/ソライアシン陽性の原発性浸潤性乳癌は、エストロゲン受容体(ER)陰性で、4の陽性リンパ節を持つ組織学的に高悪性度である可能性が高い。腫瘍試料のサブセット(156名の韓国人患者)では、HID-5/ソライアシン発現はerbB2発現と正の相関を示したが(OR=5.29, LR $p<0.0001$)、これは結合したデータセットでは見られず、おそらく民族差を示している可能性がある。この試験では、フィッシャーの直接法を用いて、乳癌細胞ではS100A7の発現がFASN(脂肪酸合成酵素)($p=9.95 \times 10^{-6}$)、およびトレフォイル因子3(trefoil factor 3: TFF3)($p=0.002$)の発現の可能性の上昇、ならびに結合組織成長因子(connective tissue growth factor: CTGF)($p=0.005$)の発現の低下と関連することも示された。また、FASNの乳癌細胞に

40

50

おける発現は、TFF3 ($p=3.5 \times 10^{-6}$) および SPARC ($p=4 \times 10^{-5}$) と関連していた。

【0081】

ER陰性、複数の陽性リンパ節を持つ高悪性度腫瘍は、一般に臨床転帰が悪いので、全体およ無遠隔転移なしの生存に対するHID-5/ソライアシンの発現を解析した。臨床追跡データは、患者のサブセット(156名の韓国人患者)のみで、またわずか7年までしか得られていなかった。この解析では、HID-5/ソライアシン陽性腫瘍の患者は、5年を超える生存率がいくらか低下した。しかし、この低下は統計的に有意ではなかった。

【0082】

要約すると、正常乳房上皮細胞およびDCIS腫瘍の遺伝子発現プロファイルのSAGE解析で、乾癬に關与するいくつかの遺伝子が、高悪性度DCISで異常発現しており、これらの腫瘍で最も多い転写物の1つがHID-5/ソライアシンであることが示された。インビトロの乳房上皮細胞におけるHID-5/ソライアシンの劇的なアップレギュレーションは、増殖因子の除去、細胞のコンフルエンス、および細胞外マトリックスへの接着の欠如によって誘導される。これらの条件は全て高い増殖率を特徴とする高悪性度DCISおよび乾癬性皮膚病変で起こり得るので、これらの細胞におけるHID-5/ソライアシンの高レベルの発現は、同じシグナルによる可能性があり、HID-5/ソライアシンはこれらの細胞のアポトーシス抵抗性の獲得に關与している可能性がある。

【0083】

本発明のいくつかの態様が記述されている。しかし、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、様々な改変が行なえることは理解されると思われる。したがって、他の態様は特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1A】レーザーキャプチャマイクロダイセクション(LCM)で精製された原発性乳癌および対応する正常な乳房上皮における、HID-5/ソライアシンmRNA発現のリアルタイムPCR解析の結果を示す棒グラフである。データは、対応する正常上皮におけるHID-5/ソライアシンmRNAレベルに対する、癌性上皮におけるHID-5/ソライアシンmRNAレベルの比(「T/N比」として表されている。各バーには症例番号が表示されており、略号は癌腫が非浸潤性(in situ)(「is」)か浸潤性(invasive)(「inv」)かを示す。癌腫が高悪性度(「H」)か、中悪性度(「I」)か、低悪性度(「L」)か、およびエストロゲン受容体(「ER」)、プロゲステロン受容体(「PR」、およびerbB2の発現があるか(「+」)ないか(「-」)が示されている。

【図1B】ヘマトキシリン・エオジン(「H&E」)染色または³³P標識アンチセンスもしくはセンスHID-5/ソライアシンリポプローブとインサイチュールハイブリダイゼーションを行なった、2つの高悪性度コメドDCIS腫瘍(「DCIS-1」および「DCIS-2」)の組織切片の顕微鏡写真である。アンチセンスリポプローブで分析した試料は、4xおよび20xの倍率の対物レンズを用いた、「明視野」および「暗視野」条件で顕微鏡写真を撮影した。センスリポプローブで分析した試料は、20xの倍率の対物レンズのみを用いて、「暗視野」条件で顕微鏡写真を撮影した。2つの低悪性度および中悪性度のDCIS腫瘍を同様にインサイチュールハイブリダイゼーション解析したが、どの試料でもHID-5/ソライアシンmRNAは検出できなかった。

【図2A】ポリクローナル抗HID-5抗体(左パネル)および4つのモノクローナル抗HID-5抗体(右パネル)の特異性を示す免疫プロットの1組の写真である。HID-5発現(「H」)および対照のHID-5非発現(「C」)細胞溶解液を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリリアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析し、得られたゲルを膜にブロッティングし、対照の免疫前血清(「P.I.」)、ポリクローナル抗HID-5抗体(「HID5」)、または4つのモノクローナル抗HID-5抗体(「CI 1」, 「CI 2」, 「CI 3」, および「CI 4」)で染色した。「M」と示されたレーンは、17kDaおよび7kDaの分子量マーカーの位置を示す。両方のパネルでHID-5の位置が示されている(「HID-5/ソライアシン」)。

【図2B】低い(「0.2%血清培地」)または高い(「5%血清培地」)濃度の血清を含む

10

20

30

40

50

培地中で、コンフルエント（「コンフルエント細胞」）または低密度（「低密度細胞」）の培養条件下で培養したMCF10A細胞によるHID-5蛋白質発現の相対レベルを示す免疫プロットの3枚の写真である。細胞は0日、2日、4日、8日、12日および16日培養した後、HID-5蛋白質発現を検定した。プロットは図2Aのようにして作製し、HID-5に特異的なポリクローナル抗体で染色した。免疫プロット上の、HID-5（「HID-5/ソライアシン」）および対照蛋白質（「 チューブリン」）の位置が示されている。

【図2C】0日、1日、2日および3日間懸濁培養したMCF10A細胞により発現されたHID-5蛋白質の相対レベルを示す免疫プロットの写真である。プロットは、図2Aのようにして作製し、HID-5に特異的なポリクローナル抗体で染色した。免疫プロット上の、HID-5（「HID-5/ソライアシン」）および対照蛋白質（「 チューブリン」）の位置が示されている。 10

【図2D】1日、2日および3日間懸濁培養（「懸濁」）、または4日、8日および12日間コンフルエントな培養条件（「コンフルエンス」）で培養したMCF10A細胞によって発現されるHID-5 mRNAの相対レベルを示すノーザンプロットのオートラジオグラムの写真である。示された時間に細胞からRNAを単離し、以前に記述されたようにして（Kropfら（2001）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9796-9801）、RNAをノーザンプロット解析した。プロットは³²P標識HID-5および アクチンcDNAプローブを用いて順次解析した。プロット上のHID-5（HID-5/ソライアシン）および アクチンの位置が示されている。

【図3A】指数増殖（「指数増殖」）または無血清下（「無血清」）で増殖しているMDA-MB-468乳癌細胞（左パネル）およびMCF10A正常乳房上皮細胞（右パネル）の培養の顕微鏡写真である。MDA-MB-468細胞は抗HID-5モノクローナル抗体（左パネル、下の顕微鏡写真） 20、または対照の正常マウス血清（左パネル、上の顕微鏡写真）で染色された。MCF10A細胞は、抗HID-5モノクローナル抗体で染色された。対照の正常マウス血清で染色したMCF10A細胞では、染色は観察されなかった。左の顕微鏡写真は、2xの倍率の対物レンズ、右の顕微鏡写真は10xの倍率の対物レンズを用いて撮影した。

【図3B】培養MDA-MB-468細胞によるHID-5の分泌と細胞内局在性を示す免疫プロットの写真である。MDA-MB-468細胞溶解液全体（「全体」）、およびMDA-MB-468細胞からポリクローナル抗HID-5抗体（「HID-5」）または対照の免疫前血清（「P.I.」）によって溶解液（「細胞」）または細胞上清（「培地」）から免疫沈降した蛋白質をSDS-PAGEで分析し、免疫プロット分析した。HID-5（「HID-5/ソライアシン」）の免疫プロット上の位置が示されている。 30

【図3C】ヘマトキシリン・エオジン（「H&E」）（左の写真）、抗HID-5モノクローナル抗体（「HID-5」）（右の写真）、および対照の正常マウス血清（「対照」）（中央の写真）で染色した、高悪性度コメドDCIS病変の切片の3枚の顕微鏡写真である。

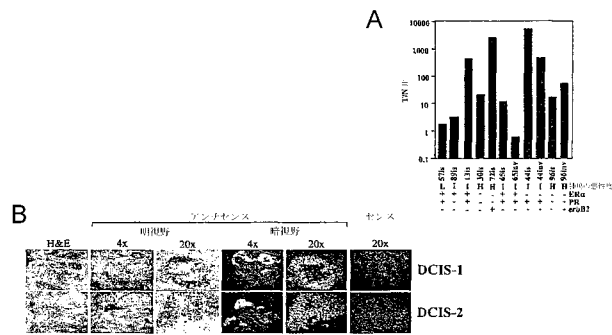
【図3D】ヘマトキシリン・エオジン（「H&E」）、HID-5、ER、erbB2、またはCD45に特異的なモノクローナル抗体、または対照の正常マウス血清（「対照」）を用いて染色した組織アレイ中の、代表的な乳房腫瘍由来の試料の6枚の顕微鏡写真である。

【図3E】2つの組織アレイの免疫化学的解析の結果を模式的にまとめたものである。アレイ1は、5つの正常乳房組織試料および30個の原発性浸潤性乳癌試料（低、中、高悪性度それぞれ10ずつ）、アレイ2は、6つの正常乳房組織試料、3つの良性過剰増殖病変、および49個の原発性浸潤性乳管癌試料から構成される。アレイ1では、各腫瘍試料3パンチ（水平の列）をスライドに付着させ、腫瘍は組織学的段階（低、中、および高悪性度の腫瘍）にしたがって分類した。アレイ1の腫瘍試料では、HID-5、ER（ER）、およびerbB2の発現、ならびに汎白血球抗原CD45に特異的な抗体を用いて、白血球の存在を解析した。アレイ2の最初の縦の列は、正常乳房組織6試料、良性の過剰増殖病変3試料、および空のスポット（線影をつけて示す）1つを含む。アレイ2の試料では、ER、プロゲステロン受容体（PR）、およびp53について解析した。HID-5およびER発現のデータを示す。染色の強度は、影の濃さで示され、白は検出可能な染色がないことを、黒は非常に強い染色を表す。線影をつけた四角形は、アレイ上の空のスポット、または染色手順中に試料が失われたことを表す。 40

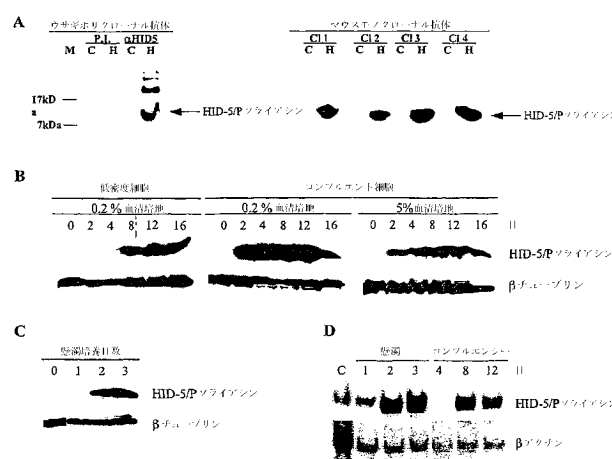
【図4A】HID-5/ソライアシンのアミノ酸配列（配列番号：1）を示す。 50

【図4B】HID-5/ソライアシンの核酸配列（配列番号：2）を示す。

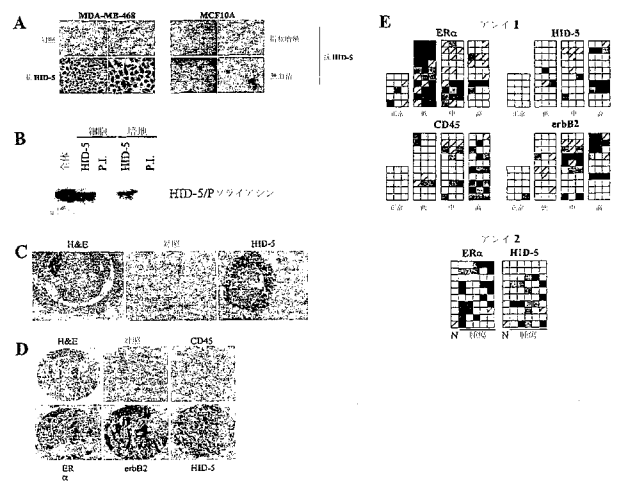
【図1】



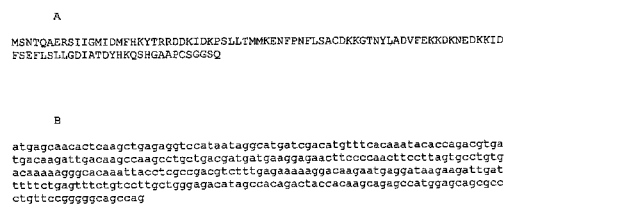
【図2】



【図3】



【図4】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/41795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/00, 1/68; G01N 33/53; A61K 38/00, 48/00, 39/395 US CL : 435/4, 6, 7.1; 514/2, 43; 434/130.1 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) U.S. : 435/4, 6, 7.1; 514/2, 43; 434/130.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, Biosis, Scisearch, Lifesci, Biotechds, Caplus, USPATfull, PCTfull, Europatfull, on STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PORTER et al. A SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) View of Breast Tumor Progression. Cancer Research. 01 August 2001, Vol. 61, pages 5697-5702, see entire document.	1-27
Y	WATSON et al. Molecules in focus: Psoriasis (S100A7). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. May 1998, Vol. 30, pages 567-571, see entire document.	1-27
Y	LEYGUE et al. Differential Expression of Psoriasis Messenger RNA between in Situ and Invasive Human Breast Carcinoma. 15 October 1996, Vol. 66, pages 4606-4609, see entire document.	1-7
Y	WO 00/55629 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY, INC.) 21 September 2000, see abstract.	1-27
<input 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	"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
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 04 October 2003 (04.10.2003)		Date of mailing of the international search report 14 OCT 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-2230		Authorized officer Anthony Capula Telephone No. 703-308-0196

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 15/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 5/06	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	A
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	E
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ポリャック コーネリア
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックリン # 6 エフ ビーコン ストリート 1 8 5
 6

(72) 発明者 エネルバック シャーロット
 スウェーデン国 ヨテボリ トルベッドガタン 2 4

F ターム(参考) 2G045 BB14 CB01 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA36 CA03 CA05 CA09 HA14
 4B063 QA06 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ52 QQ53 QQ79 QR35 QR36
 QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS33 QS34
 4B065 AA93X BB19 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA13 AA17 AA19 BA01 BA08 BA21 BA23 BA44 DA01
 NA14 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB11 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005526233A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003557518	申请日	2002-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
[标]发明人	ポリャックコーネリア エネルバックシャーロット		
发明人	ポリャック コーネリア エネルバック シャーロット		
IPC分类号	G01N33/68 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P35/00 A61P37/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/06 C12N15/09		
CPC分类号	A61P15/00 G01N33/57415 G01N33/57488		
FI分类号	G01N33/68.ZNA A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P15/00 A61P35/00 A61P37/02 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/574. A C12N5/00.E C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB14 2G045/CB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024 /CA03 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA14 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR35 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063 /QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA93X 4B065/BB19 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084 /BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/EE01 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZB26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/345740 2001-12-31 US		
其他公开文献	JP2005526233A		

摘要(译)

本发明的特征在于诊断高级别导管原位癌 (DCIS) 的方法。这些方法涉及测量：(1) 被怀疑患有或处于危险中的受试者的体液 (例如血液或尿液) 中HID-5的水平。具有高级DCIS的；(2) 怀疑患有高等级DCIS或有患高等级DCIS的受试者的乳房组织中HID-5基因表达的水平。本发明还体现了抑制DCIS细胞中HID-5蛋白表达的方法和治疗怀疑患有高等级DCIS或有患高等级DCIS风险的受试者的方法。