

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-73548

(P2005-73548A)

(43) 公開日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/50 Z	
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-306818 (P2003-306818)	(71) 出願人	590001452 国立がんセンター総長 東京都中央区築地5丁目1番1号
(22) 出願日	平成15年8月29日 (2003.8.29)	(71) 出願人	504137945 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関3-3-2
		(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	土谷 聡 東京都中央区築地五丁目一番一号 国立がんセンター内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 卵巣明細胞腺癌の検査、治療、および治療薬のスクリーニングのための、HNF-1βの利用

(57) 【要約】

【課題】 HNF-1 遺伝子および該遺伝子がコードするタンパク質を用いた卵巣明細胞腺癌の検査方法、および該疾患の治療薬のスクリーニング方法の提供を課題とする。

【解決手段】 オリゴヌクレオチドアレイを用いて卵巣明細胞腺癌 (CCC) 細胞と非CCC細胞との間で発現レベルに差が見られる遺伝子を分析し、CCC細胞でのみ発現亢進しているHNF-1 遺伝子を見出した。免疫プロット分析および免疫組織染色によって、HNF-1 遺伝子がmRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で発現亢進していることが確認された。さらにRNAiを使用してCCC細胞におけるHNF-1 の発現の有意性を検討したところ、HNF-1 の減少がCCCのアポトーシス性細胞死を誘導することが明らかとなった。以上の結果から、HNF-1 がCCCの診断および該疾患のための治療薬のスクリーニングに利用可能であることが示された。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

卵巣明細胞腺癌の検査方法であって、

- (1) 被検者から卵巣明細胞腺癌が疑われる細胞を採取する工程、および
 - (2) 工程(1)で採取された細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルを測定する工程、を含み、
- 工程(2)で測定されたHNF-1 遺伝子の発現レベルが、卵巣明細胞腺癌の危険を判定する対照細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルより高い被検者を、卵巣明細胞腺癌に罹患している危険があると判定する方法。

【請求項 2】

遺伝子の発現レベルを転写レベルで測定する、請求項 1 に記載の検査方法。

10

【請求項 3】

転写レベルをリアルタイム定量RT-PCRによって測定する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

遺伝子の発現レベルを翻訳レベルで測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

翻訳レベルを免疫ブロット分析により測定する、請求項 4 に記載の検査方法。

【請求項 6】

翻訳レベルを免疫組織染色によって測定する、請求項 4 に記載の検査方法。

【請求項 7】

卵巣明細胞腺癌の危険を判定する対照細胞が、卵巣明細胞腺癌以外の卵巣癌細胞または正常卵巣表層上皮である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

次の(a)または(b)を含む、卵巣明細胞腺癌の検査薬。

- (a) HNF-1 遺伝子のセンス鎖またはその相補鎖の連続する少なくとも15の塩基配列を含むポリヌクレオチド
- (b) HNF-1 タンパク質に結合する抗体

【請求項 9】

次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。

- (1) HNF-1 タンパク質と候補化合物を接触させる工程
- (2) 前記タンパク質と候補化合物との結合活性を測定する工程
- (3) 前記タンパク質に結合する化合物を選択する工程

30

【請求項 10】

次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。

- (1) HNF-1 遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
- (2) HNF-1 遺伝子の発現レベルを測定する工程
- (3) 候補化合物を接触させない場合と比較して、HNF-1 遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【請求項 11】

HNF-1 遺伝子を発現する細胞が明細胞腺癌細胞である、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。

- (1) HNF-1 遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補化合物を接触させる工程
- (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (3) 候補化合物を接触させない対照と比較して、前記レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【請求項 13】

次の工程を含む、明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。

- (1) 請求項 9 ~ 12 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって同定された化合物

50

を卵巣明細胞腺癌細胞に接触させる工程

(2) 卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを検出する工程

(3) 卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを誘導する化合物を選択する工程

【請求項14】

請求項9～13のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、卵巣明細胞腺癌の治療薬。

【請求項15】

HNF-1 遺伝子の発現レベルまたは活性を低下させる能力を有する化合物を有効成分として含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬。

【請求項16】

HNF-1 遺伝子の発現レベルまたは活性を低下させる能力を有する化合物が、下記(a)～(c)のいずれかである、請求項15に記載の治療薬。

(a) HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なRNA

(b) (a)のRNAをコードするDNA

(c) HNF-1 タンパク質の結合配列を含むポリヌクレオチド

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はHNF-1 遺伝子および該遺伝子がコードするタンパク質の卵巣明細胞腺癌における分子マーカーとしての利用、および該疾患の治療薬のスクリーニング方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

上皮性卵巣癌は、全ての婦人科悪性疾患の中で最も予後不良であるが(非特許文献1参照)、白金製剤をベースにした化学療法が出現して以来、上皮性卵巣癌患者の生存率は劇的に改善された(非特許文献2参照)。現在、手術(debulking surgery)および補助化学療法(パクリタキセルおよびカルボプラチンの組み合わせ等)は、上皮性卵巣癌の標準的な治療法として用いられている(非特許文献3参照)。しかし、依然として上皮性卵巣癌治療には多数の問題が存在する。中でも明細胞腺癌(CCC)は最も困難な疾患のひとつである。上皮性卵巣癌におけるCCCの発症数は高くないが(約10%)、CCC患者は卵巣漿液性癌患者よりも有意に予後不良である(非特許文献4および5参照)。CCCの予後が悪い理由の1つには、標準的な白金製剤ベースの化学療法に対する薬剤応答性が低いことがある(非特許文献6参照)。

【0003】

病理学的観点からみると、CCCは他の上皮性卵巣癌と異なる多数の特徴を有している。I期患者の割合は、漿液性腺癌患者(16.6%)よりもCCC患者(48.5%)で有意に高く(非特許文献7参照)、これはCCCと非CCCとの間の浸潤能の相違を意味する。p53変異の発生率は、CCC(0%)と類内膜腺癌(63%)との間で異なる(非特許文献8参照)。また、ヘテロ接合性の消失(LOH)パターンは、CCCと非CCCとの間で異なる(非特許文献9参照)。免疫組織学的解析により、他の組織学的サブタイプと比較してCCCはp53およびサイクリンAの発現が弱く、p21およびサイクリンEの発現が顕著に増大する等の傾向があることが明らかとされている(非特許文献10参照)。グルタチオンペルオキシダーゼ3(GPX3)がCCCで過剰発現されている事実はCCCの化学療法抵抗性を説明し得る(非特許文献11参照)。これらの事実を考慮すると、CCCは単に上皮性卵巣癌の別の型というよりはむしろ別個の疾患であると考えられるべきで、その予後を改善するには分子病態を同定する必要がある。

【0004】

ゲノムワイドなcDNAマイクロアレイ(非特許文献12および13参照)の出現する数年前までは、上皮性卵巣癌の分子病態は断片的にしか知られていなかったが、cDNAマイクロアレイの出現以来、上皮性卵巣癌を含む種々の腫瘍の分子病態は広範に研究され、急速に

10

20

30

40

50

進歩した（非特許文献14～20参照）。このようなcDNAマイクロアレイ分析に基づいた研究により、卵巣癌に関係する可能性がある多数の新規遺伝子が同定された。

【0005】

しかしながら、マイクロアレイによる網羅的な同定の段階では、これら遺伝子が現実的に卵巣癌に関係することの証明にはならず、従って、同定された遺伝子が卵巣癌の検査や治療の標的となりうるかはいまだ不明である。

【非特許文献1】 Scully RE, Young RH, Clement PB: Atlas of Tumor Pathology. Third Series Facile 23. Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube, and Broad Ligament. Edited by Rosai J. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 1999, pp. 27-50

10

【非特許文献2】 Piver MS: Ovarian carcinoma. A decade of progress. Cancer 1984, 54:2706-2715

【非特許文献3】 The International Collaborative Ovarian Neoplasm (ICON) Group: Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. Lancet 2002, 360:505-515

【非特許文献4】 Tammela J, Geisler JP, Eskew PN, Jr., Geisler HE: Clear cell carcinoma of the ovary: poor prognosis compared to serous carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 1998, 19:438-440

【非特許文献5】 O'Brien ME, Schofield JB, Tan S, Fryatt I, Fisher C, Wiltshaw E: Clear cell epithelial ovarian cancer (mesonephroid): bad prognosis only in early stages. Gynecol Oncol 1993, 49:250-254

20

【非特許文献6】 Goff BA, Sainz de la Cuesta R, Muntz HG, Fleischhacker D, Ek M, Rice LW, Nikrui N, Tamimi HK, Cain JM, Greer BE, Fuller AF, Jr.: Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. Gynecol Oncol 1996, 60:412-417

【非特許文献7】 Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, Sato I, Taguchi K: Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. Cancer 2000, 88:2584-2589

30

【非特許文献8】 Okuda T, Otsuka J, Sekizawa A, Saito H, Makino R, Kushima M, Farina A, Kuwano Y, Okai T: p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. Gynecol Oncol 2003, 88:318-325

【非特許文献9】 Okada S, Tsuda H, Takarabe T, Yoshikawa H, Taketani Y, Hirohashi S: Allelotype Analysis of Common Epithelial Ovarian Cancers with Special Reference to Comparison between Clear Cell Adenocarcinoma with Other Histological Types. Jpn J Cancer Res 2002, 93:798-806

【非特許文献10】 Shimizu M, Nikaido T, Toki T, Shiozawa T, Fujii S: Clear cell carcinoma has an expression pattern of cell cycle regulatory molecules that is unique among ovarian adenocarcinomas. Cancer 1999, 85:669-677

40

【非特許文献11】 Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ: Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. Cancer Res 2001, 61:3869-3876

【非特許文献12】 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995, 270:467-470

【非特許文献13】 Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol 1996, 14:16

50

75-1680

【非特許文献14】Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999, 286:531-537

【非特許文献15】Higgins JP, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Terris M, Cohen RJ, Fero M, Pollack JR, van de Rijn M, Brooks JD: Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol* 2003, 162:925-932

【非特許文献16】Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002, 419:624-629 10

【非特許文献17】Wang K, Gan L, Jeffery E, Gayle M, Gown AM, Skelly M, Nelson P S, Ng WV, Schummer M, Hood L, Mulligan J: Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* 1999, 229:101-108

【非特許文献18】Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, Kitahara O, Kihara C, Okamoto A, Ochiai K, Takagi T, Nakamura Y: Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2000, 60:5007-5011

【非特許文献19】Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, Lockhart DJ, Burger RA, Hampton GM: Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:1176-1181 20

【非特許文献20】Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, Reed H, Ellenson LH, Giordano TJ, Fearon ER, Hanash SM, Cho KR: Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2002, 62:4722-4729

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】 30

【0006】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、卵巢明細胞腺癌（CCC）と密接に関係する遺伝子やそのタンパク質を標的とした卵巢明細胞腺癌の検査、治療、および治療薬のスクリーニング方法、並びに該検査や治療に用いられる分子を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、CCC細胞と、非CCC細胞との間で発現レベルに差が見られる遺伝子を明らかにし、該疾患との関連性を明らかにすることにより、卵巢明細胞腺癌の検査や治療のための新たな標的分子を見出すことができると考えた。 40

【0008】

このような考えに基づき、本発明者らは、まず、オリゴヌクレオチドアレイ法を利用して4個のCCC細胞株と7個の非CCC細胞株との間で発現が有意に異なる遺伝子を網羅的に同定した。

続いて、同定した遺伝子の中から配列特異的転写因子HNF-1に着目し、11個の卵巢癌細胞株の免疫プロッティング分析、および、83症例の手術切除検体を用いた免疫組織染色を行なった結果、CCCでは他の上皮性卵巢癌と異なり、配列特異的転写因子HNF-1がmRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で発現亢進することを見出した。HNF-1は肝細胞癌では過剰発現するが（Wang W, et al., *J Pathol*, 1998, 184:272-278）、HNF-1の発現亢進はこれまで他の癌では報告されていなかった。 50

【 0 0 0 9 】

HNF-1 の発現がCCCと強い結びつきがあることが明らかとなったことから、さらに本発明者らは、RNA干渉 (RNAi) (新規の遺伝子サイレンシング技術 (Fire A, et al., Nature, 1998, 391:806-811, Kennerdell JR & Carthew RW, Cell, 1998, 95:1017-1026、および、Elbashir SM, et al., Nature, 2001, 411:494-498)) を使用して卵巣明細胞腺癌細胞におけるHNF-1 の発現の有意性を検討した。卵巣明細胞腺癌細胞を、HNF-1 遺伝子に対してsiRNA (short interference RNA) でトランスフェクトし、TUNEL分析およびFACS分析を行なった結果、HNF-1 の抑制が卵巣明細胞腺癌のアポトーシス性細胞死を誘導することが明らかとなった。これらの結果は、HNF-1 がCCC特異的分子であるのみならず、卵巣明細胞腺癌の生存に不可欠な分子であることをも意味するものである。従って、HNF-1 遺伝子やそのタンパク質は、卵巣明細胞腺癌の診断や治療薬のスクリーニングのための優れた標的として利用しうる。

10

【 0 0 1 0 】

本発明は、上記知見を基に完成された、卵巣明細胞腺癌の検査方法、並びに該疾患の治療薬のスクリーニング方法に関し、より詳しくは、以下の〔 1 〕～〔 1 6 〕を提供するものである。

- 〔 1 〕 卵巣明細胞腺癌の検査方法であって、
- (1) 被検者から卵巣明細胞腺癌が疑われる細胞を採取する工程、および
- (2) 工程 (1) で採取された細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルを測定する工程、を含み、
- 工程 (2) で測定されたHNF-1 遺伝子の発現レベルが、卵巣明細胞腺癌の危険を判定する対照細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルより高い被検者を、卵巣明細胞腺癌に罹患している危険があると判定する方法。
- 〔 2 〕 遺伝子の発現レベルを転写レベルで測定する、〔 1 〕に記載の検査方法。
- 〔 3 〕 転写レベルをリアルタイム定量RT-PCRによって測定する、〔 2 〕に記載の方法。
- 〔 4 〕 遺伝子の発現レベルを翻訳レベルで測定する、〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 5 〕 翻訳レベルを免疫プロット分析により測定する、〔 4 〕に記載の検査方法。
- 〔 6 〕 翻訳レベルを免疫組織染色によって測定する、〔 4 〕に記載の検査方法。
- 〔 7 〕 卵巣明細胞腺癌の危険を判定する対照細胞が、卵巣明細胞腺癌以外の卵巣癌細胞または正常卵巣表層上皮である、〔 1 〕に記載の方法。
- 〔 8 〕 次の (a) または (b) を含む、卵巣明細胞腺癌の検査薬。
- (a) HNF-1 遺伝子のセンス鎖またはその相補鎖の連続する少なくとも15の塩基配列を含むポリヌクレオチド
- (b) HNF-1 タンパク質に結合する抗体
- 〔 9 〕 次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。
- (1) HNF-1 タンパク質と候補化合物を接触させる工程
- (2) 前記タンパク質と候補化合物との結合活性を測定する工程
- (3) 前記タンパク質に結合する化合物を選択する工程
- 〔 1 0 〕 次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。
- (1) HNF-1 遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
- (2) HNF-1 遺伝子の発現レベルを測定する工程
- (3) 候補化合物を接触させない場合と比較して、HNF-1 遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程
- 〔 1 1 〕 HNF-1 遺伝子を発現する細胞が明細胞腺癌細胞である、〔 1 0 〕に記載の方法。
- 〔 1 2 〕 次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。
- (1) HNF-1 遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補化合物を接触させる工程
- (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (3) 候補化合物を接触させない対照と比較して、前記レポーター遺伝子の発現レベルを

20

30

40

50

低下させる化合物を選択する工程

〔13〕次の工程を含む、明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法。

(1)〔9〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって同定された化合物を卵巣明細胞腺癌細胞に接触させる工程

(2)卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを検出する工程

(3)卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを誘導する化合物を選択する工程

〔14〕〔9〕～〔13〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、卵巣明細胞腺癌の治療薬。

〔15〕HNF-1 遺伝子の発現レベルまたは活性を低下させる能力を有する化合物を有効成分として含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬。

〔16〕HNF-1 遺伝子の発現レベルまたは活性を低下させる能力を有する化合物が、下記(a)～(c)のいずれかである、〔15〕に記載の治療薬。

(a)HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なRNA

(b)(a)のRNAをコードするDNA

(c)HNF-1 タンパク質の結合配列を含むポリヌクレオチド

【発明の効果】

【0011】

本発明によって、HNF-1 遺伝子を用いた卵巣明細胞腺癌の検査方法、並びに該疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供された。本発明の検査方法は、特に細胞診断において、これまでの標準的なパパニコロウ染色では困難であった卵巣明細胞腺癌細胞を他の組織型と区別する優れた方法である。さらに、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物は、卵巣明細胞腺癌の新たな治療薬として利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

HNF-1 タンパク質 (Hepatocyte Nuclear Factor-1beta、変異HNF1、LF-B3、またはTCF2とも呼ばれる)は、アルブミンおよび α -フェトプロテイン等の肝臓特異的な様式で発現する遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーを制御する転写因子である (Courtois G, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85:7937-7941、Cereghini S, et al., Genes Dev, 1988, 2:957-974、および、Rey-Campos J, et al., Embo J, 1991, 10:1445-1457)。HNF-1 およびHNF-1 (HNF-1 と密接に関連するタンパク質 (Rey-Campos J, et al., Embo J, 1991, 10:1445-1457))はまた、グルコースホメオスタシスの主要な制御因子と考えられており (Pontoglio M, J Am Soc Nephrol, 2000, 11 Suppl 16:S140-143)、HNF-1 変異により、若年発症の非インスリン依存性糖尿病が発症する (Horikawa Y, et al., Nat Genet, 1997, 17:384-385)。肝細胞癌ではHNF-1 が過剰発現することが報告されている (Wang W, et al., J Pathol, 1998, 184:272-278)。

【0013】

本発明における「HNF-1 遺伝子」には、本発明の原理や目的に反しない限り、ゲノムDNAおよびcDNAが含まれる。また、本発明における「HNF-1 タンパク質」には、本発明の原理や目的に反しない限り、天然のタンパク質および組み換えタンパク質が含まれる。また、野生型のタンパク質のみならず、その変異体も含まれる。また、その由来する生物に特に制限はない。卵巣明細胞腺癌の治療薬開発の標的とするHNF-1 タンパク質は、好ましくは哺乳動物由来であり、最も好ましくはヒト由来である。人由来の代表的なHNF-1 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に、HNF-1 遺伝子の塩基配列を配列番号：1に示す。

【0014】

本発明において、卵巣明細胞腺癌とは、上皮性卵巣癌の中で、以下のような特徴的な組織学的特徴を持つ腺癌である。1.淡明な細胞質を持つ腫瘍細胞が充実性、蜂窩状に増殖する。2.核が細胞表面に突出し、hobnail(靴釘)型、peg-like(棍棒状)細胞をみる。3.硝子様間質を有し、腫瘍細胞とともに間質はPAS染色陽性に染まる。婦人科腫瘍WHO国際組織分類では、コード8310/3と定義される。なお、明細胞(clear cell)とは、様々な病的な

10

20

30

40

50

状態で出現する、組織学的に淡明な細胞質をもつ細胞を意味する。

【0015】

本発明の卵巢明細胞腺癌の検査方法は、被検者から卵巢明細胞腺癌が疑われる細胞を採取する工程、および被検者から採取された細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルを測定する工程を含む。

【0016】

被検者から採取する「卵巢明細胞腺癌が疑われる細胞」は、被検者における卵巢細胞であり、通常は、卵巢癌細胞である。卵巢癌細胞は、手術により切除した検体や細胞診検体を用いることができる。卵巢癌の患者は腹水貯留を認めることが多いため、腹水穿刺によって得られた細胞を診断して癌の種類および組織型の判定することは、その後の治療方針(例えばどのような化学療法を行うかを決定する)を立てる際の重要な指針となり、特に重要である。また、末梢血液検体利用した診断も考えられる。この場合、末梢血液中の微量な癌細胞を取得し、この癌細胞のHNF-1 のmRNAを測定することによってCCCの判定を行なうことが考えられる。

10

【0017】

上記の生体試料からライセートを調製すれば、HNF-1 タンパク質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートからmRNAを抽出すれば、HNF-1 遺伝子に対応するmRNAの測定のための試料とすることができる。生体試料のライセートまたはmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

【0018】

また、「対照細胞」は、卵巢明細胞腺癌の危険を判定する対照として利用しうるものであれば特に制限はないが、卵巢明細胞腺癌以外の卵巢癌細胞または正常卵巢表層上皮が例示できる。

20

【0019】

一般的には、これら対照細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルを測定して標準値を決定し、この標準値をもとに、許容範囲を決定する。標準値を設定した後は、被検者における卵巢明細胞腺癌が疑われる細胞の発現レベルのみを測定し、予め決定された標準値との比較に基づいて、本発明の検査方法を実施することもできる。被検者で測定されたHNF-1 遺伝子の発現レベルが、対照細胞におけるHNF-1 遺伝子の発現レベル(許容範囲)よりも高ければ、被検者は卵巢明細胞腺癌に罹患している危険があると判定される。一方、被検者のHNF-1 遺伝子の発現レベルが許容範囲内であれば、卵巢明細胞腺癌に罹患している危険は低いと判定される。

30

【0020】

本発明において、HNF-1 遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写レベル、並びにタンパク質への翻訳レベルを含む。従って、本発明による卵巢明細胞腺癌の検査方法は、HNF-1 遺伝子に対応するmRNAの発現強度、あるいはHNF-1 タンパク質の発現レベルの比較に基づいて行うことができる。HNF-1 遺伝子の発現レベルの測定は、公知の遺伝子解析方法に従って実施することができる。例えばこの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、またはHNF-1 遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーは、HNF-1 遺伝子の塩基配列に基づいてデザインすることができる。

40

【0021】

プライマーあるいはプローブには、HNF-1 遺伝子のセンス鎖またはその相補鎖の連続する少なくとも15の塩基配列を含むポリヌクレオチドを利用することができる。「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成されたものでも天然のものでもよい。また、「相補鎖」とは、A:T(RNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。本発明のポリペプチドは、HNF-1 遺伝子のセンス鎖に相補的なポリペプチドである。「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも

50

70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLAST等のアルゴリズムにより決定することができる。本発明のポリヌクレオチドは、好ましくはHNF-1 遺伝子にストリンジентな条件下でハイブリダイズする少なくとも15塩基の長さを有するポリヌクレオチドである。ここで「ストリンジентな条件下」とは、例えば、低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、5×SSC、0.1% SDSの条件であり、好ましくは50℃、5×SSC、0.1% SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジентな条件が挙げられる。高ストリンジентな条件とは、例えば65℃、0.1×SSC及び0.1% SDSの条件である。

10

【0022】

本発明のポリヌクレオチドを、プライマーとして用いる場合には、通常、15~100塩基、好ましくは15~35塩基の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、HNF-1 遺伝子（またはその相補鎖）の少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15塩基対の鎖長のDNAが用いられる。プライマーは、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグ等を付加することができる。

【0023】

本発明のポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブとして用いる場合には、通常、標識したものが用いられる。標識物質としては、検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、蛍光物質、放射性元素等を挙げることができる。標識は、当業者によって一般的に行われる方法で実施することができる。このような方法としては、例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

20

【0024】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。

30

【0025】

ハイブリダイゼーション技術を利用した卵巣明細胞腺癌の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、またはDNAマイクロアレイを用いた方法等を使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてリアルタイム定量RT-PCRを用いることにより、HNF-1 遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。リアルタイム定量RT-PCRにおいては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象（DNAもしくはRNAの逆転写産物）にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ（exonuclease）活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する（Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001）。PCR増幅モニター法においては、例えば、GeneAmp 7700 Sequence Detector（パーキンエルマー アプライド バイオシステムズ、フォスター シティ、カリフォルニア州）を用いることができる。

40

【0026】

また本発明の検査方法の別の態様としては、HNF-1 遺伝子によりコードされるタンパ

50

ク質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、HNF-1 タンパク質に結合する抗体を利用した免疫プロット分析、免疫組織染色、免疫沈降法、ELISA法等を利用することができる。この検出に用いるHNF-1 タンパク質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40) であることができる。例えば、HNF-1 タンパク質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髄腫細胞等と細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。HNF-1 タンパク質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

10

【0027】

抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えばHNF-1 遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、HNF-1 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列、あるいは全長cDNAによってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

20

【0028】

本発明におけるHNF-1 遺伝子の発現レベルの測定値は、公知の方法によって補正することができる。補正により、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を比較することができる。測定値の補正は、上記生体試料における各細胞において、発現レベルが大きく変動しない遺伝子 (例えば、ハウスキーピング遺伝子) の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標遺伝子の発現レベルの測定値を補正することによって行われる。発現レベルが大きく変動しない遺伝子の例としては、GAPDH、 α -アクチン等を挙げることができる。

30

【0029】

本発明は、卵巣明細胞腺癌の検査薬を提供する。本発明の検査薬は、HNF-1 遺伝子のセンス鎖またはその相補鎖の連続する少なくとも15の塩基配列を含むポリヌクレオチド、あるいはHNF-1 タンパク質に結合する抗体を含む。これらポリヌクレオチドや抗体は必要に応じて標識されていてもよい。本発明の検査薬においては、有効成分であるポリヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤 (BSAやゼラチン等)、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

40

【0030】

さらに本発明は、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法を提供する。HNF-1 遺伝子は、卵巣明細胞腺癌患者の卵巣細胞において有意に発現レベルが上昇している。従って、HNF-1 遺伝子の発現レベルを低下させることができる化合物を選択することによって、卵巣明細胞腺癌の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを低下させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、およびタンパク質の活性発現のいずれかのステップに対して抑制的に作用する作用を持つ化合物である。

【0031】

本発明のスクリーニング方法の態様としては、例えば、HNF-1 タンパク質との結合活性に基づくスクリーニング方法である。すなわち本発明は、次の工程を含む、卵巣明細胞

50

腺癌の治療薬のスクリーニング方法に関する。

- (1) HNF-1 タンパク質と候補化合物を接触させる工程
- (2) 前記タンパク質と候補化合物との結合活性を測定する工程
- (3) 前記タンパク質に結合する化合物を選択する工程

【0032】

スクリーニングに用いられるHNF-1 タンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来のタンパク質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。候補化合物としては特に制限はなく、例えば、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、精製若しくは粗精製ポリペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。候補化合物を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、可溶性タンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、候補化合物に接触させることができる。

10

【0033】

本発明の治療薬のスクリーニング方法の別の態様としては、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

- (1) HNF-1 遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
- (2) HNF-1 遺伝子の発現レベルを測定する工程
- (3) 候補化合物を接触させない場合と比較して、HNF-1 遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【0034】

HNF-1 遺伝子を発現する細胞としては、例えば、細胞株、好ましくは卵巣癌細胞株を用いることができる。本発明のスクリーニング方法において、HNF-1 遺伝子の発現レベルは、転写レベルで検出してもよく、また、翻訳レベルで検出してもよい。HNF-1 遺伝子の発現レベルの検出手法については、HNF-1 遺伝子の発現を指標とした検査方法との関連で、上述した通りである。

20

【0035】

本発明の治療薬のスクリーニング方法の別の態様は、本発明のHNF-1 遺伝子の転写調節領域を利用したレポーターアッセイ系を利用する手法である。すなわち本発明は、次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法に関する。

- (1) HNF-1 遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補化合物を接触させる工程
- (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (3) 候補化合物を接触させない対照と比較して、前記レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

30

【0036】

転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、TATAボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子としては、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子等を利用することができる。なお、転写調節領域については、Lockwoodらの文献(Lockwood CR, Bingham C, Frayling TM. ,Mol Genet Metab. 2003 Feb;78(2):145-51.)を参照のこと。

40

【0037】

HNF-1 遺伝子の転写調節領域は、次のようにして取得することもできる。すなわち、まずHNF-1 遺伝子のcDNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーやプローブを利用したPCRまたはハイブリダイゼーションにより、BACライブラリー、YACライブラリー等のゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして、該ライブラリーから該cDNAの塩基配列を含むゲノムDNAクローンを取得し、次いで、得られたゲノムDNAにおいて、転写活性を指標に、転写調節領域を同定し、該領域のDNAを取得すればよい。

【0038】

転写調節領域が得られれば、レポーター遺伝子の upstream に位置するようにクローニングし

50

てレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、候補化合物を接触させない対照と比較して、前記レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択することにより本発明のスクリーニングを行うことができる。

【0039】

本発明のスクリーニング方法の別の態様として、卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを指標とする、二次スクリーニング方法を利用することもできる。すなわち本発明は、次の工程を含む、卵巣明細胞腺癌の治療薬のスクリーニング方法に関する。

(1) 上記のスクリーニング方法によって同定された化合物を卵巣明細胞腺癌細胞に接触させる工程

(2) 卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを検出する工程

(3) 卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスを誘導する化合物を選択する工程

【0040】

このようにして得ることができる化合物は、卵巣明細胞腺癌細胞にアポトーシスを誘導し、その結果、卵巣明細胞腺癌を制御することができる。アポトーシス誘導活性は、例えば、HNF-1 タンパク質が発現した細胞株のTUNELおよびFACS分析を用いて、細胞の形態学的な変化や、染色体DNAの切断を指標として確認することができる。

【0041】

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、卵巣明細胞腺癌の治療薬として有用である。HNF-1 遺伝子は、卵巣明細胞腺癌患者の卵巣明細胞腺癌細胞において発現が上昇する遺伝子である。従って、これらの遺伝子の発現、あるいはこれら遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を抑制することによって、卵巣明細胞腺癌の治療効果を期待することができる。細胞におけるタンパク質の機能を抑制するには、例えばHNF-1 遺伝子のアンチセンスRNA、短鎖二本鎖RNA(short interfering RNA ; siRNA)、HNF-1 タンパク質のデコイ、これらをコードするDNA等を細胞に導入または発現させる。即ち、本発明の卵巣明細胞腺癌の治療薬は、スクリーニング方法によって選択された化合物を有効成分として含む。例えば、下記(a)~(c)のいずれかを含むが、これらに限定されない。

(a) HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なRNA

(b) (a)のRNAをコードするDNA

(c) HNF-1 タンパク質の結合配列を含むポリヌクレオチド

【0042】

「HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なRNA」および「該RNAをコードするDNA」の一つの態様は、HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNAおよび該RNAをコードするDNAである。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局部的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(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,pp.319-347,1993)。

【0043】

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑

10

20

30

40

50

制してもよい。一つの態様としては、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ろう。しかし、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し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNA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。アンチセンスDNAの配列は、HNF-1 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阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

10

20

40

50

【0044】

「HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なRNA」および「該RNAをコードするDNA」の他の一つの態様は、HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なdsRNA (HNF-1 遺伝子の転写産物と相補的なRNAとその相補鎖からなるdsRNA) および該dsRNAをコードするDNAである。RNAi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 (以下dsRNA) 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抑制される現象である。細胞に約40~数百塩基対のdsRNAが導入されると、ヘリカーゼドメインを持つダイサー(Dicer)と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存在下で、dsRNAを3'末端から約21~23塩基対ずつ切り出し、siRNA (short interference RNA) を生じる。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、ヌクレアーゼ複合体 (RISC: RNA-induced silencing complex) が形成される。この複合体はsiRNAと同じ配列を認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部で標的遺伝子のmRNAを切断する。また、この経路とは別にsiRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ(RsRP)のプライマーとして作用し、dsRNAが合成される。このdsRNAが再びダイサーの基質となって、新たなsiRNAを生じて作用を増幅する経路も考えられている。

【0045】

上記RNAiは、当初、線虫において発見されたが (Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811, (1998))、現在では、線虫のみならず、植物、線形動物、ショウジョウバエ、原生動物などの種々の生物において観察されている (Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363 (1999)、Sharp, P. A. RNA interference 2001. *Genes Dev.* 15, 485-490 (2001)、Hammond, S. M., Caudy, A. A. & Hannon, G. J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Rev. Genet.* 2, 110-1119 (2001)、Zamore, P. D. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol.* 8, 746-750 (2001))。これら生物では、実際に外来よりdsRNAを導入することにより標的遺伝子の発現が抑制されることが確認され、さらにはノックアウト個体を創生する方法としても利用されつつある。

【0046】

RNAiの登場当初はdsRNAはある程度の長さ(40塩基)以上でなければ効果がないと考えられていたが、米ロックフェラー大のTuschlらは21塩基対前後の単鎖dsRNA(siRNA)を細胞に導入すれば、哺乳動物細胞においてもPKRによる抗ウイルス反応を起こさず、RNAiの効果があることを報告し (Tuschl, *Nature*, 411, 494-498(2001))、RNAiは分化したヒトなどの哺乳動物細胞に応用可能な技術として俄然注目を集めることになった。

【0047】

本発明のDNAは、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンスRNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、前記標的遺伝子mRNAのいずれかの領域のセンスRNAをコードしたセンスコードDNAを含み、前記アンチセンスコードDNAおよび前記センスコードDNAよ

り前記アンチセンスRNAおよび前記センスRNAを発現させることができる。また、これらのアンチセンスRNAおよびセンスRNAよりdsRNAを作成することもできる。

【0048】

本発明のdsRNAの発現システムを、ベクター等に保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合と、異なるベクターからそれぞれアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる場合がある。例えば、同一のベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれpolIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することができる。また、異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA (siRNAコードDNA) が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るようにプロモータを対向して備えられる。この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖 (アンチセンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖) の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A (アデニン) 塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパリンδροームスタイルの発現システムでは、二つのプロモータの種類を異ならせることが好ましい。

【0049】

また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。

【0050】

本発明のRNAiにおいては、dsRNAとしてsiRNAが使用されたものであってもよい。「siRNA」は、細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、Tuschlら (前掲) により報告された全長21~23塩基対に限定されるものではなく、毒性を示さない範囲の長さであれば特に限定はなく、例えば、15~49塩基対と、好適には15~35塩基対と、さらに好適には21~30塩基対とすることができる。あるいは、発現されるsiRNAが転写され最終的な二重鎖RNA部分の長さが、例えば、15~49塩基対、好適には15~35塩基対、さらに好適には21~30塩基対とすることができる。

【0051】

本発明のDNAとしては、標的配列のインバーテッドリピートの中に適当な配列 (イントロン配列が望ましい) を挿入し、ヘアピン構造を持つダブルストランドRNA (self-complementary 'hairpin' RNA (hpRNA)) を作るようなコンストラクト (Smith, N.A. et al. Nature, 407:319, 2000; Wesley, S.V. et al. Plant J. 27:581, 2001; Piccin, A. et al. Nucleic Acids Res. 29:E55, 2001) を用いることもできる。

【0052】

RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を有する。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。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。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

【0053】

dsRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ（対応する塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不対合部分が含まれていてもよい。本発明においては、dsRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、バルジおよびミスマッチの両方が含まれていてもよい。

【0054】

上記のアンチセンスRNAやdsRNA等は、化学的に合成することができる。この場合、ヌクレアーゼによる分解を防ぐためにRNAを修飾しておくことができる。例えば、チオ化されたRNAは、ヌクレアーゼの作用を受けにくいいため好適である。あるいは、これらのRNAを細胞内で発現させることもできる。標的細胞で活性を持つプロモーターの下流に目的のRNAをコードするDNAを連結したベクターを作製し、これを細胞に導入する。ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクターやリポソーム等の非ウイルスベクター等が利用できる。これらのベクター系を利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法等により患者へ投与を行う遺伝子治療が可能となる。

10

【0055】

また、本発明はHNF-1 タンパク質の結合配列を含むポリヌクレオチド（デコイ核酸）を含む。ポリヌクレオチドは、RNAであっても、DNAであってもよい。一例として、コンセンサス配列としてGTTAATNATTAAC（配列番号：3）を含むポリヌクレオチドが挙げられる（Dirk BC and Gerald RC, J. Biol. Chem., 266, 677-680, 1991）。

20

【0056】

本発明の卵巣明細胞腺癌の治療薬は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明の卵巣明細胞腺癌の治療剤は、該疾患の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

【0057】

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

【0058】

また、投与すべき化合物がタンパク質からなる場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらすタンパク質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である。

30

【0059】

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類等により異なるが、熟練した医師であれば、適宜、治療に有効な投与量を決定することができよう。投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

40

【0060】

HNF-1 遺伝子の発現やHNF-1 タンパク質の機能を抑制する核酸分子をベクターに組み込んで投与する場合には、該核酸分子の発現を支配するプロモーターの活性などを考慮して、治療に有効なベクターの投与量を決定する必要がある。

【実施例】

【0061】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例に用いた材料と方法]

〔1〕 細胞培養

50

【 0 0 6 2 】

本実施例で使用した細胞株の提供元および入手元を以下に示す。

RMG-1、RMG-2、およびRMUG-L（野澤博士（慶応大学，東京，日本））

JHOS-5、JHOC-2、およびJHOS-3（石川博士（東京慈恵会医科大学，東京，日本））

OMC-3（山田博士（大阪医科大学，大阪，日本））

MCAS（JCRB遺伝子バンク，東京，日本）

OV-90、TOV-21G、TOV-112D、およびHeLa細胞（ATCC（American Type Culture Collection）, マナッサス, バージニア州）

【 0 0 6 3 】

上記細胞株の略称および組織型を表1に示す。全ての細胞株を、10%ウシ胎仔血清、10 10
0単位/mLペニシリン、および100 μ g/mLストレプトマイシンを加えたRPMI-1640培地中、
37 $^{\circ}$ C、CO₂5%の空気の湿潤気相下、37 $^{\circ}$ Cで培養した。

【 0 0 6 4 】

【表1】

略称	細胞株	組織型
C1	RMG-2	明細胞
C2	RMG-1	明細胞
C3	JHOC-5	明細胞
C4	TOV-21G	明細胞
E1	TOV-112D	類子宮内膜性
M1	RMUG-L	粘液性
M2	MCAS	粘液性
M3	OMC-3	粘液性
S1	JHOS-3	漿液性
S2	OV-90	漿液性
S3	JHOS-2	漿液性

〔 2 〕 RNA抽出およびオリゴヌクレオチドアレイ

【 0 0 6 5 】

TRIZOL試薬（インビトロジェン，カールズバッド，カリフォルニア州）を使用し、製造者の説明書に従って各細胞株から全RNAを抽出し、DNaseI（プロメガ，マディソン，ウィスコンシン州）で処理した。Super Script Choice System（インビトロジェン）およびBioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit（エンゾ ダイアグノスティクス，ファーマンデール，ニューヨーク州）を使用し、製造者の説明書に従って各サンプル由来の5 μ gの全RNAからcRNAターゲットを合成した。各cRNAターゲットのヒトU95Av2オリゴヌクレオチドプローブアレイ（12,686個のヒト遺伝子に対応する）（アフィメトリクス，サンタクララ，カリフォルニア州）へのハイブリッド形成およびシグナルの検出を、製造者の説明書に従って行った。その後、Affymetrix Microarray Suite 4.0ソフトウェアを使用して発現量の絶対値を分析した（absolute analysis）。発現強度データは、各アレイ毎の全遺伝子のシグナル強度の平均を1000となるように標準化した。得られた発現強度のデータをGeneSpringソフトウェア（バージョン4.2.1；シリコンジェネティクス，サンカルロス，カリフォルニア州）によって選別し分析した。

〔 3 〕 リアルタイム逆転写PCR

【 0 0 6 6 】

オリゴ（dT）₁₂₋₁₈プライマー（インビトロジェン）およびOmniscrypt逆転写酵素（キ 50

アゲン, ヒルデン, ドイツ) を使用して全RNAサンプルから鋳型cDNAを合成した。QuantiTect SYBR Green PCRキット(キアゲン)およびGeneAmp 7700 Sequence Detector(パーキンエルマー アプライド バイオシステムズ, フォスター シティ, カリフォルニア州) を使用し、以下の条件下でリアルタイム定量RT-PCRを行った。

95 15分 1サイクル

95 15秒、55 30秒、72 30秒 40サイクル

RNA量を標準化するために、各サンプル中のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現を定量した。HNF-1、ラミン、およびGAPDH cDNAの増幅用プライマー対を以下に示す。

HNF-1 (正方向) 5'-GCCACACACCACCTTACTTCG-3' (配列番号: 4)

(逆方向) 5'-GTCCGTCAGGTAAGCAGGGAC-3' (配列番号: 5)

ラミン (正方向) 5'-CTGCGCAACAAGTCCAATGAG-3' (配列番号: 6)

(逆方向) 5'-CAGGGTGAACCTTTGGTGGGAAC-3' (配列番号: 7)

GAPDH (正方向) 5'-AGGAAGAGAGACCCTCACTGC-3' (配列番号: 8)

(逆方向) 5'-ATGACAAGGTGCGGCTCC-3' (配列番号: 9)

定量的RT-PCRは各サンプルにつき少なくとも3回行い、鋳型cDNAを含まないサンプルをネガティブコントロールとして用いた。マン・ホイットニーU検定(Mann-Whitney U-test)による統計分析を行った。

[4] 免疫プロット分析

【0067】

免疫プロット分析用に、細胞を溶解緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM NaCl、1% Triton X-100、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、およびプロテアーゼインヒビターカクテルタブレット(ロシュ ディアグノスティクス, パーゼル, スイス))で溶解した。溶解物を遠心分離し、上清を調製した。等量のタンパク質を、SDS-PAGE(10%)で分離し、ポリビニリデンジフルオライドメンブレン(Immobilon; ミリポア, カントン, マサチューセッツ州)に転写した。非特異的な抗原抗体反応を防ぐため、5%(w/v)脱脂粉乳を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)とともに、室温で90分間インキュベーションすることで、ブロックした。次に、メンブレンを、同一のブロッキング溶液中で、HNF-1についてはヤギポリクローナル抗体(sc-7411; サンタクルーズバイオテクノロジー, カリフォルニア州)、ラミンA/Cについてはマウスモノクローナル抗体(612163; BD バイオサイエンシズ, サンノゼ, カリフォルニア州)、および、ローディングコントロールとしての-チューブリンについてはマウスモノクローナル抗体(sc-8035; サンタクルーズバイオテクノロジー)と、4で一晩インキュベートした。その後メンブレンを洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体(サンタクルーズバイオテクノロジー)と室温で90分間インキュベートした。免疫複合体を、化学発光検出システム(アマシャムファルマシアバイオテク, パッキングガムシャー州, 英国)を使用して視覚化した。

[5] 免疫組織染色に使用した症例

【0068】

1998年から2001年の間に国立がんセンター中央病院で全部で83症例の上皮性卵巣癌の手術切除検体について調査した。患者の年齢は、30歳~84歳(平均55.6歳)の範囲であり、患者は手術前に化学療法や他の治療を受けていなかった。患者の詳細な臨床病理的特徴を、表2にまとめる。10症例の卵巣子宮内膜症および10症例の他の良性婦人科疾患患者由来の正常な卵巣表層上皮も調査した。世界保健機関および世界産婦人科連合(FIGO)の基準に従って、病理学的診断を行った(Serov SF, et al., Geneva: World Health Organization 1973)。

【0069】

【表 2】

特徴	明細胞(%)	類子宮内膜性(%)	粘液性(%)	漿液性 (%)
年齢				
< 60	14 (63.6)	25 (64.1)	9 (81.8)	9 (81.8)
≥ 60	8 (36.3)	14 (35.8)	2 (18.2)	2 (18.2)
組織分化				
高い	10 (45.4)	14 (35.8)	9 (81.8)	8 (72.7)
中程度	8 (36.3)	14 (35.8)	2 (18.2)	3 (27.2)
低い	4 (18.1)	11 (28.2)	0	0
FIGO 期				
I / II	18 (81.8)	16 (41.0)	10 (90.9)	9 (81.8)
III / IV	4 (18.1)	23 (58.9)	1 (9.1)	2 (18.2)
合計 (症例数)	22	39	11	11

10

〔 6 〕 免疫組織染色

20

【 0 0 7 0 】

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から5μm厚に薄切した切片を、キシレンで脱パラフィンし、0.3%過酸化水素を含むメタノール溶液で処理し、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中に浸漬し、マイクロウェーブオーブンで90℃で10分間加熱し、30分間で室温において冷却した。切片を2%正常ブタ血清(ダコ, グロストラブ, デンマーク)を含むPBSでプレインキュベートし、4℃で一晩一次抗体とインキュベートし、PBSで洗浄し、二次抗体としてのビオチン化ウマ抗ヤギ免疫グロブリン(ベクター ラボラトリーズ, バーリングゲーム, カリフォルニア州)と30分間インキュベートした。続いて、Vectastain ABCキット(ベクター ラボラトリーズ)を使用してアビジン - ビオチニル - ペルオキシダーゼ複合体と30分間インキュベートし、色素原の0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸および0.007% 過酸化水素を含むTris-HCl緩衝液(pH7.6)を使用したペルオキシダーゼ反応に供し、その後ヘマトキシリンを使用した核対比染色に供した。

30

〔 7 〕 染色評価および統計法

【 0 0 7 1 】

2人の観察者(A.T.およびM.S.)が染色を評価した。HNF-1について陽性の核の比率に基づいてスコアをつけた(0、陽性細胞なし; 1、5%以下; 2、6%~25%; 3、26%~50%; 4、51%~75%; 5、75%超)。マン・ホイットニーU検定および²検定を使用して、HNF-1発現と臨床病理学的変数との関係の統計的有意性を分析した。

〔 8 〕 RNA干渉

【 0 0 7 2 】

化学合成した21塩基のヌクレオチドからなる二本鎖RNA、HNF-1 siRNAを、Dharmacon Research Inc.(ラフィーエット, コロラド州)から入手した。HNF-1 siRNAを開始コドンの第1のヌクレオチド(Genbankアクセッション番号X58840)に対するコード領域1276-1296(AAUCCCCAGCAAUCUCAAAAC(配列番号: 10))に標的化した。ルシフェラーゼGL2およびラミンA/Cを標的化とするコントロールsiRNAは、Dharmacon Research Inc.から入手した。リアルタイム定量的RT-PCR、免疫プロット、TUNEL、およびFACS分析用に、6ウェルプレートに2×10⁵個の細胞をプレーティングした。プレーティングから24時間後、siPORT Lipid(アンピオン, オースティン, テキサス州)を使用して製造者の説明書に従って、終濃度100nMのsiRNAで細胞にトランスフェクトした。

40

〔 9 〕 アポトーシスの検出

50

【0073】

TUNEL (in situターミナルトランスフェラーゼ媒介dUTPニック末端標識) 分析およびFACS (蛍光細胞分析分離装置) 分析によってアポトーシスを検出した。In Situ細胞死検出キット (ロシュ デイアグノスティクス) を使用して製造者の説明書に従って、TUNEL分析を行った。次に、核をVectaShield DAPI (ベクター ラボラトリーズ) で対比染色し、Zeiss LSM410顕微鏡 (ゾーンウッド, ニューヨーク州) で観察した。TUNEL陽性核を計数し、DAPI染色核数で割って、TUNEL陽性細胞の比率を計算した。

【0074】

FACS分析用に、siRNAによるトランスフェクションから一定時間後、接着細胞と分離細胞とを合わせ、70%エタノールにて4 で一晩固定した。PBSで2回洗浄した後、細胞を1mgのリボヌクレアーゼAを含む1mlのPBSと37 で20分間インキュベートし、50 μ gのヨウ化プロピジウムを含む1mlのPBSで染色した。全部で2 \times 10⁴個の細胞をフローサイトメーター (FACScalibur; ベクトン ディキンソン, フランクリンレイクス, ニュージャージー州) で分析し、CELLQuestソフトウェアを使用してサブG1ピークを定量した。

10

[実施例1] 11種の卵巣癌細胞株の発現分析

【0075】

CCCと非CCCとで異なる発現をする遺伝子を同定するために、オリゴヌクレオチドアレイを使用して、4種の卵巣CCC細胞株における遺伝子発現と7種の他の組織像の細胞株における遺伝子発現とを比較した。全遺伝子を下記の基準によって選別した。

(1)11サンプル中少なくとも5サンプルでの発現が認められる (2)11サンプル中少なくとも5サンプルで1000を超える発現強度である (発現強度とは完全な適合プローブ対とミスマッチプローブ対との間のシグナル強度の差を意味する)。

20

(3) マン・ホイットニー-U検定でP<0.05の有意差をもってCCCと非CCCとで発現の異なる遺伝子群。

上記の基準を使用して、12,686組のプローブから207個の発現の異なる遺伝子を選択した。さらに、CCC細胞または非CCC細胞において発現がより有意に異なる遺伝子を同定するため、2群間の発現強度に3倍以上の差が認められる遺伝子を列挙した (図1)。非CCCと比較してCCCでは16個の遺伝子が発現が亢進し、12個の遺伝子の発現が減弱していた。

[実施例2] 卵巣癌細胞株におけるHNF-1 mRNAおよびタンパク質の発現

【0076】

本発明者らは、図1に示す遺伝子のうち転写因子HNF-1 に注目した。HNF-1 は最も高度に発現亢進している転写因子であるので、その下流の標的遺伝子の調節によってCCCの特徴的な生物学的挙動に寄与すると推測した。まず、本発明者らは、定量RT-PCRによってHNF-1 mRNAの発現レベルを分析した (図2A)。定量RT-PCR分析によるGAPDH mRNAで標準化したHNF-1 mRNAの相対的発現レベルは、マイクロアレイ分析の結果と密接に関連していた。CCCにおけるHNF-1 mRNAの相対発現レベル (8.75 \pm 3.89) は、非CCCのもの (0.75 \pm 1.09) より平均して11.6倍であった (U検定によりP=0.008)。

30

【0077】

次に、抗HNF-1 抗体を使用してHNF-1 タンパク質の発現を調べた。一連の卵巣癌細胞株におけるHNF-1 の免疫プロット検出を、図2Bに示す。全てのCCC細胞株でHNF-1 タンパク質に対応する分子量70,000のバンドが検出された。C1およびC2で検出された分子量55,000のバンドは、3つのHNF-1 アイソフォームが存在することから (Bach I & Yaniv M, Embo J 1993, 12:4229-4242)、HNF-1 のスプライス変異タンパク質に対応すると考えられた。これらの2つのHNF-1 特異的バンド以外の特異的バンドは検出されなかった。各細胞株における分子量70,000のバンド強度は、定量的RT-PCR分析で得たmRNA発現レベルと相関した。M1以外ではいかなる非CCC細胞株においてもHNF-1 蛋白の発現はほとんどないか皆無であった。

40

[実施例3] 卵巣癌検体の免疫組織染色

【0078】

CCCの外科切除検体においてタンパク質レベルでもHNF-1 の発現が亢進しているかどうか

50

かを同定するために、免疫プロット分析で使用したものと同一の抗HNF-1 抗体を使用して、免疫組織染色を行なった(図3)。ほとんど全てのCCC検体では核が染色されたが(図3 A~C)、非CCC検体では全く免疫染色されないか、局所的且つ微かに核が染色されるだけであった(図3 D~G)。良性子宮内膜症検体ではHNF-1 の核染色は認められなかった(図3 H)。上皮性卵巣癌の起源と考えられる正常な卵巣表層上皮もまた、HNF-1 の核染色は認められなかった(図3 I)。

【0079】

CCCのHNF-1 免疫染色スコア(4.22 ± 0.85)は、非CCCのHNF-1 免疫染色スコア(0.31 ± 0.62)よりも有意に高かった(U検定により $P < 0.0001$)(図4)。HNF-1 の発現パターンの相違(HNF-1 発現の高低)は、患者の年齢や組織分化度と関連しなかった(表3)。早期FIGO期(I、II期)と進行期(III、IV期)とのHNF-1 の発現パターンの差についてのP値は有意であるが(χ^2 検定による $P=0.041$)(表3)、本発明者らは、この有意性はCCCでは早期の(I、II期)FIGO期をとるものが多く、かつCCCのHNF-1 免疫染色スコアは非CCCより高いためであると考えた。実際、初期CCC(4.16 ± 0.57 、18症例)と進行期CCC(4.50 ± 0.99 、4症例)とにHNF-1 スコアの有意差は認められなかった(U検定による $P=0.670$)。従って、免疫染色スコアとFIGO期との間に本質的な関連性は認められなかった。

10

【0080】

【表 3】

	HNF-1 β 高発現群			HNF-1 β 低発現群		P 値
	n	(スコア 3-5)	(スコア 0-2)			
全患者数	83	22 (27%)	61 (73%)			
年齢						
<60	57	15 (26%)	42 (74%)			
≥ 60	26	7 (27%)	19 (73%)			0.953
組織型						
明細胞	22	21 (95%)	1 (5%)			
漿液性	39	0 (0%)	39 (100%)			
粘液性	11	0 (0%)	11 (100%)			
類子宮内膜性	11	1 (9%)	10 (91%)			< 0.0001
組織分化						
高い	41	11 (27%)	30 (73%)			
中程度	27	8 (30%)	19 (70%)			
低い	15	3 (20%)	12 (80%)			0.793
FIGO 期						
I / II	53	18 (34%)	35 (66%)			
III / IV	30	4 (13%)	26 (87%)			0.041

10

20

30

* χ^2 検定

【実施例 4】 RNA干渉による HNF-1 発現の減少

【0081】

CCCにおけるHNF-1 の発現亢進が生物学的に有意であることを調べるために、RNAiを用いたHNF-1 発現の減少による機能解析を行った。定量RT-PCRを利用して、siRNAの、TOV-21G卵巣明細胞腺癌細胞株におけるラミンおよびHNF-1 mRNAの内因性レベルを減少させる能力を検定した(図5A)。Elbashirら(Elbashir SM, et al., Nature 2001, 411:494-498)が使用したものと同一の配列を有するラミンsiRNAにより、トランスフェクション試薬のみで処理した細胞と比較してラミンmRNA発現レベルは $44 \pm 6\%$ まで有意に減少したが、HNF-1 mRNAの発現は減少しなかった。HNF-1 siRNAにより、トランスフェクション試薬のみで処理した細胞と比較してHNF-1 mRNA発現レベルは27~45%まで有意に減少したが、ラミンmRNAの発現は減少しなかった。従って、siRNAの使用によって、TOV-21G細胞株における遺伝子特異的サイレンシングが誘導された。

40

【0082】

次に、免疫プロット分析によって、siRNAはラミンまたはHNF-1 タンパク質の発現をも減少させるかどうかを検定した(図5B)。ラミンsiRNAにより、ラミンタンパク質発現

50

が減少した。HNF-1 siRNAによりHNF-1 タンパク質発現が時間経過とともに減少し、HNF-1 タンパク質のバンド強度はトランスフェクションから36時間後にほぼバックグラウンドレベルに達した。ラミン siRNAまたはHNF-1 siRNAは、それぞれラミンタンパク質またはHNF-1 タンパク質を減少させ、TOV-21Gが内因的に発現しないルシフェラーゼを標的とするsiRNAは、いかなるタンパク質発現も変化させなかった。

[実施例5] HNF-1 発現の減少による卵巣明細胞腺癌細胞のアポトーシスの誘導

【0083】

HNF-1 siRNAでトランスフェクトされたTOV-21G細胞は、高頻度で培養皿から剥離し、培養培地中に浮遊し、浮遊細胞はアポトーシスを連想させる円形の縮んだ形態を示すことが観察された。一方、コントロールとしてラミンsiRNAでトランスフェクトした細胞は、浮遊やこれらの形態的变化が認められなかった。HNF-1 発現の減少によりTOV-21G細胞のアポトーシスが誘導されたかどうかを調べるために、TUNELおよびFACS分析を行なった。TUNEL分析により、HNF-1 siRNAでトランスフェクトした接着TOV-21G細胞の $9.2 \pm 2.2\%$ に、トランスフェクション開始から24時間後アポトーシスが起こることが示された。アポトーシス細胞の比率は、ラミンsiRNAでトランスフェクトしたコントロール細胞の比率($2.9 \pm 1.0\%$)より有意に高かった(U検定による $P < 0.001$) (図6A)。

10

【0084】

図6Bは、FACS分析によるTOV-21G細胞の細胞周期プロフィールに対するHNF-1 siRNAの経時的な効果を示す。細胞をラミンsiRNAまたは緩衝液のみで処理した場合、実験期間を通して、アポトーシス細胞に特徴的な、サブG1ピークに占める細胞比率が変化しなかった。一方、HNF-1 siRNAで処理した細胞では、トランスフェクション開始から12時間後に、サブG1ピークの有意な増加が認められた。HNF-1 siRNA処理細胞におけるサブG1ピークの比率は段階的に増加し、トランスフェクション開始から24時間後に23.0%に達した。

20

【0085】

合成したHNF-1 siRNAが培養細胞に予期せぬ毒性を示す可能性を除外するために、内因性HNF-1 発現を示さないHeLa細胞のFACS分析を行った。HeLa細胞ではHNF-1 mRNA (データ示さず) やHNF-1 タンパク質 (図5C) の発現が認められなかった。ラミンsiRNAによりHeLa細胞に含まれるラミンタンパク質含有量は減少したので、HeLa細胞でRNAi機構が作用したことが示された (図5C)。トランスフェクションから24時間後に行ったFACS分析により、HNF-1 siRNA処理細胞のサブG1ピークとラミンsiRNA処理細胞のサブG1ピークとの間に有意差は認められなかった (図6B)。従って、この所見により、合成したHNF-1 siRNAは非特異的な副作用は無く、HNF-1 mRNAの分解およびそれに引き続くHNF-1 タンパク質の減少によって、HNF-1 siRNAでトランスフェクトしたTOV-21G細胞がアポトーシス細胞死を引き起こされることが示された。

30

【0086】

本発明者らはオリゴヌクレオチドアレイを使用した卵巣癌細胞株の発現分析を行った結果、卵巣明細胞腺癌細胞株においてHNF-1 の発現が亢進していることを見出した。さらに、本発明者らは、多様な臨床病理学的特徴をもつ手術切除検体を使用することで、タンパク質レベルでのHNF-1 発現の発現亢進が、臨床進行期または組織の分化度に無関係に卵巣CCCに非常に強く関連することを見出した。分析した95%を超えるCCC検体で(22症例のうち21症例)、25%超のHNF-1 陽性癌細胞が認められたのに対して、2%未満の非CCC検体でしか(61症例のうち1症例)、25%超のHNF-1 陽性癌細胞が認められなかった。子宮内膜症はCCCと高度に関連し(Ogawa S, et al., Gynecol Oncol 2000, 77:298-304)、CCCの前駆的病変と考えられているので(Feeley KM & Wells M, Histopathology 2001, 38:87-95)、良性子宮内膜症検体または正常な卵巣でHNF-1 免疫染色が認められなかったことは興味深い。免疫組織染色の結果は、HNF-1 が卵巣CCCの有用な分子マーカーであることを意味する。特に細胞診断において、HNF-1 免疫染色はこれまでの標準的なパパンニコウ染色では困難であった卵巣CCC細胞を他の組織型と区別する優れた方法である。

40

【0087】

50

また、RNAiを使用したHNF-1 の機能解析により、HNF-1 発現がCCC細胞の生存に不可欠であることが示唆された。HNF-1 のドミナントネガティブ変異体を用いた抑制によりインスリノーマ細胞のアポトーシスが誘導されるという証拠は本発明者らの所見を支持している (Wobser H, Dussmann H, et al., J Biol Chem 2002, 277:6413-6421)。

【0088】

結論として、本発明者らは卵巣CCCで優先的に発現される一連の遺伝子を見出した。さらにHNF-1 発現がCCCと強く関連し、その細胞生存に不可欠であることも見出された。本発明で見出された遺伝子群は、CCCの起源、形態学、および卵巣癌の標準的治療への耐性を含むCCCの特異な性質を明白にするための有用な手がかりであると考えられる。

【図面の簡単な説明】

10

【0089】

【図1】明細胞腺癌と非明細胞腺癌で発現が異なる遺伝子を示す図および写真である。28種の遺伝子がU検定により $P < 0.05$ で有意に発現レベルが3倍以上増減した。得られたビジュアルマップ中の各カラーパッチは、緑色(最低)から鮮赤色(最高)までの11細胞株サンプルにおける遺伝子の発現レベルを示している。Genbankアクセッション番号、遺伝子記号、遺伝子座、遺伝子の説明、および変化の倍数を示す。スケールバーは、全サンプルの発現レベルの中央値に対する任意の所与の遺伝子の増加(赤)または減少(緑)を反映する。サンプルを以下のように分類する。C=卵巣明細胞癌、E=類子宮内膜腺癌、M=粘液性腺癌、S=漿液性腺癌。

【図2】卵巣癌細胞株における定量RT-PCR分析および免疫プロット分析を示す図および写真である。A: HNF-1 の遺伝子発現レベル。各サンプルにおいて発現レベルをGAPDH mRNAで標準化した。BおよびC: HNF-1 タンパク質の免疫プロット分析(B)。各細胞溶解物(20 μ g)を、抗HNF-1 抗体を使用して分析した。矢印は、正常なHNF-1 アイソフォームを示す。各レーンにローディングされたタンパク質量が等しいことを確認するため、抗 α -チューブリン抗体でリプローブした(C)。これらの細胞株の略称(C1、C2、C3、C4、E1、M1、M2、M3、S1、S2、およびS3)および細胞株の組織型を表1に示す。

20

【図3】手術切除上皮性卵巣癌検体におけるHNF-1 タンパク質発現の免疫組織染色を示す写真である。卵巣の明細胞腺癌(A: 症例26、B: 症例8、C: 症例15)、漿液性腺癌(D: 症例35、E: 症例59)、類内膜腺癌(F: 症例18)、および粘液性腺癌(G: 症例81)のパラフィン包埋サンプルに対する免疫組織染色を、HNF-1 に対する抗体を使用して行った。卵巣子宮内膜症(H)および正常な卵巣表層上皮(I)もまた、同一の抗体で免疫染色を行った。明細胞腺癌は、HNF-1 について核に強い染色が認められた。倍率: A - H ; 200倍、I ; 400倍。

30

【図4】HNF-1 の免疫組織染色と組織型との関係を示す図である。HNF-1 免疫染色スコアと組織型との関係を示す箱ヒゲ図。ボックスは、50パーセントイル(中央値)を挟んで25パーセントイルから75パーセントイルを含む。5パーセントイルおよび95パーセントイルは上下の として、10パーセントイルおよび90パーセントイルはヒゲ(whisker cap)として示す。明細胞腺癌の免疫染色スコアは、他の組織型のそれよりも有意に高かった(U検定による $P < 0.0001$)。

【図5】HeLaおよびTOV-21G卵巣明細胞腺癌細胞におけるsiRNAの効果を示す図および写真である。A: リアルタイム定量RT-PCR分析によって測定したラミンおよびHNF-1 の遺伝子発現レベル。緩衝液(PBS+トランスフェクション試薬)、ルシフェラーゼsiRNA、およびラミンsiRNAでトランスフェクションしたTOV-21G細胞を、トランスフェクション開始から24時間後に分析した。HNF-1 siRNAトランスフェクション細胞を、トランスフェクション開始から12時間後、24時間後、および36時間後に分析した。各サンプルにおいて発現レベルをGAPDH mRNAで標準化した。3回行ないその平均をとった。エラーバーは標準偏差を示している。* * は、緩衝液のみと比較して有意に減少したことを示す(U検定による $P < 0.001$)。BおよびC: トランスフェクトしたTOV-21G(B)およびHeLa(C)細胞におけるラミンおよびHNF-1 タンパク質の免疫プロット分析。各細胞系統溶解物(20 μ g)を、抗ラミン抗体および抗HNF-1 抗体を用いて分析した。各レーンにローディングされた全タ

40

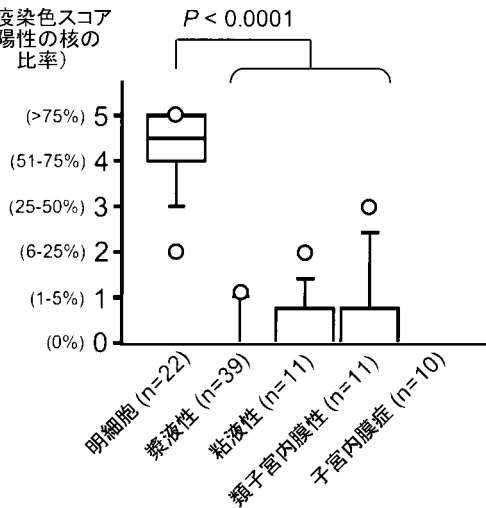
50

ンパク質質量が等しいことを確認するため、抗-チューブリン抗体でリプローブした。

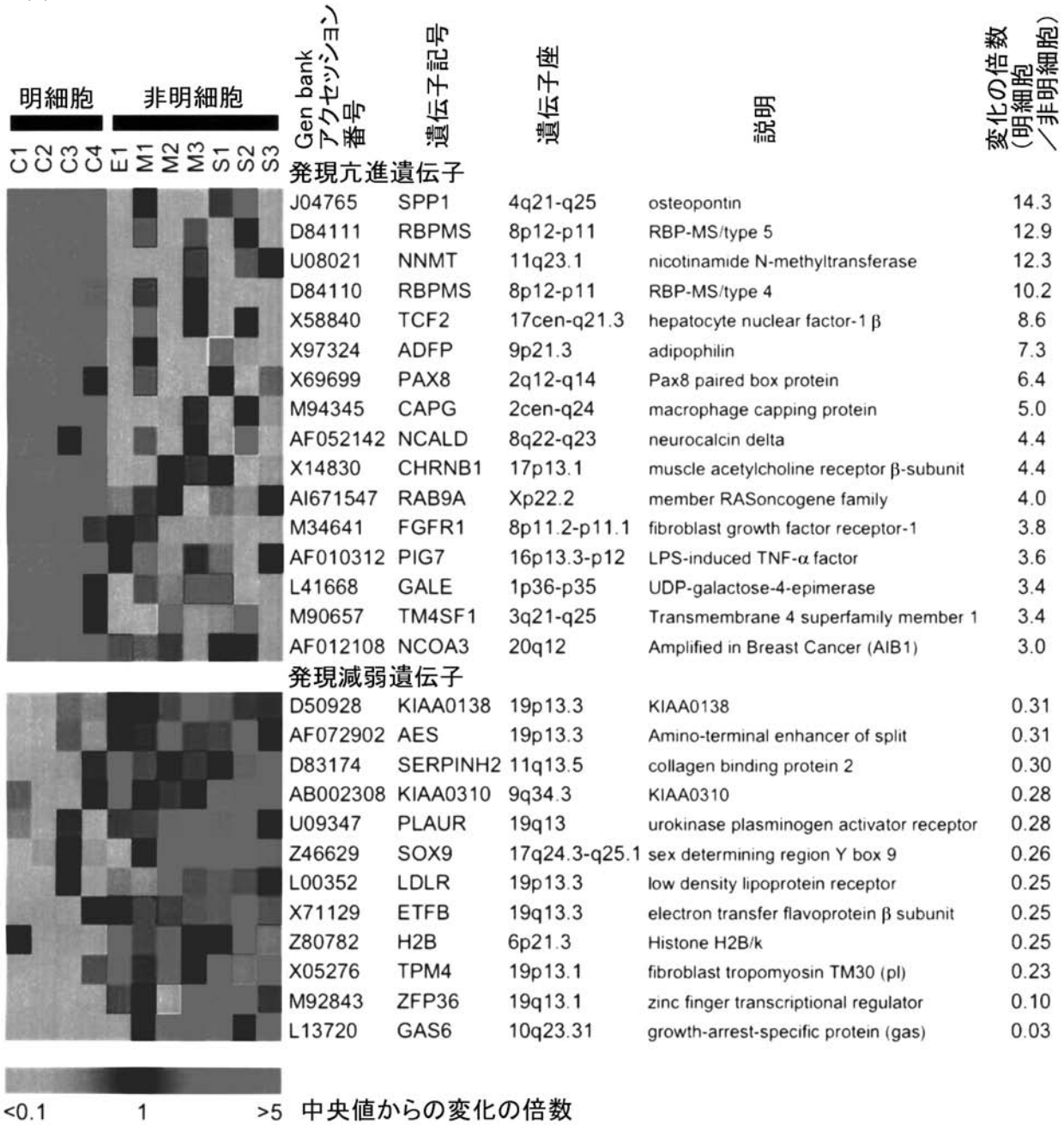
【図6】RNAiを使用したTOV-21G卵巣明細胞腺癌細胞におけるHNF-1 発現の減少によるアポトーシスの誘導を示す図および写真である。A：TOV-21G細胞を、HNF-1 およびラミンのsiRNAでトランスフェクトした。トランスフェクション開始から24時間後に、FITC放射を使用したTUNEL法によってアポトーシスを検出した。TUNEL陽性値の比率は各スライドにつき10視野の合計を3領域評価し独立した3回の実験で得た結果の平均および標準偏差に対応する。B：アポトーシス細胞を、緩衝液（PBS+トランスフェクション試薬）、ラミンsiRNA、およびHNF-1 siRNA（上の4列）を使用したトランスフェクションの開始から6、12、18、および24時間後にFACS分析によって評価した。値は、サブG1 DNA含有量を含む細胞の比率を示す。独立した3回の実験で各実験につき3回ずつ測定した。コントロールとして、内因性HNF-1 発現を示さないHeLa細胞に対しsiRNAをトランスフェクションし、24時間後にFACS分析によってアポトーシス細胞の割合を評価した。

【図4】

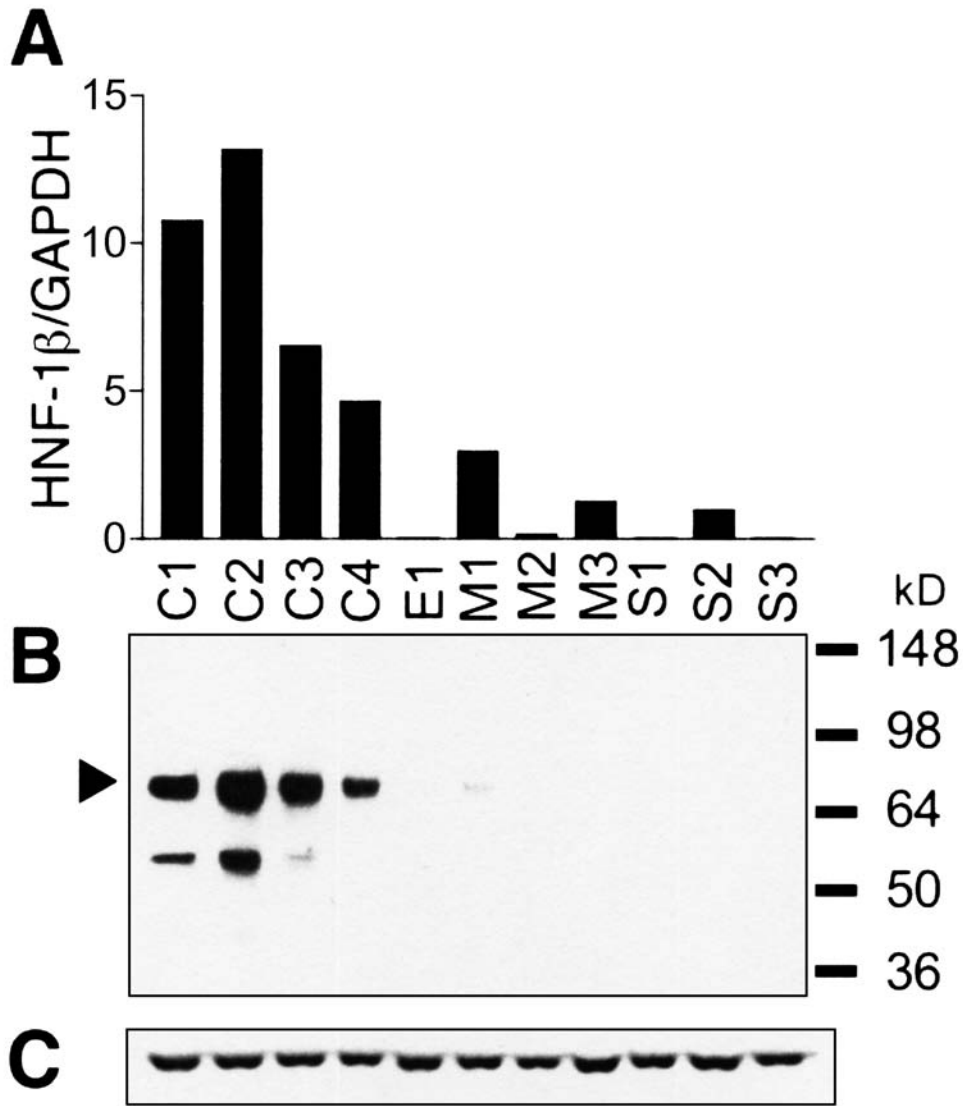
免疫染色スコア
(陽性の核の
比率)



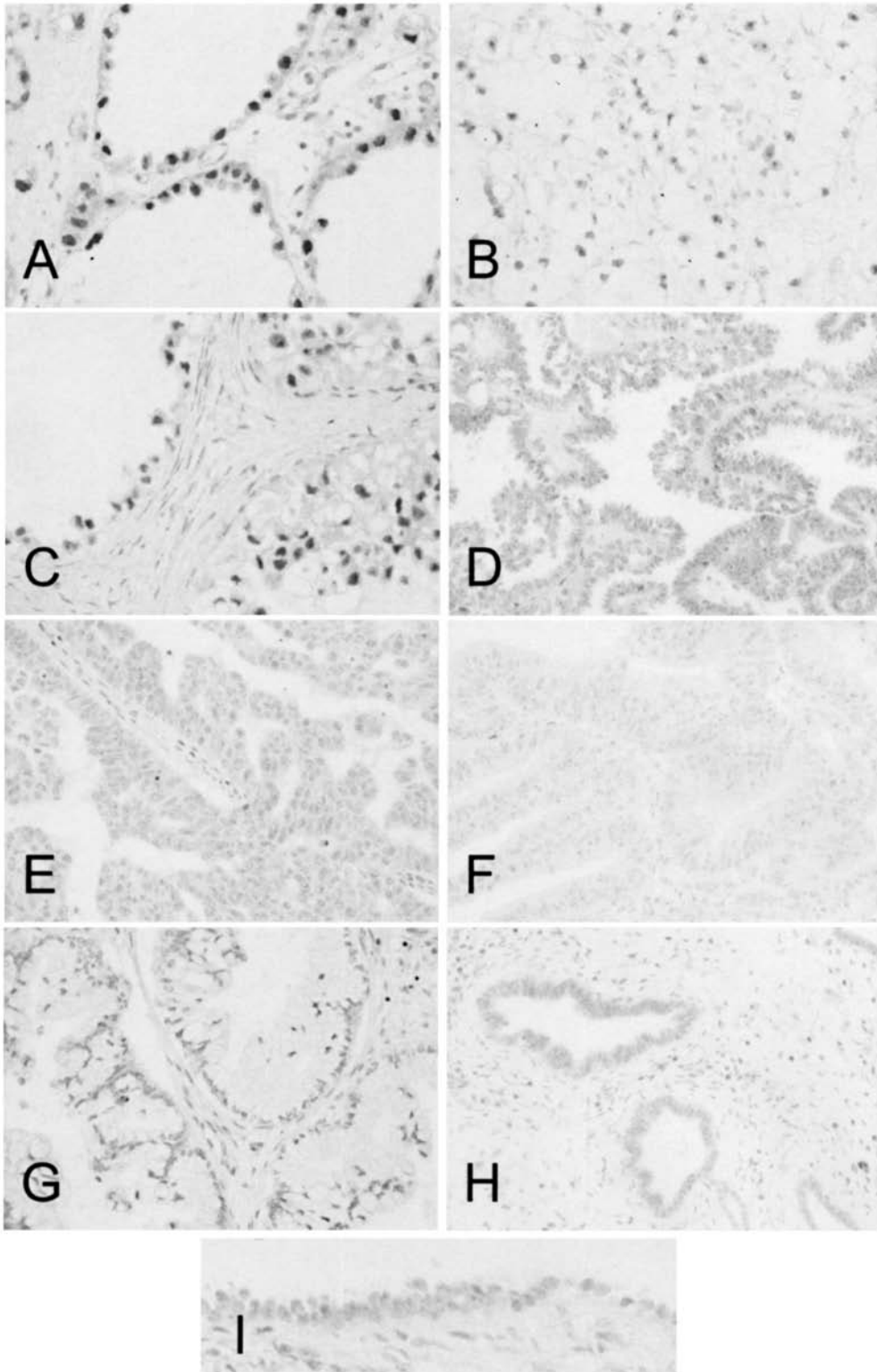
【 図 1 】



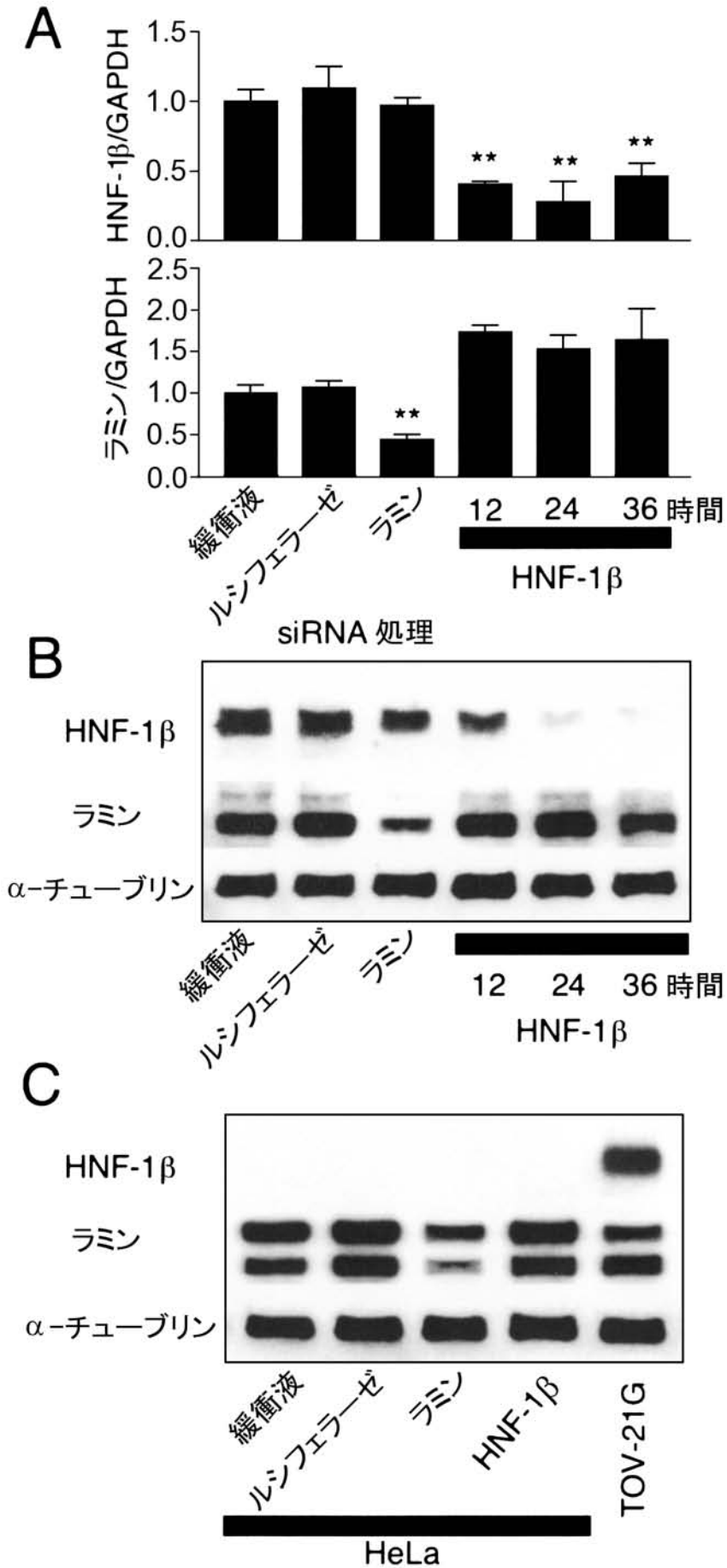
【 図 2 】



【 図 3 】

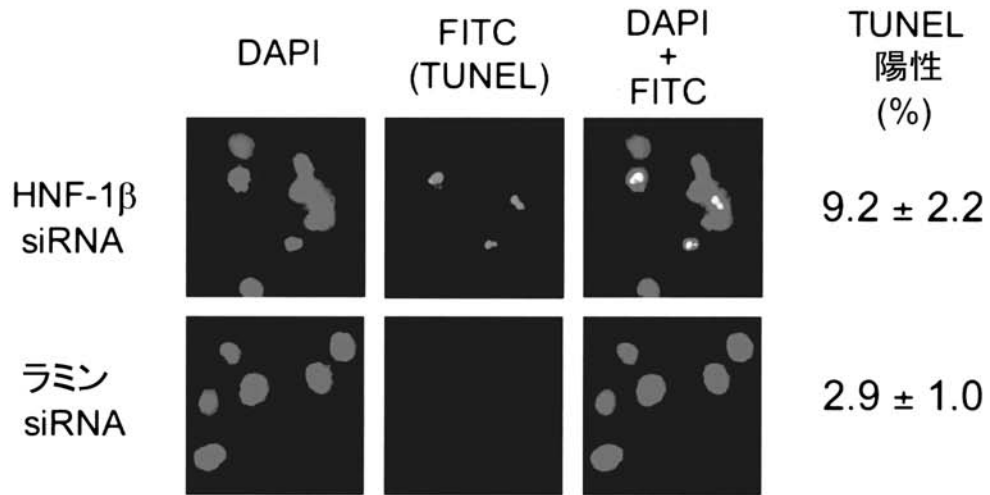


【 図 5 】

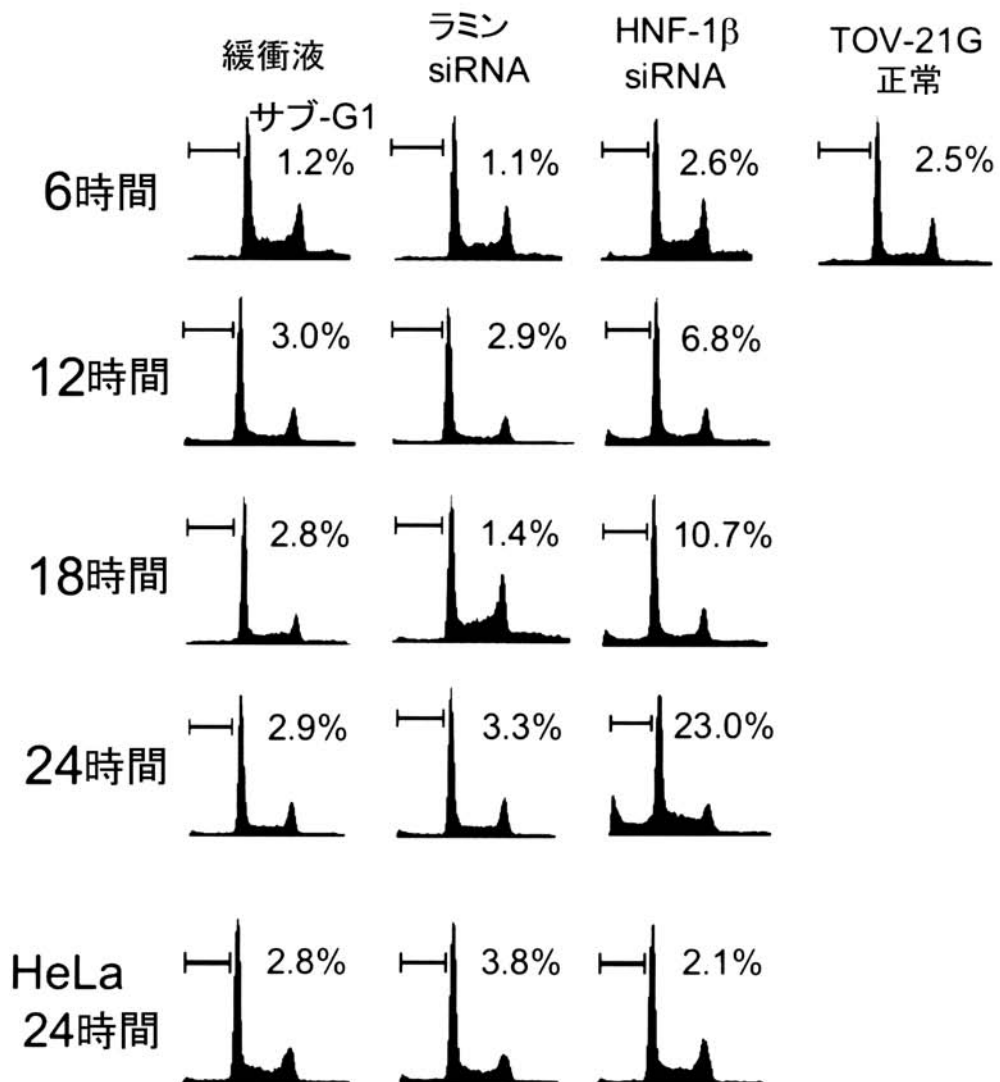


【図6】

A



B



【配列表】

2005073548000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	D
	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 坂元 亨宇

東京都新宿区信濃町三十五番地 慶應義塾大学内

(72)発明者 太田 力

東京都中央区築地五丁目一番一号 国立がんセンター内

(72)発明者 廣橋 説雄

東京都中央区築地五丁目一番一号 国立がんセンター内

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BA14 BB01 BB14 BB20 BB24 BB50 BB51 CB02
 DA12 DA13 DA14 DA36 FA11 FA16 FB01 FB02 FB03 FB07
 FB13 GB02 GC15
 4B024 AA01 AA11 AA12 CA01 CA04 CA11 CA12 DA03 GA11 GA18
 HA12 HA15
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ53 QQ79 QR32 QR35 QR55 QR77 QS03
 QS25 QS33 QS34 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	利用HNF-1β检测，治疗和筛选卵巢透明细胞腺癌的治疗药物		
公开(公告)号	JP2005073548A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003306818	申请日	2003-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	国立癌症中心总裁		
申请(专利权)人(译)	国立癌症中心总裁 药品和医疗器械局		
[标]发明人	土谷 聡 坂元 亨宇 太田 力 廣橋 説雄		
发明人	土谷 聡 坂元 亨宇 太田 力 廣橋 説雄		
IPC分类号	G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/574.D C12N15/00.A C12N15/00.G C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BA14 2G045/BB01 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB02 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB13 2G045/GB02 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用HNF（肝细胞核因子）-1β基因和编码该基因的蛋白质检查卵巢透明细胞腺癌的方法，并提供筛选该疾病的治疗方法。解决方案：用寡核苷酸阵列分析卵巢透明细胞腺癌（CCC）细胞和非CCC细胞之间表达水平差异的基因，发现仅在CCC细胞中表达和激活的HNF-1β基因。通过免疫印迹分析方法和免疫结构染色方法证实HNF-1β基因在mRNA水平和蛋白质水平均表达和激活。当用RNAi检查CCC细胞中HNF-1β表达的显著性时，澄清了HNF-1β的减少诱导了CCC的凋亡样细胞死亡。从以上结果可以看出，HNF-1β可用于诊断CCC和筛选治疗疾病的药物。 ㄩ

	n	HNF-1β 高発現群		HNF-1β 低発現群		P 値
		スコア 3-5	(%)	スコア 0-2	(%)	
全患者数	83	22	(27%)	61	(73%)	
年齢						
<60	57	15	(26%)	42	(74%)	0.953
≥60	26	7	(27%)	19	(73%)	
組織型						
明細胞	22	21	(95%)	1	(5%)	< 0.0001
漿液性	39	0	(0%)	39	(100%)	
粘液性	11	0	(0%)	11	(100%)	
類子宮内膜性	11	1	(9%)	10	(91%)	
組織分化						
高い	41	11	(27%)	30	(73%)	0.793
中程度	27	8	(30%)	19	(70%)	
低い	15	3	(20%)	12	(80%)	
FIGO 期						
I / II	53	18	(34%)	35	(66%)	0.041
III / IV	30	4	(13%)	26	(87%)	

*χ² 検定
 [実施例 4] RNA干渉による HNF-1β 発現の減少
 [0 0 8 1]