

(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2006-340722

(P2006-340722A)

(43) 公開日 平成18年12月21日(2006.12.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	

審査請求 未請求 請求項の数 168 O L 外国語出願 (全 160 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-203083 (P2006-203083)
 (22) 出願日 平成18年7月26日 (2006.7.26)
 (62) 分割の表示 特願2006-67928 (P2006-67928) の分割
 原出願日 平成12年4月7日 (2000.4.7)
 (31) 優先権主張番号 60/128,676
 (32) 優先日 平成11年4月9日 (1999.4.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/449,589
 (32) 優先日 平成11年11月29日 (1999.11.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501394136
 ボード オブ トラスティーズ オブ ザ
 ユニヴァースティ オブ イリノイ
 アメリカ合衆国 61801 イリノイ州
 アーバナ サウス ライト ストリート
 506 ヘンリー アドミニストレイシ
 ョン ビルディング 352
 (74) 代理人 100083806
 弁理士 三好 秀和
 (72) 発明者 チャン、 ベイデー
 アメリカ合衆国 60148 イリノイ州
 ロンバード カンプリア レーン 11
 16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 p 2 1 により調節される遺伝子の発現を同定および調節するための試薬および方法

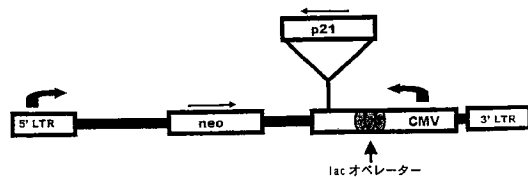
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】細胞周期進行、成長促進段階、アポトーシスの調節、細胞の老化、および加齢に關与する遺伝子を同定するための方法および試薬、および p 2 1 によって調節される、細胞の老化を阻害または増強する化合物を同定する方法を提供する。

【解決手段】誘導性 p 2 1 遺伝子を含む哺乳動物繊維肉腫細胞。該細胞を使用した哺乳類細胞での老化を阻害する化合物の同定方法。老化を阻害する化合物と細胞を接触させることによる笹井棒の老化、加齢関連疾患または加齢関連遺伝子産物を阻害する方法。

【選択図】 図 1

図 1. IPTG 調節レトロウイルスベクター-LNp21C03



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p 2 1 が線維肉腫細胞中でそれによって発現される、哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含する、組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 2】

組換え発現構築物からの p 2 1 の発現が、組換え細胞を、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤と接触させることによって、またはこのようなプロモーターから転写を阻害する剤を除去することによって仲介されることを特徴とする誘導性異型プロモーターによって転写で制御される哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含する組換え哺乳類線維肉腫細胞。

10

【請求項 3】

ヒト HT 1 0 8 0 である請求項 1 または 2 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 4】

哺乳類 p 2 1 遺伝子が、ヒト p 2 1 遺伝子またはそれらの CDK - 結合断片である、請求項 1 または 2 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 5】

転写を哺乳類プロモーターによって制御される哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物が、ラクトースレプレッサー応答性プロモーター要素を包含し、そして p 2 1 の転写が、該ラクトースレプレッサー応答性プロモーター要素によって制御され、そして組換え発現構築物からの p 2 1 の発現が、組換え細胞を、ラクトースレプレッサー特異的誘導剤に接触させることによって仲介されることを特徴とする、さらに、細菌のラクトースレプレッサーをコードする組換え発現構築物を包含する、請求項 2 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

20

【請求項 6】

細胞が、ヒト HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞である、請求項 5 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 7】

細菌のラクトースレプレッサーをコードする組換え発現構築物が、3' S S である、請求項 5 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 8】

哺乳類 p 2 1 遺伝子が、ヒト p 2 1 遺伝子またはそれらの CDK - 結合断片である、請求項 5 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

30

【請求項 9】

第二の発現構築物が LN p 2 1 C O 3 である、請求項 5 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 10】

ラクトースレプレッサー特異的誘導剤が、 β -ガラクトシドである、請求項 5 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

【請求項 11】

A T C C 受託番号 _____ (p 2 1 - 9) によって同定される請求項 5 に記載の組換え哺乳類線維肉腫細胞。

40

【請求項 12】

以下の段階を包含することを特徴とする、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 哺乳類細胞中で p 2 1 の発現を生じる ;

(b) その発現が、p 2 1 によって調節される細胞の遺伝子の発現における変化について、化合物の存在下で細胞をアッセイする ; および

(c) サブパート (b) の細胞の遺伝子の発現が、化合物の存在下でより少ない範囲まで変化される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節の阻害剤として化合物を同定する。

50

【請求項 13】

哺乳類細胞が請求項 2 に記載の細胞であり、p 2 1 発現が、細胞を誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤に接触させるか、またはプロモーターから転写を阻害する剤を除去することによって発生される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

細胞の遺伝子の発現が p 2 1 により抑制される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 15】

細胞の遺伝子が表 I に同定される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 16】

細胞の遺伝子の発現が p 2 1 により誘導される、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 17】

細胞の遺伝子が表 I I に同定される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 18】

細胞の遺伝子の発現が免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞の遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてのアッセイによって検出される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 20】

細胞の遺伝子の発現が、相補的核酸に対しハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 1 2 に記載の方法。

20

【請求項 21】

発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についての、プロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物を包含し、p 2 1 の発現が、それにより哺乳類細胞中で実験的に誘導されることを特徴とする哺乳類細胞。

【請求項 22】

哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物が、誘導性異種プロモーターの転写制御下にあり、組換え発現構築物から得た p 2 1 の発現が、組換え細胞を、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤に接触させることによるか、またはこのようなプロモーターから転写を阻害する剤を除去することによって仲介される請求項 2 1 に記載の哺乳類細胞。

30

【請求項 23】

レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ベータ・ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリ性ホスファターゼをコードする請求項 2 1 に記載の哺乳類細胞。

【請求項 24】

レポーター遺伝子は、その発現が、p 2 1 により抑制される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある請求項 2 1 に記載の哺乳類細胞。

【請求項 25】

哺乳類遺伝子プロモーターが、表 I に同定される哺乳類遺伝子のプロモーターである、請求項 2 4 に記載の哺乳類細胞。

40

【請求項 26】

レポーター遺伝子は、その発現が、p 2 1 により誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 2 1 に記載の哺乳類細胞。

【請求項 27】

哺乳類遺伝子プロモーターが、表 I I に同定される哺乳類遺伝子のプロモーターである、請求項 2 6 に記載の哺乳類細胞。

【請求項 28】

プロモーターが、遺伝子 O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1

50

、 A I K 1、 C E N P - A、 C E N P - F、 M A D 2、 B U B R 1、 M C A K、 H S E T、 C H L 1、 サイモポイエチン、 M P P 2、 M P P 5、 C D C 4 7 / M C M 7、 C D C 2 1 / M C M 4、 D N A リガーゼ I、 D N A ポリメラーゼ、 R a d 5 4、 エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、 P L K 1、 D H F R または シトロンキナーゼ から得られることを特徴とする、発現が p 2 1 によって阻害される哺乳類遺伝子についての、プロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする、組換え発現構築物を包含することを特徴とする哺乳類細胞。

【請求項 2 9】

プロモーターが、遺伝子血清アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、 M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、 p 6 6 ^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、または カテプシン B から得られることを特徴とし、発現が p 2 1 によって誘導される哺乳類遺伝子についての、プロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含する哺乳類細胞。

10

【請求項 3 0】

以下の段階を包含する、細胞の遺伝子発現の p 2 1 - 仲介調節を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在下で、請求項 2 1 に記載の哺乳類細胞における p 2 1 の発現を生じること；

20

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の存在下でより小さな範囲に変化される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 3 1】

レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって抑制される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

哺乳類遺伝子プロモーターが、表 I に同定される哺乳類遺伝子のプロモーターである、請求項 3 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

レポーター遺伝子は、その発現が p 2 1 により誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

哺乳類遺伝子プロモーターが、表 I I に同定される哺乳類遺伝子のプロモーターである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

レポーター遺伝子の発現が、免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

レポーター遺伝子の発現が、レポーター遺伝子産物の活性についてアッセイすることによって検出される、請求項 3 0 に記載の方法。

40

【請求項 3 7】

レポーター遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 8】

以下の段階を包含する、細胞の遺伝子発現の p 2 1 - 仲介調節を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在下で、請求項 2 8 に記載の哺乳類細胞における p 2 1 の発現を生じること；

50

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の存在下でより小さな範囲に変化される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 3 9】

以下の段階を特徴とする、細胞の遺伝子発現の p 2 1 - 仲介調節を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在下で、請求項 2 9 に記載の哺乳類細胞における p 2 1 の発現を生じること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および 10

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の存在下でより小さな範囲に変化される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 4 0】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞における老化を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在および不在下で哺乳類細胞を剤で処理するか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) p 2 1 遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類細胞のアッセイを行うこと；および

(c) 化合物の不在でより化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子が、より小さな範囲に抑制されるか、または p 2 1 によって誘導される遺伝子が、より小さな範囲に誘導される場合に老化の阻害剤として化合物を同定すること。 20

【請求項 4 1】

哺乳類細胞が、p 2 1 によって誘導される遺伝子についてアッセイされる、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

遺伝子が表 I I に同定される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

哺乳類細胞が p 2 1 により抑制される遺伝子についてアッセイされる、請求項 4 0 に記載の方法。 30

【請求項 4 4】

遺伝子が表 I に同定される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

細胞の遺伝子の発現が免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 6】

細胞の遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてのアッセイにより検出される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 7】

細胞の遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 4 0 に記載の方法。 40

【請求項 4 8】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞中の老化を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 細胞は、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を包含することを特徴とする、化合物の存在または不在下にある哺乳類細胞を、剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養させること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で小さな程 50

度に変化される場合に、老化の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 49】

レポーター遺伝子が、その発現が p 21 によって誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

哺乳類遺伝子プロモーターが、表 I I に同定される哺乳類遺伝子のプロモーターである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

レポーター遺伝子は、その発現が p 21 により抑制される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 48 に記載の方法。

10

【請求項 52】

哺乳類遺伝子プロモーターが、表 I に同定される哺乳類遺伝子のプロモーターである、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 53】

細胞の遺伝子の発現が、免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 54】

細胞の遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてのアッセイにより検出される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 55】

細胞の遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 48 に記載の方法。

20

【請求項 56】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞での老化を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在下にある哺乳類細胞を、剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養させること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で小さな程度に変化される場合に、老化の阻害剤として化合物を同定すること。

30

【請求項 57】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞中の老化を阻害する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在下にある請求項 29 に記載の哺乳類細胞を、剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で該哺乳類細胞を培養させること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で小さな程度に変化される場合に、老化の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 58】

請求項 12 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

40

【請求項 59】

請求項 30 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

【請求項 60】

請求項 38 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

【請求項 61】

請求項 39 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

50

【請求項 6 2】

請求項 4 0 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

【請求項 6 3】

請求項 4 8 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

【請求項 6 4】

請求項 5 6 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

【請求項 6 5】

請求項 5 7 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞の老化を阻害する方法。

10

【請求項 6 6】

請求項 1 2 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

【請求項 6 7】

請求項 3 0 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

【請求項 6 8】

請求項 3 8 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

20

【請求項 6 9】

請求項 3 9 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

【請求項 7 0】

請求項 4 0 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

【請求項 7 1】

請求項 4 8 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

30

【請求項 7 2】

請求項 5 6 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

【請求項 7 3】

請求項 5 7 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、哺乳類細胞中の疾病関連遺伝子産物の産生を阻害する方法。

【請求項 7 4】

以下の段階を包含する、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節の効果を増強する化合物を同定する方法。

(a) 哺乳類細胞中で p 2 1 の発現を生じること ;

40

(b) その発現が、p 2 1 で誘導または抑制される細胞の遺伝子の発現における変化について、化合物の存在および不在下にある細胞のアッセイを行うこと ; および

(c) サブパート (b) の細胞の遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で大きな範囲に誘導または抑制される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節のポテンシエーターとして化合物を同定すること。

【請求項 7 5】

哺乳類細胞が、請求項 2 に記載の細胞であり、p 2 1 発現が誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤と細胞を接触させることによって発生される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

50

細胞の遺伝子の発現が p 2 1 によって抑制される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

細胞の遺伝子が表 I に同定される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

細胞の遺伝子の発現が p 2 1 によって誘導される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 9】

細胞の遺伝子が表 I I に同定される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

細胞の遺伝子の発現、免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 7 4 に記載の方法

。

10

【請求項 8 1】

細胞の遺伝子の発現が細胞の遺伝子産物の活性についてのアッセイにより検出される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 2】

細胞の遺伝子の発現が相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 3】

p 2 1 は、その効果が細胞中の p 2 1 発現の最大効果より少ない範囲まで細胞中で産生される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 4】

20

以下の段階を包含する老化を増強する化合物を同定する方法。

(a) 細胞は、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を包含することを特徴とする、化合物の存在または不在下にある哺乳類細胞を、剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養させること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で大きな範囲に変化する場合に、老化のポテンシエーターとして化合物を同定すること。

【請求項 8 5】

30

哺乳類細胞が、請求項 2 に記載の細胞であり、老化が誘導性プロモーターから p 2 1 転写を誘導する誘導剤と細胞を接触させることによって発生される、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

遺伝子が表 I I に同定される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

レポーター遺伝子は、その発現が p 2 1 により抑制される哺乳類遺伝子についてのプロ

40

【請求項 8 9】

モーターの転写制御下にある、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 0】

遺伝子が表 I に同定される、請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 1】

レポーター遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてのアッセイにより検出される、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 2】

50

レポーター遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 3】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞における老化の誘導を促進する化合物を同定する方法。

(a) 哺乳類細胞を剤で処理するか、または化合物の存在下で老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) p 2 1 遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類細胞のアッセイを行うこと；および

(c) 化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子が、さらに抑制されるか、または p 2 1 によって誘導される遺伝子が、さらに誘導される場合に老化の誘導を促進する化合物を同定すること。

10

【請求項 9 4】

哺乳類細胞が、p 2 1 により誘導される遺伝子についてのアッセイをうける、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

遺伝子が表 I I に同定される、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

哺乳類細胞が、p 2 1 により抑制される遺伝子についてのアッセイをうける、請求項 9 3 に記載の方法。

20

【請求項 9 7】

遺伝子が表 I に同定される、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

細胞の遺伝子の発現が免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 9】

細胞の遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてのアッセイにより検出される、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

細胞の遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 9 3 に記載の方法。

30

【請求項 1 0 1】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞中の老化の誘導を促進する化合物を同定する方法。

(a) 細胞は、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を包含することを特徴とする、化合物の存在または不在下にある哺乳類細胞を、剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養させること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で大きな範囲に変化する場合に、老化の誘導を促進する化合物を同定すること。

40

【請求項 1 0 2】

レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

遺伝子が、表 I I に同定される請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

レポーター遺伝子は、その発現が p 2 1 により抑制される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にある、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

50

遺伝子が表 I に同定される、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

細胞の遺伝子の発現が免疫学上の試薬を使用して検出される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 107】

細胞の遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてアッセイすることによって検出される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 108】

細胞の遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成させることにより検出される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 109】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞における老化の誘導を促進する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在で請求項 28 に記載の哺乳類細胞を剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在でより、化合物の存在下でより大きな範囲に変化する場合に、老化の誘導を促進する化合物を同定すること。

【請求項 110】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞における老化の誘導を促進する化合物を同定する方法。

(a) 化合物の存在または不在で請求項 29 に記載の哺乳類細胞を剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在でより、化合物の存在下でより大きな範囲に変化する場合に、老化の誘導を促進する化合物を同定すること。

【請求項 111】

請求項 74 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含する、細胞中の老化を促進する方法。

【請求項 112】

細胞が、腫瘍細胞、増殖性細胞、または過剰増殖のため病原性であるか、あるいは疾病原因の細胞である、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

請求項 84 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、細胞中の老化を促進する方法。

【請求項 114】

細胞が、腫瘍細胞、増殖性細胞、または過剰増殖のため病原性であるかあるいは疾病原因の細胞である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

請求項 93 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、細胞中の老化を促進する方法。

【請求項 116】

細胞が、腫瘍細胞、増殖性細胞、または過剰増殖のため病原性であるかあるいは疾病原因である細胞である、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

請求項 101 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、細胞中の老化を促進する方法。

【請求項 118】

10

20

30

40

50

細胞が、腫瘍細胞、増殖性細胞、または過剰増殖のため病原性であるかあるいは疾病原因である細胞である、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

請求項 1 0 9 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、細胞中の老化を促進する方法。

【請求項 1 2 0】

細胞が、腫瘍細胞、増殖性細胞、または過剰増殖のため病原性であるかあるいは疾病原因である細胞である、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

請求項 1 1 0 の方法により生成される化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、細胞中の老化を促進する方法。 10

【請求項 1 2 2】

細胞が、腫瘍細胞、増殖性細胞、または過剰増殖のため病原性であるかあるいは疾病原因である細胞である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

以下の段階による方法で生成される、細胞の遺伝子発現の p 2 1 調節を阻害する化合物。

(a) 哺乳類細胞中の p 2 1 の発現を誘導すること；

(b) その発現が、p 2 1 によって調節される細胞の遺伝子の発現における変化について、化合物の存在または不在下にある細胞のアッセイを行うこと；および 20

(c) サブパート (b) の細胞の遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下でより少ない範囲に変化される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 - 仲介調節の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 1 2 4】

以下の段階による方法で生成される、細胞の遺伝子発現の p 2 1 調節を阻害する化合物。

(a) 化合物の存在または不在下で、請求項 2 1 に記載の哺乳類細胞中の p 2 1 の発現を生じること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および 30

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の存在下でより少ない範囲に変化される場合に、細胞の遺伝子発現の p 2 1 - 仲介調節の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 1 2 5】

以下の段階による方法で生成される、哺乳類細胞中の老化を阻害する化合物。

(a) 化合物の存在下にある哺乳類細胞を剤で処理するか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) p 2 1 遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類細胞のアッセイを行うこと；および

(c) 化合物の存在下で、p 2 1 により抑制される遺伝子が、より少ない範囲に抑制されるか、または p 2 1 により誘導される遺伝子が、より少ない範囲に誘導される場合に、老化の阻害剤として化合物を同定すること。 40

【請求項 1 2 6】

以下の段階による方法で生成される、哺乳類細胞における老化を阻害する化合物。

(a) 細胞が、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を包含することを特徴とする、化合物の存在または不在下で哺乳類細胞を剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の存在下でより少ない範囲に変化される場合 50

に、老化の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 1 2 7】

以下の段階による方法で生成される、哺乳類細胞における老化を増強する化合物。

(a) 哺乳類細胞中で p 2 1 の発現を生じること；

(b) その発現が、p 2 1 により誘導または抑制される細胞の遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) サブパート (b) の細胞の遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下でより大きな範囲に誘導または抑制される場合に、老化の阻害剤として化合物を同定すること。

【請求項 1 2 8】

以下の段階による方法で生成される、哺乳類細胞中の老化を増強する化合物。

(a) 化合物の存在下にある哺乳類細胞を剤で処理するか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) p 2 1 遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類細胞のアッセイを行うこと；および

(c) 化合物の存在下で、p 2 1 により抑制される遺伝子が、より大きい範囲に抑制されるか、または p 2 1 により誘導される遺伝子が、より大きな範囲に誘導される場合に、老化のポテンシエーターとして化合物を同定すること。

【請求項 1 2 9】

以下の段階による方法で生成される、哺乳類細胞における老化を増強する化合物。

(a) 細胞が、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を包含することを特徴とする、化合物の存在または不在下で哺乳類細胞を剤と接触させるか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) レポーター遺伝子の発現が、化合物の不在下でより化合物の存在下でより大きな範囲に変化する場合に、老化のポテンシエーターとして化合物を同定すること。

【請求項 1 3 0】

哺乳類細胞での p 2 1 発現を生じ、そして抗アポトーシスまたは有糸分裂因子を産生するのに十分な時間、細胞培養用培地中で細胞を培養する段階を包含することを特徴とする、哺乳類細胞から抗アポトーシスまたは有糸分裂因子を生じる方法。

【請求項 1 3 1】

哺乳類細胞が、請求項 2 に記載の哺乳類細胞であり、そして p 2 1 発現が、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤を含む培養用培地中で哺乳類細胞を培養するか、またはこのようなプロモーターからの転写を阻害する剤を除去することによって誘導される、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

哺乳類細胞によって生じた抗アポトーシスまたは有糸分裂性化合物が、その発現が p 2 1 によって誘導される化合物である、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

p 2 1 を発現する哺乳類細胞の成長によって調節される哺乳類細胞の培養用培地。

【請求項 1 3 4】

哺乳類細胞が、請求項 2 に記載の哺乳類細胞であり、そして p 2 1 発現が、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤を含む培養用培地中で哺乳類細胞を培養するか、またはこのようなプロモーターからの転写を阻害する剤を除去することによって誘導される、請求項 1 3 3 に記載の哺乳類細胞の培養用培地。

【請求項 1 3 5】

以下の段階を包含する、細胞周期進行に關与する遺伝子について富化される複数の核酸種を得る方法。

10

20

30

40

50

(a) 哺乳類細胞での p 2 1 の発現を誘導すること ;

(b) p 2 1 が段階 (a) により誘導される前および後に、哺乳類細胞から細胞の m R N A を得ること ;

(c) p 2 1 が誘導される前に細胞から得られた細胞の m R N A の発現を、p 2 1 が誘導された後に細胞の m R N A の発現と比較すること ; および

(d) p 2 1 発現が誘導された後に、その発現が、細胞中で抑制される遺伝子について富化された複数の核酸種を得ること。

【請求項 1 3 6】

以下の段階を包含する、パラ分泌機能を有する分泌タンパク質、ならびに老化および加齢関連疾病に關与するタンパク質をコードする遺伝子について富化される複数の核酸種を得る方法。

10

(a) 哺乳類細胞での p 2 1 の発現を誘導すること ;

(b) p 2 1 が誘導される前および後に、哺乳類細胞から細胞の m R N A を得ること ; および

(c) p 2 1 が誘導された後に、その発現が細胞中で誘導される遺伝子について富化された複数の核酸種を得ること。

【請求項 1 3 7】

以下の段階を包含する、細胞の老化のマーカである複数の細胞の遺伝子を同定する方法。

(a) 哺乳類細胞の第一の集団での p 2 1 の発現、および哺乳類細胞の第二の集団での静止を誘導すること ;

20

(b) 細胞の各集団から m R N A を得ること ;

(c) p 2 1 が誘導される前および後の第一の集団中の細胞での遺伝子発現のパターンを、細胞が静止になる前および後の第二の集団中の細胞での遺伝子発現のパターンと比較すること ;

(d) p 2 1 誘導細胞で強力に誘導される複数の遺伝子を、静止している細胞で強力に誘導される複数の遺伝子と比較すること ; および

(e) 静止している細胞で強力に誘導されはしない p 2 1 誘導細胞で強力に誘導される遺伝子を同定すること。

【請求項 1 3 8】

30

結合性組織成長因子、血清アミロイド A、インテグリン 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、M a c 2 結合タンパク質、または組織トランスグルタミナーゼである遺伝子から構成される群から選択される遺伝子の発現を検出する段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の老化を検出する方法。

【請求項 1 3 9】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞中で老化を誘導する化合物を同定する方法。

(a) その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子の発現について、化合物の存在および不在下で哺乳類細胞のアッセイを行うこと ; および

(b) 化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子の発現が、細胞中で抑制されるか、p 2 1 によって誘導される遺伝子の発現が、細胞中で増加されるときに、老化を誘導する化合物を同定すること。

40

【請求項 1 4 0】

遺伝子が p 2 1 によって誘導される、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

遺伝子が表 I I に同定される、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

遺伝子が p 2 1 によって抑制される、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

遺伝子が表 I に同定される、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

50

遺伝子の発現が免疫学上の試薬を用いて検出される、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

遺伝子の発現が細胞の遺伝子産物の活性についてアッセイすることによって検出される、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

遺伝子の発現が相補的核酸にハイブリッド形成することによって検出される、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

サブパート (a) でのアッセイが抗癌剤の存在で行われる、請求項 1 3 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 8】

哺乳類細胞が誘導性 p 2 1 遺伝子を包含し、そしてサブパート (a) でのアッセイが、多量の p 2 1 発現を誘導する剤の存在で行われ、それにより p 2 1 誘導の範囲が、p 2 1 によって阻害される遺伝子の完全な阻害のためには不十分である、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

以下の段階を包含する、哺乳類細胞における老化を誘導する化合物を同定する方法。

(a) 細胞が、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を包含することを特徴とする、哺乳類細胞を化合物と接触させること；

20

(b) レポーター遺伝子の発現における変化について細胞のアッセイを行うこと；および

(c) 細胞が、化合物と接触される場合に、レポーター遺伝子の発現が、p 2 1 によって抑制される遺伝子からプロモーターの転写制御下にあるときに減少されるか、またはレポーター遺伝子の発現が、p 2 1 によって誘導される遺伝子の転写制御下にあるときに増加される場合に老化を誘導する化合物を同定すること。

【請求項 1 5 0】

レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって誘導される哺乳類細胞についてのプロモーターの転写抑制下にある、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

遺伝子が、表 I I に同定される、請求項 1 5 0 に記載の方法。

30

【請求項 1 5 2】

レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって抑制される哺乳類細胞についてのプロモーターの転写抑制下にある、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

遺伝子が、表 I に同定される、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

レポーター遺伝子の発現が、免疫学上の試薬を用いて検出される、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

レポーター遺伝子の発現が、細胞の遺伝子産物の活性についてアッセイすることによって検出される、請求項 1 4 9 に記載の方法。

40

【請求項 1 5 6】

レポーター遺伝子の発現が、相補的核酸にハイブリッド形成することによって検出される、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

その発現が p 2 1 によって阻害される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物。

【請求項 1 5 8】

プロモーターが、遺伝子 O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1

50

、 A I K 1、 C E N P - A、 C E N P - F、 M A D 2、 B U B R 1、 M C A K、 H S E T、 C H L 1、 サイモポイエチン、 M P P 2、 M P P 5、 C D C 4 7 / M C M 7、 C D C 2 1 / M C M 4、 D N A リガーゼ I、 D N A ポリメラーゼ、 R a d 5 4、 エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、 P L K 1、 D H F R または シトロンキナーゼ から得られたものである、請求項 1 5 7 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 1 5 9】

その発現が、 p 2 1 によって誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物。

【請求項 1 6 0】

プロモーターが、遺伝子血清アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、 M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、 p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から得られる、請求項 1 5 9 に記載の組換え発現構築物。

【請求項 1 6 1】

請求項 1 2 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 2】

請求項 3 0 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 3】

請求項 3 8 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 4】

請求項 3 9 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 5】

請求項 4 0 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 6】

請求項 4 8 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 7】

請求項 5 6 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする、哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【請求項 1 6 8】

請求項 5 7 の方法により生成される化合物と細胞を接触される段階を包含することを特徴とする、哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物の産生を阻害する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の背景)

本出願は、1999年11月29日に提出された米国特許出願番号第09/449,589号、および1999年4月9日に提出された米国特許出願番号第60/128,676号に対する優先権を主張し、その各々の開示は、ここに参照して明白に組込まれる。

【0 0 0 2】

1. (発明の分野)

本発明は、細胞の老化および老化に付随する細胞の遺伝子発現における変化に関する。

特に、本発明は、その発現が、老化の開始時に細胞中に誘導される細胞の遺伝子産物 p 2 1 によって調節される遺伝子の同定に関する。さらに詳細には、本発明は、その発現が、p 2 1 によって誘導または抑制されている遺伝子である細胞の老化のマーカーを提供する。本発明は、これらのマーカー遺伝子の抑制または誘導の阻害を検出することによって細胞の老化を阻害または増強する化合物を同定する方法を提供する。さらに提供されるのは、実験的に誘導性である p 2 1 をコードする組換え発現構築物を含有する組換え哺乳類細胞、および p 2 1 に調節される遺伝子についてのプロモーターの転写制御下にレポーター遺伝子を発現する組換え発現構築物を含有する組換え哺乳類細胞である試薬である。

【背景技術】

【0003】

2. (関連技術の要約)

p 2 1^{W A F 1 / C I P 1 / S D H} は、哺乳類細胞における成長停止および老化の重大なメディエーターである。p 2 1 は、サイクリン依存性キナーゼ (C D K) を結合および阻害するタンパク質 (Harper ら、Cell 75巻: 805 - 816 頁、1993 年) として、野生型 p 5 3 により上方調節された遺伝子 (e l - D e i r y ら、Cancer Res. 55巻: 2910 - 2919 頁、1993 年) として、および老化線維芽細胞で過剰発現される成長阻害遺伝子 (N o d a ら、Exp. Cell. Res. 211巻: 90 - 98 頁、1994 年) として数種の群によって独立に同定された。p 5 3 で調節された成長停止におけるその中心的な役割のため、p 2 1 は、通常、腫瘍抑制剤と考えられる。それにもかかわらず、ヒト癌における p 2 1 突然変異はまれであり (H a l l および Peters、Adv. Cancer Res. 68巻: 67 - 108 頁、1996 年)、そして p 2 1 ノックアウトマウスは、正常に発育し、そして腫瘍誘発の速度が増加したことを示さなかった (D e n g ら、Cell 82巻: 675 - 684 頁、1995 年)。

【0004】

p 2 1 の細胞のレベルは、DNA - 損傷および分化剤を含めた多様な刺激にตอบสนองして増加される。これらの応答のいくつかは、p 5 3 によって p 2 1 遺伝子の転写活性化を通して仲介されるが、しかし p 2 1 は、多様な p 5 3 独立因子によっても調節される (G a r t e l および Tyner、Exp. Cell Res. 227巻: 171 - 181 頁、1999 年で再検討)。p 2 1 発現が増加されたことで、細胞成長停止に至り (N o d a ら、1994 年、上記)、そしてそれは、G 1 および G 2 の両方で起こり (N i c u l e s c u ら、1998 年、Mol. Cell Biol. 18巻: 629 - 643 頁)、そして老化の形態学および表現型マーカーの開発に伴って起った (V o g t ら、Cell Growth Differ. 9巻、1998 年: 139 - 146 頁; M c C o n n e l l ら、Curr. Biol. 8巻: 351 - 354 頁、1998 年; B a t e s ら、Oncogene 17巻: 1691 - 1703 頁、1998 年; F a n g ら、Oncogene 18巻: 2789 - 2797 頁、1999 年)。

【0005】

p 2 1 の一過性誘導は、細胞に DNA 損傷を修復させる一過性停止、ならびに生来の成長停止 (「促進された老化」とも称される) を含めた、様々な形態の損傷誘導成長停止を仲介し、そしてそれは、正常な線維芽細胞 (D i L e o n a r d o ら、1994 年、Genes Develop. 8巻: 2540 - 2551 頁; R o b l e s および A d a m i、1998 年、Oncogene 16巻: 1113 - 1123 頁) および DNA 損傷または癌遺伝子 R A S (S e r r a n o ら、Cell 88巻: 593 - 602 頁、1997 年) の導入による腫瘍細胞 (C h a n g ら、Cancer Res. 59巻: 3761 - 3767 頁、1999 年) で誘導される。p 2 1 発現の高まりも、加齢の線維芽細胞の反復性老化の間の終結成長停止 (N o d a ら、1994 年、上記; A l c o r t a ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻: 13742 - 13747 頁、1996 年; S t e i n ら、Mol. Cell Biol. 19巻: 2109 - 2117 頁、1999 年) および有糸分裂後の細胞の終結分化 (E l - D e i r y ら、1995 年

10

20

30

40

50

、上記；Gartelら、Exp. Cell Res. 246巻：280 - 289頁、1996年)の開始と同時発生する。p21 (p21 - / - 同種接合体)を発現できない細胞の分析は、正常な線維芽細胞の反復性老化 (Brownら、Science 277巻：831 - 834頁、1997年)における、および腫瘍細胞の促進された老化 (Changら、Oncogene 18巻：4804 - 4818頁、1999年)における、一過性G1およびG2停止 (Dengら、1995年、上記；Waldmanら、Cancer Res. 55巻：5187 - 5190頁、1995年；Bunzら、Science 282巻：1497 - 1501頁、1998年)でのp21の必要性を示した。
【0006】

p21が、それ自身の転写因子でない場合、それは、その細胞の機能における役割を果しうる遺伝子発現における間接的效果を示す。p21の最高の公知生化学的機能は、細胞周期の異なる相の間の一過性を調節するCDK複合体の阻害である (GartelおよびTyner、1998年、INHIBITORS OF CELL GROWTH, PROGRESS IN MOLECULAR AND SUBCELLULAR BIOLOGY, 20巻 (A. Macieir-Coelho編)で、「p21の成長調節の役割 (WAF1/CIP1)」、スプリングー-ベルグ：ベルリン・ハイデルベルグ、43 - 71頁で再検討)。CDK阻害の結果の1つは、Rbの脱リン酸化であり、そしてそれは、順次、DNA複写および細胞周期進行に参与した多くの遺伝子を調節するE2F転写因子を阻害する (Nevins、Cell Growth Differ. 9巻：585 - 593頁、1998年)。p21発現細胞 (p21 + / +) およびp21 - 非発現細胞 (p21 - / -) の比較は、数種のE2F調節細胞の遺伝子における放射線誘導阻害にp21に関係があるとした (de Toledoら、Cell Growth Differ. 9巻：887 - 896頁、1998年)。p21によるCDK阻害の別の結果は、NF Bを増大する転写コファクターp300の刺激である (Perkinsら、Science 275巻：523 - 527頁、1988年)。多くの誘導性転写因子を増強するヒストンアセチルトランスフェラーゼp300の活性化は、遺伝子発現に多面発現性効果を示しうる (SnowdenおよびPerkins、Biochem. Pharmacol. 55巻：1947 - 1954頁、1988年)。p21は、CDK以外のタンパク質とのその相互作用を通して遺伝子発現に影響を及ぼし得る。例えば、p21は、ケラチン細胞分化マーカーの発現を阻害することが分かった；この効果は、CDK阻害について必要とされないが、しかし増殖細胞核の抗原に結合することが知られているp21のC - 末端部分に依存した (Di Cuntoら、Science 280巻：1069 - 1072頁、1998年)。p21は、JNKキナーゼ (Shimら、Nature 381巻：804 - 807頁、1996年)、アポトーシスシグナル調節キナーゼ1 (Asadaら、EMBO J. 18巻：1223 - 1234頁、1999年) およびGadd45 (Kearseyら、Oncogene 11巻：1675 - 1683頁、1995年) に結合することも報告された；これらの相互作用は、対応の経路によって調節される遺伝子の発現に影響を及ぼしうる。

【0007】

その発現が、p21遺伝子発現の誘導によって調節される遺伝子を同定する当業界における必要性が残る。細胞の老化、発癌および加齢関連疾患における化合物の効果を評価する標的を開発する当業界における必要性もある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

(発明の要約)

本発明は、その発現が、p21遺伝子発現の誘導により調節される遺伝子を同定する試薬および方法を提供する。本発明は、細胞の老化、発癌および加齢関連疾患を防止するため、または抗癌治療の効力を増加するための合理的薬剤設計での第一の段階として、細胞の遺伝子発現におけるp21の効果を増害または増強する化合物を同定する試薬および方

法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

第一の態様で、本発明は、誘導性 p 2 1 遺伝子を含む哺乳類細胞を提供する。好ましい実施形態で、哺乳類細胞は、誘導性 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含する組換え哺乳類細胞である。さらに詳細には、構築物は、誘導性プロモーターの転写制御下で、p 2 1、もっとも好ましくはヒト p 2 1 をコードするヌクレオチド配列を包含する。選択的实施形態で、構築物は、CDK 結合ドメインを包含する p 2 1 のアミノ-末端部分をコードするヌクレオチド配列を包含し、より好ましくは p 2 1 アミノ酸配列のアミノ酸 1 から 78 を包含する。より好ましい実施形態で、誘導性プロモーターは、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤、最も好ましくは生理学上の天然の誘導性薬剤と細胞を接触させることによって、またはこのようなプロモーターから転写を阻害する剤を除去することによって誘導されうる。好ましい実施形態では、哺乳類細胞は、線維肉腫細胞である。

10

【0010】

本発明の第一の態様の実施形態では、レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって調節される細胞の遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下にある組換え発現構築物を含む組換え哺乳類細胞が提供される。好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が、p 2 1 によって抑制される細胞の遺伝子から誘導される。これらの実施形態では、プロモーターは、表 I に同定される遺伝子から最も好ましく誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、ORC 1、PRC 1、XRCC 9、CDC 2、サイクリン B 1、AIK 1、CENP - A、CENP - F、MAD 2、BUBR 1、MCAK、HSET、CHL 1、サイモポイチン、MPP 2、MPP 5、CDC 47 / MCM 7、CDC 21 / MCM 4、DNA リガーゼ I、DNA ポリメラーゼ、Rad 5 4、エキソヌクレアーゼ HEX 1 / RAD 2、PLK 1、DHF R または シトロンキナーゼから誘導される。他の好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって誘導される細胞の遺伝子から誘導される。これらの実施形態では、プロモーターは、最も好ましくは、表 I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、Mac 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 66^{shc}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から誘導される。本発明の組換え発現構築物を包含する好ましいレポーター遺伝子としては、ホタル・ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。

20

30

【0011】

別の好ましい実施形態で、本発明は、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および p 2 1 の発現が、それにより哺乳類細胞で実験的に誘導される哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物を含む哺乳類細胞を提供する。好ましい実施形態では、哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物は、組換え発現構築物から p 2 1 の発現が、組換え細胞を、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤と接触させることによって、またはこのようなプロモーターから転写を阻害する剤を除去することによって仲介されることを特徴とする誘導性異種プロモーターの転写制御下にある。好ましくは、構築物は、p 2 1、最も好ましくはヒト p 2 1 をコードするヌクレオチド配列を包含する。代替の実施形態では、構築物は、CDK - 結合ドメインを含む p 2 1 のアミノ末端部分をコードするヌクレオチド配列を包含し、さらに好ましくは p 2 1 アミノ酸配列のアミノ酸 1 から 78 を包含する。好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が、p 2 1 によって抑制される細胞の遺伝子から誘導される。これらの実施形態では、プロモーターは、最も好ましくは、表 I に同定される遺伝子から誘導される。他の好まし

40

50

い実施形態では、プロモーターは、その発現が、p 2 1によって誘導される細胞の遺伝子から誘導される。これらの実施形態では、プロモーターは、最も好ましくは、表 I I に同定される遺伝子から誘導される。本発明の組換え発現構築物を包含する好ましいレポーター遺伝子としては、ホタル・ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ベータ・ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。好ましい実施形態では、哺乳類細胞は、線維肉腫細胞である。

【 0 0 1 2 】

第二の態様では、本発明は、培地が、p 2 1を発現する細胞によって調整される調整細胞培養用培地、および上記調整培地を生成する方法を提供する。好ましい実施形態では、調整培地は、哺乳類細胞培養用培地、最も好ましくは血清添加剤を含有しない合成培地中でp 2 1発現細胞を培養することによって生成される。本発明のこの態様に有用なp 2 1発現としては、誘導性プロモーターの転写制御下でp 2 1をコードする組換え発現構築物の内在性p 2 1発現および誘導性発現の両方が挙げられる。好ましい細胞としては、哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、そしてさらに好ましくはマウスまたはヒト細胞が挙げられる。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、さらに好ましくはヒト線維肉腫細胞および最も好ましくはヒトHT 1 0 8 0線維肉腫細胞株およびそれらの誘導体である。

10

【 0 0 1 3 】

本発明のこの態様は、哺乳類細胞における有糸分裂または抗アポトーシス因子のp 2 1誘導発現を阻害する化合物を同定するスクリーニング法を提供する。好ましい実施形態では、その方法は、化合物の存在または不在下で、細胞中のp 2 1の発現を誘導すること、そして調整培地中で有糸分裂または抗アポトーシス性化合物あるいはそれらの複数の発現を比較することを包含する。阻害剤は、化合物の不在下でより、化合物の存在下で調整培地中に少ない量の有糸分裂または抗アポトーシス性化合物あるいはそれらの複数を有することによって同定される。本発明のこの態様で供される方法で、任意のp 2 1発現細胞が、有用であり、そしてこのような細胞におけるp 2 1発現は、内因性p 2 1を誘導することによるか、または本発明による誘導性p 2 1発現構築物を含有する細胞を使用することによって達成されうる。好ましい細胞としては、哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、そしてさらに好ましくはマウスまたはヒト細胞が挙げられる。特に好ましい実施形態では、線維肉腫細胞、さらに好ましくは、ヒト線維肉腫細胞および最も好ましくはヒトHT 1 0 8 0線維肉腫細胞株およびそれらの誘導体である。

20

30

【 0 0 1 4 】

代替の実施形態では、本発明は、細胞が、p 2 1によって誘導される細胞の遺伝子のプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含することを特徴とする、哺乳類細胞中の有糸分裂または抗アポトーシス因子のp 2 1誘導発現を阻害する化合物を同定する方法を提供する。好ましい実施形態では、プロモーターとしては、CTGF、アクチピンA、エピセリン/グラヌリン、ガレクチン-3およびプロサボシンが挙げられる。好ましいレポーター遺伝子としては、それに限定されないが、ホタル・ルシフェラーゼ、 - ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質が挙げられる。これらの実施形態では、レポーター遺伝子発現のp 2 1仲介誘導の阻害は、p 2 1発現細胞における有糸分裂または抗アポトーシス因子の誘導を阻害する化合物を同定するために使用される。

40

【 0 0 1 5 】

この実施形態では、本発明は、有糸分裂または抗アポトーシス因子の産生を阻害する化合物と細胞を接触させる段階を包含し、該化合物が、本発明のこの態様の前述の方法によって同定されることを特徴とする、哺乳類細胞での有糸分裂または抗アポトーシス因子または化合物の産生を阻害する方法も提供する。好ましい実施形態では、有糸分裂または抗アポトーシス因子の産生が、阻害される阻害化合物と接触される哺乳類細胞は、線維芽細胞、最も好ましくは間質の線維芽細胞である。

【 0 0 1 6 】

50

第3の態様では、本発明は、細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節を阻害する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、哺乳類細胞における p 2 1 を誘導またはさもなければ産生すること；その発現が p 2 1 によって調節される細胞の遺伝子の発現における変化について、化合物の存在下で細胞を分析すること；および細胞の遺伝子の発現が、化合物の不在下でより、化合物の存在下で少ない範囲に変化される場合に細胞の遺伝子発現の p 2 1 仲介調節を阻害する化合物を同定する段階を包含する。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって抑制され、そして阻害剤は、p 2 1 が、化合物の不在下で発現されるときに検出されものより大きなレベルで、遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I に同定される。代替の好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって誘導され、そして阻害剤は、p 2 1 が、化合物の不在下で発現されるときに検出されものより少ないレベルで、遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I I に同定される。別の代替の実施形態では、その方法は、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を包含する組換え哺乳類細胞を使用して行われる。p 2 1 によって抑制される遺伝子から誘導されるプロモーターを包含する構築物を使用するこれらの実施形態では、レポーター遺伝子産物は、化合物が、p 2 1 遺伝子発現調節の阻害剤であるときに化合物の不在下でより、存在下で大きなレベルで産生される。これらの実施形態では、プロモーターは、最も好ましくは、表 I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、ORC 1、PRC 1、XRCC 9、CDC 2、サイクリン B 1、AIK 1、CENP - A、CENP - F、MAD 2、BUBR 1、MCAK、HSET、CHL 1、サイモポイエチン、MPP 2、MPP 5、CDC 47 / MCM 7、CDC 21 / MCM 4、DNAリガーゼ I、DNAポリメラーゼ、Rad 5 4、エキソヌクレアーゼ HEX 1 / RAD 2、PLK 1、DHF R またはシトロンキナーゼから誘導される。p 2 1 によって誘導される遺伝子から誘導されるプロモーターを含む構築物を使用する場合、レポーター遺伝子産物は、化合物が、p 2 1 遺伝子発現調節の阻害剤であるときに化合物の不在より存在下で少ないレベルで産生される。これらの実施形態では、プロモーターは、最も好ましくは、表 I I に同定される遺伝子から誘導される。さらに好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、Mac 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から誘導される。本発明の組換え発現構築物を含む好ましいレポーター遺伝子としては、ホタル・ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。他の好ましい実施形態では、細胞は、その発現が、p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物を包含し、p 2 1 の発現が、それにより哺乳類細胞中で実験的に誘導される。p 2 1 により誘導または抑制されるレポーター遺伝子または内因性遺伝子の産生は、遺伝子産物の活性について分析することにより、または相補的核酸にハイブリッド形成することによって、免疫学上の試薬を用いて検出される。

【 0 0 1 7 】

第4の態様では、本発明は、哺乳類細胞での老化を阻害する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、化合物の存在下で哺乳類細胞を、剤で処理するか、または老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；p 2 1 遺伝子発現により抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類細胞を分析すること；および化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子が、抑制されないか、または p 2 1 によって誘導される遺伝子が、誘導されない場合に老化の阻害剤として化合物を同定する段階を包含する。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 により抑制され、そして老化阻害剤は、p 2 1 が、化合物の不在下で発現されるときに検出されるものより大きなレベルで、

遺伝子の発現を検出することによって同定される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I に同定される。代替の好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって誘導され、そして老化阻害剤は、p 2 1 が化合物の不在下に発現されるときに検出されるものより少ないレベルで、遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I I に同定される。別の代替の実施形態では、方法は、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から由来したプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を包含する組換え哺乳類細胞を使用して行われる。これらの実施形態では、p 2 1 によって抑制される遺伝子から由来したプロモーターを含む構築物を使用したときに、化合物の不在下でより存在下で大きなレベルにあるか、または p 2 1 によって誘導される遺伝子から由来したプロモーターを含む構築物を使用したときに、化合物の不在下でより存在下で小さなレベルにあるレポーター遺伝子の産物の産生は、化合物が老化の阻害剤であるときに検出される。プロモーターは、好ましくは、表 I (p 2 1 によって抑制される遺伝子については) または表 I I (p 2 1 によって誘導される遺伝子については) で同定される遺伝子から誘導される。p 2 1 抑制遺伝子については、プロモーターは、最も好ましくは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、サイモポイエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、D N A リガーゼ I、D N A ポリメラーゼ、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R または シトロンキナーゼ から誘導される。p 2 1 誘導遺伝子については、プロモーターは、最も好ましくは、アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、または カテプシン B から誘導される。他の好ましい実施形態では、細胞は、その発現が、p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物を包含し、そして p 2 1 の発現が、それにより哺乳類細胞中で実験的に誘導される。p 2 1 によって誘導または抑制されるレポーター遺伝子または内因性遺伝子の産生は、遺伝子産物の活性について分析することによるか、または相補的核酸にハイブリッド形成させることにより免疫学上の試薬を使用して検出される。

【 0 0 1 8 】

第 5 の態様で、本発明は、本発明の前述の態様に供される方法を使用して測定される場合、老化を阻害する化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする細胞の老化、加齢関連疾患または加齢関連遺伝子産物を阻害する方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

第 6 の態様で、本発明は、哺乳類細胞中の老化を増強する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、化合物の存在および不在下で哺乳類細胞中の 2 1 を誘導すること ; p 2 1 遺伝子発現によって抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類腫瘍細胞を分析すること ; および化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子が、より大きな範囲に抑制されるか、または p 2 1 によって誘導される遺伝子が、より大きな範囲まで誘導されるかで、老化のポテンシエーターとして化合物を同定する段階を包含する。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって抑制され、そしてポテンシエーターは、p 2 1 が、化合物の不在下で発現される時に検出されるものより少ないレベルで、細胞の遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I に同定される。代替の好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって誘導され、そしてポテンシエーターは、p 2 1 が、化合物の不在下で発現される時に検出されるものより大きなレベルで、細胞の遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I I に同定される。別の代替の実施形態では、細胞が、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から由来したプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を有する構築物を包含することを特徴とする、その発

現 p 2 1 によって調節される遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子を含む組換え哺乳類細胞を使用して行われる。これらの実施形態では、p 2 1 によって抑制される遺伝子から由来したプロモーターを含む構築物を使用したときに、化合物の不在下でより存在下で低いレベルにあるか、または p 2 1 によって誘導される遺伝子から由来したプロモーターを含む構築物を使用したときに、化合物の不在下でより存在下で大きなレベルにあるレポーター遺伝子の産物の産生は、化合物が老化のポテンシエーターであるときに検出される。好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって抑制される遺伝子から誘導され、最も好ましくは表 I に同定される遺伝子である。最も好ましくは、プロモーターは、ORC 1、PRC 1、XRCC 9、CDC 2、サイクリン B 1、AIK 1、CENP - A、CENP - F、MAD 2、BUBR 1、MCAK、HSET、CHL 1、サイモポイエチン、MPP 2、MPP 5、CDC 47 / MCM 7、CDC 21 / MCM 4、DNAリガーゼ I、DNAポリメラーゼ、Rad 5 4、エキソヌクレアーゼ HEX 1 / RAD 2、PLK 1、DHF R または シトロンキナーゼから誘導される。代替の好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって誘導される遺伝子、最も好ましくは表 I I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、Mac 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から誘導される。他の好ましい実施形態では、細胞は、その発現が、p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物を包含し、そして p 2 1 の発現が、それにより哺乳類細胞中で実験的に誘導される。p 2 1 によって誘導または抑制されるレポーター遺伝子または内因性遺伝子の産生は、遺伝子産物の活性について分析することによるか、または相補的核酸にハイブリッド形成させることにより免疫学上の試薬を使用して検出される。

【 0 0 2 0 】

第 7 の態様で、本発明は、本発明の前述の態様に供される方法を使用して測定されるときに、老化を増強する化合物と細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、過剰増殖のため、腫瘍細胞、増殖性細胞または病理学または疾病原因である任意の細胞型で細胞の老化を促進または増強する方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

第 8 の態様で、本発明は、ここに開示されるとおり本発明の方法のいずれかを使用して同定される化合物を提供する。

【 0 0 2 2 】

第 9 の態様で、本発明は、細胞周期進行に関与する遺伝子について富化される複数の核酸種を得る方法を提供する。これらの方法は、哺乳類細胞での p 2 1 の発現を誘導すること； p 2 1 誘導の前、および p 2 1 が誘導され、そして細胞成長が停止された後に、哺乳類細胞から細胞の mRNA を得ること； および細胞周期進行に関与する遺伝子について富化された複数の核酸種を得る段階を包含する。好ましい実施形態では、細胞周期進行遺伝子について富化された複数の核酸種は、当業界に知られる消去式ハイブリッド形成法によって得られ、それにより p 2 1 を発現する細胞で過少表現される核酸種は、選択的に富化された。

【 0 0 2 3 】

第 10 の態様で、本発明は、パラ分泌機能を有する分泌タンパク質および老化および加齢関連疾病に関与するタンパク質をコードする遺伝子について富化される複数の核酸種を得る方法を提供する。これらの方法は、哺乳類細胞での p 2 1 の発現を誘導すること； p 2 1 が誘導される前および後に、哺乳類細胞から細胞の mRNA を得ること； および p 2 1 が誘導された後に、その発現が細胞中で増加される遺伝子について富化された複数の核酸種を得る段階を包含する。好ましい実施形態では、タンパク質のパラ分泌機能は、有糸

分裂および抗アポトーシス効果である。好ましい実施形態では、パラ分泌機能を有する分泌タンパク質および老化および加齢関連疾病に関与するタンパク質をコードする遺伝子について富化される複数の核酸種は、当業界で知られる消去式ハイブリッド形成方法によって得られ、それにより p 2 1 を発現する細胞で過剰表現される核酸種は、選択的に富化される。

【 0 0 2 4 】

第 1 1 の態様で、本発明は、哺乳類細胞の第一の集団での p 2 1 の発現を産生することにより老化を誘導し、そして哺乳類細胞の第二の集団での静止を誘導すること；細胞の各集団から m R N A を得ること；細胞中の p 2 1 の誘導の前および後の細胞での遺伝子発現のパターンを、細胞が静止になる前および後の細胞での遺伝子発現のパターンと比較すること；p 2 1 が誘導された後の細胞で強力に誘導される複数の遺伝子を、静止している細胞で強力に誘導される複数の遺伝子と比較すること；および静止している細胞で強力に誘導されはしない p 2 1 を産生する細胞で強力に誘導される遺伝子を同定する段階を包含することを特徴とする、細胞の老化のマーカーである遺伝子を同定する方法を提供する。

10

【 0 0 2 5 】

第 1 2 の態様で、本発明は、哺乳類細胞における老化を検出する方法を提供する。これらの方法は、老化についてのマーカーである遺伝子の発現を検出する段階を包含する。好ましい実施形態では、老化の好ましいマーカーとしては、結合性組織成長因子 (C T G F)、血清アミロイド A、インテグリン 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、M a c 2 結合タンパク質、または組織トランスグルタミナーゼが挙げられる。

20

【 0 0 2 6 】

第 1 3 の態様で、本発明は、哺乳類細胞中で老化の誘導を促進する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、哺乳類細胞を剤で処理すること、または化合物の存在下で老化を誘導する条件下で哺乳類細胞を培養すること；p 2 1 遺伝子発現によって抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について哺乳類腫瘍細胞を分析すること；および化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子が、さらに抑制される場合に、すなわち、より大きな範囲に、または p 2 1 によって誘導される遺伝子がさらに誘導される、すなわち、より大きな範囲に、老化のポテンシエーターとして化合物を同定する段階を包含する。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって抑制され、そして老化の誘導を促進する化合物は、p 2 1 が、化合物の不在下で発現される場合に検出されるものより小さいレベルで、細胞の遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態で、遺伝子は、表 I に同定される。代替の好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって誘導され、そして老化の誘導を促進する化合物は、p 2 1 が、化合物の不在下で発現される場合に検出されるものより大きなレベルで、細胞の遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I I に同定される。さらに代替の好ましい実施形態では、その方法は、細胞が、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から得られるプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を有する構築物を包含することを特徴とする、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を含む組換え哺乳類細胞を使用して行われる。これらの実施形態では、p 2 1 によって抑制される遺伝子から誘導されるプロモーターを含む構築物を使用する時に化合物の不在下でより存在下でより低いレベルで、または p 2 1 によって誘導される遺伝子から誘導されるプロモーターを含む構築物を使用する時に化合物の不在下でより存在下で大きいレベルで、レポーター遺伝子の産物の産生は、化合物が、老化の誘導を促進するときに検出される。好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって抑制される遺伝子、最も好ましくは表 I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、サイモポイエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、D N A リガーゼ I、D N A ポリメラーゼ、R a d 5 4、エキソヌクラーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R ま

30

40

50

たはシトロンキナーゼから誘導される。代替の好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって誘導される遺伝子、最も好ましくは表 I I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、血清アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から誘導される。他の好ましい実施形態では、細胞は、その発現が、p 2 1 によって調節される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物を包含し、そして p 2 1 の発現が、それにより哺乳類細胞中で実験的に誘導される。p 2 1 によって誘導または抑制されるレポーター遺伝子または内因性遺伝子の産生は、遺伝子産物の活性について分析することによるか、または相補的核酸にハイブリッド形成させることにより免疫学上の試薬を使用して検出される。

10

【 0 0 2 7 】

第 1 4 の態様で、本発明は、哺乳類細胞中で老化を誘導する化合物を同定する方法を提供する。これらの方法は、p 2 1 遺伝子発現によって抑制または誘導される遺伝子の抑制または誘導について、化合物の存在および不在下で哺乳類細胞を分析すること；および化合物の存在下で、p 2 1 によって抑制される遺伝子が、抑制される場合に、または p 2 1 によって誘導される遺伝子が誘導される場合に、老化を誘導する化合物を同定する段階を包含する。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって抑制され、そして老化を誘導する化合物は、化合物の不在下で検出されるものより小さいレベルで細胞の遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態で、遺伝子は、表 I に同定される。代替の好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p 2 1 によって誘導され、そして老化を誘導する化合物は、化合物の不在下で検出されるものより大きなレベルで、細胞の遺伝子の発現を検出することによって検出される。好ましい実施形態では、遺伝子は、表 I I に同定される。さらに代替の実施形態では、その方法は、細胞が、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から得られるプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を有する構築物を包含することを特徴とする、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子を含む組換え哺乳類細胞を使用して行われる。これらの実施形態では、p 2 1 によって抑制される遺伝子から誘導されるプロモーターを含む構築物を使用する時に、化合物の不在下でより存在下で低いレベルで、または p 2 1 によって誘導される遺伝子から誘導されるプロモーターを含む構築物を使用する時に化合物の不在下でより存在下で大きいレベルで、レポーター遺伝子の産物の産生は、化合物が、老化を誘導するときに検出される。好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって抑制される遺伝子、最も好ましくは表 I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、サイモポイエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、D N A リガーゼ I、D N A ポリメラーゼ、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R

またはシトロンキナーゼから誘導される。代替の好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって誘導される遺伝子、最も好ましくは表 I I に同定される遺伝子から誘導される。最も好ましくは、プロモーターは、アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチピン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から誘導される。p 2 1 によって誘導または抑制されるレポーター遺伝子または内因性遺伝子の産物は、遺伝子産物の活性について分析すること、または相補的核酸にハイブリッド形成することによって免疫学上の試薬を使用して検出される。

20

30

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

50

【0028】

本発明の特に好ましい実施形態は、特定の好ましい実施形態および請求項の以下のいっそう詳細な説明から明らかになる。

【0029】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明は、p 21で誘導した細胞の老化を仲介することに関与した遺伝子を同定する試薬および方法、および哺乳類細胞における老化または静止を阻害または増強する能力のある化合物を提供する。

【0030】

本発明の目的について、「細胞」または「複数の細胞」に言及されるのは、等価であることが意図され、そして特に、哺乳類細胞成長のインビトロ培養を包含し、そして当業界で知られるとおり維持される。

【0031】

本発明の目的について、複数で「細胞の遺伝子」に言及されるのは、単独遺伝子、ならびに2つまたはそれ以上の遺伝子を包含することが意図される。細胞の遺伝子発現の調節効果、または細胞の遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下でレポーター構築物は、第一の遺伝子で検出でき、そしてその後、その効果は、第二または任意の数の追加の遺伝子、またはレポーター遺伝子構築物を試験することによって複製されることも、当業者によって理解される。代わりに、2つまたはそれ以上の遺伝子またはレポーター遺伝子の発現は、本発明の範囲内で同時に分析されうる。

【0032】

本発明の目的について、語句「静止」は、血清不足の条件下で培養された哺乳類細胞で起こるような細胞成長およびDNA複製の一時的中止を包含すると解釈される。

【0033】

本発明の目的について、語句「老化」は、正常な細胞の増殖性寿命の終点で、または細胞毒性薬剤、DNA損傷または他の細胞のインサルト (i n s u l t) に応答して正常あるいは腫瘍細胞で起こるような、成長因子によって逆行されないDNA複製および細胞成長の恒常的中止を包含すると解釈される。

【0034】

老化は、多数の方法により哺乳類細胞で誘導されうる。第一に、インビボまたはインビトロのいずれかで、正常な細胞成長の自然の結果である。正常な細胞が、老化になる前に受ける可能性のある限定された数の細胞分裂、継代または世代がある。正確な数は、細胞の型および起源の種によって変化する (H a y f l i c k および M o o r h e a d 、 1 9 6 1 年、E x p . C e l l R e s . 2 5 巻 : 5 8 5 - 6 2 1 頁) 。 任意の細胞型に老化を誘導する別の方法は、ほとんどの抗癌薬剤、放射線および細胞の分化剤のような細胞毒性薬剤を用いた処理である。C h a n g ら、C a n c e r R e s . 5 9 巻 : 3 7 6 1 - 3 7 6 7 頁、1 9 9 9 年参照。老化も、その細胞に、腫瘍サプレッサー遺伝子 (p 5 3 、 p 2 1 、 p 1 6 または R b のような) を形質導入させ、そしてそこに遺伝子を発現させることによって任意の哺乳類細胞に迅速に誘導されうる。S u g r u e ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 巻 : 9 6 4 8 - 9 6 5 3 頁、1 9 9 7 年 ; U h r b o m ら、O n c o g e n e 1 5 巻 : 5 0 5 - 5 1 4 頁、1 9 9 7 年 ; X u ら、O n c o g e n e 1 5 巻 : 2 5 8 9 - 1 5 9 6 頁、1 9 9 7 年 ; V o g t ら、C e l l G r o w t h D i f f e r . 9 巻 : 1 3 9 - 1 4 6 頁、1 9 9 8 年参照。

【0035】

本発明の試薬としては、任意の哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、さらに好ましくはマウス細胞、および最も好ましくはこのような遺伝子が、遺伝子操作によって導入される内在性遺伝子または外来性遺伝子のいずれかであることを特徴とする p 2 1 遺伝子の発現を誘導しうるヒト細胞が挙げられる。実施例は、このような誘導性 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含する組換え哺乳類細胞を開示するが、これらの実施形態が、単に実験的設計選択および都合よさの問題であるだけであること、および本

10

20

30

40

50

発明が、内因性 p 2 1 の誘導を十分に包含することが分かる。

【 0 0 3 6 】

好ましい実施形態では、本発明は、誘導性哺乳類 p 2 1 遺伝子をコードする組換え発現構築物を含む哺乳類細胞を提供する。好ましい実施形態では、p 2 1 遺伝子は、ここに参照して組込まれた米国特許番号第 5, 4 2 4, 4 0 0 号に規定されるとおりヌクレオチドおよびアミノ酸配列を有するヒト p 2 1 である。代替の実施形態では、p 2 1 遺伝子は、ヒト p 2 1 遺伝子のアミノ末端部分であり、好ましくは生来のヒト p 2 1 タンパク質のアミノ酸残渣 1 から 7 8 を包含し (米国特許番号第 5, 8 0 7, 6 9 2 号で開示されるとおりであり、参照して組込まれる)、そしてさらに好ましくは生来のヒト p 2 1 タンパク質のアミノ酸 2 1 - 7 1 を含む C D K 結合ドメインを包含する (N a k a n i s h i r a
10
、 E M B O J . 1 4 巻 : 5 5 5 - 5 6 3 頁、1 9 9 5 年)。好ましい宿主細胞としては、哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、そしてさらに好ましくはマウスまたはヒト細胞が挙げられる。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、さらに好ましくはヒト線維肉腫細胞、そして最も好ましくはヒト H T 1 0 8 0 線維肉腫細胞株およびその誘導体である。最も好ましい培養細胞株は、2 0 0 0 年 4 月 6 日に、受託番号第 _____ 号の下に米国バージニア州マナサスのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (t h e A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n) に寄託された p 2 1 - 9 として同定される H T 1 0 8 0 線維肉腫細胞株誘導体である。

【 0 0 3 7 】

組換え発現構築物は、当業者によって理解されるとおり、適切な哺乳類細胞に導入され
20
うる。上記構築物の好ましい実施形態は、伝達性ベクター、さらに好ましくはウイルス性ベクター、そして最も好ましくは当業界で知られるとおりのレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターで産生される。一般に、M A M M A L I A N C E L L B I O T E C H N O L O G Y : A P R A C T I C A L A P P R O A C H (B u t l e r 編)、オックスフォード・ユニバーシティ・プレス：ニューヨーク、1 9 9 1 年、5 7 - 8 4 頁参照。

【 0 0 3 8 】

さらに好ましい実施形態では、本発明の組換え細胞は、その遺伝子が、誘導性プロモーターの転写制御下にあることを特徴とする誘導性 p 2 1 遺伝子をコードする構築物を含む。さらに好ましい実施形態では、誘導性プロモーターは、その効果が、誘導剤によって調
30
節されうるトランス作用因子に応答性がある。誘導剤は、温度、そして最も好ましくは誘導剤の存在または不在を含めた実験的に操作されうる任意の因子でありうる。好ましくは、誘導剤は、化学的化合物、最も好ましくはトランス作用因子に特異的である生理学的に中性の化合物である。ここに開示されるとおり誘導性プロモーターを含む構築物の使用で、組換え発現構築物から得られる p 2 1 の発現は、誘導性プロモーターから転写を誘導する誘導剤に、組換え細胞を接触させることによるか、またはこのようなプロモーターから転写を阻害する剤を除去することによって仲介される。細胞培養の温度を増加させること
40
によって活性化されうるヒートショックプロモーター、そしてさらに好ましくは、t e t プロモーターおよび哺乳類転写因子 (米国特許番号第 5, 6 5 4, 1 6 8 号、第 5, 8 5 1, 7 9 6 号、および第 5, 9 6 8, 7 7 3 号) とのその融合、そしてラクトースオペロンの細菌性 l a c プロモーターおよびその同族体 l a c I レプレッサータンパク質のようなプロモーター/因子対を含めた多様な誘導性プロモーターおよび同族体トランス作用因子は、先行技術で知られている。好ましい実施形態では、組換え細胞は、l a c I レプレッサータンパク質、および 1 つまたは複数の l a c - 応答性要素を含むプロモーターの制御下でヒト p 2 1 をコードする組換え発現構築物を発現し、p 2 1 の発現は、細胞を、生理学的に中性の誘導剤イソプロピルチオ - ガラクトシドと接触させることによ
て誘導されうることを特徴とする。この好ましい実施形態では、l a c I レプレッサーは、3 ' S S (ストラタジーンから市販で入手可能である、カリフォルニア州ラホーラ) として同定される組換え発現構築物によってコードされる。

【 0 0 3 9 】

本発明は、レポーター遺伝子が、その発現が p 2 1 によって調節される遺伝子のプロモーターの転写制御下にあることを特徴とする組換え発現構築物も提供する。これらとしては、その発現が p 2 1 によって誘導される遺伝子、およびその発現が p 2 1 によって抑制される遺伝子が挙げられる。好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって抑制される遺伝子から由来し、そして表 I に同定される。最も好ましくは、プロモーターは、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、サイモポイエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、D N A リガーゼ I、D N A ポリメラーゼ、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R またはシトロンキナーゼから誘導される。別の好ましい実施形態では、プロモーターは、その発現が p 2 1 によって誘導されるか、さもなければ増加される遺伝子から誘導され、そして表 I I I で同定される。最も好ましくは、プロモーターは、アミロイド A、補体 C 3、結合性組織成長因子、インテグリン 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から誘導される。これらのレポーター遺伝子は、その後、p 2 1 誘導の効果の感受性および都合のよい指標として使用され、そして哺乳類細胞における p 2 1 発現の効果を増害または増強する化合物が、容易に同定されることを可能にする。これらの構築物についての宿主としては、p 2 1 遺伝子発現が誘導されうる任意の細胞が挙げられ、そして好ましくは、上に記述されるとおり誘導性 p 2 1 遺伝子を含む組換え発現構築物をも含む細胞が挙げられる。本発明のこの態様の実施に有用なレポーター遺伝子は、それに限定されないが、ホタル・ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、またはアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。

10

20

【0040】

好ましい実施形態では、本発明による細胞は、その発現が p 2 1 によって調節される哺乳類細胞についてのプロモーターの転写制御下でレポーター遺伝子をコードする第一の組換え発現構築物、および p 2 1 発現が、哺乳類細胞中でそれにより実験的に誘導性であることを特徴とする哺乳類細胞 p 2 1 遺伝子をコードする第二の組換え発現構築物の両方を包含する。

30

【0041】

代替の実施形態では、本発明は、プロモーターが、O R C 1、P R C 1、X R C C 9、C D C 2、サイクリン B 1、A I K 1、C E N P - A、C E N P - F、M A D 2、B U B R 1、M C A K、H S E T、C H L 1、サイモポイエチン、M P P 2、M P P 5、C D C 4 7 / M C M 7、C D C 2 1 / M C M 4、D N A リガーゼ I、D N A ポリメラーゼ、R a d 5 4、エキソヌクレアーゼ H E X 1 / R A D 2、P L K 1、D H F R またはシトロンキナーゼから得られることを特徴とする、その発現が p 2 1 によって抑制される哺乳類細胞についてのプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物を含む哺乳類細胞を提供する。別の代替の実施形態では、本発明は、プロモーターが、遺伝子結合性組織成長因子、血清アミロイド A、補体 C 3、インテグリン 3、アクチビン A、ナチュラルキラー細胞タンパク質 4、プロサポシン、M a c 2 結合タンパク質、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、グラヌリン / エピセリン、p 6 6^{s h c}、リソソームの - ガラクトシダーゼ、またはカテプシン B から得られることを特徴とし、その発現が p 2 1 によって誘導される哺乳類遺伝子についてのプロモーターの転写制御下での、レポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物を含む哺乳類細胞を提供する。

40

【0042】

本発明は、培地が、p 2 1 を発現する細胞によって調整されることを特徴とする調整された細胞培養様培地、および上記調整培地を生成する方法を提供する。ここに使用される場合、語句「調整培地」は、有糸分裂または抗アポトーシス因子を含む p 2 1 発現細胞の

50

成長によって調整された細胞培養用培地を包含することが意図される。調整培地は、哺乳類細胞の培養用培地、最も好ましくは、血清添加物を含有しない合成培地中で p 2 1 発現細胞を培養することによって好ましい実施形態で生成される。任意の p 2 1 発現細胞は、上記調整培地の生成のために有用であり、そしてこのような細胞における p 2 1 発現は、内因性 p 2 1 を誘導することによる (DNA 損傷剤、放射線を用いた処理によるような) か、または本発明による誘導性 p 2 1 発現構築物を含む細胞を使用し、そして生理学的に中性の誘導剤で細胞を培養することによって達成されうる。好ましい細胞としては、哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、そしてさらに好ましくはマウスまたはヒト細胞が挙げられる。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、さらに好ましくはヒト線維肉腫細胞、そして最も好ましくはヒト HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞株およびそれらの誘導体である。 10

【0043】

本発明は、哺乳類細胞での有糸分裂または抗アポトーシス因子の p 2 1 誘導発現を阻害する化合物を同定するスクリーニング法も提供する。好ましい実施形態では、p 2 1 発現は、有糸分裂または抗アポトーシス因子の p 2 1 誘導発現の阻害剤として同定されるべき化合物の存在または不在で哺乳類細胞培養物中において誘導される。化合物は、細胞中の p 2 1 の発現を誘導し、そして化合物の存在下での有糸分裂または抗アポトーシス因子、あるいはそれらの複数の発現の範囲を、化合物の不在下での発現と比較することによって、阻害剤として同定され、そして阻害剤は、化合物の存在下で有糸分裂または抗アポトーシス因子、あるいはそれらの複数の発現の減少量を示す化合物として同定される。任意の p 2 1 発現細胞は、上記調整培地の生成のために有用であり、そしてこのような細胞における p 2 1 発現は、内因性 p 2 1 を誘導することによる (DNA 損傷剤および他の細胞毒性化合物、および放射線を用いた処理によるような) か、または本発明による誘導性 p 2 1 発現構築物を含む細胞を使用し、そして生理学的に中性の誘導剤中で細胞を培養することによって達成されうる。好ましい細胞としては、哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、そしてさらに好ましくはマウスまたはヒト細胞が挙げられる。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、さらに好ましくはヒト線維肉腫細胞、および最も好ましくはヒト HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞株およびその誘導体が挙げられる。哺乳類細胞のこの特に好ましい実施形態による例示の培養細胞株は、2000年4月6日に、受託番号第 _____ 号の下に米国バージニア州マナサスのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された p 2 1 - 9 として同定された HT 1 0 8 0 線維肉腫細胞株誘導体である。 20 30

【0044】

代替の実施形態では、本発明は、細胞が、p 2 1 によって誘導される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含することを特徴とする、哺乳類細胞における有糸分裂または抗アポトーシス因子の p 2 1 誘導発現を阻害する化合物を同定する方法を提供する。好ましい実施形態では、プロモーターは、CTGF、アクチビンA、エピセリン/グラヌリン、ガレクチン-3 およびプロサポシンが挙げられる。好ましいレポーター遺伝子としては、それに限定されないが、ホタル・ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質が挙げられ、その全ては、市販で入手できる。これらの実施形態では、p 2 1 発現は、その細胞で誘導され、そして化合物の存在下でのレポーター遺伝子の発現の範囲を、化合物の不在下での発現と比較する。阻害剤は、化合物の存在下でのレポーター遺伝子の発現の減少した量を供する化合物として同定される。任意の p 2 1 発現細胞は、本発明のこの態様に有用であり、そしてこのような細胞における p 2 1 発現は、内因性 p 2 1 (例えば、DNA 損傷剤または他の細胞毒性化合物、または放射線での処理によって) を誘導することによって、または本発明による誘導性 p 2 1 発現構築物を含む細胞を使用し、そして生理学的に中性の誘導剤中で細胞を培養することによって達成されうる。好ましい細胞としては、哺乳類細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、およびさらに好ましくはマウスまたはヒト細胞が挙げられる。特に好ましい実施形態は、線維肉腫細胞、さら 40 50

に好ましくは、ヒト繊維肉腫細胞および最も好ましくはヒトHT1080線維肉腫細胞株およびそれらの誘導体である。

【0045】

本発明は、老化を阻害または促進する方法を提供し、それにより化合物の効果は、その化合物が、その発現がp21によって調節される遺伝子の誘導または抑制を阻害または増強するかどうかを決定することによって分析される。本発明の方法の実施では、p21が誘導されうる培養哺乳類細胞が、例えば、放射線処理、または細胞毒性薬剤を用いた処理によって処理されてp21を誘導するか、またはp21をコードする伝達性ベクターで形質移入され。さらに好ましくは、p21が、IPTGと細胞を接触させることによって誘導されうるp21-9細胞が使用される。全般的に、細胞は、適切な培養用培地（例えば、p21-9細胞のための10%牛胎児血清（FCS）で補足されたDMEM）で育成される。p21遺伝子発現は、約50μMの濃度でIPTGを培養用培地に添加することによって、p21-9で誘導される。全般的に、p21は、哺乳類細胞の方法によって試験されるべき化合物の存在または不在下でこれらの細胞中に誘導される。その後、mRNAは、p21が誘導される細胞から単離され、そしてp21によって調節される遺伝子の発現が分析される。p21が化合物の存在下で誘導される発現を、化合物の不在下で誘導される発現と比較され、そして差異は、ここに規定される方法によって細胞の遺伝子発現に影響を及ぼす化合物を同定するために使用される。特定の実施形態では、細胞の遺伝子発現は、市販で入手可能であるような（例えば、ゲノム・システムズ、インク。（Genome Systems, Inc.）、ミズーリー州セントルイスから得られる）オリゴヌクレオチドまたは細胞のcDNAのマイクロアレイを使用して分析される。代替の実施形態では、p21によって誘導または抑制されることが知られている遺伝子が分析される。遺伝子発現は、細胞のmRNAまたはタンパク質を、1つまたは複数のいずれかのp21調節遺伝子について分析することによって、分析されうる。最も好ましくは、これらのアッセイに使用される遺伝子は、表IおよびIIに同定される遺伝子である。

10

20

【0046】

代替の実施形態では、このような化合物は、p21指向性実験的操作に独立して同定される。このようなアッセイで、細胞が処理されて、上に開示される方法のいずれかで老化を誘導し、それに限定されないが、細胞毒性薬剤、放射線または細胞の分化剤、または腫瘍抑制剤の導入が挙げられる。p21によって抑制または誘導される遺伝子の発現は、試験化合物の存在または不在下で分析される。最も好ましくは、これらのアッセイに使用される遺伝子は、遺伝子発現分析について上で検討されたmRNAおよびタンパク質アッセイの型を使用して、表IおよびIIで同定される遺伝子である。

30

【0047】

代替の実施形態では、p21が誘導される細胞は、さらに、p21によって誘導または抑制される細胞遺伝子のプロモーターの転写制御下で、レポーター遺伝子をコードする組換え発現構築物を包含する。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p21によって抑制される遺伝子であり、そしてプロモーターは、表Iに同定される遺伝子から由来する。このような遺伝子についての公知プロモーターの例は、ORC1、PRC1、XRCC9、CDC2、サイクリンB1、AIK1、CENP-A、CENP-F、MAD2、UBR1、MCAK、HSET、CHL1、サイモポイエチン、MPP2、MPP5、CDC47/MCM7、CDC21/MCM4、DNAリガーゼI、DNAポリメラーゼ、RAD54、HEX1/RAD2、PLK1、DHF_Rまたはシトロンキナーゼが挙げられる。好ましい実施形態では、細胞の遺伝子は、p21によって誘導される遺伝子であり、そして、プロモーターは、表IIに同定される遺伝子から由来する。このような遺伝子についての公知プロモーターの例としては、結合性組織成長因子、血清アミロイドA、補体C3、インテグリン₃、アクチピンA、ナチュラルキラー細胞タンパク質4、プロサポシン、Mac2結合タンパク質、ガレクチン-3、スーパーオキシドジスムターゼ2、グラヌリン/エピセリン、p66^{shc}、リソソームの-ガラクトシダーゼ、またはカテプシンBが挙げられる。好ましいレポーター遺伝子としては、ホタル・ルシフェラ

40

50

ーゼ、 - ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質が挙げられ、その全ては、市販で入手可能である。

【0048】

本発明は、p21で誘導された細胞の老化の効果を仲介する遺伝子を同定する方法も提供する。p21の誘導は、老化、末端分化および細胞の損傷に対する応答に関連した細胞成長停止の絶対に必要な部分であることがわかる。下の実施例で記述されるとおり、cDNAアレイハイブリッド形成は、これらの効果が、遺伝子配列におけるp21で誘導される変化によるかどうかを調査するために使用された。この分析は、p21が、有糸分裂の制御、DNA複製、分離および修復に関与した複数の遺伝子を選択的に阻害することを示した。これらの実験でp21によって誘導される多くのタンパク質は、老化および加齢に関連したか、または硬化症、アルツハイマー病、アミロイド症および関節炎を含めた加齢関連疾病に関与していることを示した。これらの知見は、p21誘導の累積効果が、癌および加齢関連疾病の病因に起因しうることを示唆する。さらに、多くのp21活性化遺伝子は、細胞成長およびアポトーシスにおける強力なパラ分泌効果を示す分泌タンパク質をコードする。この観察と一致して、p21誘導細胞から得られる調整培地は、有糸分裂および抗アポトーシス活性を示した。

10

【0049】

下の実施例で開示される分析は、細胞周期進行遺伝子の阻害が、単にp21-誘導成長停止の結果でないことを示した。これらの遺伝子の内、いくつかの締め出しは、細胞成長停止と共に起こり、そしてp21からの放出による全ての試験遺伝子の抑制は、細胞周期への細胞の再登場に先行した。ORC1(DNA複製の開始について必要とされる)、トポイソメラーゼII(G2でのDNA分離に重要である)、およびPLK1(有糸分裂の開始に関与した)のような即時応答遺伝子の特性は、それらの発現の阻害は、p21による成長停止の誘導における原因的役割を実際に果しうることを示唆した。これらの観察は、本発明の方法の一態様についての根拠を形成し、そしてそれは、哺乳類細胞での細胞周期進行に関与した遺伝子を同定する方法を提供する。

20

【0050】

さらに、即時および早期応答遺伝子の両方についての生物学上の機能は、それらの閉じ込めが、p21で誘導された成長停止を維持する役割を果すことを示す。哺乳類細胞の試験および方法の使用は、p21-誘導成長停止からの放出が、内性複製および有糸分裂の異常性を生じること例示した。DNA複製および有糸分裂は、全てのp21-阻害遺伝子が、再発現されるまで、IPTGからの放出の後に再び始まらず、そしてDNA複製は、有糸分裂の相当前に再び始まった。下の実施例で開示される結果は、長期化したp21誘導が、複製または有糸分裂の「品質制御」に関与した多数のタンパク質を含めて、細胞周期進行に関与した多くのタンパク質の衰退に至ることを示す。細胞が、p21から放出された後に細胞周期に再登場した時間までに、このようなタンパク質の貯蔵を再生させるのに失敗している結果として、異常な複製および異常な有糸分裂が続いて起こった。例えば、倍数体細胞の産生は、長期化されたp21誘導細胞成長停止から開放された後に観察される。細胞の倍数体化に至るプロセスである内性複製は、有糸分裂の確認点制御を廃止したことの結果であり得(Hixonら、Mol. Cell Biol. 18巻: 622-4-37頁、1998年)、そしてそれは、MAD2およびBUBR1のようなp21阻害確認点制御タンパク質の欠乏から生じうる。さらに、倍数体細胞は、細胞質分裂に関連したタンパク質Prcl、Aim1およびシトロンキナーゼの欠乏によって誘発されうる細胞質分裂の不全により生じ得て、そしてそれは、p21によって阻害されることがわかった。

30

40

【0051】

p21から放出された後に観察された、異なる有糸分裂の異常性は、MAD2、BUBR1、PLK1、AIK1、CENP-A、CHL1およびMCAK(LiおよびBen Ezra、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻: 10436-10440頁、1996年; Gloverら、Genes Develop. 12巻: 37

50

77 - 3787頁、1998年；Chanら、*J. Cell Biol.* 146巻：941 - 954頁、1999年）のような、このようなp21 - 阻害遺伝子の産物のような、適切な染色体整列および分離を制御するタンパク質の突然変異または阻害から生じることが先に見られた。p21 - 誘導有糸分裂の異常性におけるこのようなタンパク質の役割は、有糸分裂制御タンパク質の減退および再合成の時間経過の分析によって支持される。したがって、再開した有糸分裂の時間（放出の36時間後）に、有糸分裂の開始について要求されるCdc2およびPlk1の貯蔵は、未処理細胞に匹敵するレベルまで再生される（図7Bに示されるとおり）。対照的に、その機能は、染色体が有糸分裂の紡錘体に適切に付着している限り、後期を防止するMAD2は、いっそう効率が低く再合成される（図7B）。さらに、IPTG処理の1日後に残るMAD2レベルは、3日またはそれ以上の後よりいっそう高く（図7B）、そしてそれは、p21誘導の1日後に放出される細胞中の異常な有糸分裂の頻度が低いことと一致する。

10

【0052】

p21過剰発現は、DNA修復を阻害することが報告されている（Panら、*J. Biol. Chem.* 270巻：22008 - 22016頁、1995年；Umarら、*Cell* 87巻：65 - 73頁、1996年）。我々の結果の点で、p21のこの効果は、XRCC9、RAD54、HEX1/RAD2、RAD21相同体およびDNAリガーゼIのようなDNA修復遺伝子の阻害に起因しうる。DNA修復の阻害は、p21誘導成長停止から回復する細胞における突然変異の頻度を増加させるようでもあり、それにより、このような細胞の全体的な遺伝的不安定性に起因する。

20

【0053】

正常な細胞におけるp21誘導遺伝的動揺化は、強力な発癌効果をも示しうる。老化細胞の成長停止は、一過性p21誘導によって誘発される一方で、別のCDK阻害剤p16は、p21の衰退の後、成長停止を維持する原因であるようである（Alcortaraら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93巻：13742 - 13747頁、1996年）。p16（p21に対する強烈な対照）は、本研究で使用されたHT1080線維肉腫を含めてヒト腫瘍中で頻繁に突然変異される（HallおよびPeters、*Adv. Cancer Res.* 68巻：67 - 108頁、1996年）。p16突然変異の一次発癌効果が、発育不全の老化である場合、それにより突然変異p16を発現する細胞は、長期化したp21有糸分裂に出会う。ここに開示される結果と一致して、これらの条件下の細胞周期への再登場は、核型の異常性の発生を生じると予想される。p16と異なり、p21は、このプロセスにおける腫瘍サプレッサーとしてより癌遺伝子としてより作用し、そして癌におけるp21突然変異の希少性を説明できる。

30

【0054】

したがって、本発明は、p21誘導細胞周期停止を阻害することによって、抗発癌性効果を示す化合物を同定する方法を提供する。これらの方法によって生成される化合物は、核型の異常性を示す細胞の発生を最小にできると予想され、そしてそれは、順次、このような細胞が、悪性疾患に発展する見込みを減じることが予想される。

【0055】

本発明は、老化を誘導または促進する化合物を同定する方法を提供する。この態様では、本発明は、p21発現によって阻害される遺伝子の阻害を増加する化合物を提供する。細胞分裂および細胞周期進行制御遺伝子の阻害は、細胞がp21誘導後の細胞周期の再登場することを防止し、そして不可逆の成長停止を生じることがここに示される。したがって、このような遺伝子のp21誘導抑制を誘導または増強する化合物は、細胞老化および末端成長停止を促進する上で有効である。したがって、本発明は、細胞周期進行を制御する細胞の遺伝子、最も好ましくは表Iに同定される遺伝子を阻害する化合物を同定する方法を提供する。好ましい実施形態では、化合物は、哺乳類細胞、最も好ましくは腫瘍細胞、増殖性細胞または過剰増殖のため病理学または疾病を引き起す任意の細胞型の老化を促進するために使用される。哺乳類細胞のこの態様の好ましい実施形態では、哺乳類細胞は、化合物の存在または不在下で、哺乳類細胞中でp21を誘導する；p21によって抑制さ

40

50

れる遺伝子の発現について細胞を分析する；そして遺伝子が、化合物の不在下でより化合物の存在下で大きな範囲に抑制される場合に、老化のポテンシエーターとして化合物を同定する段階を包含する。本発明の方法の他の態様では、哺乳類細胞中で老化を促進する化合物は、例えば、上に開示される方法のいずれかで細胞中の老化を誘導することにより p 2 1 指向性の実験的操作から独立に同定される。老化が、p 2 1 不足細胞でさえ誘導されうること (Changら、Oncogene 18 巻：4808 - 4818 頁、1999 年、および Pantojaら、Oncogene 18 巻：4974 - 4982 頁、1999 年)、および全てのトランスレチン酸を用いた MCF-7 細胞の処理 (Changら、Cancer Res. 59 巻：3761 - 3767 頁、1999 年) のような、ある種の老化誘導処理が、p 2 1 の細胞のレベルにおける増加よりむしろ減少に関連すること (Zhuら、Exp. Cell Res. 234 巻：293 - 299 頁、1997 年) は当業界で知られている。

10

【0056】

本発明は、本発明の方法によって同定される化合物に細胞を接触させる段階を包含することを特徴とする、哺乳類細胞中の老化を増強する方法も提供する。好ましい実施形態では、哺乳類細胞は、腫瘍細胞、増殖性細胞または過剰増殖により病理学または疾病を引き起こす任意の細胞型である。代替の実施形態では、方法は、放射線または抗癌、細胞毒性、または抗増殖性薬剤と細胞を接触させる追加の段階を包含する。

【0057】

遺伝子発現における p 2 1 誘導の観察される効果は、細胞老化および生物の加齢に関連した変化との膨大な相互関係を示す。これらの相互関係は、p 2 1 で阻害される遺伝子の分析から来る。したがって、老化線維芽細胞は、我々が p 2 1 誘導によっても観察されたとおり、低い Rb のレベルを表すことが報告された (Steinら、Mol. Cell Biol. 19 巻：2109 - 2117 頁、1999 年)。3つの p 2 1 阻害遺伝子 CHL1、CDC21 および RAD54 は、ヘリカーゼファミリーの構成員をコードすることも興味がある。ヘリカーゼ基の別のタンパク質における欠乏は、ワーナー症候群、早発の加齢に関連した臨床的症状の原因、そして細胞のレベルで、培養物中の細胞の促進された老化として同定された (Grayら、Nature Genet. 17 巻：100 - 103 頁、1997 年)。

20

【0058】

しかし、老化表現型との最強の相互関係は、p 2 1 誘導遺伝子の同定から来て、そしてその多くは、複製的老化または生物加齢の間、それらの濃度を増加することが知られている。ECMタンパク質の過剰発現は、反復性老化の公知優良の証明であり、これらの群中の2つの p 2 1 誘導遺伝子フィブロネクチン1 およびプラスミノゲンアクチベーター阻害剤1 (PAI-1) は、細胞の老化に頻繁に関連してきた (Crisofalo および Pignolo、Exp. Gerontol. 31 巻：111 - 123 頁、1996 年で再検討)。老化線維芽細胞で過剰発現されるとも報告された他の p 2 1 誘導遺伝子としては、組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) (Westら、Exp. Gerontol. 31 巻：175 - 193 頁、1996 年)、カテプシン B (diPaoloら、Exp. Cell Res. 201 巻：500 - 505 頁、1992 年)、インテグリン 3 (Hashimotoら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 240 巻：88 - 92 頁、1997 年)、および APP (Adlerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 巻：16 - 20 頁、1991 年) が挙げられる。数種の p 2 1 誘導タンパク質の発現は、t-PA および PAI-1 (Hashimotoら、Thromb. Res. 46 巻：625 - 633 頁、1987 年)、カテプシン B (Bernsteinら、Brain Res. Bull. 24 巻：43 - 54 頁、1990 年)、アクチピン A (Loriaら、Eur. J. Endocrinol. 139 巻：487 - 492 頁、1998 年)、プロサポシン (Mathurら、Biochem. Mol. Biol. Int. 34 巻：1063 - 1071 頁、1994 年)、APP (Ogomoriら、J. Gerontol. 43 巻：B157 - B162 頁、198

30

40

50

8年)、SAA (RosenthalおよびFranklin、J. Clin. Invest. 55巻: 746 - 753頁、1975年)およびt-TGエース (Singhら、J. Investig. Med. 45巻: 567 - 575頁、1997年)を含めた生物加齢に相互関係することが示された。

【0059】

細胞老化の最も一般的に使用されるマーカーは、SA-gal活性である (Dimriら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻: 9363 - 9367頁、1995年)。この遺伝子は、IPTGで処理されたp21-9細胞で強力に上昇される (Changら、Oncogene 18巻: 4804 - 4818頁、1999年)。SA-galは、活性が増加され、そしてリソソームのβ-ガラクトシダーゼの改変配置を示すことが示唆され (Dimriら、1995年、上記)、そして他の研究は、老化細胞中のリソソーム活性が上昇されたことを記述した (CristofaloおよびKabakijan、Mech. Aging Dev. 4巻: 19 - 28頁、1995年)。5つのリソソームの酵素は、表IIに表され、N-アセチルガラクトサミン-6-スルフェートスルファターゼ (GALNS)、カテプシンB、酸β-グルコシダーゼ、酸リパーゼAおよびリソソマル (lysosomal) ペプスタチン-不感受性プロテアーゼが挙げられる。p21も、ミトコンドリアのタンパク質SOD2、メタジンおよび2,4-ジエノイル-CoAレダクターゼの遺伝子を上方調節し、そしてそれらは、老化細胞中で過剰発現される、異なるミトコンドリアの遺伝子の報告に相互に関係している (Doggettら、Mech. Aging Dev. 65巻: 239 - 255頁、1992年; Kodamaら、Exp. Cell Res. 219巻: 82 - 86頁、1995年; Kumazakiら、Mech. Aging Dev. 101巻: 91 - 99頁、1998年)。

【0060】

以下の実施例で開示されるとおり、p21-9細胞でのp21誘導の効果と、正常な線維芽細胞での老化と関連した変化との間に多くの類似性がある。特に、老化細胞は、転移を促進しうる様々な成長因子およびECMタンパク質を過剰生成することが示された (Campisiら、J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3巻: 1 - 5頁、1998年)。数種の成長因子および成長因子レセプターは、強力なp21誘導の条件下で、p53-依存性手段での照射により誘導される遺伝子の中でも同定された (Komarovaら、Oncogene 17巻: 1089 - 1096頁、1998年)。興味深いことに、これら遺伝子の内のほとんどは、それらのプロモーター中にp53-結合部位を含まなかった。我々の結果は、p53による成長因子の誘導が、p21誘導を通して仲介される間接的効果でありうることを示唆する。

【0061】

したがって、本発明は、細胞の老化に関係する遺伝子、特に、老化の間に、そして特にp21発現により誘導される遺伝子を同定する方法を提供する。本発明は、このような遺伝子のp21-仲介誘導を阻害しうる化合物を同定する方法も提供する。このような化合物は、遺伝子配列のp21-仲介誘導におけるそれらの効果により細胞の老化を減少、抑制または逆行させる許容性を示すことが予想される。

【0062】

印象的なことに、我々がp21により誘導されると知見した多くの遺伝子の産物は、アルツハイマー病、アミロイド症、硬化症および関節炎を含めた加齢関連疾病に繋がった。したがって、APPは、アルツハイマーのアミロイドプラークの主要成分であるβ-アミロイドペプチドを生み出す。補体C3 (Veehuisら、Virchows Arch. 426巻: 603 - 610頁、1995年)およびAMPデアミナーゼ (Simsら、Neurobiol. Aging 19巻: 385 - 391頁、1998年)は、アルツハイマー病で役割を果たすことも示唆された。p21によって最も迅速に誘導され、そして細胞分化、癌誘発、アポトーシスおよび加齢の多面発現性メディエーターとして記述されたt-TGエース (Parkら、J. Gerontol. A. Biol. Sci. 54巻

10

20

30

40

50

：B78 - B83頁、1999年)が、アルツハイマー病およびアミロイド症の両方に関連したプラークの形成に参与している(DudekおよびJohnson、Brain Res. 651巻：129 - 133頁、1994年)ことは特に興味深い。後者の疾病は、別のp21誘導異性体産物SAAの沈殿作用により、そしてそれは、硬化症、変形性関節症、リウマチ様関節炎に係わり合いになってもいた(JensenおよびWhitehead、Biochem. J. 334巻：489 - 503頁、1998年)。2つの他のp21 - 上方調節された分泌タンパク質、結合性組織成長因子(CTGF)およびガレクチン3は、硬化症に参与する(Oemarら、Circulation 95巻：831 - 839頁、1997年；Nachtigalら、Am. J. Pathol. 152巻：1199 - 1208頁、1998年)。さらに、カテプシンB(Howieら、J. Pathol. 145巻：307 - 314頁、1985年)、PAI-1(Cerinicら、Life Sci. 63巻：441 - 453頁、1998年)、フィブロネクチン(Chevalier、Semin. Arthritis Rheum. 22巻：307 - 318頁、1993年)、GALNSおよびMac-2結合タンパク質(Sekiら、Arthritis Rheum. 41巻：1356 - 1364頁、1998年)は、変形性関節症および/またはリウマチ様関節炎に関連した。さらに、PAI-1発現が増加したことのような、ECMタンパク質での老化関連の変化は、皮膚および他の組織の構造における年齢特異的な破壊を生じることが提案された(Campisiら、J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 3巻：1 - 5頁、1998年)。加齢細胞によるフィブロネクチン産生が増加したことも、ECMにおけるフィブロネクチンネットワークの密度を増加することが示唆され、そしてそれは、高齢の個人におけるゆっくりとした創傷治癒に寄与しうる(Albinら、Coll. Relat. Res. 8巻：23 - 37頁、1988年)。

【0063】

ここに開示される結果は、p21誘導が、癌または加齢関連疾病の発生の可能性を増加しうる方法で、細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことを示す。p21発現の高まりは、正常な反復性老化でのみならず、細胞損傷に応答しても起こる；両方の場合に、p21誘導の歓迎されない効果は、年齢依存性手段で促進することが予想される。遺伝子発現におけるp21のこれらの効果に起因する特異的分子の相互関係および調節経路の説明は、癌および加齢関連疾病の防止に対する新たなアプローチ法を示唆しうる。

【0064】

したがって、本発明は、加齢関連疾病に関連した遺伝子を同定する方法を提供する。本発明は、このような遺伝子のp21仲介誘導を阻害しうる化合物を同定する方法をも提供する。このような化合物は、加齢関連疾病を防止、妨害または逆行する治療的許容性を示すことが予想される。

【0065】

その発現がp21によって調節される遺伝子を同定する方向に向けられた本発明の方法は、p21発現を実験的に誘導する能力を利用する。誘導性p21遺伝子を含む本発明により提供される場合の細胞は、p21発現による誘導、抑制および開放された遺伝子の発現状況に反映する細胞のmRNAを単離するために使用されうる。p21が、誘導されない投薬を受けたことのない細胞は、細胞のmRNAの比較、対照源を供する。複数の核酸、最も好ましくは、消去式ハイブリッド形成法を用いて分化cDNAライブラリーを構築することによって誘導または抑制遺伝子のいずれかについて特異的である細胞のmRNAのcDNAコピーが得られうる。例えば、Diatchenkoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93巻：6025 - 6030頁、1996年参照。p21誘導の前後に単離されたmRNAまたはcDNAは、アレイ化または非アレイ化cDNAライブラリーのいずれかを使用することによりハイブリッド形成分析のためのプローブとしても使用でき、そして分化的に発現された遺伝子は、このようなハイブリッド形成から同定されうる。一般に、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー

・プレス、ニューヨーク、1990年参照。代わりに、消去されたcDNA集団の示差表示が行われて、p21発現によって上方調節または下方調節のいずれかをされる遺伝子の集団を生じうる。

【0066】

追加の実施形態では、p21発現によって上方調節または下方調節される遺伝子は、当業界で十分に知られた分子クローニング技術を使用して単離されうる。Sambrookら、上記。上に記述されるとおり生成された示差cDNAライブラリーは、適切なcDNA集団についてのプローブを富化する消去式ハイブリッド形成法を使用して、p21により誘導または抑制される遺伝子に特異的なプローブを用いてスクリーニングしうる。代わりに、このようなプローブは、全長または全長に近いcDNAを含むコロニーの含有率を最大にし、p21で調節された遺伝子、特に本発明の方法を使用して同定された新規遺伝子のクローニングを促進するために構築された従来的に作成されたcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用されうる。上記遺伝子も、本発明の範囲内に入ることが意図される。

10

【0067】

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態をさらに例示するが、特性で制限しないことが意図される。

【実施例1】

【0068】

誘導性p21遺伝子を含む哺乳類細胞の産生

ヒト線維肉腫細胞株HT1080の組換え誘導体p21-9を、Changら(Oncogene 18巻:4808-4818頁、1999年)により基本的に生成された。この培養細胞株は、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)により調節されるプロモーターの転写制御下でp21コーディング配列を含有した。p21の発現は、十分な量のIPTGの存在下でこれらの細胞を培養し、それによりp21発現の後遺症を、内因性p21遺伝子の誘導が、刺激する可能性あるあらゆる追加の効果の不在下で研究せしめる。この培養細胞株は、2000年4月6日に、受託番号第_____号の下に米国バージニア州マナサスのジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A.T.C.C.)に寄託された。

20

【0069】

簡便には、プラスミド3'SS(ストラタジーン)(ChangおよびRoninson、Gene 33巻:703-709頁、1996年に記述され、参照して組込まれる)によってコードされるネズミの環境親和性レトロウイルスレセプターおよび修飾された細菌性lacIリプレッサーを発現するHT1080のサブラインを、その構造が図1に示される組換えレトロウイルスLNp21CO3を含むレトロウイルスの粒子で感染させた。このレトロウイルスベクターは、レトロウイルスの長い末端反復プロモーターの転写制御下で、細菌のネオマイシン耐性遺伝子(neo)を含有する。p21コード化配列は、neo遺伝子の転写方向と反対の方向で、そして修飾されたヒトサイトメガロウイルスプロモーターの制御下でクローン化する。特にCMVプロモーターは、細胞中で発現されるlacIリプレッサーに感受性のあるプロモーターから発現させる細菌のlacオペレーター配列と比べて、3倍の反復を含む。LNp21CO3は、本来のベクターLNXC03(ChangおよびRoninson、上記で開示された)のNotIおよびBglII部位に21pコーディング配列を含む492bpのDNAの断片をクローニングすることによって構築された。

30

40

【0070】

感染後、LNXC03ベクターで感染した細胞が、400μg/mL G418(メリーランド州ゲーザースバーグのBRL-GIBCOから得た)の存在下で細胞を培養することによって選択された。クローナルラインp21-9は、クローナル細胞株が得られるまで終点希釈によってLNp21CO3形質導入G418耐性細胞株から誘導された。

【実施例2】

50

【0071】

細胞成長アッセイ

実施例1で記述されたとおり産生されたp21-9細胞は、p21が細胞中で発現されたときに、細胞成長におけるどのような変化が起こったかを決定する細胞成長アッセイで使用された。

【0072】

p21-9細胞でのLNp21CO3ベクターから得られるp21発現が、10%牛胎児血清（ハイクロン（Hyclone）、ユタ州ローガン）およびIPTGを含有するDMEM培地中で細胞を培養することによって誘導された。これらのアッセイの結果は、図2Aおよび2bで示された。図2Aは、50μM IPTGの存在下で培養された細胞中のp21タンパク質産物の時間経過を示す。p21遺伝子発現は、成長培地中へのIPTGの導入の後、6および12時間の間、増加し、そしてその発現は、約24時間誘導後にピークに達した。IPTG含有培地から細胞を取出すことによって、p21発現は、それが生じたのとほとんど同じくらい迅速に上昇し、IPTGが除去された後の約24時間にレベル予め誘導に戻した（図2B）。

10

【0073】

IPTGの存在下で細胞成長は、3つの方法で分析された：³H-チミジン取込み（「標識指数」と称される）を測定すること；顕微鏡により培養物中の有糸分裂細胞の数（「有糸分裂指数」と称される）を観察すること、および様々な比率の細胞周期で、培養細胞の分布（「細胞周期分布」と称される）を測定すること。これらの結果は、図3Aから3Cに示される。

20

【0074】

³H-チミジン取込みアッセイは、Dimriら（Proc. Natl. Sci. U.S.A. 92巻：9363-9367頁、1995年）によって記述されたとおり実質的に行われた。細胞は、3時間、³H-チミジンの存在下で培養され、そしてその後、オートラジオグラフィーによって分析された。オートラジオグラフィーによって測定されるときのDNA複製は、培養用培地にIPTGを添加した9時間後までに全体的に起こった（図3A）。有糸分裂指数は、細胞を顕微鏡下で観察し、そして5μg/mLの4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール（DAPI）で染色した後に有糸分裂中の細胞の数を計算することによって測定され、そして画像は、ライカDMIRB蛍光顕微鏡およびバイテク（Vaytek）（アイオワ州フェアフィールド）の画像システムを使用して収集された。顕微鏡で検出可能な有糸分裂細胞は、2つの段階で、IPTGの存在下でこれらの培養物から消えた：第一は、IPTG添加の0-4時間の間（有糸分裂指数は、未処理細胞で約15%から、IPTG-処理細胞で約5%まで下降した）に、そしてその後再びIPTG添加の約10-14時間後の間（有糸分裂指数は、IPTG添加の約13時間後にゼロに下降した）に起こる（図3B）。

30

【0075】

細胞周期分布は、ベクトン・ディキンソンのFACSORTを使用して、Jordanら（Cancer Res. 56巻：816-825頁、1996年）により記述されたとおりヨウ化プロピジウムで染色した後、DNA含量のFACS分析を使用して測定された。細胞周期分布は、IPTG処理の24時間後に安定化した（図3Cで示された）。この時までには、42-43%のIPTG処理細胞は、それぞれ、G1およびG2で停止され、そして約15%の細胞は、S期DNA含量で停止された。

40

【0076】

p21発現の効果は、p21の効果から細胞を開放し、細胞培養用培地からIPTGを除去することによっても調査された。IPTG-処理p21-9細胞は、形態学上の老化マーカーを示すことが知られている（Changら、上記、1999年）。図2Bに示されるとおり、p21-9細胞におけるp21遺伝子発現レベルは、IPTGの除去後の24時間以内に基本のレベルに戻った。ここで、IPTG-処理p21-9細胞が、IPTGの除去後にクローン性許容量の全ての損失を示すかどうか決定された。これらの実験

50

の結果は、図 4 A から 4 D に示される。

【 0 0 7 7 】

I P T G 処理からの回収についてのコロニーアッセイは、D M E M / 1 0 % F C S 中で、そして I P T G の存在または不在で 1 0 c m 培養皿当たり約 2、0 0 0 の p 2 1 - 9 細胞を平板に載せることによって行われた。それらのコロニー許容量が測定され前に 1 0 日間、細胞にコロニーを形成させた。p 2 1 - 9 細胞を、3 つの濃度の I P T G : 0 . 5 μ M、5 μ M および 5 0 μ M で処理した。これらの処理は、p 2 1 遺伝子発現で、それぞれ、基本の p 2 1 レベル (0 . 5 μ M)、半分 - 極大 (5 μ M) または極大の増加 (5 0 μ M) よりなんら測定可能な増加を誘導しなかった。図 4 A で示されるとおり、0 . 5 μ M I P T G を用いた p 2 1 - 9 細胞の処理は、コロニー形成を阻害しなかった。対照的に、5 μ M または 5 0 μ M の I P T G への細胞の継続的露出は、p 2 1 - 9 細胞のコロニー誘発性を、それぞれ 8 0 % および 1 0 0 % まで減少させた。I P T G が、1 2 または 1 4 時間後に除去されるときに、5 μ M I P T G で処理した細胞は、実質的に低下していないコロニー形成を示した。しかし、5 0 μ M I P T G - 処理細胞は、コロニー誘発性で 5 8 - 6 3 % の減少を示した。3 - 5 日の処理後、5 μ M I P T G で培養される細胞は、5 5 - 5 8 % の減少したコロニー誘発性を示し、そして 5 μ M I P T G で処理した細胞は、9 5 - 9 9 % の減少したコロニー誘発性を示した。これらの結果は、p 2 1 遺伝子発現が衰退した後に回復する細胞の能力が、誘導された p 2 1 のレベルに、そして p 2 1 誘導の期間に逆に関連したことを示す。この結果は、他の細胞培養システムで他方によって得られる結果と一致した (F a n g ら、O n c o g e n e 1 8 巻 : 2 7 8 9 - 2 7 9 7 頁、1 9 9 9 年) 。

【 0 0 7 8 】

コロニー誘発性の損失の原因は、以下のとおり調査された。D N A 複製の再開は、上に記述されるとおり、³ H - チミジン取込みアッセイを用いて I P T G から開放された約 2 0 時間後に最初に検出された。これらの結果は、図 4 B に示される。これらの細胞における有糸分裂の再開は、上に記述されるとおり、有糸分裂指数から測定されるとおり、I P T G 開放の約 3 0 時間後に最初に検出された。これらの結果は、図 4 C に示される。細胞周期の S または M 期に入る細胞の率は、5 日間より 1 日間 (図 4 B および 4 C でそれぞれについての曲線を比較する)、I P T G で処理された細胞でより高かったが、しかし差異は、図 4 A で示されるとおりクローン性回復での対応の差異を占めるほど明らかに十分ではなかった。

【 0 0 7 9 】

クローン誘発アッセイから得られる培養平板の顕微鏡実験は、3 またはそれ以上の日数 5 0 μ M I P T G で処理した平板は、コロニーに発達することに失敗した膨大な単細胞および小型細胞クラスターを含有することを示した。さらに、I P T G からの開放は、I P T G 開放後の最初の 2 日間は、浮遊する細胞の外観に繋がり、そして細胞が、1 日後より I P T G の 3 日後に放出されたときにより高かった (図 4 D に示されるとおり)。これらの浮遊細胞のほとんどは、トリパンブルー染色およびコロニー誘発性における 1 0 0 - 1, 0 0 0 倍減少によって示されるとおり、死滅した。

【 0 0 8 0 】

これらの細胞における p 2 1 誘導の効果は、長期化した I P T G 処理からの放出の後、現れた成長妨害および死滅細胞の D N A 計数を実験することによって、さらに研究された。成長妨害された細胞は、細胞膜に安定に組込み、そして娘細胞の間に均等に分割される親油性発蛍光団である P K H 2 の滞留が増加されたことに基づいて、F A C S を使用して単離された : これは、細胞分裂の各経路で細胞の蛍光における比例した減少に、そして非分裂または死滅細胞における減少に至る (H o r a n および S l e z a k、N a t u r e 3 4 0 巻 : 1 6 7 - 1 6 8 頁、1 9 8 9 年)。これらのアッセイは、C h a n g ら (C a n c e r R e s . 5 9 巻 : 3 7 6 1 - 3 7 6 7 頁、1 9 9 9 年) に記述されるとおりに行われた。未処理 p 2 1 - 9 細胞および 5 日間、5 0 μ m I P T G で処理した細胞を、P K H 2 で標識し、I P T G 不含培地に載せ、そしてそれらの P K H 2 蛍光を、連続し

た日に分析した。図5Aに示されるとおり、IPTG-処理細胞は、対照細胞より後に分裂を開始し、そして増殖細胞の発生ピーク、および高いPKH2蛍光を示す成長を妨害された細胞の肩を伴い、異種PKH2プロファイルを発生した。成長妨害細胞は、老化細胞について特徴づけられる上昇した側面散乱を示した(Changら、1999年、上記)。増殖(PKH2^{low}SS^{low})および成長妨害(PKH2^{high}SS^{high})細胞集団は、IPTGからの放出の6日後FACSによって分離され、そしてそれらのDNA含量は、PI染色によって分析された。成長妨害フラクションは、高いG2/Mフラクションおよび4C DNA含有量より大きいことを示す多数の細胞を示す上で増殖細胞と異なった(図5Bに示される)。後者の細胞の倍数体特性は、染色体18および21について特異的なプローブを用いて、間期核の蛍光in situハイブリッド形成(FISH)によって確認された;これらの実験は、Changら(1999年、上記)で記述されるとおり行われた。高い倍数体およびG2/Mフラクションも、IPTGからの開放の後に収集された浮遊する死滅細胞の中で観察された(図5Cで示された);顕微鏡分析は、これらの死滅細胞の多くが、有糸分裂中であることを示した。

10

【0081】

倍数体細胞の起源を調査するために、IPTGからの開放の後に全体の細胞集団のDNA含量における変化の時間経過を測定した。倍数体細胞の数は、DNA合成の再開と同時に(図4Bを比較)、放出の24-28時間後に非常に増加した(図5Dに示されるとおり)。この結果は、放出細胞の多くが、DNA複製の不定期経路である内性重複を受けていることを示した。しかし、内性重複の時間経過および規模は、IPTGの1日後(図5D)に、または3-5日後に放出された細胞の非常に類似した。

20

【0082】

しかし、5日間阻害されたものと比較して、1日間、IPTGによって阻害された細胞の間の主要な差異は、IPTGから開放された1-2日後に生じる付着した有糸分裂細胞の形態学が、試験されたときに発生した。これらの結果は、図6に示された。未処理の細胞における圧倒的的主要な有糸分裂図が、形態学的に正常に見えた(図6、左)一方で、IPTG処理の後に放出された細胞における有糸分裂図のほとんどは、多数の中心を持つ有糸分裂、不均一な染色体分布および前期停止を含めた膨大な異常性を示した(図6、右)。1日および5日IPTGで処理された細胞における正常な有糸分裂の含有率は、それぞれ、45%および2%であり、そしてそれは、クローン性回復についての対応する値に密接である(38%および1%)。これらの結果は、異常な有糸分裂が、内性重複と一緒に、p21から放出された後のコロニー誘発性の損失に起因することを示唆する。

30

【0083】

これらの結果は、p21の誘導した発現が、遺伝子が発現されるときに細胞における激しい効果でのみならず、細胞周期および成長への細胞の正常な回復になかなか消えず、そして干渉する効果も示すことを示した。

【実施例3】

【0084】

p21遺伝子発現により調節された遺伝子発現の分析

実施例2で開示された結果は、p21誘導の形態学上のおよび細胞周期の結果は、細胞周期進行を制御する遺伝子の抑制の結果でありうることを示唆した。細胞の遺伝子発現におけるp21誘導の効果は、以下のとおり実験された。

40

【0085】

逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析は、細胞周期調査点進行の制御に関与することが知られた遺伝子の発現を調査するために行われた。細胞周期制御およびDNA複製に関与した27の遺伝子の予備RT-PCR分析は、これらの遺伝子の内の8つが、p21-9細胞中のIPTGによって阻害されることを示した。総RNAは、様々な時点で、IPTG処理および開放の間に収集されたp21-9細胞から抽出された。下方調節された遺伝子についての遺伝子発現における変化のRT-PCR分析は、基本的に、Noonanら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻: 7160-

50

7164頁、1990年)によって記述されるとおり行われた。

【0086】

いっそう総合的な分析が、未処理 p21-9 から、および3日間、50 μm IPTG で処理された細胞からポリ(A)⁺RNAを単離することによって行われた。cDNAは、ポリ(A)⁺RNAから製造され、そしてヒトUniGEM V cDNAマイクロアレイを用いたディフュゼンシャルハイブリダイゼーションのためのプローブとして使用され(ミズーリー州セントルイスのゲノム・システムズ, インク. により行われるとおり)、そしてそれは、4,000配列以上で実証された公知ヒト遺伝子および3,000 ESTを含む。2,500以上の遺伝子およびESTは、未処理およびIPTG処理 p21-9細胞の両方から得られたプローブを用いた測定可能なハイブリッド形成シグナルを示した。平衡差次的発現2.5で下方調節されるか、または平衡差次的発現2.0で上方調節された遺伝子は、それぞれ、表IおよびIIに列記される。

10

【0087】

これら遺伝子のうち69の発現が、マイクロアレイに存在するcDNAクローンの挿入物から誘導されるプローブを用いたRT-PCRまたはノーザンハイブリッド形成によって個別に試験された;これらのcDNAは、ゲノム・システムズ, インク. から得られた。さらに、p21タンパク質の酵素連結免疫ソルベントアッセイ(ELISA)測定が、記述された(Changら、Oncogene 18巻: 4808-4818頁、1999年)とおり、WAF1 ELISAキット(ニューヨーク州ユニオンドールのオンコジーン・サイエンスから得られた)を用いて行われた。以下の一次抗体を、免疫プロット

ングのために使用した: Cdc2 (サンタ・クルーズ)、サイクリンA (ネオマーカー)、Plk1 (ザイムド(Zymed)) およびRb (ファルミンゲン(PharMingen)) に対するマウスのモノクローナル抗体; MAD2 (BadCo)、p107 (サンタ・クルーズ)、CTGF (図12; L. Lau博士の寄贈)、Prcl (W. Jiang博士およびT. Hunter博士の寄贈) およびトポイソメラーゼII (Ab0284; W. T. Beck博士の寄贈) に対するウサギのポリクローナル抗体、およびSOD2 (カルバイオケム(Calbiochem)) に対するヒツジのポリクローナル抗体。使用された西洋ワザビペルオキシダーゼ(HRP)接合二次抗体は、ヤギ抗-マウスおよびヤギ抗-ウサギIgG (サンタ・クルーズ) およびウサギ抗-ヒツジIgG (KPL)であった。全てのサンプルにおけるタンパク質濃度は、バイオラッドのタンパク質アッセイキットを用いた測定の後に等しくされた。免疫プロット

ングは、標準手段によって行われ、そしてシグナルは、LumiGlo (KPL)を用いて化学発光によって検出された。

20

30

【0088】

これらの結果は、図7Aから7Cに示される。上に記述されるマイクロアレイアッセイによって推定された遺伝子発現における変化は、38/39下方調節および27/30上方調節された遺伝子について確認された。試験遺伝子のほとんどについてのノーザンハイブリッド形成またはRT-PCRにおける観察されたシグナル差異(図7Aから7C)は、cDNAアレイから測定される平衡差異発現の値(表IおよびII)より高いように見え、それによりcDNAアレイハイブリッド形成は、遺伝子発現におけるp21効果の規模を過少概算する傾向にあることが示唆された。6つの下方調節および4つの上方調節遺伝子の発現における変化は、免疫プロット

ング(図7B)またはザイモグラフィ(示されず)によりタンパク質レベルでも試験され、そして試験された全ての場で確認された。

40

【0089】

遺伝子発現におけるp21-仲介変化が、p21-誘導細胞成長停止に続く近々の効果および長期の効果から構成されることが確認された。この目的のために、IPTGの添加および除去の後のp21-阻害(図7B)およびp21-誘導遺伝子(図7C)の副集団のRNAレベルにおける変化の時間経過が測定された。免疫プロット

ングは、Rbリン酸化(電気泳動移動性により示されるとおり)における、そしてcDNAアレイによりp

50

21によって阻害されるRbおよび数種のタンパク質の細胞レベルにおける、p21誘導された変化の時間経過を分析するために使用された；これらの結果は、図7Bに示される。Rbは、IPTGの添加の1.6時間後と同じくらい早くに、脱リン酸化を受けることが分かった。さらに、Rbタンパク質レベルは、12-24時間の間鋭く減少した（図7Bで示された）が、しかし、明らかな変化は、RB mRNAレベルで検出されなかった（データは示されず）。同様の減少が、Rb-関連タンパク質p107について観察された（図7Aで示された）。

【0090】

1. p21によって阻害された遺伝子発現

全ての試験されたp21阻害遺伝子は、p21誘導および放出に迅速な応答を示した。これらの遺伝子の内5つ（トポイソメラーゼII、ORC1、PLK1、PRC1およびXRCC9）は、IPTGの添加の4および8時間後の間にRNAおよびタンパク質レベルの両方で明らかな阻害を示した（図7B）。このパターンは、細胞成長停止およびRb脱リン酸化の速度論に匹敵する「即時応答」と称された。他のp21阻害遺伝子（CDC2またはDHF Rのような）は、IPTGの添加のわずか12時間後に検出可能なmRNAレベルにおける主要な減少を伴い、DNA複製および有糸分裂の休止の後わずかに遅れる「早期応答」パターンを示した。しかし、全てのp21阻害遺伝子は、細胞がなお成長停止されているとき、およびDNA複製および有糸分裂の再開の前に、IPTGの除去の21-16時間後にそれらの発現を再開した。この分析は、p21阻害遺伝子の発現における変化が、p21誘導および放出の近々の効果であり、そして細胞成長停止および回復の結果ではないことを示した。

【0091】

要約すれば、69の遺伝子および3つのESTは、2.5-12.6の平行分化発現と共に、p21誘導細胞で下方調節されるときにcDNAマイクロアレイによって同定された（表1A）；IPTG処理細胞で下方調節されるときに我々の早期アッセイにより同定される5つの別の遺伝子は、表1Bに列記される。cDNAアレイによって同定された下方調節された遺伝子の目だって高いフラクション（69の内43）は、有糸分裂、DNA複製、分離および修復、そしてクロマチン構築に関連し、それにより、遺伝子発現のp21-仲介阻害の非常に選択的特性を示した。

【0092】

p21-下方調節された遺伝子の最大の群は、有糸分裂のシグナル発生、実行および制御にかかわり合いになっていたことである。これらの遺伝子としては、有糸分裂開始複合体を形成するCDC2およびサイクリンB1、有糸分裂、有糸分裂観察点制御および細胞質分裂（Cl over ら、Genes Develop. 12巻：3777-3787頁、1998年）の発生における役割を果すポロ様キナーゼ（PLK1）、および有糸分裂観察点制御の標的（Hixonら、Mol. Cell Biol. 18巻：6224-37頁、1998年）であるCDC2-相互作用タンパク質CKsHs1が挙げられる。この群にある他の遺伝子は、キセノプス・コンデンシンタンパク質XCAP-Hの相同体、娘染色分体凝集力に関連したRad21修復タンパク質の相同体（Losadaら、Genes Develop. 12巻：1986-1997頁、1998年）、および有糸分裂組換え（McKayら、Genomics 36巻：305-315頁、1996年）、紡錘体形成に関連した中心体結合キナーゼAIK1（Kimuraら、J. Biol. Chem. 272巻：13766-13771頁、1997年）、動原体タンパク質CENP-AおよびCENP-F、ならびに紡錘体観察点制御で中心的役割を果すMAD2およびBUBR1タンパク質（LiおよびBenezra、Science 274巻：246-248頁、1996年；Chanら、J. Cell Biol. 146巻：941-954頁、1999年）、有糸分裂の動原体結合キネシン（MCAK）、間期中心体および有糸分裂の紡錘体に配置されるキネシン様タンパク質HSET、CHL1ヘリカーゼ（有糸分裂の間に適切な染色体分布における役割を果す酵母タンパク質の相同体；Gerringerら、EMBO J. 9巻：4347-4358頁、1990年）、および細胞質

分裂に関与した3つのタンパク質、Prc1、Aim1/Aik2およびシトロンキナーゼ(Jiangら、Mol. Cell 2環: 877-885頁、1998年; Tera daら、EMBO J. 17巻: 667-676頁、1998年; Madauleら、Nature 394巻: 491-494頁、1988年)をコードする。p21は、核のエンベロープ遺伝子ラミンB1およびラミンB2、核の構築に関与したラミン関連ポリペプチド(サイモポイエチン)、およびM期ホスホタンパク質MPP2およびMPP5をコードする遺伝子も阻害する。上記タンパク質の多くでの欠乏は、我々がIPTGからの放出の後のp21-9細胞で観察した同じ事象である、異常な染色体分離および倍数体化を生じることが知られている。

【0093】

多くのp21阻害遺伝子は、DNA複製および分離、クロマチン構築およびDNA修復に関与する。これらの遺伝子のいくつかは、リボヌクレオチドレダクターゼサブユニットM1およびM2、チミジンキナーゼ、チミジン酸シターゼ、ウリジンホスホリラーゼ、およびジヒドロ葉酸レダクターゼを含めたヌクレオチド生合成に関与した酵素をコードする。他のタンパク質は、DNA複製に関与し、それにより複製認可因子Cdc47/Mcm4、Cdc45相同体、起点認識複合体のOrc1タンパク質、DNAポリメラーゼ、B-Myb、37kDサブユニットの複製因子C、およびDNAリガーゼIの成分を包含する。この群としては、複製DNAの分離に関与した遺伝子(トポイソメラーゼII)、後成的に決定される染色体の状態の遺伝形質(クロマチン構築因子-Iのp60サブユニット)、および高移動性群タンパク質1および2のような他のクロマチン成分も挙げられる。数種のp21阻害遺伝子は、DNA後複製修復または細胞周期観察点制御(de Winterら、Nat. Genet. 20巻: 281-283頁、1998年)に関与しうるXRCC9、Rad54組換え修復タンパク質、エキソヌクレアーゼHex1/Rad2、および上記Rad21相同体およびDNAリガーゼIを含めたDNA修復に関連する。

【0094】

cDNAアレイ中のp21阻害遺伝子の60%以上は、有糸分裂、DNA複製、分離および修復に関与する。このような生理学上の選択性は、大規模発現プロファイル研究で先例がない。この観察に対する推論は、その機能が今のところ知られていないp21阻害遺伝子が、細胞周期進行で役割を果すようであることである。実際に、6つのp21阻害遺伝子は、ESTまたは未知機能を示す遺伝子としてcDNAアレイに元来列記されていたが、しかし、データベース調査は、DNA修復の細胞分裂にそれらの産物の3つを結合させた。1つの場合には、元来同定されたESTは、シトロンキナーゼのコーディング配列にゲノムクローン3'で地図作成することが分かった;その後、p21によるシトロンキナーゼ遺伝子の阻害は、そのコーディング配列に基づいてRT-PCRによって例示された。追加のp21阻害遺伝子のクローニングは、哺乳類細胞の分裂に役割を果す新規遺伝子を得るようである。

【0095】

これらの結果も、治療上の介入のための標的であるp21誘導老化の細胞プログラムの成分を発見するさらなる機会を示唆する。遺伝子発現のp21介在阻害が、E2F阻害の結果であることが示唆された(de Toledoら、Cell Growth Differ. 9巻: 887-896頁、1998年)。この解釈と一致して、我々のp21-阻害遺伝子(例えば、CDC2、ORC1、DHFR、サイクリンA1)の小集団は、それらのプロモーター中にE2F部位を含む。他方、E2F部位は、いくつかのp21-阻害遺伝子(例えば、サイクリンB1)のプロモーターで見出される可能性があり、そしていくつかのE2F-依存性遺伝子(例えば、サイクリンE)は、p21誘導により影響を受けなかった(データは示されず)。したがって、E2Fに加えて、まだ同定されていない調節因子としていくつかは、遺伝子発現のp21-仲介阻害に関与しうる。このような追加の因子は、新規製薬学上の標的を表し、上記標的の存在および同定は、哺乳類細胞によって提供される方法および試薬を使用した説明のために利用できる。

10

20

30

40

50

【0096】

2. p21により誘導される遺伝子発現

p21発現により抑制される遺伝子に加えて、上に記述されるアッセイは、p21によって誘導される遺伝子を検出した。p21-誘導遺伝子の遺伝子発現のパターンは、表7Cに示される。p21-阻害遺伝子とは対照的に、p21-上方調節された遺伝子は、IPTGの添加、すなわち、全ての細胞での成長停止の開始後の48時間後にそれらの発現を増加した。1つの試験遺伝子、組織トランスグルタミナーゼ(t-TGエース)が、IPTGの添加の12時間後に、検出可能な増加を示したが、しかしその発現は、ただ48時間まで極大に達した(図7Cで示されるとおり)。さらに、全ての試験遺伝子(t-TGエース以外に)の上昇した発現は、IPTGから開放された後少なくとも3日間、細胞周期の再開の十分に後に、続いた(示されず)。この「後期応答」速度論は、このような遺伝子のp21誘導は、p21仲介成長停止に比べて遅延した効果であることを示した。

10

【0097】

48個の公知遺伝子および6個のESTまたは未知機能を示す遺伝子は、p21-誘導細胞で、2.0-7.8の平衡差次的発現と共に、p21-誘導細胞で上方調節されたときに同定された(表II)。この群の同定可能な遺伝子の非常に高いフラクション(20/48)は、細胞外マトリックス(ECM)成分(例えば、フィブロネクチン1、ラミニン2、Mac-2結合タンパク質)、他の分泌タンパク質(例えば、アクチビンA、結合組織成長因子、血清アミロイドA)、またはECMレセプター(インテグリン3のような)をコードする。これらの分泌タンパク質の内数種、ならびにp21-誘導細胞内タンパク質の大きな群(表II)は、ストレス応答性の様々な形態で誘導されるか、またはストレス関連シグナル形質導入で役割を果たすことが知られている。注目すべきことに、p21によって誘導されることが分かった多くの遺伝子も、細胞の老化、生物の加齢、または様々な加齢関係疾病で上方調節される。

20

【0098】

p21-阻害遺伝子と対照的に、p21によって誘導されることが分かった遺伝子で、細胞成長停止を誘発する任意の公知機能を示すものはない。さらに、このような遺伝子の誘導は、成長停止の開始のはるか後に遅れる後期応答である。興味深くは、数種のp21-誘導遺伝子は、スーパーオキシドジスムターゼ2(SOD2)(Jonesら、Mol. Cell Biol. 17巻: 6970-6981頁、1997年)、t-TGエース(Mirzaら、Amer. J. Physiol. 272巻: G281-G288頁、1997年)、アルツハイマー病のアミロイド前駆体タンパク質(APP)(Grillira、J. Biol. Chem. 271巻: 15002-15007頁、1996年)および炎症タンパク質血清アミロイドA(SAA)(JensenおよびWhitehead、Biochem J. 334巻: 489-503頁、1998年)を含めたNF-Bにより積極的に調節される。p21は、転写コファクターp300におけるその効果を通してNF-B依存性転写を活性化する(Perkinsら、Science 275巻: 523-527頁、1997年)ので、p300または関連転写コファクターの活性化が、上方調節された遺伝子のいくつかにおけるp21の効果に起因しうることが可能である。しかし、遺伝子発現のp21-仲介誘導の遅延した速度論は、この誘導が、p21の即時効果のかなり下流で起こることを示唆する。

30

40

【0099】

これらの結果、および表IIで規定される遺伝子の特性は、これらの遺伝子の発現が、p21の成長停止機能に関与しないことを示す。しかし、豊富なp21-活性化遺伝子の産物の中で我々が見出した分泌タンパク質が、重要な生理学上の結果を示す。下の実施例5に開示されるとおり、p21-誘導細胞から得られる調整培地は、p21-上方調節遺伝子の特性によって推定される2つの生物学上の効果を示す: 細胞成長の刺激およびアポトーシスの抑制。p21-誘導細胞の上で検討された遺伝的不安定と一緒にして、この知見は、p21の「パラ分泌」効果が、近隣細胞における腫瘍促進効果を通して、癌誘発に寄与しうることを示唆する。これは、p21で仲介された遺伝子誘導の抑制が、抗癌誘

50

発効果を達成する方法を提供しうるといふ、そして p 2 1 - 仲介遺伝子誘導経路が、癌防止薬剤の新たな発生のための合理的薬剤設計の標的であるといふ可能性を生じる。

【 0 1 0 0 】

観察された p 2 1 誘導のパラ分泌、抗 - アポトーシス効果は、プロサポシンおよびガレクチン - 3、我々が p 2 1 によって誘導されると知見した分泌タンパク質 (表 I I) の報告された活性と一致する。抗 - アポトーシス活性は、p 2 1 - 誘導された細胞内タンパク質 S O D 2 (Mannaら、J . B i o l . C h e m . 2 7 3 巻 : 1 3 2 4 5 - 1 3 2 5 4 頁、1 9 9 8 年) および R - R a s (Suzukiら、F E B S L e t t . 4 3 7 巻 : 1 1 2 - 1 1 6 頁、1 9 9 8 年) に関連した。逆説的に、p 2 1 - 誘導 t - T G エースおよびカテプシン B (Singhalら、J . I n v e s t i g . M e d . 4 5 巻 : 5 6 7 - 5 7 5 頁、1 9 9 7 年) は、後アポトーシス機能にあるとされた。アポトーシスにおける p 2 1 の効果に関する文献に反対する報告がある。ある種のシステムでは、p 2 1 過剰発現は、アポトーシスを誘導した (Prabhura、C l i n . C a n c e r R e s . 2 巻 : 1 2 2 1 - 1 2 2 9 頁、1 9 9 6 年 ; T s a o ら、J . V i r o l . 7 3 巻 : 4 9 8 3 - 4 9 9 0 頁、1 9 9 9 年) が、しかし他の研究では、p 2 1 は、数種の型の処理によって誘導されるアポトーシスから細胞を保護した (Gorosperら、O n c o g e n e 1 4 巻 : 9 2 9 - 9 3 5 頁、1 9 9 7 年 ; Luら、O n c o g e n e 1 6 巻 : 7 0 5 - 7 1 2 頁、1 9 9 8 年 ; B i s s o n n e t t e および H u n t i n g、O n c o g e n e 1 6 巻 : 3 4 6 1 - 3 4 6 9 頁、1 9 9 8 年)。ここに開示される結果は、抗 - アポトーシスおよび後アポトーシスの遺伝子の両方が、アポトーシスにおける p 2 1 の効果における矛盾した報告を説明しうることを誘導する。

10

20

【 実施例 4 】

【 0 1 0 1 】

I P T G - 処理および血清 - 不足 p 2 1 - 9 細胞を比較することによる p 2 1 誘導の特異性の同定

細胞成長停止の結果であるようである細胞の遺伝子発現における p 2 1 - 誘導された変化の同一性は、以下の通り決定される。類似の実験は、p 2 1 の切断形態 (アミノ酸 1 - 9 0 を包含する) を使用することによって行われ、そして同一の結果が得られた。

【 0 1 0 2 】

成長停止 (静止) は、4 日間、血清不含培地中で細胞を培養することによって生じた血清不足によって、p 2 1 - 9 細胞で誘導された。血清不足細胞で、I P T G 処理 p 2 1 - 9 細胞と異なり、細胞は、老化形態学を発生せず、そしてただ非常に弱い S A - g a l 発現を示した。血清不足細胞における p 2 1 レベルは、I P T G 処理細胞で見られる 1 5 - 2 0 倍増加に対峙するように、ほんの約 2 倍に増加された。図 7 D は、血清不含培地で 4 日、または 5 0 μ M I P T G の存在下で 3 日後に成長が停止された p 2 1 - 9 細胞での p 2 1 - 阻害および p 2 1 - 誘導遺伝子の群の発現について、上に記述されるとおりに行われた R T - P C R 分析を示す。培養用培地が、5 0 μ M I P T G を含有する場合には、p 2 1 - 9 細胞で完全に阻害された遺伝子は、血清不足細胞でも阻害されたが、しかしこれらの細胞のほとんどは、I P T G - 処理細胞でより小さな範囲に阻害された。

30

【 0 1 0 3 】

その発現が p 2 1 に誘導される遺伝子は、3 つの固有のパターンを示した。第一の群は、その発現が、老化を示す細胞でと同じくらい静止細胞で強力に誘導される遺伝子である。これらとしては、ガレクチン - 3、スーパーオキシドジスムターゼ 2、補体 C 3 およびプロサポシンが挙げられ、それによりそれらの導入は、細胞成長停止の結果であったこと、またはこのような遺伝子が、わずかに上昇した p 2 1 レベルに見事に感受性があったことを示す。第二の群は、静止細胞で上方調節されたが、老化を示す細胞でと同様に強力でない遺伝子である。これらの遺伝子としては、フィブロンectin - 1、M a c 2 結合タンパク質およびアルツハイマー前駆体タンパク質血清アミロイド A が挙げられる。第三の群は、静止細胞で検出可能には誘導されないが、老化を示す細胞で強力に誘導される遺伝子である。これらの遺伝子としては、C T G F、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤 1

40

50

、組織トランスグルタミナーゼまたはナチュラルキラー細胞マーカータンパク質NK4、インテグリン・ベータ3およびアクチビンAが挙げられる。

【0104】

血清不足による静止の誘導に対するある種の遺伝子の応答と、p21のIPTG-誘導過剰発現を通じた細胞の老化との間の差異は、老化の診断用マーカーとしてこれらの遺伝子を同定した。さらに新規老化マーカーは、現在は、p21-発現と静止細胞の間でのこれらの発現を比較することによって同定できる。

【実施例5】

【0105】

有糸分裂因子を含む調整培地の生成および有糸分裂の活性アッセイ

数種のp21-上方調節された分泌タンパク質は、CTGF (Bradhamら、J. Cell Biol. 114巻: 1285 - 1294頁、1991年)、アクチビンA (Sakuraiら、J. Biol. Chem. 269巻: 14118 - 14122頁、1994年)、エピセリン/グラヌリン (Shoyabら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻: 7912 - 7916頁、1990年) およびガレクチン-3 (Inoharaら、Exp Cell Res. 245巻: 294 - 302頁、1998年) を含めた成長因子として、そして小さな範囲のクルステリン (Koch-BrandtおよびMorgans、Prog. Mol. Subcell. Biol. 16巻: 130 - 149頁、1996年)、プロスタサイクリン-刺激因子 (PSF; Yamauchiら、Biochem. J. 303巻: 591 - 598頁、1994年)、血管の上皮成長因子-C (VEGF-C; Joukovら、EMBO J. 15巻: 290 - 298頁、1996年)、ゲルソリン (Ohtsuら、EMBO J. 16巻: 4650 - 4656頁、1997年) およびメタロプロテイナーゼ-1 (TIMP-1; Hayakawaら、FEBS Lett. 298巻: 29 - 32頁、1992年) 組織阻害剤に作用する。これらの結果は、p21誘導が、パラ分泌有糸分裂効果を引起しうることを示唆した。さらに、ガレクチン-3 (Akahaniら、Cancer Res. 57巻: 5272 - 5276頁、1997年) およびプロサポシン (Hiraiwaraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻: 4778 - 4781頁、1997年) は、抗-アポトーシス活性を示すことが示された。IPTG-処理p21-9細胞から得た調整培地を、それが、細胞成長およびアポトーシスにおける効果を示すかどうかを調べるために試験された。

【0106】

これらの実験で、調整培地は、DMEM/10% FCSの存在下で15cm平板当たり 10^6 個のp21-9細胞を載せることによって製造した。次の日に、IPTGを、50 μ Mの最終濃度に添加し、そしてこの培地を、3日後に、0.5% FCSおよび50 μ M IPTGで補足したDMEMに交換した。2日後 (IPTG処理の3-5日後)、この調整培地を、収集し、そして使用の15日前まで4で保存した。未処理細胞成長に、IPTG-処理細胞と同じ密度までIPTG不含DMEM/0.5% FCSを添加し、そしてその2日後に培地を収集することによって、対照培地を製造した。

【0107】

ゆっくりと成長するヒト線維肉腫細胞株HS15.Tは、これらの調整培地での有糸分裂活性に向けるために使用された。有糸分裂活性アッセイについて、両方の型の調整培地、ならびに新鮮培地、および調整培地および新鮮培地の1:1混合物を、有糸分裂活性を試験するために使用した。これらの実験で、調整培地は、1%または2% FCSで補足された。簡便には、HS15.T細胞を、ウエル当たり $15,000$ 細胞で12-ウエル平板に載せた。2日後、これらの細胞を、様々な型の培地で培養した。細胞を、調整培地で、60時間育成し、そして3.13 μ Ci/mLの濃度で 3 H-チミジンを添加し、そして24時間インキュベートした。その後、細胞を収集し、そしてそれらの 3 H-チミジン組込みを、Moscaら (Mol. Cell Biol. 12巻: 4375 - 4383頁、1992年) によって記述されるとおり測定した。

10

20

30

40

50

【0108】

新鮮培地にIPTGを添加することは、このアッセイに効果を示さなかった（示されず）。図8Aに示されるとおり、新鮮培地でと、未処理p21-9細胞から得られる調整培地での細胞成長の明らかな差異はなかった。対照的に、IPTG-処理細胞から得られた調整培地は、3倍まで³H-チミジン組込みを増加した（図8A）。IPTG-処理細胞から得られる調整培地によるHS15.Tの成長刺激が、メチレンブルー染色によっても検出可能であった（データは示されず）。

【0109】

アポトーシスにおけるこの調整培地の効果も、測定された。これらの実験は、マウス胚線維芽ラインC8を使用し、E1Aによって固定した。この細胞株は、血清不足（Loweら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻: 2026-2030頁、1994年）を含めた様々の刺激によって誘導されるアポトーシスを非常に受けやすい（Loweら、Science 266巻: 807-810頁、1994年；Nikiforovaら、Oncogene 13巻: 1709-1719頁、1996年）。アポトーシスは、6cm平板当たり 3×10^5 個C8細胞を載せ、そして続く日に、その培地を、0.4%血清で補足した新鮮培地、または調整培地（新鮮な血清は添加されず）に交換することによって分析された。DNA含量の分析およびDAPI染色を、24時間および48時間後に行い、そして相対的細胞数を、低血清培地中で48時間の後に、メチレンブルー染色（Perryら、Mutat. Res. 276巻: 189-197頁、1992年）によって測定した。

【0110】

IPTG-処理または未処理細胞から得た低血清新鮮培地または調整培地の添加は、DAPI染色後に、細胞の大半で検出可能な細胞脱離およびアポトーシス形態学により明らかにされるとおり（示されず）、C8細胞でのアポトーシスを迅速に誘導した。しかし、IPTG-処理細胞から得た調整培地が、48時間後に付着したままであった細胞のメチレンブルー染色によって測定されるとおり、未処理細胞から得られる新鮮培地および調整培地に比べて生存の細胞を強力に増加した（図8Bで示されるとおり）。p21-誘導細胞から得られる調整培地の効果は、細胞のDNA含量のFACS分析でよりいっそう明らかであり、そしてそれは、培地交換の24時間および48時間後に付着および浮遊C8細胞を合せて行った（図8B）。多くの他の培養細胞株と異なり、C8細胞のアポトーシスは、DNAの(sub-G1)量を減少しながら、ただ少数の細胞を生成し、そしてG2/M DNA含量で細胞の選択的消失によって特徴づけられる（Nikiforovaら、1996年、上記）。IPTG-処理した細胞から得られる調整培地中の血清不足の細胞は、G2/Mフラクシオンを保持し、そして血清富化培地での対照細胞成長に類似する細胞周期プロファイルを示した（図8B）。それ自身によるIPTGの添加は、C8細胞でのアポトーシスにおける効果をなんら示さなかった。したがって、HT1080細胞におけるp21誘導は、p21-未調節遺伝子の特性により推定されるとおり、有糸分裂および抗-アポトーシス因子の分泌を生じる。

【実施例6】

【0111】

p21-応答性プロモーターにより発現されるレポーター遺伝子を含む組換え発現構築物の産生

プロモーター-レポーター構築物を、以下のとおり、ヒトPLK1、NK4およびSAAプロモーターから作成した。プロモーター特異的DNAのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を、テンプレートとしてHT1080 p21-9細胞を用いて、ゲノムDNAを用いて行った。PCRを、PfuTurboDNAポリメラーゼ（ストラタジーン）および表II Iaに列記されるプライマー・セットを使用して行った。各プライマーセットについてのPCR条件は、表II Ibに記述される。PCR産物が得られ、そしてTOPOTAクローニングベクターpCR2.1/TOPO（PLK1およびSAAについては）またはpCRII/TOPO（NK4については）にクローニングした。これらの構築

10

20

30

40

50

物は、配列決定によって認証され、そしてその後、正しい方向でプロモーターを含む K p n I - X h o 断片を、標準組換え遺伝子技術 (S a m b r o o k ら、上記) を用いて、ルシフェラーゼレポーターベクター p G L 2 基本 (プロメガ、ウィスコンシン州マディソン) 中の K p n I および X h o I 部位に挿入した。

【 0 1 1 2 】

各プロモーター構築物の 2 つの別々に単離されたプラスミドクローンを、一過性形質移入アッセイによって、p 2 1 - 調節について試験した。各プロモーター - ルシフェラーゼ構築物を、1 : 1 比で p C M V - g a l (プロメガ) プラスミドと共に混合し、そして L I P O F E C T A M I N E 2 0 0 0 (リポフェクタミン 2 0 0 0) (ライフ・テクノロジーズ、インク、メリーランド州ゲーザースバーグ) によって H T 1 0 9 0 p 2 1 - 9 細胞に導入した。6 から 8 時間後に、5 0 μ M I P T G を伴うか、または伴わない培地を、形質移入細胞に添加し、そして細胞抽出物を、これらの細胞 6 0 - 7 2 時間後から作成し、そしてルシフェラーゼ活性について分析した (ルシフェラーゼ・アッセイ・システム、プロメガ) 。 - ガラクトシダーゼアッセイを、形質移入効率についての補正対照として使用した。

10

【 0 1 1 3 】

図 9 は、これらの実験の結果を示す。形質移入細胞中の p 2 1 - 誘導により、p 2 1 - 阻害遺伝子 P L K 1 から作成されるプロモーター構築物から得られる発現が減少され (3 から 5 倍) 、そして p 2 1 - 誘導遺伝子 N K 4 および S A A から作成されたプロモーター構築物からの発現は、増加された (N K 4 については 7 から 1 0 倍、そして S A A については 3 0 倍) 。このような結果は、p 2 1 が、それらのプロモーターを調節することによって、これらの遺伝子の発現を上方調節または下方調節すること、およびこのような遺伝子のプロモーター構築物は、遺伝子発現の p 2 1 - 仲介調節について分析するために使用されうることを示す。

20

【 表 1 】

表 IIIa. プライマー配列

プロモーター	センスプライマー(5'→3')	アンチセンスプライマー(5'→3')
PLK1	CCTGTAATCCCAGCATTTGG (配列番号 1)	AGACCTCGATCCGAGCAGA (配列番号 2)
NK4	TGGAGGTAGAAGAGCCCGTAGG (配列番号 3)	GCCAAAAGTTCAAGGAGCCAA (配列番号 4)
SAA	CAGAGTTGCTGCTATGTCCACCA (配列番号 5)	CACTCCTTGTGTGCTCCTCACC (配列番号 6)

30

表 IIIb. P C R 条件

プロモーター	変性	アニーリング	伸長	反復数	産物サイズ
PLK1	94°, 1 分	68°, 1 分	72°, 1 分 40 秒	32	990bp
NK4	94°, 1 分	65°, 1 分	72°, 1 分 40 秒	32	877bp
SAA	94°, 1 分	68°, 1 分	72°, 1 分 40 秒	32	1000bp

40

【 0 1 1 4 】

前述の開示は、本発明のある種の特別の実施形態を包含すると、そして全ての修飾またはそれらの代替的等価物は、付随の請求項に規定されるとおり本発明の概念および範囲内にあると解釈されるべきである。

【表 2】

表 I
p 2 1 誘導により下方調節された遺伝子

A. UniGemVアレイにより同定された p 2 1 で阻害された遺伝子

遺伝子	受託番号	平衡分化実験	確認方法 ^a	
有糸分裂関連:				
CDC2	X05360	2.5	R,W	
CKxHs1(CDC2 キナーゼ)	X54941	5.5	R	
PLK1 (ポロ様キナーゼ)	U01038	5.1	R,W	
XCAP-H 濃縮相同体	D38553	6	R	10
CENP-A (動原体タンパク質 A)	U14518	5.3	R	
CENP-F (動原体タンパク質 F)	U30872	2.5	R	
MAD2	U65410	6.6	R,W	
BUBR1	AF053306	5.9	R	
MCAK (有糸分裂の動原体関連キネシン)	U63743	3.8	R	
HSET キネシン様タンパク質	AL021366	3.6	R	
CHL1 ヘリカーゼ	U75968	3.3	R	
AIK-1(オーロラ/ IPL1 関連キナーゼ)	D84212	4.6	R	
AIM-1(AIK-2;オーロラ/IPL1 関連キナーゼ)	AF004022	10.2	R	
PRC1 (細胞質分裂調節タンパク質 1)	AF044588	12.6	R,W	20
シトロンキナーゼ	H10809	2.7	R	
ラミン B 1	L37747	7		
ラミン B 2	M94362	2.7		
LAP-2 (ラミン関連タンパク質 2)	U18271	4.6	R	
MPP2 (M期リン酸タンパク質 2)	U74612	3.7	R	
MPP5 (M期リン酸タンパク質 5)	X98261	3.7		
DNA複製、分離およびクロマチン構築に関連して:				
チミジンキナーゼ 1	K02581	2.9	R	
チミジル酸合成酵素	X02308	3.9	R	
ウリジンホスホリラーゼ	X90858	2.5	R	30
リボヌクレオチド還元酵素 M1	X59543	4.6	R	
リボヌクレオチド還元酵素 M2	X59618	10.7	R	
CDC47 相同体 (MCM7)	D55716	9.6	R	
CDC21 相同体 (MCM4)	X74794	2.7	R	
CDC45 相同体 (PORC-PI)	AJ223728	4.1	R	
HsORC1 (起点認識複合体 1)	U40152	2.7	R	
DNAポリメラーゼ α	X06745	2.8	R	
複製因子 C (37-kD サブユニット)	M87339	2.6		
B-MYB	X13293	9.1		
HPV16 E1 タンパク質結合タンパク質	U96131	3.7		40
トポイソメラーゼ II α	J04088	8.6	R	
クロマチン構築因子-1 (p60 サブユニット)	U20980	2.7	R	
高移動度群染色体タンパク質 2	X62534	3.7	R	
高移動度群染色体タンパク質 1	D63874	3.6	R	
ヒストン H2A.F/Z 変異体	AA203494	2.8		
DNA修復に関連して:				
XRCC9	U70310	3.6	R	
RAD54 相同体	X97795	5.4	R	

HEX1 5'-3' エキソヌクレアーゼ(RAD2 相同体)	AF042282	5.2	R	
ATP 依存性DNAリガーゼI	M36067	2.5	R	
RAD21 相同体	D38551	2.9	R	
転写およびRNAプロセッシングに関連して：				
推定上の転写因子 CA150	AF017789	2.8		
転写活性化補助因子 ALY	AF047002	3.3		
WHSC1/MMSET (SET ドメインタンパク質)	AA401245	2.9		
NN8-4AG (SET ドメインタンパク質)	U50383	2.8		
EZH2(ゼステ(zeste)相同体2の転写促進因子)	U61145	2.8		10
PTB-関連分断因子	X70944	2.5		
AU 富化要素 RNA 結合タンパク質 AUF1	U02019	2.8		
U-snRNP 関連シクロフィリン	AF016371	2.8		
他の遺伝子：				
3-ホスホグリセレート脱水素酵素	AF006043	4.8		
L型アミノ酸運搬体、サブユニット LAT1	M80244	4.1	R	
ヒアルロンン仲介移動レセプター	U29343	4		
ホルボリン I (PKC-誘導性)	U03891	3.9		
PSD-95 結合ファミリータンパク質	D13633	3.7	R	20
HTRIP (TNF レセプター成分)	U77845	3.6		
NAD 依存性メチレンテトラヒドロ葉酸脱水素酵素	X16396	3.4		
膜糖タンパク質 4F2 抗原重鎖	J02939	3.2		
ムチン様タンパク質	D79992	3.2		
MAC30 (髄膜腫で示差的に発現された)	L19183	2.9		
P52rIPK (インターフェロン誘導タンパク質キナーゼ制御因子)	AF007393	2.8		
推定ホスホセリンアミノ転移酵素	AA192483	2.8		
グルコース 6-リン酸転移酵素	Y15409	2.7		
カルシクリン結合タンパク質	AF057356	2.6		30
オルニチンデカルボキシラーゼ1	X16277	2.6	R	
トロフィニン補助タンパク質 (タスチン)	U04810	2.5		
アシル補酵素Aコレステロールアシル転移酵素	L21934	2.5		
ピニン/SDK3	Y10351	2.5		
未知機能を有する遺伝子：				
EST	AA975298	2.7		
EST	AA034414	2.5		
EST	AA482549	2.5		

B. RT-PCRにより同定された p 2 1 阻害遺伝子：

40

遺伝子	受託番号	UniGemV 結果 ^b
シクリンA 1	U66838	IS
シクリンB 1	M25753	IS
CDC25A	NM_001789	A
ジヒドロリン酸還元酵素	J00140	1.5
ING1	NM_005537	A

^a 略号：R, RT-PCR；W, ウエスタンブロットティング

^b 略号：IS, 不十分なシグナル；A, アレイから不在

【表 3】

表 I I			
p 2 1 誘導により上方調節された遺伝子			
遺伝子	受託番号	平衡分化実験	確認方法 ^a
分泌タンパク質および細胞外マトリックスに関連したタンパク質:			
フィブロネクチン 1	X02761	5.7	R
プラスミノゲン活性化因子阻害因子、I 型	M14083	3.7	R,N
プラスミノゲン活性化因子、組織型	M15518	2.8	Z
ラミニン $\beta 2$	X79683	2.1	
デスモコリン 2a/bb	X56807	3.5	
ポドカリキシン様タンパク質	U97519	2	
アクチピン A (インヒピン βA)	J03634	2	R
ガレクチン 3 (Mac-2)	AB006780	2.4	N
Mac-2 結合タンパク質	L13210	2	R,N
プロサポシン	J03077	2.9	N
CTGF (結合性組織成長因子)	M92934	3.3	N
グラヌリン/エピセリン	AF055008	2.1	N
カテプシン B	L04288	2.4	N
組織トランスグルタミナーゼ	M55153	2.5	R,N,W
P37NB (スリット相同体)	U32907	2.1	
血清アミロイド A タンパク質前駆体	M26152	4	R,N,W
アルツハイマー病アミロイド A4 タンパク質前駆体	D87675	2	R,N
補体 C3 前駆体	K02765	5.9	R,N
テスチカン	X73608	2.1	N
インテグリン $\beta 3$	M35999	2.1	R,N
リソソームのタンパク質:			
N-アセチルガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ	U06088	2.3	N
酸アルファ-グルコシダーゼ	X55079	2.4	N
酸リパーゼ A (コレステロールエステラーゼ)	X76488	2.1	N
リソソームのペプスタチン不感性プロテアーゼ (CLN2)	AF017456	2.5	
ミトコンドリアのタンパク質:			
スーパーオキシドジスムターゼ 2	X07834	3.5	R,N,W
メタキシン	J03060	3.4	
2,4-ジエノイル-CoA 還元酵素	U78302	2	
ストレス応答およびシグナル形質導入に関連した他の遺伝子:			
ユビキチン接合酵素 (UbcH8)	AF031141	2	
ユビキチン特異的プロテアーゼ 8	D29956	2	
RTP/Cap43/Drg1/Nd1 (ニッケル、レチノイド、ホモシステインおよび ER ストレスによる誘導性)	D87953	2.5	
C-193 筋肉アンキリン反復核タンパク質 (サイトカイン誘導性)	X83703	3	
マルチドラッグ耐性に関連した LRP 主要円蓋タンパク質	X79882	2.2	N
β -アレクチン関連 HHCPA78 相同体 (ビタミン D3 により上方調節された)	S73591	4.1	N
R-RAS	M14949	2.4	

RAB13 小型 GTP エース	X75593	2.2		
P66SHC (ski 癌遺伝子)	U73377	2	N	
MK-STYX (MAP キナーゼ脱リン酸酵素様タンパク質)	N75168	2		
H73 核の抗原/MA-3 アポトーシス関連/TIS (抑制されたトポイソメラーゼ阻害剤)	U96628	2.4		
他の遺伝子:				
ナチュラルキラー細胞タンパク質 4	M59807	4.4	R	10
TXK チロシンキナーゼ (T細胞特異的)	L27071	3.8		
X 連結 PEST 含有運搬体	U05321	2.1		
AMP デアミナーゼ 2	M91029	2	N	
FIP2/HYPL ハンチントン相互作用タンパク質	AF061034	2		
DNASE1 相同体	X90392	2.5	N	
転写因子 11	X77366	2		
ヒストン H2A.2	L19779	2.8		
ヒストン H2B	AL021807	2.4		
未知の機能を有する遺伝子:				
23808	AF038192	2.1		20
CGI-147	AA307912	2.1	N	
EST	W89120	2.8		
EST	AI026140	2.5		
EST	AA218982	2.4		
EST	W63684	2		

^a 略号: R, RT-PCR; N, ノーザンハイブリッド形成; W, ウェスタンブロッティング; Z, ザイモグラフィ

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】ヒトHT1080線維肉腫培養細胞株異性体p21-9を産生するために使用されるIPTG調節レトロウイルス性ベクターLNp21CO3の模式図である。

【図2】図2Aは、p21レベルが、ELISAによって測定される、50μM IPTGの添加後のp21誘導の時間経過のグラフである。図2Bは、IPTGの除去後のp21衰退の時間経過のグラフである。

【図3】図3Aは、50μM IPTGの添加後の³H-チミジン標識指数(オートラジオグラフィによって測定されるとおり)における変化の時間経過のグラフである。図3Bは、50μM IPTGの添加後の有糸分裂指数(DAPI染色後に顕微鏡によって測定されるとおり)における変化の時間経過のグラフである。図3Cは、50μM IPTGの添加後の細胞周期分布(ヨウ化プロピジウムに続く蛍光活性化細胞選別(FACS)分析によって測定される)における変化の時間経過のグラフである; - - : 細胞周期のG1期にある細胞; - - : 細胞周期のG2/M期にある細胞; - - : 細胞周期のS期にある細胞。

【図4】図4Aは、p21-9細胞によるコロニー形成での様々な用量のIPTGを用いた処置の期間の効果を示すグラフである; - - : 0.5μM IPTG; - - : 5μM IPTG; - - : 50μM IPTG。図4Bは、50μM IPTGの除去後の³H-チミジン標識指数(オートラジオグラフィによって測定されるとおり)における変化の時間経過のグラフである; - - : 1日; - - : 5日。図4Cは、50μM IPTGの除去後の有糸分裂指数(顕微鏡によって測定されるとおり)における変化の時間

30

40

50

経過のグラフである； - - : 1日； - - : 5日。図4Dは、1日または3日の処置に続く50 μ M IPTGの除去後の浮遊細胞の含有率における変化の時間経過のグラフである；未処置； - - : 1日； - - : - - : 3日。

【図5】図5Aは、FACSによって測定されるとおり、未処理細胞（左）、および5日間、50 μ M IPTGで処理され、そしてIPTG不含培地に放出された細胞（右）のPKH2蛍光プロファイルにおける変化を示す度数分布図である。図5Bは、50 μ M IPTGを用いた5日間の処理、PKH2標識、およびIPTGなしの6日の成長の後、FACSによって単離されたPKH2^{low}SS^{low}（細線）およびPKH2^{high}SS^{high}（太線）細胞集団のDNA含有量のFACSプロファイルの図形表現である。図5Cは、50 μ M IPTGを用いた3日間の処理（左）から、そして未処理の細胞（右）から放出された48時間後、収集される浮遊細胞のDNA含有量のFACSプロファイルの図形表現である。図5Dは、1日のIPTG処理から放出された後、0時間、12時間、24時間、28時間、36時間および48時間で付着した細胞のDNA含有量のFACSプロファイルの図形表現である。

10

【図6】図6は、IPTGから放出された1-2日後に観察された正常な（左）および異常な（右）の有糸分裂図の例を示す顕微鏡写真である（DAP1染色；1,000 \times 倍率で撮影された）。

【図7A-C】図7Aは、注目される遺伝子の発現におけるIPTGで誘導された変化についての、RT-PCR実験（左）、細胞のmRNA発現のノーザンブロット分析（中央）および免疫ブロッティングアッセイのゲル電気泳動パターンの写真である；C：対照の未処理p21-9細胞；I：50 μ M IPTGで3日間処理した細胞。2-マイクログロブリン（2-M）は、RT-PCRについての補正対照、およびノーザンハイブリッド形成についてのS14リボソームのタンパク質遺伝子として使用された。図7Bは、IPTG添加および放出による、注目されるp21で阻害された遺伝子の発現における変化の時間経過を示すRT-PCR実験（左）および免疫ブロッティング分析（右）のゲル電気泳動の写真である。図7Cは、IPTG添加による、注目されるp21で誘導された遺伝子の発現における変化の時間経過のRT-PCR実験（左）、およびノーザンハイブリッド形成分析（右）のゲル電気泳動パターンの写真である。

20

【図7D】図7Dは、未処理対照p21-9細胞（C）、血清不足静止細胞（Q）およびIPTG処理老化細胞（I）における遺伝子発現の比較である。

30

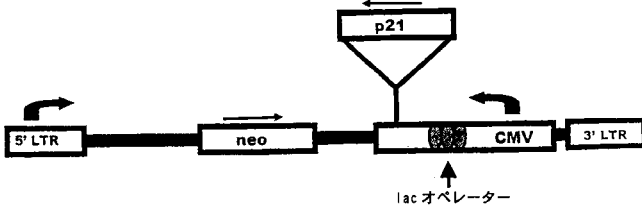
【図8】図8Aは、HS15.T細胞による³H-チミジン組込みにおける、新鮮な培地（F）、IPTG処理から得た調整培地（I）または未処理p21-9細胞（U）、および1%または2%血清で補足した調整ならびに新鮮培地の1:1混合物（I/FおよびU/F）の効果を示す度数分布図である。図8Bは、10%血清（対照）で、低血清新鮮培地（F）で、またはIPTG処理（I）から、または未処理（U）p21-9細胞で得られる調整培地での24時間または48時間インキュベーション後の付着および浮遊の合せたC8細胞のDNA含有量のFACSプロファイルの図形表現である。同じ培地中の48時間のインキュベーション後の付着細胞（メチレンブルー染色により測定されるとおり）の相対数は、各集合の度数分布図の下に列記される。

【図9】図9は、ルシフェラーゼの発現がp21によって調節される遺伝子から得られるプロモーターの転写制御下にある構築物を含む、細胞中のルシフェラーゼ活性の度数分布図である。p21発現の不在（IPTGなし、空の棒線として示される）および存在（50 μ M IPTGの添加で、影付棒線で示される）下における発現は、ポロ様キナーゼ（PLK1）、ナチュラルキラー細胞タンパク質4（NK4）、および血清アミロイドA（SAA）から得られるプロモーターを含む実施例6により製造される構築物について示される；各プロモーター構築物は、2つの独立の構築物クローンを使用して試験された。

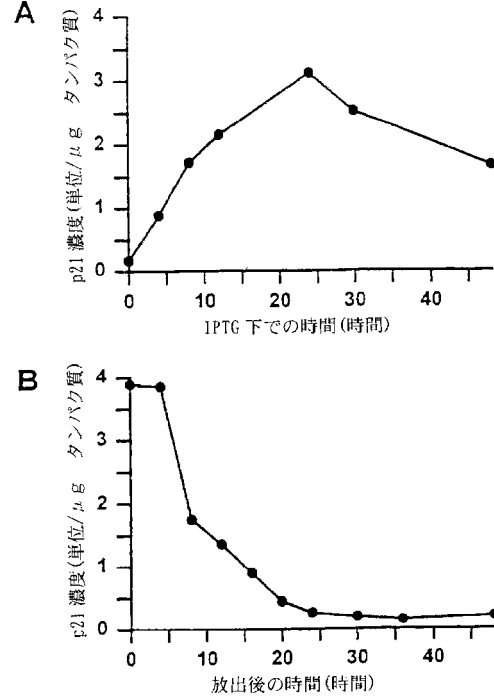
40

【 図 1 】

図 1. IPTG 調節レトロウイルスベクター-LNp21C03



【 図 2 】



【 図 3 】

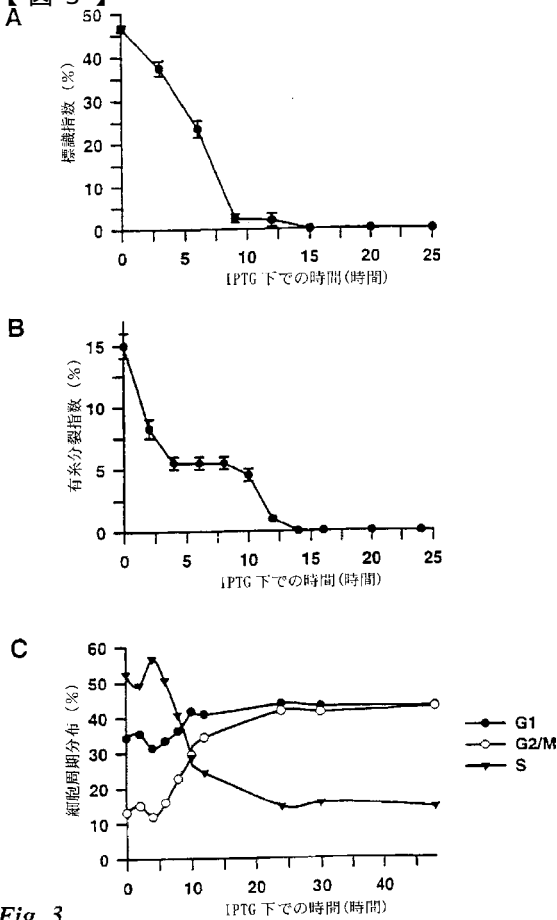


Fig. 3

Fig. 2

【 図 4 】

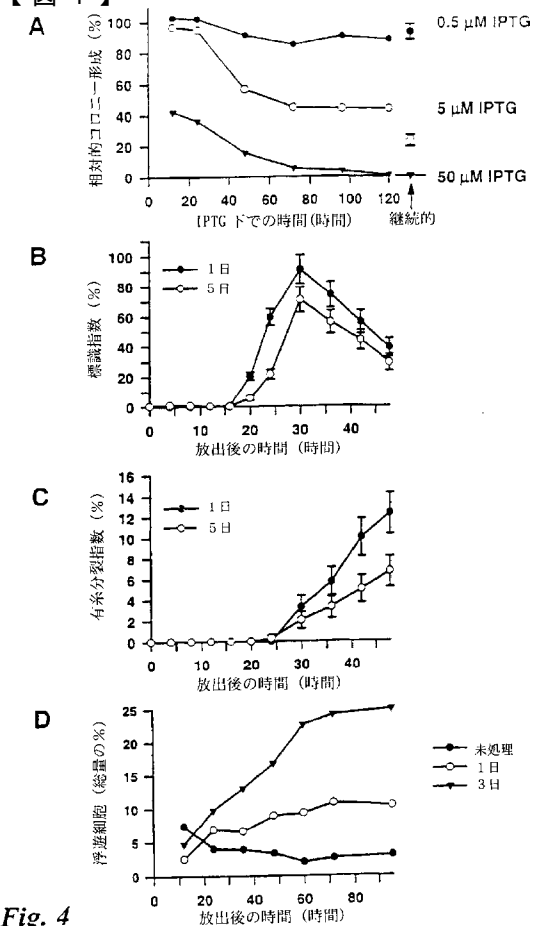


Fig. 4

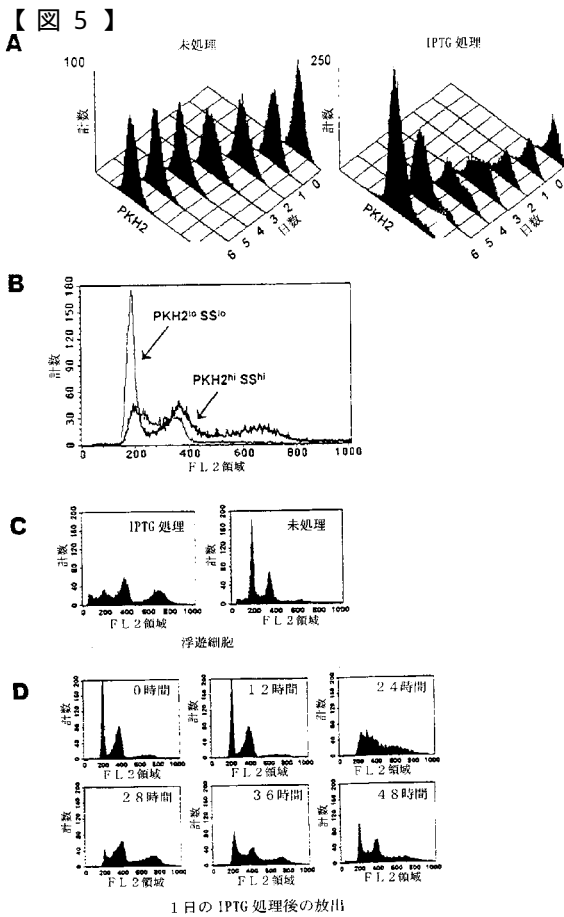


Fig. 5

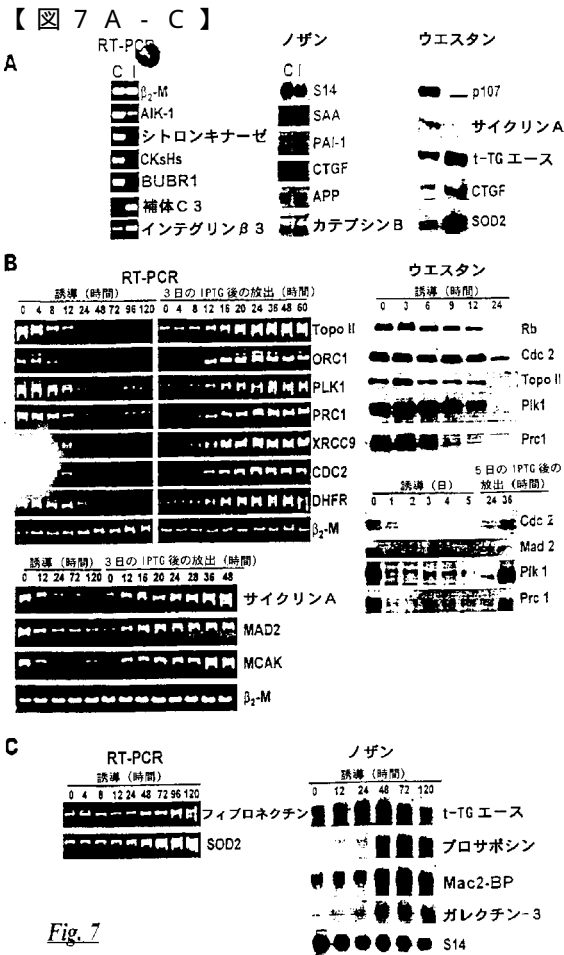


Fig. 7

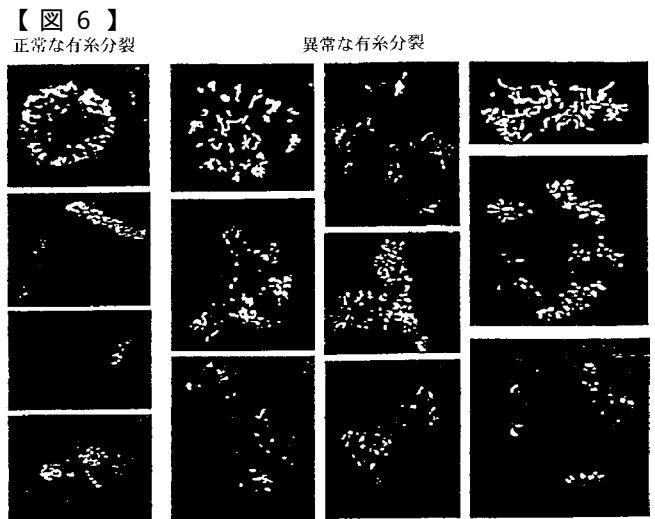
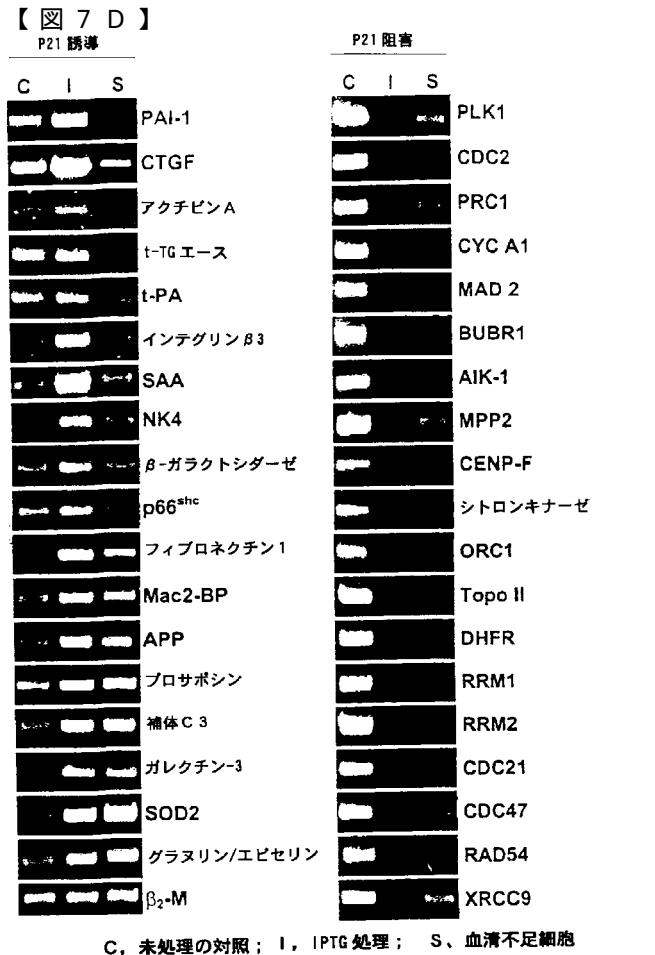
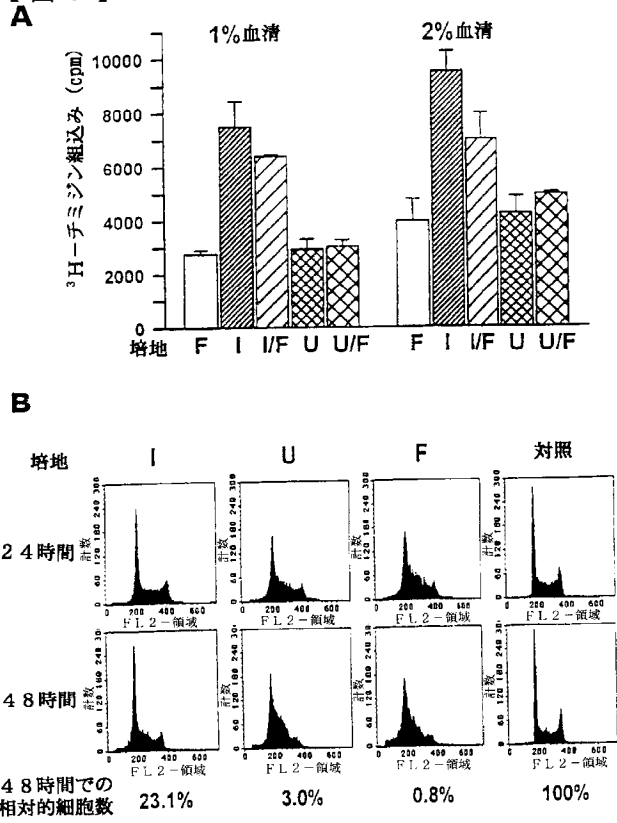


Fig. 6



【 図 8 】



【 図 9 】

Figure 9

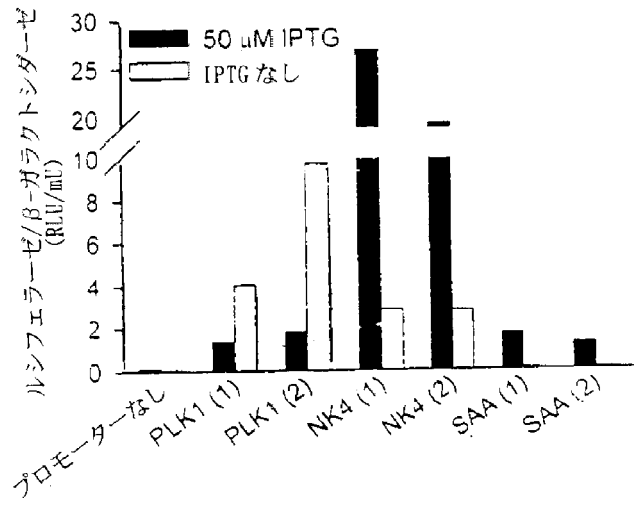


Fig. 8

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 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/566	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
			G 0 1 N	33/566	

(72)発明者 ロニンソン、 イゴール ピー .

アメリカ合衆国 6 0 0 9 1 イリノイ州 ウィルメット リンカーン レーン 2 7 3 1

Fターム(参考) 2G045 DA13 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA12 DA02 EA04 FA02 FA10 GA11
HA14

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ21 QQ53 QQ79 QR08 QR32
QR56 QR57 QR60 QR62 QR69 QR77 QR80 QS25 QS34 QS36
QX01 QX02

4B065 AA01X AA57X AA87X AA93X AA93Y BA02 CA44 CA46

【 外国語明細書 】

TITLE OF THE INVENTION

REAGENTS AND METHODS FOR IDENTIFYING AND MODULATING EXPRESSION OF GENES REGULATED BY p21

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application claims priority to U.S. Serial No. 09/449,589, filed November 29, 1999 and U.S. Serial No. 60/128,676, filed April 9, 1999, the disclosure of each of which is explicitly incorporated by reference herein.

1. Field Of The Invention

This invention is related to cellular senescence and changes in cellular gene expression that accompany senescence. In particular, the invention is related to the identification of genes the expression of which is modulated by a cellular gene product, p21, induced in cells at the onset of senescence. More specifically, the invention provides markers of cellular senescence that are genes whose expression is induced or repressed by p21. The invention provides methods for identifying compounds that inhibit or potentiate cellular senescence by detecting inhibition of repression or induction of these marker genes. Also provided are reagents that are recombinant mammalian cells containing a recombinant expression construct encoding p21 that is experimentally-inducible, and recombinant mammalian cells containing a recombinant expression construct that expresses a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a gene that is regulated by p21.

2. Summary Of The Related Art

p21^{WAF1/CIP1/SD11} is an important mediator of growth arrest and senescence in mammalian cells. p21 has been independently identified by several groups as a protein that binds and inhibits cyclin-dependent kinases (CDK) (Harper *et al.*, 1993, *Cell* 75: 805-816), as a gene upregulated by wild-type p53 (el-Deiry *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 55:

2910-2919), and as a growth-inhibitory gene overexpressed in senescent fibroblasts (Noda *et al.*, 1994, *Exp. Cell. Res.* 211: 90-98). Because of its pivotal role in p53-regulated growth arrest, p21 is usually regarded as a tumor suppressor. Nevertheless, p21 mutations in human cancer are rare (Hall & Peters, 1996, *Adv. Cancer Res.* 68: 67-108), and p21 knockout mice develop normally and do not show an increased rate of tumorigenesis (Deng *et al.*, 1995, *Cell* 82: 675-684).

Cellular levels of p21 are increased in response to a variety of stimuli, including DNA-damaging and differentiating agents. Some of these responses are mediated through transcriptional activation of the p21 gene by p53, but p21 is also regulated by a variety of p53-independent factors (reviewed in Gartel & Tyner, 1999, *Exp. Cell Res.* 227: 171-181). Increased p21 expression leads to cell growth arrest (Noda *et al.*, 1994, *ibid.*), which occurs in both G1 and G2 (Niculescu *et al.*, 1998, *Mol. Cell. Biol.* 18: 629-643) and is accompanied by the development of morphologic and phenotypic markers of senescence (Vogt *et al.*, 1998, *Cell Growth Differ.* 9: 139-146; McConnell *et al.*, 1998, *Curr. Biol.* 8: 351-354; Bates *et al.*, 1998, *Oncogene* 17: 1691-1703; Fang *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 2789-2797).

Transient induction of p21 mediates different forms of damage-induced growth arrest, including transient arrest that allows cell to repair DNA damage, as well as permanent growth arrest (also termed "accelerated senescence"), which is induced in normal fibroblasts (DiLeonardo *et al.*, 1994, *Genes Develop.* 8: 2540-2551; Robles & Adami, 1998, *Oncogene* 16: 1113-1123) and tumor cells (Chang *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59: 3761-3767) by DNA damage or introduction of oncogenic RAS (Serrano *et al.*, 1997, *Cell* 88: 593-602). A surge of p21 expression also coincides with the onset of terminal growth arrest during replicative senescence of aging fibroblasts (Noda *et al.*,

1994, *ibid.*; Alcorta *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:13742-13747; Stein *et al.*, 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19: 2109-2117) and terminal differentiation of postmitotic cells (El-Deiry *et al.*, 1995, *ibid.*; Gartel *et al.*, 1996, *Exp. Cell Res.* 246: 280-289). Analysis of cells that cannot express p21 (p21^{-/-} homozygotes) demonstrated the requirement of p21 in transient G1 and G2 arrest (Deng *et al.*, 1995, *ibid.*; Waldman *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 5187-5190; Bunz *et al.*, 1998, *Science* 282: 1497-1501), in replicative senescence of normal fibroblasts (Brown *et al.*, 1997, *Science* 277: 831-834), and in accelerated senescence of tumor cells (Chang *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 4808-4818).

While p21 is not a transcription factor *per se*, it has indirect effects on gene expression that may play a role in its cellular functions. The best-known biochemical function of p21 is the inhibition of CDK complexes that regulate transitions between different phases of the cell cycle (reviewed in Gartel & Tyner, 1998, "The growth-regulatory role of p21 (WAF1/CIP1)," *in* INHIBITORS OF CELL GROWTH, PROGRESS IN MOLECULAR AND SUBCELLULAR BIOLOGY, Vol. 20 (A. Macieir-Coelho, ed.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, pp. 43-71.). One of the consequences of CDK inhibition is dephosphorylation of Rb, which in turn inhibits E2F transcription factors that regulate many genes involved in DNA replication and cell cycle progression (Nevins, 1998, *Cell Growth Differ.* 9: 585-593). A comparison of p21-expressing cells (p21^{+/+}) and p21-nonexpressing cells (p21^{-/-}) has implicated p21 in radiation-induced inhibition of several E2F-regulated cellular genes (de Toledo *et al.*, 1998, *Cell Growth Differ.* 9: 887-896). Another result of CDK inhibition by p21 is stimulation of transcription cofactor p300 that augments NFκB (Perkins *et al.*, 1988, *Science* 275: 523-527). Activation of histone acetyltransferase p300, that enhances many inducible transcription factors, may have a pleiotropic effect on gene expression (Snowden & Perkins, 1988, *Biochem.*

Pharmacol. 55: 1947-1954). p21 may also affect gene expression through its interactions with proteins other than CDK. For example, p21 has been found to inhibit the expression of keratinocyte differentiation markers; this effect was dependent on the C-terminal portion of p21, which is not required for CDK inhibition but is known to bind the proliferating cell nuclear antigen (Di Cunto *et al.*, 1998, *Science* 280: 1069-1072). p21 was also reported to bind JNK kinases (Shim *et al.*, 1996, *Nature* 381: 804-807), apoptosis signal-regulating kinase 1 (Asada *et al.*, 1999, *EMBO J.* 18: 1223-1234), and Gadd45 (Kearsey *et al.*, 1995, *Oncogene* 11: 1675-1683); these interactions may affect the expression of genes regulated by the corresponding pathways.

There remains a need in this art to identify genes whose expression is modulated by induction of p21 gene expression. There is also a need in this art to develop targets for assessing the effects of compounds on cellular senescence, carcinogenesis and age-related diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides reagents and methods for identifying genes whose expression is modulated by induction of p21 gene expression. The invention also provides reagents and methods for identifying compounds that inhibit or potentiate the effects of p21 on cellular gene expression, as a first step in rational drug design for preventing cellular senescence, carcinogenesis and age-related diseases or for increasing the efficacy of anticancer therapies.

In a first aspect, the invention provides a mammalian cell containing an inducible p21 gene. In preferred embodiments, the mammalian cell is a recombinant mammalian cell comprising a recombinant expression construct encoding an inducible p21 gene.

More preferably, the construct comprises a nucleotide sequence encoding p21, most preferably human p21, under the transcriptional control of an inducible promoter. In alternative embodiments, the construct comprises a nucleotide sequence encoding the amino-terminal portion of p21 comprising the CDK binding domain, more preferably comprising amino acids 1 through 78 of the p21 amino acid sequence. In more preferred
5
embodiments, the inducible promoter can be induced by contacting the cells with an inducing agent, most preferably a physiologically-neutral inducing agent, that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter. In a preferred embodiment, the mammalian cell is a
.0 fibrosarcoma cell.

In another embodiment of the first aspect of the invention are provided recombinant mammalian cells comprising a recombinant expression construct in which a reporter gene is under the transcriptional control of a promoter derived from a cellular gene whose expression is modulated by p21. In a preferred embodiment, the promoter
.5 is derived from a cellular gene whose expression is repressed by p21. In these embodiments, the promoter is most preferably derived from a gene identified in Table I. Most preferably, the promoter is derived from ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α ,
20 Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR, or citron kinase. In other preferred embodiments, the promoter is derived from a cellular gene whose expression is induced by p21. In these embodiments, the promoter is most preferably derived from a gene identified in Table II. Most preferably, the promoter is derived from serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer

cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galactin-3, superoxide dismutase 2, granulin/epithelin, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. Preferred reporter genes comprising the recombinant expression constructs of the invention include firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase.

In additional preferred embodiments, the invention provides a mammalian cell comprising a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein expression of p21 is experimentally-induced in the mammalian cell thereby. In preferred embodiments, the recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene is under the transcriptional control of an inducible heterologous promoter, wherein expression of p21 from the recombinant expression construct is mediated by contacting the recombinant cell with an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter. Preferably, the construct comprises a nucleotide sequence encoding p21, most preferably human p21. In alternative embodiments, the construct comprises a nucleotide sequence encoding the amino-terminal portion of p21 comprising the CDK binding domain, more preferably comprising amino acids 1 through 78 of the p21 amino acid sequence. In a preferred embodiment, the promoter is derived from a cellular gene whose expression is repressed by p21. In these embodiments, the promoter is most preferably derived from a gene identified in Table I. In other preferred embodiments, the promoter is derived from a cellular gene whose expression is induced by p21. In these embodiments, the promoter

is most preferably derived from a gene identified in Table II. Preferred reporter genes comprising the recombinant expression constructs of the invention include firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase. In a preferred embodiment, the mammalian cell is a fibrosarcoma cell.

In a second aspect, the invention provides a conditioned cell culture medium wherein the medium is conditioned by cells expressing p21, and methods for producing said conditioned medium. In preferred embodiments, the conditioned medium is produced by culturing p21-expressing cells in a mammalian cell culture medium, most preferably a synthetic medium that does not contain serum additives. p21 expression useful with this aspect of the invention includes both endogenous p21 expression and inducible expression of a recombinant expression construct encoding p21 under the transcriptional control of an inducible promoter. Preferred cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and more preferably mouse or human cells. A particularly preferred embodiment are fibrosarcoma cells, more preferably human fibrosarcoma cells and most preferably human HT1080 fibrosarcoma cell line and derivatives thereof.

This aspect of the invention also provides a screening method for identifying compounds that inhibit p21 induced expression of mitogenic or anti-apoptotic factors in mammalian cells. In preferred embodiments, the method comprises the steps of inducing p21 expression in the cells in the presence or absence of a compound, and comparing expression of a mitogen or anti-apoptotic compound, or a plurality thereof, in the conditioned media. Inhibitors are identified by having a lesser amount of the mitogen or anti-apoptotic compound, or a plurality thereof, in the conditioned media in

the presence of the compound than in the absence of the compound. In the methods provided in this aspect of the invention, any p21-expressing cell is useful, and p21 expression in such cells can be achieved by inducing endogenous p21 or by using cells containing an inducible p21 expression construct according to the invention. Preferred cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and more preferably mouse or human cells. In a particularly preferred embodiment are fibrosarcoma cells, more preferably human fibrosarcoma cells and most preferably human HT1080 fibrosarcoma cell line and derivatives thereof.

In alternative embodiments, the invention provides methods for identifying compounds that inhibit p21 induced expression of mitogenic or anti-apoptotic factors in mammalian cells, wherein the cells comprise a recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter of a cellular gene that is induced by p21. In preferred embodiments, promoters include the promoters for CTGF, activin A, epithelin/granulin, galectin-3 and prosaposin. Preferred reporter genes include but are not limited to firefly luciferase, β -galactosidase, alkaline phosphatase and green fluorescent protein. In these embodiments, inhibition of p21-mediated induction of reporter gene expression is used to identify compounds that inhibit induction of mitogens or anti-apoptotic factors in p21-expressing cells.

In this aspect, the invention also provides a method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic factors or compounds in a mammalian cell, the method comprising the steps of contacting the cell with a compound that inhibits production of mitogenic or anti-apoptotic factors, wherein said compound is identified by the aforesaid methods of this aspect of the invention. In preferred embodiments, the mammalian cells contacted with the inhibitory compounds in which production of mitogenic or anti-

apoptotic factors is inhibited are fibroblasts, most preferably stromal fibroblasts.

In a third aspect, the invention provides methods for identifying compounds that inhibit p21-mediated modulation of cellular gene expression. These methods comprise the steps of inducing or otherwise producing p21 in a mammalian cell; assaying the cell
5 in the presence of the compound for changes in expression of cellular genes whose expression is modulated by p21; and identifying compounds that inhibit p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the cellular genes is changed to a lesser extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

In preferred embodiments, the cellular genes are repressed by p21, and inhibitors are
0 detected by detecting expression of the genes at levels greater than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table I. In alternative preferred embodiments, the cellular genes are induced by p21, and inhibitors are detected by detecting expression of the genes at levels less than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In
5 preferred embodiments, the genes are identified in Table II. In further alternative embodiments, the method is performed using a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene under the transcriptional control of a promoter derived from a gene whose expression is modulated by p21. In these embodiments using constructs comprising promoters derived from genes repressed by p21, the reporter gene product
0 is produced at greater levels in the presence than in the absence of the compound when the compound is an inhibitor of p21 gene expression modulation. In these embodiments, the promoter is most preferably derived from a gene identified in Table I. Most preferably, the promoter is derived from ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α ,

MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. When using constructs comprising promoters derived from genes induced by p21, the reporter gene product is produced at lesser levels in the presence than the absence of the compound when the compound is an inhibitor of p21 gene expression modulation. In these 5 embodiments, the promoter is most preferably derived from a gene identified in Table II. Most preferably, the promoter is derived from serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, 0 granulin/epithelin, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. Preferred reporter genes comprising the recombinant expression constructs of the invention include firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase. In other preferred embodiments, the cell comprises a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional 5 control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein expression of p21 is experimentally-induced in the mammalian cell thereby. The product of the reporter gene or the endogenous gene that is induced or repressed by p21 is detected using an immunological reagent, by assaying for an activity of the gene 0 product, or by hybridization to a complementary nucleic acid.

In a fourth aspect, the invention provides methods for identifying compounds that inhibit senescence in a mammalian cell. These methods comprise the steps of treating the mammalian cell in the presence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence; assaying the mammalian

cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and identifying the compound as an inhibitor of senescence if genes that are repressed by p21 are not repressed, or genes that are induced by p21 are not induced, in the presence of the compound. In preferred embodiments, the cellular genes are repressed by p21, and senescence inhibitors are identified by detecting expression of the genes at levels greater than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table I. In alternative preferred embodiments, the cellular genes are induced by p21, and senescence inhibitors are detected by detecting expression of the genes at levels less than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table II. In further alternative embodiments, the method is performed using a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene under the transcriptional control of a promoter derived from a gene whose expression is modulated by p21. In these embodiments, production of the product of the reporter gene at greater levels in the presence than in the absence of the compound when using constructs comprising promoters derived from genes repressed by p21, or at lesser levels in the presence than the absence of the compound when using constructs comprising promoter derived from genes induced by p21, is detected when the compound is an inhibitor of senescence. The promoters are preferably derived from genes identified in Table I (for genes repressed by p21) or Table II (for genes induced by p21). For p21-repressed genes, the promoter is most preferably derived from ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. For

p21-induced genes, the promoter most preferably is derived from serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. In other preferred
5 embodiments, the cell comprises a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein expression of p21 is experimentally-induced in the mammalian cell thereby. The product of the reporter gene or the endogenous gene
10 that is induced or repressed by p21 is detected using an immunological reagent, by assaying for an activity of the gene product, or by hybridization to a complementary nucleic acid.

In a fifth aspect, the invention provides methods for inhibiting cellular senescence, age-related diseases or age-associated gene products, the method comprising
15 the steps of contacting the cell with a compound that inhibits senescence as determined using the methods provided in the aforesaid aspects of the invention.

In a sixth aspect, the invention provides methods for identifying compounds that potentiate senescence in a mammalian cell. These methods comprise the steps of inducing p21 in the mammalian cell in the presence and absence of the compound;
20 assaying the mammalian tumor cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and identifying the compound as a potentiator of senescence if genes that are repressed by p21 are repressed to a greater extent, or genes that are induced by p21 are induced to a greater extent, in the presence of the compound. In preferred embodiments, the cellular genes are repressed by p21,

and potentiators are detected by detecting expression of the cellular gene at levels less than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table I. In alternative preferred embodiments, the cellular genes are induced by p21, and potentiators are detected by detecting
5 expression of the cellular gene at levels greater than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table II. In further alternative embodiments, the method is performed using recombinant mammalian cells comprising a reporter gene under the transcriptional control of a promoter derived from a gene whose expression is modulated by p21,
.0 wherein the cells comprise constructs having the reporter gene under the transcriptional control of promoters from genes whose expression is modulated by p21. In these embodiments, production of the product of the reporter gene at lower levels in the presence than in the absence of the compound when using constructs comprising promoters derived from genes repressed by p21, or at greater levels in the presence than
.5 the absence of the compound when using constructs comprising promoter derived from genes induced by p21, is detected when the compound is a potentiator of senescence.

In preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is repressed by p21, most preferably genes identified in Table I. Most preferably, the promoter is derived from ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A,
20 CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. In alternative preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is induced by p21, most preferably genes identified in Table II. Most preferably, the promoter is derived from serum

amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. In other preferred embodiments, the cell comprises a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein expression of p21 is experimentally-induced in the mammalian cell thereby. The product of the reporter gene or the endogenous gene that is induced or repressed by p21 is detected using an immunological reagent, by assaying for an activity of the gene product, or by hybridization to a complementary nucleic acid.

In a seventh aspect, the invention provides methods for promoting or potentiating cellular senescence in tumor cells, hyperplastic cells or any cell type that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation, the method comprising the steps of contacting the cell with a compound that potentiates senescence as determined using the methods provided in the aforesaid aspect of the invention.

In an eighth aspect, the invention provides compounds that are identified using any of the methods of the invention as disclosed herein.

In a ninth aspect, the invention provides methods for obtaining a plurality of nucleic acid species enriched for genes involved in cell cycle progression. These methods comprise the steps of inducing the expression of p21 in a mammalian cell; obtaining cellular mRNA from a mammalian cell before p21 induction and after p21 is induced and cell growth is stopped; and obtaining the plurality of nucleic acid species enriched for genes involved in cell cycle progression. In a preferred embodiment, the

plurality of nucleic acid species enriched for cell cycle progression genes is obtained by subtractive hybridization methods known in the art, whereby nucleic acid species underrepresented in cells expressing p21 are selectively enriched.

In a tenth aspect, the invention provides methods for obtaining a plurality of nucleic acid species enriched for genes that encode secreted proteins with paracrine functions and proteins involved in senescence and age-related diseases. These methods comprise the steps of inducing expression of p21 in a mammalian cell; obtaining cellular mRNA from a mammalian cell before and after p21 is induced; and obtaining the plurality of nucleic acid species enriched for genes whose expression is increased in the cell after p21 is induced. In preferred embodiments, the paracrine functions of the proteins are mitogenic and anti-apoptotic effects. In a preferred embodiment, the plurality of nucleic acid species enriched for genes that encode secreted proteins with paracrine functions and proteins involved in senescence and age-related diseases is obtained by subtractive hybridization methods known in the art, whereby nucleic acid species overrepresented in cells expressing p21 are selectively enriched.

In an eleventh aspect, the invention provides a method for identifying genes that are markers of cellular senescence, the method comprising the steps of inducing senescence by producing p21 expression in a first population of mammalian cells and inducing quiescence in a second population of mammalian cells; obtaining mRNA from each population of cells; comparing the pattern of gene expression in cells before and after production or p21 in the cells with the pattern of gene expression in cells before and after the cells became quiescent; comparing the plurality of genes strongly induced in the cells after p21 is produced with the plurality of genes strongly induced in quiescent cells; and identifying the genes strongly induced in cells producing p21 that are not

strongly induced in quiescent cells.

In a twelfth aspect, the invention provides methods for detecting senescence in a mammalian cell. These methods comprise the step of detecting expression of a gene that is a marker for senescence. In preferred embodiments, preferred markers of senescence include connective tissue growth factor (CTGF), serum amyloid A, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, Mac2 binding protein, or tissue transglutaminase.

In a thirteenth aspect, the invention provides methods for identifying compounds that promote induction of senescence in a mammalian cell. These methods comprise the steps of treating the mammalian cell with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence in the presence of the compound; assaying the mammalian tumor cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and identifying the compound as a potentiator of senescence if genes that are repressed by p21 are further repressed, *i.e.*, to a greater extent, or genes that are induced by p21 are further induced, *i.e.*, to a greater extent, in the presence of the compound. In preferred embodiments, the cellular genes are repressed by p21, and compounds that promote induction of senescence are detected by detecting expression of the cellular gene at levels less than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table I. In alternative preferred embodiments, the cellular genes are induced by p21, and compounds that promote induction of senescence are detected by detecting expression of the cellular gene at levels greater than those detected when p21 is expressed in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table II. In further alternative embodiments, the method is performed using recombinant

mammalian cells comprising a reporter gene under the transcriptional control of a promoter derived from a gene whose expression is modulated by p21, wherein the cells comprise constructs having the reporter gene under the transcriptional control of promoters from genes whose expression is modulated by p21. In these embodiments, production of the product of the reporter gene at lower levels in the presence than in the absence of the compound when using constructs comprising promoters derived from genes repressed by p21, or at greater levels in the presence than the absence of the compound when using constructs comprising promoter derived from genes induced by p21, is detected when the compound promotes induction of senescence. In preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is repressed by p21, most preferably genes identified in Table I. Most preferably, the promoter is derived from ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. In alternative preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is induced by p21, most preferably genes identified in Table II. Most preferably, the promoter is derived from serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. In other preferred embodiments, the cell comprises a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein expression of p21 is

experimentally-induced in the mammalian cell thereby. The product of the reporter gene or the endogenous gene that is induced or repressed by p21 is detected using an immunological reagent, by assaying for an activity of the gene product, or by hybridization to a complementary nucleic acid.

5 In a fourteenth aspect, the invention provides methods for identifying compounds that induce senescence in a mammalian cell. These methods comprise the steps of assaying a mammalian cell in the presence and absence of the compound for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and identifying compounds that induce senescence if genes that are repressed by p21 are
0 repressed, or genes that are induced by p21 are induced, in the presence of the compound. In preferred embodiments, the cellular genes are repressed by p21, and compounds that induce senescence are detected by detecting expression of the cellular gene at levels less than those detected in the absence of the compound. In preferred
5 embodiments, the genes are identified in Table I. In alternative preferred embodiments, the cellular genes are induced by p21, and compounds that induce senescence are detected by detecting expression of the cellular gene at levels greater than those detected
0 in the absence of the compound. In preferred embodiments, the genes are identified in Table II. In further alternative embodiments, the method is performed using recombinant mammalian cells comprising a reporter gene under the transcriptional
0 control of a promoter derived from a gene whose expression is modulated by p21, wherein the cells comprise constructs having the reporter gene under the transcriptional control of promoters from genes whose expression is modulated by p21. In these
embodiments, production of the product of the reporter gene at lower levels in the presence than in the absence of the compound when using constructs comprising

promoters derived from genes repressed by p21, or at greater levels in the presence than the absence of the compound when using constructs comprising promoter derived from genes induced by p21, is detected when the compound induces senescence. In preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is repressed by p21, most preferably genes identified in Table I. Most preferably, the promoter is derived from ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. In alternative preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is induced by p21, most preferably genes identified in Table II. Most preferably, the promoter is derived from serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. The product of the reporter gene or the endogenous gene that is induced or repressed by p21 is detected using an immunological reagent, by assaying for an activity of the gene product, or by hybridization to a complementary nucleic acid.

Specific preferred embodiments of the present invention will become evident from the following more detailed description of certain preferred embodiments and the claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a schematic diagram of the IPTG-regulated retroviral vector LNp21CO3 used to produce the human HT1080 fibrosarcoma cell line variant p21-9.

Figure 2A is a graph of the time course of p21 induction after the addition of 50 μ M IPTG, where p21 levels were determined by ELISA.

Figure 2B is a graph of the time course of p21 decay after removal of IPTG.

5

Figure 3A is a graph of the time course of changes in 3 H-thymidine labeling index (as determined by autoradiography) after the addition of 50 μ M IPTG.

Figure 3B is a graph of the time course of changes in mitotic index (as determined by microscopy after DAPI staining) after the addition of 50 μ M IPTG.

10

Figure 3C is a graph of the time course of changes in cell cycle distribution (determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis following propidium iodide) after the addition of 50 μ M IPTG; -●-: cells in G1 phase of the cell cycle; -○-: cells in G2/M phase of the cell cycle; -▼-: cells in S phase of the cell cycle.

15

Figure 4A is a graph showing the effects of the duration of treatment with different doses of IPTG on colony formation by p21-9 cells; -●-: 0.5 μ M IPTG; -○-: 5 μ M IPTG; -▼-: 50 μ M IPTG.

20

Figure 4B is a graph of the time course of changes in 3 H-thymidine labeling index (determined by autoradiography) after the removal of 50 μ M IPTG; -●-: 1 day; -○-: 5 days.

Figure 4C is a graph of the time course of changes in mitotic index (determined by microscopy) after the removal of 50 μ M IPTG; -●-: 1 day; -○-: 5 days.

Figure 4D is a graph of the time courses of changes in the percentage of floating cells after the removal of 50 μ M IPTG following one day or three days of treatment; -●-: untreated; -○-: 1 day; -▼-: 3 days.

Figure 5A is a histogram showing changes in PKH2 fluorescence profiles of untreated cells (left) and cells treated for 5 days with 50 μ M IPTG and released in IPTG-free media (right), as determined by FACS.

Figure 5B is a graphical representation of FACS profiles of DNA content of PKH2^{lo}SS^{lo} (thin line) and PKH2^{hi}SS^{hi} (thick line) cell populations isolated by FACS after 5-day treatment with 50 μ M IPTG, PKH2 labeling, and 6-day growth without IPTG.

Figure 5C is a graphical representation of FACS profiles of DNA content of floating cells, collected 48 hrs after release from 3-day treatment with 50 μ M IPTG (left) and from untreated cells (right).

Figure 5D is a graphical representation of FACS profiles of DNA content of attached cells at 0h, 12h, 24h, 28h, 36h and 48h after release from 1-day IPTG treatment.

Figure 6 are photomicrographs illustrating examples of normal (left) and abnormal (right) mitotic figures observed 1-2 days after release from IPTG (DAPI staining; photographed at 1,000 x magnification).

5 Figure 7A are photographs of gel electrophoresis patterns of RT-PCR experiments (left), northern blot analysis of cellular mRNA expression (middle) and immunoblotting assays for IPTG-induced changes in expression of the denoted genes; C: control untreated p21-9 cells; I: cells treated for 3 days with 50 μ M IPTG. β 2-microglobulin (β 2-M) was used as a normalization control for RT-PCR and S14
0 ribosomal protein gene for northern hybridization.

Figure 7B are photographs of gel electrophoresis of RT-PCR experiments (left) and immunoblotting analysis (right) showing the time course of changes in the expression of the denoted p21-inhibited genes upon IPTG addition and release.

5

Figure 7C are photographs of gel electrophoresis patterns of RT-PCR experiments (left) and northern hybridization analysis (right) of the time course of changes in the expression of the denoted p21-induced genes upon IPTG addition.

0

Figure 7D is a comparison of gene expression in untreated control p21-9 cells (C), serum-starved quiescent cells (Q) and IPTG-treated senescent cells (I).

Figure 8A is a histogram showing the effects of fresh media (F), conditioned media from IPTG-treated (I) or untreated p21-9 cells (U), and 1:1 mixtures of

conditioned and fresh media (I/F and U/F), supplemented with 1% or 2% serum, on ³H-thymidine incorporation by HS 15.T cells.

Figure 8B are graphical representations of FACS profiles of the DNA content of combined attached and floating C8 cells after 24 hr or 48 hr incubation in 10% serum (control), in low-serum fresh media (F) or in conditioned media from IPTG-treated (I) or untreated (U) p21-9 cells. Relative numbers of attached cells (as determined by methylene blue staining) after 48 hr incubation in the same media are listed beneath each set of histograms.

Figure 9 is a histogram of luciferase activity in cells containing a construct in which luciferase is under the transcriptional control of a promoter from a gene the expression of which is modulated by p21. Expression in the absence (no IPTG, shown as open bars) and presence (with the addition of 50 μM IPTG, shown as shaded bars) of p21 expression is shown for constructs prepared according to Example 6 containing promoters from polo-like kinase (PLK 1), natural killer cell protein 4 (NK4), and serum amyloid A (SAA); each promoter construct tested using 2 independent construct clones.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

This invention provides reagents and methods for identifying genes involved in mediating p21-induced cellular senescence, and compounds capable of inhibiting or potentiating senescence or quiescence in mammalian cells.

5 For the purposes of this invention, reference to “a cell” or “cells” is intended to be equivalent, and particularly encompasses in vitro cultures of mammalian cells grown and maintained as known in the art.

For the purposes of this invention, reference to “cellular genes” in the plural is intended to encompass a single gene as well as two or more genes. It will also be understood by those with skill in the art that effects of modulation of cellular gene
10 expression, or reporter constructs under the transcriptional control of promoters derived from cellular genes, can be detected in a first gene and then the effect replicated by testing a second or any number of additional genes or reporter gene constructs. Alternatively, expression of two or more genes or reporter gene constructs can be
15 assayed simultaneously within the scope of this invention.

For the purposes of this invention, the term “quiescence” will be understood to encompass temporary cessation of cell growth and DNA replication such as occurs in cultured mammalian cells under conditions of serum starvation.

For the purposes of this invention, the term “senescence” will be understood to
20 include permanent cessation of DNA replication and cell growth not reversible by growth factors, such as occurs at the end of the proliferative lifespan of normal cells or in normal or tumor cells in response to cytotoxic drugs, DNA damage or other cellular insult.

Senescence can be induced in a mammalian cell in a number of ways. The first
25 is a natural consequence of normal cell growth, either in vivo or in vitro: there are a

limited number of cell divisions, passages or generations that a normal cell can undergo before it becomes senescent. The precise number varies with cell type and species of origin (Hayflick & Moorhead, 1961, *Exp. Cell Res.* 25: 585-621). Another method for inducing senescence in any cell type is treatment with cytotoxic drugs such as most anticancer drugs, radiation, and cellular differentiating agents. See, Chang *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59: 3761-3767. Senescence also can be rapidly induced in any mammalian cell by transducing into that cell a tumor suppressor gene (such as p53, p21, p16 or Rb) and expressing the gene therein. See, Sugrue *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9648-9653; Uhrbom *et al.*, 1997, *Oncogene* 15: 505-514; Xu *et al.*, 1997, *Oncogene* 15: 2589-2596; Vogt *et al.*, 1998, *Cell Growth Differ.* 9: 139-146

The reagents of the present invention include any mammalian cell, preferably a rodent or primate cell, more preferably a mouse cell and most preferably a human cell, that can induce expression of the p21 gene, wherein such gene is either the endogenous gene or an exogenous gene introduced by genetic engineering. Although the Examples disclose recombinant mammalian cells comprising recombinant expression constructs encoding such an inducible p21 gene, it will be understood that these embodiments are merely a matter of experimental design choice and convenience, and that the invention fully encompasses induction of endogenous p21.

In preferred embodiments, the invention provides mammalian cells containing a recombinant expression construct encoding an inducible mammalian p21 gene. In preferred embodiments, the p21 gene is human p21 having nucleotide and amino acid sequences as set forth in U.S. Patent No. 5,424,400, incorporated by reference herein.

In alternative embodiments, the p21 gene is an amino-terminal portion of the human p21 gene, preferably comprising amino acid residues 1 through 78 of the native human

p21 protein (as disclosed in U.S. Patent No. 5,807,692, incorporated by reference) and more preferably comprising the CDK binding domain comprising amino acids 21-71 of the native human p21 protein (Nakanishi *et al.*, 1995, *EMBO J.* 14: 555-563). Preferred host cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and more preferably mouse or human cells. Particularly preferred embodiments are fibrosarcoma cells, more preferably human fibrosarcoma cells and most preferably human HT1080 fibrosarcoma cell line and derivatives thereof. A most preferred cell line is an HT 1080 fibrosarcoma cell line derivative identified as p21-9, deposited on April 6, 2000 with the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia U.S.A. under Accession No.

Recombinant expression constructs can be introduced into appropriate mammalian cells as understood by those with skill in the art. Preferred embodiments of said constructs are produced in transmissible vectors, more preferably viral vectors and most preferably retrovirus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, and vaccinia virus vectors, as known in the art. See, generally, MAMMALIAN CELL BIOTECHNOLOGY: A PRACTICAL APPROACH, (Butler, ed.), Oxford University Press: New York, 1991, pp. 57-84.

In additionally preferred embodiments, the recombinant cells of the invention contain a construct encoding an inducible p21 gene, wherein the gene is under the transcriptional control of an inducible promoter. In more preferred embodiments, the inducible promoter is responsive to a *trans*-acting factor whose effects can be modulated by an inducing agent. The inducing agent can be any factor that can be manipulated experimentally, including temperature and most preferably the presence or absence of an inducing agent. Preferably, the inducing agent is a chemical compound, most

preferably a physiologically-neutral compound that is specific for the *trans*-acting factor.

In the use of constructs comprising inducible promoters as disclosed herein, expression of p21 from the recombinant expression construct is mediated by contacting the recombinant cell with an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter. A variety of inducible promoters and cognate *trans*-acting factors are known in the prior art, including heat shock promoters than can be activated by increasing the temperature of the cell culture, and more preferably promoter/factor pairs such as the *tet* promoter and fusions thereof with mammalian transcription factors (as are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,654,168, 5,851,796, and 5,968,773), and the bacterial *lac* promoter of the lactose operon and its cognate *lacI* repressor protein. In a preferred embodiment, the recombinant cell expresses the *lacI* repressor protein and a recombinant expression construct encoding human p21 under the control of a promoter comprising one or a multiplicity of *lac*-responsive elements, wherein expression of p21 can be induced by contacting the cells with the physiologically-neutral inducing agent, isopropylthio- β -galactoside. In this preferred embodiment, the *lacI* repressor is encoded by a recombinant expression construct identified as 3'SS (commercially available from Stratagene, LaJolla, CA).

The invention also provides recombinant expression constructs wherein a reporter gene is under the transcriptional control of a promoter of a gene whose expression is modulated by p21. These include genes whose expression is induced by p21 and genes whose expression is repressed by p21. In preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is repressed by p21, and are identified in Table I. Most preferably, the promoter is derived from ORC1, PRC1,

XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase.

In additional preferred embodiments, the promoters are derived from genes whose expression is induced or otherwise increased by p21, and are identified in Table II. Most preferably, the promoter is derived from serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. These reporter genes are then used as sensitive and convenient indicators of the effects of p21 induction, and enable compounds that inhibit or potentiate the effects of p21 expression in mammalian cells to be easily identified. Host cells for these constructs include any cell in which p21 gene expression can be induced, and preferably include cells also containing recombinant expression constructs containing an inducible p21 gene as described above. Reporter genes useful in the practice of this aspect of the invention include but are not limited to firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, and alkaline phosphatase.

In preferred embodiments, cells according to the invention comprise both a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein p21 expression is experimentally-inducible thereby in the mammalian cell.

In alternative embodiments, the invention provides a mammalian cell comprising a recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional

control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21, wherein the promoter is from the gene ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. In further alternative embodiments, the invention provides a mammalian cell comprising a recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21, wherein the promoter is from the gene connective tissue growth factor, serum amyloid A, complement C3, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{slc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B.

The invention provides a conditioned cell culture medium wherein the medium is conditioned by cells expressing p21, and methods for producing said conditioned medium. As used herein, the term "conditioned media" is intended to encompass cell culture media conditioned by growth of p21-expressing cells that contains mitogenic or anti-apoptotic factors. The conditioned media is produced in a preferred embodiment by culturing p21-expressing cells in a mammalian cell culture medium, most preferably a synthetic medium that does not contain serum additives. Any p21-expressing cell is useful for the production of said conditioned media, and p21 expression in such cells can be achieved by inducing endogenous p21 (such as by treatment with DNA damaging agents, radiation,) or by using cells containing an inducible p21 expression construct according to the invention and culturing the cells in a physiologically-neutral inducing agent. Preferred cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and

more preferably mouse or human cells. A particularly preferred embodiment are fibrosarcoma cells, more preferably human fibrosarcoma cells and most preferably human HT1080 fibrosarcoma cell line and derivatives thereof.

The invention also provides a screening method for identifying compounds that
5 inhibit p21 induced expression of mitogenic or anti-apoptotic factors in mammalian cells. In preferred embodiments, p21 expression is induced in a mammalian cell culture in the presence or absence of compounds to be identified as inhibitors of p21 induced expression of mitogenic or anti-apoptotic factors. Compounds are identified as
0 inhibitors by inducing expression of p21 in the cells, and comparing the extent of expression of a mitogenic or anti-apoptotic factor, or a plurality thereof, in the presence of the compound with expression in the absence of the compound, and inhibitors identified as compounds that have a reduced amount of expression of a mitogenic or anti-apoptotic factor, or a plurality thereof, in the presence of the compound . Any p21-expressing cell is useful for the production of said conditioned media, and p21
5 expression in such cells can be achieved by inducing endogenous p21 (such as by treatment with DNA damaging agents and other cytotoxic compounds, and radiation) or by using cells containing an inducible p21 expression construct according to the invention and culturing the cells in a physiologically-neutral inducing agent. Preferred cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and more preferably
0 mouse or human cells. Particularly preferred embodiments are fibrosarcoma cells, more preferably human fibrosarcoma cells and most preferably human HT1080 fibrosarcoma cell line and derivatives thereof. An exemplary cell line according to this particularly preferred embodiment of the invention is an HT 1080 fibrosarcoma cell line derivative

identified as p21-9, deposited on April 6, 2000 with the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia U.S.A. under Accession No. _____.

In alternative embodiments, the invention provides methods for identifying compounds that inhibit p21 induced expression of mitogenic or anti-apoptotic factors
5 in mammalian cells, wherein the cells comprise a recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter of a cellular gene that is induced by p21. In preferred embodiments, promoters include the promoters for CTGF, activin A, epithelin/granulin, galectin-3 and prosaposin. Preferred reporter genes include but are not limited to firefly luciferase, β -galactosidase, alkaline
10 phosphatase and green fluorescent protein, all of which are commercially available. In these embodiments, p21 expression is induced in the cells, and the extent of expression of the reporter gene is compared in the presence of the compound with expression in the absence of the compound. Inhibitors are identified as compounds that provide a reduced amount of expression of the reporter gene in the presence of the compound. Any p21-
15 expressing cell is useful in this aspect of the invention, and p21 expression in such cells can be achieved by inducing endogenous p21 (for example, by treatment with DNA damaging agents or other cytotoxic compounds, or radiation) or by using cells containing an inducible p21 expression construct according to the invention and culturing the cells in a physiologically-neutral inducing agent. Preferred cells include
20 mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and more preferably mouse or human cells. A particularly preferred embodiment are fibrosarcoma cells, more preferably human fibrosarcoma cells and most preferably human HT1080 fibrosarcoma cell line and derivatives thereof.

The invention provides methods for identifying compounds that inhibit or promote senescence, whereby the effects of the compound are assayed by determining whether the compounds inhibit or potentiate induction or repression of genes whose expression is modulated by p21. In the practice of the methods of the invention, cultured mammalian cells in which p21 can be induced are treated to induce p21, for example, by radiation treatment or treatment with cytotoxic drugs, or transduced with a transmissible vector encoding p21. More preferably, p21-9 cells are used in which p21 can be induced by contacting the cells with IPTG. Typically, cells are grown in appropriate culture media (*e.g.*, DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) for p21-9 cells). p21 gene expression is induced in p21-9 cells by adding IPTG to the culture media at a concentration of about 50 μ M. Typically, p21 is induced in these cells in the presence or absence of the compound to be tested according to the methods of the invention. mRNA is then isolated from cells in which p21 is induced, and expression of genes that are regulated by p21 is analyzed. Expression is compared in cells in which p21 is induced in the presence of the compound with expression induced in the absence of the compound, and the differences used to identify compounds that affect cellular gene expression according to the methods set forth herein. In certain embodiments, cellular gene expression is analyzed using microarrays of oligonucleotides or cellular cDNAs such as are commercially available (for example, from Genome Systems, Inc., St. Louis, MO). In alternative embodiments, genes known to be induced or repressed by p21 are assayed. Gene expression can be assayed either by analyzing cellular mRNA or protein for one or a plurality of p21-modulated genes. Most preferably, the genes used in these assays are genes identified in Tables I and II.

In alternative embodiments, such compounds are identified independently of p21-directed experimental manipulation. In such assays, cells are treated to induce senescence in any of the ways disclosed above, including but not limited to treatment with cytotoxic drugs, radiation or cellular differentiating agents, or introduction of a tumor suppressor gene. Expression of genes that are repressed or induced by p21 is analyzed in the presence or absence of the test compound. Most preferably, the genes used in these assays are genes identified in Tables I and II, using the types of mRNA and protein assays discussed above for gene expression analysis.

In alternative embodiments, the cells in which p21 is induced further comprise a recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter of a cellular gene that is induced or repressed by p21. In preferred embodiments, the cellular gene is a gene that is repressed by p21, and the promoter is derived from a gene identified in Table I. Examples of known promoters for such genes include ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , RAD54, HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase. In preferred embodiments, the cellular gene is a gene that is induced by p21, and the promoter is derived from a gene identified in Table II. Examples of known promoters for such genes include connective tissue growth factor, serum amyloid A, complement C3, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B. Preferred reporter genes include but are not limited to firefly luciferase, β -galactosidase, alkaline phosphatase and green fluorescent protein, all of which are commercially available.

The invention also provides methods for identifying genes mediating the effects of p21-induced cellular senescence. Induction of p21 turns out to be an integral part of cell growth arrest associated with senescence, terminal differentiation and response to cellular damage. As described in the Examples below, cDNA array hybridization was used to investigate whether these effects were due to p21-induced changes in gene expression. This analysis showed that p21 selectively inhibited multiple genes involved in the control of mitosis, DNA replication, segregation and repair. Many proteins that were induced by p21 in these experiments have been associated with senescence and aging or implicated in age-related diseases, including atherosclerosis, Alzheimer's disease, amyloidosis and arthritis. These findings suggest that cumulative effects of p21 induction may contribute to the pathogenesis of cancer and age-related diseases. In addition, a number of p21-activated genes encode secreted proteins with potential paracrine effects on cell growth and apoptosis. In agreement with this observation, conditioned media from p21-induced cells showed mitogenic and anti-apoptotic activity.

The analyses disclosed in the Examples below showed that inhibition of cell cycle progression genes was not simply a consequence of p21-induced growth arrest. Shutoff of some of these genes occurred together with cell growth arrest, and the re-expression of all the tested genes upon release from p21 preceded the re-entry of cells into cell cycle. The nature of the immediate-response genes, such as ORC1 (required for the initiation of DNA replication), topoisomerase II (which is central to DNA segregation in G2), and PLK1 (involved in the initiation of mitosis), suggested that inhibition of their expression may in fact play a causal role in the induction of growth arrest by p21. These observations formed the basis for one aspect of the methods of the

invention, which provide methods for identifying genes involved in cell cycle progression in mammalian cells.

Furthermore, the biological functions of both immediate- and early-response genes indicate that their shutoff serves to maintain p21-induced growth arrest. The use of the reagents and methods of the present invention has demonstrated that release from p21-induced growth arrest results in endoreduplication and mitotic abnormalities. DNA replication and mitosis did not resume after release from IPTG until all the p21-inhibited genes were re-expressed, and DNA replication resumed considerably before mitosis. The results disclosed in the Examples below indicate that prolonged p21 induction leads to the decay of many proteins involved in cell cycle progression, including a number of proteins involved in the "quality control" of replication or mitosis. As a result of failing to regenerate the pools of such proteins by the time cells re-entered the cell cycle after release from p21, abnormal replication and abnormal mitosis ensued. For example, the production of polyploid cells was observed after release from prolonged p21-induced cell growth arrest. Endoreduplication, the process that leads to polyploidization of the cells, may be a consequence of the abrogation of mitotic checkpoint control (Hixon *et al.*, 1998, *Mol. Cell Biol.* 18: 6224-37), which could result from a lack of p21-inhibited checkpoint control proteins, such as MAD2 and BUBR1. Furthermore, polyploid cells may arise due to a failure of cytokinesis that can be triggered by a lack of cytokinesis-associated proteins Prcl, Aim1 and citron kinase, which we found to be inhibited by p21.

Different mitotic abnormalities that were observed after release from p21 have been previously found to result from mutation or inhibition of proteins that control proper chromosome alignment and segregation, including the products of such p21-

inhibited genes as MAD2, BUBR1, PLK1, AIK-1, CENP-A, CHL1 and MCAK (Li & Benezra, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10436-10440; Glover *et al.*, 1998, *Genes Develop.* 12: 3777-3787; Chan *et al.*, 1999, *J. Cell Biol.* 146: 941-954). The role of such proteins in p21-induced mitotic abnormalities is supported by the analysis of the
5 time course of decay and resynthesis of mitosis control proteins. Thus, at the time of resumed mitosis (36 hrs after release), the pools of Cdc2 and Plk1, which are required for the initiation of mitosis, are regenerated to levels comparable to untreated cells (as shown in Figure 7B). In contrast, MAD2, the function of which is to prevent anaphase unless chromosomes are properly attached to the mitotic spindle, is resynthesized much
0 less efficiently (Fig. 7B). Furthermore, MAD2 levels that remain after one day of IPTG treatment are much higher than after 3 or more days (Fig. 7B), which agrees with a lower frequency of abnormal mitosis in cells that are released after one day of p21 induction.

p21 overexpression has been reported to inhibit DNA repair (Pan *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 22008-22016; Umar *et al.*, 1996, *Cell* 87: 65-73). In light of our
5 results, this effect of p21 can be attributed to the inhibition of DNA repair genes, such as XRCC9, RAD54, HEX1/RAD2, RAD21 homolog and DNA ligase I. Inhibition of DNA repair is also likely to increase the frequency of mutations in cells that recover from p21-induced growth arrest, contributing to the overall genetic instability of such cells.

p21-induced genetic destabilization in normal cells may also have a potential
10 carcinogenic effect. Growth arrest of senescent cells is triggered by transient p21 induction, while another CDK inhibitor, p16, appears to be responsible for maintaining the growth arrest after the decay of p21 (Alcorta *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13742-13747). p16 (in striking contrast to p21) is frequently mutated in human

tumors (Hall & Peters, 1996, *Adv. Cancer Res.* 68: 67-108), including HT1080 fibrosarcoma used in the present study. If the primary carcinogenic effect of p16 mutations is abortive senescence, then cells expressing mutated p16 would experience prolonged p21 induction. Consistent with the results disclosed herein, re-entry into the cell cycle under these conditions would be expected to result in the development of karyotypic abnormalities. Unlike p16, p21 would act more as an oncogene than as a tumor suppressor in this process, which can explain the rarity of p21 mutations in cancer.

Thus, the invention provides methods for identifying compounds having an anticarcinogenic effect by inhibiting p21-induced cell cycle arrest. The compounds produced by these methods would be expected to be able to minimize the development of cells having karyotypic abnormalities, which in turn would be expected to reduce the likelihood that such cells would develop into malignant disease.

The invention also provides methods for identifying compounds that induce or promote senescence. In this aspect, the invention provides compounds that increase inhibition of genes inhibited by p21 expression. Inhibition of cell division and cell cycle progression control genes is shown herein to prevent cells from re-entering the cell cycle after p21 induction and result in irreversible growth arrest. Thus, compounds that induce or potentiate p21-induced repression of such genes are effective in promoting cell senescence and terminal growth arrest. Thus, the invention provides methods for identifying compounds that inhibit cellular genes that control cell cycle progression, most preferably genes identified in Table I. In preferred embodiments, the compounds are used to promote senescence of mammalian cells, most preferably tumor cells, hyperplastic cells or any cell type that is pathological or disease-causing due to excessive

proliferation. In preferred embodiments of this aspect of the invention, the methods comprise the steps of inducing p21 in a mammalian cell in the presence or absence of the compound; assaying the cell for expression of genes repressed by p21; and identifying the compound as a potentiator of senescence if the genes are repressed to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

In other aspects of the methods of the invention, compounds that promote senescence in a mammalian cell are identified independently of p21-directed experimental manipulation, for example, by inducing senescence in the cells in any of the ways disclosed above. It is known in the art that senescence can be induced even in p21-deficient cells (Chang *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 4808-4818 and Pantoja *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 4974-4982) and that some senescence-inducing treatments, such as the treatment of MCF-7 cells with all-trans retinoic acid (Chang *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59: 3761-3767), are associated with a decrease rather than an increase in the cellular levels of p21 (Zhu *et al.*, 1997, *Exp. Cell Res.* 234: 293-299).

The invention also provides methods for potentiating senescence in a mammalian cell, comprising the step of contacting the cell with a compound identified by the methods of the invention. In preferred embodiments, the mammalian cells are tumor cells, hyperplastic cells or any cell type that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation. In alternative embodiments, the methods comprise the additional step of contacting the cells with radiation or anticancer, cytotoxic or antiproliferative drugs.

The observed effects of p21 induction on gene expression show numerous correlations with the changes that have been associated with cell senescence and organism aging. Some of these correlations come from the analysis of p21-inhibited

genes. Thus, senescent fibroblasts were reported to express lower levels of Rb (Stein *et al.*, 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19: 2109-2117), as we have also observed upon p21 induction.

It is also interesting that three p21-inhibited genes, CHL1, CDC21 and RAD54 encode members of the helicase family. A deficiency in another protein of the helicase group has been identified as the cause of Werner syndrome, a clinical condition associated with premature aging and , at the cellular level, accelerated senescence of cells in culture (Gray *et al.*, 1997, *Nature Genet.* 17: 100-103).

The strongest correlations with the senescent phenotype, however, come from identification of p21-induced genes, many of which are known to increase their levels during replicative senescence or organism aging. Overexpression of ECM proteins is a known hallmark of replicative senescence, and two p21-induced genes in this group, fibronectin 1 and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), have been frequently associated with cellular senescence (reviewed in Crisofalo & Pignolo, 1996, *Exp. Gerontol.* 31: 111-123). Other p21-induced genes that were also reported to be overexpressed in senescent fibroblasts include tissue-type plasminogen activator (t-PA)(West *et al.*, 1996, *Exp. Gerontol.* 31: 175-193), cathepsin B (diPaolo *et al.*, 1992, *Exp. Cell Res.* 201: 500-505), integrin β 3 (Hashimoto *et al.*, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 88-92) and APP (Adler *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 16-20). Expression of several p21-induced proteins was shown to correlate with organism aging, including t-PA and PAI-1 (Hashimoto *et al.*, 1987, *Thromb. Res.* 46: 625-633), cathepsin B (Bernstein *et al.*, 1990, *Brain Res. Bull.* 24: 43-549) activin A (Loria *et al.*, 1998, *Eur. J. Endocrinol.* 139: 487-492), prosaposin (Mathur *et al.*, 1994, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 1063-1071), APP (Ogomori *et al.*, 1988, *J. Gerontol.* 43: B157-B162), SAA (Rosenthal & Franklin, 1975, *J. Clin. Invest.* 55: 746-753) and t-

TGase (Singhal *et al.*, 1997, *J. Investig. Med.* 45: 567-575).

The most commonly used marker of cell senescence is the SA- β -gal activity (Dimri *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9363-9367). This gene is strongly elevated in IPTG-treated p21-9 cells (Chang *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 4808-4818).

5 SA- β -gal was suggested to represent increased activity and altered localization of the lysosomal β -galactosidase (Dimri *et al.*, 1995, *ibid.*), and other studies have described elevated lysosome activities in senescent cells (Cristofalo & Kabakijan, 1975, *Mech. Aging Dev.* 4: 19-28). Five lysosomal enzymes appear in Table II, including N-acetylgalactosamine-6- sulfate sulfatase (GALNS), cathepsin B, acid α -glucosidase, acid
0 lipase A and lysomal pepstatin-insensitive protease. p21 also upregulated genes for mitochondrial proteins SOD2, metazin and 2, 4-dienoyl-CoA reductase, which correlates with reports of different mitochondrial genes overexpressed in senescent cells (Doggett *et al.*, 1992, *Mech. Aging Dev.* 65: 239-255; Kodama *et al.*, 1995, *Exp. Cell Res.* 219: 82-86; Kumazaki *et al.*, 1998, *Mech. Aging Dev.* 101: 91-99).

5 As disclosed in the following Examples, there are many similarities between the effects of p21 induction in p21-9 cells and changes associated with senescence in normal fibroblasts. Senescent cells, in particular, were shown to overproduce different growth factors and ECM proteins that may promote metastasis (Campisi *et al.*, 1998, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 3: 1-5). Several growth factors and growth factor receptors have
:0 also been identified among the genes that are induced by irradiation in a p53-dependent manner, under the conditions of strong p21 induction (Komarova *et al.*, 1998, *Oncogene* 17: 1089-1096). Interestingly, most of these genes did not contain p53-binding sites in their promoters. Our results suggest that induction of growth factors by p53 may be an indirect effect, mediated through p21 induction.

Thus, the invention provides methods for identifying genes associated with cellular senescence, particularly genes that are induced during senescence, and particularly by p21 expression.. The invention also provides methods for identifying compounds that can inhibit p21-mediated induction of such genes. Such compounds would be expected to exhibit the capacity to reduce, repress or reverse cellular senescence by their effects on p21-mediated induction of gene expressions.

Strikingly, products of many genes that we found to be induced by p21 have been linked to age-related diseases, including Alzheimer's disease, amyloidosis, atherosclerosis and arthritis. Thus, APP gives rise to β -amyloid peptide, the main component of Alzheimer's amyloid plaques. Complement C3 (Veerhuis *et al.*, 1995, *Virchows Arch.* 426: 603-610) and AMP deaminase (Sims *et al.*, 1998, *Neurobiol. Aging* 19: 385-391) were also suggested to play a role in Alzheimer's. It is especially interesting that t-TGase, which is most rapidly induced by p21 and which has been described as a pleiotropic mediator of cell differentiation, carcinogenesis, apoptosis and aging (Park *et al.*, 1999, *J. Gerontol. A Biol. Sci.* 54: B78-B83), is involved in the formation of plaques associated with both Alzheimer's disease and amyloidosis (Dudek & Johnson, 1994, *Brain Res.* 651: 129-133). The latter disease is due to the deposition of another p21-induced gene product, SAA, which has also been implicated in atherosclerosis, osteoarthritis and rheumatoid arthritis (Jensen & Whitehead, 1998, *Biochem. J.* 334: 489-503). Two other p21-upregulated secreted proteins, connective tissue growth factor (CTGF) and galectin 3 are involved in atherosclerosis (Oemar *et al.*, 1997, *Circulation* 95: 831-839; Nachtigal *et al.*, 1998, *Am. J. Pathol.* 152: 1199-1208). In addition, cathepsin B (Howie *et al.*, 1985, *J. Pathol.* 145: 307-314), PAI-1 (Cerinic *et al.*, 1998, *Life Sci.* 63: 441-453), fibronectin (Chevalier, 1993, *Semin. Arthritis*

Rheum. 22: 307-318), GALNS and Mac-2 binding protein (Seki et al., 1998, *Arthritis Rheum.* 41: 1356-1364) have been associated with osteoarthritis and/or rheumatoid arthritis. Furthermore, senescence-related changes in ECM proteins, such as increased PAI-1 expression, were proposed to result in age-specific deterioration in the structure of skin and other tissues (Campisi, 1998, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 3: 1-5). Increased fibronectin production by aging cells was also suggested to increase the density of the fibronectin network in ECM, which may contribute to slower wound healing in aged individuals (Albini et al., 1988, *Coll. Relat. Res.* 8: 23-37).

The results disclosed herein indicate that p21 induction affects cellular gene expression in a way that may increase the probability of the development of cancer or age-related diseases. A surge of p21 expression occurs not only in normal replicative senescence but also in response to cellular damage; in both cases, the undesirable effects of p21 induction would be expected to accumulate in an age-dependent manner. Elucidation of specific molecular interactions and regulatory pathways that are responsible for these effects of p21 on gene expression may suggest new approaches to the prevention of cancer and age-related diseases.

Thus, the invention provides methods for identifying genes associated with age-related diseases. The invention also provides methods for identifying compounds that can inhibit p21-mediated induction of such genes. Such compounds would be expected to exhibit therapeutic capacity to prevent, retard or reverse age-related diseases.

The methods of the invention directed towards identifying genes whose expression is modulated by p21 take advantage of the ability to experimentally induce p21 expression. Cells as provided by the invention containing inducible p21 genes can be used to isolate cellular mRNA reflecting the expression status of genes induced,

repressed and unchanged by p21 expression. Naive cells in which p21 is not induced provide a comparative, control source of cellular mRNA. A plurality of nucleic acids, most preferably cDNA copies of cellular mRNA, can be obtained that is specific for either induced or repressed genes by constructing differential cDNA libraries using subtractive hybridization methods. *See, for example, Diatchenko et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6025-6030.* mRNA or cDNA isolated before and after p21 induction can also be used as probes for hybridization analysis, either using arrayed or non-arrayed cDNA libraries, and differentially-expressed genes can be identified from such hybridization. *See, generally, Sambrook et al., 1990, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.* Alternatively, differential display of the subtracted cDNA population can be performed to yield sets of genes that are either upregulated or downregulated by p21 expression.

In additional embodiments, genes that are upregulated or downregulated by p21 expression can be isolated using molecular cloning techniques well known in the art. *Sambrook et al., ibid.* Differential cDNA libraries produced as described above can be screened with probes specific for genes induced or repressed by p21, using subtractive hybridization methods that enrich the probes for the appropriate cDNA population. Alternatively, such probes can be used to screen conventionally-prepared cDNA libraries constructed to maximize the percentage of colonies comprising full-length or close to full length cDNAs, to facilitate cloning of p21-modulated genes, particularly novel genes identified using the methods of the invention. Said genes are also intended to fall within the scope of this invention.

The following Examples are intended to further illustrate certain preferred embodiments of the invention and are not limiting in nature.

EXAMPLE 1
Production of a Mammalian Cell comprising
an Inducible p21 Gene

5 A recombinant derivative of human fibrosarcoma cell line HT1080, p21-9, was produced essentially according to Chang *et al.* (1999, *Oncogene* 18: 4808-4818, incorporated by reference herein). This cell line contained a p21 coding sequence under the transcriptional control of a promoter regulated by isopropyl- β -thiogalactoside (IPTG). Expression of p21 can be induced by culturing these cells in the presence of a
0 sufficient amount of IPTG, thereby permitting the sequellae of p21 expression to be studied in the absence of any additional effects that induction of the endogenous p21 gene might provoke. This cell line has been deposited on April 6, 2000 in the American Type Culture Collection (A.T.C.C.), Manassas, VA and given Accession Number _____.

5 Briefly, a subline of HT1080 expressing a murine ecotropic retrovirus receptor and a modified bacterial *lacI* repressor encoded by the plasmid 3'SS (Stratagene) (described in Chang & Roninson, 1996, *Gene* 33: 703-709, incorporated by reference) was infected with retroviral particles containing recombinant retrovirus LNp21CO3, the structure of which is shown in Figure 1. This retroviral vector contains the bacterial
10 neomycin resistance gene (*neo*) under the transcriptional control of the retroviral long terminal repeat promoter. p21-encoding sequences are cloned in the opposite orientation to the transcriptional direction of the *neo* gene, and under the control of a modified human cytomegalovirus promoter. Specifically, the CMV promoter contains a three-fold repeat of bacterial *lac* operator sequences that make expression from the promoter
25 sensitive to the *lacI* repressor expressed in the cell. LNp21CO3 was constructed by

cloning a 492bp fragment of DNA comprising the p21 coding sequence into the *NotI* and *BglIII* sites of the parent vector, LNXCO3 (disclosed in Chang & Roninson, *ibid.*).

After infection, cells infected with the LNp21CO3X vector were selected by culturing the cells in the presence of 400µg/mL G418 (obtained from BRL-GIBCO, Gaithersburg, MD). Clonal line p21-9 was derived from LNp21CO3 transduced, G418-resistant cell lines by end-point dilution until a clonal cell line was obtained.

EXAMPLE 2

Cell Growth Assays

p21-9 cells produced as described in Example 1 were used in cell growth assays to determine what changes in cell growth occurred when p21 was expressed in the cell.

p21 expression from the LNp21CO3 vector in p21-9 cells was induced by culturing the cells in DMEM medium containing 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT) and IPTG. Results of these assays are shown in Figures 2A and 2B. Figure 2A shows the time course of p21 protein production in cells cultured in the presence of 50µM IPTG. p21 gene expression increased between 6 and 12 hours after introduction of IPTG into the growth media, which expression peaked at about 24 hours post-induction. Upon removing the cells from IPTG-containing media, p21 expression fell about as rapidly as it had risen, returning to pre-induction levels at about 24 hours after IPTG was removed, (Figure 2B).

Cell growth in the presence of IPTG was assayed in three ways: measuring ³H-thymidine incorporation (termed the "labeling index"); observing the number of mitotic cells in the culture by microscopy (termed the "mitotic index") and determining the distribution of the culture cells in different portions of the cell cycle (termed the "cell

cycle distribution"). These results are shown in Figures 3A through 3C.

³H-thymidine incorporation assays were performed substantially as described by Dimri *et al.* (1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9363-9367). Cells were cultured in the presence of ³H-thymidine for 3h, and then analyzed by autoradiography. DNA replication as determined by autoradiography ceased entirely by 9 hours after addition of IPTG to the culture media (Figure 3A). The mitotic index was determined by observing cells microscopically and calculating the number of cells in mitosis after staining with 5µg/mL 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), and images were collected using a Leica DMIRB fluorescence microscope and Vaytek (Fairfield, Iowa) imaging system. Microscopically-detectable mitotic cells disappeared from these cultures in the presence of IPTG in two stages: the first occurring between 0-4 hours after IPTG addition (wherein the mitotic index dropped from about 15% in untreated cells to about 5% in IPTG-treated cells) and then again between about 10-14 hours after IPTG addition (wherein the mitotic index dropped to zero at about 13 hours after IPTG addition (Figure 3B).

Cell cycle distribution was determined using FACS analysis of DNA content after staining with propidium iodide as described by Jordan *et al.* (1996, *Cancer Res.* 56: 816-825) using Becton Dickinson FACSort. Cell cycle distribution stabilized after 24 hrs of IPTG treatment (shown in Figure 3C). By this time, 42-43% of IPTG-treated cells were arrested in G1 and G2, respectively, and about 15% of the cells were arrested with S-phase DNA content.

The effects of p21 expression were also investigated by releasing cells from the effects of p21 by removing IPTG from the cell culture media. It was known that IPTG-treated p21-9 cells displayed morphological senescence markers (Chang *et al.*, 1999,

ibid.) As shown in Figure 2B, p21 gene expression levels in p21-9 cells reverted to basal levels within 24 hours after removal of IPTG. Here, it was determined whether IPTG-treated p21-9 cells show any loss of clonogenic capacity after removal of IPTG. The results of these experiments are shown in Figures 4A through 4D.

5 Colony assays for recovery from IPTG treatment were performed by plating about 2,000 p21-9 cells per 10cm culture dish in DMEM/ 10% FCS and the presence or absence of IPTG. Cells were allowed to form colonies for 10 days before their clonogenic capacity was determined. p21-9 cells were treated with three concentrations of IPTG: 0.5 μ M, 5 μ M and 50 μ M. These treatments induced, respectively, no
0 measurable increase over basal p21 levels (0.5 μ M), half-maximal (5 μ M) or maximal increase (50 μ M) in p21 gene expression. As shown in Figure 4A, treatment of p21-9 cells with 0.5 μ M IPTG did not inhibit colony formation. In contrast, continuous exposure of the cells to 5 μ M or 50 μ M IPTG reduced the clonogenicity of p21-9 cells by 80% and 100%, respectively. When IPTG was removed after 12 or 14 hours, cells
5 treated with 5 μ M IPTG showed substantially undiminished colony formation. However, the 50 μ M IPTG-treated cells showed a decrease in clonogenicity of 58-63%. After 3-5 days treatment, cells cultured in 5 μ M IPTG showed a decreased clonogenicity of 55-58%, and cells cultured in 50 μ M IPTG showed a decreased clonogenicity of 95-99%.
0 These results indicated that the ability of cells to recover after p21 gene expression decayed was inversely correlated with the level of induced p21 and with the duration of p21 induction. This result was consistent with results obtained by others in other cell culture systems (Fang *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 2789-2797).

The causes of the loss of clonogenicity were investigated as follows. Resumption of DNA replication was first detected about 20 hours after release from

IPTG using the ^3H -thymidine incorporation assay as described above. These results are shown in Figure 4B. Resumption of mitosis in these cells was first detected about 30 hours after IPTG release, as determined from the mitotic index as described above. These results are shown in Figure 4C. The percentages of cells entering the S or M phase of the cell cycle were higher in cells that were treated with IPTG for one day than for five days (*compare* the curves for each in Figures 4B and 4C) but the differences were not significant enough to account for the corresponding difference in clonogenic recovery as shown in Figure 4A.

Microscopic examination of culture plates from the clonogenic assays showed that plates treated with 50 μM IPTG for three or more days contained numerous single cells and small cell clusters that failed to develop into colonies. In addition, release from IPTG was associated with the appearance of floating cells during the first two days after IPTG release, and the number of such cells was much higher when cells were released after three days of IPTG induction than after one day (as shown in Figure 4D). Most of these floating cells were dead, as indicated by trypan blue staining and a 100-1,000-fold decrease in clonogenicity

The effect of p21 induction in these cells was further studied by examining the DNA content of growth-retarded and dead cells that appeared after release from prolonged IPTG treatment. Growth-retarded cells were isolated using FACS on the basis of increased retention of PKH2, a lipophilic fluorophore that stably incorporates into the cell membrane and is evenly divided between daughter cells; this leads to a proportional decrease in cellular fluorescence with each round of cell division, and no decrease in non-dividing or dead cells (Horan & Slezak, 1989, *Nature* 340: 167-168). These assays were performed as described in Chang *et al.* (1999, *Cancer Res.* 59: 3761-

3767). Untreated p21-9 cells and cells treated with 50 μ m IPTG for five days were labeled with PKH2, plated in IPTG-free medium, and their PKH2 fluorescence was analyzed on consecutive days. As shown in Fig. 5A, IPTG-treated cells started dividing later than the control cells and developed a heterogeneous PKH2 profile, with an emerging peak of proliferating cells and a shoulder of growth-retarded cells with high PKH2 fluorescence. The growth-retarded cells also showed elevated side scatter which is characteristic for senescent cells (Chang *et al.*, 1999, *ibid.*). The proliferating (PKH2^{lo}SS^{lo}) and growth-retarded (PKH2^{hi}SS^{hi}) cell populations were separated by FACS six days after release from IPTG, and their DNA content was analyzed by PI staining. The growth-retarded fraction differed from the proliferating cells in having a higher G2/M fraction and a large number of cells with greater than 4C DNA content (shown in Fig. 5B). The polyploid nature of the latter cells was confirmed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of interphase nuclei with specific probes for chromosomes 18 and 21; these experiments were performed as described in Chang *et al.* (1999, *ibid.*). High polyploid and G2/M fractions were also observed among floating dead cells collected after release from IPTG (shown in Fig. 5C); microscopic analysis indicated that many of these dead cells were in mitosis.

To investigate the origin of polyploid cells, the time course of changes in DNA content of the entire cell population after release from IPTG was determined. The number of polyploid cells greatly increased 24-28 hrs after release (as shown in Fig. 5D), concurrently with the resumption of DNA synthesis (*compare*, Fig. 4B). This result indicated that many of the released cells were undergoing endoreduplication, an unscheduled round of DNA replication. The time course and magnitude of endoreduplication were very similar, however, between cells released after one day (Fig.

5D) or after 3-5 days of IPTG inhibition.

A major difference between cells that were inhibited by IPTG for one day compared with those inhibited for 5 days emerged, however, when the morphology of attached mitotic cells arising 1-2 days after release from IPTG was examined. These results are shown in Figure 6. While an overwhelming majority of mitotic figures in untreated cells appeared morphologically normal (Fig. 6, left), most of the mitotic figures in cells released after IPTG treatment showed numerous abnormalities, including multicentric mitosis, uneven chromosome distribution and prophase arrest (Fig. 6, right).

The percentage of normal mitoses in 1-day and 5-day IPTG treated cells were 45% and 2%, respectively, which is close to the corresponding values for clonogenic recovery (38% and 1%). These results suggest that abnormal mitosis, together with endoreduplication, are responsible for the loss of clonogenicity after release from p21.

These results indicated that induced expression of p21 has profound effects not only on the cells while the gene is expressed, but effects that linger and interfere with normal recovery of the cells into the cell cycle and growth.

EXAMPLE 3

Analysis of Gene Expression Modulated by p21 Gene Expression

The results disclosed in Example 2 suggested that the morphological and cell cycle consequences of p21 induction could be the result of repression of genes that control cell cycle progression. The effects of p21 induction on cellular gene expression were examined as follows.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed to investigate expression of genes known to be involved in the control of cell

cycle checkpoint progression. Preliminary RT-PCR analysis of 27 genes involved in cell cycle control and DNA replication revealed that eight of these genes were inhibited by IPTG in p21-9 cells. Total RNA was extracted from p21-9 cells collected at different time points during IPTG treatment and release. RT-PCR analysis of changes in gene expression for downregulated genes was carried out essentially as described by Noonan *et al.* (1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7160-7164).

A more comprehensive analysis was performed by isolating poly(A)⁺ RNA from untreated p21-9 cells and from cells that were treated for 3 days with 50 μ m IPTG. cDNA was prepared from the poly(A)⁺ RNA and used as probes for differential hybridization with the Human UniGEM V cDNA microarray (as performed by Genome Systems, Inc., St. Louis, MO), which contains over 4,000 sequence-verified known human genes and 3,000 ESTs. More than 2,500 genes and ESTs showed measurable hybridization signals with probes from both untreated and IPTG-treated p21-9 cells. Genes that were downregulated with balanced differential expression ≥ 2.5 or upregulated with balanced differential expression ≥ 2.0 are listed in Tables I and II, respectively.

Expression of 69 of these genes was individually tested by RT-PCR or northern hybridization with probes derived from inserts of the cDNA clones present in the microarray; these cDNAs were obtained from Genome Systems, Inc. In addition, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measurement of p21 protein was carried out using WAF1 ELISA kit (obtained from Oncogene Science, Uniondale, NY) as described (Chang *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 4808-4818). The following primary antibodies were used for immunoblotting: mouse monoclonal antibodies against Cdc2 (Santa Cruz), cyclin A (NeoMarkers), Plk 1 (Zymed) and Rb (PharMingen); rabbit

polyclonal antibodies against MAD2 (BadCo), p107 (Santa Cruz), CTGF (Fisp-12; a gift of Dr. L. Lau), Prc 1 (a gift of Drs. W. Jiang and T. Hunter), and topoisomerase II α (Ab0284; a gift of Dr. W.T. Beck), and sheep polyclonal antibody against SOD2 (Calbiochem). Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies used
5 were goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz) and rabbit anti-sheep IgG (KPL). Protein concentrations in all samples were equalized after measurement with BioRad protein assay kit. Immunoblotting was carried out by standard procedures, and the signal was detected by chemiluminescence using LumiGlo (KPL).

These results are shown in Figures 7A through 7C. The changes in gene
0 expression predicted by the microarray assays described above were confirmed for 38/39 downregulated and 27/30 upregulated genes. The observed signal differences in northern hybridization or RT-PCR for most of the tested genes (Figure 7A through 7C) appeared to be higher than the values of balanced differential expression determined from the cDNA array (Tables I and II), suggesting that cDNA array hybridization tends
5 to underestimate the magnitude of p21 effects on gene expression. Changes in the expression of 6 downregulated and 4 upregulated genes were also tested at the protein level by immunoblotting (Figure 7B) or zymography (not shown) and were confirmed in all cases tested.

It was recognized that p21-mediated changes in gene expression were comprised
0 of near-term effects and longer-term effects that followed p21-induced cell growth arrest. For this purpose, the time course of changes in the RNA levels of a subset of p21-inhibited (Fig. 7B) and p21-induced genes (Fig. 7C) after the addition and removal of IPTG was determined. Immunoblotting was used to analyze the time course of p21-induced changes in Rb phosphorylation (as indicated by electrophoretic mobility) and

in the cellular levels of Rb and several proteins that were inhibited by p21 according to the cDNA array; these results are shown in Figure 7B. Rb was found to become dephosphorylated as early as 6 hrs after the addition of IPTG. Furthermore, Rb protein levels decreased sharply between 12-24 hrs (shown in Figure 7B), but no significant changes were detected in RB mRNA levels (data not shown). A similar decrease was observed for a Rb-related protein p107 (shown in Fig. 7A).

1. Gene expression inhibited by p21.

All the tested p21-inhibited genes showed a rapid response to p21 induction and release. Five of these genes (topoisomerase II α , ORC1, PLK1, PRC1 and XRCC9) showed significant inhibition at both RNA and protein levels between 4 and 8 hrs after the addition of IPTG (Fig. 7B). This pattern has been termed an "immediate response," which parallels the kinetics of cell growth arrest and Rb dephosphorylation. Other p21-inhibited genes (such as CDC2 or DHFR) showed an "early response" pattern that lags slightly behind the cessation of DNA replication and mitosis, with a major decrease in mRNA levels detectable only 12 hrs after the addition of IPTG. All p21-inhibited genes, however, resumed their expression 12-16 hrs after the removal of IPTG, when the cells were still growth-arrested and before the resumption of DNA replication and mitosis (Fig. 7B). This analysis indicated that changes in the expression of p21-inhibited genes were near-term effects of p21 induction and release and were not a consequence of cell growth arrest and recovery.

In summary, 69 genes and 3 ESTs were identified by the cDNA microarray as downregulated in p21-induced cells, with balanced differential expression of 2.5-12.6 (Table 1A); 5 additional genes identified by our earlier assays as downregulated in

IPTG-treated cells are listed in Table 1B. A strikingly high fraction of downregulated genes identified by the cDNA array (43 of 69) were associated with mitosis, DNA replication, segregation and repair and chromatin assembly, indicating a highly selective nature of p21-mediated inhibition of gene expression.

5 The largest group of p21-downregulated genes are that have been implicated in the signaling, execution and control of mitosis. These genes include CDC2 and cyclin B1 that form the mitosis-initiating complex, polo-like kinase (PLK1) that plays a role in the onset of mitosis, mitotic checkpoint control and cytokinesis (Glover *et al.*, 1998, *Genes Develop.* 12: 3777-3787) and CDC2-interacting protein CKsHs1, a target of
0 mitotic checkpoint control (Hixon *et al.*, 1998, *Mol. Cell Biol.* 18: 6224-37). Other genes in this group encode a homolog of *Xenopus* condensin protein XCAP-H, a homolog of Rad21 repair protein involved in sister chromatid cohesion (Losada *et al.*, 1998, *Genes Develop.* 12: 1986-1997) and mitotic recombination (McKay *et al.*, 1996, *Genomics* 36: 305-315), a centrosome-associated kinase AIK1 involved in spindle
5 formation (Kimura *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 13766-13771), centromere proteins CENP-A and CENP-F, as well as MAD2 and BUBR1 proteins that play a central role in the spindle checkpoint control (Li and Benezra, 1996, *Science* 274: 246-248; Chan *et al.*, 1999, *J. Cell Biol.* 146: 941-954), mitotic centromere-associated kinesin (MCAK), kinesin-like protein HSET located at the interphase centrosome and mitotic spindle,
0 CHL1 helicase (a homolog of a yeast protein that plays a role in proper chromosome distribution during mitosis; Gerring *et al.*, 1990, *EMBO J.* 9: 4347-4358), and three proteins involved in cytokinesis, Prc1, Aim1/Aik2 and citron kinase (Jiang *et al.*, 1998, *Mol. Cell* 2: 877-885; Terada *et al.*, 1998, *EMBO J.* 17: 667-676; Madaule *et al.*, 1988, *Nature* 394: 491-494). p21 also inhibits genes that encode nuclear envelope proteins

lamin B1 and lamin B2, lamin-associated polypeptides α (thymopoietin α) involved in nuclear assembly, and M-phase phosphoproteins MPP2 and MPP5. Deficiencies in many of the above proteins are known to result in abnormal chromosome segregation and polyploidization, the same events that we observed in p21-9 cells after release from
5 IPTG.

Many p21-inhibited genes are involved in DNA replication and segregation, chromatin assembly and DNA repair. Some of these genes encode enzymes involved in nucleotide biosynthesis, including ribonucleotide reductase subunits M1 and M2, thymidine kinase, thymidylate synthase, uridine phosphorylase and dihydrofolate
.0 reductase. Other proteins are involved in DNA replication, including components of the replication licensing factor Cdc47/Mcm4, Cdc45 homolog, Orc1 protein of the origin recognition complex, DNA polymerase α , B-Myb, 37-kD subunit of replication factor C, and DNA ligase I. This group also includes genes involved in the segregation of replicated DNA (topoisomerase II α), inheritance of epigenetically determined
.5 chromosomal states (p60 subunit of chromatin assembly factor-I), and other chromatin components, such as high mobility group proteins 1 and 2. Several p21-inhibited genes are associated with DNA repair, including XRCC9, which may be involved in DNA post-replication repair or cell cycle checkpoint control (deWinter *et al.*, 1998, *Nat Genet.* 20: 281-283), Rad54 recombination repair protein, exonuclease Hex1/Rad2, and the
20 above Rad21 homolog and DNA ligase I.

Over 60% of p21-inhibited genes in the cDNA array are involved in mitosis, DNA replication, segregation and repair. Such biological selectivity is unprecedented in large-scale expression profiling studies. A corollary to this observation is that p21-inhibited genes whose function is presently unknown are likely to play a role in cell

cycle progression. Indeed, six p21-inhibited genes were originally listed in the cDNA array as ESTs or genes with unknown function, but a database search has linked three of their products to cell division or DNA repair. In one case, the originally identified EST was found to map in a genomic clone 3' to the coding sequence of citron kinase; inhibition of the citron kinase gene by p21 was then demonstrated by RT-PCR based on its coding sequence. Cloning of additional p21-inhibited genes is likely to yield novel genes that play a role in mammalian cell division.

These results also suggest further opportunities for discovering components of the cellular program of p21-induced senescence that would be targets for therapeutic intervention. It has been suggested that p21-mediated inhibition of gene expression is a result of E2F inhibition (de Toledo *et al.*, 1998, *Cell Growth Differ.* 9: 887-896). In agreement with this interpretation, a subset of our p21-inhibited genes (*e.g.* CDC2, ORC1, DHFR, cyclin A1) contain E2F sites in their promoters. On the other hand, no E2F sites could be found in the promoters of some p21-inhibited genes (*e.g.* cyclin B1), and some E2F-dependent genes (*e.g.* cyclin E) were unaffected by p21 induction (data not shown). Some as yet unidentified regulatory factors, in addition to E2F, may therefore be involved in p21-mediated inhibition of gene expression. Such additional factors represent targets for novel pharmaceuticals, the existence and identity of said targets being available for elucidation using the methods and reagents provided by the instant invention.

2. Gene expression induced by p21

In addition to genes repressed by p21 expression, the assays described above detected genes induced by p21. The pattern of gene expression of p21-induced genes is shown in Figure 7C. In contrast to p21-inhibited genes, p21-upregulated genes

increased their expression only 48 hrs after the addition of IPTG, *i.e.* after the onset of growth arrest in all cells. Only one tested gene, tissue transglutaminase (t-TGase), showed a detectable increase 12 hrs after the addition of IPTG, but its expression reached a maximum only by 48 hrs (as shown in Fig.7C). Furthermore, elevated expression of all the tested genes (except for t-TGase) persisted for at least three days after release from IPTG, well after resumption of the cell cycle (not shown). This "late response" kinetics indicated that p21 induction of such genes was a delayed effect relative to p21-mediated growth arrest.

48 known genes and 6 ESTs or genes with unknown functions were identified as upregulated in p21-induced cells, with balanced differential expression of 2.0-7.8 (Table II). A very high fraction (20/48) of identifiable genes in this group encode extracellular matrix (ECM) components (*e.g.* fibronectin 1, laminin α 2, Mac-2 binding protein), other secreted proteins (*e.g.* activin A, connective tissue growth factor, serum amyloid A), or ECM receptors (such as integrin β 3). Several of these secreted proteins, as well as a large group of p21-induced intracellular proteins (Table II), are known to be induced in different forms of stress response or to play a role in stress-associated signal transduction. Remarkably, many genes that we found to be induced by p21 are also upregulated in cellular senescence, organism aging, or different age-related diseases.

In contrast to p21-inhibited genes, none of the genes found to be induced by p21 have any known functions that may trigger cell growth arrest. Furthermore, the induction of such genes is a late response that lags far behind the onset of growth arrest. Interestingly, several p21-induced genes are positively regulated by NF κ B, including superoxide dismutase 2 (SOD2) (Jones *et al.*, 1997, *Mol. Cell. Biol.* 17: 6970-6981), t-

TGase (Mirza *et al.*, 1997, *Amer. J. Physiol.* 272: G281-G288), Alzheimer's β -amyloid precursor protein (APP) (Grilli *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 15002-15007) and the inflammatory protein serum amyloid A (SAA) (Jensen and Whitehead, 1998, *Biochem J.* 334: 489-503). Since p21 activates NF κ B-dependent transcription through its effect
5 on the transcription cofactor p300 (Perkins *et al.*, 1997, *Science* 275: 523-527), it is possible that activation of p300 or related transcription cofactors may be responsible for the effect of p21 on some of the upregulated genes. The delayed kinetics of p21-mediated induction of gene expression suggest, however, that this induction occurs far downstream of the immediate effects of p21.

0 These results, and the nature of the genes set forth in Table II, indicate that expression of these genes is not involved in the growth arrest function of p21. However, the abundance of secreted proteins that we found among the products of p21-activated genes has important physiological consequences. As disclosed in Example 5 below, conditioned media from p21-induced cells exhibits two biological effects predicted by
5 the nature of p21-upregulated genes: stimulation of cell growth and suppression of apoptosis. This finding, taken with the above discussed genetic destabilization in p21-induced cells, suggests that "paracrine" effects of p21 may contribute to carcinogenesis through a tumor-promoting effect on neighboring cells. This raises the possibility that suppression of p21-mediated gene induction may provide a way to achieve an anti-
0 carcinogenic effect, and that p21-mediated gene induction pathways are targets of rational drug design for a new generation of cancer-preventing drugs.

The observed paracrine, anti-apoptotic effect of p21 induction agrees with the reported activities of prosaposin and galectin-3, secreted proteins that we found to be induced by p21 (Table II). Anti-apoptotic activity has also been associated with p21-

induced intracellular proteins SOD2 (Manna *et al.*, 1998, *J. Biol. Chem.* 273: 13245-13254) and R-Ras (Suzuki *et al.*, 1998, *FEBS Lett.* 437: 112-116). Paradoxically, p21-induced t-TGase and cathepsin B (Singhal *et al.*, 1997, *J. Investig. Med.* 45: 567-575) have been ascribed a pro-apoptotic function. There are conflicting reports in the literature regarding the effects of p21 on apoptosis. In some systems, p21 overexpression induced apoptosis (Prabhu *et al.*, 1996, *Clin. Cancer Res.* 2: 1221-1229; Tsao *et al.*, 1999, *J. Virol.* 73: 4983-4990), but in other studies p21 protected cells from apoptosis induced by several types of treatment (Gorospe *et al.*, 1997, *Oncogene* 14: 929-935; Lu *et al.*, 1998, *Oncogene* 16: 705-712; Bissonnette & Hunting, 1998, *Oncogene* 16: 3461-3469). The results disclosed herein that p21 induces both anti-apoptotic and pro-apoptotic genes may explain the contradictory reports on the effects of p21 on apoptosis.

EXAMPLE 4

Identifying the Specificity of p21 Induction by Comparing IPTG-treated and Serum-Starved p21-9 Cells

The identity of p21-induced changes in cellular gene expression that are likely to be a consequence of cell growth arrest was determined as follows. Analogous experiments were performed using a truncated form of p21 (comprising amino acids 1-90) and identical results were obtained.

Growth arrest (quiescence) was induced in p21-9 cells by serum starvation produced by culturing the cells in serum-free media for 4 days. In serum-starved cells, unlike IPTG-treated p21-9 cells, the cells did not develop a senescent morphology and showed only very weak SA- β -gal expression. p21 levels in serum-starved cells were increased only about 2-fold, as opposed to the 15-20 fold increase seen in IPTG-treated

cells. Fig. 7D shows RT-PCR analysis performed as described above of the expression of a group of p21-inhibited and p21-induced genes in p21-9 cells that were growth-arrested after 4 days in serum-free media or 3 days in the presence of 50 μ M IPTG. Genes that were completely inhibited in p21-9 cells when the culture media contained 50 μ M IPTG were also inhibited in serum-starved cells, but most of these genes were inhibited to a lesser extent than in IPTG-treated cells.

Genes whose expression is induced by p21 showed three distinct patterns. The first group are genes whose expression is induced as strongly in quiescent cells as in senescent cells. These include galectin-3, superoxide dismutase 2, complement C3 and prosaposin, indicating that their induction was a consequence of cell growth arrest or that such genes were exquisitely sensitive to slightly elevated p21 levels. The second group are genes that were up-regulated in quiescent cells but not as strongly as in senescent cells. These genes include fibronectin-1, Mac2 binding protein and the Alzheimer precursor protein serum amyloid A. The third group are genes that are not detectably induced in quiescent cells but are strongly induced in senescent cells. These genes include CTGF, plasminogen activator inhibitor 1, tissue transglutaminase or natural killer cell marker protein NK4, integrin beta 3 and activin A.

The difference between the response of certain genes to induction of quiescence by serum starvation and cellular senescence through IPTG-induced overexpression of p21 identified these genes as diagnostic markers of senescence. Furthermore, novel senescence markers can now be identified by comparing their expression between p21-expressing and quiescent cells.

EXAMPLE 5
Production of Conditioned Media containing Mitogenic Factors and
Mitogenic Activity Assays

5 Several p21-upregulated secreted proteins act as growth factors, including CTGF
(Bradham *et al.*, 1991, *J. Cell Biol.* 114: 1285-1294), activin A (Sakurai *et al.*, 1994, *J.*
Biol. Chem. 269: 14118-14122), epithelin/granulin (Shoyab *et al.*, 1990, *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 87: 7912-7916) and galectin-3 (Inohara *et al.*, 1998, *Exp Cell Res.* 245:
294-302), and to a lesser extent clusterin (Koch-Brandt & Morgans, 1996, *Prog. Mol.*
10 *Subcell. Biol.* 16: 130-149), prostacyclin-stimulating factor (PSF; Yamauchi *et al.*, 1994,
Biochem. J. 303: 591-598), vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C; Joukov *et*
al., 1996, *EMBO J.* 15: 290-298), gelsolin (Ohtsu *et al.*, 1997, *EMBO J.* 16: 4650-4656)
and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1; Hayakawa *et al.*, 1992, *FEBS Lett.*
298: 29-32). These results suggested that p21 induction may cause paracrine mitogenic
5 effects. In addition, galectin-3 (Akahani *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 57: 5272-5276) and
prosaposin (Hiraiwa *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4778-4781) were shown
to have anti-apoptotic activity. Conditioned media from IPTG-treated p21-9 cells was
tested to investigate whether it would have an effect on cell growth and apoptosis.

In these experiments, conditioned media were prepared by plating 10⁶ p21-9
0 cells per 15cm plate in the presence of DMEM/ 10% FCS. The next day, IPTG was
added to a final concentration of 50 μ M. and this media was replaced three days later
with DMEM supplemented with 0.5% FCS and 50 μ M IPTG. Two days later (days 3-5
of IPTG treatment), this conditioned media was collected and stored at 4°C up to 15
days before use. Control media were prepared by adding IPTG-free DMEM/ 0.5% FCS
5 to untreated cells grown to the same density as IPTG-treated cells and collecting the
media two days thereafter.

The slow-growing human fibrosarcoma cell line HS 15.T was used to detect mitogenic activity in these conditioned media. For mitogenic activity assays, both types of conditioned media, as well as fresh media and 1:1 mixtures of conditioned media and fresh media were used to test mitogenic activity. In these experiments, the conditioned media were supplemented with 1% or 2% FCS. Briefly, HS 15.T cells were plated in 12-well plates at 15,000 cells per well. Two days later, these cells were cultured in different types of media. The cells were grown in conditioned media for 60hr, and the ³H-thymidine at a concentration of 3.13 μCi/mL was added and incubated for 24 hrs. Cells were then collected and their ³H-thymidine incorporation determined as described by Mosca *et al.* (1992, *Mol. Cell. Biol.* 12: 4375-4383).

The addition of IPTG to fresh media had no effect in this assay (not shown). As shown in Fig. 8A, there was no significant difference between cell growth in fresh media and in conditioned media from untreated p21-9 cells. In contrast, conditioned media from IPTG-treated cells increased ³H-thymidine incorporation up to three-fold (Fig. 8A). Growth stimulation of HS 15.T by conditioned media from IPTG-treated cells was also detectable by methylene blue staining (data not shown).

The effect of this conditioned media on apoptosis was also determined. These experiments used a mouse embryo fibroblast line C8, immortalized by E1A. This cell line is highly susceptible to apoptosis induced by different stimuli (Lowe *et al.*, 1994, *Science* 266: 807-810; Nikiforov *et al.*, 1996, *Oncogene* 13: 1709-1719), including serum starvation (Lowe *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2026-2030). Apoptosis was analyzed by plating 3 x 10⁵ C8 cells per 6-cm plate, and replacing the media on the following day with fresh media supplemented with 0.4% serum or with conditioned media (no fresh serum added). DNA content analysis and DAPI staining

were carried out after 24 hrs and 48 hrs, and relative cell numbers were measured by methylene blue staining (Perry *et al.*, 1992, *Mutat. Res.* 276: 189-197) after 48 hrs in low-serum media.

The addition of low-serum fresh media or conditioned media from IPTG-treated or untreated cells rapidly induced apoptosis in C8 cells, as evidenced by cell detachment and apoptotic morphology detectable in the majority of cells after DAPI staining (not shown). Conditioned media from IPTG-treated cells, however, strongly increased cell survival relative to fresh media and conditioned media from untreated cells, as measured by methylene blue staining of cells that remained attached after 48 hrs (as shown in Figure 8B). The effect of the conditioned media from p21-induced cells was even more apparent in FACS analysis of cellular DNA content, which was carried out on combined attached and floating C8 cells 24 hrs and 48 hrs after media change (Fig. 8B). Unlike many other cell lines, apoptosis of C8 cells produces only a few cells with decreased (sub-G1) amount of DNA, and it is characterized by selective disappearance of cells with G2/M DNA content (Nikiforov *et al.*, 1996, *ibid.*). Serum-starved cells in conditioned media from IPTG-treated cells retained the G2/M fraction and showed cell cycle profiles that resembled control cells growing in serum-rich media (Fig. 8B). The addition of IPTG by itself had no effect on apoptosis in C8 cells (not shown). Thus, p21 induction in HT1080 cells results in the secretion of mitogenic and anti-apoptotic factors, as predicted by the nature of p21-unregulated genes.

EXAMPLE 6

Production of Recombinant Expression Constructs containing a Reporter Gene Expressed by a p21-responsive Promoter

Promoter-reporter constructs were prepared from human PLK1, NK4 and SAA

promoters as follows. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of promoter-specific DNA was performed using genomic DNA from HT1080 p21-9 cells as the template. PCR was carried out using *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene) and primer sets listed in Table IIIa. The PCR conditions for each primer set are described in Table IIIb. PCR products were obtained and cloned into the TOPO TA cloning vectors pCR2.1/TOPO (for PLK1 and SAA) or pCRII/TOPO (for NK4). These constructs were verified by sequencing, and the *Kpn* I-*Xho* I fragments containing promoters in the correct orientation were then inserted into the *Kpn* I and *Xho* I sites in a luciferase-reporter vector pGL2 basic (Promega, Madison, WI) using standard recombinant genetic techniques (Sambrook *et al.*, *ibid.*).

Two separately-isolated plasmid clones of each promoter construct were tested for p21-regulation by transient transfection assay. Each promoter-luciferase construct was mixed with the pCMV- β -gal (Promega) plasmid in 1:1 ratio and introduced into HT1080 p21-9 cells by LIPOFECTAMINE 2000 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Six to eight hours later, media with or without 50 μ M IPTG was added to transfected cells, and cell extracts were prepared from these cells 60-72 hours later and assayed for luciferase activity (Luciferase Assay System, Promega). β -galactosidase assays were used as a normalization control for transfection efficiency.

Figure 9 shows the results of these experiments. Upon p21-induction in transfected cells, expression from promoter constructs prepared from the p21-inhibited gene PLK1 was reduced (3- to 5-fold) and expression from promoter constructs prepared from the p21-induced genes NK4 and SAA was increased (7- to 10-fold for NK4 and 20- to 30-fold for SAA). These results indicated that p21 up-regulates or down-regulates expression of these genes by regulating their promoters, and that promoter constructs of

such genes can be used to assay for p21-mediated regulation of gene expression.

Table IIIa. Primer sequences

promoter	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')
PLK1	CCTGTAATCCCAGCATTGG (SEQ ID No. 1)	AGACCTCGATCCGAGCAGA (SEQ ID No. 2)
NK4	TGGAGCTAGAAGAGCCCGTAGG (SEQ ID No. 3)	GCCAAAAGTTCAAGGAGCCAA (SEQ ID No. 4)
SAA	CAGAGTTGCTGCTATGTCCACCA (SEQ ID No. 5)	CACTCCTTGTGTGCTCCTCACC (SEQ ID No. 6)

Table IIIb. PCR conditions

promoter	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles	Product size
PLK1	94°, 1 min	68°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	990 bp
NK4	94°, 1 min	65°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	877 bp
SAA	94°, 1 min	68°, 1 min	72°, 1 min 40 sec	32	1000 bp

It should be understood that the foregoing disclosure emphasizes certain specific embodiments of the invention and that all modifications or alternatives equivalent thereto are within the spirit and scope of the invention as set forth in the appended claims.

Table I

Genes downregulated by p21 induction

A. p21-inhibited genes identified by UniGemV array:

<u>Genes</u>	<u>Accession No.</u>	<u>Balanced Diff Expr.</u>	<u>Confirmed by^a</u>
<i>Associated with mitosis:</i>			
CDC2	X05360	2.5	R, W
CKsHs1 (CDC2 kinase)	X54941	5.5	R
PLK1 (polo-like kinase)	U01038	5.1	R, W
XCAP-H condensin homolog	D38553	6	R
CENP-A (centromere protein A)	U14518	5.3	R
CENP-F (centromere protein F)	U30872	2.5	R
MAD2	U65410	6.6	R, W
BUBR1	AF053306	5.9	R
MCAK (mitotic centromere-associated kinesin)	U63743	3.8	R
HSET kinesin-like protein	AL021366	3.6	R
CHL1 helicase	U75968	3.3	R
AIK-1 (aurora/IPL1-related kinase)	D84212	4.6	R
AIM-1 (AIK-2; aurora/IPL1-related kinase)	AF004022	10.2	R
PRC1 (protein regulating cytokinesis 1)	AF044588	12.6	R, W
Citron kinase	H10809	2.7	R
Lamin B1	L37747	7	
Lamin B2	M94362	2.7	
LAP-2 (lamin-associated protein 2)	U18271	4.6	R
MPP2 (M phase phosphoprotein 2)	U74612	3.7	R
MPP5 (M phase phosphoprotein 5)	X98261	3.7	
<i>Associated with DNA replication, segregation and chromatin assembly:</i>			
Thymidine kinase 1	K02581	2.9	R
Thymidylate synthase	X02308	3.9	R
Uridine phosphorylase	X90858	2.5	
Ribonucleotide reductase M1	X59543	4.6	R
Ribonucleotide reductase M2	X59618	10.7	R
CDC47 homolog (MCM7)	D55716	9.6	R
CDC21 homolog (MCM4)	X74794	2.7	R
CDC45 homolog (Porc-PI)	AJ223728	4.1	R
HsORC1 (origin recognition complex 1)	U40152	2.7	R
DNA polymerase α	X05745	2.8	R
Replication factor C (37-kD subunit)	M87339	2.6	
B-MYB	X13293	9.1	
HPV16 E1 protein binding protein	U96131	3.7	
Topoisomerase II α	J04088	8.6	R
Chromatin assembly factor-I (p60 subunit)	U20980	2.7	R
High-mobility group chromosomal protein 2	X62534	3.7	R
High-mobility group chromosomal protein 1	D63874	3.6	R
Histone H2A.F/Z variant	AA203494	2.8	
<i>Associated with DNA repair:</i>			
XRCC9	U70310	3.6	R
RAD54 homolog	X97795	5.4	R
HEX1 5'-3' exonuclease (RAD2 homolog)	AF042282	5.2	R
ATP-dependent DNA ligase I	M36067	2.5	R
RAD21 homolog	D38551	2.9	R

Table I

<i>Associated with transcription and RNA processing:</i>			
Putative transcription factor CA150	AF017789	2.8	
Transcriptional coactivator ALY	AF047002	3.3	
WHSC1/MMSET (SET domain protein)	AA401245	2.9	
NN8-4AG (SET domain protein)	U50383	2.8	
EZH2 (enhancer of zeste homolog 2)	U61145	2.8	
PTB-associated splicing factor	X70944	2.5	
AU-rich element RNA-binding protein AUF1	U02019	2.8	
U-snRNP-associated cyclophilin	AF016371	2.8	
<i>Other genes:</i>			
3-phosphoglycerate dehydrogenase	AF006043	4.8	
L-type amino acid transporter, subunit LAT1	M80244	4.1	R
Hyaluronan-mediated motility receptor	U29343	4	
Phorbolins I (PKC-inducible)	U03891	3.9	
PSD-95 binding family protein	D13633	3.7	R
HTRIP (TNF receptor component)	U77845	3.6	
NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	X16396	3.4	
Membrane glycoprotein 4F2 antigen heavy chain	J02939	3.2	
Mucin-like protein	D79992	3.2	
MAC30 (differentially expressed in meningiomas)	L19183	2.9	
P52rIPK (regulator of interferon-induced protein kinase)	AF007393	2.8	
Putative phosphoserine aminotransferase	AA192483	2.8	
Glucose 6-phosphate translocase	Y15409	2.7	
Calcyclin binding protein	AF057356	2.6	
Ornithine decarboxylase 1	X16277	2.6	R
Trophinin assisting protein (tastin)	U04810	2.5	
Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase	L21934	2.5	
Pinin/SDK3	Y10351	2.5	
<i>Genes with unknown function:</i>			
EST	AA975298	2.7	
EST	AA034414	2.5	
EST	AA482549	2.5	

B. p21-inhibited genes identified by RT-PCR:

<u>Genes</u>	<u>Accession No.</u>	<u>UniGemV result^b</u>
Cyclin A1	U66838	IS
Cyclin B1	M25753	IS
CDC25A	NM_001789	A
Dihydrofolate reductase	J00140	1.5
ING1	NM_005537	A

^aAbbreviations: R, RT-PCR; W, western blotting

^bAbbreviations: IS, insufficient signal; A, absent from the array

Table II

Genes upregulated by p21 induction

<u>Genes</u>	<u>Accession No</u>	<u>Balanced Diff Expr</u>	<u>Confirmed by^a</u>
<i>Secreted proteins and proteins associated with extracellular matrix:</i>			
Fibronectin 1	X02761	5.7	R
Plasminogen activator inhibitor, type I	M14083	3.7	R, N
Plasminogen activator, tissue type	M15518	2.8	Z
Laminin β 2	X79683	2.1	
Desmocollin 2a/bb	X56807	3.5	
Podocalyxin-like protein	U97519	2	
Activin A (inhibin β A)	J03634	2	R
Galectin 3 (Mac-2)	AB006780	2.4	N
Mac-2 binding protein	L13210	2	R, N
Prosaposin	J03077	2.9	N
CTGF (connective tissue growth factor)	M92934	3.3	N
Granulin/epithelin	AF055008	2.1	N
Cathepsin B	L04288	2.4	N
Tissue transglutaminase	M55153	2.5	R, N, W
P37NB (slit homolog)	U32907	2.1	
Serum amyloid A protein precursor	M26152	4	R, N, W
Alzheimer's disease amyloid A4 protein precursor	D87675	2	R, N
Complement C3 precursor	K02765	5.9	R, N
Testican	X73608	2.1	N
Integrin β 3	M35999	2.1	R, N
<i>Lysosomal proteins:</i>			
N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	U06088	2.3	N
Acid alpha-glucosidase	X55079	2.4	N
Acid lipase A (cholesterol esterase)	X76488	2.1	N
Lysosomal pepstatin-insensitive protease (CLN2)	AF017456	2.5	
<i>Mitochondrial proteins:</i>			
Superoxide dismutase 2	X07834	3.5	R, N, W
Metaxin	J03060	3.4	
2,4-dienoyl-CoA reductase	U78302	2	
<i>Other genes associated with stress response and signal transduction:</i>			
Ubiquitin-conjugating enzyme (UbcH8)	AF031141	2	
Ubiquitin-specific protease 8	D29956	2	
RTP/Cap43/Drg1/Ndr1 (Inducible by nickel, retinoids, homocysteine and ER stress)	D87953	2.5	
C-193 muscle ankyrin-repeat nuclear protein (cytokine-inducible)	X83703	3	
LRP major vault protein associated with multidrug resistance	X79882	2.2	N
β -arrestin related HHCPA78 homolog (upregulated by vitamin D3)	S73591	4.1	N
R-RAS	M14949	2.4	
RAB 13 small GTPase	X75593	2.2	
P66 SHC (ski oncogene)	U73377	2	N
MK-STYX (MAP kinase phosphatase-like protein)	N75168	2	
H73 nuclear antigen/MA-3 apoptosis-related/TIS (topoisomerase-inhibitor suppressed)	U96628	2.4	

Table II

<i>Other genes:</i>			
Natural killer cells protein 4	M59807	4.4	R
TXK tyrosine kinase (T-cell specific)	L27071	3.8	
X-linked PEST-containing transporter	U05321	2.1	
AMP deaminase 2	M91029	2	N
FIP2/HYPL huntingtin-interacting protein	AF061034	2	
DNASE I homolog	X90392	2.5	N
Transcription factor 11	X77366	2	
Histone H2A.2	L19779	2.8	
Histone H2B	AL021807	2.4	
<i>Genes with unknown function:</i>			
23808	AF038192	2.1	
CGI-147	AA307912	2.1	N
EST	W89120	2.8	
EST	AI026140	2.5	
EST	AA218982	2.4	
EST	W63684	2	

^aAbbreviations: R, RT-PCR; N, northern hybridization; W, western blotting; Z, zymography

CLAIMS

1. A recombinant mammalian fibrosarcoma cell comprising a recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein p21 is expressed thereby in the fibrosarcoma cell.

2. A recombinant mammalian fibrosarcoma cell comprising a recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene transcriptionally controlled by an inducible heterologous promoter, wherein expression of p21 from the recombinant expression construct is mediated by contacting the recombinant cell with an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter.

3. A recombinant mammalian fibrosarcoma cell according to claims 1 or 2 that is a human HT1080.

4. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claims 1 or 2, wherein the mammalian p21 gene is a human p21 gene or CDK-binding fragment thereof.

5. A recombinant mammalian fibrosarcoma cell according to claim 2, further comprising a recombinant expression construct encoding a bacterial lactose repressor, wherein transcription thereof is controlled by a mammalian promoter, wherein the recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene comprises a lactose repressor-responsive promoter element and wherein transcription of p21 is controlled by said lactose-repressor responsive promoter element, and wherein

expression of p21 from the recombinant expression construct is mediated by contacting the recombinant cell with a lactose repressor-specific inducing agent.

6. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claim 5, wherein the cell is a human HT1080 fibrosarcoma cell.

7. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claim 5, wherein the recombinant expression construct encoding a bacterial lactose repressor is 3'SS.

8. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claim 5, wherein the mammalian p21 gene is a human p21 gene or CDK-binding fragment thereof.

9. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claim 5, wherein the second expression construct is LNp21CO3.

10. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claim 5, wherein the lactose repressor-specific inducing agent is a β -galactoside.

11. The recombinant mammalian fibrosarcoma cell of claim 5, identified by A.T.C.C. Accession No. _____ (p21-9).

12. A method for identifying a compound that inhibits p21-mediated modulation of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell;

- (b) assaying the cell in the presence of the compound for changes in expression of cellular genes whose expression is modulated by p21; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the cellular genes of subpart (b) is changed to a lesser extent in the presence of the compound.

13. The method of Claim 12, wherein the mammalian cell is a cell according to Claim 2 and p21 expression is produced by contacting the cell with an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or removing an agent that inhibits transcription from the promoter.

14. The method of claim 12, wherein expression of the cellular gene is repressed by p21.

15. The method of claim 14, wherein the cellular gene is identified in Table I.

16. The method of claim 12, wherein expression of the cellular gene is induced by p21.

17. The method of claim 16, wherein the cellular gene is identified in Table II.

18. The method of claim 12, wherein expression of the cellular gene is

detected using an immunological reagent.

19. The method of claim 12, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

20. The method of claim 12, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

21. A mammalian cell comprising a first recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21, and a second recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene, wherein expression of p21 is experimentally-induced in the mammalian cell thereby.

22. The mammalian cell of claim 21, wherein the recombinant expression construct encoding a mammalian p21 gene is under the transcriptional control of an inducible heterologous promoter, wherein expression of p21 from the recombinant expression construct is mediated by contacting the recombinant cell with an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter.

23. A mammalian cell of claim 21, wherein the reporter gene encodes firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein, or alkaline phosphatase.

24. A mammalian cell according to claim 21, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21.

25. A mammalian cell according to claim 24 wherein the mammalian gene promoter is a promoter of a mammalian gene identified in Table I.

26. A mammalian cell according to claim 21, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

27. A mammalian cell according to claim 26 wherein the mammalian gene promoter is a promoter of a mammalian gene identified in Table II.

28. A mammalian cell comprising a recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is inhibited by p21, wherein the promoter is from the gene ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase.

29. A mammalian cell comprising a recombinant expression construct

encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21, wherein the promoter is from the gene serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B.

30. A method for identifying a compound that inhibits p21-mediated modulation of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell according to Claim 21 in the presence or absence of the compound;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the reporter gene is changed to a lesser extent in the presence of the compound.

31. The method of Claim 30, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21.

32. The method of Claim 31, wherein the mammalian gene promoter is a promoter of a mammalian gene identified in Table I.

33. The method of Claim 30, wherein the reporter gene is under the

transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

34. The method of Claim 33, wherein the mammalian gene promoter is a promoter of a mammalian gene identified in Table II.

35. The method of claim 30, wherein expression of the reporter gene is detected using an immunological reagent.

36. The method of claim 30, wherein expression of the reporter gene is detected by assaying for an activity of the reporter gene product.

37. The method of claim 30, where expression of the reporter gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

38. A method for identifying a compound that inhibits p21-mediated modulation of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell according to Claim 28 in the presence or absence of the compound;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the reporter gene is changed to a lesser extent in the presence of the compound.

39. A method for identifying a compound that inhibits p21-mediated modulation of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell according to Claim 29 in the presence or absence of the compound;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the reporter gene is changed to a lesser extent in the presence of the compound.

40. A method for identifying a compound that inhibits senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) treating the mammalian cell in the presence and absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;
- (b) assaying the mammalian cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of senescence if genes that are repressed by p21 are repressed to a lesser extent, or genes that are induced by p21 are induced to a lesser extent, in the presence of the compound than in the absence of the compound.

41. The method of claim 40, wherein the mammalian cell is assayed for genes that are induced by p21.

42. The method of claim 41, wherein the genes are identified in Table II.
43. The method of claim 40, wherein the mammalian cell is assayed for genes that are repressed by p21.
44. The method of claim 43, wherein the genes are identified in Table I.
45. The method of claim 40, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.
46. The method of claim 40, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.
47. The method of claim 40, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.
48. A method for identifying a compound that inhibits senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:
- (a) contacting a mammalian cell in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence, wherein the cell comprises a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21;
 - (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and

- (c) identifying the compound as an inhibitor of senescence if expression of the reporter gene is changed to a lesser degree in the presence of the compound than in the absence of the compound.

49. The method of Claim 48, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

50. The method of claim 49, wherein the mammalian gene promoter is a promoter of a mammalian gene identified in Table II.

51. The method of Claim 48, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21.

52. The method of claim 48, wherein the mammalian gene promoter is a promoter of a mammalian gene identified in Table I.

53. The method of claim 48, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

54. The method of claim 48, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

55. The method of claim 48, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

56. A method for identifying a compound that inhibits senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell according to Claim 28 in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of senescence if expression of the reporter gene is changed to a lesser degree in the presence of the compound than in the absence of the compound.

57. A method for identifying a compound that inhibits senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell according to Claim 29 in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of senescence if expression of the reporter gene is changed to a lesser degree in the presence of the compound than in the absence of the compound.

58. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the

step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim
12.

59. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the
step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim
30.

60. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the
step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim
38.

61. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the
step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim
39.

62. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the
step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim
40.

63. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the
step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim
48.

64. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the

step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 56.

65. A method for inhibiting cellular senescence, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 57.

66. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 12.

67. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 30.

68. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 38.

69. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 39.

70. A method for inhibiting production of disease-associated gene products

in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 40.

71. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 48.

72. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 56.

73. A method for inhibiting production of disease-associated gene products in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 57.

74. A method for identifying a compound that potentiates the effects of p21-mediated modulation of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell;
- (b) assaying the cell in the presence and absence of the compound for changes in expression of cellular genes whose expression is induced or repressed p21; and
- (c) identifying the compound as a potentiator of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the cellular genes of subpart (b) is induced or repressed to a greater extent in the presence of the

compound than in the absence of the compound.

75. The method of Claim 74, wherein the mammalian cell is a cell according to Claim 2 and p21 expression is produced by contacting the cell with an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter

76. The method of claim 74, wherein expression of the cellular gene is repressed by p21.

77. The method of claim 76, wherein the cellular gene is identified in Table I.

78. The method of claim 74, wherein expression of the cellular gene is induced by p21.

79. The method of claim 78, wherein the cellular gene is identified in Table II.

80. The method of claim 74, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

81. The method of claim 74, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

82. The method of claim 74, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

83. The method of claim 74, wherein p21 is produced in the cell to an extent that its effect is less than the maximum effect of p21 expression in the cell.

84. A method for identifying a compound that potentiates senescence, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence, wherein the cell comprises a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as a potentiator of senescence if expression of the reporter gene changes to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

85. The method of Claim 84, wherein the mammalian cell is a cell according to Claim 2 and senescence is produced by contacting the cell with an inducing agent that induces p21 transcription from the inducible promoter

86. The method of Claim 84, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

87. The method of claim 86, wherein the genes are identified in Table II.

88. The method of Claim 84, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21.

89. The method of claim 88, wherein the genes are identified in Table I.

90. The method of claim 84, wherein expression of the reporter gene is detected using an immunological reagent.

91. The method of claim 84, wherein expression of the reporter gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

92. The method of claim 84, where expression of the reporter gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

93. A method for identifying a compound that promotes induction of senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) treating the mammalian cell with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence in the presence of the compound;
- (b) assaying the mammalian cell for repression or induction of genes that are

repressed or induced by p21 gene expression; and

- (c) identifying compounds that promote induction of senescence if genes that are repressed by p21 are further repressed, or genes that are induced by p21 are further induced, in the presence of the compound.

94. The method of claim 93, wherein the mammalian cell is assayed for genes that are induced by p21.

95. The method of claim 94, wherein the genes are identified in Table II.

96. The method of claim 93, wherein the mammalian cell is assayed for genes that are repressed by p21.

97. The method of claim 96, wherein the genes are identified in Table I.

98. The method of claim 93, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

99. The method of claim 93, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

100. The method of claim 93, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

101. A method for identifying a compound that promotes induction of senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence, wherein the cell comprises a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying compounds that promote induction of senescence if expression of the reporter gene changes to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

102. The method of Claim 101, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

103. The method of claim 102, wherein the genes are identified in Table II.

104. The method of Claim 101, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21.

105. The method of claim 104, wherein the genes are identified in Table I.

106. The method of claim 101, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

107. The method of claim 101, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

108. The method of claim 101, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

109. A method for identifying a compound that promotes induction of senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell according to Claim 28 in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying compounds that promote induction of senescence if expression of the reporter gene changes to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

110. A method for identifying a compound that promotes induction of senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell according to Claim 29 in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;

- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying compounds that promote induction of senescence if expression of the reporter gene changes to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

5

111. A method for promoting senescence in a cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 74.

)

112. The method of claim 111, wherein the cell is a tumor cell, a hyperplastic cell or a cell that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation.

5

113. A method for promoting senescence in a cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 84.

0

114. The method of claim 113, wherein the cell is a tumor cell, a hyperplastic cell or a cell that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation.

115. A method for promoting senescence in a cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 93.

116. The method of claim 115, wherein the cell is a tumor cell, a hyperplastic

cell or a cell that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation.

117. A method for promoting senescence in a cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 101.

118. The method of claim 117, wherein the cell is a tumor cell, a hyperplastic cell or a cell that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation.

119. A method for promoting senescence in a cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 109.

120. The method of claim 119, wherein the cell is a tumor cell, a hyperplastic cell or a cell that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation.

121. A method for promoting senescence in a cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 110.

122. The method of claim 121, wherein the cell is a tumor cell, a hyperplastic cell or a cell that is pathological or disease-causing due to excessive proliferation.

123. A compound that inhibits p21 modulation of cellular gene expression,

wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) inducing expression of p21 in a mammalian cell;
- (b) assaying the cell in the presence or absence of the compound for changes in expression of cellular genes whose expression is modulated by p21;
and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the cellular genes of subpart (b) is changed to a lesser extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

124. A compound that inhibits p21 modulation of cellular gene expression, wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell according to Claim 21 in the presence or absence of the compound;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of p21-mediated modulation of cellular gene expression if expression of the reporter gene is changed to a lesser extent in the presence of the compound.

125. A compound that inhibits senescence in a mammalian cell, wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) treating the mammalian cell in the presence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;

- (b) assaying the mammalian cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of senescence if genes that are repressed by p21 are repressed to a lesser extent, or genes that are induced by p21 are induced to a lesser extent, in the presence of the compound.

126. A compound that inhibits senescence in a mammalian cell, wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence, wherein the cell comprises a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as an inhibitor of senescence if expression of the reporter gene is changed to a lesser extent in the presence of the compound.

127. A compound that potentiates senescence in a mammalian cell, wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) producing expression of p21 in a mammalian cell;
- (b) assaying the cell for changes in expression of cellular genes whose expression is induced or repressed by p21; and

- (c) identifying the compound as a potentiator of senescence if expression of the cellular genes of subpart (b) is induced or repressed to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

5

128. A compound that potentiates senescence in a mammalian cell, wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) treating the mammalian cell in the presence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence;
- (b) assaying the mammalian cell for repression or induction of genes that are repressed or induced by p21 gene expression; and
- (c) identifying the compound as a potentiator of senescence if genes that are repressed by p21 are repressed to a greater extent, or genes that are induced by p21 are induced to a greater extent, in the presence of the compound.

)

5

129 A compound that potentiates senescence in a mammalian cell, wherein the compound is produced by a method having the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell in the presence or absence of the compound with an agent or culturing the mammalian cell under conditions that induce senescence, wherein the cell comprises a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21;

0

- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying the compound as a potentiator of senescence if expression of the reporter gene changes to a greater extent in the presence of the compound than in the absence of the compound.

130. A method for producing an anti-apoptotic or mitogenic factor from a mammalian cell, the method comprising the steps of producing p21 expression in the mammalian cell and culturing the cell in a cell culture medium for a time sufficient to produce the anti-apoptotic or mitogenic factor.

131. The method of claim 130, wherein the mammalian cell is a mammalian cell according to claim 2, and p21 expression is induced by culturing the mammalian cell in a culture medium containing an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter.

132. A method according to claim 130, wherein the anti-apoptotic or mitogenic compound produced by the mammalian cell is a compound whose expression is induced by p21.

133. A mammalian cell culture media, conditioned by growth of a mammalian cell that expresses p21.

134. A mammalian cell culture media according to claim 133, wherein the

mammalian cell is a mammalian cell according to claim 2 and p21 expression is induced by culturing the mammalian cell in a culture medium containing an inducing agent that induces transcription from the inducible promoter or by removing an agent that inhibits transcription from such promoter.

5

135. A method for obtaining a plurality of nucleic acid species enriched for genes involved in cell cycle progression, the method comprising the steps of:

- (a) inducing expression of p21 in a mammalian cell;
- (b) obtaining cellular mRNA from a mammalian cell before and after p21 is induced according to step (a);
- (c) comparing expression of the cellular mRNA obtained from the cell before p21 is induced with expression of cellular mRNA after p21 is induced; and
- (d) obtaining the plurality of nucleic acid species enriched for genes whose expression is repressed in the cell after p21 expression is induced.

5

136. A method for obtaining a plurality of nucleic acid species enriched for genes that encode secreted proteins with paracrine functions and proteins involved in senescence and age-related diseases, the method comprising the steps of:

- (a) inducing expression of p21 in a mammalian cell;
- (b) obtaining cellular mRNA from a mammalian cell before and after p21 is induced; and
- (c) obtaining the plurality of nucleic acid species enriched for genes whose expression is induced in the cell after p21 expression is induced.

0

137. A method for identifying a plurality of cellular genes that are markers of cellular senescence, comprising the steps of:

- (a) inducing expression of p21 in a first population of mammalian cells and quiescence in a second population of mammalian cells;
- (b) obtaining mRNA from each population of cells;
- (c) comparing the pattern of gene expression in cells in the first population before and after p21 is induced with the pattern of gene expression in cells in the second population before and after the cells became quiescent;
- (d) comparing the plurality of genes strongly induced in the p21-induced cells with the plurality of genes strongly induced in quiescent cells; and
- (e) identifying the genes strongly induced in p21 induced cells that are not strongly induced in quiescent cells.

138. A method for detecting senescence in a mammalian cell, the method comprising the step of detecting expression of a gene selected from the group consisting of the genes are connective tissue growth factor, serum amyloid A, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, Mac2 binding protein, or tissue transglutaminase.

139. A method for identifying a compound that induces senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) assaying a mammalian cell in the presence and absence of the compound for expression of a gene whose expression is modulated by p21; and

(b) identifying compounds that induce senescence when expression of a gene that is repressed by p21 is repressed in the cell, or expression of a gene that is induced by p21 is increased in the cell, in the presence of the compound.

5

140. The method of Claim 139, wherein the gene is induced by p21.

141. The method of claim 140, wherein the gene is identified in Table II.

)

142. The method of Claim 139, wherein the gene is repressed by p21.

143. The method of claim 142, wherein the gene is identified in Table I.

5

144. The method of claim 139, wherein expression of the gene is detected using an immunological reagent.

145. The method of claim 139, wherein expression of the gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

0

146. The method of claim 139, where expression of the gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

147. The method of claim 139, wherein the assay in subpart (a) is performed in the presence of an anticancer drug.

148. The method of claim 139, wherein the mammalian cell comprises an inducible p21 gene, and wherein the assay in subpart (a) is performed in the presence of an amount of an agent that induces p21 expression whereby the extent of p21 induction is insufficient for complete inhibition of genes inhibited by p21.

149. A method for identifying a compound that induces senescence in a mammalian cell, the method comprising the steps of:

- (a) contacting a mammalian cell with the compound, wherein the cell comprises a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is modulated by p21;
- (b) assaying the cell for changes in expression of the reporter gene; and
- (c) identifying compounds that induce senescence if expression of the reporter gene is reduced when under the transcriptional control of a promoter from a gene repressed by p21, or expression of the reporter gene is increased when under the transcriptional control of genes that are induced by p21, when the cell is contacted with the compound.

150. The method of Claim 149, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

151. The method of claim 150, wherein the genes are identified in Table II.

152. The method of Claim 149, wherein the reporter gene is under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is repressed by p21.

5 153. The method of claim 152, wherein the genes are identified in Table I.

154. The method of claim 149, wherein expression of the reporter gene is detected using an immunological reagent.

10 155. The method of claim 149, wherein expression of the reporter gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

156. The method of claim 149, where expression of the reporter gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

5

157. A recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is inhibited by p21.

10 158. A recombinant expression construct according to claim 157, wherein the promoter is from the gene ORC1, PRC1, XRCC9, CDC2, cyclin B1, AIK1, CENP-A, CENP-F, MAD2, BUBR1, MCAK, HSET, CHL1, thymopoietin α , MPP2, MPP5, CDC47/MCM7, CDC21/MCM4, DNA ligase I, DNA polymerase α , Rad54, exonuclease HEX1/RAD2, PLK1, DHFR or citron kinase.

159. A recombinant expression construct encoding a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a mammalian gene whose expression is induced by p21.

160. A recombinant expression construct according to claim 159, wherein the promoter is from the gene serum amyloid A, complement C3, connective tissue growth factor, integrin β -3, activin A, natural killer cell protein 4, prosaposin, Mac2 binding protein, galectin-3, superoxide dismutase 2, granulins/epithelins, p66^{shc}, lysosomal β -galactosidase, or cathepsin B.

161. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 12.

162. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 30.

163. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 38.

164. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic

compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 39.

165. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 40.

166. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 48.

167. A method for inhibiting production of mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 56.

168. A method for inhibiting of production mitogenic or anti-apoptotic compounds in a mammalian cell, the method comprising the step of contacting the cell with a compound produced according to the method of claim 57.

(57) Abstract

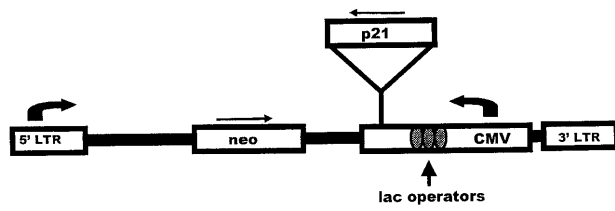
This invention provides methods and reagents for identifying genes involved in cell cycle progression, growth promotion, modulation of apoptosis, cellular senescence and aging, and methods for identifying compounds that inhibit or potentiate cellular senescence, regulated by p21.

Representative Drawing

Fig.1

1/10

Figure 1. IPTG-regulated retroviral vector LNp21CO3



2/10

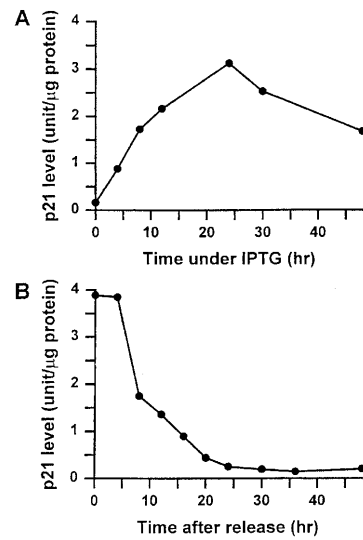


Fig. 2

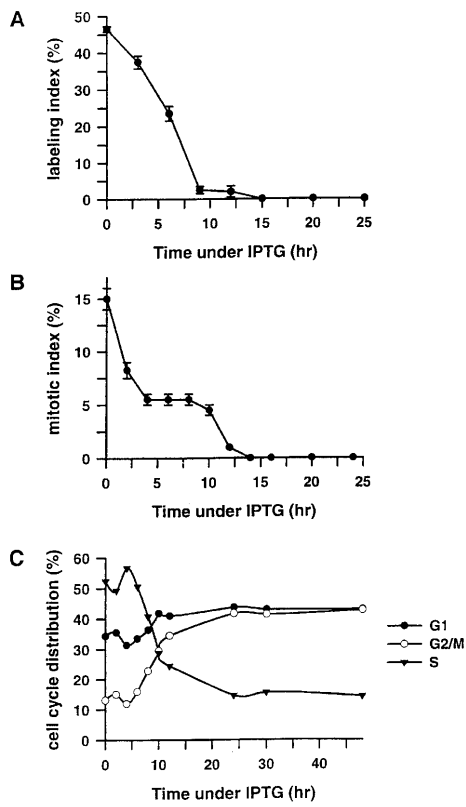


Fig. 3

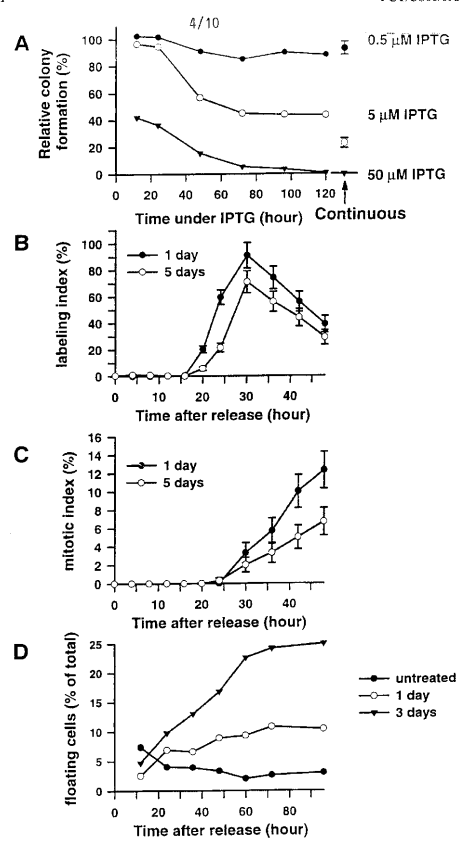


Fig. 4

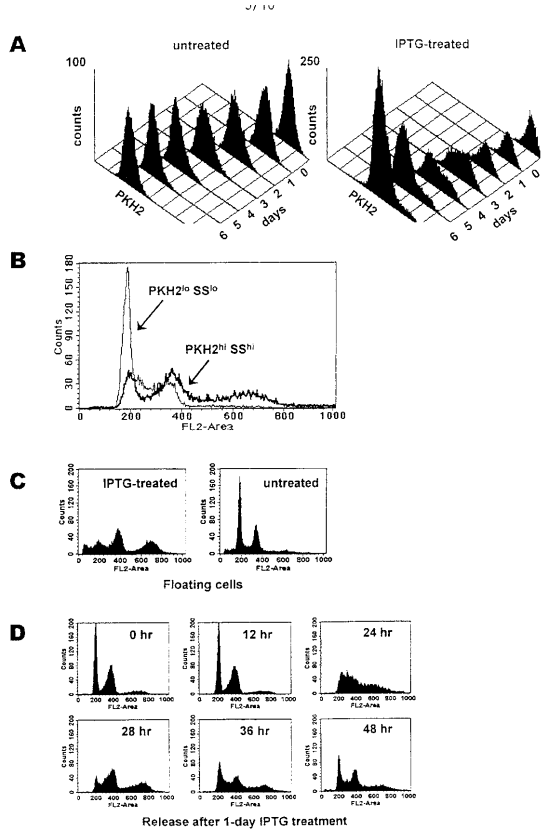


Fig. 5

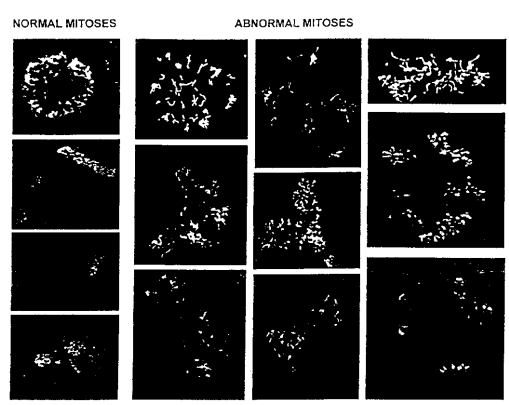


Fig. 6

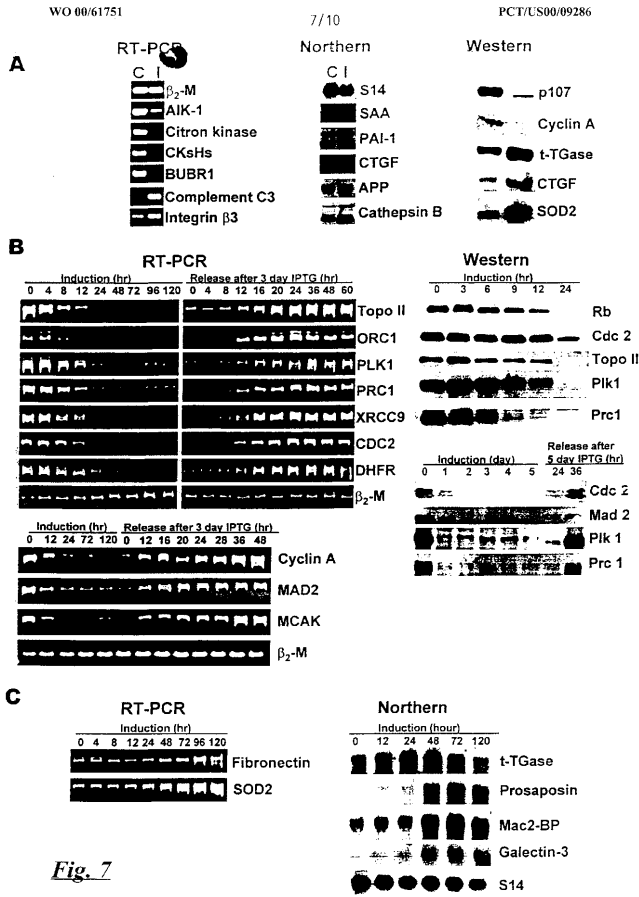


Fig. 7

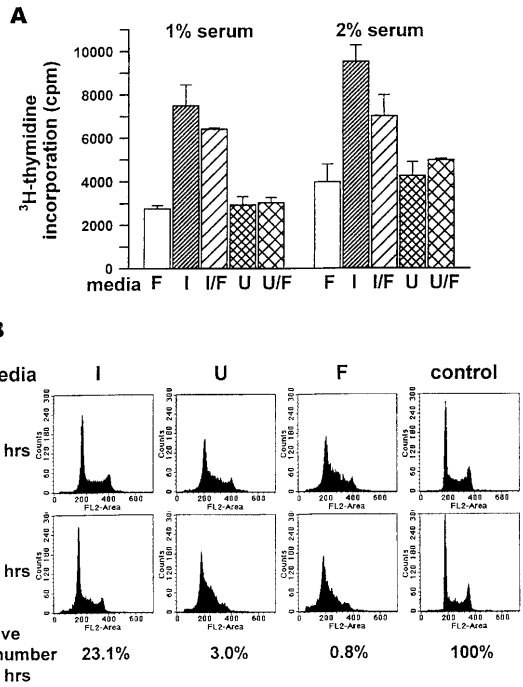


Fig. 8

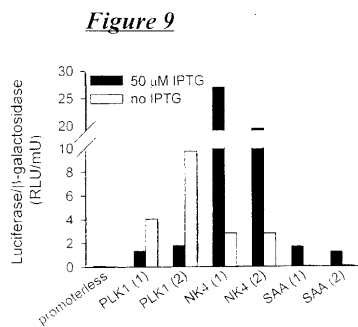


Figure 9

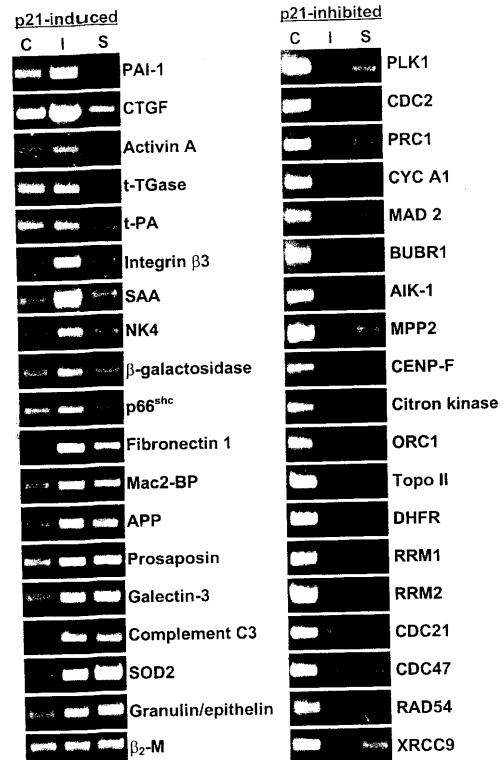


Figure 7D C, control untreated; I, IPTG-treated; S, serum-starved cells

专利名称(译)	用于鉴定和调节由p21调节的基因表达的试剂和方法		
公开(公告)号	JP2006340722A	公开(公告)日	2006-12-21
申请号	JP2006203083	申请日	2006-07-26
申请(专利权)人(译)	伊利诺伊州的盐湖研究所董事会		
[标]发明人	チャンバイデー ロニンソンイゴールビー		
发明人	チャン、バイ-デー ロニンソン、イゴールビー.		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/02 C12N5/06 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47		
CPC分类号	C07K14/4738		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12Q1/68.A C12Q1/02 C12N5/00.E C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/00.202.U C12N5/09 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024 /CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ21 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063 /QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR60 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065 /AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	三好秀		
优先权	60/128676 1999-04-09 US 09/449589 1999-11-29 US		
其他公开文献	JP2006340722A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

鉴定与细胞周期进程，生长促进阶段，凋亡调控，细胞衰老和衰老以及抑制或增强p21调控的细胞衰老有关的基因的方法和试剂 提供了鉴定化合物的方法。包含可诱导的p21基因的哺乳动物纤维肉瘤细胞。一种使用该细胞鉴定可抑制哺乳动物细胞衰老的化合物的方法。一种通过使细胞与抑制衰老的化合物接触来抑制Sasai stick，衰老相关疾病或衰老相关基因产物衰老的方法。 [选型图]图1

图1。 (PTC 诱导)レトロウイルスベクター-p21

