(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2009-77714
(P2009-77714A)
(43)公開日　平成21年4月16日(2009.4.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M	

審査請求 有　請求項の数 26　ＯＬ　外国語出願　（全 153 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-238858 (P2008-238858)
(22)出願日　平成20年9月18日 (2008.9.18)
(62)分割の表示　特願2004-519674 (P2004-519674)の分割
原出願日　平成15年6月27日 (2003.6.27)
(31)優先権主張番号　60/394,121
(32)優先日　平成14年7月3日 (2002.7.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503063593
ザ　ボード　オブ　トラスティーズ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　イリノイ
アメリカ合衆国　６１８０１　イリノイ　アーバナ　サウス　ライト　ストリート　５０６　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
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤　正和
(72)発明者　ロニンソン、　イゴア　ビー.
アメリカ合衆国　６００９１　イリノイ州　ウィルメッテ　リンカーン　レーン　２７３１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍老化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】その発現が哺乳動物腫瘍細胞の老化の進行に関連する遺伝子の発現を調節する化合物を同定するための方法を提供する。
【解決手段】細胞毒性物質を用いる処置により誘導される腫瘍老化遺伝子を同定する。これらの細胞遺伝子の発現を誘導し、そして細胞老化、とりわけ腫瘍細胞における老化を生じさせる化合物を同定するための試薬および方法。また、その発現が老化細胞において調節される、遺伝子のプロモーターの転写制御下においてレポーター遺伝子を発現させる、組換え発現構築物を含有する組換え哺乳動物細胞である試薬、および、このような細胞を用いてこれらの細胞遺伝子の発現を調節する化合物を同定するための方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）化合物の存在下および不存在下において哺乳動物細胞を培養すること；
（ｂ）化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記細胞における表２Ａの少なくとも１つの前記細胞遺伝子の発現をアッセイすること；並びに
（ｃ）表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下においてよりも化合物の存在下において高い場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項２】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
表２Ａの前記細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
表２Ａの前記細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
表２Ａの前記細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記細胞遺伝子がＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の誘導を、表２Ａの細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を用いることにより、そして化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも増加するレポーター遺伝子の発現を検出することによりアッセイする、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
ｄ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；並びに
ｅ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項９に記載の方法。
【請求項１３】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）化合物の存在下および不存在下において哺乳動物細胞を培養すること；
（ｂ）化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記細胞における表２Ａの少なくとも１つの前記細胞遺伝子の発現をアッセイすること；

（ｃ）細胞増殖および老化の形態学的特徴に関して組換え哺乳動物細胞をアッセイすること；並びに
（ｄ）表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下においてよりも化合物の存在下において高く、そして化合物の存在下において細胞が増殖抑制され、老化の形態学的特徴を表す場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項１４】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
表２Ａの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】
表２Ａの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１８】
表２Ａの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１３に記載の方法。
【請求項１９】
前記細胞遺伝子がＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである、請求項１３に記載の方法。
【請求項２０】
表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の誘導を、表２Ａの細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を用いることにより、そして化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも増加するレポーター遺伝子の発現を検出することによりアッセイする、請求項１３に記載の方法。
【請求項２１】
ｅ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；並びに
ｆ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項２２】
ｅ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；並びに
ｆ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項２１または２２に記載の方法。
【請求項２４】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項２１または２２に記載の方法。
【請求項２５】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項２１または２２に記載の方法。
【請求項２６】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）レポーター遺伝子に作動可能に連結された表２Ａの細胞遺伝子に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を前記哺乳動物細胞に導入することにより、組換え哺乳動

物細胞を作製すること；
（ｂ）化合物の存在下および不存在下において組換え哺乳動物細胞を培養すること；
（ｃ）化合物の不存在下の組換え細胞における前記レポーター遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記組換え細胞におけるレポーター遺伝子の発現をアッセイすること；並びに
（ｄ）レポーター遺伝子の遺伝子発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも高い場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項２７】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
細胞遺伝子のプロモーターがＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンに由来するプロモーターである、請求項２６に記載の方法。
【請求項３０】
ｅ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｆ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項３１】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）レポーター遺伝子に作動可能に連結された表２Ａの細胞遺伝子に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を前記哺乳動物細胞に導入することにより、組換え哺乳動物細胞を作製すること；
（ｂ）化合物の存在下および不存在下において組換え哺乳動物細胞を培養すること；
（ｃ）化合物の不存在下の組換え細胞における前記レポーター遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記組換え細胞におけるレポーター遺伝子の発現をアッセイすること；
（ｄ）細胞増殖および老化の形態学的特徴に関して組換え哺乳動物細胞をアッセイすること；並びに
（ｅ）レポーター遺伝子発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも高く、そして化合物の存在下において細胞が増殖抑制され、老化の形態学的特徴を表す場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項３５】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
細胞遺伝子のプロモーターがＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、

ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンに由来するプロモーターである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３８】
ｆ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｇ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３９】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４２】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）化合物の存在下および不存在下において哺乳動物細胞を培養すること；
（ｂ）化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記細胞における表１の少なくとも１つの前記細胞遺伝子の発現をアッセイすること；
（ｃ）表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも低い場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項４３】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
表１の細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４６】
表１の細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４７】
表１の細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４８】
前記細胞遺伝子がＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４９】
表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の抑制を、表１の細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を用いることにより、そして化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも減少したレポーター遺伝子の発現を検出することによりアッセイする、請求項４２に記載の方法。
【請求項５０】
ｄ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｅ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項４１に記載の方法。

【請求項５１】
ｄ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｅ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項４８に記載の方法。
【請求項５２】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項５０または５１に記載の方法。
【請求項５３】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項５０または５１に記載の方法。
【請求項５４】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項５０または５１に記載の方法。
【請求項５５】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）化合物の存在下および不存在下において哺乳動物細胞を培養すること；
（ｂ）化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記細胞における表１の少なくとも１つの前記細胞遺伝子の発現をアッセイすること；
（ｃ）細胞増殖および老化の形態学的特徴に関して組換え哺乳動物細胞をアッセイすること；並びに
（ｄ）表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下においてよりも化合物の存在下において低く、そして化合物の存在下において細胞が増殖抑制され、老化の形態学的特徴を表す場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項５６】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
表１の細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５９】
表１の細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項５５に記載の方法。
【請求項６０】
表１の細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項５５に記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞遺伝子がＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１である、請求項５５に記載の方法。
【請求項６２】
表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の抑制を、表１の細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞を用いることにより、そして化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも減少するレポーター遺伝子の発現を検出することによりアッセイする、請求項５５に記載の方法。
【請求項６３】
ｅ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｆ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；

の工程をさらに含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項６４】
ｅ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｆ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項６３または６４に記載の方法。
【請求項６６】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項６３または６４に記載の方法。
【請求項６７】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項６３または６４に記載の方法。
【請求項６８】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）レポーター遺伝子に作動可能に連結された表１の細胞遺伝子に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を前記哺乳動物細胞に導入することにより、組換え哺乳動物細胞を作製すること；
（ｂ）化合物の存在下および不存在下において組換え哺乳動物細胞を培養すること；
（ｃ）化合物の不存在下の組換え細胞における前記レポーター遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記組換え細胞におけるレポーター遺伝子の発現をアッセイすること；並びに
（ｄ）レポーター遺伝子の発現が化合物の不存在下においてよりも化合物の存在下において低い場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項６９】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７１】
細胞遺伝子のプロモーターがＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１に由来するプロモーターである、請求項６８に記載の方法。
【請求項７２】
ｅ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｆ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項６８に記載の方法。
【請求項７３】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項７２に記載の方法。
【請求項７５】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項７２に記載の方法。
【請求項７６】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法であって、

（ａ）レポーター遺伝子に作動可能に連結された表１の細胞遺伝子に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を前記哺乳動物細胞に導入することにより、組換え哺乳動物細胞を作製すること；
（ｂ）化合物の存在下および不存在下において組換え哺乳動物細胞を培養すること；
（ｃ）化合物の不存在下の組換え細胞における前記レポーター遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記組換え細胞におけるレポーター遺伝子の発現をアッセイすること；
（ｄ）細胞増殖および老化の形態学的特徴に関して組換え哺乳動物細胞をアッセイすること；並びに
（ｅ）レポーター遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも低く、そして化合物の存在下において細胞が増殖抑制され、老化の形態学的特徴を表す場合に、老化を誘導する化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項７７】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項７６に記載の方法。
【請求項７９】
細胞遺伝子のプロモーターがＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１に由来するプロモーターである、請求項７６に記載の方法。
【請求項８０】
ｆ）表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現をアッセイすること；および
ｇ）表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下において化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定すること；
の工程をさらに含む、請求項７６に記載の方法。
【請求項８１】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項８０に記載の方法。
【請求項８２】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項８０に記載の方法。
【請求項８３】
表２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項８０に記載の方法。
【請求項８４】
哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物であって、前記化合物が請求項９、２１、２２、３０、３８、５０、５１、６３、６４、７２または８０に記載の方法に従って同定される前記化合物。
【請求項８５】
非レチノイド化合物である、請求項８４に記載の化合物。
【請求項８６】
異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状の処置の有効性を評価するための方法であって、
（ａ）処理前および処理後の異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を有する動物に由来する細胞を含む生物学的サンプルを入手すること；
（ｂ）処置後の表１、２Ａまたは２Ｂの少なくとも１つの遺伝子の発現を、処置前の前記遺伝子の発現と比較すること；並びに
（ｃ）表２Ａおよび２Ｂの少なくとも１つの遺伝子が処置前よりも処置後に高いか、あるいは表１の少なくとも１つの遺伝子の発現が処置前よりも処置後に低い場合に、前記処置が異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を処置するための有効性を有していると決定すること；

の工程を含む方法。
【請求項８７】
前記生物学的サンプルが腫瘍細胞を含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
前記遺伝子が表２Ａの細胞遺伝子である、請求項８６に記載の方法。
【請求項８９】
少なくとも１つの細胞遺伝子がＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記遺伝子が表１の細胞遺伝子である、請求項８６に記載の方法。
【請求項９１】
前記細胞遺伝子がＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１である、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
表１、２Ａまたは２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項８６に記載の方法。
【請求項９３】
表１、２Ａまたは２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項８６に記載の方法。
【請求項９４】
表１、２Ａまたは２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項８６に記載の方法。
【請求項９５】
異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を処置するための方法であって、異常増殖細胞または腫瘍細胞において老化を誘導する、請求項９、２１、２２、３０、３８、５０、５１、６３、６４、７２または８０に記載の方法に従って生成された治療有効量の化合物を前記疾患または症状を有する動物に投与する工程を含む、前記方法。
【請求項９６】
化合物が非レチノイド化合物である、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導を抑制する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）細胞増殖を抑制する濃度の細胞毒性物質と細胞を接触させること；
（ｂ）細胞が老化するときに誘導される細胞遺伝子の発現における変化に関して化合物の存在下および不存在下で細胞をアッセイすること；並びに
（ｃ）下位区分（ｂ）の細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下で誘導されるが、化合物の存在下で誘導されない場合に、細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導の抑制因子として化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項９８】
前記細胞遺伝子がサイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパイン－Ｌ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ　ウロキナーゼ、アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、または膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）である、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項９７に記載の方法。
【請求項１００】

細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０１】
細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０２】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０３】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項９７に記載の方法。
【請求項１０４】
細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導を抑制する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）レポーター遺伝子に作動可能に連結された、サイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパイン－Ｌ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ　ウロキナーゼ、アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、または膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を前記哺乳動物細胞に導入することにより、組換え哺乳動物細胞を作製すること
（ｂ）細胞増殖を抑制する濃度の細胞毒性物質に細胞を接触させること；
（ｃ）化合物の不存在下の組換え細胞における前記レポーター遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記組換え細胞におけるレポーター遺伝子の発現をアッセイすること；
（ｄ）下位区分（ｃ）の細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下で誘導されるが、化合物の存在下で誘導されない場合に、細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導の抑制因子として化合物を同定すること；
の工程を含む方法。
【請求項１０５】
細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０７】
細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０８】
細胞老化を誘導する化合物で処置された動物において処置の有効性を決定するための方法であって、
（ａ）老化マーカーに関して処理前および後の動物からの生物学的液体をアッセイすること；並びに
（ｂ）処理後に検出されるマーカーの量が処理前に検出されるマーカーの量よりも多い場合に、処理が有効であることを決定すること；
の工程を含む方法。
【請求項１０９】
老化マーカーがマスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
体液が血液、尿、滲出液、腹水、唾液、脳脊髄液、頸管分泌物、膣分泌物、子宮内膜分泌物、消化管分泌物、気管支分泌物、痰、または乳房からの分泌物もしくは洗浄液である、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１１】
老化マーカーが相補的核酸へのハイブリダイゼーション、免疫学的試薬の使用、または

細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１０８に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

発明の背景

本出願は、国立衛生研究所からの助成金、第＿＿＿＿＿号により支援された。政府は本発明において一定の権利を有し得る。

【０００２】

１．本発明の技術分野

本発明は、細胞遺伝子発現における変化、および細胞遺伝子発現に変化を生じる化合物に関する。詳細には、本発明は、化学療法剤、例えばドキソルビシン、および電離放射線を含む細胞毒性物質を用いる処置の場合に、その発現が哺乳動物腫瘍細胞の老化の進行に関連する遺伝子の同定に関する。さらに具体的には、本発明は、これらの細胞遺伝子の発現を調節する化合物を同定するための方法を提供する。本発明はまた、老化関連遺伝子の発現のために、プロモーターの転写制御下で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動物細胞である試薬、および、前記細胞においてこれらの細胞遺伝子の発現を調節し、そして老化を生じさせる化合物を同定するためにこのような細胞を使用するための方法を提供する。本発明の方法を用いて同定される化合物は、異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患および障害を処置するための治療方法において使用するために提供される。診断方法、とりわけ抗癌治療計画の有効性をモニタリングするための方法もまた、本発明により提供される。

【０００３】

２．関連技術についての概説

癌は、依然として米国で主要な死亡原因の１つである。現在の癌治療には、化学療法および放射線療法などがあるが、これらの処置はすべての腫瘍細胞に対して常に細胞毒性であるというわけではない。処置に耐えた細胞の中には回復して増殖を再開する細胞もあるし、永続的に増殖停止する細胞もある。抗癌剤で処置された腫瘍細胞の不可逆的増殖停止は、細胞死または永続的な増殖停止の結果であり得る。損傷誘導性の細胞死のメカニズムは活発な研究の対象であるが、腫瘍細胞における最終的な増殖停止の決定因子に関してはほとんど解っていない。

【０００４】

種々の腫瘍細胞系の、インビトロおよびインビボでの種々の抗癌物質への暴露は、細胞老化の表現型の特徴、例えば細胞肥大、接着および細胞内顆粒密度（ｇｒａｎｕｌａｒｉｔｙ）の増加、並びに老化に関連するβ－ガラクトシダーゼ活性（ＳＡ－β－ｇａｌ；Ｃｈａｎｇら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５９：３７６１－３７６７（１９９９ａ））などを伴う長期間の増殖停止を誘導する。処置された腫瘍細胞における老化表現型の誘導は、種々の細胞毒性物質、例えばドキソルビシン、アフィジコリン、シスプラチン、電離放射線、シタラビン、エトポシドまたはタキソールで処置された細胞において観察されている；この応答は、検出可能な増殖抑制を生じる最低濃度の細胞毒性物質で処置された腫瘍細胞においてさえ検出可能である（Ｃｈａｎｇら（１９９９ａ）前出）。腫瘍細胞の老化は、細胞毒性物質のみならず、ビタミンＡ誘導体、レチノイドを用いても、最小限の細胞毒性で増殖抑制を生じる条件下において生じうる（Ｃｈａｎｇら（１９９９ａ）前出）。乳癌細胞におけるレチノイド誘導性の老化は、Ｄｏｋｍａｎｏｖｉｃら（Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌ．　Ｔｈｅｒ．１：１６－１９（２００２））、および共有で同時係属中の２００１年５月２５日出願の米国特許出願第０９／８６５，８７９号（参照して本明細書に組み込まれる）に記載されているような、いくつかの増殖抑制遺伝子の同時誘導に関連する。腫瘍細胞はまた、腫瘍サプレッサーの異所的発現（Ｓｕｇｒｕｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４：９６４８－９６５３（１９９７）；Ｕｈｒｂｏｍら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１５：５０５－５１４（１９９７）；Ｘｕら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１

５：２５８９－２５９６（１９９７））または腫瘍遺伝子抑制により老化するように誘導することもできる。例えば、子宮頸癌細胞系におけるパピローマウイルス腫瘍性タンパク質Ｅ６およびＥ７の抑制により、ほとんど１００％の細胞で老化様の増殖停止が誘導されることが見出された（Ｇｏｏｄｗｉｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９７：１０９７８－１０９８３（２０００））。従って、腫瘍細胞における老化プログラムの活性化は、癌治療に対する実現可能な生物学的アプローチになると思われる。

【０００５】

細胞、とりわけ腫瘍細胞が、老化表現型のマーカーとしておよび前記細胞において老化を誘導するための標的としての双方として老化する場合に、誘導される遺伝子を同定する必要性が当該技術分野において依然存在している。処置、とりわけ抗癌処置に応答して老化する細胞、とりわけ腫瘍細胞を、このような処置の有効性を評価するために同定する必要性もまた当該技術分野に存在する。さらに、癌のような増殖性疾患の処置を改善する方法として、哺乳動物細胞、とりわけ腫瘍細胞において老化を誘導する化合物を同定する必要性も当該技術分野に存在する。

【０００６】

発明の概要

本発明は、老化細胞において誘導または抑制され、そして細胞毒性物質で処置したときに生じる遺伝子、並びにこのような遺伝子を誘導または抑制する化合物を同定するための試薬および方法を提供する。都合がよいことには、本発明はまた、これらの作用物質に関連する毒性を生じることなく、腫瘍細胞の増殖の抑制において細胞毒性物質の作用を模倣する化合物を提供する。最も好ましくは、模倣された作用は哺乳動物腫瘍細胞における老化の誘導である。

【０００７】

第１の態様では、本発明は、哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法を提供する。１つの実施形態では、前記方法は、化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞を培養する工程；化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での表２Ａに示す少なくとも１つの前記細胞遺伝子の前記細胞における発現をアッセイする工程；並びに、表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも高い場合に、老化を誘導する化合物を同定する工程を含む。好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はｐ５３欠損細胞である。別の好ましい態様では、哺乳動物細胞は腫瘍細胞である。好ましくは、細胞遺伝子はヒト遺伝子、最も好ましくはＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリン（ａｍｐｈｉｒｅｇｕｌｉｎ）である。前記方法による細胞遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、または細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【０００８】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、表２Ａの細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞である。これらの実施形態では、組換え哺乳動物細胞、並びに化合物の存在下および不存在下で検出されるレポーター遺伝子の発現増加を用いて、表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の誘導をアッセイする。別の好ましい実施形態では、前記方法は、表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現に関して試験化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下よりも多くない化合物を同定する工程をさらに含む。前記方法によるレポーター遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、またはレポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【０００９】

本発明の第１の態様の別の実施形態では、哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定する方法は、化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞を培養する工程；化合

物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での表２Ａに示す少なくとも１つの前記細胞遺伝子の前記細胞における発現をアッセイする工程；細胞増殖および老化の形態学的特徴に関して組換え哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに、表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも高く、そして化合物の存在下で細胞が増殖抑制されて老化の形態学的特徴を発現する場合に、老化を誘導する化合物を同定する工程を含む。好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はｐ５３欠損細胞である。別の好ましい実施形態では、哺乳動物細胞は腫瘍細胞である。好ましくは、細胞遺伝子はヒト遺伝子、最も好ましくはＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである。前記方法による細胞遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、または細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１０】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、表２Ａの細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞である。これらの実施形態では、表２Ａの少なくとも１つの細胞遺伝子の誘導は、組換え哺乳動物細胞、並びに化合物の存在下および不存在下において検出されるレポーター遺伝子の発現増加を用いてアッセイする。別の好ましい実施形態では、前記方法は、表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現に関して試験化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定する工程をさらに含む。前記方法によるレポーター遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、またはレポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１１】

第２の態様では、本発明は、哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法を提供する。１つの実施形態では、前記方法は、化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞を培養する工程；化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での表１に示す少なくとも１つの前記細胞遺伝子の前記細胞における発現をアッセイする工程；並びに、表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも低い場合に、老化を誘導する化合物を同定する工程を含む。好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はｐ５３欠損細胞である。別の好ましい実施形態では、哺乳動物細胞は腫瘍細胞である。好ましくは、細胞遺伝子はヒト遺伝子、最も好ましくはＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１である。前記方法による細胞遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、または細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１２】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、表１の細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞である。これらの実施形態では、表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の誘導は、組換え哺乳動物細胞、並びに化合物の存在下および不存在下で検出されるレポーター遺伝子の発現低下を用いてアッセイする。別の好ましい実施形態では、前記方法は、表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現に関して試験化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに、表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定する工程をさらに含む。前記方法によるレポーター遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、またはレポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１３】

本発明の第２の態様の別の実施形態では、哺乳動物細胞において老化を誘導する化合物

を同定する方法は、化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞を培養する工程；化合物の不存在下の細胞における細胞遺伝子の発現と、化合物の存在下での表１に示す少なくとも１つの前記細胞遺伝子の前記細胞における発現をアッセイする工程；細胞増殖および老化の形態学的特徴に関して組換え哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに、表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下よりも低く、そして化合物の存在下で細胞が増殖抑制されて老化の形態学的特徴を発現する場合に、老化を誘導する化合物を同定する工程を含む。好ましい実施形態では、哺乳動物細胞はｐ５３欠損細胞である。別の好ましい実施形態では、哺乳動物細胞は腫瘍細胞である。好ましくは、細胞遺伝子はヒト遺伝子、最も好ましくはＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１である。前記方法による細胞遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、または細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１４】

また別の実施形態では、哺乳動物細胞は、表１の細胞遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む組換え哺乳動物細胞である。これらの実施形態では、表１の少なくとも１つの細胞遺伝子の抑制は、組換え哺乳動物細胞、並びに化合物の存在下および不存在下で検出されるレポーター遺伝子の発現低下を用いてアッセイする。別の好ましい実施形態では、前記方法は、表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現に関して試験化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定する工程をさらに含む。前記方法によるレポーター遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、またはレポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１５】

第３の態様では、本発明は、本発明の方法、最も好ましくは、試験化合物の存在下および不存在下で、表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現に関して哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに、表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定する工程をさらに含む本発明の方法の実施形態により生成される化合物を提供する。

【００１６】

第４の態様では、本発明は、異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状の処置の有効性を評価する方法を提供する。前記方法は：処置前および処置後に異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を有する動物に由来する細胞を含む生物学的サンプルを入手する工程；処置後の表１、２Ａまたは２Ｂの少なくとも１つの遺伝子の発現を処置前の前記遺伝子の発現と比較する工程；並びに、表２Ａおよび２Ｂの少なくとも１つの遺伝子の発現が処置前よりも処置後において高いか、あるいは表１の少なくとも１つの遺伝子の発現が処置前よりも処置後において低い場合に、前記処置が異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状の処置に関して有効性を有していると決定する工程を含む。好ましい実施形態では、生物学的サンプルは腫瘍細胞を含む。好ましくは、遺伝子は表２Ａの細胞遺伝子であり、最も好ましくは、少なくとも１つの細胞遺伝子がＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンであるヒト遺伝子である。別の好ましい実施形態では、遺伝子は表１の細胞遺伝子であり、最も好ましくは、ＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、およびＬＲＰＲ１であるヒト遺伝子である。前記方法による細胞遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、またはレポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００１７】

第５の態様では、本発明は、異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状、最も好ましくは癌を処置するための方法を提供する。本発明の方法は、本発明の方法

、最も好ましくは、試験化合物の存在下および不存在下で、表２Ｂの１つまたはそれ以上の遺伝子の発現に関して哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに、表２Ｂの遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定する工程をさらに含む本発明の方法の実施形態に従って生成された、治療有効量の化合物を前記疾患または症状を有する動物に投与する工程を含む。

【００１８】

さらなる態様では、本発明は、老化細胞において生成された分泌性タンパク質を検出するための方法を提供する。特に本発明は、この態様において、細胞、好ましくは腫瘍細胞において老化を誘導する処置が有効であるかどうかを特に決定するための診断方法を提供する。好ましい実施形態では、本発明により提供される検出アッセイを、体液、例えば血液、尿、滲出液、腹水、唾液、脳脊髄液、頸管分泌物、膣分泌物、子宮内膜分泌物、消化管分泌物、気管支分泌物、痰、または乳房からの分泌物もしくは洗浄液について実施する。本発明のこの態様でアッセイされる好ましい分泌性タンパク質には、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６およびアンフィレギュリンが含まれる。

【００１９】

第６の態様では、本発明は、細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導を抑制する化合物を同定するための方法を提供する。この態様の好ましい実施形態では、前記方法は、細胞を、細胞増殖を抑制する濃度の細胞毒性物質と接触させる工程；細胞が老化するときに誘導される細胞遺伝子の発現における変化に関して、化合物の存在下および不存在下で細胞をアッセイする工程；並びに、前記細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下で誘導されるが、化合物の存在下では誘導されない場合に、細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導の抑制因子として化合物を同定する工程を含む。好ましい態様では、細胞遺伝子は、サイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパイン－Ｌ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ、ウロキナーゼ、アミロイドベータ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、または膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）である、ヒト遺伝子である。好ましい態様では、哺乳動物細胞はｐ５３欠損細胞である。別の好ましい実施形態では、哺乳動物細胞は腫瘍細胞である。前記方法による細胞遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、または細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００２０】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、サイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパイン－Ｌ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ、ウロキナーゼ、アミロイドベータ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、または膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）であるヒト遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含む、組換え哺乳動物細胞である。これらの実施形態では、前記方法は、哺乳動物細胞を、細胞増殖を抑制する濃度の細胞毒性物質と接触させる工程；レポーター遺伝子の発現に関して試験化合物の存在下および不存在下で哺乳動物細胞をアッセイする工程；並びに、レポーター遺伝子の発現が化合物の存在下では化合物の不存在下においてよりも多くない化合物を同定する工程を含む。前記方法によるレポーター遺伝子の発現は、相補的な核酸に対するハイブリダイゼーションにより、免疫学的試薬を用いることにより、またはレポーター遺伝子産物の活性をアッセイすることにより、好ましくは検出される。

【００２１】

本発明はまた、処置の有効性をモニタリングする方法を提供する。これらの実施形態では、老化し、もはや増殖することができない腫瘍細胞を同定し、そして、処置後に回復および増殖する腫瘍細胞から区別する。患者の処置後に得られた腫瘍からの生検サンプルにおける老化マーカー検出を処置応答の指標として用いる。

【００２２】

本発明の特定の好ましい実施形態は、以下のさらに詳細な、特定の好ましい実施形態お

よび特許請求の範囲の記載から明らかになろう。

【００２３】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、細胞毒性物質で処置したときに老化する細胞においてその発現が調節される遺伝子を提供する。本発明はまた、細胞毒性物質の遺伝子発現調節特性を模倣するが、化学療法剤の処置に特徴的である毒性がない化合物を同定する方法、並びに方法により同定される化合物を提供する。さらにとりわけ本明細書に示すような診断および治療的処置方法が提供される。

【００２４】

本発明の目的のために、用語「老化」は、増殖因子により可逆でないＤＮＡ複製および細胞増殖の永続的な停止を含むと理解され、例えば、正常細胞の増殖性の寿命の終わりに、または細胞毒性物質、ＤＮＡ損傷もしくはその他の細胞障害に応答した正常もしくは腫瘍細胞に生じる。老化はまた、サイズの増加、扁平な形態、細胞内顆粒密度の増大、および老化に関連するβ－ガラクトシダーゼ活性（ＳＡ－β－ｇａｌ）などの特定の形態学的特徴により特徴付けられる。

【００２５】

本明細書で用いる用語「老化関連遺伝子」は、細胞が老化表現型、とりわけ細胞を細胞毒性物質と接触させることにより生じる老化表現型を発現する場合に、その発現が調節される（誘導されるかまたは抑制されるかのいずれか）遺伝子を包含することを意図する。最も好ましくは、その用語は本明細書、とりわけ表１および２で開示される遺伝子を意味すると理解される。

【００２６】

老化は、哺乳動物細胞において、細胞増殖を抑制する細胞毒性物質の用量で細胞に接触させることにより、都合よく誘導することができる（Ｃｈａｎｇら（１９９９ａ）前出に開示されている）。作用物質の存在下および不存在下で培養された細胞の数を比較し、そして等しい培養時間の後に作用物質の存在下では作用物質の不存在下よりも細胞が少ない場合に増殖抑制を検出することにより、細胞の増殖を測定する。このような細胞毒性物質の実例には、ドキソルビシン、アフィジコリン、シスプラチン、シタラビン、エトポシド、タキソールおよび電離放射線などがあるが、これらに限定されない。適当な用量は種々の細胞型で変動する；老化を誘導する用量の決定は当該技術分野の技術の範囲内であり、Ｃｈａｎｇら（１９９９ａ）前出に開示されている。

【００２７】

本発明の目的のために、「（１つの）細胞」または「（複数の）細胞」は等価であると意図され、そしてとりわけ当該技術分野で知られているように増殖および維持された哺乳動物細胞のインビトロ培養物、並びに、とりわけインビボ腫瘍標本から得られた、生物学的サンプルを包含する。

【００２８】

本発明の目的のために、複数の「細胞遺伝子」への言及は、単一の遺伝子および２またはそれ以上の遺伝子を包含すると意図される。細胞遺伝子発現、または細胞遺伝子から誘導されるプロモーターの転写制御下のレポーター構築物の調節の効果を第１の遺伝子において検出することができ、そして次に第２のまたはいくつかのさらなる遺伝子もしくはレポーター遺伝子構築物を試験することにより効果を反復することができる。あるいは、２またはそれ以上の遺伝子もしくはレポーター遺伝子構築物の発現を本発明の範囲内で同時にアッセイすることができる。

【００２９】

本発明の方法は、細胞毒性物質に応答して老化表現型を進行させうるいずれかの哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、最も好ましくはヒト細胞を用いて実施することができる。好ましい細胞には、哺乳動物細胞、好ましくは齧歯類または霊長類細胞、最も好ましくはヒト細胞などがある。特定の実施形態では、最も好ましい細胞は、変異、欠失、組換え、染色体消失または遺伝子操作の結果として、正常量よりも少ない、または

正常の機能活性よりも少ない腫瘍サプレッサーｐ５３を発現する細胞である、ｐ５３欠損細胞である。

【００３０】

特定の実施形態では、本発明の方法は、老化細胞で誘導される遺伝子に由来するプロモーターに作動可能に連結された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組換え哺乳動物細胞を用いて、都合よく実施される。前記構築物を含む好ましいレポーター遺伝子には、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、β－ガラクトシダーゼ、グリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、アルカリホスファターゼ、そして最も詳細には、市販により入手可能なＧＦＰ－ルシフェラーゼ融合遺伝子が含まれる。本発明の組換え発現構築物を含む最も好ましいプロモーターは、老化細胞において誘導されることが知られている細胞遺伝子に由来するプロモーターである。細胞遺伝子プロモーターは、本明細書の表２Ａで同定された遺伝子に由来するのが都合がよい。最も好ましい実施形態では、細胞プロモーターは、ＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンに由来する。別の実施形態では、細胞遺伝子プロモーターは老化細胞において抑制される遺伝子に由来する。この型の好ましいプロモーターには、本明細書の表１で同定された遺伝子に由来するプロモーターが含まれる。さらに好ましい実施形態では、細胞プロモーターは、ＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１に由来する。

【００３１】

これらの遺伝子のいくつかに由来するプロモーター配列は当該技術分野で知られている。これには：サイクリンＤ１（Ｍｏｔｏｋｕｒａ ＆ Ａｒｎｏｌｄ、Ｇｅｎｅｓ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ Ｃａｎｃｅｒ ７：８９－９５（１９９３））；、ＣＹＲ６１（Ｌａｔｉｎｋｉｃら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：３２６１－３２６７（１９９１））；プロサポシン（Ｓｕｎら、Ｇｅｎｅ ２１８：２３－３４（１９９８））；形質転換増殖因子α（ＴＧＦα；Ｒａｊａら、Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．５：５１４－５２０（１９９１））；カリクレイン７（Ｙｏｕｓｅｆら、Ｇｅｎｅ ２５４：１１９－１２８（２０００））；カルパイン－Ｌ２（Ｓｕｚｕｋｉら、Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｈｏｐｐｅ Ｓｅｙｌｅｒ．３７６：５２３－５２９（１９９５））；プラスミノーゲンアクチベータ ウロキナーゼ（Ｒｉｃｃｉｏら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：２７５９－２７７１（１９８５））；およびアミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ；Ｌａｈｉｒｉ ＆ Ｒｏｂａｋｉｓ、Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．９：２５３－２５７（１９９１））が含まれる。

【００３２】

その他の遺伝子については、遺伝子をコードするｃＤＮＡの上流の約５ｋｂ以内（およびさらに典型的には１ｋｂ以内）のゲノムＤＮＡの領域から、プロモーター配列を容易に単離することができる。ヒトゲノムの完全配列を利用することにより、いずれかの遺伝子に対して５’のゲノム領域をコンセンサスプロモーター配列、例えば「ＴＡＴＡ」ボックスと称されるＡＴに富む配列、およびプロモーターの核酸とＲＮＡポリメラーゼのようなタンパク質因子との相互作用を媒介するとして知られている「ＣＡＡＴ」配列を含む別の配列を調べることが可能になる。レポーター遺伝子から上流に推定プロモーター配列を挿入し、そしてこのような構築物のレポーター遺伝子活性を、推定プロモーターインサートを含まない構築物の活性と比較することにより、推定プロモーターを容易に試験することができる。

【００３３】

組換え発現構築物は、当業者に理解されるように、最も好ましくはトランスフェクションおよびエレクトロポレーションにより、適当な哺乳動物細胞に導入することができる。前記構築物の好ましい実施形態は、ベクターの有用量を容易に生成させるために用いることができるプラスミドベクターまたはその他のベクターにおいて生成する。別の実施形態には、当該技術分野で知られているように、伝達ベクター、より好ましくはウイルスベクター、および最も好ましくはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ

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が含まれる。一般的には、ＭＡＭＭＡＬＩＡＮ　ＣＥＬＬ　ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：Ａ　ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ　ＡＰＰＲＯＡＣＨ（Ｂｕｔｌｅｒ編）、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ：Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、ｐ．５７－８４（１９９１）を参照のこと。組換え発現構築物で一過性にトランスフェクションした細胞、およびさらに好ましくは構築物で安定的にトランスフェクションし、そして選択物質を用いて選択した細胞を、本発明の方法の特定の実施形態において使用するのが有利である。

【００３４】

臨床の癌における老化応答の検出には、老化細胞の診断マーカーが必要である。最も一般的な老化マーカーであるＳＡ－β－ｇａｌ（Ｄｉｍｒｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２：９３６３－９３６７（１９９５））には２つの主要な欠点がある：これは、凍結組織サンプルにおいて、そして限られた時間の間のみ保存される酵素活性を示し、そして、これは老化細胞の増殖停止に機構的に関連しない。本発明は、老化細胞において上方制御される多くの遺伝子を提供する。これらのタンパク質は、細胞毒性物質に誘導される老化に対して感受性のある診断マーカーを提供する。診断マーカーとしてとりわけ興味深いのは、老化細胞において上方制御され、そして増殖停止に機能的に関連するいくつかの遺伝子、例えばＥＰＬＩＮ、ＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６およびアンフィレギュリンである。これらの老化関連増殖抑制因子の誘導は、ドキソルビシン処理されたＨＣＴ１１６細胞に限定されない；例えば、正常な上皮組織に比べて２１の癌腫細胞系のうちの２０において下方制御される増殖抑制タンパク質、ＥＰＬＩＮ（Ｍａｕｌら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１８：７８３８－７８４１（１９９９））は、老化様増殖停止を生じる条件下で、レチノイド処理によりＭＣＦ－７乳癌細胞において強く誘導される（Ｄｏｋｍａｎｏｖｉｃら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．１：１６－１９（２００２）、および共有で同時係属中の２００１年５月２５日出願の米国特許出願第０９／８６５，８７９号（参照して本明細書に組み込まれる））。レチノイド処理はまた、分泌増殖抑制因子ＩＧＦＢＰ－６を誘導することも示された（Ｄａｉｌｌｙら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１５１８：１４５－１５１（２００１））。その他の多くの老化関連増殖抑制因子は、種々のその他の腫瘍由来の細胞系、ＢＴＧ１（Ｃｏｒｔｅｓら、Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎ．２７：５７－６４（２０００））、ＢＴＧ２（Ｆｌｅｔｃｈｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６：１４５１１－１４５１８（１９９１））、ＷＩＰ１（Ｆｉｓｃｅｌｌａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４：６０４８－６０５３（１９９７））、マスピン（Ｚｏｕら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：６０５１－６０５４（２０００））およびＭＩＣ－１（Ｋｏｍａｒｏｖａら、前出）などにおけるＤＮＡ損傷により誘導されることが示されている。しかしながら、これらの研究はいずれも、これらの遺伝子と老化との関連性、および本明細書にて開示されるＤＮＡ損傷によるこのような遺伝子の一般的な誘導能力が、このような遺伝子が損傷誘導性の老化の広く適用可能なマーカーであることを強く示しているとは認識していない。

【００３５】

本発明はまた、細胞毒性物質誘導性の老化においてその発現が下方制御される遺伝子を提供する。これらの遺伝子は、老化がこのような遺伝子の下方制御を特徴とすること以外は、老化の間に誘導される遺伝子と同様の様式で、腫瘍細胞における老化を検出するのに有用である。これらの遺伝子のいくつかは、細胞サイクルの進行に関与する転写因子であるＨＦＨ－１１（Ｔｒｉｄｅｎｔ）（Ｙｅら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９：８５７０－８５８０（１９９９））、種々の癌で過剰発現される遺伝子であるＳＴＥＡＰ（Ｈｕｂｅｒｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：１４５２３－１４５２８（１９９９））、発癌活性を有していることが示されているＲＨＡＭＭ（Ｈａｌｌら、Ｃｅｌｌ　８２：１９－２６（１９９５））、肝臓再生に関わっているＩＮＳＩＧ１（Ｐｅｎｇら、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　４３：２７８－２８４（１９９７））、およびＦＳＨに対する増殖性応答を媒介するＬＲＰＲ１（Ｓｌｅｇｔｅｎｈｏｒｓｔ－Ｅｅｇｄｅｍ

ａｎら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１０８：１１５－１２４（１９９５））などの老化細胞において下方制御されるマーカーとしてとりわけ興味深い。

【００３６】

当該技術分野で十分に確立された方法を用いて、遺伝子発現における変化、誘導または抑制のいずれか、および本明細書に開示するレポーター遺伝子構築物のいずれかの元来の遺伝子を検出する。これには、細胞核酸、最も好ましくはｍＲＮＡを検出するためのハイブリダイゼーションアッセイが含まれ、前記アッセイには、ノーザン・ハイブリダイゼーション、サザン・ハイブリダイゼーション、および当該技術分野で知られている種々のインビトロ増幅方法のいずれもが含まれる。免疫学的試薬、並びに酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、およびポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、抗体フラグメントまたは組換えもしくはキメラ抗体およびこのような免疫学的試薬を用いるその他のアッセイを含む方法を用いて、遺伝子発現の変化を検出することもできる。特定の遺伝子産物の活性はまた、最も好ましくは、既知であり定量可能な活性を有するレポーター遺伝子構築物と共に用いて、そして最も好ましくは、容易に検出される産物を生成するレポーター遺伝子構築物と共に用いて、遺伝子発現において老化に関連する変化を検出するのに有利である。

【００３７】

処理に誘導される老化に関連する分子変化の解明もまた、治療に好都合である。加速された老化の誘導により永久的に停止している腫瘍細胞増殖は、細胞毒性が最小限である条件下においてさえ薬物処置に対してこの応答を誘導することができるので、魅力的な処置アプローチである。薬物に誘導される老化が複数の抗増殖性遺伝子（そのいくつかはまた、近隣細胞の増殖をも抑制する）の協調誘導に関連するという本開示は、このような遺伝子を活性化する共通の制御経路の存在を示唆している。重要なことには、たいていの増殖抑制遺伝子はまた、ｐ５３欠損細胞におけるドキソルビシン処理によっても誘導される。従って、老化関連増殖抑制遺伝子の誘導を刺激するために開発することができる作用物質は、機能的なｐ５３を伴ってまたは伴わずに、腫瘍に対して有効である可能性がある。

【００３８】

しかしながら、薬物誘導性の老化について観察できるのは、病理学的状態（例えばアルツハイマー病）に関連する遺伝子、並びにプロテアーゼおよび有糸分裂促進性、抗アポトーシス性および血管形成性の分泌性因子の誘導である。老化細胞によるこのような遺伝子の発現は、短期間（非老化腫瘍細胞の増殖刺激）および長期間（新規の発癌性および年齢関連疾患の可能性の増大）において、有害な作用の可能性を有し得る。正常ヒト肝臓におけるＳＡ－β－ｇａｌ発現が肝細胞癌腫の進行と強く相関することを見出したＰａｒａｄｉｓら（Ｈｕｍａｎ　Ｐａｔｈｏｌ．３２：３２７－３３２（２００１））の最近の研究により、細胞老化とインビボ発癌性との間の関連性が示唆されている。また、形質転換された上皮細胞を老化線維芽細胞と混合することにより（前老化線維芽細胞とは混合しない）、形質転換された細胞の増殖および腫瘍形成性が増強されることを見出したＫｒｔｏｌｉｃａら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９８：１２０７２－１２０７７（２００１））により、このような関連性が直接実証された。ｐ２１誘導は多くの疾患関連遺伝子を上方制御し、そしてパラクリン抗アポトーシスおよび有糸分裂促進活性を誘導し（Ｃｈａｎｇら（２０００）前出）、そしてｐ２１ノックアウトがプロサポニン、ＴＧＦαおよびアルツハイマー病のβＡＰＰのような遺伝子の誘導を低下または遅延させることが本明細書で示された。これらの所見は、ｐ２１刺激された制御経路が老化細胞における疾患関連遺伝子の発現に大いに関与することを示唆している。

【００３９】

本発明は、前記有糸分裂促進性、抗アポトーシス性および血管形成性の分泌性因子または病理学的状態に関連する遺伝子の発現を同時に誘導することなく、腫瘍細胞において老化を誘導する化合物を同定するための方法を提供する。このような化合物の存在は、ｐ２１または病理学的状態に関連するその他の遺伝子ではなく、いくつかの増殖抑制遺伝子の同時活性化により腫瘍細胞老化を誘導するレチノイドの挙動により示唆され（共有で同時係属中の２００１年５月２５日出願の米国特許出願第０９／８６５，８７９号（参照して

本明細書に組み込まれる）およびＤｏｋｍａｎｏｖｉｃら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．１：１６－１９（２００２）に開示されるように）、そして本発明は、腫瘍細胞において老化を生じる当該技術分野で既知の化合物の細胞毒性およびその他の望ましくない特徴から切り離された、その他の化合物を同定するための方法を提供する。

【００４０】

本発明はまた、老化し、そしてもはや増殖できない腫瘍細胞を同定すること、並びに処置後に回復および増殖する腫瘍細胞から前記細胞を区別することにより、処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する。処置された腫瘍の生検における老化のマーカーの検出を、処置応答の指標として用いることができる。このタイプの診断は、多くの臨床状況において、例えば完全な応答に数ヶ月または数年さえも必要とされる可能性がある放射線治療の成功を評価するための生検試験として、有用であるはずである（Ｃｏｓら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｒａｄｉａｔ．Ｏｎｃｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｐｈｙｓ．９：２９９－３０３（１９８３）；Ｂａｔａｉｎｉら、Ａｍ．Ｊ．Ｓｕｒｇ．１５５：７５４－７６０（１９８８））。老化のマーカーを発現する腫瘍細胞の優位性が、処置の成功に積極的に相関すると予測される。対応する遺伝子産物に対する抗体をイン・サイチュー（ｉｎ　ｓｉｔｕ）免疫染色、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、またはウェスタンブロッティングに用い、対応する遺伝子の発現をタンパク質レベルで測定することができる。最も好ましくは、イン・サイチュー・ハイブリダイゼーション、イン・サイチュー・ＲＴ－ＰＣＲ、またはバルクＲＮＡ分析技術、例えばＲＴ－ＰＣＲまたは異なる形態のフィルター・ハイブリダイゼーション（ノーザンブロッティングを含む）を用いて、少なくとも１つの前記遺伝子をコードするＲＮＡの発現を検出することにより、遺伝子発現を核酸レベルで測定することもできる。老化細胞において抑制されるマーカーの選択は、表１に列挙する遺伝子により提供される。老化細胞において誘導される老化マーカーの選択は、表２に列挙する遺伝子により提供される。老化細胞において抑制されるマーカーには、原因として細胞増殖に関係し、そして細胞老化のその他の系において抑制されることが知られている遺伝子、例えばＫｉ－６７（これは既に増殖マーカーとして広く用いられている）、ＣＥＮＰ－Ｆ、ＡＩＭ－１、ＭＡＤ－２、リボヌクレオチド　リダクターゼＭ１、およびチミジンキナーゼなどが含まれる。このようなマーカーはまた、腫瘍特異的発現を示し、そして老化において抑制されることが以前に示されていない遺伝子、例えばＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭまたはＴＬＳ／ＦＵＳが含まれる。老化マーカーとしてとりわけ興味深いものは、老化細胞において誘導され、そして原因として細胞増殖抑制に関係する遺伝子、例えばＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリン、および、正常組織に比べて腫瘍においてその発現が下方制御されるその他の遺伝子、例えばＰ－カドヘリン、デスモプラキン、デスモヨーキン、およびニューロシンである。

【００４１】

老化細胞において誘導される遺伝子のいくつかは、影響を受ける組織内のみならず、体液、例えば血液、尿、滲出液、腹水、唾液、脳脊髄液、頸管分泌物、膣分泌物、子宮内膜分泌物、消化管分泌物、気管支分泌物、痰、または乳房からの分泌物もしくは洗浄液においても検出できる、分泌性タンパク質をコードする。これらの分泌性タンパク質のうちの４つ（マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６、アンフィレギュリン）は腫瘍増殖抑制因子として作用し、そして癌治療薬によるその誘導は治療の成功に寄与するはずである。従って、化学療法の適用または一連の放射線治療の後に測定される、患者の血液または尿中のこのようなタンパク質のレベルは、処置の成功の可能性に相関する診断パラメーターを提供すると予測される。マスピン（Ｚｏｕら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：６０５１－６０５４（２０００））およびＭＩＣ－１（Ｋｏｍａｒｏｖａら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１７：１０８９－１０９６（１９９８））は、以前に、化学療法剤または放射線治療により誘導されると報告されているが、ＩＧＦＢＰ－６はレチノイドにより誘導できることが知られており（Ｄａｉｌｌｙら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１５１８：１４５－１５１（２００１））、そして、アンフィレギュリンはビタミンＤにより誘導される（Ａｋｕｔｓｕら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．

２８１：１０５１－１０５６（２００１））が、処置により誘導される老化を被っている細胞におけるこれらのタンパク質の安定した誘導は、先行技術においては知られていなかった。

【００４２】

前記のタンパク質に対する抗体は開発されており、それらの多くが市販により入手可能である。例えば、抗マスピン抗体はＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、カリフォルニア州（カタログ番号５５４２９２）、抗アンフィレギュリン抗体はＬａｂ Ｖｉｓｉｏｎ Ｃｏｒｐ．、Ｆｒｅｍｏｎｔ、カリフォルニア州（カタログ番号ＲＢ－２５７－Ｐ）より入手可能であり、そして抗ＩＧＦＢＰ－６抗体はＣｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．、Ｎｏｒｗｏｏｄ、マサチューセッツ州（カタログ番号ＰＡＵ１）より入手可能である。ＭＩＣ－１に対するモノクローナル抗体は、当該技術分野で説明されている（Ｆａｉｒｌｉｅら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４０：６５－７３（２００１））。これらの抗体または類似の抗体は、対応するタンパク質の量を検出および測定するために、ＥＬＩＳＡアッセイ、またはその他の従来の免疫化学アッセイにおいて、最も都合よく用いることができる。処置の成功に相関する血液または尿中のタンパク質レベルは現在知られていないが、これらを簡単な臨床試験により決定することができる。このような試験において、対応するタンパク質レベルは、患者において処置の前および処置の適用後いろいろな時点で測定する。次いで、これらの測定の結果を処置の成功（部分的寛解およびこれに続く完全な寛解）のための標準的な臨床基準と相関させる。

【００４３】

本明細書で開示するように、細胞毒性物質誘導および抑制遺伝子は、生理学に基づく細胞増殖に及ぼす増殖抑制作用を模倣する細胞毒性物質以外の化合物を同定するための有用な標的である。このような化合物を同定することにより、哺乳動物細胞、とりわけ腫瘍細胞および不適切にまたは病原的に増殖するその他の細胞において増殖停止を生じる代替の作用物質が好都合に提供される。このような化合物は、細胞毒性物質の増殖抑制作用を模倣することができるので有益である。

【００４４】

このような化合物の別の利点は、これらが先行技術において知られているその他の増殖抑制化合物で見出される全身性の副作用を生じることなく増殖抑制作用を有すると予測することができるという点である。例えば、先行技術において知られている多くの増殖抑制薬および化合物は、その発現が疾患、とりわけ年齢関連疾患、例えばアルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、腎臓疾患、および関節炎の進行に関連する複数の遺伝子を活性化することにより老化、増殖停止およびアポトーシスを誘導するｐ２１遺伝子発現を誘導する点で不利である（共有で同時係属中の２００１年２月１日出願の米国特許出願第６０／２６５，８４０号（代理人整理番号第９９，２１６－Ｅ）および２００１年５月２１日出願の米国特許出願第０９／８６１，９２５号（代理人整理番号第９９，２１６－Ｆ）（参照して本明細書に組み込まれる）に開示されている）。当該技術分野で知られている増殖抑制化合物の毒性の副作用を生じることなく細胞毒性物質、化学療法剤の増殖抑制作用を模倣する化合物の発見が、本発明により有利に提供される。

【００４５】

病原性活性を有する、細胞毒性物質誘導性の老化関連遺伝子の本明細書における同定により、このような遺伝子の誘導を抑制する薬物を開発するための標的が提供される。本発明は、細胞を試験化合物と接触させることにより、細胞毒性物質誘導性の老化の結果として起こる老化関連遺伝子の誘導を抑制する試験化合物をアッセイするための方法を提供する。これらの遺伝子の誘導を抑制する化合物は、未処置細胞と比較して、作用物質処理した細胞においてこれらの遺伝子の発現を増加させないことを示す。また、レポーター遺伝子構築物は、これらの疾患関連遺伝子を指向する本発明の方法において、遺伝子誘導およびその欠如をアッセイするために好都合に使用される。

【００４６】

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説明することを意図し、そし

て決して限定を意図するものではない。

【実施例１】

【００４７】

細胞毒性物質で処理した腫瘍細胞における永続的な増殖停止は老化表現型の進行に関連する

培養物中のヒト大腸癌細胞（ＨＣＴ１１６）において、ＤＮＡ分離の過程でトポイソメラーゼＩＩにより形成された切断可能な中間複合体を安定化することによりＤＮＡ損傷を生じる広く用いられている抗癌剤、ドキソルビシンの効果を測定するために、細胞学的および遺伝子発現分析を実施した。

【００４８】

野生型、ｐ２１－／－（クローン　８０Ｓ４）およびｐ５３－／－（クローン　３７９．２）細胞系（Ｄｒ．Ｂ．Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎ（Ｊｏｈｎｓ　Ｈｏｐｋｉｎｓ大学）からの寄贈）を含むＨＣＴ１１６大腸癌細胞（Ｍｙｏｈａｎｅｎら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８：５９１－５９３（１９９８）；アクセッション番号ＣＣＬ－２４７、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ、バージニア州）を、１０％　ＦＣ２血清含有ダルベッコ変法イーグル培地中で増殖させた。細胞を１５ｃｍプレートあたり細胞５×１０^{6}個で播種し、そして２００ｎＭドキソルビシンで２４時間処理した。その後、細胞を薬物不含培地で１０日間まで回復させた。細胞分割の蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）分析のために、細胞をＰＫＨ２（脂溶性フルオロフォア；Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ミズーリ州）で標識したが、これは安定的に形質膜内に取り込まれ、そして娘細胞間で均等に分布し、結果として生じる細胞分割の間にＰＫＨ２蛍光が徐々に低下する（Ｈｏｒａｎら、Ｎａｔｕｒｅ　３４０：１６７－１６８（１９８９））。ＦＡＣＳ分析および細胞分類をＣｈａｎｇら（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５９：３７６１－３７６７（１９９９）およびＯｎｃｏｇｅｎｅ　１８：４８０８－４８１８（１９９９））に記載されているようにして実施した。老化（ＰＫＨ２^{ｈｉ}）および増殖（ＰＫＨ２^{ｌｏ}）細胞の分類した分画（純度９０－９５％）を、Ｊｏｒｄａｎら（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：８１６－８２５（１９９６））により記載されているように、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）染色およびＦＡＣＳ分析を用いて、ＤＮＡ含量に関して分析した。また、Ｄｉｍｒｉら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２：９３６３－９３６７（１９９５））により記載されているように、老化関連β－ガラクトシダーゼ（ＳＡ－β－ｇａｌ）活性に関して細胞を染色した。最後に、１０ｃｍプレートあたり２，０００から１０，０００個の分類された細胞を播種することにより、分類した集団のクローン原性（ｃｌｏｎｏｇｅｎｉｃｉｔｙ）を試験した。

【００４９】

これらのアッセイの結果を図１Ａから１Ｄに示す。ＰＫＨ２蛍光を用いるＦＡＣＳにより検出される細胞増殖を図１Ａに示す。ＰＫＨ２蛍光における変化を、ドキソルビシン処理後種々の日数においてＦＡＣＳによりモニタリングした。膜非透過性色素ＰＩを用いるその染色に基づくこの分析から、薬物処理の後に死んだ細胞を排除した。ドキソルビシン処理後最初の２から３日間は、ほとんどすべてのＰＩ陰性細胞は増殖停止（ＰＫＨ２^{ｈｉ}）のままであったが、増殖細胞集団（ＰＫＨ２^{ｌｏ}）の出現は第４日に始まった。しかしながら、細胞の実質的な分画はＰＫＨ２^{ｈｉ}のままであり、そしてその蛍光が低下せず、これはこれらの細胞が薬物からの解放の後、一度も分割しなかったことを示している。ドキソルビシン処理後６から１０日目に、生存細胞をＦＡＣＳによりＰＫＨ２^{ｈｉ}およびＰＫＨ２^{ｌｏ}分画に分離した。

【００５０】

ＤＮＡ含量分析により、ほとんどのＰＫＨ２^{ｈｉ}細胞がＧ２のままであり、その相では、ほとんどの細胞がドキソルビシンにより、そのトポイソメラーゼＩＩに及ぼす効果を介してもともと停止している（図１Ｂ）。図１Ｃに示すように、ＰＫＨ２^{ｈｉ}細胞は大きく肥大し、そしてＳＡ－β－ｇａｌに関して陽性に染色され、これはその老化表現型を示し

ている。対照的に、ＰＫＨ２^{lo}細胞は正常なサイズのままであり、そしてＳＡ－β－ｇａｌに関して陰性のままであった。コロニーを形成する能力は本質的にＰＫＨ２^{lo}画分に限定され（図１Ｄ）、これは老化ＰＫＨ２^{hi}細胞がその増殖能力を喪失していることを示している。

【００５１】

これらの結果は、ＨＣＴ１１６細胞がドキソルビシン処理の後２つの異なる集団：老化細胞集団および増殖する能力を回復した集団に分離されたことを明確に示している。

【実施例２】

【００５２】

ドキソルビシン誘導性の老化において誘導および抑制された遺伝子の同定

実施例１に記載したようにして、ＨＣＴ１１６細胞のドキソルビシン処理により生じる老化および増殖細胞の集団を用いて、これらの細胞集団と未処置細胞との間の遺伝子発現における差異を同定した。

【００５３】

これらの実験では、ポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡおよびタンパク質抽出物をＰＫＨ２^{lo}およびＰＫＨ２^{hi}細胞集団から調製し、ドキソルビシンからの解放の後６、９または１０日目に種々の試験で分離した。蛍光ｃＤＮＡプローブを合成し、そしてヒトＵｎｉＧＥＭ Ｖ２．０ ｃＤＮＡマイクロアレイを用いるハイブリダイゼーションおよびシグナル分析に使用した（アッセイは、ＩｎｃｙｔｅＧｅｎｏｍｉｃｓ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ミズーリ州により、その会社のウェブサイト（ｗｗｗ．ｉｎｃｙｔｅ．ｃｏｍ）に記載されているようにして行った）。遺伝子発現における差異は、本質的には記載されているようにして（Ｎｏｏｎａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：７１６０－７１６４（１９９０））、正規化内部標準としてのβ－アクチンおよび表３に示すオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、半定量的逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）により確認した。独立した実験で単離した２対の増殖および老化細胞ＲＮＡ調製物を用いて、ＲＴ－ＰＣＲ分析を実施し、同様の結果を得た；遺伝子のサブセットに関して、同一のＲＮＡサンプルの対でアッセイを再現した。これらの結果は、以下の１次抗体：β－アクチンに対するマウスモノクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．）、ｐ５３およびｐ２１（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、マサチューセッツ州）、マスピン（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、カリフォルニア州）、ケラチン１８（Ｎｅｏｍａｒｋｅｒｓ、Ｕｎｉｏｎ Ｃｉｔｙ、カリフォルニア州）、サイクリンＤ１（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ、カリフォルニア州）、およびＡＴＦ－３に対するウサギポリクローナル抗体（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ）、Ｍａｄ－２（ＢａｂＣｏ、Ｒｉｃｈｍｏｎｄ、カリフォルニア州）およびＥＰＬＩＮ（Ｄｒ．Ｄ．Ｃｈａｎｇ、ＵＣＬＡからの寄贈）を用いて、（同じ結果について）少なくとも２回実施した免疫ブロッティングアッセイにより確認した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ標識した２次抗体およびＥＣＬ化学発光検出キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ニュージャージー州）を用いて、バンドを検出した。

【００５４】

蛍光ｃＤＮＡプローブを老化（ＰＫＨ２^{hi}）および増殖（ＰＫＨ２^{lo}）細胞集団のＲＮＡから調製し、そして＞９，０００の遺伝子を含有するヒトＵｎｉＧＥＭ Ｖ２．０ ｃＤＮＡマイクロアレイ（ＩｎｃｙｔｅＧｅｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．）を用いて、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションに使用した。９，０００以上の配列確認された遺伝子のうちの８２％およびＵｎｉＧＥＭ Ｖ２．０ マイクロアレイに存在する発現された配列タグ（ＥＳＴ）により、双方のプローブで測定可能なハイブリダイゼーションシグナルが得られた。このハイブリダイゼーションにより増殖細胞に対して老化細胞において（比較した（ｂａｌａｎｃｅｄ）差次的発現が２．０またはそれ以上）下方制御または上方制御されたものとして同定された遺伝子のリストを、表１および２にて提供する。

【００５５】

ハイブリダイゼーションアッセイを用いて検出された７４の個々の遺伝子についてＲＴ－ＰＣＲ分析（図２Ａ）を実施し、そして２６／２９の下方制御された、および３７／４５の上方制御された遺伝子に関する遺伝子発現における定量的変化を確認した。たいていの場合、ＲＴ－ＰＣＲにより示される遺伝子発現の差異は、ｃＤＮＡマイクロアレイ・ハイブリダイゼーションにより示された値よりも非常に高かった。また、７つの遺伝子における発現の変化を免疫ブロッティングによりタンパク質レベルでも確認した（図３Ａ）。

【００５６】

６８の遺伝子の半分以上および老化細胞において下方制御されたＥＳＴは、細胞サイクル進行において役割を果たすことが知られている：これらの遺伝子のうちの２５が種々の段階の有糸分裂またはＤＮＡ分離に関与し（例えばＣＤＣ２、Ｋｉ－６７、ＭＡＤ２、トポイソメラーゼＩＩα）；１１の遺伝子はＤＮＡ複製およびクロマチン集合において機能し（例えばリボヌクレオチド・リダクターゼＭ１、チミジレートキナーゼ、複製タンパク質Ａ３）；そして４つの遺伝子はＤＮＡ修復に関与する（例えばＨＥＸ１、ＦＥＮ１））。細胞増殖に関与する遺伝子の下方制御は老化細胞の増殖停止状態に相関し、そして本発明者らの系における遺伝子発現プロファイリングの生物学的関連性を実証する。

【００５７】

さらに、ドキソルビシン処理により複数の増殖抑制遺伝子を誘導した。老化ＨＣＴ１１６細胞が立証された増殖抑制活性を有する複数の遺伝子を上方制御することが見出され、これにより、ｐ１６（これはＨＣＴ１１６細胞では発現されない）の不存在下におけるドキソルビシン誘導性の細胞サイクル停止の維持に関する十分な説明が提供される。上方制御される遺伝子の１つはｐ２１である（図２Ａに示す）。野生型、ｐ５３－／－（１４）およびｐ２１－／－（１５）ＨＣＴ１１６細胞系におけるドキソルビシンによるｐ２１およびｐ５３タンパク質誘導の分析により、この系のｐ２１誘導がｐ５３に強く依存することが実証された（図３Ｂに示す）。ｐ５３およびｐ２１の双方のタンパク質は、薬物からの解放後９日目に単離された老化細胞において高いレベルを維持する（図３Ａ）。しかしながら、ｐ２１とは対照的に、ｐ５３はタンパク質レベルにおいてのみ上方制御される。

【００５８】

持続的なｐ２１の誘導に加えて、老化細胞は、いくつかの既知または推定の腫瘍サプレッサー遺伝子を含む多くのその他の増殖抑制因子を強く過剰発現する。これらの遺伝子のいくつかは、腫瘍サプレッサーＢＴＧ１およびそのホモログＢＴＧ２、推定腫瘍サプレッサーＥＰＬＩＮ（新生物における上皮タンパク質消失）およびＷＩＰ１ホスファターゼを含む、細胞内増殖抑制タンパク質をコードする。老化ＨＣＴ１１６細胞はまた、ＭＩＣ－１（ｐＴＧＦ－β）、タンパク質６に結合するインスリン様増殖因子（ＩＧＦＢＰ－６）、セリンプロテアーゼインヒビター　マスピン（進行した乳癌において下方制御される腫瘍サプレッサー）、およびアンフィレギュリン、正常な上皮細胞の増殖を促進するが、いくつかの癌腫細胞系の増殖を抑制するＥＧＦ関連因子を含む、いくつかの分泌性増殖抑制因子を過剰発現する。これらの知見により、薬物誘導性の腫瘍細胞の増殖停止は、一連の、見かけ上は余分な細胞内およびパラクリン因子により維持されることが示唆される。

【００５９】

薬物処理したＨＣＴ１１６細胞の老化および増殖集団の間の遺伝子発現における差異は、正常細胞と癌性上皮細胞と間の差異に匹敵する。前記で列挙した腫瘍サプレッサーに加えて、老化ＨＣＴ１１６細胞は、正常上皮細胞に対して癌において下方制御されるいくつかの他の遺伝子を誘導する（ＭＩＣ－１、Ｐ－カドヘリン、デスモプラキン、デスモヨーキン、ニューロシンを含む）。一方、老化細胞は、細胞増殖に関与する複数の遺伝子のみならず、発癌活性を有するいくつかの他の遺伝子（ＲＨＡＭＭおよびＴＬＳ／ＦＵＳ）をも下方制御するか、あるいは、腫瘍特異的発現を示す（ＳＴＥＡＰ）。老化細胞の推定される「正常化」の別の徴候は、ケラチン遺伝子ファミリーの６つのメンバーの上方制御である。この群の最強の誘導は、抗アポトーシス活性を有するケラチンの対であるケラチン８および１８について観察された（Ｃａｕｌｉｎら、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１４９：１７－２２（２０００））。しかしながら、老化ＨＣＴ１１６細胞は、それらが２つのプ

ロアポトーシス遺伝子、ＡＰＯ－１／ＦａｓおよびＮＯＸＡを上方制御するにもかかわらず、アポトーシスの証拠を示さない。

【００６０】

増殖抑制遺伝子に加え、老化ＨＣＴ１１６細胞は、分泌性有糸分裂促進性、抗アポトーシス性および血管形成性の因子、例えば細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質Ｃｙｒ６１およびプロサポシン、並びに形質転換増殖因子α（ＴＧＦ－α）の遺伝子の発現上昇を示す。このような遺伝子の誘導の結果、インビトロおよびインビボで腫瘍細胞増殖を促進するパラクリン活性に至る。このような活性は、以前は、正常細胞における複製老化（Ｃａｍｐｉｓｉ、Ｉｎ ｖｉｔｒｏ １４：１８３－１８８（２０００））および腫瘍細胞におけるｐ２１誘導（Ｃｈａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：１４９７－１５０１１７（２０００））に関連付けられてきた。老化ＨＣＴ１１６細胞はまた、転移性増殖の一因となる可能性を有し得るいくつかのプロテアーゼ（カリクレイン－７、カルパインＬ２、ニューロシン、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータ）をも上方制御する。老化ＨＣＴ１１６細胞において誘導されるいくつかのその他の遺伝子は、細胞接着および細胞－細胞接触に関与する（Ｐ－カドヘリン、Ｍａｃ２結合タンパク質およびデスモプラキンを含む）。その他の誘導された遺伝子は、血管形成に関与するいくつかのインテグリンおよびシンデカン－４（リュードカン）を含む、ＥＣＭレセプターをコードする。老化細胞において誘導されるいくつかのその他の膜貫通性タンパク質は、増殖制御タンパク質ＣＤ４４およびジャグド－１（Ｊａｇｇｅｄ－１）、アルツハイマー病のβ－アミロイド前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、並びにアルツハイマー様疾患に関連する別のアミロイド前駆体、ＢＲＩである。分泌性因子、ＥＣＭタンパク質、ＥＣＭレセプターおよびその他の膜内在性タンパク質は、総計で、老化ＨＣＴ１１６細胞において誘導される既知の機能を有する６８の遺伝子のうちの３３の遺伝子を構成する。対照的に、既知の機能を有する下方制御された６４の遺伝子のうちの２つのみが、ドキソルビシンで処理したＨＣＴ１１６細胞の老化細胞集団において誘導された。

【００６１】

ドキソルビシン処理したＨＣＴ１１６細胞において差次的に発現される遺伝子の１種は、既知または推定の転写因子またはコファクターをコードする遺伝子である。いくつかの既知または推定の転写因子およびコファクターの遺伝子は、老化ＨＣＴ１１６細胞において制御の変化を示す。下方制御された転写因子の１つは、ＤＮＡ複製の陽性の調節因子である、翼状の（ｗｉｎｇｅｄ）らせんタンパク質ＨＦＨ－１１（Ｔｒｉｄｅｎｔ）であり、これはサイクリング中の細胞において特異的に発現される（Ｙｅら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９：８５７０－８５８０（１９９９））。いくつかの上方制御された転写因子はＡＰ－１ファミリーに関連し、これは種々の有糸分裂促進シグナル、インターフェロンおよび種々の形態のストレスに対する細胞性応答を媒介する（Ｗｉｓｄｏｍ、Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ．Ｒｅｓ．２５３：１８０－１８５（１９９９））。これには、ｃ－Ｊｕｎならびに２つの他の塩基性ロイシン・ジッパータンパク質である、ＸＢＰ－１（構造的にｃ－Ｊｕｎに関連する）、およびｃ－Ｊｕｎと二量化するＡＴＦ３が含まれる。このストレス応答性因子の誘導は、ＡＴＦ３のその独自の転写を抑制する能力のために、通常一過性（数時間にわたる）であるので、老化細胞におけるＡＴＦ３ ｍＲＮＡおよびタンパク質の持続性上方制御は驚くべきことである（Ｗｏｌｆｇａｎｇら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：１６８６５－１６８７０（２０００））。別の誘導される転写因子は、機能的にそしておそらく物理的にＡＰ－１と相互作用することが知られているらせん－ループ－らせんタンパク質のＥｔｓファミリーのメンバーであるＥＬＦ－１である（Ｗｉｓｄｏｍ、前出）。

【００６２】

ＨＣＴ１１６細胞の細胞毒性薬物誘導性の老化における遺伝子発現について観察されるパターンにより、正常細胞における老化に対して多くの類似点が示された。老化細胞の一般的な特性のいくつか（最終的な増殖停止以外）は、アポトーシスに対する抵抗性、細胞接着の増大（ＥＣＭ成分の過剰産生に関連する）、並びにプロテアーゼ、プロテアーゼイ

ンヒビター、および有糸分裂促進因子の分泌である（Ｃａｍｐｉｓｉ、前出）。これらの現象すべてに関与する遺伝子は、老化ＨＣＴ１１６腫瘍細胞において上方制御されるものの中で非常に代表的である。しかしながら、正常細胞とは対照的に、老化ＨＣＴ１１６細胞は、ＲＡＳ誘導性の加速された老化に関連するｐ１６または腫瘍サプレッサーＰＭＬを上方制御しない（Ｐｅａｒｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ　４０６：２０７－２１０（２０００））。

【００６３】

薬物誘導性の老化に関連する遺伝子発現における変化はまた、生物の加齢に匹敵することも示された。老化ＨＣＴ１１６大腸癌細胞において誘導されるタンパク質のいくつか、例えばβＡＰＰおよびプロサポシンは、動物において年齢依存性の発現を示す。意外なことに、マスピン、ＣＤ４４およびサイクリンＤ１は、加齢動物の結腸上皮において特異的に上方制御されることが報告された（Ｌｅｅら、Ｍｅｃｈ　Ａｇｅｉｎｇ　Ｄｅｖ．１２２：３５５－３７１（２００１）。さらに、老化ＨＣＴ１１６細胞において下方制御された８つの遺伝子はまた、若年者に由来する同様の培養物に対して老齢者に由来する活発に増殖する線維芽細胞培養物における発現の低下を示し、一方、２つの誘導された遺伝子（ＭＩＣ－１およびデスモプラキン）は老齢の個体からの培養物において上方制御された（Ｌｙら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８７：２４８６－２４９２（２０００））。これらの結果より、腫瘍細胞における薬物誘導性の老化の過程が複製老化および生物加齢の双方に関連することが実証される。

【実施例３】

【００６４】

老化関連遺伝子発現における細胞毒性薬物誘導性の変化に及ぼすｐ５３およびｐ２１ノックアウトの影響

老化ＨＣＴ１１６細胞において発現の変化を示す多くの遺伝子は、ｐ５３（９つの下方制御される遺伝子、および１１の上方制御される遺伝子）およびｐ２１（４６の下方制御される遺伝子、および７つの上方制御される遺伝子）の過剰発現時に同様の変化を示している（表１および２参照）。ｐ５３は多くの遺伝子（ｐ２１を含む）の直接転写アクチベータとして作用し、そしてそのプロモーターにｐ５３結合部位を有しない遺伝子の群を間接的に制御する（Ｋｏｍａｒｏｖａら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１７：１０８９－１０９６（１９９８）；Ｚｈａｏら、Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．９：５１－５９（１９９９））。ｐ５３誘導遺伝子の顕著なクラスは分泌性増殖抑制因子をコードし、これはパラクリン抗増殖性活性を提供する（Ｋｏｍａｒｏｖａら、前出）。ｐ５３とは対照的に、ｐ２１はそれ自体が転写調節因子ではないが、転写因子、コファクター、およびシグナルトランスダクションのメディエーターの広範なネットワークと相互作用する（Ｄｏｔｔｏ、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１４７１：Ｍ４３－Ｍ５６（２０００））。線維肉腫細胞におけるｐ２１の過剰発現の結果、複数の細胞増殖遺伝子の下方制御、並びに多くのＥＣＭ成分および分泌性有糸分裂促進性因子および抗アポトーシス因子の上方制御に至り、これにより、ｐ２１誘導された細胞の条件培地において対応する活性が提供される（Ｃｈａｎｇら、前出（２０００））。ｐ２１による転写活性化の既知のメカニズムは、ｐ３００／ＣＢＰ転写コファクターを刺激するその能力に基づいている（Ｓｎｏｗｄｅｎら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２０：２６７６－２６８６（２０００））。しかしながら、ＨＣＴ１１６細胞は転写因子ｐ３００の優性の変異型を発現し（Ｇａｙｔｈｅｒら、Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２４：３００－３０３（２０００））、これは、なぜ老化ＨＣＴ１１６細胞が比較的少数のｐ２１誘導遺伝子を上方制御するのかを説明することができる。

【００６５】

遺伝子発現において観察される変化におけるｐ５３およびｐ２１の役割を解明するために、野生型、ｐ２１－／－およびｐ５３－／－　ＨＣＴ１１６細胞のドキソルビシン処理時における老化関連遺伝子の発現を分析した。薬物の添加前、ドキソルビシンによる１日処理の直後、および薬物除去後３日間連続して、ＲＮＡサンプルを単離した。老化細胞において上方制御された３３の遺伝子および下方制御された１１の遺伝子を、ＲＴ－ＰＣＲ

により前記したようにして分析した；結果を図２Ｂに示す。

【００６６】

この分析により、未処理の野生型細胞において、ドキソルビシン処理した細胞の増殖分画におけるレベルと同様のレベルで、すべての被験遺伝子が発現された。ドキソルビシン１日処理の後、または薬物からの解放後１日目に、たいていのこれらの遺伝子の発現における老化に関連する変化が、野生型ＨＣＴ１１６細胞の全集団において検出可能になった。この初期応答により、ｐ２１－／－およびｐ５３－／－細胞系の小さな老化分画を精製する必要なく、ｐ２１およびｐ５３ノックアウトのドキソルビシン処理細胞の全集団に及ぼす影響を評価することが可能になる。

【００６７】

老化細胞において上方制御される遺伝子のおよそ３分の１は、野生型、ｐ２１－／－およびｐ５３－／－細胞系の間でほぼ区別不可能な応答を示し、これは、これらの遺伝子の誘導がｐ５３またはｐ２１のいずれにも関与しないことを示している（図２Ｂ）。これらの遺伝子には、腫瘍サプレッサーＢＴＧ１および分泌性増殖抑制因子ＩＧＦＢＰ－６が含まれる。驚くべきことに、ｐ５３依存性を示さない遺伝子の１つはＮＯＸＡであるが、これはｐ５３により誘導可能であることが知られている。上方制御される遺伝子の残りの３分の２は、ｐ５３－／－細胞において誘導が低下または遅延することを示した。後者の遺伝子の約２分の１は、ｐ２１ノックアウトの影響を受けなかった。この群には、ＡＰ－１ファミリーの転写因子、ＣＹＲ６１、およびいくつかの細胞内（ＢＴＧ２、ＷＩＰ１）および分泌性増殖抑制因子（マスピン、ＭＩＣ－１、アンフィレギュリン）が含まれる。しかしながら、これらの遺伝子のうち、その誘導に関して完全にｐ５３に依存するものはなく、そしてそれらのすべてが薬物からの解放後２日目にｐ５３－／－細胞において誘導される。ほぼすべての老化関連増殖抑制因子（ｐ２１およびＥＰＬＩＮを除く）は、結局は、ｐ５３－／－細胞において野生型細胞系に匹敵するレベルまで誘導される（図２Ｂ）。これらの結果により、ドキソルビシン処理後、ｐ５３－／－細胞において、誘導は低下するが依然実質的に老化様増殖停止を誘導するということに関する説明が提供される（Ｃｈａｎｇら、前出（１９９９ａ））。

【００６８】

誘導された遺伝子の最後の群は、野生型細胞においてよりもｐ２１－／－においてさらに弱い変化を示し、これは、これらの遺伝子の制御がｐ２１を介して媒介されることを示している。ドキソルビシン処理ＨＣＴ１１６細胞におけるｐ２１誘導はｐ５３依存性であるので、このような遺伝子はまた、ｐ５３－／－細胞における誘導の低下を示す。被験遺伝子の中で最も強いｐ２１依存性は、サイクリンＤ１について見出される。ｐ２１依存性遺伝子のうち、分泌性増殖抑制因子を生ずるものはないが、それらのうちの２つは、分泌性有糸分裂促進性／抗アポトーシス性タンパク質（プロサポシンおよびＴＧＦα）をコードする。老化ＨＣＴ１１６細胞において下方制御されるたいていの遺伝子は、ｐ２１により抑制されることが知られている（Ｃａｕｌｉｎら、前出）。この所見に合致して、このような遺伝子は、ドキソルビシン処理後、野生型においてのみ発現の低下が示され、ｐ２１－／－またはｐ５３－／－細胞系では示されない（図２Ｂ）。ｐ２１依存性誘導を示す遺伝子と共に、ｐ５３ノックアウトにより影響を受ける３１の被験遺伝子のうちの２０の被験遺伝子（ｐ２１は除く）はまた、ｐ２１のノックアウトにより同様またはそれ以上の程度まで影響を受ける。従って、ｐ２１は、最近まで遺伝子発現の制御に役割を果たすことが知られていなかったのだが、ｐ５３の対応する作用の主要なメディエーターであると思われる。

【００６９】

これらの結果により、本明細書で同定された遺伝子が、細胞老化に及ぼすその影響に関して化合物を評価するためのマーカーとして、およびｐ５３、ｐ２１または双方に関係しないメカニズムにより老化表現型を誘導する化合物を同定するためのマーカーとして用いることができることが示される。

【実施例４】

【００７０】

老化細胞において誘導されるプロモーター－レポーター遺伝子構築物の構築および腫瘍細胞において老化を誘導する作用物質に関するスクリーニング

細胞に基づくスクリーニングアッセイを用いて、ｐ５３欠損腫瘍細胞において、分泌性腫瘍促進因子を同時活性化することなく、老化関連増殖抑制遺伝子を活性化する化合物を同定する。この目的のために、キメラＧＦＰ－ルシフェラーゼレポーターの発現を駆動する、種々の老化関連増殖抑制遺伝子のプロモーター構築物を構築する。このようなキメラレポーターは、ＧＦＰ蛍光に基づく選択、およびルシフェラーゼ化学発光に基づく感受性プロモーター活性の測定に適していることが示された（Ｋｏｔａｒｓｋｙら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２８８：２０９－２１５（２００１））。同様のキメラレポーター遺伝子は市販により入手可能である（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、カリフォルニア州）。プロモーター－レポーター構築物は、対応する遺伝子を活性化する条件下でドキソルビシンによる誘導性に関して試験する。最もよく制御されたプロモーター構築物を用いて、安定的にトランスフェクションされる細胞系、および薬物誘導性の老化の条件下でレポーター遺伝子を最も強く誘導すると同定される細胞系を開発する。

【００７１】

一旦適当なレポーター細胞系が開発されると、キメラライブラリーのハイスループット・スクリーニング（ＨＴＳ）に関して最適化された条件が、レポーターのルシフェラーゼ活性に基づいて決定される。このＨＴＳアッセイを用いて、キメラ化合物ライブラリーをスクリーニングする（例えばＮＣＩの治療開発プログラム（ＤＴＰ）からの１，９９０の化合物の多様なセット）。次いで、このアッセイで陽性の化合物を、加速化される老化の正および負の局面に関連するその他の遺伝子の発現に及ぼすその影響に関して試験する。

【００７２】

７つの老化に関連する増殖抑制遺伝子は、誘導アッセイに関する優先的な標的である：

ＢＴＧ１は、Ｂ細胞白血病のｔ（８；１２）（ｑ２４；ｑ２２）染色体転座で再構成される腫瘍サプレッサー、および細胞増殖の抑制因子である（Ｒｏｕａｕｌｔら、ＥＭＢＯＪ．１１：１６６３－１６７０（１９９２））。ＢＴＧ１は、種々のヒト腫瘍細胞系においてＤＮＡ損傷により誘導されることが示された（Ｃｏｒｔｅｓら、Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇ．２７：５７－６４（２０００））。損傷誘導性のＢＴＧ１発現はＣｏｒｔｅｓらにより示され、そしてｐ５３非依存性であることが本明細書において示された。

【００７３】

ＢＴＧ２（ＰＣ３／ＴＩＳ２１）は、ＢＴＧ１関連抗増殖性遺伝子である（Ｒｏｕａｕｌｔら、Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１４：４８２－４８６（１９９６））。ＢＴＧ１はストレス応答性であり（Ｆｉｅｄｌｅｒら、Ｂｉｏｃｅｈｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２４９：５６２－５６５（１９９８））、そしてまた、種々の細胞系においてＤＮＡ損傷、増殖因子および腫瘍プロモーターにより誘導される（Ｆｌｅｔｃｈｅｒら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６６：１４５１１－１４５１８（１９９１））。ＢＴＧ２は、転写のレベルでｐ５３により誘導されることが示された（Ｒｏｕａｕｌｔら、前出（１９９６））が、野生型細胞におけるよりも少ない程度ではあるが、ｐ５３－／－細胞においてドキソルビシンにより誘導される。

【００７４】

ＩＧＦ結合タンパク質６（ＩＧＦＢＰ－６）は、ＩＧＦ機能および腫瘍細胞増殖の分泌性抑制因子であり（Ｂａｃｈ、Ｈｏｒｍ．Ｍｅｔａｂ．Ｒｅｓ．３１：２２６－２３４（１９９９）；Ｓｕｅｏｋａら、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１９：４４３２－４４３６（２０００））、転写のレベルでレチノイドにより誘導されることが示されている（Ｄａｉｌｌｙら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１５１８：１４５－１５１（２００１））。ドキソルビシンによるＩＧＦＢＰ－６誘導はｐ５３に依存しないことが示されている。

【００７５】

アンフィレギュリンは、いくつかの癌腫細胞系の増殖を抑制することが示されたＥＧＦ

関連因子であるが、一方、正常な上皮細胞の増殖を促進する（Ｐｌｏｗｍａｎら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１０：１９６９－１９８１（１９９０））。アンフィレギュリンは、ＷＴ１ ウィルムス腫瘍サプレッサー遺伝子による転写誘導の主要な標的であり（Ｌｅｅら、Ｃｅｌｌ ９８：６６３－６７３（１９９９））、そしてビタミンＤ３により誘導される（Ａｋｕｔｓｕら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２８１：１０５１－１０５６（２００１））。ドキソルビシンによるアンフィレギュリン誘導は、ｐ５３に中程度の依存性しか示さない。

【００７６】

ＭＩＣ－１（ｐＴＧＦ－β／ＰＬＡＢ／ＰＤＦ／ＧＤＦ１５）は、ＴＧＦ－βスーパーファミリーの分泌性増殖抑制性のメンバーであり、転写のレベルでｐ５３により誘導されることが示され（Ｔａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：１０９－１１４（２０００））、そしてｐ５３のパラクリン増殖抑制作用の重要なメディエーターであることが示唆された（Ｋａｎｎａｎら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４７０：７７－８２（２０００））。驚くべきことに、ドキソルビシンによるＭＩＣ－１誘導は、ｐ５３に弱い依存性しか示さない。

【００７７】

マスピンは、分泌性セリンプロテアーゼインヒビターであり、その発現が多くの進行した乳癌で消失する腫瘍サプレッサーとして同定されている（Ｄｏｍａｎｎら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ８５：８０５－８１０（２０００））。マスピンは、ドキソルビシン処理したＨＣＴ１１６細胞などにおいてタンパク質レベルでＤＮＡ損傷により非常に強力な誘導を示す；Ｚｏｕら（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７５：６０５１－６０５４（２０００））は、４つのその他の腫瘍細胞系における薬物処理によりマスピン誘導を示した。マスピン発現はｐ５３により転写レベルで誘導される（Ｚｏｕら、前出）。ｐ５３ノックアウトはドキソルビシン処理によりマスピン誘導を強く低下させるが、このような誘導は、ｐ５３－／－細胞において依然として容易に検出される。

【００７８】

ＥＰＬＩＮ（新生物の上皮タンパク質消失）は、アクチン結合細胞骨格タンパク質であり、ほぼすべての正常な上皮組織で発現されるが、２１の被験癌腫細胞系のうち２０の被験癌腫細胞系で下方制御される。ＥＰＬＩＮは細胞増殖を抑制し、それにより推定腫瘍サプレッサーとされている（ＭａｕｌおよびＣｈａｎｇ、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ １８：７８３８－７８４１（１９９９））。ＥＰＬＩＮは、ドキソルビシン処理したＨＣＴ１１６細胞の老化集団においてのみならず、レチノイドでの処理時に老化様の増殖停止を行うＭＣＦ７乳癌細胞においても誘導される。この群のすべての遺伝子の中でもＥＰＬＩＮは、未分類細胞においてドキソルビシンによる最も弱い誘導を示し、この誘導はｐ２１－／－およびｐ５３－／－細胞ではなおさらに低減される。このパターンにより薬物処理時のＥＰＬＩＮ誘導を検出することが困難になる可能性があるが、分類された老化細胞の集団においてはＥＰＬＩＮ発現が強く増加することから、その誘導が老化についてのとりわけ特異的なマーカーであり得ることが示唆される。

【００７９】

これらの遺伝子のすべてに関して機能的プロモーター配列が公開されている：ＢＴＧ１（Ｒｏｄｉｅｒら、Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２４９：３３７－３４８（１９９９））、ＢＴＧ２（Ｆｌｅｔｃｈｅｒら、前出（１９９１））、ＩＧＦＢＰ－６（Ｄａｉｌｌｙら、前出（２００１））、アンフィレギュリン（Ｌｅｅら、前出（１９９９））、マスピン（Ｚｏｕら、前出（２０００））、ＭＩＣ－１（Ｔａｎら、前出（２０００））、ＥＰＬＩＮ（Ｇａｏら、Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１８４：３７３－３７９（２０００））；ＥＰＬＩＮは２つの別のプロモーターを有している；好ましいプロモーターは、ＨＣＴ１１６細胞およびＭＣＦ７細胞において優先的に発現されるより長いβアイソフォームに対応するプロモーターである。対応する遺伝子の転写は、種々の因子（ＤＮＡ損傷、血清、分化誘導剤、フォルボールエステル、腫瘍サプレッサー）により、そのプロモーターのシス制御エレメントを介して制御される。さらに、マスピンは乳癌においてプロモー

ターのメチル化のレベルでサイレントであることが示されている（Ｄｏｍａｎｎら、前出（２０００））。従って、これらの遺伝子の発現における老化に関連する変化はプロモーター構築物において再現可能であると予測できる。ＴＲＡＮＳＦＡＣ　４．０データベースに基づくＭａｔＩｎｓｐｅｃｔｏｒ　Ｖ２．２プログラムを用いて、対応するプロモーター配列の転写因子結合部位を試験することにより示されるように、実質的にすべてのこれらのプロモーターは、ＡＰ－１、ＡＰ－４、ＥＬＫ１およびＧＡＴＡを含むいくつかの共通するシス制御部位を共有する。薬物誘導性の老化において観察されるこれらの遺伝子の同時制御と共に、これらの所見は、これらの遺伝子のすべてまたはほとんどを同時に刺激する作用物質を同定する可能性を支持する。

【００８０】

従来のクローニング方法によるか、あるいは、対応するプロモーターをフランキングする配列から設計されたプライマーおよび鋳型としてヒトゲノムＤＮＡを用いて、プロモーター配列のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅により、レポーター遺伝子構築物を調製する。適当なレポーター遺伝子の上流にプロモーター配列をクローン化するが、その最も便宜なものは選択マーカーおよびＨＴＳについての基準の双方として有用である。グリーン蛍光タンパク質およびルシフェラーゼのキメラを含む市販により入手可能なレポーターが、この目的に最も適している。このレポーターは、カルボキシル末端でホタル・ルシフェラーゼに融合された、アミノ末端でグリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の強化色彩変異体（市販によりＣｌｏｎｔｅｃｈより入手可能）により形成されたキメラタンパク質である。このキメラレポーターにより、強力なＧＦＰ蛍光およびルシフェラーゼに基づく高感度の化学発光アッセイが提供される。この遺伝子は、都合のよいクローニング部位または多重クローニング部位がレポーター遺伝子の５’末端で作動可能に連結される方向でプロモーター不含ベクターにクローン化され、そのために、７つの老化関連遺伝子に由来するプロモーターが容易に挿入され、そしてそれによりレポーター遺伝子に作動可能に連結される。

【００８１】

いくつかの被験遺伝子は、ｐ５３により誘導されることが知られている。ｐ５３非依存性メカニズムを介して老化関連増殖抑制因子を活性化する化合物を選択するために、ｐ５３欠損細胞系をスクリーニングに使用する。前記したように、１次細胞系はＨＣＴ１１６大腸癌細胞のｐ５３－／－誘導体である（Ｂｕｎｚら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２：１４９７－１５０１（１９９８））。次いで、この細胞系で陽性の結果を示すプロモーター構築物を別のｐ５３欠損腫瘍細胞型において試験して、これらのプロモーターの誘導がＨＣＴ１１６細胞に特有ではないことを確認する（多くの細胞系における損傷応答性は、ＢＴＧ１、ＢＴＧ２およびマスピンに関して既に実証されており、そして乳癌系でのレチノイド誘導性がＥＰＬＩＮおよびＩＧＦＢＰ－６に関して示された）。ｐ５３変異腫瘍細胞系、とりわけドキソルビシン処理時に老化表現型を進行させるこれらの細胞系（ＳＷ４８０大腸癌腫、Ｕ２５１神経膠腫およびＳａｏｓ２骨肉種を含む）を使用する（Ｃｈａｎｇら、前出（１９９９ｂ）に開示されている）。また、これらのアッセイにおいて、ｐ５３機能がｐ５３由来の遺伝子サプレッサーエレメントＧＳＥ５６により完全に抑制されているＨＴ１０８０線維肉腫の誘導体を使用する（Ｃｈａｎｇら、前出（１９９９ａ）に開示されている）。

【００８２】

ドキソルビシン処理によるルシフェラーゼ活性の誘導に関する一過性トランスフェクションアッセイにおいて、これらのプロモーター－レポーター構築物を最初に使用する。正規化のために、被験構築物は、構成的に発現されたプロモーター（例えばＣＭＶプロモーターから転写されたβ－ガラクトシダーゼ）の下で異なるレポーター遺伝子を担持する構築物と混合する。これらの混合物を（エレクトロポレーションを用いて）ｐ５３－／－ＨＣＴ１１６細胞にトランスフェクションし、次いで、これを未処理とするかまたは２００ｎＭドキソルビシンで処理する。市販により入手可能なアッセイキットを用いて、ホタル・ルシフェラーゼおよび対照レポーター遺伝子（β－ｇａｌ）の活性を測定し、そして

ホタル・ルシフェラーゼ活性の正規化された値を処理された細胞と未処理の細胞との間で比較する。最高の発現および最良の誘導を提供するプロモーター構築物をこれらのアッセイから決定する。

【００８３】

一過性のトランスフェクションアッセイにおいて少なくとも３倍の誘導を示すいくつかのプロモーター構築物をｐ５３－／－　ＨＣＴ１１６細胞にトランスフェクションし、そして安定的にトランスフェクションされた細胞をピューロマイシンで選択する。それぞれの被験構築物から約１００個のクローン トランスフェクタントを単離し、そして細胞１００，０００個に近い大きさまで広げる。この段階で、選定した系を９６ウェルプレートアッセイにおいてドキソルビシンによる活性に関してスクリーニングする（以下にさらに詳述する）。最良に誘導された細胞系を広げ、そして続いてＧＦＰおよびルシフェラーゼ誘導の双方に関して試験を繰り返すことにより特徴解析する。レポーター細胞系は、ルシフェラーゼの絶対的な高発現がＨＴＳアッセイにおいて検出できるシグナルを生じるのに必要な細胞数を最小限にするので、誘導されるルシフェラーゼ発現の絶対レベルが最大になって高い誘導倍率を維持するように選択する。一度開発されると、これらの至適な細胞系を時間経過およびレポーター発現のドキソルビシン用量依存性に関して分析し、そして試験して発現の老化特異性を確認する。ＰＫＨ２６（ＰＫＨ２に関連するフルオロフォアであるが、赤色にシフトした発光波長を有する）で細胞を標識することにより後者の分析を実施し、続いてドキソルビシン処理し、そして薬物不含培地に解放する。解放後６から７日の間、ＰＫＨ２６およびＧＦＰ蛍光に関する二色分析によりＦＡＣＳで細胞を分析する。それにより、ＰＫＨ２６^{hi}（老化）細胞に選択的に関連するＧＦＰ蛍光を、物理学的に分類することなく測定する。最終的に、選択された細胞系におけるレポーター発現誘導性は、ドキソルビシン以外の老化誘導物質、例えば電離放射線、シスプラチン、アフィジコリンまたはシタラビンなどのその他の作用物質を用いて試験する（Ｃｈａｎｇら、前出（１９９９ｂ））。その後の化合物スクリーニングのための１次レポーター細胞系をそれにより作製し、そして種々の遺伝子のプロモーターからレポーターを発現する２次細胞系を確認アッセイに用いることができる。

【００８４】

前記したようにして開発した１次レポーター細胞系を用いて、ＨＴＳアッセイを開発する。レポーター遺伝子のデュアルＦＧＰ－ルシフェラーゼ特性はとりわけ、さらに高感受性のルシフェラーゼに基づく化学発光アッセイ、および試験化合物の効果がルシフェラーゼアッセイにおよぼす人工的な影響によらないことを確認するためのＧＦＰ蛍光を用いるスクリーニングアッセイを行うのに特に便宜である。

【００８５】

ドキソルビシンおよびその他の老化誘導物質に関して確立されたアッセイ条件を用いて、そして化学ライブラリーのルシフェラーゼに基づくスクリーニングのために他の研究者が用いた手順と同様にして、１次スクリーニングを実施する（Ｓｏｈｎら、Ａｎｎ．Ｓｕｒｇ．２３３：６９６－７０３（２００１））。化合物ライブラリーにおける各化合物の１ｍＭストックの一部を、最終濃度２μＭで、細胞培養培地の入った３つ一組の９６ウェルプレートに加える。次いで、ウェルあたり少なくとも２つの試薬不含の陰性対照ウェルおよび２つのドキソルビシン含有陽性対照ウェルを用いて、９６ウェルプレートにレポーター細胞を播種し、そして必要な時間３７℃でインキュベーションする。インキュベーションの後、プレートを蛍光リーダーで読み取り（さらなる操作を行わない）、ＧＦＰ活性が実質的に増加しているウェルを同定する。次いで、同一のプレートをルシフェラーゼアッセイについて処理し、そしてマイクロプレートルミノメーターで読み取る。３つのプレートのルミノメーターの読み取りを用いて、候補の陽性物質を同定し、そしてＧＦＰ蛍光の結果と比較する。２次スクリーニングの前に、別の一連のアッセイにて陽性の化合物を再試験する。ルシフェラーゼおよびＧＦＰ活性の増加に関するアッセイの本質は、アッセイの過程で生存細胞において発現される必要があるので、候補物質のリストから高い細胞毒性を有する化合物を排除すべきである。

【００８６】
１次分析で陽性として記録された化合物を、種々の老化関連遺伝子の発現に及ぼすその効果に関して試験する。これらのアッセイのいくつかを安定的にトランスフェクションされた細胞系を用いて実施し、ここでレポーター遺伝子は１次レポーター系において以外の遺伝子のプロモーターにより駆動される。１次アッセイで非常に多くの陽性物質を検出すれば、これらの単純なレポーター活性化アッセイは保証される。２次レポーター系を用いて、１以上のプロモーターで活性である化合物数にその化合物数を限定する。しかしながら、１次スクリーニングの後、陽性化合物の数が少ない場合には、この２次スクリーニング工程は不要であり、陽性化合物は遺伝子発現に関する化合物の直接分析に用いられる。
【００８７】
さらに詳しいスクリーニングに加えて、およびその前に、レポーターアッセイにおいて強い増加を生じる化合物の最低濃度を決定する。この濃度はまた、ｐ５３－／－　ＨＣＴ１１６細胞において内因性老化関連遺伝子の発現に及ぼすその効果に関して試験される。これらのアッセイでは、ＲＮＡを処理の前および後で抽出し、そして、例えば一連のＲＮＡサンプル間の複数の遺伝子に関する発現レベルを比較することを可能にする定量的ＲＴ－ＰＣＲ（Ｎｏｏｎａｎら、（１９９０）に開示されている）により、種々の老化関連遺伝子の発現を分析する。単一のＲＴ－ＰＣＲアッセイは約５０ｎｇの全細胞ＲＮＡを使用し、これにより、ノーザン・ハイブリダイゼーションの単一のレーンで典型的に使用される量である、５μｇの全ＲＮＡから出発して約１００アッセイを実施することが可能になる。このアッセイでは、β－アクチンの発現が老化細胞で未変化であるので、ノーザンおよびウェスタンブロットに従い、β－アクチンを正規化標準として用いる。
【００８８】
ドキソルビシン誘導性の加速された老化において上方または下方制御される６３の遺伝子に関するＲＴ－ＰＣＲプライマーおよびアッセイ条件を表３に開示する（Ｃｈａｎｇら、前出（２００１））。これらのアッセイを用いて、陽性化合物が前記した増殖抑制遺伝子のみならず、その他の老化関連増殖調節因子、例えばＷＩＰ１、ＣＤ４４、ジャグド－１、および正常細胞に対して癌において下方制御され、そして次に老化腫瘍細胞において上方制御されることが知られているいくつかの遺伝子、例えばＰ－カドヘリン、デスモプラキンおよびデスモヨーキンをも活性化することができるかどうかを試験する。後者の遺伝子は、癌で下方制御される老化関連増殖抑制因子（例えばＥＰＬＩＮまたはマスピン）で同時制御される可能性がある。一方、化合物は、ｐ２１、またはドキソルビシン誘導性の老化で上方制御される病原性の可能性のあるタンパク質、例えば分泌性腫瘍促進因子ＴＧＦα、ＣＹＲ６１およびプロサポシン、プロテアーゼ（例えばカリクレイン－７もしくはカルパインＬ２）、およびプラーク形成タンパク質、例えばアルツハイマー病のβ－アミロイド前駆体およびＢＲＩを誘導しないことが見出されるであろうと予測される。また、老化細胞で下方制御される遺伝子、例えば腫瘍特異的膜貫通タンパク質ＳＴＥＡＰ、および細胞増殖に関与する遺伝子（例えばＫｉ－６７、トポイソメラーゼＩＩα、ＣＤＣ２、ＰＬＫ１、ＭＡＤ２、チミジレート シンターゼ、リボヌクレオチド・リダクターゼＭ１）に及ぼす化合物の影響に関しても、陽性化合物をアッセイする。後者の遺伝子の抑制は試験化合物の細胞増殖抑制効果の指標であり、これは別個のアッセイで試験される（以下を参照）。
【００８９】
この分析が遺伝子発現に望ましい効果を有する化合物を明らかにする場合には、化合物が細胞増殖にどのように影響するかを決定するために分析を実施する。標準的な細胞増殖アッセイ、および抗増殖作用の細胞増殖抑制性および細胞毒性の成分を評価するアッセイの双方により、この分析を実施する。このアッセイでは細胞をＰＫＨ２で標識し、試験化合物で連続的または限定された時間（例えば２４時間）のいずれかで処理し、そして３回の細胞倍化に相当する時間の後に分析する。この分析のために、接着および浮遊した細胞を混合し、そして、膜が損なわれた（死亡した）細胞のみを染色するヨウ化プロピジウム（ＰＩ）で染色する。次いで、染色した細胞をＦＡＣＳにより、ＰＫＨ２蛍光における変

化に関して、および同時にＰＫＨ２で標識した未処置細胞の対照サンプルに隣接したＰＩ－陽性細胞の分画に関して分析する。対照細胞に対してＰＫＨ２蛍光の増加は細胞分割の抑制（細胞増殖抑制効果）を示し、そしてＰＩ＋分画の増加は細胞毒性効果を示す。このような効果は老化プログラムの特異的活性化から予測されるので、腫瘍細胞に及ぼす（細胞毒性よりもむしろ）優先的な細胞増殖抑制効果を有する化合物はとりわけ興味深い。

【００９０】

望ましい特性を有する原型化合物が見出される場合には、この化合物からの誘導体のライブラリーを調製し、次いで、これをスクリーニングしてさらに有効な作用物質を見出す。このような作用物質は、前臨床試験による原型薬物として評価される。

【実施例５】

【００９１】

プロモーター－レポーター遺伝子構築物の構築および抗癌剤誘導性の老化に関連する病原性遺伝子の誘導を防御する作用物質のスクリーニング

本明細書に開示する結果は、加齢の疾患およびパラクリン増殖刺激効果、とりわけ腫瘍細胞増殖刺激に関連してきた特定の遺伝子が細胞毒性薬での処理により誘導されることを示している。これらの遺伝子には、サイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパインＬ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ、ウロキナーゼ、アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、および膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）が含まれる。これらの遺伝子に由来するプロモーターを用いて、実施例４に開示されているのと同様の様式で、レポーター遺伝子構築物を別の老化関連遺伝子に関して作製することができる。次いで、これらの構築物を用いて、試験化合物の存在下および不存在下で細胞毒性薬の処置によるレポーター遺伝子の誘導をアッセイすることができる。

【００９２】

これらの遺伝子のすべてに関して、機能的プロモーター配列が公開されている：サイクリンＤ１（ＭｏｔｏｋｕｒａおよびＡｒｎｏｌｄ、Ｇｅｎｅｓ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ Ｃａｎｃｅｒ ７：８９－９５（１９９３））；ＣＹＲ６１（Ｌａｔｉｎｋｉｃら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． １９：３２６１－３２６７（１９９１））；プロサポシン（Ｓｕｎら、Ｇｅｎｅ ２１８：２３－３４（１９９８））；形質転換増殖因子α（ＴＧＦα；Ｒａｊａら、Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ． ５：５１４－５２０（１９９１））；カリクレイン７（Ｙｏｕｓｅｆら、Ｇｅｎｅ ２５４：１１９－１２８（２０００））；カルパインＬ２（Ｓｕｚｕｋｉら、Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｈｏｐｐｅ Ｓｅｙｌｅｒ．３７６：５２３－５２９（１９９５））；プラスミノーゲンアクチベータ ウロキナーゼ（Ｒｉｃｃｉｏら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：２７５９－２７７１（１９８５））；およびアミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ；ＬａｈｉｒｉおよびＲｏｂａｋｉｓ、Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．９：２５３－２５７（１９９１））。

【００９３】

実施例４に記載した方法の変法により、レポーター遺伝子構築物を調製する。典型的には細胞を老化誘導濃度のドキソルビシンまたはその他の細胞毒性物質と接触させることにより、一過性および安定的にトランスフェクションされた細胞において老化を誘導する。これらの実験を用いて、試験化合物の不存在下でのレポーター遺伝子誘導のレベルを確立する。

【００９４】

対応する遺伝子を活性化する条件下で、ドキソルビシンによる誘導性に関してプロモーター－レポーター構築物を試験する。最良に調節されたプロモーター構築物を用いて、安定的にトランスフェクションされた細胞系を増殖させ、そして実施例４に記載するように、薬物処置の条件下で最も強力なレポーターの誘導を有する細胞系を同定する。

【００９５】

また、試験化合物の不存在下で実施した実験と同一の様式で、試験化合物の存在下でも

実験を実施する。典型的には、同一濃度の細胞毒性物質で誘導された細胞において多様な濃度の試験化合物を用いて実験を実施し、そしてレポーター遺伝子の発現を測定し、そして試験化合物の不存在下においてその濃度の細胞毒性物質で誘導された細胞におけるレポーター遺伝子発現と比較する。

【００９６】

これらの実験の結果により、細胞毒性薬で、およびその有効濃度で処理した細胞において、疾患を促進する老化関連遺伝子の老化に関連する誘導を低減、抑制または防御する試験化合物が同定される。これらの結果により、従来の癌治療に関連する細胞毒性物質誘導性の老化の結果として、疾患を促進する、とりわけ腫瘍細胞増殖を刺激する遺伝子の誘導を防御するのに有用な化合物が提供される。

【００９７】

前記の開示は本発明の特定の実施形態を強調するものであり、そしてすべての変更またはそれに等価な代替は添付の特許請求の範囲に示す本発明の精神および範囲内であると理解すべきである。

【００９８】

表1. ドキソルビシン処置後に分離されたＨＣＴ１１６細胞における増殖細胞分画に関して、老化で下方制御される遺伝子
（ＲＴ－ＰＣＲにより確認された遺伝子を太字で示す）

遺伝子名	アクセッション番号	作用[a]：		備考	B.D.E.[b]
		p53	p21		
転写因子およびコファクター					
HFH-11/Trident/Win/MPP2	U74612		↓[1]	陽性細胞成長レギュレーター[2]、加齢で下方制御される[3]	-3.3
AND-1	AJ006266			ＷＤ反復、ＨＭＧボックス	-2.4
構造特異的認識タンパク質１（ＳＳＲＰ１）	M86737		↓[1]	転写延長因子	-2.3
ヒストン アセチルトランスフェラーゼ１（ＨＡＴ１）	AF030424		↓[d]	転写コファクター	-2.1
ジンクフィンガータンパク質、Ｙ－連結（ＺＦＹ）	M30607			精巣決定	-2.1
有糸分裂／ＤＮＡ分離					
Ｋｉ－６７抗原	X65550		↓[d]	クロマチン濃縮	-4.9
ＸＣＡＰ－Ｃ コンデンシン ホモログ	NM_005496			クロマチン濃縮	-4.2
セントロメア タンパク質Ｆ（ＣＥＮＰ－Ｆ）	NM_005196		↓[1]	動原体成分、加齢で下方制御される[3]	-3.8
ＸＣＡＰ－Ｈ コンデンシン ホモログ	D38553		↓[1]	クロマチン濃縮	-3.7
BUBR1/BUB1B	AF053306		↓[1]	動原体、紡錘体チェックポイント制御	-3.6
キネシン様ＤＮＡ結合タンパク質（Ｋｉｄ／Ｏｂｐ－２）	AB017430		↓[d]	動原体	-3.1
AIM-1/AIK-2	NM_004217		↓[1]	中心体レギュレーター	-3.1
ラミンＢレセプター	L25941	↓[4]		核エンベロープ集合体	-3
アポトーシス インヒビター４（サービビン）	U75285		↓[d]	中心体；有糸分裂関連アポトーシスからの保護	-2.9
CDC2	X05360	↓[5]	↓[1]	有糸分裂開始	-2.7
CDC20	AW411344		↓[d]	ＡＰＣ活性化／後期開始、加齢で下方制御される[3]	-2.6
有糸分裂キネシン様タンパク質－１	H63163			紡錘体移動	-2.5
セントロメア タンパク質Ｅ（ＣＥＮＰ－Ｅ）	Z15005		↓[d]	動原体	-2.5
ＺＷ１０インタラクター（ｈＺｗｉｎｔ－１／ＭＰＰ５）	AW409765		↓[1]	動原体	-2.5

甲状腺ホルモンレセプター インタラクター１３（ＴＲＩＰ１３）／ＨＰＶ１６ Ｅ１結合タンパク質	AA134541		↓[1]	酵母太糸期チェックポイントタンパク質のホモログ	-2.4
乳癌１（ＢＲＣＡ１）	L78833	↓[6]		中心体複製レギュレーター、腫瘍サプレッサー	-2.3
ショウジョウバエのラフディール（ｒｏｕｇｈ ｄｅａｌ）（Ｒｏｄ）タンパク質のホモログ	AF070553			染色体分離	-2.3
AIK-1/AIM-2/STK15	NM_003600		↓[1]	中心体レギュレーター、癌で増幅される癌原遺伝子[7]	-2.1
MAD2	NM_002358	↓[4]	↓[1]	動原体、紡錘体チェックポイント制御	-2.1
トポイソメラーゼＩＩα	AF071747	↓[4]	↓[1]	ＤＮＡおよび染色体分離	-2.1
ラミンＢ２	M94363		↓[1]	核エンベロープ集合体	-2.1
ペリセントリン	AI970199			中心体	-2
チモポイエチン	U18271		↓[1]	核エンベロープ集合体	-2
ＦＫ５０６結合タンパク質５	U71321			精巣特異的クロマチン濃縮に関与する齧歯類ＴＰ２に対して相同体	-2
ポロ様キナーゼ（ＰＬＫ１）	U01038		↓[1]	有糸分裂の開始およびいくつかのその他の段階を制御、加齢で下方制御される[3]	ND[e]
ＤＮＡ複製／クロマチン集合					
リボヌクレオチド リダクターゼＭ１（ＲＲＭ１）	NM_001033		↓[1]	ヌクレオチド合成	-3.4
高移動度群タンパク質１（ＨＭＧ１）	AW160834		↓[1]	クロマチン成分	-3.4
チミジンキナーゼ１	NM_003258		↓[1]	ヌクレオチド合成	-3.3
MCM7/CDC47	D55716	↓[4]	↓[1]	複製ライセンス因子成分	-3.3
チミジレート シンターゼ	NM_001071		↓[1]	ヌクレオチド合成、加齢で下方制御される[3]	-3.2
ＭＣＭ２（マイトチン）	AW264268		↓[d]	複製ライセンス因子成分	-2.8
複製因子Ｃ（アクチベータ１）（３６．５ｋＤ）	AI651635, AW651734		↓[1]	ＰＣＮＡクランプ形成	-2.7,-2.4[c]
高移動度群タンパク質２（ＨＭＧ２）	X62534	↓[4]	↓[1]	クロマチン成分、加齢で下方制御される[3]	-2.5
複製タンパク質Ａ３（１４ｋＤ）	NM_002947		↓[d]	複製および修復に関与する１本鎖ＤＮＡ結合タンパク質	-2.1
γ－グルタミルヒドロラーゼ（フォリルポリガンマグルタミル ヒドロラーゼ）	NM_003878			葉酸代謝レギュレーター	-2
MCM3	NM_002388		↓[d]	複製因子	-2

ＤＮＡ修復					
ＨＥＸ１（ＲＡＤ２ホモログ）	AF042282		↓[1]	エクソヌクレアーゼ	-3.7
フラップ エンドヌクレアーゼ１（ＦＥＮ１、ＲＡＤ２ホモログ）	AW246270		↓[d]	エクソヌクレアーゼ、加齢で下方制御される[3]	-3
ＲＡＤ５１ ホモログ	D14134		↓[d]	大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＲｅｃＡに類似	-2.4
Ｔ（１２；１６）悪性脂肪肉腫融合体（ＴＬＳ／ＦＵＳ）	S62140		↓[d]	レチノイドにより抑制される、癌原遺伝子[8]	-2.2
ＲＮＡプロセシング／トラフィッキング					
異種性 核リボヌクレオタンパク質 Ｈ１	NM_005520		↓[d]		-2.1
ロイシンに富む酸性タンパク質（ＡＰＲＩＬ）	Y07570		↓[d]	ＲＮＡ安定性	-2.1
プレｍＲＮＡ切断因子 Ｉｍ（２５ｋＤ）	AA738354		↓[d]		-2
異種性 核リボヌクレオタンパク質 Ｇ	Z23064				-2
異種性 核リボヌクレオタンパク質 Ａ２／Ｂ１	NM_002137		↓[d]		-2
異種性 核リボヌクレオタンパク質 Ａ１	AA173135		↓[d]		-2
増殖関連					
インスリン誘導性遺伝子１（ＩＮＳＩＧ１／ＣＬ－６）	AW663903			肝臓再生	-2.3
ヒアルロン媒介運動性レセプター（ＲＨＡＭＭ）	U29343		↓[1]	細胞運動性、発癌活性[9]	-2.1
ＦＳＨ１次応答（ＬＲＰＲ１）	NM_006733			ＦＳＨ増殖応答	-2.1
前立腺の６回膜貫通型上皮タンパク質（ＳＴＥＡＰ）	AC004969			癌腫で過剰発現される、潜在性膜トランスポーター[10]	-2.1
その他					
ラブキネシン－６	NM_005733		↓[d]	ゴルジ、細胞内輸送	-3
ワクシニア関連キナーゼ１	AA312869		↓[d]	ｐ５３リン酸化、Ｍｄｍ－２干渉（interference）の可能性	-3
タンパク質キナーゼＣ、θ	L07032		↓[d]	シグナル トランスダクション	-2.4
ユビキチン キャリアタンパク質	AI571293			タンパク質分解、加齢で下方制御される[3]	-2.2
アクチン、γ１	NM_001614				-2.1
KIAA0008	D13633		↓[1]		-4.6
KIAA0101	D14657	↓[4]	↓[1]		-4
KIAA0056	AF070553				-2.3
KIAA0225	D86978				-2.1

40 30 20 10

[a] p53またはp21の異所性過剰発現時の遺伝子発現における既知の変化

[b] B. D. E. 、比較した(balanced)差次的発現(Incyte UniGem V2. 0ハイブリダイゼーション分析から)、ほぼ全例でRT－PCRで観察された実際の倍差を低く見積もる

[c] アレイの2個のクローンが同一の遺伝子から誘導されることが見出された、双方のクローンのB. D. E. 値を示す

[d] マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションにより決定される、HT1080線維肉腫細胞におけるp21誘導の作用(本発明者らの未公開データ、元の報告には含まれていない[1])

[e] マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションにより検出されないが、RT－PCRにより同定される

参照文献

1. B. D. Chang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 97, 4291-4296 (2000).
2. H. Ye, A. X. Holterman, K. W. Yoo, R. R. Franks, R. H. Costa, *Mol.Cell Biol.* 19, 8570-8580 (1999).
3. D. H. Ly, D. J. Lockhart, R. A. Lerner, P. G. Schultz, *Science* 287, 2486-2492 (2000).
4. R. Zhao et al., *Genes Dev.* 14, 981-993 (2000).
5. K. Kannan, N. Amariglio, G. Rechavi, D. Givol, *FEBS Lett.* 470, 77-82 (2000).
6. P. Arizti et al., *Mol.Cell Biol.* 20, 7450-7459 (2000).
7. H. Zhou et al., *Nat.Genet.* 20, 189-193 (1998).
8. D. Perrotti et al., *EMBO J.* 17, 4442-4455 (1998).
9. C. L. Hall et al., *Cell* 82, 19-26 (1995).
10. R. S. Hubert et al., *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A* 96, 14523-14528 (1999).

40 30 20 10

表2.ドキソルビシン処置後に分離されたＨＣＴ１１６細胞における増殖細胞分画に関して、老化で上方制御される遺伝子
（ＲＴ－ＰＣＲにより確認された遺伝子を太字で示す）

Table 2A

遺伝子名	アクセッション番号	作用[a]：		備考	B.D.E.[b]
		p53	p21		
転写因子					
Xボックス結合タンパク質1（XBP-1/HTF/TREB）	AW021229			bZIPドメイン、c-Junファミリー、Fosで二量化[1]	3.9
活性化転写因子３（ＡＴＦ３）	N39944	↑[2]		ｂＺＩＰドメイン、ｃ－Ｊｕｎで二量化[3]	3.3
C-JUN	AI078377			ＡＰ－１、ストレス応答[4]	2.5
ELF-1	AW503166			ｅｔｓ ドメイン因子、リンパおよび上皮組織で発現される[5]	2.4
リングフィンガータンパク質３（ＲＮＦ３）	AA403225		↑[d]	ショウジョウバエの７３Ａｈレギュレーターのホモログ	2.3
ショウジョウバエ・マッスルブラインド (muscleblind) Ｂタンパク質のホモログ（ＭＢＬＬ）	AF061261			Ｃ３Ｈ型 ジンクフィンガータンパク質	2.3
ＳＯＸ９／ＳＲＹ（性別決定領域Ｙ）	NM_000346			ＨＭＧドメイン、レチノイド誘導性[6]、軟骨細胞分化に関与する[7]	2.2
シェーグレン症候群 抗原Ａ２（６０ｋＤ、リボヌクレオタンパク質 ＳＳ－Ａ／Ｒｏ）	U44388			推定される転写調節因子	2.1
コアプロモーターエレメント結合タンパク質（ＣＰＢＰ／ＺＦ９／ＫＬＦ８）	AL037865			クルッペル様ファミリー転写因子、ケラチン－４ プロモーターを活性化[8]	2
増殖抑制因子、細胞内					
新生物の上皮タンパク質消失（ＥＰＬＩＮ）	AL048161			複数の癌腫において低下[11]	3.5
Ｂ細胞転座遺伝子１（ＢＴＧ１）	AI560266			腫瘍サプレッサー[12]	2.8
Ｂ細胞転座遺伝子２（ＢＴＧ２）	NM_006763	↑[13]		腫瘍サプレッサー[13]	2.1
WIP1	NM_003620	↑[14]		ｐ５３誘導性タンパク質ホスファターゼ[14]	2
増殖抑制因子、分泌性					
マスピン	AA316156, AI435384	↑[15]		セリン プロテアーゼ インヒビター、新生物において下方制御され、腫瘍増殖、転移、血管形成を抑制[16]、加齢で上方制御[17]	5.2, 3.3[c]

ＭＩＣ－１（前立腺差次的因子、ＰＴＧＦ－β、ＰＬＡＢ）	AB000584	↑[18]		ＴＧＦ－βファミリー、癌で下方制御される、増殖停止およびアポトーシスを誘導する[19]	2.9
インスリン様成長因子結合タンパク質６（ＩＧＦＢＰ－６）	AA675888			レチノイド誘導性[20]	2.7
アンフィレギュリン	NM_001657			ＥＧＦ／ＴＧＦαファミリー分泌性因子、正常上皮細胞の増殖を促進するが、癌腫を抑制する[21]、ＷＴ１誘導性[22]	2.3
その他の増殖調節因子					
ＣＤ４４抗原	X66733, X55150			接着分子、増殖調節因子[23]、加齢で上方制御される[17]	3.9, 2.1[c]
ジャグド－１	U61276			ノッチリガンド、幹細胞増殖、血管形成因子[24]	2
細胞接着および細胞－細胞接触					
Ｐ－カドヘリン	NM_001793			前立腺癌で消失[36]	2.9
デスモプラキン（ＤＰＩ、ＤＰＩＩ）	J05211			新生物で低下[37]、加齢で上方制御される[38]	2.4
ＰＭ５タンパク質（コラゲナーゼ関連）	X57398			細胞接着タンパク質に相同	2.2
ＣＤ６３／ＭＥ４９１抗原	X62654				2.1
Ｍａｃ－２結合タンパク質	X79089		↑[28]	ＥＣＭ形成体[39]	2
オクルディン	U53823			タイトジャンクションタンパク質	2.1
ＥＣＭレセプター					
インテグリンβ４	X53587				2.6
ラミニン、α３（ナイセイン／カリニン／ＢＭ６００／エピレグリン）	L34155				2.4
シンデカン４（アンフィグリカン、リュードカン）	D79206, NM_002999			創傷修復および血管形成に関与する[40]	2.3, 2.2[c]
インテグリンα６	X53586				2.2
膜貫通シグナル伝達					
AHNAK ヌクレオタンパク質（デスモヨーキン）	M80899			ＰＬＣ－γを活性化[41]、神経芽細胞腫で低下[42]	2.1
ＣＤ２４抗原	AI745625			ムチン様糖タンパク質、乳癌で上方制御される[43]	2.1
リポコルチン－２（アネキシンＡ２）	W53011			ｓｒｃチロシンキナーゼの基質	2

イオン輸送およびイオン交換					
ホスホレマン(Phospholemman)様、８ｋＤ（ＭＡＴ－８）	AA826766			塩化物チャネルアクチベータ	2.3
フェリチン、重ポリペプチド１	AW575826		↑[d]	鉄の貯蔵	2.8
カベオリン２	AI093287			膜の区画化	2.2
ニューログラニン	Y09689		↑[d]	カルモジュリン結合タンパク質、神経系	2.2
Ｈ１　塩化物チャネル	AI381979			カベオリンと同時局在する[44]	2
細胞内トラフィッキング、細胞骨格および足場					
インターフェロン誘導性タンパク質５６（ＩＦＩ－５６Ｋ／Ｐ５６）	NM_001548			テトラトリコペプチドタンパク質、Ｉｎｔ６相互作用[45]	3.2
主要ヴォールト（vault）タンパク質（肺抵抗性タンパク質、ＬＲＰ）	X79882			ストレス応答、多剤耐性	2.4
マクロフィン（マイクロフィラメントおよびアクチンフィラメント架橋タンパク質）	AB029290			細胞骨格	2.4
微小管関連タンパク質　１Ｂ（ＭＡＰ１Ｂ）	L06237			細胞骨格、ＣＫ２基質	2
プロアポトーシス					
NOXA	D90070	↑[46]		Ｂｃｌ２ファミリーメンバー[46]	2.7
Ｆａｓ抗原／ＡＰＯ－１	M67454	↑[47]		アポトーシスシグナルレセプター	2.3
ケラチン					
ケラチン１８	X12881			抗アポトーシス[48]	4
ケラチン８	X74929	↑[49]		抗アポトーシス[48]	3.4
ケラチン２Ａ	AF019084				2.9
ケラチン７	M13955, AA307373				2.6 2.1[c]
ケラチン１５	NM_002275				2.3
ケラチン６Ｂ	L42611				2.1
その他					
高移動度群タンパク質　ＨＭＧ２　ホモログ	AI191623				5.4
Ｕ１　小リボヌクレオタンパク質　１ＳＮＲＰ　ホモログ	AI400786				3.7
レチンアルデヒト　デヒドロゲナーゼ３（ＡＬＤＨ６／ＲＡＬＤＨ３）	U07919			レチノイン酸合成	3.2

腫瘍差次的発現１（ＴＤＥ１）	NM_006811			膜貫通タンパク質、睾丸腫瘍で増加するマウス遺伝子に相同[50]	2.4
アポリポタンパク質Ｅ	K00396			アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症	2
インサイトＥＳＴ	X62654				2.1
２３８１５ ヒトｍＲＮＡ	U90916				2.1
Table 2B					
増殖調節因子、細胞内					
p21 (Waf1/Cip1/Sdi1)	AA481712	↑[9]		サイクリン－ＣＤＫ複合体の多面発現性インヒビター、種々の転写因子およびコファクターを阻害または刺激する[10]	5.1
サイクリンＤ１（Ｂｃｌ－１）	M73554, X59798	↑[25]	↑[25]	Ｇ１／Ｓ移行；癌においてｐ２１と同時制御される[26]	2.8, 2.2[c]
血清誘導性キナーゼ（Ｓｎｋ、ポロ様）	NM_006622			推定される細胞増殖調節因子	2.2
有糸分裂促進／抗アポトーシス因子、分泌性					
CYR61	Y12084			有糸分裂促進／血管形成因子[27]	3.3
プロサポシン	J03015		↑[28]	抗アポトーシス／有糸分裂促進性[29]、加齢で上方制御される[30]	2.3
形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）	X70340	↑[31]		ＥＧＦ関連マイトジェン[32]	2
プロテアーゼ					
カリクレイン７（セリン プロテアーゼ６）	L33404			卵巣癌で上方制御される[33]	3.2
カルパイン－Ｌ２	M23254				2.3
ニューロシン（セリン プロテアーゼ９、ザイム、プロテアーゼＭ）	NM_002774			乳癌で下方制御される[34]、卵巣癌で上方制御される[35]	2
プラスミノーゲンアクチベータ、ウロキナーゼ	D11143				2
その他					
アミロイドベータ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）	X06989		↑[28]	アルツハイマー病アミロイド前駆体	2
膜内在タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）	AW131784			家族性英国型痴呆のアミロイド前駆体[51]	2

10 20 30 40

[a] ｐ５３またはｐ２１の異所性過剰発現時の遺伝子発現における既知の変化

[b] Ｂ．Ｄ．Ｅ．、比較した（ｂａｌａｎｃｅｄ）差次的発現（Ｉｎｃｙｔｅ　ＵｎｉＧｅｍ　Ｖ２．０ハイブリダイゼーション分析から）、ほぼ全例でＲＴ－ＰＣＲで観察された実際の倍差を低く見積もる

[c] アレイの２個のクローンが同一の遺伝子から誘導されることが見出された、双方のクローンのＢ．Ｄ．Ｅ．値を示す

[d] マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションにより決定される、ＨＴ１０８０線維肉腫細胞におけるｐ２１誘導の作用（本発明者らの未公開データ、元の報告には含まれていない２８）

参照文献

1. A. M. Reimold et al., *Genes Dev.* 14, 152-157 (2000).
2. T. Hai, C. D. Wolfgang, D. K. Marsee, A. E. Allen, U. Sivaprasad, *Gene Expr.* 7, 321-335 (1999).
3. C. D. Wolfgang, G. Liang, Y. Okamoto, A. E. Allen, T. Hai, *J.Biol.Chem.* 275, 16865-16870 (2000).
4. D. Bohmann et al., *Science* 238, 1386-1392 (1987).
5. A. G. Bassuk, K. P. Barton, R. T. Anandappa, M. M. Lu, J. M. Leiden, *Mol.Med.* 4, 392-401 (1998).
6. O. J. Marshall and V. R. Harley, *Mol.Genet.Metab* 71, 455-462 (2000).
7. W. Huang, U. I. Chung, H. M. Kronenberg, B. de Crombrugghe, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 160-165 (2001).
8. J. Okano et al., *FEBS Lett.* 473, 95-100 (2000).
9. W. S. El Deiry et al., *Cell* 75, 817-825 (1993).
10. G. P. Dotto, *Biochim.Biophys.Acta* 1471, M43-M56 (2000).
11. R. S. Maul and D. D. Chang, *Oncogene* 18, 7838-7841 (1999).
12. J. P. Rouault et al., *EMBO J.* 11, 1663-1670 (1992).
13. J. P. Rouault et al., *Nat.Genet.* 14, 482-486 (1996).
14. M. Fiscella et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 6048-6053 (1997).
15. Z. Zou et al., *J.Biol.Chem.* 275, 6051-6054 (2000).
16. F. E. Domann, J. C. Rice, M. J. Hendrix, B. W. Futscher, *Int.J.Cancer* 85, 805-810 (2000).
17. C. K. Lee, R. Weindruch, T. A. Prolla, *Nat.Genet.* 25, 294-297 (2000).
18. M. Tan, Y. Wang, K. Guan, Y. Sun, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 109-114 (2000).
19. P. X. Li et al., *J.Biol.Chem.* 275, 20127-20135 (2000).
20. Y. P. Dailly, Y. Zhou, T. A. Linkhart, D. J. Baylink, D. D. Strong, *Biochim.Biophys.Acta* 1518, 145-151 (2001).

40 30 20 10

21. G. D. Plowman et al., *Mol.Cell Biol.* 10, 1969-1981 (1990).
22. S. B. Lee et al., *Cell* 98, 663-673 (1999).
23. P. Herrlich et al., *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 910, 106-118 (2000).
24. L. Walker et al., *Stem Cells* 17, 162-171 (1999).
25. X. Chen, J. Bargonetti, C. Prives, *Cancer Res.* 55, 4257-4263 (1995).
26. J. S. de Jong, P. J. van Diest, R. J. Michalides, J. P. Baak, *Mol.Pathol.* 52, 78-83 (1999).
27. A. M. Babic, M. L. Kireeva, T. V. Kolesnikova, L. F. Lau, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6355-6360 (1998).
28. B. D. Chang et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4291-4296 (2000).
29. M. Hiraiwa, E. M. Taylor, W. M. Campana, S. J. Darin, J. S. O'Brien, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4778-4781 (1997).
30. P. P. Mathur et al., *Biochem.Mol.Biol.Int.* 34, 1063-1071 (1994).
31. T. H. Shin, A. J. Paterson, J. E. Kudlow, *Mol.Cell Biol.* 15, 4694-4701 (1995).
32. V. Kumar, S. A. Bustin, I. A. McKay, *Cell Biol.Int.* 19, 373-388 (1995).
33. H. Tanimoto et al., *Cancer* 86, 2074-2082 (1999).
34. A. Anisowicz, G. Sotiropoulou, G. Stenman, S. C. Mok, R. Sager, *Mol.Med.* 2, 624-636 (1996).
35. H. Tanimoto, L. J. Underwood, K. Shigemasa, T. H. Parmley, T. J. O'Brien, *Tumour.Biol.* 22, 11-18 (2001).
36. D. F. Jarrard et al., *Clin.Cancer Res.* 3, 2121-2128 (1997).
37. A. Hiraki et al., *Br.J.Cancer* 73, 1491-1497 (1996).
38. D. H. Ly, D. J. Lockhart, R. A. Lerner, P. G. Schultz, *Science* 287, 2486-2492 (2000).
39. T. Sasaki, C. Brakebusch, J. Engel, R. Timpl, *EMBO J.* 17, 1606-1613 (1998).
40. F. Echtermeyer et al., *J.Clin.Invest* 107, R9-R14 (2001).
41. F. Sekiya, Y. S. Bae, D. Y. Jhon, S. C. Hwang, S. G. Rhee, *J.Biol.Chem.* 274, 13900-13907 (1999).
42. E. Shtivelman, F. E. Cohen, J. M. Bishop, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5472-5476 (1992).
43. M. Fogel et al., *Cancer Lett.* 143, 87-94 (1999).
44. J. C. Edwards, *Am.J.Physiol* 276, F398-F408 (1999).
45. J. Guo and G. C. Sen, *J.Virol.* 74, 1892-1899 (2000).
46. E. Oda et al., *Science* 288, 1053-1058 (2000).
47. M. Muller et al., *J.Exp.Med.* 188, 2033-2045 (1998).
48. C. Caulin, C. F. Ware, T. M. Magin, R. G. Oshima, *J.Cell Biol.* 149, 17-22 (2000).
49. T. Mukhopadhyay and J. A. Roth, *Anticancer Res.* 16, 105-112 (1996).
50. M. Bossolasco, M. Lebel, N. Lemieux, A. M. Mes-Masson, *Mol.Carcinog.* 26, 189-200 (1999).
51. R. Vidal et al., *Nature* 399, 776-781 (1999).

【0100】

表3.

ＰＣＲ増幅プライマー配列

遺伝子	センス（５’－３’）	配列番号	アンチセンス（５’－３’）	配列番号
AIK1	TGGAATATGCACCACTTGGA	1	TTCTCTGAGCATTGGCCTCT	63
AIK2 (AIM1)	TGGGACACCCGACATCTTA	2	GCTCTTCTGCAGCTCCTTGTA	64
APRIL	TGCCCCAGCTTACCTACTTG	3	AATCCATGAGCAGTCCAACC	65
BRCA1	AAGACAGAGCCCCAGAGTCA	4	GACCTTGGTGGTTTCTTCCA	66
BUBR1	GAAGCCGAGCTATTGACCAG	5	GCCTGTGATAATGGCATCCT	67
CDC2	AAGCCGGGATCTACCATACC	6	GGCCAAAATCAGCCAGTTTA	68
CDC20	GAGGTGCAGCTATGGGATGT	7	TGTAATGGGGAGACCAGAGG	69
CDC47	CGACAGGTGGTACAGGGTTT	8	CAGCCATCTTGTCGAACTCA	70
CENP-E	GTTGATCTTGCAGGCAGTGA	9	TCACCAGCATCCGTGTTAAG	71
コンデンシンH **(XCAP-H)**	ACGACACCTCCAACTTTTGC	10	CCGCTAAGCATCTTCTCGTC	72
GRCC8	CAGGTGTTTTCCAAGGAGGA	11	GCTGTGAGTCCCAGTTTGGT	73
HEX1 (RAD2)	ACTGCGTGGGATTGGATTAG	12	TCTTGAATGGGCAGGCATAG	74
HFH-11B (MPP2, Trident)	TTCACAGCATCATCACAGCA	13	TCGAAGGCTCCTCAACCTTA	75
HMG1	AGGGAGTTGTCAAGGCTGAA	14	CTGTGCCCAAACAAGAACCT	76
HPV 16E1-BP (TRIP13)	GACTCACAGCCCATCGATTT	15	CACCAGGGCGTCTTTATCAT	77
Ki67	CAGACTCCATGTGCCTGAGA	16	CCCTGGAGAACATAGGCAAA	78
KIAA0008	GCCAAGGGCAATGAAAACTA	17	ACCTGCTTTGCTGCTTGAGT	79
KIAA0101	CTGAAGAGGCAGGAAGCAGT	18	TGGCACCATTCCAATAATCA	80
KIAA0166 (rod)	GCAGCTCAAAGTCCACATCA	19	GGCCTTGCCCTCTTTAGAAT	81
MAD2	TGGCCGAGTTCTTCTCATTC	20	CGCACTTCCTCAGAATTGGT	82

遺伝子	センス（５’－３’）	配列番号	アンチセンス（５’－３’）	配列番号
ペリセントリン	CAGCCAGGTCTCCATTTTGT	21	AGCTTCGTCTCCCAGCATAA	83
PLK1	AAGAGATCCCGGAGGTCCTA	22	TCCCACACAGGGTCTTCTTC	84
リボヌクレオチドリダクターゼ Ｍ１	ACCAGCAAAGATGAGGTTGC	23	GCATCGGGGCAATAAGTAAA	85
STEAP	GCCCTTCAGAACTTCAGCAC	24	GCTCAATCCAGGCATCTTCT	86
サービビン	GGACCACCGCATCTCTACAT	25	CTGGTGCCACTTTCAAGACA	87
トポイソメラーゼＩＩａ	AGGTGGTCGAAATGGCTATG	26	CACTTCCCACCTGTGGTTTAC	88
ZWint (MPP5)	CAGAACCAGTGGCAGCTACA	27	AATGATGGTTGGGAGGTGAG	89
アンフィレギュリン	CATTATGCTGCTGGATTGGA	28	TCATGGACTTTTCCCCACAC	90
APR (NOXA)	CCGGCAGAAACTTCTGAATC	29	GTGCTGAGTTGGCACTGAAA	91
ATF3	GCTGGAATCAGTCACTGTCA	30	GCCTTCAGTTCAGCATTCAC	92
bAPP	CTCGTTCCTGACAAGTGCAA	31	TGTTCAGAGCACACCTCTCG	93
BRI	AGAAGAGCCTGGTGTTGGTG	32	GCAAATAGGTTCCAGCCTTG	94
BTG1	CCGTGTCCTTCATCTCCAAG	33	TCCATAATCCATCCCCAAGA	95
BTG2	AACAGGCCACCACATACCTC	34	CTCTGCCCAGGACCTCATTA	96
カルパインＬ２	GCAGGGATCTTTCACTTCCA	35	AGCTTGGGCAGTTGTCATTC	97
CD44	CTGCCGCTTTGCAGGTGTAT	36	TAGCAGGGATTCTGTCTGTG	98
C-JUN	ATGAGGAACCGCATCGCTGCCT	37	GACCAAGTCCTTCCCACTCGTG	99
サイクリンＤ１	AGGTCTGCGAGGAACAGAAG	38	AGCGTGTGAGGCGGTAGTAG	100
CYR61	GAAAGTTTCCAGCCCAACTG	39	TACACTGGCTGTCCACAAGG	101
ELF-1	TGTGGATCTAAGGGGAATGC	40	TCTTGCACCTGCTGTGTTTC	102
EPLIN b	AGAAAGGGGACCCTGACTGT	41	AAGATCCTCACCGTCCTTGA	103
FAS (APO-1)	ATTGCTCAACAACCATGCTG	42	GTTGCTGGTGAGTGTGCATT	104
IGFBP-6	AACCGCAGAGACCAACAGAG	43	GACCCCAAGCACAGCTTTAT	105
インテグリンｂ４	GTGACTGTCCCCTCAGCAAT	44	CAGCAGGCACAGTACTTCCA	106
ジャグド－１	TGCCTCTGTGAGACCAACTG	45	TCACAATTCTGACCCATCCA	107
ケラチン１８	CAGCATGAGCTTCACCACTC	46	CTCCTTCTCGTTCTGGATGC	108
LRP	AGATCATTCAGGCCACCATC	47	CCGACAGCACATACACATCC	109

遺伝子	センス（5’－3’）	配列番号	アンチセンス（5’－3’）	配列番号
MAC2-BP	ACCATGAGTGTGGATGCTGA	48	ACAGGGACAGGTTGAACTGC	110
マスピン	CCCTATGCAAAGGAATTGGA	49	CAAGCCTGTGGACTCATCCT	111
MBLL	TCCTGTTCCTTGGATTGGAC	50	AAAGTGGGCACTGGATGAAG	112
MIC-1	CGGATACTCACGCCAGAAGT	51	CACATGGTCACTTGCACCTC	113
p21WAF	GGAAGACCATGTGGACCTGT	52	ATGCCCAGCACTCTTAGGAA	114
Ｐ-カドヘリン	GTGACAGCCACAGATGAGGA	53	TTTGGCCTCAAAATCCAAAC	115
プロサポシン	CCAGAGCTGGACATGACTGA	54	GTCACCTCCTTCACCAGGAA	116
ＰＲＳＳ６（カリクレイン７）	ATGGCAAGATCCCTTCTCCT	55	GGTCAGAGGGAAAGGTCACA	117
ＰＲＳＳ９（ニューロシン）	GGGGTCCTTATCCATCCACT	56	GGGATGTTACCCCATGACAC	118
RNF3	AGACATCAAGGGGGAGACCT	57	CACCCAGAGGCAATGTTCTT	119
SOX-9	GGTTGTTGGAGCTTTCCTCA	58	TAGCCTCCCTCACTCCAAGA	120
シンデカン４	TCGATCCGAGAGACTGAGGT	59	GGTTTCTTGCCCAGGTCATA	121
TGFa	CAGGTCCGAAAACACTGTGA	60	AATTCTGTTGTGGGGAGGTG	122
WIP1	CGACCTCGACTCACTCACAA	61	ATGGGGAAGGAGTCATCACA	123
XBP-1	TAGCAGCTCAGACTGCCAGA	62	ACTGGGTCCAAGTTGTCCAG	124

【図面の簡単な説明】

【０１０１】

【図１】図１Ａは、ドキソルビシン処理したＨＣＴ１１６細胞の増殖および増殖停止分画についての蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）のプロファイルである。ドキソルビシンからの解放後の表示された日のＰＫＨ２蛍光に基づいて細胞を分類する。増殖細胞のＰＫＨ２^{lo}集団は第４日に出現し、そして第６日までにＰＫＨ２^{hi}（増殖停止）集団から分離する。図１Ｂは、ＤＮＡ含量に基づいて分離された、ドキソルビシン処理したＨＣＴ１１６細胞の増殖および増殖停止分画についてのＦＡＣＳプロファイルである。指数関数的に増殖するＨＣＴ１１６細胞はＧ１にてピークを有するが、薬物処理の９日後に単離されたＰＫＨ２^{hi}集団はＧ２／Ｍにてピークを有する。図１Ｃは、薬物からの解放後６日に分離されたＰＫＨ２^{hi}およびＰＫＨ２^{lo}集団のＳＡ－β－ｇａｌ染色を示す写真である。双方のパネルは、同一の２００×の倍率で撮影されている。図１Ｄは、薬物処理後９日に分離され、そして１０ｃｍプレートあたり１０，０００個の生存（ＰＩ陰性）細胞で播種された、ＰＫＨ２^{hi}およびＰＫＨ２^{lo}集団によるコロニー形成を示す写真である。

【図２】図２Ａおよび図２Ｂは、表示された老化関連遺伝子の発現の変化についてのＲＴ－ＰＣＲ分析の写真である。正規化標準としてβ－アクチンを用いた。図２Ａは、ドキソルビシン処理後９日に分離されたＨＣＴ１１６細胞の増殖（ＰＫＨ２^{lo}）および老化（ＰＫＨ２^{hi}）集団の遺伝子発現の比較を示す。図２Ｂは、２００ｎＭドキソルビシンでの処理の前および２４時間後、および薬物からの解放後の表示された日の、野生型、ｐ２１－／－およびｐ５３－／－　ＨＣＴ１１６細胞の分類されていない集団の遺伝子発現の比較である。その発現における変化が後日検出可能になるか、または野生型細胞においてと比較してｐ５３－／－もしくはｐ２１－／－系においてはあまり顕著でなかった場合には、遺伝子をｐ５３－またはｐ２１－依存性と称した。

【図３】図３Ａおよび図３Ｂは、ｐ５３と薬物誘導性の老化において発現の変化を示す遺伝子の表示されたタンパク質産物とにおける変化についての免疫ブロッティング分析の写真である。正規化標準としてβ－アクチンを用いた。図３Ａは、未処置か、２００ｎＭドキソルビシンで２日間処理したか、またはドキソルビシン処理後９日に増殖（ＰＫＨ２^{lo}）および老化（ＰＫＨ２^{hi}）細胞集団に分類された、野生型ＨＣＴ１１６細胞の免疫ブロッティングの結果を示す。図３Ｂは、表示された日数ドキソルビシンで処理された野生型、ｐ２１－／－およびｐ５３－／－　ＨＣＴ１１６細胞系の免疫ブロッティング分析による、ドキソルビシン処理ＨＣＴ１１６細胞におけるｐ２１誘導のｐ５３依存性を示す。

【図１】

FIG. 1A

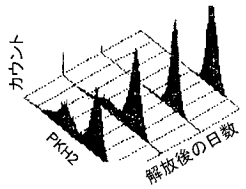


FIG. 1B

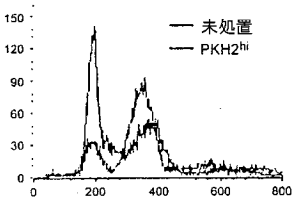
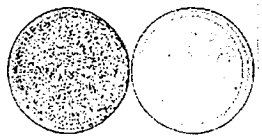


FIG. 1C

FIG. 1D

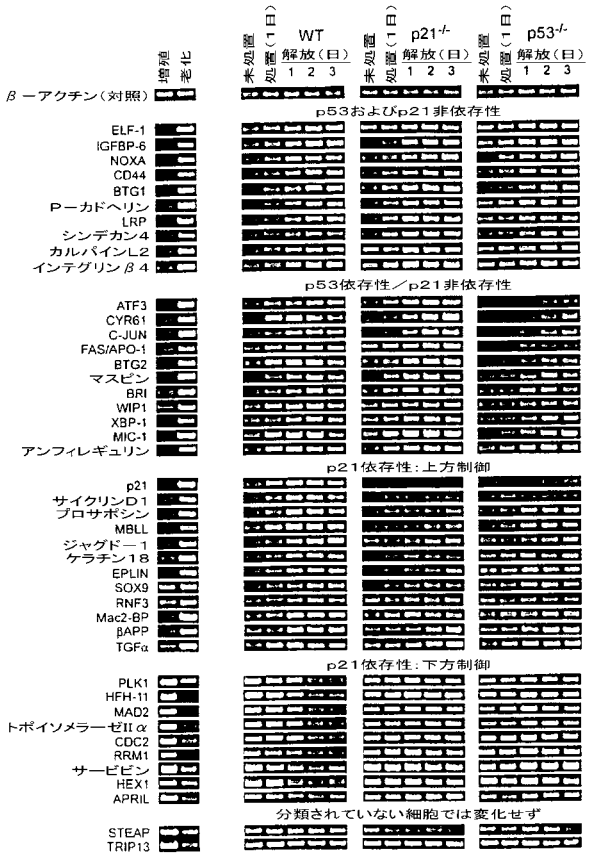


増殖 (PKH2lo)　　増殖停止 (PKH2hi)

【図２】

FIG. 2A

FIG. 2B



【図３】

FIG. 3A

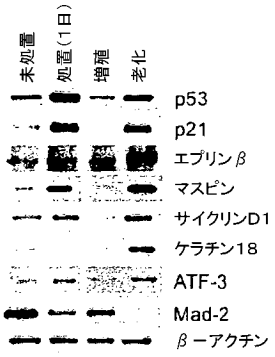
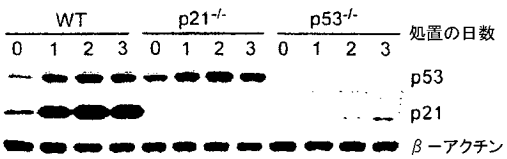


FIG. 3B



【配列表】
2009077714000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成20年10月16日(2008.10.16)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状の処置の有効性を評価するための方法であって、
（ａ）処理前および処理後の異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を有する動物に由来する細胞を含む生物学的サンプルを入手するステップ；
（ｂ）処置後の表１、２Ａまたは２Ｂの少なくとも１つの遺伝子の発現を、処置前の前記遺伝子の発現と比較するステップ；並びに
（ｃ）表２Ａおよび２Ｂの少なくとも１つの遺伝子が処置前よりも処置後に高いか、あるいは表１の少なくとも１つの遺伝子の発現が処置前よりも処置後に低い場合に、前記処置が異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を処置するための有効性を有していると決定するステップ；
を含む方法。
【請求項２】
前記生物学的サンプルが腫瘍細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記遺伝子が表２Ａの細胞遺伝子である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
少なくとも１つの細胞遺伝子がＢＴＧ１、ＢＴＧ２、ＥＰＬＩＮ、ＷＩＰ１、マスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記遺伝子が表１の細胞遺伝子である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記細胞遺伝子がＨＦＨ－１１、ＳＴＥＡＰ、ＲＨＡＭＭ、ＩＮＳＩＧ１、ＬＲＰＲ１である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
表１、２Ａまたは２Ｂの細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
表１、２Ａまたは２Ｂの細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
表１、２Ａまたは２Ｂの細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
異常細胞増殖または腫瘍細胞増殖に関連する疾患または症状を処置するための方法であって、異常増殖細胞または腫瘍細胞において老化を誘導する、治療有効量の化合物を前記疾患または症状を有する動物に投与するステップを含む、前記方法。
【請求項１１】
化合物が非レチノイド化合物である、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】
細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導を抑制する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）細胞増殖を抑制する濃度の細胞毒性物質と細胞を接触させるステップ；
（ｂ）細胞が老化するときに誘導される細胞遺伝子の発現における変化に関して化合物の存在下および不存在下で細胞をアッセイするステップ；並びに
（ｃ）ステップ（ｂ）の細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下で誘導されるが、化合物の存在下で誘導されない場合に、細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導の抑制因子として化合物を同定するステップ；
を含む方法。
【請求項１３】
前記細胞遺伝子がサイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパイン－Ｌ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ　ウロキナーゼ、アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、または膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１６】
細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
前記哺乳動物細胞がｐ５３欠損細胞である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１８】
前記哺乳動物細胞が腫瘍細胞である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１９】
細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導を抑制する化合物を同定するための方法であって、
（ａ）レポーター遺伝子に作動可能に連結された、サイクリンＤ１、血清誘導性キナーゼ、ＣＹＲ６１、プロサポシン、形質転換増殖因子α（ＴＧＦα）、カリクレイン７、カルパイン－Ｌ２、ニューロシン、プラスミノーゲンアクチベータ　ウロキナーゼ、アミロイドβ（Ａ４）前駆体タンパク質（βＡＰＰ）、または膜内在性タンパク質２Ｂ（ＢＲＩ／ＩＴＭ２Ｂ）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を前記哺乳動物細胞に導入することにより、組換え哺乳動物細胞を作製するステップ
（ｂ）細胞増殖を抑制する濃度の細胞毒性物質に細胞を接触させるステップ；
（ｃ）化合物の不存在下の組換え細胞における前記レポーター遺伝子の発現と、化合物の存在下での前記組換え細胞におけるレポーター遺伝子の発現をアッセイするステップ；
（ｄ）ステップ（ｃ）の細胞遺伝子の発現が化合物の不存在下で誘導されるが、化合物の存在下で誘導されない場合に、細胞遺伝子発現の老化に関連する誘導の抑制因子として化合物を同定するステップ；
を含む方法。
【請求項２０】
細胞遺伝子の発現が相補的核酸へのハイブリダイゼーションにより検出される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
細胞遺伝子の発現が免疫学的試薬の使用により検出される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】

細胞遺伝子の発現が細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
細胞老化を誘導する化合物で処置された動物において処置の有効性を決定するための方法であって、
（ａ）老化マーカーに関して処理前および後の動物からの生物学的液体をアッセイするステップ；並びに
（ｂ）処理後に検出されるマーカーの量が処理前に検出されるマーカーの量よりも多い場合に、処理が有効であることを決定するステップ；
を含む方法。
【請求項２４】
老化マーカーがマスピン、ＭＩＣ－１、ＩＧＦＢＰ－６またはアンフィレギュリンである、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
体液が血液、尿、滲出液、腹水、唾液、脳脊髄液、頸管分泌物、膣分泌物、子宮内膜分泌物、消化管分泌物、気管支分泌物、痰、または乳房からの分泌物もしくは洗浄液である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
老化マーカーが、相補的核酸へのハイブリダイゼーション、免疫学的試薬の使用、または細胞遺伝子産物の活性をアッセイすることにより検出される、請求項２３に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(72)発明者 チャン、 ベイーディー
アメリカ合衆国 ６０１４８ イリノイ州 ロンバード カンブリア レーン １１１６

Ｆターム(参考) 4B024 AA12 BA03 BA08 BA14 BA15 BA16 CA02 DA03 EA04 GA11 HA14
4B063 QA18 QQ03 QQ08 QQ13 QQ22 QQ27 QQ36 QQ43 QQ49 QQ79 QR02 QR07 QR16 QR32 QR48 QR66 QR72 QR77 QR80 QX02
4C084 AA17 NA14 ZB261

【外国語明細書】

TITLE OF THE INVENTION

REAGENTS AND METHODS FOR IDENTIFYING AND MODULATING EXPRESSION OF TUMOR SENESCENCE GENES

BACKGROUND OF THE INVENTION

This application was supported by a grant from the National Institutes of Health, No. _____. The government may have certain rights in this invention.

1. Field Of The Invention

This invention is related to changes in cellular gene expression and compounds that produce changes in cellular gene expression. In particular, the invention is related to the identification of genes the expression of which is associated with the development of senescence in mammalian tumor cells upon treatment with cytotoxic agents, including chemotherapeutic drugs, such as doxorubicin, and ionizing radiation. More specifically, the invention provides methods for identifying compounds that modulate expression of these cellular genes. The invention also provides reagents that are recombinant mammalian cells containing recombinant expression constructs that express a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a senescence-associated gene expression, and methods for using such cells for identifying compounds that modulate expression of these cellular genes and produce senescence in said cells. Compounds identified using the methods of the invention are provided for use in therapeutic methods for treating diseases and disorders relating to abnormal cellular proliferation or neoplastic cell growth. Diagnostic methods, particularly methods for monitoring the efficacy of anticancer treatment regimes, are also provided by this invention.

2. Summary Of The Related Art

Cancer remains one of the leading causes of death in the United States. Current treatment for cancer includes chemotherapy and radiation, but these treatments are not invariably cytotoxic to all tumor cells. Some of the cells that survive treatment recover and resume proliferation, while others undergo permanent growth arrest. Irreversible proliferation arrest in tumor cells treated with anticancer agents may result from cell death or permanent growth arrest. Although the mechanism of damage-induced cell death is a subject of active investigation, little is known about the determinants of

terminal growth arrest in tumor cells.

Exposure of different tumor cell lines to various anticancer agents *in vitro* and *in vivo* induces long-term growth arrest with phenotypic features of cell senescence, such as cell enlargement, increased adhesion and granularity, and senescence-associated β-galactosidase activity (SA-β-gal; Chang *et al.*, 1999a, *Cancer Res.* 59: 3761-3767). Induction of the senescent phenotype in treated tumor cells has been observed in cells treated with a variety of cytotoxic agents, such as doxorubicin, aphidicolin, cisplatin, ionizing radiation, cytarabine, etoposide or taxol; this response is detectable in treated tumor cells even at the lowest concentration of a cytotoxic agent that produces detectable growth inhibition (Chang *et al.*, 1999a, *ibid.*). Senescence of tumor cells can be produced upon treatment not only with cytotoxic agents but also with vitamin A derivatives, retinoids, under conditions that produce growth inhibition with only minimal cytotoxicity (Chang *et al.*, 1999a, *ibid.*). Retinoid-induced senescence in breast carcinoma cells is associated with co-induction of several growth-inhibitory genes, as described in Dokmanovic *et al.* (2002, *Cancer Biol. Ther.* 1: 16-19) and in co-owned and co-pending U.S. Serial No. 09/865,879, filed May 25, 2001, incorporated by reference herein. Tumor cells can also be induced to undergo senescence through ectopic expression of tumor suppressors (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) or oncogene inhibition. For example, inhibition of papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in cervical carcinoma cell lines was found to induce senescence-like growth arrest in almost 100% of cells (Goodwin, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10978-10983). Activation of the senescence program in tumor cells appears therefore to be a feasible biological approach to cancer therapy.

There remains a need in the art to identify genes that are induced when a cell, particularly a tumor cell, becomes senescent, both as markers for the senescence phenotype and as targets for inducing senescence in said cells. There is also a need in the art to identify cells, particularly tumor cells that have become senescent in response to treatment, particularly anticancer treatment, to assess the efficacy of such treatment. There is further a need in the art to identify compounds that induce senescence in mammalian cells, particularly tumor cells, as a way to improve treatment of proliferative disorders such as cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides genes that are induced or repressed in senescent cells and arise upon treatment with cytotoxic agents, as well as reagents and methods for identifying compounds that induce or repress such genes. The invention also advantageously provides compounds that mimic the effects of cytotoxic agents in inhibiting the growth of tumor cells without producing toxicity associated with these agents. Most preferably the mimicked effect is induction of senescence in mammalian tumor cells.

In a first aspect, the invention provides a method for identifying a compound that induces senescence in a mammalian cell. In one embodiment, the method comprises the steps of culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound; assaying expression of at least one cellular gene set forth in Table 2A in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound; and identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 2A is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound.. In a preferred embodiment, the mammalian cell is a p53 deficient cell. In other preferred embodiments, the mammalian cell is a tumor cell. Preferably, the cellular gene is a human gene, most preferably BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin. Expression of cellular genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

In alternative embodiments, the mammalian cell is a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 2A. In these embodiments, induction of at least one of the cellular genes in Table 2A is assayed using the recombinant mammalian cell and increased expression of the reporter gene detected in the presence and absence of the compound. In further preferred embodiments, the method comprises the additional steps of assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of one or more genes in Table 2B; and identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

Expression of reporter genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the reporter gene product.

In additional embodiments of the first aspect of the invention, the method for identifying a compound that induces senescence in a mammalian cell comprises the steps of culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound; assaying expression of at least one cellular gene set forth in Table 2A in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound; assaying the recombinant mammalian cell for cell growth and morphological features of senescence; and identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 2A is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound and the cells are growth-inhibited and express morphological features of senescence in the presence of the compound. In a preferred embodiment, the mammalian cell is a p53 deficient cell. In other preferred embodiments, the mammalian cell is a tumor cell. Preferably, the cellular gene is a human gene, most preferably BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin. Expression of cellular genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

In alternative embodiments, the mammalian cell is a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 2A. In these embodiments, induction of at least one of the cellular genes in Table 2A is assayed using the recombinant mammalian cell and increased expression of the reporter gene detected in the presence and absence of the compound. In further preferred embodiments, the method comprises the additional steps of assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of one or more genes in Table 2B; and identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound. Expression of reporter genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the reporter gene product.

In a second aspect, the invention provides a method for identifying a compound that induces senescence in a mammalian cell. In one embodiment, the method comprises the steps of culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound; assaying expression of at least one cellular gene set forth in Table 1 in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound; and identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 1 is lower in the presence of the compound than in the absence of the compound. In a preferred embodiment, the mammalian cell is a p53 deficient cell. In other preferred embodiments, the mammalian cell is a tumor cell. Preferably, the cellular gene is a human gene, most preferably HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1. Expression of cellular genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

In alternative embodiments, the mammalian cell is a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 1. In these embodiments, induction of at least one of the cellular genes in Table 1 is assayed using the recombinant mammalian cell and decreased expression of the reporter gene detected in the presence and absence of the compound. In further preferred embodiments, the method comprises the additional steps of assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of one or more genes in Table 2B; and identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound. Expression of reporter genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the reporter gene product.

In additional embodiments of the second aspect of the invention, the method for identifying a compound that induces senescence in a mammalian cell comprises the steps of culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound; assaying expression of at least one cellular gene set forth in Table 1 in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound; assaying the recombinant mammalian cell for cell growth and morphological features of senescence; and identifying compounds that induce senescence when expression of at

least one cellular gene in Table 1 is lower in the presence of the compound than in the absence of the compound and the cells are growth-inhibited and express morphological features of senescence in the presence of the compound. In a preferred embodiment, the mammalian cell is a p53 deficient cell. In other preferred embodiments, the mammalian cell is a tumor cell. Preferably, the cellular gene is a human gene, most preferably HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1. Expression of cellular genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

In alternative embodiments, the mammalian cell is a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 1. In these embodiments, inhibition of at least one of the cellular genes in Table 1 is assayed using the recombinant mammalian cell and decreased expression of the reporter gene detected in the presence and absence of the compound. In further preferred embodiments, the method comprises the additional steps of assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of one or more genes in Table 2B; and identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound. Expression of reporter genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the reporter gene product.

In a third aspect, the invention provides compounds produced according to the methods of the invention, most preferably embodiments of the methods of the invention whereby the method comprises the additional steps of assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of one or more genes in Table 2B; and identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

The invention in a fourth aspect provides a method for assessing efficacy of a treatment of a disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth. The method comprises the steps of: obtaining a biological sample comprising cells from an animal having a disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth before treatment and after treatment; comparing expression of at least one gene in Table 1, 2A or 2B after treatment with expression of

said genes before treatment; and determining that said treatment has efficacy for treating the disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth if expression of at least one gene in Table 2A and 2B is higher after treatment than before treatment or expression of at least one gene in Table 1 is lower after treatment than before treatment. In preferred embodiments, the biological sample comprises tumor cells. Preferably, the gene is a cellular gene in Table 2A, most preferably whercin at least one cellular gene is a human gene that is BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin. In alternative preferred embodiments, the gene is a cellular gene in Table 1, most preferably a human gene that is HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, and LRPR1. Expression of cellular genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

In a fifth aspect, the invention provides a method for treating a disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth, most preferably cancer. The method of the invention comprises the steps of administering to an animal having said disease or condition a therapeutically effective amount of a compound produced according to the inventive methods of the invention, most preferably embodiments of the methods of the invention whereby the method comprises the additional steps of assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of one or more genes in Table 2B; and identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

In an additional aspect, the invention provides methods for detecting secreted proteins produced in senescent cells. In particular, the invention in this aspect provides diagnostic methods for determining, *inter alia*, whether a treatment that induces senescence in cells, preferably tumor cells, is effective. In preferred embodiments, detection assays as provided by the invention are performed on a bodily fluid, such as blood, urine, effusions, ascitic fluid, saliva, cerebrospinal fluid, cervical secretions, vaginal secretions, endometrial secretions, gastrointestinal secretions, bronchial secretions, sputum, or secretions or washings from the breast. Preferred secreted proteins assayed in this aspect of the invention include maspin, MIC-1, IGFBP-6, and amphiregulin.

In a sixth aspect, the invention provides methods for identifying a compound that inhibits senescence-associated induction of cellular gene expression. In preferred embodiments of this aspect, the method comprises the steps of contacting the cell with a cytotoxic agent at a concentration of said agent that inhibits cell growth; assaying the cell in the presence and absence of the compound for changes in expression of cellular genes induced when cells become senescent; and identifying the compound as an inhibitor of senescence-associated induction of cellular gene expression if expression of the above cellular genes is induced in the absence of the compound but is not induced in the presence of the compound. In preferred embodiments, the cellular gene is a human gene that is cyclin D1, serum-inducible kinase, CYR61, prosaposin, transforming growth factor α (TGFα), kallikrein 7, calpain-L2, neurosin, plasminogen activator, urokinase, amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP), or integral membrane protein 2B (BRI/ITM2B). In a preferred embodiment, the mammalian cell is a p53 deficient cell. In other preferred embodiments, the mammalian cell is a tumor cell. Expression of cellular genes according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

In alternative embodiments, the mammalian cell is a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a human gene that is cyclin D1, serum-inducible kinase, CYR61, prosaposin, transforming growth factor α (TGFα), kallikrein 7, calpain-L2, neurosin, plasminogen activator, urokinase, amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP), or integral membrane protein 2B (BRI/ITM2B). In these embodiments, the method comprises the steps of contacting the mammalian cell with a cytotoxic agent at a concentration of said agent that inhibits cell growth; assaying the mammalian cell in the presence and absence of the test compound for expression of the reporter gene; and identifying compounds wherein expression of the reporter gene is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound. Expression of the reporter gene according to the method is preferably detected by hybridization to a complementary nucleic acid, by using an immunological reagent or by assaying for an activity of the reporter gene product.

The invention also provides methods for monitoring the efficacy of treatment. In these embodiments, tumor cells that have become senescent and are no longer able to

grow are identified and distinguished from tumor cells that recover and proliferate after treatment. Senescence marker detection in biopsy samples from tumors obtained after patient treatment is used as an indicator of treatment response.

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 1A is a fluorescence-activated cell sorting (FACS) profile of proliferating and growth-arrested fractions of doxorubicin-treated HCT116 cells. Cells are sorted based on PKH2 fluorescence on the indicated days after release from doxorubicin. $PKH2^{lo}$ population of proliferating cells appears on day 4 and separates from the $PKH2^{hi}$ (growth-arrested) population by day 6.

Figure 1B is a FACS profile of proliferating and growth-arrested fractions of doxorubicin-treated HCT116 cells separated on the basis of DNA content. Exponentially growing HCT116 cells have a peak at G1, while the $PKH2^{hi}$ population isolated 9 days after drug treatment has a peak at G2/M.

Figure 1C is a photograph showing SA-β-gal staining of $PKH2^{hi}$ and $PKH2^{lo}$ populations, separated 6 days after release from the drug. Both panels are photographed at the same 200x magnification.

Figure 1D is a photograph showing colony formation by $PKH2^{hi}$ and $PKH2^{lo}$ populations, separated 9 days after drug treatment and plated at 10,000 live (PI-negative) cells per 10-cm plate.

Figures 2A and 2B are photographs of RT-PCR analysis of changes in the expression of the indicated senescence-associated genes. β-actin was used as a normalization standard. Figure 2A shows a comparison of gene expression in proliferating ($PKH2^{lo}$) and senescent ($PKH2^{hi}$) populations of HCT116 cells, separated 9 days after doxorubicin treatment. Figure 2B is a comparison of gene expression in the

unsorted populations of wild-type, p21-/- and p53-/- HCT116 cells, before and after 24-hr treatment with 200 nM doxorubicin, and on the indicated days after release from the drug. Genes were designated as p53- or p21-dependent if changes in their expression became detectable at a later day or were less pronounced in the p53-/- or p21-/- lines than in the wild-type cells.

Figures 3A and 3B are photographs of immunoblotting analysis of changes in p53 and the indicated protein products of genes that show altered expression in drug-induced senescence. β-actin was used as a normalization standard. Figure 3A shows the results of immunoblotting of wild type HCT116 cells that were either untreated, treated for two days with 200 nM doxorubicin, or sorted into proliferating ($PKH2^{lo}$) and senescent ($PKH2^{hi}$) cell populations 9 days after doxorubicin treatment. Figure 3B shows the p53 dependence of p21 induction in doxorubicin-treated HCT116 cells, through immunoblotting analysis of the wild type, p21-/- and p53-/- HCT116 cell lines treated with doxorubicin for the indicated number of days.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

This invention provides genes the expression of which is modulated in cells that become senescent upon treatment with cytotoxic agents. The invention also provides methods for identifying compounds that mimic the gene expression modulating properties of cytotoxic agents but lack toxicity that is characteristic of chemotherapeutic drug treatment, as well as the compounds identified by the methods. Diagnostic and therapeutic treatment methods are provided as set forth more particularly herein.

For the purposes of this invention, the term "senescence" will be understood to 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 is also characterized by certain morphological features, including increased size, flattened morphology increased granularity, and senescence-associated β-galactosidase activity (SA-β-gal).

As used herein, the term "senescence-associated gene" is intended to encompass genes the expression of which is modulated (either induced or repressed) when a cell expresses a senescent phenotype, particularly a senescence phenotype produced by contacting the cells with a cytotoxic agent. Most preferably, the term will be understood to refer to the genes disclosed herein, *inter alia*, in Tables 1 and 2.

Senescence can be conveniently induced in mammalian cells by contacting the cells with a dose of a cytotoxic agent that inhibits cell growth (as disclosed in Chang *et al.*, 1999a, *ibid.*). Cell growth is determined by comparing the number of cells cultured in the presence and absence of the agent and detecting growth inhibition when there are fewer cells in the presence of the agent than in the absence of the agent after an equivalent culture period of time Examples of such cytotoxic agents include but are not limited to doxorubicin, aphidicolin, cisplatin, cytarabine, etoposide, taxol and ionizing radiation. Appropriate dosages will vary with different cell types; the determination of the dose that induces senescence is within the skill of one having ordinary skill in the art, as disclosed in Chang *et al.*, 1999a, *ibid.*

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, as well as biological samples obtained, *inter alia*, from tumor specimens *in vivo*.

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 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 assayed simultaneously within the scope of this invention.

The methods of the invention can be practiced using any mammalian cell, preferably a rodent or primate cell, most preferably a human cell that can develop a senescence phenotype in response to a cytotoxic agent. Preferred cells include mammalian cells, preferably rodent or primate cells, and most preferably human cells. In certain embodiments, most preferred cells are p53 deficient cells, that are cells expressing

less than the normal amount or less than the normal functional activity of tumor suppressor p53 as the result of mutation, deletion, recombination, chromosome loss or genetic manipulation.

In certain embodiments, the methods of the invention are advantageously practiced using recombinant mammalian cells comprising a recombinant expression construct encoding a reporter gene operably linked to a promoter from a gene that is induced in senescent cells. Preferred reporter genes comprising said constructs include firefly luciferase, chloramphenicol acetyltransferase, beta-galactosidase, green fluorescent protein (GFP), alkaline phosphatase and most particularly a commercially-available GFP-luciferase fusion gene. Most preferred promoters comprising the recombinant expression constructs of the invention are promoters from a cellular gene known to be induced in senescent cells. The cellular gene promoter is advantageously from a gene identified in Table 2A herein. In more preferred embodiments, the cellular promoter is from BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin. In alternative embodiments, the cellular gene promoter is from a gene that is repressed in senescent cells. Preferred promoters of this type include promoters is from a gene identified in Table 1 herein. In more preferred embodiments, the cellular promoter is from HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1.

Promoter sequences from some of these genes are known in the art. These include: cyclin D1 (Motokura & Arnold, 1993, *Genes Chromosomes Cancer* 7: 89-95); CYR61 (Latinkic *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19: 3261-7); prosaposin (Sun *et al.*, 1998, *Gene* 218: 23-34); transforming growth factor α (TGFα; Raja *et al.*, 1991, *Mol. Endocrinol.* 5: 514-20); kallikrein 7 (Yousef *et al.*, 2000, *Gene* 254: 119-128); calpain-L2 (Suzuki *et al.*, 1995, *Biol Chem Hoppe Seyler.* 376: 523-9); plasminogen activator urokinase (Riccio *et al.*, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 2759-71); and amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP; Lahiri & Robakis, 1991, *Brain Res. Molec. Brain Res.* 9: 253-257).

For other genes, promoter sequences can be readily isolated from a region of genomic DNA within about 5 kilobases (and more typically within 1 kilobase) upstream of a cDNA encoding the gene. The availability of the complete sequence of the human genome permits the genomic region 5' to any gene to be inspected for consensus promoter sequences, such as AT-rich sequences termed "TATA" boxes, and additional

sequences comprising the sequence "CAAT" that are recognized as mediating the interaction of the nucleic acid of the promoter with protein factors such as RNA polymerase. Putative promoters can be readily tested by inserting the putative promoter sequence upstream from a reporter gene and comparing reporter gene activity in such constructs with activity in constructs without the putative promoter insert.

Recombinant expression constructs can be introduced into appropriate mammalian cells as understood by those with skill in the art, most preferably transfection and electroporation. Preferred embodiments of said constructs are produced in plasmid vectors or other vectors that can be used to easily produce useful quantities of the vector. Alternative embodiments include 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. Cells transiently transfected with the recombinant expression construct and more preferably cells stably transfected with the construct and selected using a selective agent are advantageously used in the practice of certain embodiments of the methods of the invention.

Detection of the senescence response in clinical cancers requires diagnostic markers for senescent cells. The most common senescence marker, SA-β-gal (Dimri *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9363-9367), has two major disadvantages: it represents an enzymatic activity which is preserved only in frozen tissue samples and for a limited period of time, and it is not mechanistically related to growth arrest of senescent cells. The invention provides a number of genes that are upregulated in senescent cells. These proteins provide sensitive diagnostic markers for cytotoxic agent-induced senescence. Of special interest as diagnostic markers are several genes that are upregulated in senescent cells and are functionally related to growth arrest, such as EPLIN, BTG1, BTG2, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 and amphiregulin. Induction of these senescence-associated growth inhibitors is not limited to doxorubicin-treated HCT116 cells; for example EPLIN, a growth-inhibitory protein that was downregulated in 20 of 21 carcinoma cell lines relative to normal epithelial tissues (Maul *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 7838-7841), is strongly induced in MCF-7 breast carcinoma cells by treatment with retinoids, under the conditions that produce senescence-like growth arrest

(Dokmanovic *et al.*, 2002, *Cancer Biol. Ther.* 1: 16-19 and in co-owned and co-pending U.S. Serial No. 09/865,879, filed May 25, 2001, incorporated by reference herein). Retinoid treatment was also shown to induce a secreted growth inhibitor IGFBP-6 (Dailly *et al.*, 2001, *Biochim. Biophys. Acta* 1518: 145-151). Most of the other senescence-associated growth inhibitors have been shown to be induced by DNA damage in a variety of other tumor-derived cell lines, including BTG1 (Cortes *et al.*, 2000, *Mol. Carcinogen.* 27: 57-64), BTG2 (Fletcher *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 14511-14518), WIP1 (Fiscella *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6048-6053), Maspin (Zou *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 6051-6054 and MIC-1 (Komarova *et al.*, *ibid.*). However, none of these studies appreciated the association of these genes with senescence, and the general inducibility of such genes by DNA damage disclosed herein strongly indicates that such genes are broadly applicable markers of damage-induced senescence.

The invention also provides genes the expression of which is downregulated in cytotoxic agent-induced senescence. These genes are useful for detecting senescence in tumor cells in like manner as genes that are induced during senescence, except that senescence will be marked by downregulation of such genes. Several of these genes are of special interest as markers that are downregulated in senescent cells, including HFH-11 (Trident), a transcription factor implicated in cell cycle progression (Ye *et al.*, 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19: 8570-8580), STEAP, a gene overexpressed in different cancers (Hubert *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14523-14528), RHAMM, shown to have oncogenic activity (Hall *et al.*, 1995, *Cell* 82: 19-26) INSIG1, implicated in liver regeneration (Peng *et al.*, 1997, *Genomics* 43: 278-284) and LRPR1 that mediates proliferative response to FSH (Slegtenhorst-Eegdeman *et al.*, 1995, *Mol. Cell. Endocrinol.* 108: 115-24).

Changes in gene expression, either induction or repression and either native genes of reporter gene constructs as disclosed herein, are detected using methods well-established in the art. These include hybridization assays for detecting cellular nucleic acid, most preferably mRNA, said assays including northern hybridization, Southern hybridization, and any of a variety of *in vitro* amplification methods known in the art. Gene expression changes can also be detected using immunological reagents and methods, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other assays using polyclonal or monoclonal antibodies, antibody fragments or recombinant or chimeric

antibodies and such immunological reagents. Activity of specific gene products, most preferably used with reporter gene constructs having known and quantifiable activities and most preferably producing easily-detected products are also advantageous for detecting senescence-associated changes in gene expression.

Elucidation of molecular changes associated with treatment-induced senescence is also advantageous therapeutically. Permanently arresting tumor cell growth through the induction of accelerated senescence is an attractive treatment approach, since this response to drug treatment can be elicited even under the conditions of minimal cytotoxicity. The instant disclosure that drug-induced senescence is associated with concerted induction of multiple antiproliferative genes (some of which also inhibit the growth of neighboring cells) suggests the existence of common regulatory pathways activating such genes. Importantly, most of the growth-inhibitory genes are also induced by doxorubicin treatment in p53-deficient cells. Agents that can be developed to stimulate the induction of senescence-associated growth-inhibitory genes are likely therefore to be efficacious against tumors with or without functional p53.

The obverse side of drug-induced senescence, however, is the induction of genes associated with pathological conditions (such as Alzheimer's disease), as well as proteases and mitogenic, antiapoptotic and angiogenic secreted factors. Expression of such genes by senescent cells may have potentially adverse effects in the short term (growth stimulation of non-senescent tumor cells) and in the long term (increased likelihood of de novo carcinogenesis and age-related diseases). A linkage between cell senescence and carcinogenesis in vivo has been suggested by a recent study of Paradis *et al.* (2001, *Human Pathol.* 32: 327-332), who found that SA-β-gal expression in normal human liver was strongly correlated with the development of hepatocellular carcinoma. Such linkage was also directly demonstrated by Krtolica *et al.* (2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12072-12077), who found that mixing transformed epithelial cells with senescent (but not with pre-senescent) fibroblasts enhances the growth and tumorigenicity of the transformed cells. p21 induction upregulates many disease-associated genes and induces paracrine anti-apoptotic and mitogenic activities (Chang *et al.*, 2000, *ibid.*), and p21 knockout was shown herein to decrease or delay the induction of such genes as prosaposin, TGFα and Alzheimer's βAPP. These observations suggest that p21-

stimulated regulatory pathways may be largely responsible for the expression of disease-associated genes in senescent cells.

The present invention provides methods for identifying compounds that induce senescence in tumor cells without concomitantly inducing expression of said mitogenic, antiapoptotic and angiogenic secreted factors or genes associated with pathological conditions. The existence of such compounds is suggested by the behavior of retinoids, which induce tumor cell senescence through co-activation of several growth-inhibitory genes but not of p21 or other genes associated with pathological conditions (as disclosed in co-owned and co-pending U.S. Serial No. 09/865,879, filed May 25, 2001, incorporated by reference herein and in Dokmanovic *et al.*, 2002, *Cancer Biol. Ther.* 1: 16-19), and the present invention provides methods to identify other compounds dissociated from cytotoxicity or other confounding features of compounds known in the art to produce senescence in tumor cells.

The invention also provides methods for monitoring the efficacy of treatment, by identifying tumor cells that have become senescent and are no longer able to grow and distinguishing said cells from tumor cells that recover and proliferate after treatment. The detection of the markers of senescence in the biopsies of treated tumors can be used as an indicator of treatment response. This type of diagnostics should be useful in many clinical situations, including for example as a biopsy test to evaluate the success of radiation therapy that may potentially require several months or even years for complete response (*see* Cox *et al.*, 1983, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9: 299-303; Bataini *et al.*, 1988, *Am. J. Surg.* 155: 754-760). The predominance of tumor cells that express markers of senescence is expected to be positively correlated with the success of treatment. Expression of the corresponding genes can be measured at the protein level, using antibodies against the corresponding gene products for *in situ* immunostaining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), or western blotting. Gene expression can also be measured at the nucleic acid level, most preferably by detecting expression of RNA encoding at least one of said genes, using in situ hybridization, in situ RT-PCR, or bulk RNA analysis techniques, such as RT-PCR or different forms of filter hybridization (including northern blotting). The choice of markers that are inhibited in senescent cells is provided by the genes listed in Table 1. The choice of senescence markers that are induced in senescent cells is provided by the genes listed in Table 2. Markers inhibited in

senescent cells include the genes that are causally involved in cell proliferation and are known to be inhibited in other systems of cell senescence, including for example Ki-67 (which is already widely used as a proliferation marker), CENP-F, AIM-1, MAD-2, ribonucleotide reductase M1, and thymidine kinase. Such markers also include genes that show tumor-specific expression and have not been previously shown to be inhibited in senescence, such as STEAP, RHAMM or TLS/FUS. Of special interest as senescence markers are the genes that are induced in senescent cells and are causally involved in cell growth inhibition, including for example BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin, and other genes expression of which is downregulated in tumors relative to normal tissues, such as P-cadherin, desmoplakin, desmoyokin, and neurosin.

Some of the genes that are induced in senescent cells encode secreted proteins that can be detected not only within the affected tissues but also in bodily fluids, such as blood, urine, effusions, ascitic fluid, saliva, cerebrospinal fluid, cervical secretions, vaginal secretions, endometrial secretions, gastrointestinal secretions, bronchial secretions, sputum, or secretions or washings from the breast. Four of these secreted proteins (maspin, MIC-1, IGFBP-6, amphiregulin) act as tumor growth inhibitors, and their induction by cancer therapeutic agents should contribute to the success of therapy. The levels of such proteins in the blood or urine of patients, measured after the administration of chemotherapy or a course of radiation, are expected therefore to provide a diagnostic parameter that will correlate with the probability of treatment success. Maspin (Zou *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 6051-6054) and MIC-1 (Komarova *et al.*, 1998, *Oncogene* 17: 1089-1096) have been previously reported to be induced by chemotherapeutic agents or radiation, whereas IGFBP-6 is known to be inducible by retinoids (Dailly *et al.*, 2001, *Biochim. Biophys. Acta* 1518: 145-151) and amphiregulin is induced by vitamin D (Akutsu *et al.*, 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 1051-1056), but stable induction of these proteins in cells undergoing treatment-induced senescence was not known in the prior art.

Antibodies against the above proteins have been developed and many of them are available commercially. For example, anti-Maspin antibody is available from PharMingen, San Diego, CA (Catalog # 554292), anti-amphiregulin antibody is available from Lab Vision Corp., Fremont, CA (Catalog # RB-257-P), and anti-IGFBP-6 antibody

is available from Cell Sciences, Inc., Norwood, MA (Catalog # PAU1). Monoclonal antibodies against MIC-1 have been described in the art (Fairlie *et al.*, 2001, *Biochemistry* 40: 65-73). These or similar antibodies can be used most conveniently in an ELISA assay, or in other conventional immunochemical assays, to detect and measure the amount of corresponding proteins. Although protein levels in blood or urine that correlate with treatment success are not presently known, they can be determined through straightforward clinical studies. In such studies, the corresponding protein levels are measured in patients before treatment and at different time points after the administration of treatment. The results of these measurements are then correlated with standard clinical criteria for treatment success (partial remission and subsequently complete remission).

As disclosed herein, cytotoxic agent-inducible and repressible genes are useful targets for identifying compounds other than cytotoxic agents that mimic the physiologically-based growth inhibitory effect on cell proliferation. Identifying such compounds advantageously provides alternative agents for producing growth arrest in mammalian cells, particularly tumor cells and other cells that proliferate inappropriately or pathogenically. Such compounds are beneficial because they can mimic the growth-inhibitory effects of cytotoxic agents.

Another advantage of such compounds is that they can be expected to have a growth-inhibitory effect without producing systemic side effects found with other growth-inhibitory compounds known in the prior art. For example, many growth-inhibitory drugs and compounds known in the prior art disadvantageously induce p21 gene expression, which induces senescence, growth arrest and apoptosis by activating a plurality of genes, the expression of which is associated with the development of diseases, particularly age-related diseases such as Alzheimer's disease, atherosclerosis, renal disease, and arthritis (as disclosed in co-owned and co-pending U.S. Serial No. 60/265,840, filed February 1, 2001 (Attorney Docket No. 99,216-E) and U.S. Serial No. 09/861,925, filed May 21, 2001 (Attorney Docket No. 99,216-F), incorporated by reference herein). Discovery of compounds that mimic the growth-inhibitory effects of cytotoxic agents chemotherapeutic drugs without producing the toxic side effects of growth-inhibitory compounds known in the art is advantageously provided by the invention.

Identification herein of cytotoxic agent-induced senescence-associated genes with pathogenic activity provides targets for developing drugs that inhibit the induction of such

genes. The invention provides methods for assaying test compounds that inhibit induction of senescence-associated genes consequent to cytotoxic agent-induced senescence, by contacting cells with the test compound. Compounds that inhibit induction of these genes show no increased expression of these genes in agent-treated cells compared with untreated cells. Reporter gene constructs are also advantageously used to assay gene induction and lack thereof in the methods of the invention directed to these disease-associated genes.

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

EXAMPLE 1

Permanent Growth Arrest in Tumor Cells Treated with a Cytotoxic Agent is Associated With the Development of a Senescent Phenotype

Cytological and gene expression analyses were performed to determine the effects of doxorubicin, a widely used anticancer drug that produces DNA damage by stabilizing a cleavable intermediate complex formed by topoisomerase II in the process of DNA segregation, on human colon cancer cells (HCT 116) in culture.

HCT116 colon carcinoma cells (Myohanen *et al.*, 1998, *Cancer Res.* 58: 591-593; Accession No. CCL-247, American Type Culture Collection, Manassas, VA), including wild-type, p21-/- (clone 80S4) and p53-/- (clone 379.2) cell lines (a gift of Dr. B. Vogelstein, Johns Hopkins University) were grown in Dulbecco Modified Eagle Medium with 10% FC2 serum. Cells were plated at 5 x 10^6 cells per 15-cm plate and treated for 24-hr with 200 nM doxorubicin. Thereafter, cells were allowed to recover in drug-free media up to 10 days. For fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis of cell division, cells were labeled with PKH2 (a lipophilic fluorophore; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), which stably incorporates into the plasma membrane and distributes evenly between daughter cells, resulting in gradual decrease in PKH2 fluorescence during consequent cell divisions (Horan *et al.*, 1989, *Nature* 340: 167-168). FACS analysis and cell sorting carried out as described in Chang *et al.* (1999, *Cancer Res.* 59: 3761-3767 and 1999, *Oncogene* 18: 4808-4818). Sorted fractions of senescent ($PKH2^{hi}$) and proliferating ($PKH2^{lo}$) cells (90-95% purity) were analyzed for DNA content using

propidium iodide (PI) staining and FACS analysis as described by Jordan *et al.* (1996, *Cancer Res.* 56: 816-825). The cells were also stained for senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity as described by Dimri *et al.* (1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9363-9367). Finally, clonogenicity of the sorted populations was tested by plating 2,000-10,000 sorted cells per 10-cm plate.

The results of these assays are shown in Figures 1A through 1D. Cell proliferation as detected by FACS using PKH2 fluorescence is shown in Figure 1A. Changes in PKH2 fluorescence were monitored by FACS on different days after doxorubicin treatment. Cells that died after drug treatment were excluded from this analysis based on their staining with membrane-impermeable dye PI. Almost all PI-negative cells remained growth-arrested ($PKH2^{hi}$) for the first 2-3 days after doxorubicin treatment, but a proliferating cell population ($PKH2^{lo}$) emerged starting from day 4. A substantial fraction of cells, however, remained $PKH2^{hi}$ and did not decrease their fluorescence, indicating that these cells did not divide even once after release from the drug. 6-10 days after doxorubicin treatment, the surviving cells were separated by FACS into $PKH2^{hi}$ and $PKH2^{lo}$ fractions.

DNA content analysis showed that most of $PKH2^{hi}$ cells remained in G2, the phase where most of the cells had been originally arrested by doxorubicin through its effect on topoisomerase II (Figure 1B). As shown in Figure 1C, $PKH2^{hi}$ cells were greatly enlarged and stained positively for SA-β-gal, indicating their senescent phenotype. In contrast, $PKH2^{lo}$ cells retained normal size and remained negative for SA-β-gal. The ability to form colonies was essentially confined to the $PKH2^{lo}$ fraction (Figure 1D), indicating that the senescent $PKH2^{hi}$ cells have lost their proliferative capacity.

These results clearly indicated that HCT 116 cells were separated into two different populations following doxorubicin treatment: a senescent cell population and a population that regained the capacity to proliferate.

EXAMPLE 2

Identification of Genes Induced and Repressed in Doxorubicin-Induced Senescence

The populations of senescent and proliferating cells produced by doxorubicin treatment of HCT 116 cells as described in Example 1 were used to identify differences in gene expression between these cell populations and untreated cells.

In these experiments, poly(A)$^+$ RNA and protein extracts were prepared from PKH2^{lo} and PKH2^{hi} cell populations, separated in different experiments 6, 9 or 10 days after release from doxorubicin. Fluorescent cDNA probes were synthesized and used for hybridization with the Human UniGEM V 2.0 cDNA microarray and signal analysis (assays were conducted by IncyteGenomics, St. Louis, MO, as described at that company's web site, www.incyte.com). Changes in gene expression were verified by semi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR), essentially as described (Noonan *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7160-7164), using β-actin as an internal normalization standard and the oligonucleotide primers shown in Table 3. RT-PCR analysis was carried out using two pairs of proliferating- and senescent-cell RNA preparations isolated in independent experiments, with the same results; for a subset of the genes, the assays were reproduced with the same pair of RNA samples. These results were confirmed by immunoblotting assays that were carried out at least twice (with the same results), using the following primary antibodies: mouse monoclonal antibodies against β-actin (Sigma Chemical Co.), p53 and p21 (Oncogene Research, Cambridge, MA), Maspin (Pharmingen, San Diego, CA), keratin 18 (Neomarkers, Union City, CA), cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and rabbit polyclonal antibodies against ATF-3 (Santa Cruz), Mad-2 (BabCo, Richmond, CA) and EPLIN (a gift of Dr. D. Chang, UCLA). Bands were detected using horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies and ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Fluorescent cDNA probes were prepared from RNA of senescent (PKH2^{hi}) and proliferating (PKH2^{lo}) cell populations and used for differential hybridization with UniGEM V 2.0 human cDNA microarray (IncyteGenomics, Inc.), containing >9,000 genes. 82% of the more than 9,000 sequence-verified genes and expressed sequence tags (ESTs) present in the UniGem V 2.0 microarray gave measurable hybridization signals with both probes. Lists of genes identified by this hybridization as downregulated or upregulated in the senescent relative to proliferating cells (with balanced differential expression of 2.0 or higher) are provided in Tables 1 and 2.

RT-PCR analysis (Figure 2A) was carried out for 74 individual genes detected using the hybridization assay and confirmed qualitative changes in gene expression for 26/29 downregulated and 37/45 upregulated genes. In most cases, differences in gene expression revealed by RT-PCR were much higher than the values indicated by cDNA microarray hybridization. Changes in the expression of 7 genes were also confirmed at the protein level by immunoblotting (Figure 3A).

More than one half of 68 genes and ESTs downregulated in senescent cells are known to play a role in cell cycle progression: 25 of these genes are involved in different stages of mitosis or DNA segregation (*e.g.*, CDC2, Ki-67, MAD2, Topoisomerase IIα); 11 genes function in DNA replication and chromatin assembly (*e.g.* ribonucleotide reductase M1, thymidylate kinase, replication protein A3); and 4 genes are involved in DNA repair (*e.g.* HEX1, FEN1). Downregulation of genes involved in cell proliferation correlates with the growth-arrested state of senescent cells and demonstrates the biological relevance of gene expression profiling in our system.

In addition, multiple growth-inhibitory genes were induced by doxorubicin treatment. Senescent HCT116 cells were found to upregulate multiple genes with documented growth-inhibitory activity, providing an ample explanation for the maintenance of doxorubicin-induced cell cycle arrest in the absence of p16 (which is not expressed in HCT 116 cells). One of the upregulated genes is p21 (shown in Figure 2A). Analysis of p21 and p53 protein induction by doxorubicin in wild type, p53-/- (14) and p21-/- (15) HCT116 cell lines demonstrated that p21 induction in this system is strongly dependent on p53 (shown in Figure 3B). Both p53 and p21 proteins are maintained at elevated levels in senescent cells isolated 9 days after release from the drug (Figure 3A). In contrast to p21, however, p53 is upregulated only at the protein level.

In addition to sustained p21 induction, senescent cells strongly overexpress many other growth inhibitors, including several known or putative tumor suppressor genes. Some of these genes encode intracellular growth-inhibitory proteins, including tumor suppressor BTG1 and its homolog BTG2, putative tumor suppressor EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasm) and WIP1 phosphatase. Senescent HCT116 cells also overexpress several secreted growth inhibitors, including MIC-1 (pTGF-β), insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6), serine protease inhibitor Maspin (a tumor suppressor downregulated in advanced breast cancers), and amphiregulin, an EGF-related

factor that inhibits proliferation of several carcinoma cell lines while promoting the growth of normal epithelial cells. These findings suggest that drug-induced growth arrest of tumor cells is maintained by a set of apparently redundant intracellular and paracrine factors.

Differences in gene expression between senescent and proliferating populations of drug-treated HCT116 cells parallel the differences between normal and cancerous epithelial cells. In addition to the above listed tumor suppressors, senescent HCT116 cells induce several other genes that are downregulated in cancers relative to normal epithelial cells (including MIC-1, P-cadherin, desmoplakin, desmoyokin, neurosin). On the other hand, senescent cells downregulate not only multiple genes involved in cell proliferation but also some other genes that have oncogenic activity (RHAMM and TLS/FUS) or show tumor-specific expression (STEAP). Another sign of putative "normalization" of senescent cells is the upregulation of six members of the keratin gene family. The strongest induction in this group was observed for keratins 8 and 18, a keratin pair with anti-apoptotic activity (Caulin *et al.*, 2000, *J. Cell Biol.* 149: 17-22). However, senescent HCT116 cells show no evidence of apoptosis, even though they upregulate two proapoptotic genes, APO-1/Fas and NOXA.

In addition to the growth-inhibitory genes, senescent HCT116 cells show increased expression of genes for secreted mitogenic, anti-apoptotic and angiogenic factors, such as extracellular matrix (ECM) proteins Cyr61 and prosaposin, and transforming growth factor α (TGF-α). Induction of such genes results in paracrine activities, which promote tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. Such activities have been previously associated with replicative senescence (Campisi, 2000, *In vitro* 14: 183-188) in normal cells, and with p21 induction in tumor cells (Chang *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1497-150117). Senescent HCT 116 cells also upregulate several proteases (kallikrein-7, calpain L2, neurosin, urokinase-type plasminogen activator) that may potentially contribute to metastatic growth. Several other genes induced in senescent HCT 116 cells are involved in cell adhesion and cell-cell contact (including P-cadherin, Mac2-binding protein and desmoplakin). Other induced genes encode ECM receptors, including several integrins and syndecan-4 (ryudocan), involved in angiogenesis. Some other transmembrane proteins induced in senescent cells are growth-regulatory proteins CD44 and Jagged-1, Alzheimer's β-amyloid precursor protein (βAPP), and another

amyloid precursor, BRI, associated with an Alzheimer-like disease. Altogether, secreted factors, ECM proteins, ECM receptors and other integral membrane proteins make up 33 of 68 genes with known functions that are induced in senescent HCT116 cells. In contrast, only 2 of 64 downregulated genes with known function were induced in the senescent cell population of HCT 116 cells treated with doxorubicin.

One class of genes that are differentially expressed in doxorubicin-treated HCT 116 cells are genes encoding known or putative transcription factors or cofactors. Genes for several known or putative transcription factors and cofactors show altered regulation in the senescent HCT116 cells. One of the downregulated transcription factors is winged helix protein HFH-11 (Trident), a positive regulator of DNA replication, that is specifically expressed in cycling cells (Ye *et al.*, 1999, *Mol. Cell. Biol.* 19: 8570-8580). Several upregulated transcription factors are related to the AP-1 family, which mediates cellular responses to various mitogenic signals, interferons and different forms of stress (Wisdom, 1999, *Exp. Cell. Res.* 253: 180-185). These include c-Jun and two other basic leucine zipper proteins, XBP-1 (structurally related to c-Jun) and ATF3 that dimerizes with c-Jun. Sustained upregulation of ATF3 mRNA and protein in senescent cells is surprising, since induction of this stress-responsive factor is usually transient (over hours), due to the ability of ATF3 to inhibit its own transcription (Wolfgang *et al.*, 2000, *J. Biol Chem.* 275: 16865-16870). Another induced transcription factor is ELF-1, a member of Ets family of helix-loop-helix proteins that are known to interact functionally, and possibly physically, with AP-1 (Wisdom, *ibid.*).

The observed pattern of gene expression in cytotoxic drug-induced senescence of HCT116 cells showed many similarities to senescence in normal cells. Some of the general properties of senescent cells (other than terminal growth arrest) are resistance to apoptosis, increased cell adhesion (associated with overproduction of ECM components), and secretion of proteases, protease inhibitors, and mitogenic factors (Campisi, *ibid.*). Genes involved in all of these phenomena are amply represented among those that are upregulated in senescent HCT 116 tumor cells. In contrast to normal cells, however, senescent HCT116 cells don't upregulate p16 or tumor suppressor PML associated with RAS-induced accelerated senescence (Pearson *et al.*, 2000, *Nature* 406: 207-210).

Changes in gene expression associated with drug-induced senescence also show parallels with organism aging. Some of the proteins that are induced in the senescent

HCT116 colon carcinoma cells, such as βAPP and prosaposin, show age-dependent expression in animals. Remarkably, Maspin, CD44 and Cyclin D1 were reported to be upregulated specifically in the colonic epithelium of aging animals (Lee *et al.*, 2001, *Mech Ageing Dev.* 122: 355-371). In addition, eight genes downregulated in senescent HCT116 cells also showed decreased expression in actively growing fibroblast cultures from old people relative to similar cultures from young people, whereas two induced genes (MIC-1 and desmoplakin) were upregulated in cultures from older individuals (Ly *et al.*, 2000, *Science* 287: 2486-2492). These results demonstrate that the process of drug-induced senescence in tumor cells is related to both replicative senescence and organism aging.

EXAMPLE 3

Effects of p53 and p21 Knockout on Cytotoxic Drug-induced Changes in Senescence-associated Gene Expression

Many of the genes that show altered expression in senescent HCT116 cells have shown similar changes upon overexpression of p53 (9 downregulated and 11 upregulated genes) or p21 (46 downregulated and 7 upregulated genes) (see Tables 1 and 2). p53 acts as a direct transcriptional activator of many genes (including p21) and indirectly regulates a group of genes that do not have p53-binding sites in their promoters (Komarova *et al.*, 1998, *Oncogene* 17: 1089-1096; Zhao *et al.*, 1999, *Cell Res.* 9: 51-59). A prominent class of p53-induced genes encode secreted growth-inhibitory factors, providing paracrine antiproliferative activity (Komarova *et al.*, *ibid.*). In contrast to p53, p21 is not a transcriptional regulator *per se*, but it interacts with a broad network of transcription factors, cofactors and mediators of signal transduction (Dotto, 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1471: M43-M56). Overexpression of p21 in fibrosarcoma cells results in downregulation of multiple cell proliferation genes and upregulation of many ECM components and secreted mitogenic and antiapoptotic factors, providing the corresponding activities in conditioned media of p21-induced cells (Chang *et al.*, 2000, *ibid.*). A known mechanism for transcription activation by p21 is based on its ability to stimulate p300/CBP transcription cofactors (Snowden *et al.*, 2000, *Mol. Cell. Biol.* 20: 2676-2686). HCT116 cells, however, express a dominant mutant form of transcription

factor p300 (Gayther *et al.*, 2000, *Nat. Genet.* 24: 300-303), which may explain why senescent HCT116 cells upregulate a relatively small number of p21-inducible genes.

To elucidate the roles of p53 and p21 in the observed changes in gene expression, expression of senescence-associated genes upon doxorubicin treatment of wild type, p21-/- and p53-/- HCT116 cells was analyzed. RNA samples were isolated before the addition of the drug, immediately after one-day treatment with doxorubicin, and on three consecutive days after the removal of the drug. Expression of 33 genes that were upregulated and 11 genes downregulated in senescent cells was analyzed by RT-PCR as described above; results are shown in Figure 2B.

This analysis showed that all the tested genes were expressed in the untreated wild-type cells at levels similar to those in the proliferating fraction of doxorubicin-treated cells. Senescence-associated changes in the expression of most of these genes became detectable in the total population of wild-type HCT116 cells after one-day doxorubicin treatment or one day after release from the drug. This early response made it possible to evaluate the effects of p21 and p53 knockouts on total populations of doxorubicin-treated cells, without having to purify the small senescent fractions of p21-/- and p53-/- cell lines.

Approximately one third of the genes that are upregulated in senescent cells showed almost indistinguishable response among the wild-type, p21-/- and p53-/- cell lines, indicating that the induction of these genes does not involve either p53 or p21 (Figure 2B). These genes include tumor suppressor BTG1 and secreted growth inhibitor IGFBP-6. Surprisingly, one of the genes that shows no p53 dependence is NOXA, although it is known to be inducible by p53. The remaining two thirds of the upregulated genes showed diminished or delayed induction in p53-/- cells. About one half of the latter genes were unaffected by p21 knockout. This group includes transcription factors of the AP-1 family, CYR61, and several intracellular (BTG2, WIP1) and secreted growth inhibitors (Maspin, MIC-1, amphiregulin). None of these genes, however, are completely dependent on p53 for their induction, and all of them are induced in p53-/- cells two days after release from the drug. Almost all senescence-associated growth inhibitors (except for p21 and EPLIN) are eventually induced in p53-/- cells to a level comparable to the wild-type cell line (Figure 2B). These results provide an explanation for the diminished

but still substantial induction of senescence-like growth arrest in p53-/- cells after doxorubicin treatment (Chang *et al.*, 1999a, *ibid.*).

A final group of the induced genes shows much weaker changes in p21-/- than in the wild-type cells (Figure 2B), indicating that regulation of these genes is mediated through p21. Since p21 induction in doxorubicin-treated HCT116 cells is p53-dependent, such genes also show diminished induction in p53-/- cells. The strongest p21 dependence among the tested genes is found for Cyclin D1. None of p21-dependent genes produces secreted growth inhibitors, but two of them encode secreted mitogenic/antiapoptotic proteins (prosaposin and TGFα). Most of the genes that are downregulated in senescent HCT116 cells are known to be inhibited by p21 (Caulin *et al.*, *ibid.*). In agreement with this observation, such genes show decreased expression after doxorubicin treatment only in the wild-type but not in p21-/- or p53-/- cell lines (Figure 2B). Together with the genes that show p21-dependent induction, 20 of 31 tested genes that are affected by p53 knockout (excluding p21) are also affected to the same or greater degree by the knockout of p21. Therefore, p21, which until recently was not known to play a role in the regulation of gene expression, appears to be a major mediator of the corresponding effects of p53.

These results indicate that the genes identified herein can be used as markers for assessing compounds for their effects on cellular senescence and also for identifying compounds that induce the senescence phenotype by mechanisms that do not implicate p53, p21 or both.

EXAMPLE 4

Construction of Promoter-Reporter Gene Constructs That Are Induced in Senescent Cells and Screening for Agents that Induce Senescence in Tumor Cells

A cell-based screening assay is used to identify compounds that activate senescence-associated growth-inhibitory genes in p53-deficient tumor cells, without concurrent activation of secreted tumor-promoting factors. For this purpose, promoter constructs of different senescence-associated growth-inhibitory genes are constructed that drive expression of a chimeric GFP-luciferase reporter. Such a chimeric reporter was shown to be suitable for selection based on GFP fluorescence and for sensitive promoter

activity measurements based on luciferase chemiluminescence (Kotarsky *et al.*, 2001, *Anal. Biochem.* 288: 209-215). A similar chimeric reporter gene is commercially-available (Clontech, Palo Alto, CA). The promoter-reporter constructs are tested for inducibility by doxorubicin under conditions that activate the corresponding genes. The best-regulated promoter constructs are used to develop stably transfected cell lines, and cell lines identified that have the strongest induction of the reporter gene under conditions of drug-induced senescence.

Once suitable reporter cell lines are developed, optimized conditions for high throughput screening (HTS) of chemical libraries are determined based on luciferase activity of the reporter. This HTS assay is used to screen a chemical compound library (such as the Diversity Set of 1,990 compounds from the Developmental Therapeutics Program (DTP) of NCI). Positive compounds in this assay are then tested for their effects on expression of other genes associated with positive and negative aspects of accelerated senescence.

Seven senescence-associated growth-inhibitory genes are preferential targets for induction assays:

BTG1 is a tumor suppressor rearranged in t(8;12)(q24;q22) chromosomal translocation of B-cell leukemia and an inhibitor of cell proliferation (Rouault *et al.*, 1992, *EMBO J.* 11: 1663-1670). BTG1 was shown to be induced by DNA damage in different human tumor cell lines (Cortes *et al.*, 2000, *Mol. Carcinog.* 27: 57-64). Damage-induced BTG1 expression was shown by Cortes *et al.* and is shown herein to be independent of p53.

BTG2 (PC3/TIS21) is a BTG1 related antiproliferative gene (Rouault *et al.*, 1996, *Nat. Genet.* 14: 482-486). BTG1 is stress-responsive (Fiedler *et al.*, 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 562-565) and is also induced in different cell lines by DNA damage, growth factors and tumor promoters (Fletcher *et al.*, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 14511-14518). BTG2 was shown to be induced by p53 at the level of transcription (Rouault *et al.*, 1996, *ibid.*), but it is inducible by doxorubicin in p53-/- cells, albeit to a lesser degree than in the wild type cells.

IGF-binding protein 6 (IGFBP-6), a secreted inhibitor of IGF function and tumor cell growth (Bach, 1999, *Horm. Metab. Res.* 31: 226-234; Sueoka *et al.*, 2000, *Oncogene* 19: 4432-4436), was shown to be inducible by retinoids at the level of transcription (Dailly *et al.*, 2001, *Biochim. Biophys. Acta* 1518: 145-151). IGFBP-6 induction by doxorubicin shows no dependence on p53.

Amphiregulin is an EGF-related factor that was shown to inhibit the growth of several carcinoma cell lines, while promoting the growth of normal epithelial cells (Plowman *et al.*, 1990, *Mol. Cell Biol.* 10: 1969-1981). Amphiregulin is the major target of transcriptional induction by WT1 Wilms tumor suppressor gene (Lee *et al.*, 1999, *Cell* 98: 663-673) and is inducible by vitamin D3 (Akutsu *et al.*, 2001, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 1051-1056). Amphiregulin induction by doxorubicin shows only moderate dependence on p53.

MIC-1 (pTGF-β/PLAB/PDF/GDF15), a secreted growth-inhibitory member of TGF-β superfamily, was shown to be induced by p53 at the level of transcription (Tan *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 109-114) and was suggested to be a key mediator of paracrine growth-inhibiting effects of p53 (Kannan *et al.*, 2000, *FEBS Lett.* 470: 77-82). Surprisingly, MIC-1 induction by doxorubicin shows only weak dependence on p53.

Maspin, a secreted serine protease inhibitor, has been identified as a tumor suppressor whose expression is lost in many advanced breast cancers (Domann *et al.*, 2000, *Int. J. Cancer* 85: 805-810). Maspin shows very strong induction by DNA damage at the protein level, in doxorubicin-treated HCT116 cells, and others; Zou *et al.* (2000, *J. Biol. Chem.* 275: 6051-6054) showed maspin induction by drug treatment in four other tumor cell lines. Maspin expression is induced at the transcriptional level by p53 (Zou *et al.*, *ibid.*). Although p53 knockout strongly decreases Maspin induction by doxorubicin, such induction is still readily detectable in p53-/- cells.

EPLIN (Epithelial Protein Lost in Neoplasms), an actin-binding cytoskeletal protein, is expressed in almost all normal epithelial tissues but downregulated in 20 of 21 tested carcinoma cell lines. EPLIN inhibits cell proliferation, making it a

putative tumor suppressor (Maul & Chang, 1999, *Oncogene* 18: 7838-7841). EPLIN is induced not only in the senescent population of doxorubicin-treated HCT116 cells, but also in MCF7 breast carcinoma cells that undergo senescence-like growth arrest upon treatment with retinoids. Among all the genes in this group, EPLIN shows the weakest induction by doxorubicin in the unsorted cells; this induction is even further diminished in p21-/- and p53-/- cells. Although this pattern makes it potentially difficult to detect EPLIN induction upon drug treatment, strong increase in EPLIN expression in the sorted population of senescent cells suggests that its induction may be a particularly specific marker of senescence.

Functional promoter sequences have been published for all of these genes: BTG1 (Rodier *et al.*, 1999, *Exp. Cell Res.* 249: 337-348), BTG2 (Fletcher *et al.*, 1991, *ibid.*), IGFBP-6 (Dailly *et al.*, 2001, *ibid.*), amphiregulin (Lee *et al.*, 1999, *ibid.*), Maspin (Zou *et al.*, 2000, *ibid.*), MIC-1 (Tan *et al.*, 2000, *ibid.*), EPLIN (Gao *et al.*, 2000, *J. Cell Physiol.* 184: 373-379; EPLIN has two alternative promoters; the preferred promoter is the promoter corresponding to the longer β isoform that is preferentially expressed in HCT116 and MCF7 cells. Transcription of the corresponding genes is regulated by various factors (DNA damage, serum, differentiating agents, phorbol esters, tumor suppressors) through *cis*-regulatory elements in their promoters. In addition, Maspin has been shown to be silenced in breast cancers at the level of promoter methylation (Domann *et al.*, 2000, *ibid.*). Thus, it can be expected that senescence-associated changes in the expression of these genes will be reproducible in promoter constructs. Substantially all of these promoters share several common cis-regulatory sites, including AP-1, AP-4, ELK1 and GATA as revealed by examination of transcription factor binding sites in the corresponding promoter sequences, using MatInspector V2.2 program based on TRANSFAC 4.0 database. Together with the observed coregulation of these genes in drug-induced senescence, these observations support the likelihood of identifying agents that will stimulate all or most of these genes at the same time.

Reporter gene constructs are prepared by traditional cloning methods or by polymerase chain reaction (PCR) amplification of promoter sequences using primers designed from sequences flanking the corresponding promoters and human genomic

DNA as a template. The promoter sequences are cloned upstream of a suitable reporter gene, the most convenient of which is useful both as a selectable marker and as the basis for HTS. A commercially-available reporter comprising a chimera of green fluorescence protein and luciferase is most suitable for this purpose. This reporter is a chimeric protein formed by the Enhanced form of Green Fluorescent Protein (GFP) (commercially-available from Clontech) at the amino terminal end, fused with firefly luciferase at the carboxyl terminus. This chimeric reporter provides strong GFP fluorescence and high sensitivity of luciferase-based chemiluminescence assays. This gene is cloned into a promoterless vector in an orientation that a convenient cloning site or multiple cloning site is operably linked at the 5' end of the reporter gene, so that the promoters from the seven senescence-associated genes can be easily inserted into and thereby operably linked to the reporter gene.

Several of the tested genes are known to be inducible by p53. To select compounds that activate senescence-associated growth inhibitors through p53-independent mechanisms, p53-deficient cell lines will be used for screening. The primary cell line is a p53-/- derivative of HCT116 colon carcinoma cells (Bunz *et al.*, 1998, *Science* 282: 1497-1501), as described above. Promoter constructs that show positive results in this cell line are then tested in other p53-deficient tumor cell types, to confirm that the induction of these promoters is not unique to HCT116 cells (damage-responsiveness in a number of cell lines has already been demonstrated for BTG1, BTG2 and Maspin, and retinoid inducibility in breast carcinoma lines was shown for EPLIN and IGFBP-6). p53-mutated tumor cell lines are used, particularly those cell lines that develop the senescent phenotype upon doxorubicin treatment, including SW480 colon carcinoma, U251 glioma and Saos2 osteosarcoma (as disclosed by Chang *et al.*, 1999b, *ibid.*). Also used in these assays is a derivative of HT1080 fibrosarcoma wherein p53 function has been fully inhibited with a p53-derived genetic suppressor element GSE56 (as disclosed by Chang *et al.*, 1999a, *ibid.*).

These promoter-reporter constructs are used initially in transient transfection assays for the induction of luciferase activity by doxorubicin treatment. For normalization, the tested constructs are mixed with a construct carrying a different reporter gene under a constitutively expressed promoter (e.g. β-galactosidase transcribed from the CMV promoter). These mixtures are transfected (using electroporation) into

p53-/- HCT116 cells, which are then either untreated or treated with 200 nM doxorubicin. The activity of firefly luciferase and the control reporter gene (β-gal) are determined using commercially available assay kits, and the normalized values of firefly luciferase activity are compared between the treated and untreated cells. The promoter constructs that provide the highest expression and the best induction are determined from these assays.

Several promoter constructs showing at least 3-fold induction in transient transfection assays are transfected into p53-/- HCT116 cells, and stably transfected cell lines selected with puromycin. About 100 clonal transfectants from each tested construct are isolated and expanded to the size of close to 100,000 cells. At this stage, the picked lines are screened for activity by doxorubicin in 96-well plate assays (as described in more detail below). The best-inducible cell lines are expanded and subsequently characterized by repeated testing for both GFP and luciferase induction. Reporter cell lines are selected to maximize the absolute level of induced luciferase expression while retaining a high fold-induction, because high absolute luciferase expression minimizes the number of cells required to produce a detectable signal in HTS assays. Once developed, these optimal cell lines are analyzed with regard to the time course and doxorubicin dose-dependence of reporter expression and tested to verify senescence-specificity of the expression. The latter analysis is performed by labeling cells with PKH26 (a fluorophore related to PKH2 but having a red-shifted emission wave length), followed by doxorubicin treatment and release into drug-free media. Between 6-7 days after release, cells are analyzed with FACS by two-color analysis for PKH26 and GFP fluorescence. GFP fluorescence selectively associated with $PKH26^{hi}$ (senescent) cells is thereby determined without physical sorting. Finally, reporter expression inducibility in the selected cell lines is tested with senescence-inducing agents other than doxorubicin, other agents, such as ionizing radiation, cisplatin, aphidicolin or cytarabine (Chang *et al.*, 1999b, *ibid.*). The primary reporter cell line for subsequent compound screening is generated thereby, and secondary cell lines expressing the reporter from the promoters of different genes can be used for confirmatory assays.

The primary reporter cell line developed as described above is used to develop HTS assay. The dual GFP-luciferase nature of the reporter gene is especially convenient for conducting screening assays using the more sensitive luciferase-based

chemiluminescence assay, and the GFP fluorescence to confirm that the effect of a tested compound is not due to artifactual influence on the luciferase assay.

Primary screening will be carried out using the assay conditions established for doxorubicin and other senescence-inducing agents, and similarly to the procedures used by other investigators for luciferase-based screening of chemical libraries (Sohn *et al.*, 2001, *Ann. Surg.* 233: 696-703). Aliquots of 1 mM stocks of each compound in a compound library are added at a final 2 μM concentration into a set of three 96-well plates containing cell culture media. These 96-well plates are then seeded with reporter cells and incubated at 37°C for the required period of time, with at least two reagent-free negative control wells and two doxorubicin-containing positive control wells per plate. After incubation, the plates are read (with no further manipulations) in the fluorescence reader, to identify the wells with substantial increase in GFP activity. The same plates are then processed for luciferase assay and read in a microplate luminometer. Luminometer readings on three plates are used to identify candidate positives, and compared with the results of GFP fluorescence. Positive compounds are re-tested in another set of assays prior to secondary screening. The nature of the assays for increased luciferase and GFP activity, which need to be expressed in live cells over the course of the assay, should eliminate highly cytotoxic compounds from the list of candidates.

Compounds that score as positive in the primary analysis are tested for their effect on the expression of different senescence-associated genes. Some of these assays are carried out using stably transfected cell lines, where the reporter gene is driven by promoters of other genes than the one in the primary reporter line. These simple reporter activation assays are warranted if a very large number of positives are detected in the primary assay. A second reporter line can be used to limit the number of compounds to those that are active with more than one promoter. If the number of positive compounds after the primary screen is low, however, this secondary screening step is unnecessary and the positive compounds are used for direct analysis of the compounds on gene expression.

On addition and prior to extensive further screening the minimal concentration of the compound that produces a strong increase in the reporter assay is determined. This concentration is also tested on p53-/- HCT116 cells for its effect on the expression of the endogenous senescence-associated genes. In these assays, RNA is extracted before and after treatment, and expression of different senescence-associated genes is analyzed, for

example by quantitative RT-PCR (as disclosed by Noonan *et al.*, 1990) that allows expression levels for multiple genes among a set of RNA samples to be compared. A single RT-PCR assay uses about 50 ng of total cellular RNA, which makes it possible to carry out about 100 assays starting from 5 μg of total RNA, an amount that is typically used for a single lane in northern hybridization. In this assay, β-actin is used as a normalization standard, since its expression is unaltered in senescent cells, according to northern and western blots.

RT-PCR primers and assay conditions for 63 genes that are up- or downregulated in doxorubicin-induced accelerated senescence (Chang *et al.*, 2001, *ibid.*) are disclosed in Table 3. These assays are used to test if the positive compounds can activate not only the growth-inhibitory genes that are described above, but also other senescence-associated growth regulators, such as WIP1, CD44, Jagged1, and also several genes that are known to be downregulated in cancers relative to normal cells and then upregulated in senescent tumor cells, such as P-cadherin, desmoplakin and desmoyokin. The latter genes are likely to be co-regulated with senescence-associated growth inhibitors that are downregulated in cancers (such as EPLIN or Maspin). On the other hand, it is expected that compounds will be found that will not induce p21 or the potentially pathogenic proteins that are upregulated in doxorubicin-induced senescence, such as secreted tumor-promoting factors TGFα, CYR61 and prosaposin, proteases such as kallikrein-7 or calpain L2, and plaque-forming proteins, such as Alzheimer's β-amyloid precursor and BRI. Positive compounds are also assayed for the effects of the compounds on genes that are downregulated in senescent cells, such as tumor-specific transmembrane protein STEAP, and genes involved in cell proliferation (*e.g.* Ki-67, Topoisomerase IIα, CDC2, PLK1, MAD2, Thymidylate synthetatse, Ribonucleotide reductase M1). Inhibition of the latter genes will be indicative of a cytostatic effect of the tested compound, which will be tested in separate assays (see below).

If this analysis reveals a compound that has the desired effect on gene expression, analyses are performed to determine how the compound affects cell growth. This analysis will be carried out both by standard cell proliferation assays, and by an assay that evaluates the cytostatic and cytotoxic components of the antiproliferative effect. In this assay, cells are labeled with PKH2 , treated with the test compound either continuously or for a limited period of time (*e.g.* 24 hrs), and analyzed after the period of time

corresponding to three cell doublings. For this analysis, attached and floating cells will be combined and stained with propidium iodide (PI), which stains only membrane-compromised (dead) cells. The stained cells are then analyzed by FACS for changes in PKH2 fluorescence and for the fraction of PI-positive cells, next to the control sample of untreated cells that were labeled with PKH2 at the same time. Increased PKH2 fluorescence relative to control cells indicates the inhibition of cell division (cytostatic effect) and increased PI+ fraction indicates the cytotoxic effect. Compounds with preferentially cytostatic (rather than cytotoxic) effect on tumor cells are of particular interest, because such an effect is expected from the specific activation of the senescence program.

If a prototype compound with desired properties is found, a library of derivatives from this compound is prepared, which is then screened to find more effective agents. Such agents are evaluated as prototype drugs by preclinical studies.

EXAMPLE 5

Construction of Promoter-Reporter Gene Constructs and Screening for Agents That Prevent the Induction of Pathogenic Genes Associated with Anticancer Agent-Induced Senescence

The results disclosed herein show that certain genes are induced by treatment with cytotoxic drugs that have been associated with diseases of aging and paracrine growth-stimulating effects, especially tumor cell growth stimulation. These genes include cyclin D1, serum-inducible kinase, CYR61, prosaposin, transforming growth factor α (TGFα), kallikrein 7, calpain-L2, neurosin, plasminogen activator, urokinase, amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP), and integral membrane protein 2B (BRI/ITM2B). Promoters from these genes can be used to make reporter gene constructs in like manner as disclosed in Example 4 for other senescence-associated genes. These constructs can then be used to assay reporter gene induction by cytotoxic drug treatment in the presence and absence of a test compound.

Functional promoter sequences have been published for all of these genes: cyclin D1 (Motokura & Arnold, 1993, *Genes Chromosomes Cancer* 7: 89-95); CYR61 (Latinkic *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19: 3261-7); prosaposin (Sun *et al.*, 1998, *Gene* 218: 23-34); transforming growth factor α (TGFα; Raja *et al.*, 1991, *Mol. Endocrinol.* 5: 514-20);

kallikrein 7 (Yousef *et al.*, 2000, *Gene* 254: 119-128); calpain-L2 (Suzuki *et al.*, 1995, *Biol Chem Hoppe Seyler.* 376: 523-9); plasminogen activator urokinase (Riccio *et al.*, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 2759-71); and amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP; Lahiri & Robakis, 1991, *Brain Res. Molec. Brain Res.* 9: 253-257).

Reporter gene constructs are prepared by modification of the methods described in Example 4. Senescence is induced in transient and stably-transfected cells, typically by contacting the cells with a senescence-inducing concentration of doxorubicin or other cytotoxic agent. These experiments are used to establish levels of reporter gene induction in the absence of a test compound.

The promoter-reporter constructs are tested for inducibility by doxorubicin under conditions that activate the corresponding genes. The best-regulated promoter constructs are used to develop stably transfected cell lines, and cell lines identified that have the strongest induction of the reporter under the conditions of drug treatment, as described in Example 4.

Experiments are also performed in the presence of a test compound in an identical manner as experiments performed in the absence of the test compound. Experiments are typically performed at a variety of concentrations of the test compound in cells induced with the same concentration of cytotoxic agent, and expression of the reporter gene determined and compared to reporter gene expression in cells induced with that concentration of cytotoxic agent in the absence of the test compound.

The results of these experiments identify test compounds that reduce, inhibit or prevent senescence-associated induction of disease-promoting senescence-associated genes in cells treated with a cytotoxic drug, and effective concentrations thereof. These results provide compounds useful for preventing induction of disease-promoting, particularly tumor cell growth-stimulating genes as a consequence of cytotoxic agent-induced senescence associated with conventional cancer treatments.

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 1. Genes downregulated in senescent relative to proliferating cell fractions in HCT116 cells separated after doxorubicin treatment

(genes confirmed by RT-PCR are shown in boldface)

Gene Name	Accession Number	Effects of[a]:		Notes	B.D.E.[b]
		p53	p21		
Transcription factors and cofactors					
HFH-11/Trident/Win/MPP2	U74612		↓[1]	Positive cell growth regulator[2], downregulated in aging[3]	-3.3
AND-1	AJ006266			WD repeat, HMG-box	-2.4
Structure specific recognition protein 1 (SSRP1)	M86737		↓[1]	Transcription elongation factor	-2.3
Histone acetyltransferase 1 (HAT1)	AF030424		↓[d]	Transcription cofactor	-2.1
Zinc finger protein, Y-linked (ZFY)	M30607			Testis determination	-2.1
Mitosis/DNA segregation					
Ki-67 antigen	X65550		↓[d]	Chromatin condensation	-4.9
XCAP-C condensin homolog	NM_005496			Chromatin condensation	-4.2
Centromere protein F (CENP-F)	NM_005196		↓[1]	Kinetochore component, downregulated in aging[3]	-3.8
XCAP-H condensin homolog	D38553		↓[1]	Chromatin condensation	-3.7
BUBR1/BUB1B	AF053306		↓[1]	Kinetochore, spindle checkpoint control	-3.6
Kinesin-like DNA binding protein (Kid/Obp-2)	AB017430		↓[d]	Kinetochore	-3.1
AIM-1/AIK-2	NM_004217		↓[1]	Centrosome regulator	-3.1
Lamin B receptor	L25941	↓[4]		Nuclear envelope assembly	-3
Apoptosis inhibitor 4 (survivin)	U75285		↓[d]	Centrosome; protects from mitosis-associated apoptosis	-2.9
CDC2	X05360	↓[5]	↓[1]	Mitosis initiation	-2.7
CDC20	AW411344		↓[d]	APC activation/anaphase onset, downregulated in aging[3]	-2.6
Mitotic kinesin-like protein-1	H63163			Spindle movement	-2.5
Centromere protein E (CENP-E)	Z15005		↓[d]	Kinetochore	-2.5
ZW10 interactor (hZwint-1/MPP5)	AW409765		↓[1]	Kinetochore	-2.5

Thyroid hormone receptor interactor 13 (TRIP13)/HPV16 E1 binding protein	AA134541		↓[1]	homolog of a yeast pachytene checkpoint protein	-2.4
Breast cancer 1 (BRCA1)	L78833	↓[6]		Centrosome duplication regulator, tumor suppressor	-2.3
Homolog of rough deal (Rod) protein of Drosophila	AF070553			Chromosome segregation	-2.3
AIK-1/AIM-2/STK15	NM_003600		↓[1]	Centrosome regulator, protooncogene amplified in cancers[7]	-2.1
MAD2	NM_002358	↓[4]	↓[1]	Kinetochore, spindle checkpoint control	-2.1
Topoisomerase IIα	AF071747	↓[4]	↓[1]	DNA and chromosome segregation	-2.1
Lamin B2	M94363		↓[1]	Nuclear envelope assembly	-2.1
Pericentrin	AI970199			Centrosome	-2
Thymopoietin	U18271		↓[1]	Nuclear envelope assembly	-2
FK506-binding protein 5	U71321			Homologous to rodent TP2 involved in testis-specific chromatin condensation	-2
Polo-like kinase (PLK1)	U01038		↓[1]	Controls initiation and several other stages of mitosis, downregulated in aging[3]	ND[e]
DNA replication/chromatin assembly					
Ribonucleotide reductase M1 (RRM1)	NM_001033		↓[1]	Nucleotide synthesis	-3.4
High-mobility group protein 1 (HMG1)	AW160834		↓[1]	Chromatin component	-3.4
Thymidine kinase 1	NM_003258		↓[1]	Nucleotide synthesis	-3.3
MCM7/CDC47	D55716	↓[4]	↓[1]	Replication licensing factor component	-3.3
Thymidylate synthase	NM_001071		↓[1]	Nucleotide synthesis, downregulated in aging[3]	-3.2
MCM2 (mitotin)	AW264268		↓[d]	Replication licensing factor component	-2.8
Replication factor C (activator 1) (36.5kD)	AI651635, AW651734		↓[1]	PCNA clamp formation	-2.7,-2.4[c]
High-mobility group protein 2 (HMG2)	X62534	↓[4]	↓[1]	Chromatin component, downregulated in aging[3]	-2.5
Replication protein A3 (14kD)	NM_002947		↓[d]	Single-stranded DNA binding protein, involved in replication and repair	-2.1
Gamma-glutamyl hydrolase (folylpolygammaglutamyl hydrolase)	NM_003878			Folate metabolism regulator	-2
MCM3	NM_002388		↓[d]	Replication factor	-2

DNA repair					
HEX1 (RAD2 homolog)	AF042282		↓[1]	Exonuclease	-3.7
Flap endonuclease 1 (FEN1, RAD2 homolog)	AW246270		↓[d]	Exonuclease, downregulated in aging[3]	-3
RAD51 homolog	D14134		↓[d]	Similar to E. coli RecA	-2.4
T(12;16) malignant liposarcoma fusion (TLS/FUS)	S62140		↓[d]	Retinoid-inhibited, protooncogene[8]	-2.2
RNA processing/trafficking					
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	NM_005520		↓[d]		-2.1
Acidic protein rich in leucines (APRIL)	Y07570		↓[d]	RNA stability	-2.1
Pre-mRNA cleavage factor Im (25kD)	AA738354		↓[d]		-2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	Z23064				-2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	NM_002137		↓[d]		-2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	AA173135		↓[d]		-2
Proliferation-associated					
Insulin induced gene 1 (INSIG1/CL-6)	AW663903			Liver regeneration	-2.3
Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	U29343		↓[i]	Cell motility, oncogenic activity[9]	-2.1
FSH primary response (LRPR1)	NM_006733			FSH proliferative response	-2.1
Six-transmembrane epithelial protein of the prostate (STEAP)	AC004969			Overexpressed in carcinomas, potential membrane transporter[10]	-2.1
Other					
Rabkinesin-6	NM_005733		↓[d]	Golgi, intracellular transport	-3
Vaccinia related kinase 1	AA312869		↓[d]	p53 phosphorylation, possible Mdm-2 interference	-3
Protein kinase C, theta	L07032		↓[d]	Signal transduction	-2.4
Ubiquitin carrier protein	AI571293			Proteolysis, downregulated in aging[3]	-2.2
Actin, γ1	NM_001614				-2.1
KIAA0008	D13633		↓[1]		-4.6
KIAA0101	D14657	↓[4]	↓[1]		-4
KIAA0056	AF070553				-2.3
KIAA0225	D86978				-2.1

[a] Known changes in gene expression upon ectopic overexpression of p53 or p21

[b] B.D.E., balanced differential expression (from Incyte UniGem V 2.0 hybridization analysis), in almost all cases underestimates the actual fold difference observed by RT-PCR

[c] Two clones in the array were found to be derived from the same gene, the B.D.E. values for both clones are shown

[d] effects of p21 induction in HT1080 fibrosarcoma cells, as determined by microarray hybridization (our unpublished data, not included in the original report [1]).

[e] not detected by microarray hybridization but identified by RT-PCR

Reference List

1. B. D. Chang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 97, 4291-4296 (2000).
2. H. Ye, A. X. Holterman, K. W. Yoo, R. R. Franks, R. H. Costa, *Mol.Cell Biol.* 19, 8570-8580 (1999).
3. D. H. Ly, D. J. Lockhart, R. A. Lerner, P. G. Schultz, *Science* 287, 2486-2492 (2000).
4. R. Zhao et al., *Genes Dev.* 14, 981-993 (2000).
5. K. Kannan, N. Amariglio, G. Rechavi, D. Givol, *FEBS Lett.* 470, 77-82 (2000).
6. P. Arizti et al., *Mol.Cell Biol.* 20, 7450-7459 (2000).
7. H. Zhou et al., *Nat.Genet.* 20, 189-193 (1998).
8. D. Perrotti et al., *EMBO J.* 17, 4442-4455 (1998).
9. C. L. Hall et al., *Cell* 82, 19-26 (1995).
10. R. S. Hubert et al., *Proc Natl.Acad Sci.U.S.A* 96, 14523-14528 (1999).

Table 2. Genes upregulated in senescent relative to proliferating cell fractions in HCT116 cells separated after doxorubicin treatment (genes confirmed by RT-PCR are shown in boldface)

Table 2A

Gene Name	Accession Number	Effects of[a]:		Notes	B.D.E.[b]
		p53	p21		
Transcription factors					
X-box binding protein 1 (XBP-1/HTF/TREB)	AW021229			bZIP domain, c-Jun family, dimerizes with Fos[1]	3.9
Activating transcription factor 3 (ATF3)	N39944	↑[2]		bZIP domain, dimerizes with c-Jun[3]	3.3
C-JUN	AI078377			AP-1, stress response[4]	2.5
ELF-1	AW503166			ets domain factor, expressed in lymphoid and epithelial tissues[5]	2.4
Ring finger protein 3 (RNF3)	AA403225		↑[d]	homolog of 73Ah regulator of Drosophila	2.3
Homolog of Drosophila muscleblind B protein (MBLL)	AF061261			C3H-type zinc finger protein	2.3
SOX9/SRY (sex-determining region Y)	NM_000346			HMG domain, retinoid-inducible[6], involved in chondrocyte differentiation[7],	2.2
Sjogren syndrome antigen A2 (60kD, ribonucleoprotein SS-A/Ro)	U44388			Putative transcription regulator	2.1
Core promoter element binding protein (CPBP/ZF9/KLF8)	AL037865			Kruppel-like family transcription factor, activates keratin-4 promoter[8]	2
Growth inhibitors, intracellular					
Epithelial Protein Lost in Neoplasms (EPLIN)	AL048161			Decreased in multiple carcinomas[11]	3.5
B-cell translocation gene 1 (BTG1)	AI560266			Tumor suppressor[12]	2.8
B-cell translocation gene 2 (BTG2)	NM_006763	↑[13]		Tumor suppressor[13]	2.1
WIP1	NM_003620	↑[14]		p53-inducible protein phosphatase[14]	2
Growth inhibitors, secreted					
Maspin	AA316156, AI435384	↑[15]		Serine protease inhibitor, downregulated in neoplasms, inhibits tumor growth, metastasis, angiogenesis[16], upregulated in aging[17]	5.2, 3.3[c]

MIC-1 (Prostate differentiation factor, PTGF-β, PLAB)	AB000584	↑[18]		TGF-β family, downregulated in cancers, induces growth arrest and apoptosis[19]	2.9
Insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP-6)	AA675888			Retinoid-inducible[20]	2.7
Amphiregulin	NM_001657			EGF/TGFα family secreted factor, promotes growth of normal epithelial cells but inhibits carcinomas[21], WT1-inducible[22]	2.3
Other growth regulators					
CD44 antigen	X66733, X55150			Adhesion molecule, growth modulator[23], upregulated in aging[17]	3.9, 2.1[c]
Jagged-1	U61276			Notch ligand, stem cell growth, angiogenic factor[24]	2
Cell adhesion and cell-cell contact					
P-cadherin	NM_001793			Lost in prostate cancer[36]	2.9
Desmoplakin (DPI, DPII)	J05211			Decreased in neoplasms[37], upregulated in aging[38]	2.4
PM5 protein (collagenase-related)	X57398			Homologous to cell adhesion proteins	2.2
CD63/ME491 antigen	X62654				2.1
Mac-2 binding protein	X79089		↑[28]	ECM organizer[39]	2
Occludin	U53823			Tight junction protein	2.1
ECM receptors					
Integrin β4	X53587				2.6
Laminin, α3 (nicein/kalinin/BM600/epilegrin)	L34155				2.4
Syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	D79206, NM_002999			Involved in wound repair and angiogenesis[40]	2.3, 2.2[c]
Integrin α6	X53586				2.2
Transmembrane signaling					
AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	M80899			Activates PLC-γ[41], decreased in neuroblastomas[42]	2.1
CD24 antigen	AI745625			Mucin-like glycoprotein,upregulated in breast carcinoma[43]	2.1
Lipocortin-2 (annexin A2)	W53011			Substrate of src tyrosine kinase	2

Ion transport and ion exchange					
Phospholemman-like, 8kD (MAT-8)	AA826766			Chloride channel activator	2.3
Ferritin, heavy polypeptide 1	AW575826		↑[d]	Iron storage	2.8
Caveolin 2	AI093287			Membrane compartmentalization	2.2
Neurogranin	Y09689		↑[d]	Calmodulin binding protein, neural	2.2
H1 chloride channel	AI381979			Colocalizes with caveolin[44]	2
Intracellular trafficking, cytoskeletal and scaffolding					
Interferon-induced protein 56 (IFI-56K/P56)	NM_001548			Tetratricopeptide protein, Int6 interaction[45]	3.2
Major vault protein (lung resistance protein, LRP)	X79882			Stress response, multidrug resistance	2.4
Macrophin (microfilament and actin filament cross-linker protein)	AB029290			Cytoskeletal	2.4
Microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	L06237			Cytoskeletal, CK2 substrate	2
Proapoptotic					
NOXA	D90070	↑[46]		Bcl2 family member[46]	2.7
Fas antigen/APO-1	M67454	↑[47]		Apoptotic signal receptor	2.3
Keratins					
Keratin 18	X12881			Antiapoptotic[48]	4
Keratin 8	X74929	↑[49]		Antiapoptotic[48]	3.4
Keratin 2A	AF019084				2.9
Keratin 7	M13955, AA307373				2.6 2.1[c]
Keratin 15	NM_002275				2.3
Keratin 6B	L42611				2.1
Other					
High mobility group protein HMG2 homolog	AI191623				5.4
U1 small ribonucleoprotein 1SNRP homolog	AI400786				3.7
Retinaldehyde dehydrogenase 3 (ALDH6/RALDH3)	U07919			Retinoic acid synthesis	3.2

Tumor differentially expressed 1 (TDE1)	NM_006811			Transmembrane protein, homologous to mouse gene increased in testicular tumors[50]	2.4
Apolipoprotein E	K00396			Alzheimer's, atherosclerosis	2
Incyte EST	X62654				2.1
23815 human mRNA	U90916				2.1
Table 2B					
Growth regulators, intracellular					
p21 (Waf1/Cip1/Sdi1)	AA481712	↑[9]		Pleiotropic inhibitor of cyclin-CDK complexes, inhibits or stimulates various transcription factors and cofactors[10]	5.1
Cyclin D1 (Bcl-1)	M73554, X59798	↑[25]	↑[25]	G1/S transition; coregulated with p21 in cancers[26]	2.8, 2.2[c]
Serum-inducible kinase (Snk, polo-like)	NM_006622			Putative cell growth regulator	2.2
Mitogenic/antiapoptotic factors, secreted					
CYR61	Y12084			Mitogenic/angiogenic factor[27]	3.3
Prosaposin	J03015		↑[28]	Antiapoptotic/mitogenic[29] upregulated in aging[30]	2.3
Transforming growth factor α (TGFα)	X70340	↑[31]		EGF-related mitogen[32]	2
Proteases					
Kallikrein 7 (serine protease 6)	L33404			Upregulated in ovarian carcinoma[33]	3.2
Calpain-L2	M23254				2.3
Neurosin (serine protease 9, Zyme, Protease M)	NM_002774			Downregulated in breast cancers[34], upregulated in ovarian carcinoma[35]	2
Plasminogen activator, urokinase	D11143				2
Other					
Amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP)	X06989		↑[28]	Alzheimer's disease amyloid precursor	2
Integral membrane protein 2B (BRI/ITM2B)	AW131784			Amyloid precursor in familial British dementia[51]	2

[a] Known changes in gene expression upon ectopic overexpression of p53 or p21

[b] B.D.E., balanced differential expression (from Incyte UniGem V 2.0 hybridization analysis), in almost all cases underestimates the actual fold difference observed by RT-PCR

[c] Two clones in the array were found to be derived from the same gene, the B.D.E. values for both clones are shown

[d] effects of p21 induction in HT1080 firbrosarcoma cells, as determined by microarray hybridization (our unpublished data, not included in the original report [28]).

Reference List

1. A. M. Reimold et al., *Genes Dev.* 14, 152-157 (2000).
2. T. Hai, C. D. Wolfgang, D. K. Marsee, A. E. Allen, U. Sivaprasad, *Gene Expr.* 7, 321-335 (1999).
3. C. D. Wolfgang, G. Liang, Y. Okamoto, A. E. Allen, T. Hai, *J.Biol.Chem.* 275, 16865-16870 (2000).
4. D. Bohmann et al., *Science* 238, 1386-1392 (1987).
5. A. G. Bassuk, K. P. Barton, R. T. Anandappa, M. M. Lu, J. M. Leiden, *Mol.Med.* 4, 392-401 (1998).
6. O. J. Marshall and V. R. Harley, *Mol.Genet.Metab* 71, 455-462 (2000).
7. W. Huang, U. I. Chung, H. M. Kronenberg, B. de Crombrugghe, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 160-165 (2001).
8. J. Okano et al., *FEBS Lett.* 473, 95-100 (2000).
9. W. S. El Deiry et al., *Cell* 75, 817-825 (1993).
10. G. P. Dotto, *Biochim.Biophys.Acta* 1471, M43-M56 (2000).
11. R. S. Maul and D. D. Chang, *Oncogene* 18, 7838-7841 (1999).
12. J. P. Rouault et al., *EMBO J.* 11, 1663-1670 (1992).
13. J. P. Rouault et al., *Nat.Genet.* 14, 482-486 (1996).
14. M. Fiscella et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 6048-6053 (1997).
15. Z. Zou et al., *J.Biol.Chem.* 275, 6051-6054 (2000).
16. F. E. Domann, J. C. Rice, M. J. Hendrix, B. W. Futscher, *Int.J.Cancer* 85, 805-810 (2000).
17. C. K. Lee, R. Weindruch, T. A. Prolla, *Nat.Genet.* 25, 294-297 (2000).
18. M. Tan, Y. Wang, K. Guan, Y. Sun, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 109-114 (2000).
19. P. X. Li et al., *J.Biol.Chem.* 275, 20127-20135 (2000).
20. Y. P. Dailly, Y. Zhou, T. A. Linkhart, D. J. Baylink, D. D. Strong, *Biochim.Biophys.Acta* 1518, 145-151 (2001).

21. G. D. Plowman et al., *Mol.Cell Biol.* 10, 1969-1981 (1990).
22. S. B. Lee et al., *Cell* 98, 663-673 (1999).
23. P. Herrlich et al., *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 910, 106-118 (2000).
24. L. Walker et al., *Stem Cells* 17, 162-171 (1999).
25. X. Chen, J. Bargonetti, C. Prives, *Cancer Res.* 55, 4257-4263 (1995).
26. J. S. de Jong, P. J. van Diest, R. J. Michalides, J. P. Baak, *Mol.Pathol.* 52, 78-83 (1999).
27. A. M. Babic, M. L. Kireeva, T. V. Kolesnikova, L. F. Lau, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 6355-6360 (1998).
28. B. D. Chang et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4291-4296 (2000).
29. M. Hiraiwa, E. M. Taylor, W. M. Campana, S. J. Darin, J. S. O'Brien, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4778-4781 (1997).
30. P. P. Mathur et al., *Biochem.Mol.Biol.Int.* 34, 1063-1071 (1994).
31. T. H. Shin, A. J. Paterson, J. E. Kudlow, *Mol.Cell Biol.* 15, 4694-4701 (1995).
32. V. Kumar, S. A. Bustin, I. A. McKay, *Cell Biol.Int.* 19, 373-388 (1995).
33. H. Tanimoto et al., *Cancer* 86, 2074-2082 (1999).
34. A. Anisowicz, G. Sotiropoulou, G. Stenman, S. C. Mok, R. Sager, *Mol.Med.* 2, 624-636 (1996).
35. H. Tanimoto, L. J. Underwood, K. Shigemasa, T. H. Parmley, T. J. O'Brien, *Tumour.Biol.* 22, 11-18 (2001).
36. D. F. Jarrard et al., *Clin.Cancer Res.* 3, 2121-2128 (1997).
37. A. Hiraki et al., *Br.J.Cancer* 73, 1491-1497 (1996).
38. D. H. Ly, D. J. Lockhart, R. A. Lerner, P. G. Schultz, *Science* 287, 2486-2492 (2000).
39. T. Sasaki, C. Brakebusch, J. Engel, R. Timpl, *EMBO J.* 17, 1606-1613 (1998).
40. F. Echtermeyer et al., *J.Clin.Invest* 107, R9-R14 (2001).
41. F. Sekiya, Y. S. Bae, D. Y. Jhon, S. C. Hwang, S. G. Rhee, *J.Biol.Chem.* 274, 13900-13907 (1999).
42. E. Shtivelman, F. E. Cohen, J. M. Bishop, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5472-5476 (1992).
43. M. Fogel et al., *Cancer Lett.* 143, 87-94 (1999).
44. J. C. Edwards, *Am.J.Physiol* 276, F398-F408 (1999).
45. J. Guo and G. C. Sen, *J.Virol.* 74, 1892-1899 (2000).
46. E. Oda et al., *Science* 288, 1053-1058 (2000).
47. M. Muller et al., *J.Exp.Med.* 188, 2033-2045 (1998).
48. C. Caulin, C. F. Ware, T. M. Magin, R. G. Oshima, *J.Cell Biol.* 149, 17-22 (2000).
49. T. Mukhopadhyay and J. A. Roth, *Anticancer Res.* 16, 105-112 (1996).
50. M. Bossolasco, M. Lebel, N. Lemieux, A. M. Mes-Masson, *Mol.Carcinog.* 26, 189-200 (1999).
51. R. Vidal et al., *Nature* 399, 776-781 (1999).

Table 3

PCR Amplification Primer Sequences

Gene	Sense (5'-3')	SEQ ID NO	Antisense (5'-3')	SEQ ID NO
AIK1	TGGAATATGCACCACTTGGA	1	TTCTCTGAGCATTGGCCTCT	63
AIK2 (AIM1)	TGGGACACCCGACATCTTA	2	GCTCTTCTGCAGCTCCTTGTA	64
APRIL	TGCCCCAGCTTACCTACTTG	3	AATCCATGAGCAGTCCAACC	65
BRCA1	AAGACAGAGCCCCAGAGTCA	4	GACCTTGGTGGTTTCTTCCA	66
BUBR1	GAAGCCGAGCTATTGACCAG	5	GCCTGTGATAATGGCATCCT	67
CDC2	AAGCCGGGATCTACCATACC	6	GGCCAAAATCAGCCAGTTTA	68
CDC20	GAGGTGCAGCTATGGGATGT	7	TGTAATGGGGAGACCAGAGG	69
CDC47	CGACAGGTGGTACAGGGTTT	8	CAGCCATCTTGTCGAACTCA	70
CENP-E	GTTGATCTTGCAGGCAGTGA	9	TCACCAGCATCCGTGTTAAG	71
Condensin H (XCAP-H)	ACGACACCTCCAACTTTTGC	10	CCGCTAAGCATCTTCTCGTC	72
GRCC8	CAGGTGTTTTCCAAGGAGGA	11	GCTGTGAGTCCCAGTTTGGT	73
HEX1 (RAD2)	ACTGCGTGGGATTGGATTAG	12	TCTTGAATGGGCAGGCATAG	74
HFH-11B (MPP2, Trident)	TTCACAGCATCATCACAGCA	13	TCGAAGGCTCCTCAACCTTA	75
HMG1	AGGGAGTTGTCAAGGCTGAA	14	CTGTGCCCAAACAAGAACCT	76
HPV 16E1-BP (TRIP13)	GACTCACAGCCCATCGATTT	15	CACCAGGGCGTCTTTATCAT	77
Ki67	CAGACTCCATGTGCCTGAGA	16	CCCTGGAGAACATAGGCAAA	78
KIAA0008	GCCAAGGGCAATGAAAACTA	17	ACCTGCTTTGCTGCTTGAGT	79
KIAA0101	CTGAAGAGGCAGGAAGCAGT	18	TGGCACCATTCCAATAATCA	80
KIAA0166 (rod)	GCAGCTCAAAGTCCACATCA	19	GGCCTTGCCCTCTTTAGAAT	81
MAD2	TGGCCGAGTTCTTCTCATTC	20	CGCACTTCCTCAGAATTGGT	82

(100) JP 2009-77714 A 2009.4.16

Gene	Sense (5'-3')	SEQ ID NO	Antisense (5'-3')	SEQ ID NO
Pericentrin	CAGCCAGGTCTCCATTTTGT	21	AGCTTCGTCTCCCAGCATAA	83
PLK1	AAGAGATCCCCGGAGGTCCTA	22	TCCCACACAGGGTCTTCTTC	84
Ribonucleotide reductase M1	ACCAGCAAAGATGAGGTTGC	23	GCATCGGGGCAATAAGTAAA	85
STEAP	GCCCTTCAGAACTTCAGCAC	24	GCTCAATCCAGGCATCTTCT	86
Survivin	GGACCACCGCATCTCTACAT	25	CTGGTGCCACTTTCAAGACA	87
TopoII a	AGGTGGTCGAAATGGCTATG	26	CACTTCCCACCTGTGGTTTAC	88
ZWint (MPP5)	CAGAACCAGTGGCAGCTACA	27	AATGATGGTTGGGAGGTGAG	89
Amphiregulin	CATTATGCTGCTGGATTGGA	28	TCATGGACTTTTCCCCACAC	90
APR (NOXA)	CCGGCAGAAACTTCTGAATC	29	GTGCTGAGTTGGCACTGAAA	91
ATF3	GCTGGAATCAGTCACTGTCA	30	GCCTTCAGTTCAGCATTCAC	92
bAPP	CTCGTTCCTGACAAGTGCAA	31	TGTTCAGAGCACACCTCTCG	93
BRI	AGAAGAGCCTGGTGTTGGTG	32	GCAAATAGGTTCCAGCCTTG	94
BTG1	CCGTGTCCTTCATCTCCAAG	33	TCCATAATCCATCCCCAAGA	95
BTG2	AACAGGCCACCACATACCTC	34	CTCTGCCCAGGACCTCATTA	96
Calpain L2	GCAGGGATCTTTCACTTCCA	35	AGCTTGGGCAGTTGTCATTC	97
CD44	CTGCCGCTTTGCAGGTGTAT	36	TAGCAGGGATTCTGTCTGTG	98
C-JUN	ATGAGGAACCGCATCGCTGCCT	37	GACCAAGTCCTTCCCACTCGTG	99
Cyclin D1	AGGTCTGCGAGGAACAGAAG	38	AGCGTGTGAGGCGGTAGTAG	100
CYR61	GAAAGTTTCCAGCCCAACTG	39	TACACTGGCTGTCCACAAGG	101
ELF-1	TGTGGATCTAAGGGGGAATGC	40	TCTTGCACCTGCTGTGTTTC	102
EPLIN b	AGAAAGGGGACCCTGACTGT	41	AAGATCCTCACCGTCCTTGA	103
FAS (APO-1)	ATTGCTCAACAACCATGCTG	42	GTTGCTGGTGAGTGTGCATT	104
IGFBP-6	AACCGCAGAGACCAACAGAG	43	GACCCCAAGCACAGCTTTAT	105
Integrin b4	GTGACTGTCCCCTCAGCAAT	44	CAGCAGGCACAGTACTTCCA	106
Jagged-1	TGCCTCTGTGAGACCAACTG	45	TCACAATTCTGACCCATCCA	107
Keratin 18	CAGCATGAGCTTCACCACTC	46	CTCCTTCTCGTTCTGGATGC	108
LRP	AGATCATTCAGGCCACCATC	47	CCGACAGCACATACACATCC	109

Gene	Sense (5'-3')	SEQ ID NO	Antisense (5'-3')	SEQ ID NO
MAC2-BP	ACCATGAGTGTGGATGCTGA	48	ACAGGGACAGGTTGAACTGC	110
MASPIN	CCCTATGCAAAGGAATTGGA	49	CAAGCCTGTGGACTCATCCT	111
MBLL	TCCTGTTCCTTGGATTGGAC	50	AAAGTGGGCACTGGATGAAG	112
MIC-1	CGGATACTCACGCCAGAAGT	51	CACATGGTCACTTGCACCTC	113
p21WAF	GGAAGACCATGTGGACCTGT	52	ATGCCCAGCACTCTTAGGAA	114
P-cadherin	GTGACAGCCACAGATGAGGA	53	TTTGGCCTCAAAATCCAAAC	115
Prosaposin	CCAGAGCTGGACATGACTGA	54	GTCACCTCCTTCACCAGGAA	116
PRSS6 (Kallikrein 7)	ATGGCAAGATCCCTTCTCCT	55	GGTCAGAGGGAAAGGTCACA	117
PRSS9 (Neurosin)	GGGGTCCTTATCCATCCACT	56	GGGATGTTACCCCATGACAC	118
RNF3	AGACATCAAGGGGGAGACCT	57	CACCCAGAGGCAATGTTCTT	119
SOX-9	GGTTGTTGGAGCTTTCCTCA	58	TAGCCTCCCTCACTCCAAGA	120
Syndecan 4	TCGATCCGAGAGACTGAGGT	59	GGTTTCTTGCCCAGGTCATA	121
TGFa	CAGGTCCGAAAACACTGTGA	60	AATTCTGTTGTGGGGAGGTG	122
WIP1	CGACCTCGACTCACTCACAA	61	ATGGGGAAGGAGTCATCACA	123
XBP-1	TAGCAGCTCAGACTGCCAGA	62	ACTGGGTCCAAGTTGTCCAG	124

SEQUENCE LISTING

<110> Roninson, Igor

<120> Reagents and Methods for Identifying and Modulating Expression of Tumor Senescence Genes

<130> 99,216-S

<160> 124

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
tggaatatgc accacttgga 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2
tgggacaccc gacatctta 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3
tgccccagct tacctacttg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4
aagacagagc cccagagtca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5
gaagccgagc tattgaccag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6
aagccgggat ctaccatacc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7
gaggtgcagc tatgggatgt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8
cgacaggtgg tacagggttt 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9
gttgatcttg caggcagtga 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10
acgacacctc caacttttgc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11
caggtgtttt ccaaggagga 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12
actgcgtggg attggattag 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13
ttcacagcat catcacagca 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14
agggagttgt caaggctgaa 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15
gactcacagc ccatcgattt 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16
cagactccat gtgcctgaga 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17
gccaagggca atgaaaacta 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18
ctgaagaggc aggaagcagt 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
gcagctcaaa gtccacatca 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
tggccgagtt cttctcattc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21
cagccaggtc tccattttgt 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22
aagagatccc ggaggtccta 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23
accagcaaag atgaggttgc 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24
gcccttcaga acttcagcac 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25
ggaccaccgc atctctacat 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26
aggtggtcga aatggctatg 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27
cagaaccagt ggcagctaca 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28
cattatgctg ctggattgga 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29
ccggcagaaa cttctgaatc 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30
gctggaatca gtcactgtca 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31
ctcgttcctg acaagtgcaa 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32
agaagagcct ggtgttggtg 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33
ccgtgtcctt catctccaag 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34
aacaggccac cacatacctc 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35
gcagggatct ttcacttcca 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36
ctgccgcttt gcaggtgtat 20

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37
atgaggaacc gcatcgctgc ct 22

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38
aggtctgcga ggaacagaag 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39
gaaagtttcc agcccaactg 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40
tgtggatcta aggggaatgc 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41
agaaagggga ccctgactgt 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42
attgctcaac aaccatgctg 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43
aaccgcagag accaacagag 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44
gtgactgtcc cctcagcaat 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45
tgcctctgtg agaccaactg 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46
cagcatgagc ttcaccactc 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47
agatcattca ggccaccatc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48
accatgagtg tggatgctga 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49
ccctatgcaa aggaattgga 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50
tcctgttcct tggattggac 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51
cggatactca cgccagaagt 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52
ggaagaccat gtggacctgt 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53
gtgacagcca cagatgagga 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54
ccagagctgg acatgactga 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55
atggcaagat cccttctcct 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56
ggggtcctta tccatccact 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57
agacatcaag ggggagacct 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58
ggttgttgga gctttcctca 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59
tcgatccgag agactgaggt 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60
caggtccgaa aacactgtga 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 61
cgacctcgac tcactcacaa 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62
tagcagctca gactgccaga 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63
ttctctgagc attggcctct 20

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64
gctcttctgc agctccttgt a 21

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65
aatccatgag cagtccaacc 20

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66
gaccttggtg gtttcttcca 20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67
gcctgtgata atggcatcct 20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 68
ggccaaaatc agccagttta 20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 69
tgtaatgggg agaccagagg 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70
cagccatctt gtcgaactca 20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71
tcaccagcat ccgtgttaag 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72
ccgctaagca tcttctcgtc 20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73
gctgtgagtc ccagtttggt 20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 74
tcttgaatgg gcaggcatag 20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75
tcgaaggctc ctcaaccttа 20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 76
ctgtgcccaa acaagaacct 20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 77
caccagggcg tctttatcat 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 78
ccctggagaa cataggcaaa 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 79
acctgctttg ctgcttgagt 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 80
tggcaccatt ccaataatca 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 81
ggccttgccc tctttagaat 20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 82
cgcacttcct cagaattggt 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83
agcttcgtct cccagcataa 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84
tcccacacag ggtcttcttc 20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85
gcatcggggc aataagtaaa 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 86
gctcaatcca ggcatcttct 20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 87
ctggtgccac tttcaagaca 20

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 88
cacttcccac ctgtggttta c 21

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 89
aatgatggtt gggaggtgag 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 90
tcatggactt ttccccacac 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 91
gtgctgagtt ggcactgaaa 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 92
gccttcagtt cagcattcac 20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 93
tgttcagagc acacctctcg 20

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 94
gcaaataggt tccagccttg 20

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 95
tccataatcc atccccaaga 20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 96
ctctgcccag gacctcatta 20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 97
agcttgggca gttgtcattc 20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 98
tagcagggat tctgtctgtg 20

<210> 99

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 99
gaccaagtcc ttcccactcg tg 22

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 100
agcgtgtgag gcggtagtag 20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 101
tacactggct gtccacaagg 20

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 102
tcttgcacct gctgtgtttc 20

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 103
aagatcctca ccgtccttga 20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 104
gttgctggtg agtgtgcatt 20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 105
gaccccaagc acagctttat 20

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 106
cagcaggcac agtacttcca 20

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 107
tcacaattct gacccatcca 20

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 108
ctccttctcg ttctggatgc 20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 109
ccgacagcac atacacatcc 20

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 110
acagggacag gttgaactgc 20

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 111
caagcctgtg gactcatcct 20

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 112
aaagtgggca ctggatgaag 20

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 113
cacatggtca cttgcacctc 20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 114
atgcccagca ctcttaggaa 20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 115
tttggcctca aaatccaaac 20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 116
gtcacctcct tcaccaggaa 20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 117
ggtcagaggg aaaggtcaca 20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 118
gggatgttac cccatgacac 20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 119
cacccagagg caatgttctt 20

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 120
tagcctccct cactccaaga 20

<210> 121

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 121
ggtttcttgc ccaggtcata 20

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 122
aattctgttg tggggaggtg 20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 123
atggggaagg agtcatcaca 20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 124
actgggtcca agttgtccag 20

WE CLAIM:

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

(a) culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(b) assaying expression of at least one cellular gene in Table 2A in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound; and

(c) identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 2A is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound.

2. A method according to claim 1, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

3. A method according to claim 1, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

4. The method of claim 1, where expression of the cellular gene of Table 2A is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

5. The method of claim 1, wherein expression of the cellular gene of Table 2A is detected using an immunological reagent.

6. The method of claim 1, wherein expression of the cellular gene of Table 2A is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

7. The method of claim 1, wherein the cellular gene is BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin.

8. A method according to claim 1, wherein induction of at least one of the cellular genes in Table 2A is assayed using a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 2A and detecting increased expression of the reporter gene in the presence of the compound than in the absence of the compound.

9. A method according to claim 1, further comprising the steps of:

d) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

e) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

10. The method of claim 9, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

11. The method of claim 9, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

12. The method of claim 9, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(b) assaying expression of at least one cellular gene in Table 2A in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound;

(c) assaying the recombinant mammalian cell for cell growth and morphological features of senescence; and

(d) identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 2A is higher in the presence of the compound

than in the absence of the compound and the cells are growth-inhibited and express morphological features of senescence in the presence of the compound.

14. A method according to claim 13, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

15. A method according to claim 13, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

16. The method of claim 13, where expression of the cellular gene of Table 2A is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

17. The method of claim 13, wherein expression of the cellular gene of Table 2A is detected using an immunological reagent.

18. The method of claim 13, wherein expression of the cellular gene of Table 2A is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

19. The method of claim 13, wherein the cellular gene is BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin.

20. A method according to claim 13, wherein induction of at least one of the cellular genes in Table 2A is assayed using a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 2A and detecting increased expression of the reporter gene in the presence of the compound than in the absence of the compound.

21. A method according to claim 13 further comprising the steps of:

e) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

f) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

22. A method according to claim 20 further comprising the steps of:

f) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

f) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

23. The method of claims 21 or 22, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

24. The method of claims 21 or 22, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

25. The method of claims 21 or 22, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) producing a recombinant mammalian cell by introducing into said mammalian cell a recombinant expression construct comprising a promoter from a cellular gene in Table 2A operably linked to a reporter gene;

(b) culturing the recombinant mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(c) assaying expression of the reporter gene in said recombinant cell in the presence of the compound with expression of said reporter gene in the recombinant cell in the absence of the compound; and

(d) identifying compounds that induce senescence when gene expression of the reporter gene is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound.

27. A method according to claim 26, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

28. A method according to claim 26, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

29. The method of claim 26, wherein the promoter of the cellular gene is a promoter from BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin.

30. A method according to claim 26, further comprising the steps of:

e) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

f) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

31. The method of claim 30, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

32. The method of claim 30, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

33. The method of claim 30, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) producing a recombinant mammalian cell by introducing into said mammalian cell a recombinant expression construct comprising a

promoter from a cellular gene in Table 2A operably linked to a reporter gene;

(b) culturing the recombinant mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(c) assaying expression of the reporter gene in said recombinant cell in the presence of the compound with expression of said reporter gene in the recombinant cell in the absence of the compound;

(d) assaying the recombinant mammalian cell for cell growth and morphological features of senescence; and

(e) identifying compounds that induce senescence when reporter gene expression is higher in the presence of the compound than in the absence of the compound and the cells are growth-inhibited and express morphological features of senescence in the presence of the compound.

35. A method according to claim 34, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

36. A method according to claim 34, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

37. The method of claim 34, wherein the promoter of the cellular gene is a promoter from a BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin.

38. A method according to claim 34, further comprising the steps of:

f) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

g) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

39. The method of claim 38, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

40. The method of claim 38, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

41. The method of claim 38, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(b) assaying expression of at least one cellular gene in Table 1 in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound; and

(c) identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 1 is lower in the presence of the compound than in the absence of the compound.

43. A method according to claim 42, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

44. A method according to claim 42, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

45. The method of claim 42, where expression of the cellular gene of Table 1 is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

46. The method of claim 42, wherein expression of the cellular gene of Table 1 is detected using an immunological reagent.

47. The method of claim 42, wherein expression of the cellular gene of Table 1 is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

48. The method of claim 42, wherein the cellular gene is HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1.

49. A method according to claim 42, wherein inhibition of at least one of the cellular genes in Table 1 is assayed using a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 1 and detecting decreased expression of the reporter gene in the presence of the compound than in the absence of the compound.

50. A method according to claim 41, further comprising the steps of:

d) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

e) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

51. A method according to claim 48, further comprising the steps of:

d) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

e) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

52. The method of claims 50 or 51, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

53. The method of claims 50 or 51, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

54. The method of claims 50 or 51, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) culturing the mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(b) assaying expression of at least one cellular gene in Table 1 in said cell in the presence of the compound with expression of said gene in the cell in the absence of the compound;

(c) assaying the recombinant mammalian cell for cell growth and morphological features of senescence; and

(d) identifying compounds that induce senescence when expression of at least one cellular gene in Table 1 is lower in the presence of the compound than in the absence of the compound and the cells are growth-inhibited and express morphological features of senescence in the presence of the compound.

56. A method according to claim 55, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

57. A method according to claim 55, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

58. The method of claim 55, where expression of the cellular gene of Table 1 is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

59. The method of claim 55, wherein expression of the cellular gene of Table 1 is detected using an immunological reagent.

60. The method of claim 55, wherein expression of the cellular gene of Table 1 is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

61. The method of claim 55, wherein the cellular gene is HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1.

62. A method according to claim 55, wherein inhibition of at least one of the cellular genes in Table 1 is assayed using a recombinant mammalian cell comprising a reporter gene operably linked to a promoter from a cellular gene in Table 1 and detecting decreased expression of the reporter gene in the presence of the compound than in the absence of the compound.

63. A method according to claim 55, further comprising the steps of:

e) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

f) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

64. A method according to claim 62, further comprising the steps of:

f) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

f) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

65. The method of claims 63 or 64, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

66. The method of claims 63 or 64, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

67. The method of claims 63 or 64, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) producing a recombinant mammalian cell by introducing into said mammalian cell a recombinant expression construct comprising a

promoter from a cellular gene in Table 1 operably linked to a reporter gene;

(b) culturing the recombinant mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(c) assaying expression of the reporter gene in said recombinant cell in the presence of the compound with expression of said reporter gene in the recombinant cell in the absence of the compound; and

(d) identifying compounds that induce senescence when expression of the reporter gene is lower in the presence of the compound than in the absence of the compound.

69. A method according to claim 68, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

70. A method according to claim 68, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

71. The method of claim 68, wherein the promoter of the cellular gene is a promoter from HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1.

72. A method according to claim 68, further comprising the steps of:

e) assaying expression of one or more genes Table 2B; and

f) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

73. The method of claim 72, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

74. The method of claim 72, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

75. The method of claim 72, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

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

(a) producing a recombinant mammalian cell by introducing into said mammalian cell a recombinant expression construct comprising a promoter from a cellular gene in Table 1 operably linked to a reporter gene;

(b) culturing the recombinant mammalian cell in the presence and absence of the compound;

(c) assaying expression of the reporter gene in said recombinant cell in the presence of the compound with expression of said reporter gene in the recombinant cell in the absence of the compound;

(d) assaying the recombinant mammalian cell for cell growth and morphological features of senescence; and

(e) identifying compounds that induce senescence when reporter gene expression is lower in the presence of the compound than in the absence of the compound and the cells are growth-inhibited and express morphological features of senescence in the presence of the compound.

77. A method according to claim 76, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

78. A method according to claim 76, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

79. The method of claim 76, wherein the promoter of the cellular gene is a promoter from HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1.

80. A method according to claim 76, further comprising the steps of:

g) assaying expression of one or more genes in Table 2B; and

g) identifying compounds wherein expression of the genes in Table 2B is not greater in the presence of the compound than in the absence of the compound.

81. The method of claim 80, where expression of the cellular gene of Table 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

82. The method of claim 80, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected using an immunological reagent.

83. The method of claim 80, wherein expression of the cellular gene of Table 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

84. A compound that induces senescence in a mammalian cell wherein the compound is identified according to a method of claim 9, 21, 22, 30, 38, 50, 51, 63, 64, 72 or 80.

85. A compound according to claim 84 that is a non-retinoid compound.

86. A method for assessing efficacy of a treatment of a disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth, the method comprising the steps of:

(a) obtaining a biological sample comprising cells from an animal having a disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth before treatment and after treatment;

(b) comparing expression of at least one gene in Table 1, 2A or 2B after treatment with expression of said genes before treatment; and

(c) determining that said treatment has efficacy for treating the disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth if expression of at least one gene in Table 2A and 2B is higher after treatment than before treatment or expression of at least one gene in Table 1 is lower after treatment than before treatment.

87. The method of Claim 86, wherein the biological sample comprises tumor cells.

88. The method of Claim 86, wherein the gene is a cellular gene in Table 2A.

89. The method of claim 88, wherein at least one cellular gene is BTG1, BTG2, EPLIN, WIP1, Maspin, MIC-1, IGFBP-6 or amphiregulin.

90. The method of Claim 86, wherein the gene is a cellular gene in Table 1.

91. The method of claim 90, wherein the cellular gene is HFH-11, STEAP, RHAMM, INSIG1, LRPR1.

92. The method of claim 86, where expression of the cellular gene of Tables 1, 2A or 2B is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

93. The method of claim 86, wherein expression of the cellular gene of Tables 1, 2A or 2B is detected using an immunological reagent.

94. The method of claim 86, wherein expression of the cellular gene of Tables 1, 2A or 2B is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

95. A method for treating a disease or condition relating to abnormal cell proliferation or neoplastic cell growth, the method comprising the steps of administering to an animal having said disease or condition a therapeutically effective amount of a compound produced according to the method of claims 9, 21, 22, 30, 38, 50, 51, 63, 64, 72 or 80 that induces senescence in abnormally proliferating or neoplastic cells.

96. The method of claim 95 wherein the compound is a non-retinoid compound.

97. A method for identifying a compound that inhibits senescence-associated induction of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

(a) contacting the cell with a cytotoxic agent at a concentration of said agent that inhibits cell growth;

(b) assaying the cell in the presence and absence of the compound for changes in expression of cellular genes induced when cells become senescent; and

(c) identifying the compound as an inhibitor of senescence-associated induction of cellular gene expression if expression of the cellular genes of subpart (b) is induced in the absence of the compound but is not induced in the presence of the compound.

98. The method of claim 97, wherein the cellular gene is cyclin D1, serum-inducible kinase, CYR61, prosaposin, transforming growth factor α (TGFα), kallikrein 7, calpain-L2, neurosin, plasminogen activator urokinase, amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP), or integral membrane protein 2B (BRI/ITM2B).

99. The method of claim 97, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

100. The method of claim 97, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

101. The method of claim 97, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

102. A method according to claim 97, wherein the mammalian cell is a p53 deficient cell.

103. A method according to claim 97, wherein the mammalian cell is a tumor cell.

104. A method for identifying a compound that inhibits senescence-associated induction of cellular gene expression, the method comprising the steps of:

(a) producing a recombinant mammalian cell by introducing into said mammalian cell a recombinant expression construct comprising a promoter from cyclin D1, serum-inducible kinase, CYR61, prosaposin, transforming growth factor α (TGFα), kallikrein 7, calpain-L2, neurosin, plasminogen activator urokinase, amyloid beta (A4) precursor protein (βAPP), or integral membrane protein 2B (BRI/ITM2B) operably linked to a reporter gene;

(b) contacting the cell with a cytotoxic agent at a concentration of said agent that inhibits cell growth;

(c) assaying expression of the reporter gene in said recombinant cell in the presence of the compound with expression of said reporter gene in the recombinant cell in the absence of the compound

(d) identifying the compound as an inhibitor of senescence-associated induction of cellular gene expression if expression of the cellular genes of subpart (c) is induced in the absence of the compound but is not induced in the presence of the compound.

105. The method of claim 104, where expression of the cellular gene is detected by hybridization to a complementary nucleic acid.

106. The method of claim 104, wherein expression of the cellular gene is detected using an immunological reagent.

107. The method of claim 104, wherein expression of the cellular gene is detected by assaying for an activity of the cellular gene product.

108. A method for determining treatment efficacy in an animal treated with a compound that induces cellular senescence, the method comprising the steps of:

(a) assaying a biological fluid from the animal before and after treatment for a senescence marker; and

(b) determining that the treatment is effective when the amount of the marker detected after treatment is greater than the amount of the marker detected before treatment.

109. The method of claim 108, wherein the senescence marker is maspin, MIC-1, IGFBP-6, or amphiregulin.

110. The method of claim 108, wherein the bodily fluid is blood, urine, effusions, ascitic fluid, saliva, cerebrospinal fluid, cervical secretions, vaginal secretions, endometrial secretions, gastrointestinal secretions, bronchial secretions, sputum, or secretions or washings from the breast.

111. The method of claim 108, where the senescence marker is detected by hybridization to a complementary nucleic acid, using an immunological reagent or by assaying for an activity of the cellular gene product.

(57) Abstract: This invention identifies tumor senescence genes induced by treatment with cytotoxic agents. The invention provides reagents and methods for identifying compounds that induce expression of these cellular genes and produce cellular senescence, particularly senescence in tumor cells. The invention also provides reagents that are recombinant mammalian cells containing recombinant expression constructs that express a reporter gene under the transcriptional control of a promoter for a gene the expression of which is modulated in senescent cells, and methods for using such cells to identify compounds that modulate expression of these cellular genes.

Representative Drawing

None

FIG. 1A

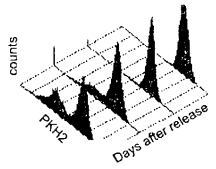


FIG. 1B

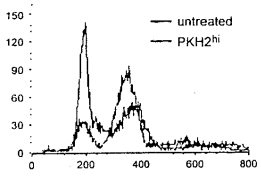
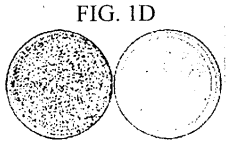


FIG. 1C

FIG. 1D



Proliferating ($PKH2^{lo}$) Growth-arrested ($PKH2^{hi}$)

FIG. 2A

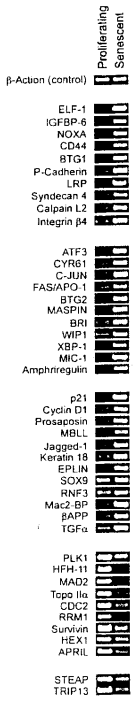


FIG. 2B

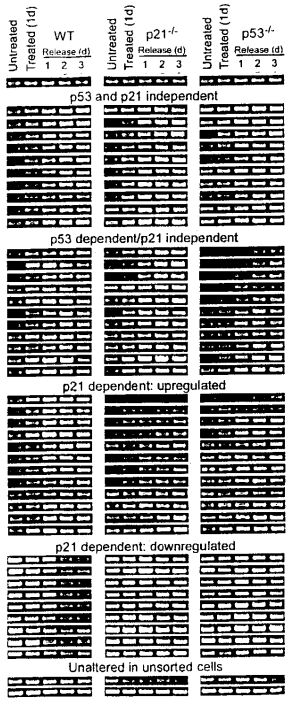


FIG. 3A

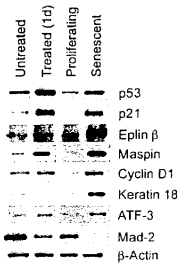
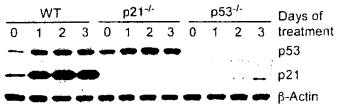

Untreated
Treated (1d)
Proliferating
Senescent
p53
p21
Eplin β
Maspin
Cyclin D1
Keratin 18
ATF-3
Mad-2
β-Actin

FIG. 3B


WT
p21-/-
p53-/-
0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3
Days of treatment
p53
p21
β-Actin

专利名称(译)	用于鉴定和调节肿瘤衰老基因表达的试剂和方法		
公开(公告)号	JP2009077714A	公开(公告)日	2009-04-16
申请号	JP2008238858	申请日	2008-09-18
申请(专利权)人(译)	伊利诺伊大学的董事会		
[标]发明人	ロニンソンイゴアビー チャンベイディー		
发明人	ロニンソン、 イゴア ビー. チャン、 ベイ-ディー		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53 C12N15/09 C12N C12N1/00 C12N15/00		
CPC分类号	G01N33/5011 C12Q1/6886 C12Q2600/136		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53.M C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA03 4B024/BA08 4B024/BA14 4B024/BA15 4B024/BA16 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ22 4B063/QQ27 4B063/QQ36 4B063/QQ43 4B063/QQ49 4B063/QQ79 4B063/QR02 4B063/QR07 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB261		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一		
优先权	60/394121 2002-07-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种鉴定化合物的方法，该化合物的表达调节与哺乳动物肿瘤细胞衰老进程有关的基因的表达。 鉴定了通过用细胞毒性剂治疗诱导的肿瘤衰老基因。 用于鉴定诱导这些细胞基因表达并引起细胞衰老的化合物的试剂和方法，特别是在肿瘤细胞中。 另外，是一种重组哺乳动物细胞的试剂，其包含重组表达构建体，该重组表达构建体在衰老细胞中调节其表达的基因启动子的转录控制下表达报道基因。 以及鉴定调节这些细胞基因表达的化合物的方法。 [选择图]无