

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/037555

発行日 平成21年4月16日 (2009. 4. 16)

(43) 国際公開日 平成19年4月5日 (2007. 4. 5)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|
| A 6 1 K 45/00 (2006. 01) | A 6 1 K 45/00 | 2 G O 4 5 |
| A 6 1 P 35/00 (2006. 01) | A 6 1 P 35/00 | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 31/7088 (2006. 01) | A 6 1 K 31/7088 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 K 48/00 (2006. 01) | A 6 1 K 48/00 | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 39/395 (2006. 01) | A 6 1 K 39/395 D | 4 C O 8 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | (全 48 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|--|
| 出願番号 | 特願2007-537785 (P2007-537785) | (71) 出願人 | 502019933 リンク・ジェノミクス株式会社 |
| (21) 国際出願番号 | PCT/JP2006/320043 | | 東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 |
| (22) 国際出願日 | 平成18年9月29日 (2006. 9. 29) | (74) 代理人 | 100092783 弁理士 小林 浩 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2005-286207 (P2005-286207) | (74) 代理人 | 100095360 弁理士 片山 英二 |
| (32) 優先日 | 平成17年9月30日 (2005. 9. 30) | (74) 代理人 | 100126354 弁理士 藤田 尚 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | (74) 代理人 | 100104282 弁理士 鈴木 康仁 |
| | | (72) 発明者 | 丹羽 眞一郎 東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 リン ク・ジェノミクス株式会社内 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 D U S P 1 5 遺伝子の治療的又は診断的用途

(57) 【要約】

本発明は、D U S P 1 5 タンパク質の発現阻害物質または活性阻害物質を含有するがん治療剤；そのような治療剤の有効成分として使用し得る化合物のスクリーニング方法；D U S P 1 5 タンパク質に対する抗体；その抗体などを用いるがん診断剤・がん診断方法などを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

D U S P 1 5 遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤。

【請求項 2】

前記 D U S P 1 5 遺伝子の発現阻害物質が、

(a) D U S P 1 5 遺伝子の発現を R N A i 効果により阻害する作用を有する核酸、

(b) D U S P 1 5 遺伝子の転写産物またはその一部に対するアンチセンス核酸、
および

(c) D U S P 1 5 遺伝子の転写産物を特異的に切断するリボザイム活性を有する核酸

、

からなる群から選択される物質を含む、請求項 1 に記載のがん治療剤。

【請求項 3】

D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤。

【請求項 4】

前記 D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質が、

該 D U S P 1 5 タンパク質に対する抗体、

を含む、請求項 3 に記載のがん治療剤。

【請求項 5】

前記がんが、大腸がんまたは子宮頸がんである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のがん治療剤。

【請求項 6】

D U S P 1 5 遺伝子の発現阻害物質をスクリーニングする方法であって、

(a) D U S P 1 5 遺伝子を発現する細胞に、被検化合物を接触させる工程、

(b) 該 D U S P 1 5 遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、該発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を包含する、スクリーニング方法。

【請求項 7】

D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質をスクリーニングする方法であって、

(a) D U S P 1 5 タンパク質と被検化合物とを接触させる工程、

(b) 該 D U S P 1 5 タンパク質と被検化合物との結合活性を測定する工程、および

(c) 該 D U S P 1 5 タンパク質と結合する化合物を選択する工程を包含する、スクリーニング方法。

【請求項 8】

前記がんが、大腸がんまたは子宮頸がんである、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

D U S P 1 5 タンパク質に対する抗体。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の抗体を含有するがん治療剤。

【請求項 11】

放射性同位元素、治療タンパク質、低分子の薬剤、または治療遺伝子を担持したベクターをさらに含有する、請求項 10 に記載のがん治療剤。

【請求項 12】

前記がんが、大腸がんまたは子宮頸がんである、請求項 10 または 11 に記載のがん治療剤。

【請求項 13】

請求項 9 に記載の抗体を含有するがん診断剤。

【請求項 14】

D U S P 1 5 遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列を含有するがん診断剤。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記がんが大腸がんである、請求項 13 または 14 に記載のがん診断剤。

【請求項 16】

請求項 9 に記載の抗体を含有するがん診断用キット。

【請求項 17】

DUSP15 遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有するがん診断用キット。

【請求項 18】

前記がんが大腸がんである、請求項 16 または 17 に記載のがん診断用キット。

【請求項 19】

被験者由来の生体試料中の DUSP15 タンパク質または DUSP15 遺伝子のがんマーカーとして検出および/または定量する方法。

【請求項 20】

前記生体試料が、全血、血清、または血漿である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

質量分析装置を用いて、DUSP15 タンパク質を検出および/または定量する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

抗 DUSP15 抗体を用いて、DUSP15 タンパク質を検出および/または定量する、請求項 19 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

(a) 被験者由来の生体試料と、DUSP15 タンパク質に対する抗体とを接触させる工程、および

(b) 前記試料中での前記抗体と、DUSP15 タンパク質との結合を検出および/または定量する工程、を包含する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

(a) 被験者由来の生体試料と、DUSP15 遺伝子またはその断片の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドとを接触させる工程、および

(b) 前記試料中での前記ポリヌクレオチドと、DUSP15 遺伝子またはその断片とのハイブリダイゼーションを検出および/または定量する工程、を包含する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 25】

がんの診断に用いるための請求項 19 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記がんが、大腸がんである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、または配列番号 10 の塩基配列を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項 28】

DUSP15 遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤であって、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、または配列番号 10 の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有する、がん治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がんにおいて特異的に増幅している遺伝子である DUSP15 遺伝子、その治療的又は診断的用途などに関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

悪性腫瘍（がん）の特徴として、増殖・浸潤・転移を経て全身化することによる致死があげられる。外科的な切除または放射線治療のような局所療法では、転移性再発がんに対して十分な対処はできず、全身療法である薬物療法の発展が、今後のがん治療成績の向上に期待されている。

がん薬物療法の現在の中心である化学療法は、直接がん細胞のDNAおよび/またはRNAに作用し、細胞を死に至らせる殺細胞薬剤を用いる場合が多いが、がん細胞以外の、例えば、骨髄細胞、生殖細胞、毛母細胞、消化管上皮細胞など分裂がさかんな正常細胞に対しても作用し、強い副作用をもたらしていた。一方、近年の分子細胞生物学の進歩により、がん細胞の浸潤・増殖・転移などにかかわるメカニズムが解明され、そのがん細胞の特定メカニズムに特異的に作用する分子標的薬の開発が注目されている。代表例として、非小細胞肺癌の治療に効果のあるEGFR（上皮成長因子受容体）、チロシンキナーゼ阻害剤であるイレッサ（一般名：ゲフィチニブ）（WO96/33980）、乳がんの治療に効果のあるHER-2（ヒト上皮成長因子受容体2）のヒト化モノクローナル抗体のハーセプチン（一般名：トラスツズマブ）（WO94/00136）などがあげられる。しかしながら、現状では未だ有効な分子標的薬は少なく、今後更なる各がん種に対する有効な分子標的薬の開発が望まれている。

10

日本人の大腸がんは年々増加の傾向にあり、死亡数は、肺がん、胃がんに次いで3位になっている。年齢別では60歳代が一番多く、次いで50歳代、70歳代の順である。大腸がんの増加の原因には、遺伝的要因、環境的要因などが考えられるが、食生活の西欧化、特に動物性脂肪の取りすぎが原因ではないかと指摘されている。大腸がんの有効な分子標的薬の開発が待たれている。また、診断に用いられている腫瘍マーカー（CEA, CA19-9）は、進行大腸がんであっても約半数が陽性を示すのみで、臓器特異性も無く、より高性能な診断薬の開発が望まれている。

20

【 発明の開示 】

【 0 0 0 3 】

上記のような状況下で、がんを治療および/または診断するための新たな薬剤または方法が求められている。

特に、がんに対して特異性の高い治療薬および/または診断薬が求められている。

上記のような状況に鑑み、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、がん（特に、大腸がん）において高頻度に増幅が起きている遺伝子が、DUSP15遺伝子であることを見出した。本発明者らはさらに、大腸がん細胞株ならびに子宮頸がん細胞株においてDUSP15タンパク質の発現を阻害することによって、癌細胞の増殖を抑制し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下に記載するがん治療剤、がん抑制作用を有する候補物質のスクリーニング方法、がん診断剤、がん診断用キット、がんの診断方法などを提供する。

30

(1) DUSP15遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤。

(2) 上記DUSP15遺伝子の発現阻害物質が、

(a) DUSP15遺伝子の発現をRNAi効果により阻害する作用を有する核酸、

(b) DUSP15遺伝子もしくはその一部、またはその転写産物に対するアンチセンス核酸、

40

(c) DUSP15遺伝子またはその一部に対するデコイ核酸、

(d) DUSP15遺伝子またはその一部に対してドミナントネガティブに作用するDUSP15遺伝子変異体

(e) DUSP15遺伝子の転写産物を特異的に切断するリボザイム活性を有する核酸、

および

(f) DUSP15遺伝子の転写またはDUSP15 mRNAの翻訳を阻害する化合物（上記核酸を除く）

からなる群から選択される物質を含む、上記(1)に記載のがん治療剤。

50

- (3) D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤。
- (4) 上記 D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質が、
- (a) 該 D U S P 1 5 タンパク質に対する抗体、
 - (b) 該 D U S P 1 5 タンパク質に対してドミナントネガティブの性質を有する D U S P 1 5 タンパク質変異体、および、
 - (c) 該 D U S P 1 5 タンパク質に結合する化合物（上記抗体および変異体を除く）からなる群から選択される物質を含む、上記（3）に記載のがん治療剤。
- (5) 上記がんが、大腸がんまたは子宮頸がんである、上記（1）～（4）のいずれかに記載のがん治療剤。
- (6) D U S P 1 5 遺伝子の発現阻害物質をスクリーニングする方法であって、
- (a) D U S P 1 5 遺伝子を発現する細胞に、被検化合物を接触させる工程、
 - (b) 該 D U S P 1 5 遺伝子の発現レベルを測定する工程、および
 - (c) 被検化合物を接触させない場合と比較して、該発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を包含する、スクリーニング方法。
- (7) D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質をスクリーニングする方法であって、
- (a) D U S P 1 5 タンパク質と被検化合物とを接触させる工程、
 - (b) 該 D U S P 1 5 タンパク質と被検化合物との結合活性を測定する工程、および
 - (c) 該 D U S P 1 5 タンパク質と結合する化合物を選択する工程を包含する、スクリーニング方法。
- (8) 上記がんが、大腸がんまたは子宮頸がんである、上記（6）または（7）に記載の方法。
- (9) D U S P 1 5 タンパク質に対する抗体。
- (10) 上記（9）に記載の抗体を含有するがん治療剤。
- (11) 放射性同位元素、治療タンパク質、低分子の薬剤、または治療遺伝子を担持したベクターをさらに含有する、上記（10）に記載のがん治療剤。
- (12) 上記がんが、大腸がんまたは子宮頸がんである、上記（10）または（11）に記載のがん治療剤。
- (13) 上記（9）に記載の抗体を含有するがん診断剤。
- (14) D U S P 1 5 遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列を含有するがん診断剤。
- (15) 上記がんが大腸がんである、上記（13）または（14）に記載のがん診断剤。
- (16) 上記（9）に記載の抗体を含有するがん診断用キット。
- (17) D U S P 1 5 遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有するがん診断用キット。
- (18) 上記がんが大腸がんである、上記（16）または（17）に記載のがん診断用キット。
- (19) 被験者由来の生体試料中の D U S P 1 5 タンパク質または D U S P 1 5 遺伝子のがんマーカーとして検出および/または定量する方法。
- (20) 前記生体試料が、全血、血清、または血漿である、上記（19）に記載の方法。
- (21) 質量分析装置を用いて、D U S P 1 5 タンパク質を検出および/または定量する、上記（19）または（20）に記載の方法。
- (22) 抗 D U S P 1 5 抗体を用いて、D U S P 1 5 タンパク質を検出および/または定量する、上記（19）～（21）のいずれかに記載の方法。
- (23) (a) 被験者由来の生体試料と、D U S P 1 5 タンパク質に対する抗体とを接触させる工程、および
- (b) 上記試料中での上記抗体と、D U S P 1 5 タンパク質との結合を検出および/または定量する工程、
- を包含する、上記（22）に記載の方法。
- (24) (a) 被験者由来の生体試料と、D U S P 1 5 遺伝子またはその断片の塩基配列

にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドとを接触させる工程、および

(b) 上記試料中での上記ポリヌクレオチドと、DUSP15 遺伝子またはその断片とのハイブリダイゼーションを検出および/または定量する工程、を包含する、上記(19)または(20)に記載の方法。

(25) がんの診断に用いるための上記(19)~(24)のいずれかに記載の方法。

(26) 前記がんが、大腸がんである、上記(25)に記載の方法。

(27) DUSP15 遺伝子の発現阻害物質を患者に投与する工程を包含する、がん治療方法。

(28) DUSP15 タンパク質の活性阻害物質を患者に投与する工程を包含する、がん治療方法。

(29) がんを治療するための医薬の製造のための、DUSP15 遺伝子の発現阻害物質の使用。

(30) がんを治療するための医薬の製造のための、DUSP15 タンパク質の活性阻害物質の使用。

(31) 配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号10の塩基配列を有する、ポリヌクレオチド。

(32) DUSP15 遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤であって、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、または配列番号10の塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有する、がん治療剤。

本発明により、がん(例えば、大腸がん)の治療および/または診断に有用な新規な薬剤、キットおよび方法、ならびにがん抑制作用を有する候補化合物のスクリーニング方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、DUSP15 遺伝子の大腸がん患者由来の200検体における遺伝子増幅度に対する頻度を示すヒストグラムである。

図2は、大腸がん細胞株Caco2およびRKOE6に、DUSP15 遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合の、RNAi解析の結果を示す光学顕微鏡写真(位相差像)である。

図3は、大腸がん細胞株Caco2にDUSP15 遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合の、RNAi効果を定量的RT-PCRにより評価した結果を示すグラフである。

図4は、大腸がん細胞株Caco2およびRKOE6にDUSP15 遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合の、生細胞数測定によるRNAi効果を評価した結果を示すグラフである。

図5は、大腸正常組織由来の細胞株CCD18CoにDUSP15 遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合の、RNAi効果を光学顕微鏡により検証した結果を示す写真(位相差像)である。

図6は、大腸正常組織由来の細胞株CCD18CoにDUSP15 遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合の、RNAi効果を生細胞数測定により検証した結果を示すグラフである。

図7は、正常な種々の臓器組織を用いて行ったノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。

図8は、FISH法で解析した大腸癌患者由来の各検体組織(A~J)のがん細胞の一部(6細胞分)の光学顕微鏡写真(蛍光像)である。

図9Aおよび図9Bは、質量分析により解析した(A)大腸がん患者由来の血清および(B)健常者由来の血清についての結果をそれぞれ示すグラフである。

図10A~Cは、MS/MS解析によって決定された、図9に示すピークとアミノ酸(またはアミノ酸配列)との対応関係を示す。

10

20

30

40

50

図11は、子宮頸癌細胞株HeLa細胞株にDUSP15遺伝子のsiRNAをトランスフェクトした場合の、RNAi効果を生細胞数測定により検証した結果を示すグラフである。

図12は、図11の実験を時系列に従い、顕微鏡下で撮影し、その動態を詳細に観察した結果を示す光学顕微鏡写真(微分干渉像)である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明者らは、大腸がん患者由来の検体を用いてアレイCGH法による増幅遺伝子の検証を行い、大腸がん特異的な遺伝子増幅領域を特定した。検体において高頻度に増幅が起きている領域のうち、ヒトDUSP15(Dual specificity phosphatase-like 15)遺伝子が大腸がん患者由来の検体において高頻度であることを見出した。

DUSP15は、非受容体型のプロテインチロシンホスファターゼファミリー(Protein-tyrosine phosphatase family)に属し、プロテインチロシンホスファターゼ(Protein-tyrosine phosphatase)活性およびセリン/スレオニン特異的ホスファターゼ(Serine/threonine-specific phosphatase)活性を有する。そのため、二重特異性ホスファターゼ(Dual specificity phosphatase(DSP))と呼ばれる。

プロテインホスファターゼ(Protein phosphatase)は、セリン/スレオニン特異的ホスファターゼ(PP1, PP2など)とシステイン残基を含むチロシンホスファターゼ(Tyrosine phosphatase)(PTP)とに分けられる(Tonks, N. K. & Neel, B. G. (1996) Cell 87, 365-368; Mustelin, T., et al. (2002) Front. Biosci. 7, 85-142; Mustelin, T., et al. (2003) Immunol, Rev. 192, 139-147)。最近ではさらに、アスパラギン酸を含む金属イオン依存性のPTP(Tootle, T. L., et al. (2003) Nature 426, 299-302; Rayapureddi, J., et al. (2003) Nature 426, 295-298; Li, X., et al. (2003) Nature 426, 247-254)が見つかっている。PTPは、PTP1B(Charbonneau, H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 5252-5256)に代表される非受容体型とCD45(Hermiston, M. L. et al. (2003) Annu. Rev. Immunol. 21, 107-137)に代表される受容体型に加え、プロテインチロシンホスファターゼ活性およびセリン/スレオニン特異的ホスファターゼ活性の両方を有する非受容体型のDSP(Yuvaniamaya, J., et al. (1996) Science 272, 1328-1331; Denu, J. M., et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 3796-3803; Keyse, S. M. (1998) Semin. Cell Dev. Biol. 9, 143-152; Camps, M., et al. (1999) FASEB J. 14, 6-16; Keyse, S. M. (2000) Curr. Opin. Cell Biol. 12, 186-192; Myers, M. P., et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 9052-9057)に分類される。ヒトゲノム上のPTPは96種の遺伝子が存在し、その内、非受容体型は26種、受容体型は29種、残りDSPについては41種類あるとの報告がある(Bhaduri, A. & Sowdhamini, R. (2003) Protein Eng. 16, 881-888)。

DSPの代表例として、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(Mitogen-activated protein kinase)であるErk、Jnk、p38より脱リン酸化し不活性させるMAPキナーゼホスファターゼ(MAP kinase phosphatase(MKP))が知られている(Saxena, M. & Musteli

10

20

30

40

50

n, T. (2000) *Semin. Immunol.* 12, 387-396; Alonso, A., et al. (2003) *Top. Curr. Genet.* 5, 333-358)。

MKPの様な典型的なDSPの他に、MKPキナーゼ標的化モチーフ(MKP kinase-targeting motif)を欠くグループが存在する。ワクシニアウイルス(*Vaccinia virus*)由来のVH1がDSPである(Guan, K. L., et al. (1991) *Nature* 350, 359-362)と報告されて以来、DUSP3(VHR)(Ishibashi, T., et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 12170-12174)、DUSP22(VHX)(Alonso, A., et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 5524-5528)、DUSP15(VHY)(Alonso, A., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 32586-32591)、DUSP14、DUSP19、DUSP20、DUSP21、DUSP23(VHZ)(Alonso, A., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 35768-74)など見つかった。

10

DUSP15(VHY)は、正常組織において精巣特異的な発現がみられ、詳細な解析では、減数分裂の第一分裂中期であるパキテン期(太糸期)精母細胞に発現が見られる。また、膜への局在に必要なミリスチン酸が結合部位(グリシン残基)がN末端にあり、細胞膜やゴルジ体に局在する。DUSP15のがんと直接的な関連については、報告されていない。

20

本発明者らは、DUSP15遺伝子の発現をRNAi(RNA干渉)によって抑制することによってがん細胞の増殖を抑制できることも確認した。したがって、DUSP15遺伝子の発現を抑制することによって、がんを治療することが可能となる。また、DUSP15遺伝子の発現量を測定することによってがんの診断を行うことも可能となる。

以下、本発明のがん治療剤、スクリーニング方法、診断剤などについて詳細に説明する。

1. がん抑制作用を有する薬剤

まず、本発明は、(1)DUSP15遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤、及び(2)DUSP15タンパク質の活性阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤を提供する。

30

本明細書中、「DUSP15遺伝子」という場合、NCBIヌクレオチドデータベースにおいて、Accession No.: NM_080611で登録されている1383塩基からなるヒトDUSP15遺伝子(配列番号1)を意味するが(Alonso, A., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 32586-32591)、これに限定されず、例えば、当該遺伝子の塩基配列において1つ以上の塩基の置換、欠失、付加、または挿入などを有することによって変化している変異体のような、当該遺伝子の塩基配列またはその相補配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドからなる遺伝子も本明細書中使用する「DUSP15遺伝子」に含まれるものとする。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(*Molecular Cloning Third Edition*, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。ここで、「ストリンジентな条件」は、低ストリンジентな条件、中ストリンジентな条件及び高ストリンジентな条件のいずれでもよい。「低ストリンジентな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、32の条件である。また、「中ストリンジентな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、42の条件である。「高ストリンジентな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%

40

50

S D S、50%ホルムアミド、50 の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、FASTA、BLASTなどの相同性検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメーターを用いて計算したときに、配列番号1の塩基配列と、例えば、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するポリヌクレオチドをあげることができる。

10

本明細書中、「遺伝子の発現阻害」とは、遺伝子からタンパク質生成までの一連の事象（例えば、転写（mRNAの生成）、翻訳（タンパク質の生成）を含む）のうちのいずれかの事象を阻害することによってその遺伝子によってコードされるタンパク質の生成を阻害することを意味するものとする。

本明細書中、「DUSP15タンパク質」という場合、NCBIタンパク質データベースにおいて、Accession No. : NP_0542178で登録されている235アミノ酸残基からなるヒトDUSP15タンパク質（配列番号2）およびこのタンパク質と実質的に同質の活性（例えば、プロテインチロシンホスファターゼ活性およびセリン/スレオニン特異的ホスファターゼ活性から選択される一種以上の活性）を保持し、このタンパク質のアミノ酸配列に対して1~複数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入、及び/または付加が生じたアミノ酸配列からなる変異タンパク質をいう。

20

上記変異タンパク質における、アミノ酸の変異部位および個数は、変異タンパク質が元のタンパク質と実質的に同質の活性を保持している限り特に制限はないが、変異個数は、例えば、1~50個、1~40個、1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個（1~数個）、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個、1個である。変異個数は一般的に少ない程好ましい。また、このような変異タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列と約70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ元のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質を含む。上記相同性の数値は一般的に大きい程好ましい。

30

上記DUSP15タンパク質には、DUSP15タンパク質の「部分ペプチド」も含まれる。DUSP15タンパク質の部分ペプチドとしては、DUSP15タンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）の一部の連続するアミノ酸の配列からなる部分ペプチドであって、好ましくは、前述のDUSP15タンパク質の活性と同様の活性を有するものであればいずれのものでも良い。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、少なくとも20個、好ましくは少なくとも50個、さらに好ましくは少なくとも70個、より好ましくは少なくとも100個、最も好ましくは少なくとも200個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。好ましくは、これらのポリペプチドは、DUSP15タンパク質の活性に関与する部分に対応するアミノ酸配列を含有する。また、本発明で使用される部分ペプチドは、上記のポリペプチドにおいて、そのアミノ酸配列中の1または複数個（例えば、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらにより好ましくは1~5個程度）のアミノ酸残基が欠失、付加、置換、または挿入により変更されているものでもよい。

40

本発明で用いるDUSP15タンパク質は、そのタンパク質を発現している細胞や組織から調製することができる。また、これらのタンパク質は、公知のペプチド合成機によっても合成できるし、原核生物あるいは真核生物から選択される適当な宿主細胞を用いた組換え方法によっても調製することができる。本発明で用いるDUSP15タンパク質は、いずれの種由来のものでもよいが、好ましくはヒト由来である。

50

「実質的に同質の活性」とは、それらの活性が性質的に同等であることを示す。したがって、酵素活性（プロテインチロシンホスファターゼ活性およびセリン/スレオニン特異的ホスファターゼ活性など）が同等（例えば、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。酵素活性の測定は、

10

- ニトロフェニルホスフェートデホスホリレーション（*Nitrophenyl Phosphate Dephosphorylation*）法（Alonso, A., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 32586-32591）などの文献に記載の公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

なお、アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST（*proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, 1990; *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873, 1993）を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている（Altschul SF, et al.: *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990）。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

20

本明細書中、「がん治療剤」という用語は、抗癌剤、癌転移阻害剤、癌細胞のアポトーシス誘導剤、癌細胞の増殖抑制剤、癌細胞の浸潤抑制剤、がん予防剤等を含む意味で使用される。なお、本願明細書中、用語「癌（または、がん）」と「腫瘍」とは同じ意味を有する用語として使用される。

1.1 DUSP15遺伝子の発現阻害物質を含有するがん治療剤

本発明は、1つの実施形態において、DUSP15遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有するがん治療剤を提供する。

本明細書中、「DUSP15遺伝子の発現阻害物質」には、DUSP15遺伝子の発現を阻害するものであれば制限はないが、例えば、

30

(i) DUSP15遺伝子からDUSP15 mRNAへの転写を阻害する物質、および
(ii) DUSP15 mRNAからDUSP15タンパク質への翻訳を阻害する物質が含まれる。

DUSP15遺伝子からDUSP15 mRNAへの転写を阻害する物質の例としては、

(a) DUSP15遺伝子またはその一部に対するアンチセンス核酸、
(b) DUSP15遺伝子またはその一部に対するデコイ核酸、
(c) DUSP15遺伝子またはその一部に対してドミナントネガティブに作用するDUSP15遺伝子変異体、あるいは
(d) その他の転写阻害化合物

40

などが含まれる。

また、DUSP15 mRNAからDUSP15タンパク質への翻訳を阻害する物質の例としては、

(e) DUSP15 mRNAまたはその一部に対してRNAi作用を有するポリヌクレオチド（例えば、siRNA）、
(f) DUSP15 mRNAまたはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド、
(g) DUSP15 mRNAまたはその一部に対してリボザイム活性を有するポリヌクレオチド、あるいは
(h) その他の翻訳阻害化合物

50

などが含まれる。

本明細書中、「核酸」とはRNAまたはDNAを意味する。ここでいう「核酸」は、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてもよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであって良い。修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたヌクレオチドはまた、糖部分が修飾されていて良く、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されているか、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のがん治療剤においては、DUSP15遺伝子の発現をRNAi効果により阻害する作用を有する核酸を有効成分として用いることができる。RNAiとは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内に導入すると、導入した外来遺伝子および標的内在性遺伝子の発現がいずれも阻害される現象のことをいう。ここで用いられるRNAとしては、例えば、19~30塩基長のRNA干渉を生ずる二重鎖RNA、例えば、dsRNA(double strand RNA)、siRNA(small interfering RNA)又はshRNA(short hairpin RNA)が挙げられる。このようなRNAは、リポソームなどの送達システムにより所望の部位に局所送達させることも可能であり、また上記二重鎖RNAが生成されるようなベクターを用いてこれを局所発現させることができる。このような二重鎖RNA(dsRNA、siRNAまたはshRNA)の調製方法、使用方法などは、多くの文献から公知である(特表2002-516062号;米国公開許第2002/086356A号; Nature Genetics, 24(2), Feb., 180-183; Genesis, 26(4), April, 240-244; Nature, Sep. 21, 407:6802, 319-20; Genesis & Dev., Vol. 16, (8) Apr. 16, 948-958; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99(8), 16 Apr., 5515-5520; Science, 296(5567), 19 Apr., 550-553; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Apr. 30, 99:9, 6047-6052; Nature Biotechnology, Vol. 20(5), May, 497-500; Nature Biotechnology, Vol. 20(5), May, 500-508; Nucleic Acids Res., May 15など)。

本発明で用いられるRNAi効果を奏する二重鎖RNAの長さは、通常、19~30塩基、好ましくは20~27塩基、より好ましくは21~25塩基、最も好ましくは21~23塩基である。本発明においては、具体的には、下記siRNA(実施例3で使用)を用いることができる。

10

20

30

【表 1】

(表 1)

s i R N A 配列 :

| siRNA | Sense | Anti-sense |
|-------|---|---|
| a | 5'-CUCUACCUCGGAAACUUCATT-3' (配列番号 5) | 5'-UGAAGUUUCCGAGGUAGAGTC-3' (配列番号 6) |
| b | 5'-CACACAUCAUCUCUAUCCATT-3' (配列番号 7) | 5'-UGGAUAGAGAUGAUGUGUGTG-3' (配列番号 8) |
| c | 5'-CUUCAAGAAUGUAUCAACTT-3' (配列番号 9) | 5'-GUUGAUACAUCUUGAAGTG-3' (配列番号 10) |

本明細書中、「アンチセンス核酸」、または「アンチセンスポリヌクレオチド」とは、ある対象となるDNA領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドを有し、そのポリヌクレオチドが当該領域の少なくとも一部とハイブリダイズすることができる核酸のことをいう。本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。それらは二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであってもよい。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導體やチオホスフェート誘導體、さらにはポリヌクレオチドアミドやオリゴヌクレオチドアミドの分解に抵抗性を有するものなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

20

使用されるアンチセンス核酸は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された核酸は、公知の方法を用いることで、所望の動物へ形質転換できる。アンチセンス核酸の配列は、形質転換される動物が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。例えば、DUSP15遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的である。コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用することができる。遺伝子の翻訳阻害に効果的なアンチセンス核酸は、標的遺伝子の転写産物に対して約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相補性を有する。

30

アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンス核酸の長さは少なくとも約10塩基以上(例えば、10~40個程度)、好ましくは約15塩基以上であり、より好ましくは約100塩基以上であり、さらに好ましくは約500塩基以上である。アンチセンス核酸は公知の文献を参照して設計することができる(例えば、平島および井上、新化学実験講座2 核酸IV遺伝子の複製と発現、日本生化学会編、東京化学同人、1993、p.319-347)、J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, p.247, 1992; Vol. 8, p.395, 1992; S. T. Crooke et al., ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993など参照)。

40

また、本発明のがん治療剤においては、DUSP15遺伝子の転写産物を特異的に切断するリボザイム活性を有する核酸を有効成分として用いることができる。ここでいう「リ

50

ボザイム活性」とは、ターゲットとする遺伝子の転写産物である mRNA を部位特異的に切断する核酸のことをいう。リボザイムには、グループ I イントロン型や RNase P に含まれる M1 RNA のように 400 ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる 40 ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある (タンパク質核酸酵素、1990、35、p. 2191)。ハンマーヘッド型リボザイムについては、例えば、FEB S Lett, 1988, 228, p. 228; FEB S Lett, 1988, 239, p. 285; タンパク質核酸酵素, 1990, 35, p. 2191; Nucl Acids Res, 1989, 17, p. 7059 などを参照することができる。また、ヘアピン型リボザイムについては、例えば、Nature, 1986, 323, p. 349; Nucl Acids Res, 1991, 19, p. 6751; 菊池洋, 化学と生物, 1992, 30, p. 112 などを参照することができる。このようなりボザイムを用いて本発明における DUSP15 遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

10

さらに、本発明は、DUSP15 遺伝子の転写活性を阻害する核酸以外の化合物を有効成分として用いることができる。そのような化合物は、例えば、DUSP15 遺伝子の発現・転写に關与する因子に結合する化合物である。このような化合物は、天然物でも合成化合物でもよい。このような化合物は、後述のスクリーニング方法によって、取得することが可能である。

1.2 DUSP15 タンパク質の活性阻害物質を含有するがん治療剤

本発明はまた、別の実施形態において、DUSP15 タンパク質の活性阻害物質を含有するがん治療剤を提供する。

20

本明細書中、「DUSP15 タンパク質の活性阻害物質」には、例えば、

(a) DUSP15 タンパク質に結合する抗体、

(b) DUSP15 タンパク質に対してドミナントネガティブの性質を有する DUSP15 タンパク質変異体、あるいは

(c) DUSP15 タンパク質に結合する化合物 (上記抗体および変異体を除く)

などが含まれる。

本明細書における「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、本発明の DUSP15 タンパク質に結合する限り、上記ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のほかに、ヒト抗体、遺伝子組み換えによるヒト型化抗体、さらにその抗体断片や抗体修飾物も含まれる。DUSP15 タンパク質に結合する抗体 (抗 DUSP15 抗体) は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。なお、抗 DUSP15 抗体の詳細については後述する。

30

本明細書における「DUSP15 タンパク質に対してドミナントネガティブの性質を有する DUSP15 タンパク質変異体」とは、それをコードする遺伝子を発現させることによって、内在性の野生型 DUSP15 タンパク質の活性を消失もしくは低下させる機能を有するタンパク質を指す (土田邦博著、遺伝子の活性阻害実験法 多比良和誠編、羊土社 (2001) 26-32 など参照)。

さらに、本発明においては、DUSP15 タンパク質の活性を阻害し得る物質として、DUSP15 タンパク質に結合する、上記抗体または変異体以外の化合物を有効成分として用いることができる。そのような化合物は、例えば、DUSP15 タンパク質に結合し、その活性を阻害する化合物である。このような化合物は、天然物でも合成化合物でもよい。このような化合物は、後述のスクリーニング方法によって、取得することが可能である。

40

上記した本発明の DUSP15 タンパク質の活性を阻害し得る物質は、がん治療剤として使用することができる。

2. DUSP15 タンパク質の活性もしくは発現を阻害する物質のスクリーニング方法

本発明は、がん抑制作用を有する候補化合物のスクリーニング方法をも提供する。

一つの好ましい態様は、DUSP15 タンパク質と被検化合物との結合を指標とする方法である。通常、DUSP15 タンパク質と結合する化合物は、DUSP15 タンパク質

50

の活性を阻害する効果を有することが期待される。ここで、該化合物は、DUSP15タンパク質の活性部位に結合することが好ましい。本方法においては、まず、DUSP15タンパク質と被検化合物とを接触させる。DUSP15タンパク質は、被検化合物との結合を検出するための指標に応じて、例えば、DUSP15タンパク質の精製された形態、細胞内または細胞外に発現した形態、あるいはアフィニティークラムに結合した形態であり得る。この方法に用いる被検化合物は必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識等を挙げることができる。

本方法においては、次いで、DUSP15タンパク質と被検化合物との結合を検出する。

本方法に用いる被検化合物としては、特に制限はない。例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物等が挙げられるが、これらに限定されない。

DUSP15タンパク質と被検化合物との結合は、例えば、DUSP15タンパク質に結合した被検化合物に付された標識によって検出することができる。また、細胞内または細胞外に発現しているDUSP15タンパク質への被検化合物の結合により生じるDUSP15タンパク質の活性の変化を指標として検出することもできる。タンパク質と被検化合物との結合活性は、公知の手法によって測定することができる(例えば、*p*-ニトロフェニルホスフェートデホスホリレーション法(Alonso, A., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 32586-32591))。

本方法においては、次いで、DUSP15タンパク質と結合し、その活性を阻害する被検化合物を選択する。

本方法により単離される化合物は、がん抑制作用を有することが期待され、がん治療剤として有用である。

本発明のスクリーニング方法の他の態様は、DUSP15遺伝子の発現を指標とする方法である。

本方法においては、まず、DUSP15遺伝子を発現する細胞に、被検化合物を接触させる。用いられる「細胞」の由来としては、ヒト、マウス、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、トリなど、ペット、家畜等に由来する細胞が挙げられるが、これら由来に制限されない。「DUSP15遺伝子を発現する細胞」としては、内因性のDUSP15遺伝子を発現している細胞、または外因性のDUSP15遺伝子が導入され、該遺伝子が発現している細胞を利用することができる。外因性のDUSP15遺伝子が発現した細胞は、通常、それぞれDUSP15遺伝子が挿入された発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより作製することができる。該発現ベクターは、一般的な遺伝子工学技術によって作製することができる。

本方法に用いる被検化合物としては、特に制限はないが、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物等が用いられる。

DUSP15遺伝子を発現する細胞への被検化合物の「接触」は、通常、それぞれDUSP15遺伝子を発現する細胞の培養液に被検化合物を添加することによって行うが、この方法に限定されない。被検化合物がタンパク質等の場合には、該タンパク質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより、「接触」を行うことができる。

本方法においては、次いで、該DUSP15遺伝子の発現レベルを測定する。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。遺伝子の発現レベルの測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、DUSP15遺伝子を発現する細胞からmRNAを常法に従って抽出し、このmRNAを鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法またはRT-PCR法を実施することによって該遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。あるいは、DUSP15遺伝子のプロモーター領域を常法に従って単離し、その下流に標識遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ、GFP、ガラクトシダーゼ

10

20

30

40

50

等の発光、蛍光、発色などを指標に検出可能な遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない)をつなげ、その標識遺伝子の活性を見ることによっても該遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。また、DUSP15遺伝子を発現する細胞からタンパク質画分を回収し、それぞれDUSP15タンパク質の発現をSDS-PAGE等の電気泳動法で検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うこともできる。さらに、DUSP15タンパク質に対する抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法を実施することにより該タンパク質の発現を検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うことも可能である。DUSP15タンパク質の検出に用いる抗体としては、検出可能な抗体であれば、特に制限はないが、例えばモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体の両方を利用することができる。

10

本方法においては、次いで、被検化合物を接触させない場合(コントロール)と比較して、該発現レベルを低下させる化合物を選択する。このようにして選択された化合物は、がん治療剤のための候補化合物となる。

3. 抗DUSP15抗体及びこの抗体を含有する治療剤、複合体および組成物

本発明はまた、抗DUSP15抗体、この抗体を含有するがん治療剤などを提供する。本発明の1つの好ましい態様では、上記がん治療剤は、がんの標的化療法または標的化薬物送達のために使用される。

3.1 抗DUSP15抗体

本明細書中、「抗DUSP15抗体」には、DUSP15タンパク質(その断片(部分ペプチド)もしくはその塩を含む)に特異的に結合する抗体が含まれる。本発明において使用する抗DUSP15抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMであり、精製の容易性等を考慮すると、より好ましくはIgGである。また、ここでいう「抗体」という用語は、任意の抗体断片または誘導体を含む意味で用いられ、例えば、Fab、Fab₂、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体(ScFv)などを含む。本発明の抗体は、公知の方法で製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である(例えばHarlowe, & Lane D., *Antibody*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)を参照)。

20

30

(1) 抗原の調製

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、通常、DUSP15タンパク質またはその塩である。上記DUSP15タンパク質には、その部分ペプチドも含まれ、これは、限定されることはないが、例えば、配列番号2のアミノ酸配列の断片であって、例えば、20個以上、40個以上、60個以上、80個以上、100個以上の、連続するアミノ酸配列部分を有する部分ペプチドである。これらの断片として、例えば、アミノ(N)末端断片やカルボキシ(C)末端断片が用いられる。本発明で用いられる部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~6個))のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入及び/又は付加されたものであってもよい。ここで用いられるDUSP15タンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸)との塩などが用いられる。抗体取得の感作抗原として使用される本発明のDUSP15タンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばマウス、ヒト由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。

40

(2) DUSP15タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製

(i) 抗体産生細胞の採取

上記のようなDUSP15タンパク質、その部分ペプチド又はその塩(本明細書中、抗体に関する説明では、これらをまとめて、「DUSP15タンパク質」という。)を抗原として、哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当た

50

りの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1～100mgであり、アジュバントを用いるときは1～100μgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（FCA）、フロイント不完全アジュバント（FIA）、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下又は腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは2～5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1～60日後、好ましくは1～14日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

(ii) 細胞融合

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば X63Ag.8.653、NSI/1-Ag4-1、NSO/1などのマウスミエローマ細胞株、YB 2/0などのラットミエローマ細胞株が挙げられる。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し（抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比2:1～3:1が好ましい）、細胞融合促進剤存在のもとで融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1000～6000ダルトンのポリエチレングリコール等を使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(iii) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えばウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に 3×10^5 個/well程度まき、各ウエルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、DUSP15タンパク質に反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウエルに含まれる培養上清の一部を採集し、酵素免疫測定法、放射性免疫測定法等によってスクリーニングすることができる。融合細胞のクローニングは、限界希釈法等により行う。そして、最終的に、DUSP15タンパク質と反応するモノクローナル抗体を産生する細胞であるハイブリドーマを樹立する。

(iv) モノクローナル抗体の採取

上記のようにして得たハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等を採用することができる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で7～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 1×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～2週間後に腹水を採取する。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

10

20

30

40

50

(3) D U S P 1 5 タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製

まず、上記した抗原を哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバントを用いないときは0.1~100mgであり、アジュバントを用いるときは10~1000 μ gである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下又は腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6~60日後に、酵素免疫測定法(ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay))又はEIA(enzyme immunoassay)、放射性免疫測定法(RIA; radioimmunoassay)等で抗体価を測定し、最大の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。

次いで、例えば、抗血清中のポリクローナル抗体を、D U S P 1 5 タンパク質で固定されたアフィニティーカラムにかけてD U S P 1 5 タンパク質と反応する抗体(カラム吸着画分)を採取する。D U S P 1 5 タンパク質に対する抗血清中のポリクローナル抗体の反応性は、ELISA法などで測定することができる。

(4) 抗体の断片など

FabまたはFab'₂断片は、従来の方法によるプロテアーゼ(例えば、ペプシンまたはパイン)を用いた消化により作製することができる。ヒト化抗体は、例えばRiechmannら(Riechmann J Mol Biol. Oct 5; 203(3): 825-8, 1988)、およびJonesら(Jones Nature 321: 522-525, 1986)に記載のような方法の1つにより調製することができる。

また、キメラ抗体は、例えば、「実験医学(臨時増刊号)、Vol. 1.6, No. 10, 1988」、特公平3-73280号公報等を、ヒト化抗体は、例えば、「Nature Genetics, Vol. 15, p. 146-156, 1997」、「Nature Genetics, Vol. 7, p. 13-21, 1994」、特表平4-504365号公報、国際出願公開WO94.25585号公報等、「日経サイエンス、6月号、第40~第50頁、1995年」、「Nature, Vol. 368, p. 856-859, 1994」、特表平6-500233号公報等を参考にそれぞれ製造することができる。本発明のD U S P 1 5 タンパク質に結合する抗体は、例えば、癌細胞の増殖もしくは転移の抑制等を目的とした使用が考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的(抗体治療)で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

抗体は、診断剤として用いる場合は、モニタリング等のための標識物質(例えば、放射性同位元素、蛍光物質など)で標識されていてもよい。必要に応じて、放射性物質、蛍光化合物などにより標識することができる。最も慣用の蛍光標識化合物の中には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリンおよびフルオレスカミンがある。同様に、生体発光性化合物を用いて、抗体D U S P 1 5 抗体を標識することもできる。生体発光性タンパク質の存在は、蛍光の存在を検出することによって測定される。この標識目的に重要な生体発光性化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびイェクオリンである。

なお、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在するD U S P 1 5 タンパク質等を特異的に検出するために使用することができる。また、D U S P 1 5 タンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中のD U S P 1 5 タンパク質等の検出、被検細胞内におけるD U S P 1 5 タンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

3.2 抗D U S P 1 5 抗体を含有する複合体など

また、本発明において使用する抗D U S P 1 5 抗体は、本発明の治療剤または診断剤において、それ自体が、抗原の活性を減弱させるような中和活性を有する薬剤(agent

）であり得るが、必要に応じて、治療効果を奏するための他の薬剤と組み合わせて用いることができる。したがって、本発明は、もう一つの態様において、がん（例えば、大腸がん）の標的化療法または標的化イメージング等に使用するための、抗DUSP15抗体と他の薬剤との複合体、そのような複合体を含有する組成物などをも提供する。このような態様によれば、本発明において使用する抗DUSP15抗体を用いて、治療効果を奏する他の薬剤または診断のための標識剤などを、DUSP15タンパク質を高発現する標的部位へ送達することができる。

本発明において用いられる「その他の薬剤」としては、例えば、放射性同位元素、治療タンパク質、または低分子の薬剤など、標的への遺伝子導入のためのウイルスベクターもしくは非ウイルスベクターなどが例示される。

本発明において、「放射性同位元素」の例としては、フッ素 - 18、ヨウ素 - 125 (^{125}I)、およびヨウ素 - 131などの放射性ハロゲン元素が挙げられる。これらの放射性ハロゲン元素も上述の放射性金属元素と同様に抗体やペプチドに標識して、放射性治療剤あるいは放射性診断剤として広く利用し得る。例えば、 ^{125}I または ^{131}I でのヨード化は、クロラミンT法等の公知の方法により、抗体または抗体断片に結合させることができる。さらに、診断用としてはテクネチウム - 99m、インジウム - 111およびガリウム - 67 (^{67}Ga)など、また治療用としてはイットリウム - 90 (^{90}Y)、レニウム - 186 (^{186}Re)またはレニウム - 188 (^{188}Re)などが使用され得る。放射性同位元素を用いて抗体に標識する場合には、通常、金属キレート剤が用いられる。金属キレート剤としては、EDTA、DTPA、ジアミノジチオ化合物、サイクラム、およびDOTAなどが知られている。これらのキレート剤は抗体に予め結合しておき、その後放射性金属で標識する場合と、放射性金属キレートを形成後、抗体に結合して標識する方法がある。

本発明において、「治療タンパク質」の例としては、免疫を担う細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球 - マクロファージ - コロニー刺激因子、ヒトマクロファージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン12等が挙げられる。また、大腸がん細胞を直接殺傷するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、治療タンパク質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに治療タンパク質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、このDNAを原核生物または真核生物用の発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

「低分子の薬剤」は、本明細書中で「放射性同位元素」や「治療タンパク質」等以外の診断または治療用化合物を意味するものとして用いられる。「低分子の薬剤」の例としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロファスファミドなどのアルキル化剤、5 - フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルピシン、ドキシソルピシンなどの抗生物質、ピンクリスチン、ピンラスチン、ピンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤（臨床腫瘍学（日本臨床腫瘍研究会編 1996年 癌と化学療法社））、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ベニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法 昭和57年 医歯薬出版株式会社）などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

「ウイルスベクター」の例としては、本発明の抗DUSP15抗体に結合し得るように改変されたウイルスベクターが使用し得る（例えば、アデノウイルスベクター（Wang, P., et al. (1995) Somatic Cell and Molec. G

10

20

30

40

50

enet. 21, 429-441)、レトロウイルスベクター (Naviaux R. K., et al. (1996) J. Virol 70, 5701-5705)、レンチウイルスベクター (Naldini, L. (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9, 457-463) などが挙げられる)。このようなウイルスベクターには、細胞増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、免疫制御遺伝子等の、標的部 (例えば、大腸がん) において、例えば、癌細胞のアポトーシスを誘導するなどの治療効果を奏する遺伝子 (治療遺伝子) が組み込まれる。抗 D U S P 1 5 抗体に結合するウイルスベクターは、抗 D U S P 1 5 抗体と共に遺伝子治療を必要とする患者に投与された場合、抗 D U S P 1 5 抗体が認識する抗原 (すなわち、D U S P 1 5) が存在する部位に標的化することができる。

10

抗 D U S P 1 5 抗体と上記他の薬剤とは、化学的または遺伝子工学的に結合され得る。ここで、「化学的な結合」には、イオン結合、水素結合、共有結合、分子間力による結合、疎水性相互作用による結合などが含まれるものとし、「遺伝子工学的な結合」には、例えば、抗体と治療タンパク質とからなる融合タンパク質を遺伝子組換えなどの技術を用いて作製した場合の、抗体と治療タンパク質との間の結合様式などが含まれるものとする。

4. 製剤化および製剤の投与方法

本発明の D U S P 1 5 遺伝子の発現阻害物質を含有するがん治療剤、D U S P 1 5 タンパク質の活性阻害物質を含有するがん治療剤、本発明の抗 D U S P 1 5 抗体を含有する治療剤、または本発明において使用する抗 D U S P 1 5 抗体が、放射性同位元素、治療タンパク質、低分子の薬剤、および治療遺伝子を担持したウイルスベクターもしくは非ウイルスベクターのうちのいずれか、またはこれらの任意の組み合わせと化学的または遺伝子工学的に結合されている治療剤は、公知の手法に基づいて製剤化することができる。

20

本発明の治療剤の製剤化にあたっては、常法に従い、必要に応じて薬学的に許容される担体を添加することができる。例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着色料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。

30

本発明の治療剤の剤型の種類としては、例えば、経口剤として錠剤、粉末剤、丸剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、軟・硬カプセル剤、フィルムコーティング剤、ベレット剤、舌下剤、ペースト剤等、非経口剤として注射剤、坐剤、経皮剤、軟膏剤、硬膏剤、外用液剤等が挙げられ、当業者においては投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。有効成分としての D U S P 1 5 タンパク質の活性 (または D U S P 1 5 遺伝子の発現) 阻害物質は、製剤中 0.1 から 99.9 重量%含有することができる。

本発明の薬剤の有効成分の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、患者 (60 kg として) に対して一日につき約 0.1 mg ~ 1,000 mg、好ましくは約 1.0 ~ 100 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 50 mg である。非経口的に投与する場合は、その一回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、患者 (60 kg に対して)、一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。しかしながら、最終的には、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状等を考慮して、医師または獣医師の判断により適宜決定することができる。

40

このようにして得られる製剤は、例えば、ヒトやその他の哺乳動物 (例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

50

ヒト以外の動物の場合も、上記の60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明の治療剤は、がん（例えば、大腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、肝臓がん、胆道がん、脾臓がん、腎がん、膀胱がん、子宮がん（例：子宮頸がん、子宮体がん）、精巣がん、甲状腺がん、膵臓がん、卵巣がん、脳腫瘍、血液腫瘍など）の子防・治療、好ましくは、大腸がんの予防・治療に用いられる。

本発明の薬剤は、DUSP15タンパク質の活性阻害物質またはDUSP15遺伝子の発現阻害物質を有効成分として含有しているため、抗癌剤、癌転移阻害剤、癌細胞のアポトーシス誘導剤等として使用し得る。対象となる細胞、組織、臓器、または癌の種類は特定のものに限定されない。また、本発明の薬剤は、DUSP15タンパク質の活性阻害物質およびDUSP15遺伝子の発現阻害物質の両方を含んでいても良い。

10

本発明の治療剤において、アンチセンス核酸を用いる場合、該アンチセンス核酸を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、公知の手段に従って投与することができる。アンチセンス核酸は、単独で、あるいは生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。

また、本発明において組換えアデノウイルス粒子のようなウイルスベクターと抗DUSP15抗体との組み合わせを癌治療のために使用する場合は、これら単独で使用してもよいが、一般には製薬的に許容できる担体と共に使用される。そのような担体としては、既に上記したような担体、ならびに水、生理食塩水、グルコース、ヒトアルブミン等の水性等張溶液が好ましい。更に、製薬的に通常使用される添加剤、保存剤、防腐剤、衡量等を添加することもできる。そのように調製した医薬組成物は、治療すべき疾病に依存して適切な投与形態、投与経路によって投与することができる。投与形態としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル、錠剤、顆粒剤、注射剤、軟膏等が挙げられる。本発明の抗DUSP15抗体-ウイルスベクター粒子またはこれを含む医薬組成物を治療のために投与する場合は、通常成人一人当たり1回に $10^3 \sim 10^{15}$ 個のウイルス粒子を投与するのが好ましいが、疾病の状態や標的細胞・組織の性質によって変更してよい。投与回数は、1日1回～数回でよく、投与期間は1日～数ヶ月以上にわたってもよく、1～数回の投入を1セットとして、長期にわたって断続的に多数セットを投与してもよい。また、本発明において使用されるウイルスベクター粒子またはウイルスベクター核酸分子は、特定の細胞および/または組織の検出、または疾病状態の診断に使用することができる。例えば、ウイルスベクターの核酸分子に検出可能なマーカー遺伝子を組込み、これを適切な宿主細胞にトランスフェクションして得られたウイルスベクター粒子は、抗DUSP15抗体と組み合わせて腫瘍細胞を検出診断するために使用することができる。あるいは、抗DUSP15抗体に検出可能な標識を結合させて腫瘍細胞を検出診断するために使用することができる。

20

30

5. がんの診断剤及び診断方法

本発明はまた、がんの診断剤を提供する。1つの好ましい態様において、本発明のがんの診断剤は、(a) DUSP15タンパク質に対する抗体、又は(b) DUSP15遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する。

40

5.1 抗DUSP15抗体を用いる診断剤及び診断方法

DUSP15タンパク質に対する抗体は、DUSP15タンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中のDUSP15タンパク質を定量することができる。具体的には、本発明の抗DUSP15抗体を用いる診断方法は、例えば、(a) 被験者由来の生体試料と、DUSP15タンパク質に対する抗体とを接触させる工程、および(b) 前記試料中での前記抗体と、DUSP15タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合を検出および/または定量する工程を包含する。好ましくは、上記検出および/または定量する工程において、標識された抗DUSP15抗体を用いて、DUSP15タンパク質またはその断片と抗DUSP15抗体との結合を検出および/または定量され

50

る。

本明細書中、「被験者由来の生体試料」は、被験者由来の組織、細胞、または体液（例えば、血液（全血、血漿、血清等を含む）、尿、リンパ液、唾液、汗、精液等）を含む。また、「被験者」は、通常、がん検診を受ける、または受けることが望まれるヒト被験体であり、がん罹患しているか、または罹患していると疑われるヒト被験体等が含まれる。このようながんの例としては、大腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、肝臓がん、胆道がん、脾臓がん、腎がん、膀胱がん、子宮がん（例：子宮頸がん、子宮体がん）、精巣がん、甲状腺がん、膵臓がん、卵巣がん、脳腫瘍、血液腫瘍などが含まれるが、とりわけ、大腸がんが好ましい。

上記のような被験者由来の生体試料におけるDUSP15の発現を検出するための免疫測定は、がん（例えば、大腸がん）を有すると疑われるか、がんの危険性を有する被験体から採取した生体試料を、特異的抗原-抗体結合を生じさせる条件下で抗DUSP15抗体と接触させ、次いで、抗体による免疫特異的結合量を測定することを包含する。このような抗体の結合を使用して、DUSP15タンパク質の存在および/または増大した発現が検出される。この場合、増大したDUSP15タンパク質発現の検出が疾病状態の指標となる。必要に応じて、生体試料中のDUSP15タンパク質のレベルを、がんを有しない健常者のレベルと比較してもよい。

上記免疫測定法の1つの態様では、例えば、血清試料などの生体試料を、試料中に存在する全部のタンパク質を固定する目的で、ニトロセルロースなどの固相支持体または担体と接触させる。次いで、この支持体を緩衝液で洗浄し、続いて検出可能に標識した抗DUSP15抗体により処理する。次いで、この固相支持体を緩衝液で2回洗浄し、未結合抗体を除去する。固相支持体上の結合した抗体の量を、周知の方法に従って測定する。各測定に適する検出条件は、慣用的な試験方法を使用して当業者により適宜決定され得る。

抗DUSP15抗体を検出可能に標識する方法の1つにおいて、当該抗体を、酵素、例えば、酵素イムノアッセイ（EIA）に使用されるもののような酵素に結合させる[Voiler, A.による「酵素標識した免疫吸着アッセイ」("The Enzyme Linked Immunosorbent Assay") (ELISA), 1978, Diagnostic Horizons, 2:1~7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voiler, A.によるJ. Clin. Pathol., 31:507~520, 1978; Butler, J. E.によるMeth. Enzymol., 73:482~523, 1981]。抗体に結合する酵素を、例えば分光光度測定により、可視手段による蛍光測定により検出することができる化学分子が生成されるような方法で、適当な基質、好ましくは色素原性基質と反応させる。抗体に検出可能な標識を付けるために使用することができる酵素は、ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼを包含するが、これらに限定されない。この検出はまた、酵素に対する色素原性基質を用いる比色法により達成することができる。

その他の本発明において使用し得る方法としては、ラジオイムノアッセイ（RIA）、サンドイッチ免疫測定法、イムノメトリック法、ネフロメトリー、蛍光免疫測定法（FIA）、時間分解蛍光免疫測定法（TRFIA）、酵素免疫測定法（EIA）、発光免疫測定法（LIA）、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、ラテックス凝集法、免疫沈降アッセイ、沈降素反応法、ゲル拡散沈降素反応法、免疫拡散検定法、凝集素検定法、補体結合検定法、免疫放射分析検定法、蛍光免疫検定法、およびプロテインA免疫検定法からなる群から選択される免疫測定法などが挙げられる（WO00/14227号公報第39頁第25行~第42頁第8行、EP1111047A2号公報段落[0115]第19頁第35行~第20頁第47行など参照）。

以上のように、本発明の抗体を用いる、生体内でのDUSP15タンパク質の定量法を利用することにより、DUSP15タンパク質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。例えば、DUSP15タンパク質の濃度増加が検出された場合は、例えば、DUSP15タンパク質の過剰発現に起因する疾患（例えば、がん（例：大腸がん）

10

20

30

40

50

)である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

なお、本発明の抗DUSP15抗体は、*in vivo*での診断に用いることもできる。ここで使用し得る抗体調製物の調製および使用方法は当該分野でよく知られている。例えば、抗体-キレート剤について、*Nucl. Med. Biol.* 1990 17:247-254に記載されている。また、磁気共鳴イメージングで用いる標識としての常磁性イオンを有する抗体については、例えば、*Magnetic Resonance in Medicine* 1991 22:339-342に記載されている。

5.2 ポリヌクレオチド(例えば、DNA)プローブを用いる診断剤及び診断方法

本発明の診断方法においては、DUSP15遺伝子の塩基配列に基づいて設計されるプローブ又はプライマーを用いることができる。具体的には、そのような診断方法は、例えば、(a)被験者由来の生体試料と、DUSP15遺伝子またはその断片の塩基配列にストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチド(プローブ)とを接触させる工程、および(b)前記試料中での前記ポリヌクレオチドと、DUSP15遺伝子またはその断片とのハイブリダイゼーションを検出および/または定量する工程を包含する。

上記本発明の方法では、被験者由来の生体試料中のDUSP15遺伝子のDNA(またはその遺伝子断片)を、上記プローブを使用して検出および/または定量する。プローブとして用いる塩基配列の長さは、例えば、12塩基以上、15塩基以上、18塩基以上、21塩基以上、24塩基以上、27塩基以上、30塩基以上、またはさらに長い長さのポリヌクレオチド断片であり得る。ハイブリダイゼーションには、上記した低、中又は高ストリンジントな条件を使用し得る。なお、本明細書中、「DUSP15遺伝子またはその断片の塩基配列にストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列」には、DUSP15遺伝子またはその断片の塩基配列に相補的な塩基配列(アンチセンスポリヌクレオチド)も含まれるものとする。プローブおよび核酸のハイブリダイゼーションの方法は当業者に知られており、例えば国際公開公報第89/06698号、EP-A0200362、米国特許第2,915,082号、EP-A0063879、EP-A0173251、EP-A0128018に記載されている。

本発明の診断方法においては、DUSP15遺伝子に対する特異的ポリヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いて、公知の手法を用いて標的配列を検出または定量することができる。そのような公知の手法として、例えば、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR法、PCR-SSCP法(*Genomics*, 第5巻, 874~879頁(1989年))、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 第86巻, 2766~2770頁(1989年))、FISH法、DNAチップあるいはアレイCGH(*Comparative Genomic Hybridization*)法などを用いることができる。定量的な検出は、定量RT-PCRによって実施可能である。

アレイCGH法は、染色体CGH法(Kallioniemi, A. et al. (1992) *Science* 258, 818-821)を応用した方法で、スライド上に染色体領域をカバーするゲノムDNA断片(BAC, PAC, YACなど)を高密度にスポットしたDNAチップを用いて、別々の色素で標識したがん由来DNAと正常DNAを、スライド上のゲノムDNA断片に対して同時にハイブリダイゼーションを行い、その結合状態を検出することにより、がんにおけるDNAコピー数異常を高解像度に検出する方法である(Pinkel, D. et al. (1998) *Nat. Genet.* 20, 207-211)。

なお、本発明においては、DUSP15遺伝子の発現が上方制御されるか否かを検出するために、細胞のDUSP15のmRNAレベルを標準遺伝子(ハウスキーピング遺伝子(例えば、Shaper, N. L.ら、*J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3(1998)315-324; Wu, Y. Y.およびRees, J. L., *Acta Derm. Venereol.* 80(2000)2-3)のmRNA

10

20

30

40

50

レベルと、好ましくは R T - P C R によって比較することもできる。

上記のような手法によって標的配列 (D N A 、 m R N A など) を検出・定量し、 D U S P 1 5 遺伝子の発現過多が確認された場合は、例えば、 D U S P 1 5 の過剰発現に起因する疾患 (例えば、がん (例 : 大腸がん)) である可能性が高い、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

5.3 質量分析装置を用いる診断方法

本発明の診断方法の別の実施形態では、被検試料中の標的タンパク質またはその断片の存在を、質量分析装置 (M S) を用いて同定することができる。すなわち、質量分析装置を用いることによって、標的タンパク質またはその断片のアミノ酸配列の決定を行うことができ、被験者由来の生体試料中に D U S P 1 5 タンパク質が存在するかどうかを判定することができる。質量分析法は、 M S を用いてタンパク質やペプチドのような試料をイオン化し、得られた質量 / 電荷 (m / z) に従って分離し、その強度を測定することにより、試料の質量を決定する方法である。その質量分析の結果から、タンパク質やペプチドのアミノ酸配列を構成する個々のアミノ酸を同定することができる。

10

イオン化には、マトリクスアシステッドレーザーデソープションイオン化法 (M A L D I) 、エレクトロスプレーイオン化法 (E S I) 、気相法 (E I , C I) 、電界脱離 (F D) 法など種々の方法が使用され得る。イオン分離には、イオン化法と相性のよいイオン分離法が用いられ、例えば、 M A L D I の場合には、飛行時間型 (t i m e o f f l i g h t : T O F) 質量分析計、 E S I の場合には、四重極型 (Q M S) 、イオントラップ型、磁場型などの質量分析計がそれぞれ用いられる。質量分析装置は、タンデムで用いられることもある。例えば、 L C - E S I M S / M S 、 Q - T O F M S 、 M A L D I - T O F M S 等が挙げられる。なお、その他のアミノ酸配列決定法、例えば、シーケンサー (例 : 気相シーケンサー) によるアミノ酸配列決定法が利用されてもよい。

20

5.4 診断用キット

本発明はまた、抗 D U S P 1 5 抗体を含有する、被験者の体液試料中の D U S P 1 5 タンパク質またはその断片をがんマーカーとして検出および / または定量するためのキットを提供する。さらに、 D U S P 1 5 遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列を含有する、被験者由来の生体試料中の D U S P 1 5 遺伝子またはその断片をがんマーカーとして検出および / または定量するためのキットをも提供する。これらのキットは、上述の免疫学的手法またはハイブリダイゼーション法等により、がんマーカーを検出するために用いられる。このようながんとしては、例えば、大腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、肝臓がん、胆道がん、脾臓がん、腎がん、膀胱がん、子宮がん (例 : 子宮頸がん、子宮体がん) 、精巣がん、甲状腺がん、膵臓がん、卵巣がん、脳腫瘍、血液腫瘍などが含まれるが、とりわけ、大腸がんが好ましい。

30

本明細書中、「がんマーカー」とは、被験者の体液 (例えば、血液、尿、リンパ液、唾液、汗、精液等) または細胞もしくは組織中における、正常組織に由来していないか、あるいはがん細胞または組織において選択的に発現の亢進している分子のことをいい、被験者の体液または細胞もしくは組織中における当該分子の存在ががんの存在を示すかまたは示唆するものをいう。

40

上記第一の態様のキットは、被験者からの体液試料中の D U S P 1 5 抗原 (D U S P 1 5 タンパク質およびその部分ペプチドを含む) を検出および / または定量する成分を含有する。例えば、 D U S P 1 5 タンパク質が E L I S A で検出および / または定量される場合、このような成分は、例えば、組織切片、または血液や尿のような体液試料中の D U S P 1 5 のレベルを検出および / または定量するために使用され得る。このような抗体は放射能、蛍光、比色、または酵素標識で標識されていてもよい。本発明のキットは、標識された二次抗体を含有していてもよい。

上記第二の態様のキットは、 D U S P 1 5 遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなるポリヌクレオチドを含有する。例えば、本発明のキットは、 D N A チップ上に固定された上記

50

ポリヌクレオチドを含有し得る。

本発明のキットは、抗DUSP15抗体、DUSP15遺伝子またはその一部の塩基配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件トでハイブリダイズ可能な塩基配列等の他に、容器およびラベルを含んでいてもよい。容器上のまたは容器に伴うラベルには、薬剤が大腸がんマーカーの検出に使用されることが示されていてもよい。また、他のアイテム、例えば、使用説明書等がさらに含まれていてもよい。

以下、本発明を実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって限定されない。

【実施例】

【0006】

実施例1：アレイCGH法による大腸がん特異的増幅遺伝子の同定

本実施例では、大腸がん特異的な遺伝子増幅領域を特定するために、大腸がん検体200症例のサンプル調製およびアレイCGH法に基づく検証を実施した。

その結果、大腸がん検体において高頻度に増幅が起きている領域の内、公共DBでの遺伝子情報(NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を利用し、精査した結果、使用したBAC Clone RP11-243J16に位置している、DUSP15(Dual specificity phosphatase-like 15)(NCBI Accession No.: NM_080611)遺伝子が大腸がん患者において高頻度で高値であることを見出した(図1, 表2)。図1は、DUSP15遺伝子の大腸がん患者200検体での増幅度に対する頻度を示すヒストグラムである。また、下記の表2は、DUSP15遺伝子の大腸がん患者200検体での増幅度(G/R値)および頻度を示す。平均値は、G/R値が1.2以上の検体での平均値を示している。

表2に示されるように、DUSP15遺伝子は、200検体の大腸がん患者の56.0%において増幅が認められ、その増幅度の平均値は、1.7であった。最大値は2.4であり、非常に高頻度で顕著な増幅が起こっていた。

【表2】

(表2)

| 200 検体アレイ CGH | | |
|---------------|----------|-------|
| 平均 G/R 値 | 最大 G/R 値 | 頻度 |
| 1.7 | 2.4 | 56.0% |

実施例2：大腸由来培養細胞株での遺伝子増幅度の検証

本実施例では、大腸がん患者において高頻度で高値な遺伝子領域について、大腸がん由来培養細胞株での増幅度を検証した。

< サンプル調製 >

培養細胞株は、大腸がん由来の細胞株であるCaco2およびRKOE6を使用した。培養細胞よりBlood & Cell Culture DNA Kit(QIAGEN)を使用して、キット添付のプロトコールに従い、ゲノムDNAを抽出した。

< アレイCGH >

遺伝子領域の増幅を確認するために、アレイCGHを実施した。方法の詳細は実施例1と同様に実施した。

結果

表3に、DUSP15遺伝子の大腸がん由来の細胞株での増幅度(G/R値)を示した。示されるように、大腸がん由来細胞株においても、BAC Clone RP11-243J16に位置している、DUSP15遺伝子で増幅が起きていることを見出した。

【表 3】

(表 3)

| アレイ CGH | |
|---------|-------|
| Caco2 | RKOE6 |
| 2.1 | 1.3 |

< 定量的 PCR >

DUSP15 遺伝子領域の増幅を確認するために、定量的 PCR を実施した。定量的 PCR は、SYBR Green RT-PCR Reagents (Applied Biosystems) を使用して、添付のプロトコールに従い、7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて実施した。プライマーは、以下の配列を合成し (OPERON に合成委託) 使用した。

プライマー配列：

5' - CCGCACTGATCTAAAGGCATTC - 3' (配列番号 3)

5' - GGTCTCAAACATCATGGCCTTTG - 3' (配列番号 4)

結果

表 4 に、DUSP15 遺伝子の大腸がん由来の細胞株での増幅度を示した。値は対照 DNA (正常) との相対値を示している。示されるように、大腸がん由来細胞株においても、DUSP15 遺伝子領域に増幅が起きていることを見出した。

【表 4】

(表 4)

| 定量的 PCR | |
|---------|-------|
| Caco2 | RKOE6 |
| 2.0 | 1.2 |

これらの結果により、大腸がん由来の細胞株 (Caco2, RKOE6) においても、DUSP15 遺伝子が増幅していることが確認された。よって、がんにおける DUSP15 遺伝子の機能解析に使用可能な培養細胞が選択された。

実施例 3：大腸がん細胞株を用いた RNAi 解析による機能解析

本実施例では、大腸がん患者 200 検体において高頻度に増幅が認められた DUSP15 遺伝子について、大腸がん由来の細胞株であり、且つ、ゲノムレベルで遺伝子の増幅が認められた細胞株 (Caco2, RKOE6) を用いて、RNAi 解析を行い、その表現型を観察した。

< RNAi 解析 >

細胞株は ATCC より購入し、添付のプロトコールに従い培養を行った。siRNA は遺伝子内の特異的な 21mer を選択しその配列を標的とする siRNA を合成した (QIAGEN に合成委託)。

10

20

40

【表 5】

(表 5)

s i R N A 配列 :

| siRNA | Sense | Anti-sense |
|-------|---|---|
| a | 5'-CUCUACCUCGGAAACUUCATT-3' (配列番号 5) | 5'-UGAAGUUUCCGAGGUAGAGTC-3' (配列番号 6) |
| b | 5'-CACACAUCAUCUCUAUCCATT-3' (配列番号 7) | 5'-UGGAUAGAGAUGAUGUGUGTG-3' (配列番号 8) |
| c | 5'-CUUCAAGAAUGUAUCAACTT-3' (配列番号 9) | 5'-GUUGAUACAUCUUGAAGTG-3' (配列番号 10) |

s i R N A の C a c o 2 細胞内への導入は、O l i g o f e c t a m i n e (I n v i t r o g e n) を使用し、100 nM の s i R N A を添付のプロトコールに従い細胞に導入した。s i R N A の R K O E 6 細胞内への導入は、R N A i F E C T (Q I A G E N) を使用し、100 nM の s i R N A を添付のプロトコールに従い細胞に導入した。対照には N e g a t i v e C o n t r o l s i R N A (Q I A G E N) を使用した。細胞に導入後 4 日間、倒立顕微鏡下で観察した。

20

< 定量的 R T - P C R 解析 >

定量的 R T - P C R 法を用いて、s i R N A の効果を mRNA レベルで検証した。s i R N A 導入後 24 時間の細胞から、M i c r o - t o - M i d i T o t a l R N A P u r i f i c a t i o n S y s t e m (I n v i t r o g e n) を使用して、添付のプロトコールに従い、全 RNA を抽出した。その後、S u p e r S c r i p t I I I F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S y s t e m f o r R T - P C R (I n v i t r o g e n) を使用して、添付のプロトコールに従い、c D N A を合成した。

30

この c D N A を鋳型にして、定量的 R T - P C R を実施した。定量的 P C R は、S Y B R G r e e n R T - P C R R e a g e n t s (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して、添付のプロトコールに従い、7500 R e a l - T i m e P C R S y s t e m (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いて実施した。プライマーは、以下の配列を合成し (O P E R O N に合成委託) 使用した。

プライマー配列 :

5' - A C C A C G A T T G T G A C A G C G T A T G - 3' (配列番号 11)

5' - A A C T C T T C A A G C T G C T G C C T A A A G - 3' (配列番号 12)

相対比を算出するための標準遺伝子には G l y c e r a l d e h y d r o g e n a s e (G A P D H) C o n t r o l R e a g e n t s (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いて G A P D H の発現量を求め、相対比を算出した。

40

< 生細胞数の測定 >

s i R N A 導入後の生細胞数を A l a m a r B l u e (B i o s o u r c e) を用いて、添付のプロトコールに従い、W a l l a c 1420 M u l t i l a b e l / L u m i n e s c e n c e C o u n t e r A R V O (P e r k i n E l m e r) により測定した。

結果

大腸がん由来の細胞株である C a c o 2 および R K O E 6 を用いて、D U S P 1 5 遺伝

50

子のRNAi解析を実施した。

図2Aおよび図2Bに、それぞれ、Caco2細胞およびRKOE6細胞にDUSP15遺伝子のsiRNAをTransfection後、4日目の観察像を示す(各図において、上段：x40；下段：x200)。a, b, およびcは、それぞれDUSP15遺伝子のsiRNA3種であり、NCはネガティブコントロールを示す。示されるように、表現型の観察では、a、b、およびc3種類のsiRNA共にNegative Control (NC)と比較して顕著に細胞数が減少していた(図2A, B)。

図3には、Caco2細胞にDUSP15遺伝子のsiRNAをTransfectionして24時間後に細胞を回収し、定量的RT-PCRを行った結果を示す。内在性コントロールとして、GAPDHの相対比を用いて、NCに対する相対量を示した。示されるように、RNAレベルでの効果を定量的RT-PCRで確認した結果、3種類のsiRNA共に顕著に発現量が減少していた(図3)。

図4AおよびBには、それぞれ、Caco2細胞およびRKOE6細胞にDUSP15遺伝子のsiRNAをTransfection後、4日目の細胞を用いて測定試薬により生細胞数を測定した結果を示す。グラフはNCに対する相対量を示した。示されるように、生細胞数の測定を行った結果、Caco2細胞については、DUSP15遺伝子のsiRNAの1種(c)において、RKOE6細胞については、DUSP15遺伝子のsiRNAの3種(a, b, c)全てにおいて、表現型同様、Negative Control (NC)と比較して顕著に細胞数が減少していた(図4A, B)。細胞数の減少が観察された上記DUSP15遺伝子のsiRNA全てについて、t検定において有意($p < 0.01$)であった。

よって、RNAi効果によりDUSP15遺伝子の発現が抑制された結果、Caco2細胞およびRKOE6細胞の両方において、顕著にがん細胞の増殖が抑制されることが見出された。

実施例4：大腸由来正常細胞株を用いたRNAi解析による機能解析

本実施例では、大腸の正常組織由来の細胞株を用いてRNAi解析を実施することにより、標的遺伝子の抑制効果ががん特異的であることを検証した。

< RNAi解析 >

細胞株はATCCより購入したCCD18Coを使用した。培養条件は、添付のプロトコールに従った。使用したsiRNAは、実施例3のc配列を使用した。siRNAの細胞内への導入は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を使用し、25nMのsiRNAを添付のプロトコールに従い細胞に導入した。対照にはNegative Control siRNA (QIAGEN)を使用した。導入後5日間、倒立顕微鏡下で観察した。

< 定量的RT-PCR解析 >

実施例3の記載方法と同様に実施した。

< 生細胞数の測定 >

実施例3の記載方法と同様に実施した。

結果

DUSP15遺伝子の、大腸正常組織由来の細胞株CCD18CoでのRNAiの効果は以下の通りである。

図5に、CCD18Co細胞にDUSP15遺伝子のsiRNAをTransfection後、5日目に得た観察像を示す(上段：x40；下段：x200)。DUSP15cは、DUSP15遺伝子のsiRNAの1種(実施例3のc配列)を示し、NCはネガティブコントロールを示す。示されるように、表現型の観察では、NCとほぼ同様で、効果は認められなかった(図5)。

図6に、CCD18Co細胞にDUSP15遺伝子のsiRNAをTransfection後、5日目の細胞を用いて測定試薬により生細胞数を測定した結果を示す。グラフはNCに対する相対量を示す。その結果、表現型同様、Negative Control (NC)とほぼ同様で、効果は認められなかった(図6)。

このことにより、大腸がん由来の細胞株であるCaco2およびRKO6では、RNAi効果によりDUSP15遺伝子の発現が抑制された結果、顕著にがん細胞の増殖が抑制されたが、大腸正常組織由来の細胞株CCD18Coでは影響が無いことが見出された。よって、DUSP15遺伝子が、正常細胞には影響が少ないことより、がん特異的な創薬標的遺伝子となりうることを見出した。

実施例5 臓器特異性の評価

DUSP15遺伝子が正常組織でどのような臓器特異的な発現がされているのか、当該技術分野で公知のノーザンハイブリダイゼーション法により評価した。

MTN Multiple Tissue Northern Blots (Clontech)を用いて、添付のプロトコールに従い、25mer(5'-cagacaccgggggagggcaagagaaa-3'(配列番号13))のOligo DNA Probeでハイブリダイゼーションを実施した。

10

具体的には、正常な各臓器組織でのRNAレベルの発現分布について、23種の臓器(心臓(Heart)、脳(Brain)、胎盤(Placenta)、肺(Lung)、肝臓(Liver)、骨格筋(Skeletal Muscle)、腎臓(Kidney)、膵臓(Pancreas)、脾臓(Spleen)、胸腺(Thymus)、前立腺(Prostate)、睾丸(Testis)、卵巣(Ovary)、小腸(Small Intestine)、結腸(Colon)、末梢血白血球(Peripheral Blood Leukocyte)、胃(Stomach)、甲状腺(Thyroid)、脊髄(Spinal Cord)、リンパ節(Lymph Node)、気管(Trachea)、副腎(Adrenal Gland)、骨髄(Bone Marrow))についてノーザンハイブリダイゼーション法により、解析した。なお、前述のとおり、DUSP15の遺伝子配列は、NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)に、Accession No. NM_080611で1,383bpの配列がmRNAとして登録されている。

20

結果

図7は、その結果を示す。示されるように、Alonso A.ら(Alonso A., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(31), 32586-32591)の報告と同様に、精巣において約1.5kb付近にバンドが認められ、精巣特異的に顕著な発現が確認された。また、今回の解析で新たに、心臓、骨格筋において約1.3kb付近にバンドが認められ、オルタナティブスプライシングバリエーションの発現が示唆された。他の臓器については、発現量が少ないことが確認された。精巣での特異な発現及び、発現する臓器が一部に限定されることは、この遺伝子を標的にした薬剤の影響が正常組織に対して限定的である可能性が高いと考えられる。

30

実施例6 遺伝子増幅の評価

検体組織内のがん細胞においてDUSP15遺伝子領域で遺伝子増幅が起きていることを、当該技術分野で公知のFISH法により評価した。

アレイCGH法により、遺伝子増幅度(G/R)が1.2以上であった検体組織(大腸癌患者由来)を用いて、DUSP15遺伝子が位置するBAC Clone RP11-243J16のDNA Probeでハイブリダイゼーションを実施した。

40

結果

図8は、各検体組織(A~J)で観察したがん細胞の一部(6細胞分)の光学顕微鏡写真(蛍光像)を示す。示されるように、がん細胞においてシグナルが3スポット以上見出された。アレイCGH法により遺伝子増幅度が1.2以上であった10検体において、DUSP15遺伝子領域が増幅していることが確認された。また、病態ステージの初期から後期にわたり遺伝子増幅が起きていることが示された。このことは、DUSP15遺伝子領域が、がん治療薬の分子標的としてだけでなく、FISH法によるがん診断に応用できることを示している。

実施例7: 質量分析による血中DUSP15タンパク質の検出

1) 血液検体の前処理

50

大腸癌患者の血清検体10 μ L及び健常者血清検体10 μ Lを、希釈バッファ溶液(10mM Tris HCl pH 7.4 + 150mM NaCl)500 μ Lで希釈後、Proteome Lab IgY-12 SC プロテオームパーティショニングキット(BECKMAN COULTER: A24618)を用いてアルブミン、グロブリン等の血清中多量蛋白質を除去した。得られた画分に終濃度10mMとなるようにジチオスレイトール(Wako: 049-08972)を加え、還元反応を60 $^{\circ}$ Cで30分間行った。反応終了後、終濃度10mMとなるようにヨードアセトアミド(SIGMA: 144-48-9)を加え、アルキル化反応を室温で30分間、遮光状態で行った。反応終了後、反応液の4倍量の冷アセトン(Wako: 014-08681, -20 $^{\circ}$ C)を加え、-80 $^{\circ}$ Cに1時間静置した後に15,000 \times gで30分間遠心してタンパク質を沈殿として回収した。回収したタンパク質は80 μ Lの2M尿素+100mM重炭酸アンモニウム溶液に溶解した。溶解後に一部をBCA法によるタンパク質濃度測定に供した。試料タンパク質と1/50(w/w)となるようにトリプシン(Promega: V511C)を加え、37 $^{\circ}$ Cで16時間消化反応を行った。

10

2) Nano-HPLC直結質量分析装置による解析

ペプチド断片0.7 μ g量を μ -Precolumn cartridge(C18 PepMap300, 5 μ m, 300 μ m i.d. \times 5mm LC PACKINGS: 163589)と直結させたナノカラム(C18 PepMap 3 μ m, 100 μ m, 75 μ m i.d. \times 150mm LC PACKINGS: 160321)により分離した。HPLC装置はUltimate Plus(LC PACKINGS)を用いた。流速は200nL/min、0.1%ギ酸(Wako: 062-02901)含有2%アセトニトリル(MERCK: 1287229)と0.1%ギ酸含有90%アセトニトリルの濃度勾配が0.57%/minの直線グラジエントを設定して解析を行った。Nano-HPLCで分離した試料はPicoTip(New Objective: FS360-20-10-D-20)を通して直結したイオントラップ型質量分析装置に連続的に導入した。質量分析装置はHCT Plus(Bruker Daltonics)を用いた。試料のイオン化はキャピラリー電圧1500V、エンドプレートオフセット値500V、ドライガス流量12L/min、ドライガス温度250 $^{\circ}$ Cの条件で行った。イオントラップの設定は標的m/zの前後2Daの取り込みとし、MRMモードでのMS/MS解析を行った。

20

30

3) データ解析

質量分析装置から得た全分析データはData Analysisソフトウェア(Bruker Daltonics)を介して出力した。出力した全データ中から標的分子の分析データのみを抽出した。抽出したデータの中から各分析時間におけるMS/MSデータを精査し、標的分子のフラグメントイオンに相当する質量を持つイオンピークの有無を解析した。

結果

図9Aおよび図9Bは、(A)大腸がん患者由来の血清、および(B)健常者由来の血清について、上記の方法で解析した結果をそれぞれ示す。

図10A~Cは、MS/MS解析によって決定された、図9に示すピークとアミノ酸(またはアミノ酸配列)との対応関係を示す。

40

図9および図10に示されるように、標的分子のフラグメントイオンに相当するイオンピークが、大腸がん患者由来の血清中に明確に認められた。すなわち、図10Bに示すように、少なくともC末端側からSAWGFE Eという部分配列が決定され、これは、DUSP15タンパク質のアミノ酸配列(配列番号2)中の136位~142位のアミノ酸配列に相当する。よって、図10Aに示すように、アミノ酸配列133位~145位の標的ペプチドフラグメント(配列番号14)が同定された。このような部分配列に対応する有意なイオンピークは健常者血清を用いた解析では認められなかった(図10Cを参照)。よって、この標的分子(すなわち、DUSP15タンパク質)は癌特異的に血中含量が増加している可能性が強く示唆された。

50

実施例 8：子宮頸がん由来株 HeLa 細胞株での RNAi 効果の評価

大腸がん細胞株では、DUSP15 遺伝子のノックダウンにより、増殖抑制効果が認められたが、子宮頸がん細胞株においてどのような効果が認められるのか、前述の RNAi 解析法により、評価した。

子宮頸がん由来細胞の HeLa 細胞株を用いて、前出の 3 種の siRNA を用いて RNAi 解析を実施した。siRNA の細胞内への導入は、Oligofectamine (Invitrogen) を使用し、100 nM の siRNA を添付のプロトコールに従い細胞に導入した。対照には Negative Control siRNA (QIAGEN) を使用した。

結果

図 11 は、HeLa 細胞に DUSP15 遺伝子の siRNA を Transfection 後、4 日目の細胞を用いて測定試薬により生細胞数を測定 (MTT assay) した結果を示す。グラフは NC (Negative control siRNA (Qiagen 社製)) に対する相対量を示した。図に示されるように、DUSP15 遺伝子の siRNA 3 種 (a, b, c) その内、siRNA a において 26% の増殖抑制効果が認められた ($p < 0.01$ の t 検定において有意)。

さらに、時系列に従い、顕微鏡下で微分干渉像を撮影し、その動態を詳細に観察した。具体的には、HeLa 細胞に siRNA (a, b, c) をトランスフェクション後、1, 2, 3, 4 日後の同視野の微分干渉像を観察した。その結果を図 12 に示す。NC は Negative control siRNA (Qiagen 社製) を使用した。NC と比較して増殖速度の抑制と、細胞死の誘導 (一部を矢印で示す) が確認された。図中、a、b、および c はそれぞれ、図 11 の siRNA a、siRNA b、および siRNA c に対応する。増殖抑制が認められた a において細胞死の誘導が認められた。

この結果より、DUSP15 遺伝子機能の障害が大腸がんだけでなく、子宮頸がんにおいても抗腫瘍性効果を示すことが示唆された。

【産業上の利用可能性】**【0007】**

本発明は、がんの治療剤、診断剤、診断方法、治療方法、ならびにそれに使用するキットなどを提供する。したがって、本発明は、がんの診断、または標的治療等の分野において有用である。

[配列表]

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> Link Genomics, Inc.

<120> Therapeutic or diagnostic use of DUSP15 gene

<130> PCT06-0106

<150> JP 2005-286207

<151> 2005-09-30

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1383

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

caacaaactg ccgttgtccc gcgggccgtg ggcecggcac actggggcctt tgtccggccc      60
cccgcccgga cccgaggcgg gggccccaca tgaccgaagg ggtaggagga gccitgcggcg      120
gcggcggttg cagcggcggc tccaccacca ttccctccc gggccggggg tcggcgggcg      180
gtggcggttg ctgggcaggg ctgggcaggg ccgcggacgc caggcccccc gtteccccgc      240
aggctgcagg cgtcgggctt gggccgtcag ggcagctgtg accggatcgc ttcccgggcg      300
gcgagctggg ggtgcaccgg gaccgccgcc cccgggatca tgggcaatgg catgaccaag      360
gtacttccig gactctacct cggaaacttc attgatgcca aagacctgga tcagctgggc      420
cgaaataaga tcacacacat catctctatc catgagtcac cccagcctct gctgcaggat      480
atcacctacc ttgcateccc ggtegetgat acccctgagg taccatecaa aaagcacttc      540
aaagaatgta tcaacttcat ccaactgetgc cgccttaatg gggggaactg ccttgtgcac      600
tgcittgcag gcatctctcg cagcaccacg attgtgacag cgtatgtgat gactgtgacg      660
gggctaggct ggcgggacgt gcttgaagcc atcaaggcca ccaggcccat cgccaacccc      720
aaccagcgtc ttaggcagca gcttgaagag ttggctggg ccagttccca gaagcttcgc      780

```

cggcagctgg aggagcgett cggecgagagc ccttcccgcg acgaggagga gtigcgcgcg 840
 ctgctgccc tgtgcaagcg ctgccggcag ggtcccgca ccteggecte ctccgccggg 900
 ccgcactcag cagctccga gggaaccgtg cagcgcttg tgccgcgcac gccccgggaa 960
 gcccaccggc cgtgcccgt gctggcgcgc gtaagcaga cttctcttg cctccccgg 1020
 tgtctgtccc gcaagggcgg caagtgagga tgcagtccag ccgtggctcc ccacttccga 1080
 ctggctccct tcgggggctg tctgcccctt caagcccc caggacgggc ccagaggctg 1140
 ggggagcccc ggggggacct gaacctgccc tcccgcgccc gccctgctcg tccgctctg 1200
 cagtcagcgt ccccaacctg tgegtctctg tctccgggccc ggctgctgc agccacctgg 1260
 tgccctagtc ctggggctgg gggagggggc ccaccttaa aggcggcggg aggggagggg 1320
 gggagagtgg agggttgac gggcctggag ggtattaaag agacacagaa gaagctgcct 1380
 gtc 1383

<210> 2

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Gly Met Thr Lys Val Leu Pro Gly Leu Tyr Leu Gly Asn
 1 5 10 15

Phe Ile Asp Ala Lys Asp Leu Asp Gln Leu Gly Arg Asn Lys Ile Thr
 20 25 30

His Ile Ile Ser Ile His Glu Ser Pro Gln Pro Leu Leu Gln Asp Ile
 35 40 45

Thr Tyr Leu Arg Ile Pro Val Ala Asp Thr Pro Glu Val Pro Ile Lys
 50 55 60

Lys His Phe Lys Glu Cys Ile Asn Phe Ile His Cys Cys Arg Leu Asn

<220>

<223> primer

<400> 3

ccgcactgat ctaaaggcat tc

22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 4

ggctcacaac tcatggcctt tg

22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (sense)

<400> 5

cucuaccucg gaaacuucac t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (anti-sense)

<400> 6

ugaaguuucc gagguagagt c

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (sense)

<400> 7

cacacaucau cucuaucatt t

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (anti-sense)

<400> 8

uggauagaga ugaugugugt g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (sense)

<400> 9

cuucaaagaa uguaucaact t

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA (anti-sense)

<400> 10

guugauacau ucuuugaagt g

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 11
 accacgattg tgacagegta tg 22

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 12
 aactcttcaa gctgctgcct aaag 24

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> probe

<400> 13
 cagacaccgg gggaggcaag agaaa 25

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

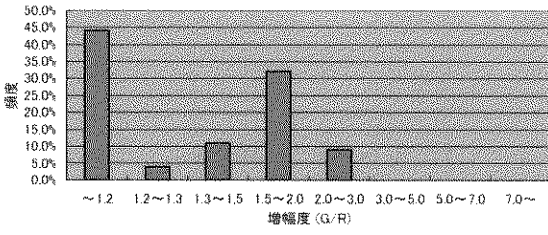
<220>
 <223> DUSP15 target peptide fragment

<400> 14

Gln Gln Leu Glu Glu Phe Gly Trp Ala Ser Ser Gln Lys
 1 5 10

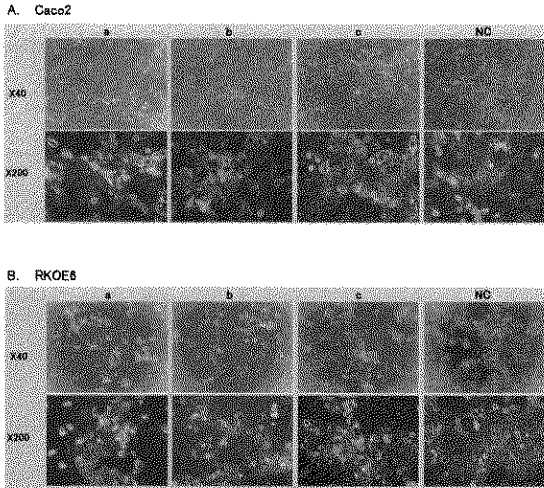
【 図 1 】

Fig. 1



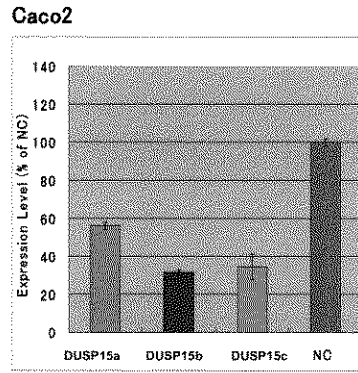
【 図 2 】

Fig. 2



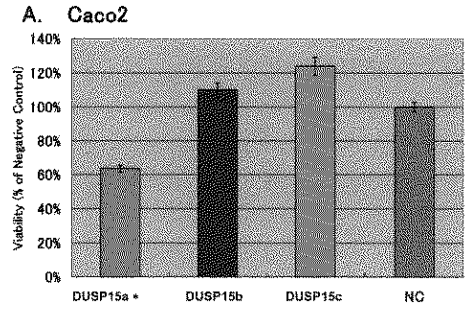
【 図 3 】

Fig. 3

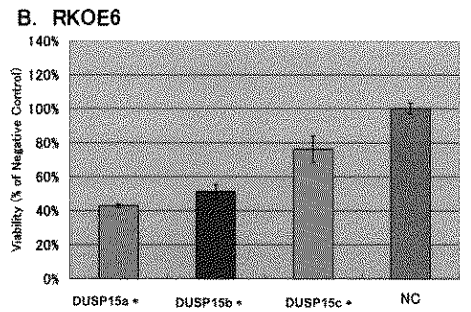


【 図 4 】

Fig. 4



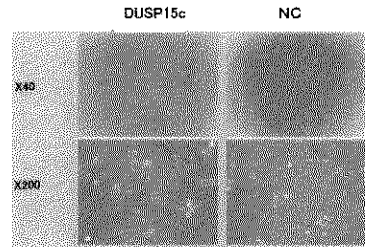
* P < 0.01



* P < 0.01

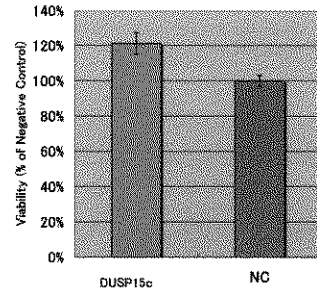
【 図 5 】

Fig. 5



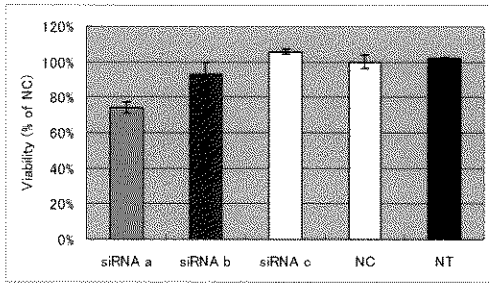
【 図 6 】

Fig. 6



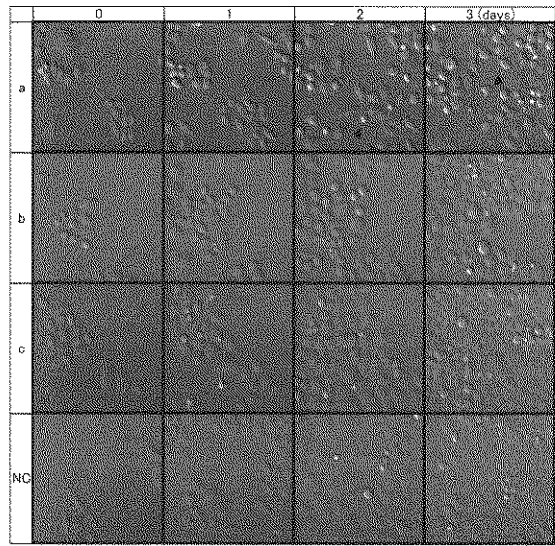
【 1 1 】

Fig. 11



【 1 2 】

Fig. 12



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2006/320043 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet. | | |
| 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) A61K45/00, A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, C07K16/32, C07K16/40, C12N15/00, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574 | | |
| 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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 02/24740 A2 (CEPTYR, INC.), 28 March, 2002 (28.03.02), Claims 1 to 98 & US 2002/182203 A1 | 1-28 |
| A | JP 2004-528805 A (Incyte Genomics, Inc.), 24 September, 2004 (24.09.04), Full text & WO 02/10363 A2 & EP 1305404 A2 | 1-28 |
| A | JP 2003-517836 A (Sugen, Inc.), 03 June, 2003 (03.06.03), Full text & WO 01/46394 A2 & EP 1299525 A2 | 1-28 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 26 October, 2006 (26.10.06) | | Date of mailing of the international search report 07 November, 2006 (07.11.06) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320043

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Anderes ALONSO, VHY, a Novel Myristoylated Testis-restricted Dual Specificity Protein Phosphatase Related to VHX, Journal of Biological Chemistry, 2004, Vol.279, No.31, Pages 32586-32691 | 1-28 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320043

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

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i,
C07K16/40(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i,
C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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/JP2006/320043

<Regarding the subject of search>

Claims 1 and 3 relate to a therapeutic agent for cancer containing as an active ingredient, a substance defined by a desired property of "an expression inhibitor of DUSP15 gene" or "an activity inhibitor of DUSP15 protein", and claims 1 and 3 include any substances having such a property. However, what is disclosed within the meaning of PCT Article 5 is only a small part of the claimed substances, and it is considered that claims 1 and 3 lack the support by the disclosure of the description within the meaning of PCT Article 6.

Further, as for the "expression inhibitor of DUSP15 gene" and the "activity inhibitor of DUSP15 protein", the scope of the substances having such a property cannot be specified even if the technical knowledge at the time of filing is taken into consideration, therefore, claims 1 and 3 also lack the requirement of clarity under PCT Article 6.

Accordingly, a search was made on the relationship between the "expression inhibitor of DUSP15 gene" or the "activity inhibitor of DUSP15 protein" and an anticancer action, and on a therapeutic agent for cancer containing as an active ingredient, a substance that is specifically described in the description and specified in claims 2 and 4. Further, a complete search was made on claims 2 and 4-28.

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JP2006/320043 | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--------------------------|------|--------------|--------------|--------------------------------|---|--|---|--|---|---------------------------|-------------------|------------------------------|--|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照 | | | | | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7088, A61K39/395, A61K48/00, A61P35/00, C07K16/32, C07K16/40, C12N15/00, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2006年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2006年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2006年 | | | | |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2006年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2006年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2006年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 国際調査で利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) BIOSIS (STN), CAlplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 請求の範囲の番号 | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 02/24740 A2 (CEPTYR, INC.) 2002.03.28, 請求項1-98 & US 2002/182203 A1 | 1-28 | | | | | | | | | | | | | |
| A | JP 2004-528805 A (インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド) 2004.09.24, 全文 & WO 02/10363 A2 & EP 1305404 A2 | 1-28 | | | | | | | | | | | | | |
| <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 26.10.2006 | 国際調査報告の発送日 07.11.2006 | | | | | | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 長部 喜幸 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 | 4C | 3229 | | | | | | | | | | | | |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/320043

| 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 請求の範囲の番号 |
| A | JP 2003-517836 A (スージェン・インコーポレイテッド) 2003.06.03, 全文 & WO 01/46394 A2 & EP 1299525 A2 | 1-28 |
| A | Anderes ALONSO, VHY, a Novel Myristoylated Testis-restricted Dual Specificity Protein Phosphatase Related to VHX, Journal of Biological Chemistry, 2004, Vol. 279, No. 31, Pages 32586-32691 | 1-28 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/320043

発明の属する分野の分類

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,
A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i,
C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,
G01N33/50(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/320043

<調査の対象について>

請求の範囲1、3は、「DUSP15遺伝子の発現阻害物質」又は「DUSP15タンパク質の活性阻害物質」という所望の性質により定義された物質を有効成分とするがん治療剤に関するものである。そして、請求の範囲1、3は、そのような性質を有するあらゆる物質を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた物質のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「DUSP15遺伝子の発現阻害物質」及び「DUSP15タンパク質の活性阻害物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する物質の範囲を特定できないから、請求の範囲1、3は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、「DUSP15遺伝子の発現阻害物質」又は「DUSP15タンパク質の活性阻害物質」と抗がん作用との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲2、4に特定されている物質を有効成分とするがん治療剤について行った。また、請求の範囲2、4-28については、完全な調査を行った。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | | | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|-------|---|------------|
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | | N | 4 C 0 8 6 |
| C 0 7 K 16/32 (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | Z N A | | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 0 7 K 16/32 | | | |
| G 0 1 N 33/15 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 | | A | |
| G 0 1 N 33/50 (2006.01) | G 0 1 N 33/15 | | Z | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/50 | | Z | |
| G 0 1 N 33/574 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | | M | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | G 0 1 N 33/574 | | A | |
| | C 1 2 N 15/00 | | A | |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO, CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,L C,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG ,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 牧野 泰孝

東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 リンク・ジェノミクス株式会社内

(72)発明者 生田 智樹

東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 リンク・ジェノミクス株式会社内

(72)発明者 新井 一也

東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 リンク・ジェノミクス株式会社内

(72)発明者 進藤 孝之

東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 リンク・ジェノミクス株式会社内

(72)発明者 小椋 広道

東京都中央区日本橋小舟町 1 3 - 3 リンク・ジェノミクス株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB02 DA14 FB02

4B024 AA01 AA12 CA09 CA11 CA12 CA20 HA08 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02

4C084 AA13 AA17 NA14 ZB26

4C085 AA13 AA14 CC23 CC32 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

4H045 AA11 DA75 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

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

| | | | |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | DUSP 15基因的治疗或诊断用途 | | |
| 公开(公告)号 | JPWO2007037555A1 | 公开(公告)日 | 2009-04-16 |
| 申请号 | JP2007537785 | 申请日 | 2006-09-29 |
| 申请(专利权)人(译) | 链接基因组公司 | | |
| [标]发明人 | 丹羽真一郎 牧野泰孝 生田智樹 新井一也 進藤孝之 小椋広道 | | |
| 发明人 | 丹羽 真一郎 牧野 泰孝 生田 智樹 新井 一也 進藤 孝之 小椋 広道 | | |
| IPC分类号 | A61K45/00 A61P35/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/395 C12Q1/02 C07K16/32 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | G01N33/57484 A61K48/00 C07K14/4703 C12N9/16 C12N15/1137 C12N2310/14 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158 C12Y207/12001 G01N2500/00 | | |
| FI分类号 | A61K45/00 A61P35/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/395.N C12Q1/02.ZNA C07K16/32 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/574.A C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/CC32 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 小林 浩 片山英二 藤田 尚 铃木康仁 | | |
| 优先权 | 2005286207 2005-09-30 JP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明使用含有DUSP15蛋白的表达抑制剂或活性抑制剂的癌症治疗剂；筛选可以用作该治疗剂的活性成分的化合物的方法；针对DUSP15蛋白的抗体；以及用于治疗癌症的药物。癌症诊断剂和癌症诊断方法。

| siRNA | Sense | Anti-sense |
|-------|---------------------------------------|--|
| a | 5'-CUCUACCUCGGAACUUCATT-3' (配列番号5) | 5'-UGAAGUCCGAGGUAGAGTC-3' (配列番号6) |
| b | 5'-CACACAUCUCUUCUCCATT-3' (配列番号7) | 5'-UGGAUAGAGAUGAUGUGTG-3' (配列番号8) |
| c | 5'-CUCAAAGAAUGUAUCAACTT-3' (配列番号9) | 5'-GUUGAUACAUCUUUGAAGTG-3' (配列番号10) |