

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-537007**(P2005-537007A)**

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B O 2 9
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-532691 (P2004-532691)	(71) 出願人	504445356
(86) (22) 出願日	平成15年8月19日 (2003.8.19)		オンコセラピー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月22日 (2005.2.22)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/010436	(71) 出願人	504137912
(87) 国際公開番号	W02004/021010		国立大学法人 東京大学
(87) 国際公開日	平成16年3月11日 (2004.3.11)		東京都文京区本郷7丁目3番1号
(31) 優先権主張番号	60-407,338	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成14年8月30日 (2002.8.30)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	中村 祐輔
			神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17番33号
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 結腸癌および胃癌の診断方法

(57) 【要約】

本明細書においては、結腸直腸癌および胃癌の検出および診断を目的とした方法を記載する。1つの態様において、その診断方法は、結腸癌細胞または胃癌細胞と正常細胞とを識別する結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現レベルを決定することを含む。本発明は、結腸癌の治療における有用な治療剤のスクリーニング方法、および結腸癌または胃癌に対するワクチンを対象に接種する方法をさらに提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下からなる群より選択される実質的に純粋なポリペプチド：

- (a) 配列番号：2、4、6、8、10、および12のアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (b) 1個以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加された配列番号：2、4、6、8、10、および12のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号：2、4、6、8、10、および12のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等な生物学的活性を有するポリペプチド；ならびに
- (c) 配列番号：1、3、5、7、9、および11のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされており、かつ配列番号：2、4、6、8、10、および12のいずれか1つのアミノ酸配列からなるポリペプチドと同等な生物学的活性を有するポリペプチド；

【請求項 2】

請求項1記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項2記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 4】

請求項2記載のポリヌクレオチドまたは請求項3記載のベクターを保有する宿主細胞。

【請求項 5】

以下の段階を含む、請求項1記載のポリペプチドを作製するための方法：

- (a) 請求項4記載の宿主細胞を培養する段階；
- (b) 宿主細胞にポリペプチドを発現させる段階；および
- (c) 発現したポリペプチドを収集する段階。

【請求項 6】

請求項1記載のポリペプチドと結合する抗体。

【請求項 7】

請求項2記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖と相補的であり、かつ少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項2記載のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNA。

【請求項 9】

配列番号：50のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：1のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 10】

配列番号：54または56のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：3のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 11】

配列番号：68のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：5のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 12】

配列番号：58、60、62、64、または66からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：7または9のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 13】

配列番号：52のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：11のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 14】

標的配列が配列番号：126のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：11のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対する低分子干渉RNA。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

標的配列が配列番号：127のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：3のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対する低分子干渉RNA。

【請求項 16】

標的配列が配列番号：128または129のヌクレオチド配列を含む、請求項8記載の配列番号：5のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに対する低分子干渉RNA。

【請求項 17】

患者に由来する生物学的試料におけるCGX1～7からなる群より選択される結腸癌関連遺伝子の発現レベルを決定する段階を含み、該遺伝子の正常対照レベルとの比較における該レベルの上昇が、対象が結腸癌に罹患しているまたは結腸癌を発症するリスクを有していることの指標となる、対象における結腸癌または結腸癌の発症の素因を診断する方法。 10

【請求項 18】

上昇が、正常対照レベルより少なくとも10%大きい、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

複数の結腸癌関連遺伝子の発現レベルを決定する段階をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

発現レベルが、以下からなる群より選択される方法のいずれか1つにより決定される、請求項17記載の方法：

(a) 結腸癌関連遺伝子のmRNAの検出； 20

(b) 結腸癌関連遺伝子によってコードされるタンパク質の検出；および

(c) 結腸癌関連遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性の検出。

【請求項 21】

発現レベルが、患者に由来する生物学的試料の遺伝子転写物と結腸癌関連遺伝子プローブとのハイブリダイゼーションを検出する段階により決定される、請求項17記載の方法。

【請求項 22】

ハイブリダイゼーション段階がDNAアレイ上で実施される、請求項21記載の方法。

【請求項 23】

生物学的試料が粘膜細胞を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 24】 30

生物学的試料が腫瘍細胞を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 25】

生物学的試料が結腸癌細胞を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 26】

CGX1～7からなる群より選択される2個以上の遺伝子の遺伝子発現パターンを含む、結腸癌参照発現プロファイル。

【請求項 27】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：

(a) CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドと被験化合物を接触させる段階； 40

(b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および

(c) ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階。

【請求項 28】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：

(a) CGX1～7からなる群より選択される1個以上のマーカー遺伝子を発現している細胞と候補化合物を接触させる段階；および

(b) CGX1～7からなる群より選択される1個以上のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。

【請求項 29】

被験細胞が結腸癌細胞を含む、請求項28記載の方法。 50

【請求項 3 0】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：
(a) CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドと被験化合物を接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および

(c) 被験化合物の非存在下で検出された生物学的活性と比較して、CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドの生物学的活性を抑制する化合物を選択する段階。

【請求項 3 1】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：
(a) CGX1～7からなる群より選択される1個以上のマーカー遺伝子の転写制御領域およびその転写制御領域の調節下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と、候補化合物を接触させる段階

(b) 該レポーター遺伝子の活性を測定する段階；ならびに

(c) 対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。

【請求項 3 2】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：
(a) 被験化合物の存在下、ARHCL1によってコードされるポリペプチドをザイキシンと接触させる段階；

(b) ポリペプチドとザイキシンとの結合を検出する段階；および

(c) ポリペプチドとザイキシンとの結合を阻害する被験化合物を選択する段階。

【請求項 3 3】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：
(a) 被験化合物の存在下、NFXL1によってコードされるポリペプチドをMGC10334またはCENPC1と接触させる段階；

(b) ポリペプチドとMGC10334またはCENPC1との結合を検出する段階；および

(c) ポリペプチドとMGC10334またはCENPC1との結合を阻害する被験化合物を選択する段階。

【請求項 3 4】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：
(a) 被験化合物の存在下、C20orf20によってコードされるポリペプチドをBRD8と接触させる段階；

(b) ポリペプチドとBRD8との結合を検出する段階；および

(c) ポリペプチドとBRD8との結合を阻害する被験化合物を選択する段階。

【請求項 3 5】

以下の段階を含む、結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：
(a) 被験化合物の存在下、CCPUC1によってコードされるポリペプチドをnCLUと接触させる段階；

(b) ポリペプチドとnCLUとの結合を検出する段階；および

(c) ポリペプチドとnCLUとの結合を阻害する被験化合物を選択する段階。

【請求項 3 6】

CGX1～7からなる群より選択される1個以上の核酸配列と結合する検出試薬を含むキット。

【請求項 3 7】

CGX1～7からなる群より選択される核酸配列によってコードされる1個以上のポリペプチドと結合する検出試薬を含むキット。

【請求項 3 8】

CGX1～7からなる群より選択される2個以上の核酸配列と結合する核酸を含むアレイ。

【請求項 3 9】

10

20

30

40

50

CGX1～7からなる群より選択されるポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を投与する段階を含む、結腸癌を治療するための方法。

【請求項 4 0】

アンチセンスポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号：50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76のヌクレオチド配列からなる群より選択される、請求項39記載の方法。

【請求項 4 1】

低分子干渉RNAの標的配列が、配列番号：126～129のヌクレオチド配列を含む、請求項39記載の方法。

10

【請求項 4 2】

CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるタンパク質と結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を対象へ投与する段階を含む、対象における結腸癌を治療または予防するための方法。

【請求項 4 3】

CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンの薬学的有効量を対象へ投与する段階を含む、対象における結腸癌を治療または予防するための方法。

【請求項 4 4】

CGX1～7からなる群より選択されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを抗原提示細胞と接触させる段階、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはそのポリヌクレオチドを含むベクターを抗原提示細胞に導入する段階を含む、抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

20

【請求項 4 5】

抗原提示細胞を対象へ投与する段階をさらに含む、請求項44記載の抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

【請求項 4 6】

請求項27～35のいずれか一項記載の方法によって得られた化合物の薬学的有効量を投与する段階を含む、対象における結腸癌を治療または予防するための方法。

30

【請求項 4 7】

CGX1～7からなる群より選択されるポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を含む、結腸癌を治療または予防するための組成物。

【請求項 4 8】

CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるタンパク質と結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を含む、結腸癌を治療または予防するための組成物。

【請求項 4 9】

CGX1～7からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの薬学的有効量を含む、結腸癌を治療または予防するための組成物。

40

【請求項 5 0】

活性成分として請求項27～35のいずれか一項記載の方法によって選択された化合物の薬学的有効量と、薬学的に許容される担体とを含む、結腸癌を治療または予防するための組成物。

【請求項 5 1】

患者に由来する生物学的試料における胃癌関連遺伝子CGX8の発現レベルを決定する段階を含み、該遺伝子の正常対照レベルとの比較における該レベルの上昇が、対象が胃癌に罹患しているまたは胃癌を発症するリスクを有していることの指標となる、対象における胃癌または胃癌の発症の素因を診断する方法。

50

【請求項 5 2】

上昇が、正常対照レベルより少なくとも10%大きい、請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

発現レベルが、以下からなる群より選択される方法のいずれか1つにより決定される、請求項51記載の方法：

(a) 胃癌関連遺伝子CGX8のmRNAの検出；

(b) 胃癌関連遺伝子CGX8によってコードされるタンパク質の検出；および

(c) 胃癌関連遺伝子CGX8によってコードされるタンパク質の生物学的活性の検出。

【請求項 5 4】

発現レベルが、患者に由来する生物学的試料の遺伝子転写物と胃癌関連遺伝子CGX8プロ
ープとのハイブリダイゼーションを検出する段階により決定される、請求項51記載の方法
。

【請求項 5 5】

ハイブリダイゼーション段階がDNAアレイ上で実施される、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

生物学的試料が粘膜細胞を含む、請求項51記載の方法。

【請求項 5 7】

生物学的試料が腫瘍細胞を含む、請求項51記載の方法。

【請求項 5 8】

生物学的試料が胃癌細胞を含む、請求項51記載の方法。 20

【請求項 5 9】

以下の段階を含む、胃癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：

(a) CGX8によってコードされるポリペプチドと被験化合物を接触させる段階；

(b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および

(c) ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階。

【請求項 6 0】

以下の段階を含む、胃癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：

(a) CGX8を発現している細胞と候補化合物を接触させる段階；および

(b) CGX8の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階。

【請求項 6 1】

30

被験細胞が胃癌細胞を含む、請求項60記載の方法。

【請求項 6 2】

以下の段階を含む、胃癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：

(a) CGX8によってコードされるポリペプチドと被験化合物を接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および

(c) 被験化合物の非存在下で検出された生物学的活性と比較して、CGX8によってコード
されるポリペプチドの生物学的活性を抑制する化合物を選択する段階。

【請求項 6 3】

以下の段階を含む、胃癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法：

(a) CGX8の転写制御領域およびその転写制御領域の調節下で発現されるレポーター遺伝
子を含むベクターを導入した細胞と、候補化合物を接触させる段階； 40

(b) 該レポーター遺伝子の活性を測定する段階；ならびに

(c) 対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する段
階。

【請求項 6 4】

CGX8の核酸配列と結合する検出試薬を含むキット。

【請求項 6 5】

CGX8によってコードされるポリペプチドと結合する検出試薬を含むキット。

【請求項 6 6】

CGX8のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNA 50

の薬学的有効量を投与する段階を含む、胃癌を治療するための方法。

【請求項 67】

アンチセンスポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が配列番号：79のヌクレオチド配列である、請求項66記載の方法。

【請求項 68】

CGX8によってコードされるタンパク質と結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を対象へ投与する段階を含む、対象における胃癌を治療または予防するための方法。

【請求項 69】

CGX8によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンの薬学的有効量を対象へ投与する段階を含む、対象における胃癌を治療または予防するための方法。

10

【請求項 70】

CGX8によってコードされるポリペプチドを抗原提示細胞と接触させる段階、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはそのポリヌクレオチドを含むベクターを抗原提示細胞に導入する段階を含む、抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

【請求項 71】

抗原提示細胞を対象へ投与する段階をさらに含む、請求項70記載の抗腫瘍免疫を誘導するための方法。

【請求項 72】

請求項59～63のいずれか一項記載の方法によって得られた化合物の薬学的有効量を投与する段階を含む、対象における胃癌を治療または予防するための方法。

20

【請求項 73】

CGX8のポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を含む、胃癌を治療または予防するための組成物。

【請求項 74】

CGX8によってコードされるタンパク質と結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を含む、胃癌を治療または予防するための組成物。

【請求項 75】

CGX8によってコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの薬学的有効量を含む、胃癌を治療または予防するための組成物。

30

【請求項 76】

活性成分として請求項59～63のいずれか一項記載の方法によって選択された化合物の薬学的有効量と、薬学的に許容される担体とを含む、胃癌を治療または予防するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、参照として本明細書に組み入れられる2002年8月30日出願の米国特許出願第60/407,338号に関連している。

40

【0002】

発明の分野

本発明は、結腸癌および胃癌の診断方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景技術

結腸直腸癌および胃癌は世界的に癌による死亡の主な原因である。診断および治療の戦略の最近の進歩にもかかわらず、進行癌の患者の予後は依然として極めて悪い。腫瘍抑制遺伝子および/または癌遺伝子の変化が発癌に関与することが分子的な研究によって明らかになってきたが、その厳密な機序は完全に明らかとはなっていない。

50

【 0 0 0 4 】

cDNAマイクロアレイ技術により、正常細胞および悪性細胞における遺伝子発現の包括的プロファイルを得ること、ならびに悪性細胞および対応する正常細胞における遺伝子発現を比較することが可能になった (Okabeら、Cancer Res 61: 2129-37 (2001); Kitaharaら、Cancer Res 61: 3544-9 (2001); Linら、Oncogene 21: 4120-8 (2002); Hasegawaら、Cancer Res 62: 7012-7 (2002))。このアプローチは癌細胞の複雑な性質を明らかにすることを可能にし、発癌の機序を解明する一助となる。腫瘍において脱制御される遺伝子の同定は、個々の癌のより正確で間違いのない診断、および新規な治療標的の開発につながる可能性がある (BienzおよびClevers、Cell 103: 311-20 (2000))。腫瘍の基礎をなす機序を全ゲノム的な観点から解明するため、ならびに診断および新規治療薬の開発のための標的分子を探索するために、本発明者らは、23040種の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを用いて腫瘍細胞の発現プロファイルを分析してきた (Okabeら、Cancer Res 61: 2129-37 (2001); Kitaharaら、Cancer Res 61: 3544-9 (2001); Linら、Oncogene 21: 4120-8 (2002); Hasegawaら、Cancer Res 62: 7012-7 (2002))。

10

【 0 0 0 5 】

発癌の機序を明らかにする目的で設計された研究により、抗腫瘍薬の分子標的を同定することは既に容易である。例えば、Ras (その活性化は翻訳後ファルネシル化に依存する) が関係する増殖シグナル伝達経路を阻害するために当初開発されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) は、動物モデルにおけるRas依存性腫瘍の治療に有効であった (Heら、Cell 99: 335-45 (1999))。抗癌薬と抗HER2モノクローナル抗体トラストズマブ (trastuzumab) を併用したヒトに対する臨床試験がプロト癌遺伝子受容体HER2/neuの拮抗を目的として実施されており、乳癌患者の臨床効果および全般的な生存率の改善が達成されている (Linら、Cancer Res 61: 6345-9 (2001))。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活性化するチロシンキナーゼ阻害剤STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球のトランスフォーメーションに決定的な役割を果たす、慢性骨髄性白血病の治療を目的として開発された。これらの種類の薬剤は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制する目的で設計されている (Fujitaら、Cancer Res 61: 7722-6 (2001))。このため、癌細胞で高頻度に上方制御される遺伝子産物は、新規抗癌薬を開発するための標的候補として役立つ可能性がある。

20

【 0 0 0 6 】

CD8+細胞障害性Tリンパ球 (CTL) は、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原 (TAA) に由来するエピトープペプチドを認識して、腫瘍細胞を溶解することが示されている。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以来、他の多くのTAAが免疫学的アプローチを用いて発見されている (Boon、Int J Cancer 54: 177-80 (1993); Boonおよびvan der Bruggen、J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991); Brichardら、J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994))。発見されたTAAのいくつかは現在、免疫療法の標的として臨床開発の段階にある。これまでに発見されたTAAには、MAGE (van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991))、gp100 (Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994))、SART (Shichijoら、J Exp Med 187: 277-88 (1998)) およびNY-ESO-1 (Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997)) が含まれる。一方、腫瘍細胞において特異的に過剰発現されることが示された遺伝子産物は、細胞性免疫応答を誘導する標的として認識されることが示されている。このような遺伝子産物には、p53 (Umanoら、Brit J Cancer 84: 1052-7 (2001))、HER2/neu (Tanakaら、Brit J Cancer 84: 94-9 (2001))、CEA (Nukayaら、Int J Cancer 80: 92-7 (1999)) などが含まれる。

30

40

【 0 0 0 7 】

TAAに関する基礎研究および臨床研究の著しい進歩にもかかわらず (Rosenbergら、Nature Med 4: 321-7 (1998); Mukherjiら、Proc Natl Acad Sci USA 92: 8078-82 (1995); Huら、Cancer Res 56: 2479-83 (1996))、結腸直腸癌を含む腺癌の治療のための候補となるTAAの数は非常に限られている。癌細胞で大量に発現されると同時にその発現が癌細胞

50

に限定されるTAAは、免疫治療の標的として有望な候補になると考えられる。さらに、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘発する新たなTAAの同定は、様々な種類の癌におけるペプチドワクチン接種の臨床使用を促すと考えられる (Boonおよびvan der Bruggen、J Exp Med 183: 725-9 (1996); van der Bruggenら、Science 254: 1643-7 (1991); Brichardら、J Exp Med 178: 489-95 (1993); Kawakamiら、J Exp Med 180: 347-52 (1994); Shichijoら、J Exp Med 187: 277-88 (1998); Chenら、Proc Natl Acad Sci USA 94: 1914-8 (1997); Harris、J Natl Cancer Inst 88: 1442-5 (1996); Butterfieldら、Cancer Res 59: 3134-42 (1999); Vissersら、Cancer Res 59: 5554-9 (1999); van der Burgら、J Immunol 156: 3308-14 (1996); Tanakaら、Cancer Res 57: 4465-8 (1997); Fujieら、Int J Cancer 80: 169-72 (1999); Kikuchiら、Int J Cancer 81: 459-66 (1999); Oisoら、Int J Cancer 81: 387-94 (1999))。

10

【0008】

ある一定の健常ドナー由来の末梢血単核細胞 (PBMC) がペプチド刺激を受けると、ペプチドに反応して著しいレベルのIFN- γ を産生するが、 ^{51}Cr 放出アッセイでHLA-A24またはHLA-A0201拘束的な様式で腫瘍細胞に対して細胞障害性を及ぼすことはほとんどないと繰り返し報告されている (Kawanoら、Cancer Res 60: 3550-8 (2000); Nishizakaら、Cancer Res 60: 4830-7 (2000); Tamuraら、Jpn J Cancer Res 92: 762-7 (2001))。しかし、HLA-A24およびHLA-A0201はどちらも日本人に多いHLAアレルであり、白人でも同様である (Dateら、Tissue Antigens 47: 93-101 (1996); Kondoら、J Immunol 155: 4307-12 (1995); Kuboら、J Immunol 152: 3913-24 (1994); Imanishiら、Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press、Oxford、1065 (1992); Williamsら、Tissue Antigens 49: 129 (1997))。このため、これらのHLAによって提示される癌の抗原ペプチドは、日本人および白人の癌の治療に特に有用な可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性CTLの誘導は通常、ペプチドを高濃度で用いて、抗原提示細胞 (APC) の表面に、これらのCTLを効果的に活性化すると考えられる特異的ペプチド/MHC複合体を高レベルに生じさせることによって起こることが知られている (Alexander-Millerら、Proc Natl Acad Sci USA 93: 4102-7 (1996))。

20

【発明の開示】

【0009】

発明の概要

30

本発明は、遺伝子の発現パターンが、癌性状態、例えば、結腸癌または胃癌と関連しているという発見に基づいている。本明細書において、結腸癌または胃癌において差次的に発現される遺伝子は、「CGX核酸」または「CGXポリヌクレオチド」と集合的に呼ばれ、対応するコードされるポリペプチドは、「CGXポリペプチド」または「CGXタンパク質」と呼ばれる。

【0010】

従って、本発明は、患者に由来する生物学的試料、例えば組織試料における結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現レベルを決定することによって、対象における結腸癌もしくは胃癌を診断する、またはその素因を決定する方法を特色とする。結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子とは、正常細胞 (または非結腸癌細胞もしくは非胃癌細胞) と比較して結腸癌細胞または胃癌細胞において発現レベルが異なることを特徴とする遺伝子を意味する。結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子には、例えば、CGX1~8が含まれる。遺伝子の正常対照レベルとの比較における遺伝子の発現レベルの変化、例えば、上昇または低下は、対象が結腸癌もしくは胃癌に罹患していること、または結腸癌もしくは胃癌を発症するリスクを有していることを示す。

40

【0011】

正常対照レベルとは、正常で健康な個体、または結腸癌もしくは胃癌に罹患していないことが既知の個体集団において検出される遺伝子発現のレベルを意味する。対照レベルは、単一の参照集団または複数の発現パターンに由来する単一の発現パターンである。例えば、対照レベルは、以前に試験された細胞からの発現パターンのデータベースであっても

50

よい。

【0012】

正常対照レベルとの比較における、被験試料で検出されたCGX1～8のレベルの上昇は、（その試料が得られた）対象が、結腸癌もしくは胃癌に罹患していること、または結腸癌もしくは胃癌を発症するリスクを有していることを示す。

【0013】

または、試料における結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子のパネルの発現が、同じ遺伝子パネルの結腸癌または胃癌の対照レベルと比較される。結腸癌または胃癌の対照レベルとは、結腸癌または胃癌に罹患している集団において見出される結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現プロファイルを意味する。

10

【0014】

遺伝子発現は、対照レベルと比較して、10%、25%、50%上昇している。または、遺伝子発現は、対照レベルと比較して、1倍、2倍、5倍、またはそれ以上、上昇している。発現は、例えばアレイ上で、患者に由来する組織試料の遺伝子転写物と結腸癌関連遺伝子プローブまたは胃癌関連遺伝子プローブとのハイブリダイゼーションを検出することにより決定される。

【0015】

患者に由来する組織試料とは、被験対象、例えば、結腸癌もしくは胃癌を有していることが既知であるか、または結腸癌もしくは胃癌を有していると推測される患者からの任意の組織である。例えば、組織は、腫瘍細胞を含有している。例えば、組織は、結腸または胃からの腫瘍細胞である。

20

【0016】

本発明は、CGX1～8のうちの2個以上の遺伝子発現レベルによる結腸癌または胃癌の参照発現プロファイルも提供する。または、本発明は、CGX1～8のうちの2個以上の発現レベルによる結腸癌または胃癌の参照発現プロファイルを提供する。

【0017】

本発明は、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子を発現している被験細胞を被験薬剤と接触させること、および結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現レベルを決定することによる、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現または活性を阻害する薬剤を同定する方法をさらに提供する。被験細胞は上皮細胞、例えば結腸または胃由来の上皮細胞である。遺伝子の正常対照レベルとの比較におけるレベルの低下は、その被験薬剤が結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の阻害剤であることを示す。さらに、酵母2-ハイブリッドスクリーニングアッセイにより、ARHCL1タンパク質、NFXL1タンパク質、C20orf20タンパク質、およびCCPUC1タンパク質が、それぞれ、ザイキシン（Zyxin）、MGC10334またはCENPC1、BRD8、およびnCLUと会合することが明らかとなった。結腸癌は、それらタンパク質の会合を阻害することにより治療され得る。従って、本発明は、被験化合物の存在下でタンパク質を接触させること、およびタンパク質の結合を阻害する被験化合物を選択することを含む、結腸癌を治療するための化合物のスクリーニング方法を提供する。

30

【0018】

本発明は、2個以上のCGX核酸配列と結合するか、または核酸配列によってコードされる遺伝子産物と結合する検出試薬を有するキットも提供する。2個以上のCGX核酸と結合する核酸のアレイも提供される。

40

【0019】

治療法には、アンチセンス組成物を対象へ投与することにより、対象における結腸癌または胃癌を治療または予防する方法が含まれる。アンチセンス組成物とは、特異的な標的遺伝子の発現を低下させるものであり、例えば、アンチセンス組成物は、CGX1～8からなる群より選択される配列に相補的なヌクレオチドを含有する。別の方法は、短鎖干渉RNA（siRNA）組成物を対象へ投与する段階を含む。siRNA組成物は、CGX1～8からなる群より選択される核酸の発現を低下させる。さらに別の方法において、対象における結腸癌または胃癌の治療または予防は、リボザイム組成物を対象へ投与することにより実施される。

50

核酸特異的リボザイム組成物は、CGX1～8からなる群より選択される核酸の発現を低下させる。

【0020】

本発明は、ワクチンおよびワクチン接種法も含む。例えば、対象における結腸癌または胃癌を治療または予防する方法は、CGX1～8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドまたはそのようなポリペプチドの免疫学的活性断片を含有しているワクチンを対象へ投与することにより実施される。免疫学的活性断片とは、天然に存在する全長のタンパク質より長さが短く、かつ免疫応答を誘導するポリペプチドである。例えば、免疫学的活性断片は、長さが少なくとも8残基であり、T細胞またはB細胞等の免疫細胞を刺激する。免疫細胞刺激は、細胞増殖、サイトカイン（例えば、IL-2）の同化、または抗体の産生を検出することにより測定される。

10

【0021】

さらに、本発明は、結腸直腸癌の診断マーカーとしての候補であるのみならず、新たな診断戦略および有効な抗癌剤を開発するための有望な標的でもある、単離された新規遺伝子ARHCL1、NFXL1、C20orf20、LEMD1、およびCCPUC1を提供する。さらに、本発明は、これらの遺伝子によってコードされるポリペプチド、ならびにそれらの作製および使用を提供する。より具体的には、本発明は以下のものを提供する。

【0022】

本出願は、細胞増殖を促進し、かつ結腸直腸癌において上方制御されている新規ヒトポリペプチドARHCL1、NFXL1、C20orf20、LEMD1、およびCCPUC1、またはそれらの機能的同

20

【0023】

好ましい態様において、ARHCL1ポリペプチドは、ヒト仮説タンパク質DKFZp434P1514.1と約68.7%の同一性およびマウスRIKEN cDNA 2310008J22と61.45%の同一性を有する推定514アミノ酸のタンパク質を含む。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツール（Simple Modular Architecture Research Tool）（SMART、<http://smart.embl-heidelberg.de>）を用いたタンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質が、セリン/トレオニンホスファターゼ、ファミリー2C、触媒ドメイン（コドン68～506）を含有していることが明らかとなった（図3b）。ARHCL1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号：2に示されたアミノ酸配列を含む。本出願は、ARHCL1ポリヌクレオチド配列、または配列番号：1に示された配列に少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%相同なポリヌクレオチド配列の少なくとも一部によってコードされる単離されたタンパク質も提供する。ARHCL1はザイキシンと会合する。ザイキシンは、N末端プロリンリッチ領域およびC末端領域内の3個のLIMドメインを含むリンタンパク質である（Macalma, T.ら、J. Biol. Chem. 271: 31470-31478、1996）。ザイキシンは、ノーザンブロット分析によると偏在性に発現しており、アクチンフィラメントの束と共に局所接着プラーク（focal adhesion plaques）に集中しているタンパク質であるが、有糸分裂細胞においては分裂装置に集中し細胞質には散在性に分布している（Hirota, T.ら、J. Cell Biol. 149: 1073-1086、2000.）。ザイキシンは、CDC2キナーゼによってリン酸化され、LATS1腫瘍抑制因子と相互作用した。従って、ザイキシンは、LATS1との相互作用により、アクチンフィラメントの構築を制御し、分裂装置を標的とする可能性がある。

30

40

【0024】

好ましい態様において、C20orf20ポリペプチドは、マウスRIKEN cDNA 1600027N09（XM_110403）と約96.6%の同一性を有する推定204アミノ酸のタンパク質を含む。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールによるタンパク質モチーフ検索では、既知の保存されたドメインは予測されなかった（図16b）。C20orf20ポリペプチドは、好ましくは、配列番号：4に示されたアミノ酸配列を含む。本出願は、C20orf20ポリヌクレオチド配列、または配列番号：3に示された配列に少なくとも97%、より好ましくは少なくとも99%相同なポリヌクレオチド配列の少なくとも一部によってコードされる単離されたタンパク質も提供する。C20orf20はBRD8と会合する。BRD8タンパク質は、C末端にプロ

50

モドメインを含有し、多くの酸性残基およびいくつかのプロリンリッチセグメントを含有している (Nielsen, M. S.ら、Biochim. Biophys. Acta 1306: 14-16、1996)。BRD8は、甲状腺ホルモン受容体およびアンドロゲン受容体と相互作用する核受容体活性化因子であり、それらの転写活性を活性化する (Monden, T.ら、J. Biol. Chem. 272: 29834-29841、1997)。

【0025】

好ましい態様において、CCPUC1ポリペプチドは、マウスRIKEN cDNA 2610111M03 (AK011846) と約89%の同一性を有する推定413アミノ酸のタンパク質を含む。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールによるタンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質が、コイルドコイル領域 (コドン195~267) を含有していることが明らかとなったため、本発明者らは、その遺伝子をCCPUC1 (coiled-coil protein up-regulated in colon cancer (結腸癌において上方制御されるコイルドコイルタンパク質)) と名付けた。CCPUC1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号: 6に示されたアミノ酸配列を含む。本出願は、CCPUC1ポリヌクレオチド配列、または配列番号: 5に示された配列に少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%相同なポリヌクレオチド配列の少なくとも一部によってコードされる単離されたタンパク質も提供する。CCPUC1はnCLUと会合する。核クラスタリン (Nuclear clusterin) (nCLU) は、CLU遺伝子の選択的スプライシング転写の産物である。エキソンIおよびIIIは、エキソンIIスキッピングによってつながれ、エキソンIIIに最初の利用可能なAUG翻訳開始部位がもたらされる。このより短いmRNAは、49kDaの前駆体nCLUタンパク質を産生する (Leskov K. S.ら、J. Biol. Chem. 278: 11590-11600、2003)。核クラスタリン (nCLU) は、Ku70に結合するタンパク質である。電離放射線 (IR) はnCLUを誘導し、その過剰発現は、MCF-7細胞においてアポトーシスを誘発する。

10

20

【0026】

好ましい態様において、LEMD1ポリペプチドは、推定29アミノ酸のタンパク質 (LEMD1S) を含む。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールによるタンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質が、LEMモチーフ (コドン1~27) を含有していることが明らかとなり、本発明者らは、その遺伝子をLEMD1 (LEM domain containing 1 (LEMドメイン含有1)) と名付けた (図38a)。LEMD1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号: 8に示されたアミノ酸配列を含む。さらに、好ましい態様において、LEMD1ポリペプチドは、その選択的スプライシング型を含む。従って、LEMD1ポリペプチドは、推定67アミノ酸のタンパク質 (LEMD1L) を含む。LEMD1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号: 10に示されたアミノ酸配列を含む。予測されたLEMD1タンパク質のアミノ酸配列は、Gen Bankアクセッション番号XM_050184を有するチモピエチン (thymopietin) に類似しているヒト仮説タンパク質と62%の同一性を示した。

30

【0027】

本出願は、LEMD1ポリヌクレオチド配列、または配列番号: 7もしくは9に示された配列に少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%相同なポリヌクレオチド配列の少なくとも一部によってコードされる単離されたタンパク質も提供する。

【0028】

好ましい態様において、NFXL1ポリペプチドは、ヒトNFX1 (nuclear transcription factor, X-box binding 1 (核転写因子、Xボックス結合1)) と約35.3%の同一性を有する推定911アミノ酸のタンパク質を含む。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールによるタンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質が、リングフィンガー (ring finger) ドメイン (コドン160~219)、12個のNFX型Znフィンガードメイン (コドン265~794)、コイルドコイル領域 (コドン822~873)、および膜貫通領域 (コドン889~906) を含有していることが明らかとなった (図9b)。NFXL1ポリペプチドは、好ましくは、配列番号: 12に示されたアミノ酸配列を含む。本出願は、NFXL1ポリヌクレオチド配列、または配列番号: 11に示された配列に少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%相同なポリヌクレオチド配列の少なくとも一部によってコードされる単離された

40

50

タンパク質も提供する。NFXL1はMGC10334またはCENPC1と会合する。免疫電子顕微鏡検によって、CENPC1が内部動原体プレート (inner kinetochore plate) に局在していることが示された (Saitoh, H.ら、Cell 70: 115-125、1992)。

【0029】

他に特記しない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語は、全て、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施または試行においては、本明細書に記載されたものに類似するかまたは同等の方法および材料が使用され得るが、適当な方法および材料を以下に記載する。本明細書において言及される出版物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、全て参照として完全に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書によって統制される。さらに、材料、方法、および実施例は、例示的なものに過ぎず、本発明を制限するためのものではない。

10

【0030】

本発明の他の特色および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲より明白になるとと思われる。

【0031】

詳細な説明

本発明は、結腸癌または胃癌を有する患者の結腸および胃由来の細胞における複数の核酸配列の発現パターンの変化の発見に一部基づいている。遺伝子発現の違いは、包括的なcDNAマイクロアレイ系を使用することにより同定された。

20

【0032】

結腸癌または胃癌の患者において発現レベルが調整されている (即ち、上昇している) 遺伝子は、本明細書において、「CGX核酸」または「CGXポリヌクレオチド」と集合的に呼ばれ、対応するコードされるポリペプチドは、「CGXポリペプチド」または「CGXタンパク質」と呼ばれる。他に特記しない限り、「CGX」は、本明細書に開示された配列 (例えば、CGX1~8) のうちのいずれかを指すものとする。

【0033】

結腸直腸癌において発現レベルが上昇している7個の遺伝子が同定された。これらの7個の遺伝子は、本明細書において、結腸癌関連遺伝子と呼ばれる。そのうち5個は新規であり、2個は、結腸癌との関連は未知であったが、以前より知られている遺伝子であった。5個の新規遺伝子には、ARHCL1 (「CGX1」)、NFXL1 (「CGX2」)、C20orf20 (「CGX3」)、LEMD1 (「CGX4」)、およびCCPUC1 (「CGX5」) が含まれる。新規の結腸癌関連遺伝子を、下記表1にとりまとめ、それらの核酸配列およびポリペプチド配列を配列表に提供する。既知の遺伝子には、Ly6E (「CGX6」) およびNkd1 (「CGX7」) が含まれる。胃癌において発現レベルが上昇している1個の既知の遺伝子LAPTM4β (「CGX8」) が同定された。この遺伝子は、本明細書において、胃癌関連遺伝子と呼ばれる。

30

【0034】

細胞試料における様々な遺伝子の発現を測定することによって、結腸癌または胃癌が、細胞または細胞の集団において決定され得る。同様に、様々な薬剤に応答して起こるこれらの遺伝子の発現を測定することによって、結腸癌または胃癌を治療するための薬剤が同定され得る。

40

【0035】

【表 1】

遺伝子の 名称	GenBank アクセッション番号	ヌクレオチドの 長さ(配列番号:)	ORF	アミノ酸の長さ (配列番号:)
ARHCL1	AB084258	6462bp (1)	415-1956	514aa (2)
C20orf20	AB085682	1634bp (3)	72-683	204aa (4)
CCPUCC1	AB089691	1681bp (5)	106-1347	413aa (6)
LEMD1S	AB084765	733bp (7)	103-192	29aa (8)
LEMD1L	AB084764	656bp (9)	103-306	67aa (10)
NFXL1	AB085695	3707bp (11)	54-2786	911aa (12)

10

【0036】

本発明は、CGX配列のうちの少なくとも1個、最大全ての発現を決定すること（例えば、測定すること）を含む。既知の配列に関しては、GeneBank登録データベースによって提供される配列情報を使用し、当業者に周知の技術を使用して、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子が検出され測定される。例えば、配列登録データベース内のCGX配列に相当する配列は、例えば、ノーザンブロットハイブリダイゼーション分析において、CGX RNA配列検出用のプローブを構築するために使用され得る。別の例として、配列は、例えば、逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応のような増幅に基づく検出法において、CGX配列の特異的増幅用のプライマーを構築するために使用され得る。

20

【0037】

被験細胞集団、例えば、患者由来の組織試料におけるCGX配列の1個以上の発現レベルは、次いで、参照集団におけるいくつかの配列の発現レベルと比較される。参照細胞集団は、比較されるパラメータが既知である、即ち、癌性または非癌性の細胞を1個以上含んでいる。

【0038】

参照細胞集団と比較した被験細胞集団における遺伝子発現レベルによって、測定されるパラメータの存在が明らかとなるか否かは、参照細胞集団の組成に依拠する。例えば、参照細胞集団が非癌細胞から構成されている場合、被験細胞集団と参照細胞集団とで類似する遺伝子発現レベルは、被験細胞集団が非癌性であることを示す。反対に、参照細胞集団が癌性細胞からなる場合には、被験細胞集団と参照細胞集団とで類似する遺伝子発現プロファイルは、被験細胞集団が癌性細胞を含むことを示す。

30

【0039】

被験細胞集団におけるCGX配列は、その発現レベルが、参照細胞集団における対応するCGX配列の発現レベルから1.0倍、1.5倍、2.0倍、5.0倍、10.0倍、またはそれ以上変動している場合、発現レベルが変化していると思なすことができる。

【0040】

所望により、被験細胞集団と参照細胞集団とで差次的に発現された配列を、測定中のパラメータまたは条件にその発現が依存しない対照核酸に対して比較することが可能である。例えば、対照核酸は、細胞の癌性状態または非癌性状態に依存して異なることはない分かっている核酸である。被験核酸および参照核酸における対照核酸の発現レベルは、比較された集団におけるシグナルレベルを規準化するために使用され得る。対照遺伝子は、例えば、β-アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、またはリボソームタンパク質P1であり得る。

40

【0041】

被験細胞集団は、複数の参照細胞集団と比較される。複数の参照集団は、各々、既知のパラメータが異なってもよい。従って、被験細胞集団は、例えば、結腸癌細胞または胃癌細胞を含有することが分かっている第二の参照細胞集団と比較してもよいし、例えば、非結腸癌細胞または非胃癌細胞を含有することが分かっている第二の参照細胞集団と比

50

較してもよい。被験細胞は、結腸癌細胞または胃癌細胞を含有することが分かっているまたはそれらを含有すると推測される対象からの組織型または細胞試料に含まれる。

【0042】

被験細胞は、体組織または体液（尿、糞便、胃分泌物、もしくは血液等）、例えば、体組織（結腸または胃等）から得られる。例えば、被験細胞は、結腸または胃の組織から精製される。

【0043】

参照細胞集団の細胞は、被験細胞に類似している組織型、例えば、結腸または胃の粘膜組織に由来する。いくつかの態様において、参照細胞は、被験細胞と同じ対象、例えば、被験細胞の起源の領域に近位の領域に由来する。または、対照細胞集団は、アッセイのパラメータまたは条件が既知の細胞から生じた分子情報のデータベースに由来する。

10

【0044】

対象は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得る。

【0045】

CGX1～8によって表される配列のうちの1個、2個、3個、4個、5個、またはそれ以上の発現が決定され、所望により、これらの配列の発現は、本明細書に記載されるパラメータまたは条件のうちの1つ、例えば、結腸癌もしくは胃癌であるかまたは非結腸癌もしくは非胃癌であるかによって発現レベルが変化することが既知の他の配列に従って決定され得る。

20

【0046】

本明細書に開示された遺伝子の発現は、当技術分野において既知の任意の方法を使用して、RNAレベルで決定される。例えば、これらの配列のうちの1個以上を特異的に認識するプローブを使用したノーザンハイブリダイゼーション分析が、遺伝子発現を決定するために使用され得る。または、発現は、例えば、差次的に発現される配列に特異的なプライマーを使用した、逆転写に基づくPCRアッセイを使用して、測定される。

【0047】

発現は、タンパク質レベルで、即ち、本明細書に記載された遺伝子産物によってコードされるポリペプチドのレベルまたはその生物学的活性を測定することによっても決定される。そのような方法は、当技術分野において周知であり、例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体に基づく免疫アッセイを含む。遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性も周知である。

30

【0048】

遺伝子発現の変化が遺伝子の増幅または欠失に関連している場合、被験細胞集団および参照細胞集団における配列比較は、被験細胞集団および参照細胞集団で調査されたDNA配列の相対量を比較することにより行われ得る。

【0049】

結腸癌または胃癌の診断

結腸癌または胃癌は、結腸癌細胞または胃癌細胞を含有しているかまたは含有していると推測される被験細胞集団（即ち、患者に由来する生物学的試料）において1個以上のCGX核酸配列の発現を調査することにより診断される。好ましくは、被験細胞集団は上皮細胞を含む。最も好ましくは、細胞集団は結腸または胃からの粘膜細胞を含む。他の生物学的試料も、タンパク質レベルを測定するために使用され得る。例えば、診断される対象に由来する血液または血清におけるタンパク質レベルが、免疫アッセイまたは生物学的アッセイによって測定され得る。

40

【0050】

結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子、例えば、CGX1～8のうちの1個以上の発現は、被験細胞または生物学的試料において決定され、正常対照レベルの発現と比較される。正常対照レベルとは、結腸癌または胃癌に罹患していない集団において典型的に見出される結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現プロファイルを意味する。患者に由来する

50

組織試料における結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現レベルの上昇または低下は、対象が結腸癌もしくは胃癌に罹患していることまたは結腸癌もしくは胃癌を発症するリスクを有していることを示す。例えば、正常対照レベルとの比較における被験集団でのCGX1～8の発現の上昇は、対象が結腸癌もしくは胃癌に罹患していることまたは結腸癌もしくは胃癌を発症するリスクを有していることを示す。

【0051】

被験集団において、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の50%、60%、80%、90%、またはそれ以上が、正常対照レベルと比較して変化している場合、それは、対象が結腸癌もしくは胃癌に罹患していることまたは結腸癌もしくは胃癌を発症するリスクを有していることを示す。

10

【0052】

または、被験集団における結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現が、結腸癌または胃癌に罹患している集団の発現プロファイルと比較される場合、CGX1～8の発現の低下は、対象が結腸癌または胃癌に罹患していないことを示す。

【0053】

特定の標本におけるCGX1～8の発現レベルは、CGX1～8に対応するmRNAまたはCGX1～8によってコードされるタンパク質を定量することにより測定され得る。mRNAの定量法は当業者に既知である。例えば、CGX1～8に対応するmRNAのレベルは、ノーザンブロットティングまたはRT-PCRによって測定され得る。CGX1～5の全長ヌクレオチド配列は配列番号：1、3、5、7、9、または11に示されている。または、CGX6～8のヌクレオチド配列は既に報告されている。当業者であれば、CGX1～8を定量するためのプローブまたはプライマーのヌクレオチド配列を設計することができる。

20

【0054】

CGX1～8の発現レベルは、遺伝子によってコードされるタンパク質の活性または量に基づき分析され得る。CGX1～8タンパク質の量を決定するための方法は、以下に示される。例えば、免疫アッセイ法は、生物学的材料におけるタンパク質の決定に有用である。任意の生物学的材料をタンパク質またはその活性の決定のために使用することができる。例えば、血液試料は、血清マーカーによってコードされるタンパク質を測定するために分析される。一方、CGX1～8によってコードされるタンパク質の活性の決定のための適切な方法は、分析される各タンパク質の活性に応じて選択され得る。

30

【0055】

標本（被験試料）におけるCGX1～8の発現レベルが測定され、正常試料における発現レベルと比較される。そのような比較によって、標的遺伝子の発現レベルが、正常試料における発現レベルより高いことが示された場合、その対象は、結腸癌または胃癌に冒されていると判断される。正常試料および対象からの標本におけるCGX1～8の発現レベルを同時に決定してもよい。または、正常な発現レベルの範囲は、対照群から前もって収集した標本における遺伝子の発現レベルを分析することにより得られた結果に基づいて統計的方法により決定してもよい。対象の試料により得られた結果が正常範囲と比較され；その結果が正常範囲内にない場合、その対象は結腸癌または胃癌に冒されていると判断される。本発明において、結腸癌を診断するには、CGX1～7の発現レベルを測定し、正常試料における発現レベルと比較する；胃癌を診断するには、CGX8を測定する。

40

【0056】

本発明においては、結腸癌または胃癌を診断するための診断剤も提供される。本発明の診断剤は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと結合する化合物を含む。好ましくは、CGX1～8のポリヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、またはCGX1～8のポリペプチドと結合する抗体が、そのような化合物として使用され得る。

【0057】

結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現を阻害する薬剤の同定

結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現または活性を阻害する薬剤は、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子を発現している被験細胞集団を被験薬剤と接触させること

50

、および結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の発現レベルを決定することにより同定される。対照レベルとの比較における発現の低下は、その薬剤が結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子の阻害剤であることを示す。

【0058】

被験細胞集団は、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子を発現している任意の細胞である。例えば、被験細胞集団は粘膜細胞を含む。好ましくは、上皮細胞は結腸または胃に由来する。

【0059】

対象における結腸癌または胃癌の治療効率の判定

本明細書において同定された差次的に発現されるCGX配列によって、結腸癌または胃癌の治療経過をモニタリングできる。この方法においては、被験細胞集団は、結腸癌または胃癌のための治療を受けている対象から提供される。所望により、被験細胞集団は、治療の前、途中、または後の様々な時点で対象から採取され得る。次いで、細胞集団におけるCGX配列の1個以上の発現が決定され、結腸癌または胃癌の状態が分かっている細胞を含む参照細胞集団と比較される。好ましくは、参照細胞は治療に曝されていない。

10

【0060】

参照細胞集団が結腸癌細胞または胃癌細胞を含有していない場合、被験細胞集団と参照細胞集団のCGX配列の発現の類似性は、その治療が効果的であることを示す。しかしながら、被験細胞集団と参照細胞集団のCGX配列の発現の違いは、その治療が効果的ではないことを示す。

20

【0061】

「効果的な」とは、その治療によって、対象における結腸癌または胃癌の腫瘍の大きさ、有病率、または転移の可能性が減少することを意味する。治療が予防的に適用される場合、「効果的な」とは、その治療によって、結腸癌または胃癌の腫瘍の形成が遅延されるかまたは防止されることを意味する。

【0062】

参照細胞集団が結腸癌細胞または胃癌細胞を含有している場合、例えば、参照細胞集団が、治療を開始する前の診断の時点で対象から採取された結腸癌細胞または胃癌細胞を含む場合、被験細胞集団と参照細胞集団の発現パターンの類似性は、その治療が効果的でないことを示す。対照的に、被験集団と参照細胞集団のCGX配列の発現の違いは、その治療が効果的であることを示す。

30

【0063】

参照細胞集団が非結腸癌細胞または非胃癌細胞を含有している場合、配列CGX1~8のうちの1個以上の発現の類似は、その治療が効果的であることを示す。

【0064】

効力は、結腸癌または胃癌を診断または治療するための任意の既知の方法と併せて決定される。結腸癌は、例えば、直腸診における物理的触診、直腸鏡検査、およびバリウム注腸、または糞便中の潜血もしくは血中の腫瘍抗原を測定する試験等のその他の画像化法に従って、症状の異常、例えば、排便習慣の変化、大便中の血液、普段より細い大便、理由のない体重減少、および恒常的な疲労を同定することにより診断される。胃癌は、例えば、糞便潜血試験、胃鏡検査、バリウム嚥下検査、コンピュータ連動断層撮影(CT)スキャン、および超音波検査に従って、症状の異常、例えば、潰瘍症状を同定することにより診断される。

40

【0065】

結腸癌または胃癌を治療するための特定の個体に適した治療剤の選択

個体の遺伝的体質の違いは、様々な薬物を代謝する相対的な能力の違いをもたらす得る。対象において代謝され抗結腸癌剤または抗胃癌剤として作用する薬剤は、対象の細胞における遺伝子発現パターンを、結腸癌または胃癌の状態に特徴的な遺伝子発現パターンから非結腸癌または非胃癌に特徴的な遺伝子発現パターンへと変化させることにより効果を現すことができる。従って、本明細書において開示された差次的に発現されるCGX配列に

50

より、推定上の治療用または予防用の抗結腸癌剤または抗胃癌剤が対象に適した抗結腸癌剤または抗胃癌剤であるか否かを決定する手段として、選択された対象由来の被験細胞集団において薬剤を試験することが可能となる。

【0066】

特定の対象に適した抗結腸癌剤または抗胃癌剤を同定するためには、対象からの被験細胞集団を治療剤に曝し、CGX1～8配列の1個以上の発現を決定する。

【0067】

被験細胞集団は、結腸癌関連遺伝子または胃癌関連遺伝子を発現している結腸癌細胞または胃癌細胞を含有している。好ましくは、被験細胞は結腸または胃からの上皮細胞である。例えば、被験細胞集団を候補薬剤の存在下でインキュベートし、被験試料の遺伝子発現パターンを測定し、1個以上の参照プロファイル、例えば、結腸癌もしくは胃癌の参照発現プロファイルまたは非結腸癌もしくは非胃癌の参照発現プロファイルと比較する。または、まず、薬剤を、薬剤を活性型へと代謝する酵素を含有している細胞抽出物、例えば、肝細胞抽出物と混合する。次いで、活性化型の薬剤を被験細胞集団と混合し、遺伝子発現を測定することができる。好ましくは、細胞集団は、エキスピボで、薬剤または活性化型の薬剤と接触させる。

【0068】

次いで、被験細胞集団における核酸配列の発現を、参照細胞集団における核酸配列の発現と比較する。参照細胞集団は、結腸癌または胃癌の状態が分かっている細胞を少なくとも1個含んでいる。参照細胞が非結腸癌または非胃癌である場合、被験細胞集団と参照細胞集団とで類似した遺伝子発現プロファイルは、その対象における結腸癌または胃癌の治療にその薬剤が適していることを示す。被験細胞集団と参照細胞集団の配列の発現の違いは、その対象における結腸癌または胃癌の治療にその薬剤が適していないことを示す。

【0069】

参照細胞が結腸癌細胞または胃癌細胞である場合、被験細胞集団と参照細胞集団の遺伝子発現パターンの類似性は、対象における結腸癌または胃癌の治療にその薬剤が適していないことを示す。

【0070】

結腸癌または胃癌を含有している参照細胞集団と比べて、被験細胞集団において配列CGX1～8の1個以上の発現が低下することは、その薬剤が治療的であることを示す。

【0071】

被験薬剤はいかなる化合物または組成物であってもよい。いくつかの態様において、被験薬剤は、抗癌剤であることが既知の化合物および組成物である。

【0072】

結腸癌または胃癌の治療または予防用の候補治療剤を同定するためのスクリーニングアッセイ

本明細書に開示された差次的に発現される配列は、結腸癌または胃癌を治療するための候補治療剤の同定にも使用され得る。その方法は、結腸癌または胃癌の状態に特徴的なCGX1～8配列の発現プロファイルを、非結腸癌または非胃癌の状態の指標となるパターンへと変化させるか否かを測定することによる候補治療剤のスクリーニングに基づく。

【0073】

その方法においては、細胞を、被験薬剤または被験薬剤の組み合わせに（連続的または結果的に）曝し、細胞における1個以上のCGX1～8配列の発現を測定する。被験集団におけるCGX配列の発現は、被験薬剤に曝されていない参照細胞集団におけるCGX配列の発現レベルと比較する。被験薬剤は、いくつかの結腸癌細胞または胃癌細胞において上方制御されているCGX配列の発現を低下させると思われる。

【0074】

いくつかの態様において、参照細胞集団は、結腸癌細胞または胃癌細胞を含んでいる。この細胞集団が使用される場合、薬剤の存在下における核酸配列の発現が、薬剤の非存在下における細胞集団の発現プロファイルから変化することは、その薬剤が結腸癌または胃

癌の治療用の候補治療剤であることを示す。

【0075】

被験薬剤は、以前に記載されていない化合物であってもよいし、または以前から既知であるが抗結腸癌剤もしくは抗胃癌剤であることは既知でない化合物であってもよい。

【0076】

過剰発現遺伝子の発現を抑制するのに有効な薬剤は、結腸癌または胃癌の腫瘍の増殖を防止する能力に関してさらに試験することができ、結腸癌または胃癌の治療に有用である可能性のある治療剤である。そのような化合物の臨床的有用性についてのさらなる評価は、抗癌剤の毒性および臨床的有効性を評価する標準的な方法を使用して実施され得る。

【0077】

さらなる態様において、本発明は、結腸癌または胃癌の治療において標的となる可能性のある候補薬剤をスクリーニングする方法を提供する。既に詳述したように、マーカー遺伝子の発現レベルまたは活性を調節することにより、結腸癌または胃癌の発症および進行を調節することが可能である。従って、結腸癌または胃癌の治療において標的となる可能性のある候補薬剤は、マーカー遺伝子の発現レベルおよび活性を指標として使用したスクリーニングによって同定され得る。本発明に関して、そのようなスクリーニングは、例えば、

(a) CGX1~8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドと被験化合物を接触させる段階；

(b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および

(c) ポリペプチドと結合する化合物を選択する段階

を含み得る。

【0078】

または、本発明のスクリーニング法は、

(a) CGX1~8からなる群より選択される1個以上のマーカー遺伝子を発現している細胞と候補化合物を接触させる段階；および

(b) CGX1~8からなる群より選択される1個以上のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する段階

を含み得る。マーカー遺伝子を発現している細胞には、例えば、結腸癌または胃癌から樹立された細胞株が含まれる；そのような細胞は、本発明の上記スクリーニングに使用することができる。

【0079】

または、本発明のスクリーニング法は、

(a) CGX1~8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドと被験化合物を接触させる段階；

(b) 段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および

(c) CGX1~8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドの生物学的活性を、被験化合物の非存在下において検出された生物学的活性と比較して抑制する化合物を選択する段階

を含み得る。

【0080】

スクリーニングに必要とされるタンパク質は、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列を使用して、組換えタンパク質として入手することができる。当業者は、マーカー遺伝子の情報に基づき、タンパク質の任意の生物学的活性をスクリーニングのための指標として選択することができ、選択された生物学的活性に基づき測定法を選択することができる。

【0081】

または、本発明のスクリーニング方法は、

a) 候補化合物を、1つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域および転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞と接触させる段階（この際、1つまたは複数のマーカー遺伝子はCGX1~8からなる群より選択される）；

10

20

30

40

50

b) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する段階；および

c) 前記レポーター遺伝子の発現レベルを対照と比較して低下させる化合物を選択する段階を含むうる。

【0082】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。スクリーニングのために必要なレポーター構築物は、マーカー遺伝子の転写調節領域を用いることによって作製しうる。マーカー遺伝子の転写調節領域が当業者に知られている場合には、事前の配列情報を用いることによってレポーター構築物を作製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域がまだ同定されていない場合には、転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントを、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいてゲノムライブラリーから単離することができる。 10

【0083】

本発明の結腸癌を治療または予防するための化合物のスクリーニング方法のさらにもう1つの態様において、本方法は、ARHCL1のザイキシンとの結合能、NFXL1のMGC10334またはCENPC1との結合能、C20orf20のBRD8との結合能、およびCCPUC1のnCLUとの結合能を利用する。本発明のタンパク質はザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUと会合することが判明した。これらの所見は、本発明のタンパク質がザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、およびnCLUなどの分子との結合を介して細胞増殖の機能を発揮することを示唆する。このため、本発明のタンパク質とザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を阻害することによって細胞増殖の阻害がもたらされ、この結合を阻害する化合物は結腸癌を治療または予防するための調合薬として役立つことが予想される。 20

【0084】

このスクリーニング方法は、(a) 被験化合物の存在下で本発明のポリペプチドをザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUと接触させる段階、(b) ポリペプチドとザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を検出する段階、および(c) ポリペプチドとザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を阻害する化合物を選択する段階を含む。

【0085】

このスクリーニングに用いられる本発明のポリペプチド、およびザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUは、組換えポリペプチドでも天然のタンパク質でもよく、または、相互の結合能を保っている限り、それらの部分ペプチドでもよい。スクリーニングに用いられる本発明のポリペプチド、ザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUは、例えば、精製ポリペプチド、可溶性タンパク質、担体と結合した形態、または他のポリペプチドと融合した融合タンパク質でありうる。 30

【0086】

任意の被験化合物は、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵性微生物の産物、海洋生物からの抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成ミクロ分子化合物および天然化合物を用いることができる。

【0087】

本発明のタンパク質とザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法としては、当業者に周知の多くの方法を用いることができる。このようなスクリーニングは、インビトロアッセイ系、例えば細胞系において行うことができる。より具体的に述べると、まず、本発明のポリペプチドまたはザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUのいずれかを支持体に対して結合させ、それに対してもう一方のタンパク質を被験試料とともに添加する。次に、混合物をインキュベートし、洗浄した上で、支持体と結合したもう一方のタンパク質を検出および/または測定する。 40

【0088】

タンパク質を結合させるために用いる支持体の例には、アガロース、セルロース、およびデキストランなどの不溶性多糖類、ならびにポリアクリルアミド、ポリスチレン、お 50

よびシリコンなどの合成樹脂が含まれる；以上の材料から作製された市販のビーズおよびプレート（例えば、マルチウェルプレート、バイオセンサーチップなど）を用いることが好ましい。ビーズを用いる場合には、それらをカラムに充填してもよい。

【0089】

タンパク質は、化学的結合および物理的吸着などの慣行の方法に従って支持体に結合させることができる。または、タンパク質は、タンパク質を特異的に認識する抗体を介して支持体に結合させてもよい。さらに、アビジンとビオチンの結合を利用して、タンパク質を支持体に結合させることもできる。

【0090】

タンパク質同士の結合は、緩衝液がタンパク質同士の結合を阻害しない限りは、例えばこれらに限定されないがリン酸緩衝液およびTris緩衝液の緩衝液中で行われる。

【0091】

本発明において、表面プラスモン共鳴現象を利用するバイオセンサーを、結合したタンパク質の検出または定量のための手段として用いることもできる。このようなバイオセンサーを用いると、ごく微量のポリペプチドのみを用いて、標識を行わずに、タンパク質同士の相互作用を表面プラスモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することができる（例えば、BIAcore、Pharmacia）。このため、BIAcoreなどのバイオセンサーを用いて、本発明のポリペプチドとザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を評価することが可能である。

【0092】

または、本発明のポリペプチドまたはザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUのいずれかを標識し、結合したタンパク質の標識を、結合したタンパク質の検出または測定に用いることもできる。具体的には、タンパク質の一方をあらかじめ標識した後に、標識したタンパク質を被験化合物の存在下でもう一方のタンパク質と接触させ、洗浄後、結合したタンパク質を標識によって検出または測定する。

【0093】

本方法におけるタンパク質の標識のためには、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ）、蛍光物質（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン）およびビオチン/アビジンなどの標識物質を用いることができる。タンパク質を放射性同位体で標識する場合には、検出または測定を液体シンチレーションによって行うことができる。または、酵素で標識したタンパク質は、呈色などの基質の酵素的変化を検出するために、酵素基質を添加して吸光光度計で検出または測定することもできる。さらに、蛍光物質を標識として用いる場合には、結合したタンパク質を蛍光光度計を用いて検出または測定することができる。

【0094】

さらに、本発明のポリペプチドとザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を、本発明のポリペプチドおよびザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUに対する抗体を用いて検出または測定することもできる。例えば、支持体上に固定させた本発明のポリペプチドを被験化合物およびザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUと接触させた後に、混合物をインキュベートし、洗浄した上で、ザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUに対する抗体を用いて検出または測定を行うことができる。または、ザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUを支持体上に固定化し、本発明のポリペプチドに対する抗体を検出または測定のための抗体として用いてもよい。

【0095】

抗体を本スクリーニングに用いる場合には、抗体を上記の標識物質のいずれかで標識し、標識物質に基づいて検出または測定を行うことが好ましい。または、標識物質で標識した二次抗体によって検出されるように、本発明のポリペプチド、ザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUに対する抗体を一次抗体として用いてもよい。さらに、本発明のスクリーニングにおいてタンパク質と結合した抗体は、プロテインGまたはプロテインA

カラムを用いて検出または測定することもできる。

【0096】

または、本発明のスクリーニング方法のもう1つの態様において、細胞を利用する2-ハイブリッド系を用いることもできる（「MATCHMAKER 2-ハイブリッド系」「哺乳動物MATCHMAKER 2-ハイブリッドアッセイキット」「MATCHMAKER 1-ハイブリッド系」（Clontech）；「HybriZAP 2-ハイブリッドベクター系」（Stratagene）；参考文献「DaltonおよびTreisman、Cell 68：597-612（1992）」「FieldsおよびSternglanz、Trends Genet 10：286-92（1994）」）。

【0097】

2-ハイブリッド系では、本発明のポリペプチドをSRF結合領域またはGAL4結合領域と融合させて、酵母細胞において発現させる。本発明のポリペプチドと結合するザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUをVP16またはGAL4転写活性化領域と融合させ、被験化合物の存在下で酵母細胞において同様に発現させる。被験化合物が本発明のポリペプチドとザイキシン、MGC10334、CENPC1、BRD8、またはnCLUとの結合を阻害しなければ、この2つの結合によってレポーター遺伝子が活性化され、陽性クローンが検出されるようになる。

10

【0098】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子のほかに、例えば、Ade2遺伝子、lacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などを用いることができる。

【0099】

本スクリーニングによって単離される化合物は、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害する薬剤の候補であり、結腸癌または胃癌の治療または予防に適用することができる。

20

【0100】

さらに、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および/または置換によって変換された化合物も、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物に含まれる。

【0101】

本発明の方法によって単離された化合物を、ヒトおよび他の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジーに対して調合薬として投与する場合には、単離された化合物を直接投与してもよく、または既知の薬剤調製法を用いて剤形に製剤化してもよい。例えば、必要に応じて、薬剤を糖衣錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、およびマイクロカプセルとして経口投与することもでき、または水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体との滅菌溶液もしくは懸濁液である注射剤の形態として非経口的に投与することもできる。例えば、化合物を、一般に認められる薬剤の実現のために必要な単位用量の形で、薬学的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、媒質、保存料、結合剤などと混合することができる。これらの製剤における有効成分の量により、指定された範囲内にある適した投与量が得られる。

30

【0102】

錠剤およびカプセル剤に混合しうる添加剤の例には、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントゴムおよびアラビアゴムなどの結合剤；結晶セルロースなどの媒質；コーンスターチ、ゼラチンおよびアルギン酸などの膨潤剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；スクロース、ラクトースまたはサッカリンなどの甘味料；ならびにペパーミント、冬緑油およびチェリーなどの香味剤がある。単位用量剤形がカプセル剤である場合には、油などの液体担体も上記の成分にさらに含めることができる。注射用の滅菌混合物は、通常の薬剤の実現に倣って、注射用の蒸留水などの媒体を用いて製剤化することができる。

40

【0103】

生理食塩水、グルコース、ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトールおよび塩化ナトリウムなどの佐剤を含むその他の等張液を、注射用の水溶液として用いるこ

50

とができる。これらは適した可溶化剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールなどの多価アルコール、Polysorbate 80 (商標)およびHCO-50などの非イオン性界面活性剤などと組み合わせて用いることができる。

【0104】

ゴマ油またはダイズ油は油脂性液体として用いることができ、これらを可溶化剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて用いることもでき、さらにこれらをリン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液などの緩衝液；塩酸プロカインなどの鎮痛薬；ベンジルアルコールおよびフェノールなどの安定剤；ならびに抗酸化剤とともに製剤化することもできる。調製された注射剤は適したアンプルに充填することができる。

10

【0105】

本発明の医薬組成物を、例えば動脈内注射、静脈内注射、または皮下注射として、および同じく鼻腔内投与、経気管支投与、筋肉内投与または経口投与として患者に対して投与するためには、当業者によく知られた方法を用いることができる。投与量および投与方法は患者の体重および年齢ならびに投与方法に応じて異なる。しかし、当業者は慣行的に適切な投与方法を選択することができる。前記化合物がDNAによってコードされう場合には、DNAを遺伝子治療用のベクターに挿入し、治療を行うためにそのベクターを患者に投与することができる。投与量および投与方法は患者の体重、年齢および症状に応じて異なるが、当業者はそれらを適切に選択することができる。

【0106】

20

例えば、本発明のタンパク質と結合してその活性を調節する化合物の投与量は、その症状に依存するとはいえ、標準的な成人（体重60kg）に対して経口投与する場合、約0.1mg～約100mg/日、好ましくは約1.0mg～約50mg/日、より好ましくは約1.0mg～約20mg/日である。

【0107】

標準的な成人（体重60kg）に対して注射剤の形態として非経口的に投与する場合には、患者、標的臓器、症状および投与方法に応じて若干の違いはあるものの、約0.01mg～約30mg/日、好ましくは約0.1～約20mg/日、より好ましくは約0.1～約10mg/日の用量を静脈注射することが好都合である。同じく、他の動物の場合にも、体重60kgに換算した量を投与することが可能である。

30

【0108】

結腸癌または胃癌を有する対象の予後の判定

被験細胞集団における1個以上のCGX配列の発現を、疾患段階の一定の範囲を超えた患者に由来する参照細胞集団における配列の発現と比較することにより、結腸癌または胃癌を有する対象の予後を判定する方法も、提供される。被験細胞集団と参照細胞集団とで1個以上のCGX配列の遺伝子発現を比較することにより、または対象に由来する被験細胞集団における遺伝子発現のパターンを経時的に比較することにより、対象の予後が判定される。

【0109】

参照細胞集団は、非結腸癌細胞もしくは非胃癌細胞、または結腸癌細胞もしくは胃癌細胞を主に含む。または、参照は、結腸癌もしくは胃癌、または非結腸癌もしくは非胃癌の発現プロファイルである。参照細胞集団が非結腸癌細胞または非胃癌細胞を主に含む場合、配列CGX1～8のうちの1個以上の発現の上昇は、予後があまり良くないことを示す。配列CGX1～8の発現の類似または低下は、その対象における予後が良いことを示す。

40

【0110】

または、参照細胞集団が非結腸癌細胞または非胃癌細胞を主に含む場合、配列CGX1～8の1個以上の発現の上昇は、その対象における予後があまり良くないことを示し、低下または類似の発現は予後が良いことを示す。

【0111】

キット

50

本発明は、キットの形態でパッケージングされたCGX検出試薬、例えば、CGX核酸の一部に相補的なオリゴヌクレオチド配列のような相同核酸配列を有していることにより特異的に1個以上のCGX核酸を同定する核酸、またはCGX核酸によってコードされるタンパク質に対する抗体も含む。キットは、別々の容器内に、核酸もしくは抗体（固体マトリックスに既に結合されているか、またはマトリックスに結合させるための試薬が別途パッケージングされている）、対照製剤（陽性および/または陰性）、ならびに/または検出可能な標識を含有し得る。アッセイを実施するための指示（例えば、文書、テープ、VCR、CD-ROM等）が、キットに含まれていてもよい。アッセイは、例えば、当技術分野において既知であるようなノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAの形態をとり得る。

【0112】

10

例えば、CGX検出試薬は、少なくとも1個のCGX検出部位が形成されるよう、多孔性ストリップのような固体マトリックスの上に固定化される。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、複数の核酸含有部位を含み得る。被験ストリップは、陰性および/または陽性対照のための部位も含有し得る。または、対照部位は、被験ストリップとは別のストリップに置かれる。選択的に、異なる検出部位に異なる量の固定化核酸を含有していてもよく、即ち、第1の検出部位により多い量を含有し、次の部位にはより少ない量を含有していてもよい。被験試料を添加すると、検出可能なシグナルを示す部位の数により、試料中に存在するCGXの量が定量的に示される。検出部位は任意の適切な検出可能な形で配置することができ、典型的には、被験ストリップの幅全体に及ぶバーまたはドットの形をとる。

20

【0113】

または、キットは、1個以上の核酸配列を含む核酸基質アレイを含む。アレイ上の核酸は、CGX1~8によって表される1個以上の核酸配列を特異的に同定する。様々な態様において、CGX1~8によって表される配列の2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上の発現が、アレイとの結合によって同定される。基質アレイは、例えば、固体基質、例えば、米国特許第5,744,305号に記載されるような「チップ」の上に存在し得る。

【0114】

アレイおよび複数状態

本発明は、1個以上の核酸配列を含む核酸基質アレイも含む。アレイ上の核酸は、CGX1~8によって表される1個以上の核酸配列を特異的に同定する。様々な態様において、CGX1~8によって表される配列のうちの2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上の発現が同定される。

30

【0115】

アレイ中の核酸は、例えば、列挙された核酸の一部に相補的なオリゴヌクレオチド配列のような相同核酸配列を有することにより、列挙された核酸を同定することができる。基質アレイは、例えば、固体基質、例えば、米国特許第5,744,305号に記載されるような「チップ」の上に存在し得る。

【0116】

本発明は、単離された複数の核酸配列（即ち、2個以上の核酸の混合物）も含む。核酸配列は、液相または固相に存在でき、例えば、ニトロセルロース膜のような固体支持体の上に固定化することができる。複数のものとしては、典型的には、CGX1~8によって表される核酸配列の1個以上が含まれる。様々な態様において、複数には、CGX1~8によって表される配列の2個、3個、4個、5個、6個、7個、またはそれ以上が含まれる。

40

【0117】

結腸癌または胃癌の治療方法

本発明は、対象における結腸癌または胃癌を治療する方法を提供する。投与は、本明細書に記載された差次的に発現される配列（例えば、CGX1~8）の異常な発現または活性に関連する障害のリスクを有している（もしくは、そのような障害に感受性である）か、またはそのような障害を有している対象に対して予防的または治療的に行われ得る。

【0118】

50

その方法は、非結腸癌細胞または非胃癌細胞と比較して結腸癌細胞または胃癌細胞において発現が上昇している遺伝子（「過剰発現遺伝子」）のうち1個以上の遺伝子産物の発現もしくは機能またはその両方を低下させることも含む。発現は、当技術分野において既知のいくつかの方式で阻害され得る。例えば、発現は、1個または複数個の過剰発現遺伝子の発現を阻害するかまたはそれに拮抗する核酸を対象へ投与することにより阻害され得る。1つの態様において、1個または複数個の遺伝子の発現を妨害するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAが、投与され得る。

【0119】

上述のように、CGX1～8のヌクレオチド配列に対応するアンチセンス核酸は、CGX1～8の発現レベルを低下させるために使用され得る。結腸癌または胃癌において上方制御されているCGX1～8に対応するアンチセンス核酸は、結腸癌または胃癌の治療に有用である。特に、本発明のアンチセンス核酸は、CGX1～8もしくはそれらに対応するmRNAに結合し、それにより、遺伝子の転写もしくは翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、かつ/またはCGX1～8からなる群より選択される核酸によってコードされるタンパク質の発現を阻害し、最終的に、タンパク質の機能を阻害することにより作用することができる。例えば、プロモーター、例えば、組織特異的または腫瘍特異的なプロモーター、を含有しているDNAが、アンチセンスRNAへと転写されるDNA配列（アンチセンス鋳型）と機能的に連結される。「機能的に連結される」とは、適切な分子（例えば、転写アクチベータータンパク質）が制御配列に結合した場合に遺伝子が発現されるような方式で、コーディング配列と制御配列（即ち、プロモーター）とが接続されることを意味する。

【0120】

「アンチセンス核酸」という用語は、本明細書において使用されるように、標的配列に特異的にハイブリダイズすることができる限り、標的配列に完全に相補的なヌクレオチドおよび1個以上のヌクレオチドのミスマッチを有するもの両方を包含する。例えば、本発明のアンチセンス核酸は、少なくとも15個の連続ヌクレオチドにわたり、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを含む。当技術分野において既知のアルゴリズムが、相同性を決定するために使用され得る。

【0121】

アンチセンス療法は、標準的なベクターおよび/または遺伝子送達系により、アンチセンス核酸を患者へ投与することにより実施される。適当な遺伝子送達系には、とりわけ、リボソーム、受容体を介する送達系、裸のDNA、ならびにヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスのようなウイルスベクターが含まれ得る。治療用核酸組成物は、薬学的に許容される担体で製剤化される。治療用組成物は、上記のような遺伝子送達系も含み得る。薬学的に許容される担体とは、動物への投与に適している生物学的に適合性の媒体、例えば、生理食塩水である。化合物の治療的有効量とは、治療を受けた動物におけるCGX遺伝子産物の産生が低下するまたは腫瘍増殖が低下するような医学的に望ましい結果をもたらすことができる量である。

【0122】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、タンパク質をコードするDNAまたはmRNAと結合し、それらの転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、タンパク質の発現を阻害し、それによって、タンパク質機能の阻害をもたらすことにより、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質を産生する細胞に作用する。

【0123】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、誘導体に対して不活性な、適当な基剤材料と混合することにより、リニメント剤またはパップ剤のような外用調製物に製造され得る。

【0124】

また、必要に応じて、誘導体は、賦形剤、等張剤、可溶化剤、安定剤、保存剤、鎮痛剤等を添加することにより、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤、および凍結乾燥剤へと製剤化され得る。これらは、以下の既知の方

10

20

30

40

50

法によって調製され得る。

【0125】

アンチセンス核酸誘導体は、病巣へ直接適用することにより、または病巣に到達するよう血管内に注射することにより、患者に与えられる。送達経路としては、静脈内、皮下、筋肉内、および腹腔内といった非経口投与が、核酸またはCGX阻害性ペプチドまたは非ペプチド化合物の送達に使用され得る。アンチセンス封入剤も、持続性および膜透過性を増加させるために使用され得る。例としては、リポソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチン、またはこれらの誘導体がある。

【0126】

本発明のアンチセンス核酸誘導体の投与量は、例えば、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の核酸、性別、投与の時間および経路、全身状態、および同時に投与される他の薬剤を含む患者の状態に応じて適切に調整され、所望の量で使用され得る。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは、0.1~50mg/kgの用量範囲が投与され得る。または、核酸の静脈内投与のための投与量は、核酸分子およそ $10^6 \sim 10^{22}$ コピーである。

10

【0127】

本発明のアンチセンス核酸は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、そのため、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制するのに有用である。また、本発明のアンチセンス核酸を含む発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を阻害することができるため、有用である。

【0128】

本発明のアンチセンス核酸は、修飾オリゴヌクレオチドを含む。例えば、チオ化(thioated)ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ抵抗性を賦与するために使用され得る。

20

【0129】

CGX mRNAの様々な部分に相補的なオリゴヌクレオチドは、標準的な方法に従い、腫瘍細胞におけるCGX産生を低下させる能力に関して、インビトロで試験される。候補組成物の非存在下で培養した細胞と比較して、候補アンチセンス組成物と接触した細胞におけるCGX遺伝子産物の低下は、CGX特異的抗体またはその他の検出戦略を使用して検出される。インビトロの細胞に基づくアッセイまたは無細胞アッセイにおいてCGXの産生を低下させた配列は、次いで、悪性新生物を有する動物におけるCGX産生の低下を確認するため、ラットまたはマウスにおいてインビボで試験される。

30

【0130】

適切なアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、配列番号：50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、および79の群より選択されるヌクレオチド配列を有する。配列番号：50のヌクレオチド配列を有するものを含むARHCL1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド；配列番号：52のヌクレオチド配列を有するものを含むNFXL1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド；配列番号：54または56のヌクレオチド配列を有するものを含むC20orf20のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド；配列番号：58、60、62、64、または66からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するものを含むLEMD1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド；配列番号：68のヌクレオチド配列を有するものを含むCCPUC1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド；配列番号：70または72のヌクレオチド配列を有するものを含むLy6EのアンチセンスS-オリゴヌクレオチド；配列番号：74または76のヌクレオチド配列を有するものを含むNkd1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、結腸直腸癌にとって適切であり得る。配列番号：79のヌクレオチド配列を有するものを含むLAPTM4βのアンチセンスS-オリゴヌクレオチドは、胃癌にとって適切であり得る。

40

【0131】

リボザイム療法も、癌患者におけるCGX遺伝子発現を阻害するために使用される。リボザイムは、特異的なmRNAに結合し、次いで、予定された切断点でそれを切断し、それによって転写物を破壊する。これらのRNA分子は、当技術分野において既知の方法に従い、CGC遺伝子の発現を阻害するために使用される(Sullivanら、1994、J. Invest. Derm. 103：

50

85S-89S ; Czubaykoら、1994、J. Biol. Chem. 269 : 21358-21363 ; Mahieuら、1994、Blood 84 : 3758-65 ; Kobayashiら、1994、Cancer Res. 54 : 1271-1275)。

【 0 1 3 2 】

また、マーカー遺伝子に対するsiRNAも、マーカー遺伝子の発現レベルを低下させるために使用され得る。「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を防ぐ二本鎖RNA分子を意味する。RNA転写の鋳型となるDNAを含む、細胞にsiRNAを導入する標準的な技術が使用される。本発明に関して、siRNAは、CGX1~8のような上方制御されるマーカー遺伝子に対するセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、単一の転写物が標的遺伝子からのセンス配列および相補的アンチセンス配列の両方、例えばヘアピンを有するように構築される。

10

【 0 1 3 3 】

この方法は、例えば、細胞の悪性形質転換の結果として上方制御された発現を変化させるために使用される。標的細胞におけるCGX1~8の1個に対応する転写物とsiRNAとの結合は、細胞におけるタンパク質産生の低下をもたらす。オリゴヌクレオチドの長さは、少なくとも10ヌクレオチドであり、天然に存在する転写物と同じ長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは19~25ヌクレオチド長である。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドは75、50、25ヌクレオチド未満の長さである。

【 0 1 3 4 】

siRNAのヌクレオチド配列は、アンピオン (Ambion) のウェブサイト (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) より入手可能なsiRNA設計コンピュータプログラムを使用して設計された。そのコンピュータプログラムは、以下のプロトコルに基づき、siRNA合成のためのヌクレオチド配列を選択する。

20

【 0 1 3 5 】

siRNA標的部位の選択：

1. 対象転写物のAUG開始コドンから開始して、下流へ、AAジヌクレオチド配列に関してスキャンする。各AAおよび3'隣接19ヌクレオチドの出現を、可能性のあるsiRNA標的部位として記録する。Tuschlらは、制御タンパク質結合部位をより豊富に含むため、5'および3'の非翻訳領域 (UTR) ならびに開始コドン近傍 (75塩基内) の領域に対してはsiRNAを設計しないよう推奨している。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合に干渉する可能性がある。
2. 可能性のある標的部位をヒトゲノムデータベースと比較し、他のコーディング配列との有意な相同性を有する標的配列を検討から排除する。相同性検索は、NCBIサーバ上の：www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/に見出されるBLASTを使用して実施することができる。
3. 合成用に適格な標的配列を選択する。アンピオン (Ambion) では、好ましくは、いくつかの標的配列を、評価用として、遺伝子の全長に沿って選択することができる。

30

【 0 1 3 6 】

好ましい態様において、siRNAの標的配列として適したヌクレオチド配列は、配列番号：126、127、128、または129の群から選択され得る。配列番号：126のヌクレオチド配列からなるNFXL1の標的配列；配列番号：127のヌクレオチド配列からなるC20orf20の標的配列；および配列番号：128または129のヌクレオチド配列からなるCCPUC1の標的配列は、結腸直腸癌の治療用のsiRNAヌクレオチド配列を設計するために適切に使用され得る。例えば、本発明の好ましいsiRNAは、以下のヌクレオチド配列の組み合わせを有する二本鎖RNAを含む。配列番号：106~121のヌクレオチド配列において、塩基「t」には、RNAヌクレオチド配列を示す塩基「u」が含まれる。

40

【 0 1 3 7 】

siRNA用標的配列のヌクレオチド配列の組み合わせ

配列番号：126	配列番号：114/115
配列番号：127	配列番号：116/117
配列番号：128	配列番号：118/119
配列番号：129	配列番号：120/121

50

【0138】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、そのため、本発明のポリペプチドの生物学的活性を抑制するのに有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現阻害剤は、本発明のポリペプチドの生物学的活性を阻害することができるという点で有用である。従って、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む組成物は、結腸癌または胃癌の治療に有用である。

【0139】

または、過剰発現遺伝子のうち1個以上の遺伝子産物の機能を、遺伝子産物に結合するまたはその機能を阻害する化合物を投与することにより阻害することができる。化合物は、例えば、1個または複数個の過剰発現遺伝子産物に対する抗体であり得る。

10

【0140】

本発明は、抗体、特に、上方制御されるマーカー遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体、またはその抗体の断片の使用に関する。本明細書において使用されるように、「抗体」という用語は、抗体を合成するために使用された抗原（即ち、上方制御されたマーカー遺伝子産物）またはそれと密接に関係している抗原とのみ相互作用する（即ち、結合する）特異的な構造を有する免疫グロブリン分子を指す。さらに、マーカー遺伝子によってコードされるタンパク質のうちの1個以上と結合する限り、抗体は、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、または適切なリンカーによってH鎖およびL鎖からのFv断片を連結させた単鎖Fv（scFv）（Huston J. S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883（1988））であり得る。より具体的には、抗体断片は、パパインまたはペプシンのような酵素で抗体を処理することにより生成してもよい。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞において発現させてもよい（例えば、Co M. S.ら、J. Immunol. 152: 2968-2976（1994）；Better M.およびHorwitz A. H.、Methods Enzymol. 178: 476-496（1989）；Pluckthun A.およびSkerra A.、Methods Enzymol. 178: 497-515（1989）；Lamoyi E.、Methods Enzymol. 121: 652-663（1986）；Rousseaux J.ら、Methods Enzymol. 121: 663-669（1986）；Bird R. E.およびWalker B. W.、Trends Biotechnol. 9: 132-137（1991）を参照のこと）。

20

【0141】

抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）のような多様な分子との結合によって修飾され得る。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することにより入手できる。これらの修飾法は、当分野において一般的である。

30

【0142】

または、抗体は、非ヒト抗体に由来する可変領域と、ヒト抗体に由来する定常領域とのキメラ抗体として、または非ヒト抗体に由来する相補性決定領域（CDR）と、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域（FR）と、定常領域とを含むヒト化抗体として入手できる。そのような抗体は、既知の技術を使用することにより調製できる。

【0143】

癌細胞で発生する特異的な分子的变化に対して指向される癌治療は、進行した乳癌の治療のためのトラスツズマブ（trastuzumab）（ハーセプチン（Herceptin））、慢性骨髄性白血病のためのメチル化イマチニブ（imatinib methylate）（グリベック（Gleevec））、非小細胞肺癌（NSCLC）のためのゲフィチニブ（gefitinib）（イレッサ（Iressa））、ならびにB細胞リンパ腫およびマントル細胞リンパ腫のためのリツキシマブ（rituximab）（抗CD20 mAb）のような抗癌薬の臨床的開発および規制承認によって認証されている（Ciardiello F、Tortora G「新規癌治療法：上皮増殖因子受容体のターゲティング（A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor）」Clin Cancer Res. 2001年10月；7（10）：2958-70 総説；Slamon DJ、Leyland-Jones B、Shak S、Fuchs H、Paton V、Bajamonde A、Fleming T、 Eiermann W、 Wolter J、 Pegram M、 Baselga J、 Norton L「HER2を過剰発現している転移性乳癌のための化学療法

40

50

とHER2に対するモノクローナル抗体との併用 (Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2) 」N Engl J Med. 2001年3月15日 ; 344 (11) : 783-92. ; Rehwald U、Schulz H、Reiser M、Sieber M、Staak JO、Morschhauser F、Driessen C、Rudiger T、Muller-Hermelink K、Diehl V、Engert A「モノクローナル抗体リツキシマブによる再発したCD20+ホジキンリンパ腫の治療は有効であり、よく容認される : ドイツホジキンリンパ腫研究グループの第二相治験の結果 (Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated : results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group) 」Blood 2003年1月15日 ; 101 (2) : 420-424 ; Fang G、Kim CN、Perkins CL、Ramadevi N、Winton E、Wittmann S、およびBhalla KN (2000) Blood、96、2246-2253) 。これらの薬物は、形質転換細胞のみを標的とするため、臨床的に有効であり、伝統的な抗癌剤よりも許容されやすい。従って、そのような薬物は、癌患者の生存率および生活の質を改善するのみならず、分子標的癌治療の概念を認証する。さらに、標的特異的薬剤は、組み合わせで使用された場合、標準的な化学療法の実効性を増強し得る (Gianni L (2002) Oncology、63 Suppl 1、47-56 ; Klejman A、Rushen L、Morrione A、Slupianek A、およびSkorski T (2002) Oncogene、21、5868-5876) 。従って、将来の癌治療は、恐らく、従来の薬物を、血管形成および侵襲性といった腫瘍細胞の異なる特徴を狙う標的特異的薬剤と組み合わせた治療を含むであろう。

10

【 0 1 4 4 】

これらの調整法は、エキスピボもしくはインピトロで (例えば、薬剤と共に細胞を培養することにより) 、またはインピボで (例えば、対象へ薬剤を投与することにより) 実施され得る。そのため、本発明は、差次的に発現されるタンパク質または核酸分子の異常な発現または活性を特徴とする疾患または障害に罹患している個体を治療する方法を提供する。1つの態様において、方法は、1個以上の差次的に発現される遺伝子の発現または活性を調整する (例えば、上方制御もしくは下方制御する) 薬剤 (例えば、本明細書に記載されたスクリーニングアッセイによって同定された薬剤) または薬剤の組み合わせを投与することを含む。別の態様において、方法は、差次的に発現される遺伝子の発現または活性における低下または異常を補う療法として、タンパク質もしくはタンパク質の組み合わせ、または核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせを投与することを含む。

20

【 0 1 4 5 】

(疾患または障害に罹患していない対象と比べて) 遺伝子のレベルまたは生物学的活性の増大を特徴とする疾患および障害は、1個または複数個の過剰発現遺伝子の活性に拮抗する (即ち、活性を低下させるかまたは阻害する) 治療剤で治療され得る。活性に拮抗する治療剤は、治療的または予防的に投与され得る。

30

【 0 1 4 6 】

利用され得る治療剤には、例えば、(i) 1個もしくは複数個の過剰発現配列のポリペプチド、もしくはその類似体、誘導体、断片、もしくは相同体 ; (ii) 1個もしくは複数個の過剰発現配列に対する抗体 ; (iii) 1個もしくは複数個の過剰発現配列をコードする核酸 ; (iv) アンチセンス核酸、もしくは「機能欠損」 (即ち、1個以上の過剰発現配列がコーディング配列へ異種挿入したため) である核酸 ; (v) 低分子干渉RNA (siRNA) ; または (vi) 調整剤 (即ち、過剰発現ポリペプチドとその結合パートナーとの相互作用を変化させる、阻害剤、アゴニスト、およびアンタゴニスト) が含まれる。機能欠損分子は、相同的組換えによってポリペプチドの内因性機能を「ノックアウト」するために利用される (例えば、Capecchi、Science 244 : 1288-1292、1989を参照) 。

40

【 0 1 4 7 】

上昇レベルは、(例えば、生検組織から) 患者の組織試料を入手し、RNAまたはペプチドのレベル、発現したペプチド (または、発現が変化した遺伝子のmRNA) の構造および / または活性に関してインピトロでアッセイし、ペプチドおよび / またはRNAを定量することにより、容易に検出され得る。当技術分野における周知の方法には、(例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降後のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル

50

電気泳動、免疫細胞化学等による)免疫アッセイ、および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、インサイチュハイブリダイゼーション等)が含まれるが、これらに制限されない。

【0148】

予防剤の投与は、疾患または障害を予防するまたはその進行を遅延するよう、異常な遺伝子発現を特徴とする症状が顕在化する前に行われ得る。検出された異常な発現の型に依存して、薬剤が対象の治療に使用され得る。適切な薬剤は、本明細書に記載されたスクリーニングアッセイに基づき決定され得る。

【0149】

本発明の別の局面は、治療目的のため、本明細書に記載された差次的に制御された遺伝子のうちの1個の発現または活性を調整する方法に関する。方法は、差次的に発現される遺伝子の遺伝子産物の活性のうちの1つ以上を調整する薬剤と、細胞とを接触させることを含む。核酸またはタンパク質、これらのタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、ペプチド模倣体、またはその他の低分子のような、タンパク質活性を調整する薬剤が、本明細書に記載されるような薬剤であり得る。1つの態様において、薬剤は、差次的に発現される遺伝子のうちの1つ以上のタンパク質活性を刺激する。そのような刺激性薬剤の例には、活性タンパク質および細胞に導入されたそのようなタンパク質をコードする核酸分子が含まれる。

【0150】

本発明は、CGX1~8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチド、もしくはポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象へ投与することを含む、対象における結腸癌または胃癌を治療または予防する方法にも関する。ポリペプチドの投与は、対象における抗腫瘍免疫を誘導する。抗腫瘍免疫を誘導するため、CGX1~8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチド、もしくはポリペプチドの免疫学的活性断片、またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが投与される。ポリペプチドまたはその免疫学的活性断片は、結腸癌または胃癌に対するワクチンとして有用である。いくつかの場合には、タンパク質またはその断片は、T細胞受容体(TCR)と結合した形態、またはマクロファージ、樹状細胞(DC)、もしくはB細胞のような抗原提示細胞(APC)によって提示された形態で投与されてもよい。DCは抗原提示能力が高いため、APCの中でDCの使用が最も好ましい。

【0151】

本発明において、結腸癌または胃癌に対するワクチンとは、動物への接種の際に抗腫瘍免疫を誘導する機能を有している物質を指す。本発明によると、CGX1~8からなる群より選択される核酸によってコードされるポリペプチドまたはその断片は、CGX1~8を発現している結腸癌細胞または胃癌細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導しうるHLA-A24拘束性またはHLA-A*0201拘束性のエピトープペプチドであることが示唆された。従って、本発明は、ポリペプチドを使用して抗腫瘍免疫を誘導する方法も包含する。一般に、抗腫瘍免疫には、腫瘍に対する細胞障害性リンパ球の誘導、腫瘍を認識する抗体の誘導、および抗腫瘍サイトカイン産生の誘導、といった免疫応答が含まれる。

【0152】

従って、ある種のタンパク質が、動物への接種の際に、これらの免疫応答のうちのいずれかを誘導する場合、そのタンパク質は、抗腫瘍免疫誘導作用を有していると決定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、宿主におけるタンパク質に対する免疫系の応答をインビボまたはインビトロで観察することにより検出され得る。

【0153】

例えば、細胞障害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。生体に侵入した外

10

20

30

40

50

来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によってT細胞およびB細胞に提示される。APCにより提示された抗原に応答するT細胞は、抗原による刺激により、細胞障害性T細胞（または、細胞障害性Tリンパ球；CTL）へと抗原特異的に分化し、次いで増殖する（これは、T細胞の活性化と呼ばれる）。従って、ある種のペプチドによるCTL誘導は、APCによりペプチドをT細胞に提示し、CTLの誘導を検出することにより評価され得る。さらに、APCは、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化作用を有する。CD4 + T細胞およびCD8 + T細胞も抗腫瘍免疫において重要であるため、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用は、これらの細胞の活性化作用を指標として使用して評価され得る。

【0154】

樹状細胞（DC）をAPCとして使用してCTLの誘導作用を評価する方法は、当技術分野において周知である。DCは、APCの中で最も強いCTL作誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法においては、まず、被験ポリペプチドをDCに接触させ、次いで、このDCをT細胞と接触させる。DCとの接触後の検出で、T細胞が目的の細胞に対する細胞障害作用を有していれば、被験ポリペプチドが細胞障害性T細胞の誘導活性を有していることを示す。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば、⁵¹Cr標識腫瘍細胞の溶解を指標として使用して検出され得る。または、³H-チミジン取り込み活性またはLDH（乳糖デヒドロゲナーゼ）放出を指標として使用して、腫瘍細胞傷害の程度を評価する方法も周知である。

【0155】

DCの他に、末梢血単核細胞（PBMC）もAPCとして使用され得る。CTLの誘導は、GM-CSFおよびIL-4の存在下でPBMCを培養することにより増強されることが報告されている。同様に、CTLは、キーホールリンペットヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin）（KLH）およびIL-7の存在下でPBMCを培養することにより誘導されることが示されている。

【0156】

これらの方法によりCTL誘導活性を保有していることが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化作用およびその後のCTL誘導活性を有するポリペプチドである。従って、腫瘍細胞に対するCTLを誘導するポリペプチドは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドと接触することにより腫瘍に対するCTLを誘導する能力を獲得したAPCは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示により細胞障害性を獲得したCTLも、腫瘍に対するワクチンとして使用され得る。そのようなAPCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を使用した腫瘍の治療法は、細胞免疫療法と呼ばれる。

【0157】

一般に、ポリペプチドを細胞免疫療法に使用する場合、異なる構造を有する複数のポリペプチドを組み合わせ、それらをDCと接触させることにより、CTL誘導の効率が增大することは既知である。従って、タンパク質断片でDCを刺激する場合、複数種の断片による混合物を使用することが有利である。

【0158】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することにより確認され得る。例えば、ポリペプチドに対する抗体が、ポリペプチドで免疫感作された実験動物において誘導される場合、および腫瘍細胞の増殖がそれらの抗体により抑制される場合、そのポリペプチドは抗腫瘍免疫を誘導する能力を有していると決定され得る。

【0159】

抗腫瘍免疫は、本発明のワクチンを投与することにより誘導され、抗腫瘍免疫の誘導による、結腸癌または胃癌の治療および予防が可能となる。癌に対する治療または癌発症の予防には、癌性細胞の増殖の阻害、癌の退縮、および癌の発生の抑制のような段階のうちのいずれかが含まれる。癌を有する個体の死亡率の低下、血中の腫瘍マーカーの減少、癌に伴う検出可能な症状の緩和等も、癌の治療または予防に含まれる。そのような治療的および予防的な効果は、統計的に有意であることが好ましい。例えば、細胞増殖性疾患に対するワクチンの治療効果または予防効果を、ワクチンを投与していない対照と比較する観

察において、5%以下は有意水準である。例えば、スチューデントのt検定、マン-ホイットニーのU検定、またはANOVAが、統計分析のため使用され得る。

【0160】

免疫学的活性を有する前述のタンパク質またはタンパク質をコードするベクターは、アジュバントと組み合わせられてもよい。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と同時に（または連続的に）投与された場合に、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバン等が含まれるが、これらに制限されない。さらに、本発明のワクチンは、薬学的に許容される担体と適切に組み合わせられてもよい。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等である。さらに、ワクチンは、必要に応じて、安定剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤等を含み得る。ワクチンは、全身投与または局所投与される。ワクチン投与は、単回投与により実施されてもよいし、または複数回投与により追加免疫を行ってもよい。

10

【0161】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを使用する場合、腫瘍は、例えば、エクスビボの方法により治療または予防され得る。より具体的には、治療または予防を受けている対象のPBMCを収集し、細胞をエクスビボでポリペプチドと接触させ、APCまたはCTLを誘導した後、細胞を対象へ投与することができる。APCは、ポリペプチドをコードするベクターをエクスビボでPBMCへ導入することによっても誘導できる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは、投与の前にクローニングすることができる。標的細胞に対する傷害活性が高い細胞をクローニングし増殖させることにより、細胞免疫療法はより効率的に実施できる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLは、細胞が由来する個体に対してのみならず、他の個体からの類似の型の腫瘍に対しても、細胞免疫療法として使用することができる。

20

【0162】

さらに、薬学的有効量の本発明のポリペプチドを含む、癌などの細胞増殖性疾患を治療または予防するための薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、抗腫瘍免疫を起こすために使用され得る。

【0163】

結腸癌または胃癌を治療するための薬学的組成物

30

別の局面において、本発明は、本明細書に記載される1個以上の治療用化合物を含む、薬学的組成物または治療用組成物を含む。薬学的製剤には、経口、直腸、鼻、局所（頬および舌下を含む）、腔、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内を含む）の投与に適したもの、または吸入もしくは通気による投与に適したものが含まれ得る。製剤は、適宜、個別の投与量単位で都合良く提示でき、薬学分野における周知の方法のいずれかによって調製できる。そのような薬学の方法は、全て、必要に応じて、液状担体もしくは微細に粉碎された固形担体またはその両方と活性化合物とを会合させる工程を含み、そして、必要であれば、次いで、その生成物を所望の製剤へと成形する工程を含む。

【0164】

経口投与に適した薬学的製剤は、予定された量の活性成分を各々含有しているカプセル剤、カシェ剤、もしくは錠剤のような個別の単位として；散剤もしくは顆粒剤として；または液剤、懸濁剤、もしくは乳濁剤として、都合良く提示できる。活性成分は、ポーラス剤またはペースト剤として提示してもよく、そして純粋な（即ち、担体を含まない）形態であってもよい。経口投与用の錠剤およびカプセル剤は、結合剤、増量剤、滑沢剤、崩壊剤、または湿潤剤のような従来の賦形剤を含み得る。錠剤は、任意で、1個以上の製剤化成分を用いて、圧縮または成型により作成してもよい。圧縮錠剤は、結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、滑沢、界面活性、または分散剤と任意に混合された散剤または顆粒剤のような流動性の高い形態の活性成分を適当な機械で圧縮することにより調製できる。成型錠剤は、不活性液状希釈剤で湿らされた粉末化合物の混合物を適当な機械で成型することにより作成できる。錠剤は、当技術分野における周知の方法に従い、剤皮を施してもよい

40

50

。経口液状調製物は、例えば、水性もしくは油性の懸濁剤、液剤、乳濁剤、シロップ剤、もしくはエリキシル剤の形態であってもよいし、または乾燥生成物として提示し、使用前に水もしくはその他の適当な媒体で調製してもよい。そのような液状調製物は、懸濁化剤、乳化剤、非水性媒体（食用油を含み得る）、または保存剤のような従来の添加剤を含有し得る。錠剤は、任意で、含まれる活性成分を徐放するようにまたは放出が制御されるように製剤化してもよい。

【0165】

非経口投与用の製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および対象となるレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る水性および非水性の無菌の注射液剤；ならびに懸濁化剤および濃化剤を含み得る水性および非水性の無菌の懸濁剤が含まれる。製剤は、単位
10
用量容器または多回用量容器、例えば、密封されたアンプルおよびバイアルで提示でき、使用直前に無菌の液状担体、例えば、生理食塩水、注射用水の添加のみを必要とする、フリーズドライ（凍結乾燥）状態で保管してもよい。または、製剤は連続注入用に提示してもよい。即席の注射用の液剤および懸濁剤は、前に記載されるような種類の無菌の散剤、顆粒剤、および錠剤から調製できる。

【0166】

直腸投与用の製剤は、カカオ脂またはポリエチレングリコールのような通常の担体を含む坐剤として提示できる。口内、例えば、頬または舌下への局所投与用の製剤には、ショ糖およびアラビアゴムもしくはトラガカントゴムのような風味付きの基剤中に活性成分が含まれたロゼンジ剤、ならびにゼラチンおよびグリセリンもしくはショ糖およびアラビア
20
ゴムのような基剤中に活性成分が含まれた香錠が挙げられる。鼻腔内投与の場合、本発明の化合物は、液状スプレーもしくは分散可能な散剤として、または滴剤の形態で使用できる。滴剤は、1つ以上の分散剤、可溶化剤、または懸濁化剤も含む水性または非水性の基剤を用いて製剤化できる。液状スプレーは、加圧パックから都合良く送達される。

【0167】

吸入による投与の場合、化合物は、注入器（insufflator）、ネブライザー（nebulizer）、加圧パック、またはエアロゾルスプレーを送達するその他の便利な手段から都合良く送達される。加圧パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、またはその他の適当なガス等の適当な噴霧剤を含み得る。加圧エアロゾル剤の場合、投与量単位はバルブによって決定され、計量され
30
た量が送達される。

【0168】

または、吸入または通気による投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物、例えば、化合物と乳糖またはデンプンのような適当な粉末基剤との粉末混合物の形態をとり得る。粉末組成物は、単位剤形、例えば、カプセル、カートリッジ、ゼラチン、またはプリスター包装で提示でき、それらから、吸入器または注入器を使用して粉末を投与できる。

【0169】

所望の場合、活性成分を徐放するよう適合させた上記の製剤が利用されてもよい。薬学的組成物は、抗微生物剤、免疫抑制剤、または保存剤のようなその他の活性成分を含有していてもよい。
40

【0170】

特に上で言及した成分に加え、本発明の製剤には、問題となる製剤の型を考慮した上で、当技術分野において一般的なその他の薬剤が含まれていてもよいこと、例えば、経口投与に適した薬剤には着香料が含まれていてもよいことが理解される。

【0171】

好ましい単位投与量製剤は、下記のような有効用量またはその活性成分の適切な画分を含有しているものとする。

【0172】

前記の各条件のため、組成物は、1日当たり約0.1～約250mg/kgの用量で経口的にまたは注射により投与され得る。成人のヒトに対する用量範囲は、一般に、約5mg～約17.5g/日
50

、好ましくは約5mg～約10g/日、最も好ましくは約100mg～約3g/日である。個別の単位で提供される錠剤またはその他の単位剤形には、そのような投与量またはその多回数の投与量で有効量となる量、例えば、約5mg～約500mg、通常約100mg～約500mgを含有する単位が都合良く含まれる。

【0173】

薬学的組成物は、好ましくは、経口的にまたは注射（静脈内もしくは皮下）により投与され、対象へ投与される正確な量は、担当医師の責任であろう。しかしながら、用いられる用量は、対象の年齢および性別、治療が施される正確な障害およびその重傷度を含む多数の要因によるものと考えられる。また、投与経路も、状態およびその重傷度によって変動し得る。

10

【0174】

CGX核酸

CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、および11）からなる群より選択される核酸配列、またはその相補鎖を含む新規の核酸、ならびにこれらの核酸を含むベクターおよび細胞も、本発明において提供される。CGX核酸によってコードされるポリペプチドまたはその生物学的活性部分も提供される。

【0175】

CGXコーディング核酸（例えば、CGX mRNA）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに十分な核酸断片、およびCGX核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして使用するための断片も、本発明に含まれる。本明細書において使用されるように、「核酸分子」という用語には、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチド類似体を使用して生成させたDNAまたはRNAの類似体、ならびにそれらの誘導體、断片、および相同体が含まれるものとする。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAである。

20

【0176】

「プローブ」とは、使用によって長さが可変する、好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド（nt）または最大例えば約6,000ntの核酸配列を指す。プローブは、同一の、類似した、または相補的な核酸配列を検出する際に使用される。より長いプローブは、通常、天然または組換えの起源から得られ、高度に特異的であり、かつオリゴマーよりもハイブリダイズするのがはるかに遅い。プローブは、一本鎖であってもまたは二本鎖であってもよく、PCR、膜を利用したハイブリダイゼーション技術、またはELISA様の技術において特異性を有するよう設計される。

30

【0177】

「単離された」核酸分子とは、その核酸の天然起源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子のことである。単離された核酸分子の例には、ベクターに含有されている組換えDNA分子、異種宿主細胞内に維持されている組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成のDNA分子またはRNA分子が含まれるが、これらに制限されない。好ましくは、「単離された」核酸は、その核酸が由来する生物のゲノムDNAにおいて、その核酸に天然に隣接している配列（即ち、その核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、様々な態様において、単離されたCGX核酸分子は、その核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて、その核酸分子に天然に隣接しているヌクレオチド配列のうち約50kb未満、25kb未満、5kb未満、4kb未満、3kb未満、2kb未満、1kb未満、0.5kb未満、または0.1kb未満を含有し得る。さらに、cDNA分子のような「単離された」核酸分子は、組換え技術により作製された場合には、他の細胞材料もしくは培養培地を実質的に含まず、または化学合成された場合には、化学前駆物質もしくはその他の化学物質を実質的に含まない可能性がある。

40

【0178】

本発明の核酸分子、例えば、CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、または11）のうちのいずれかのヌクレオチド配列を有する核酸分子またはこれらのヌクレオチド配列のうちの

50

いずれかの相補鎖は、標準的な分子生物学の技術、および本明細書に提供される配列情報を使用して単離できる。これらの核酸配列の全部または一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用し、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニングの技術を使用して、CGX核酸配列を単離できる（例えば、Sambrookら編、「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989；およびAusubelら編、「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」、John Wiley & Sons、New York、NY、1993）。

【0179】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技術に従い、鋳型としてcDNA、mRNA、またはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅され得る。そのようにして増幅された核酸は、適切なベクターにクローニングし、DNA配列分析により特徴決定できる。さらに、CGXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術により、例えば、自動DNA合成装置を使用して調製することができる。

10

【0180】

本明細書において使用されるように、「オリゴヌクレオチド」という用語は、PCR反応において使用されるのに十分なヌクレオチド塩基数を有する一連の連結されたヌクレオチド残基を指す。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づいて、またはそれらから設計することができ、特定の細胞または組織における同一の、類似した、または相補的なDNAまたはRNAを増幅するため、それらの存在を確認するため、または明らかにするために使用される。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約10nt、最大50nt、好ましくは約15nt～30ntを有する核酸配列の一部を含む。それらを化学合成し、プローブとして使用することができる。

20

【0181】

別の態様において、本発明の単離された核酸分子は、CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、または11）に示されたヌクレオチド配列の相補鎖である核酸分子を含む。別の態様において、本発明の単離された核酸分子は、これらの配列のうちのいずれかに示されたヌクレオチド配列の相補鎖である核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列のうちのいずれかの一部を含む。CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、または11）に示されたヌクレオチド配列に相補的な核酸分子とは、ミスマッチをほとんどまたは全く起こさずに、示されたヌクレオチド配列と水素結合し、それにより安定な二重鎖を形成されるような、示されたヌクレオチド配列と十分に相補的な核酸分子である。

30

【0182】

本明細書において使用されるように、「相補的な」という用語は、核酸分子のヌクレオチド単位間のワトソン-クリック（Watson-Crick）型またはフーグスティーン（Hoogsteen）型の塩基対形成をさし、「結合」という用語は、2つのポリペプチドもしくは化合物の間の物理的もしくは化学的な相互作用、または会合したポリペプチドもしくは化合物もしくはそれらの組み合わせを意味する。結合には、イオン性相互作用、非イオン性相互作用、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用等が含まれる。物理的相互作用は、直接的であっても間接的であってもよい。間接相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の作用を通したまたはそれらに起因したものであり得る。直接結合とは、別のポリペプチドまたは化合物の作用を通してまたはそれらに起因して起こるのではなく、他の実質的な化学中間物質を含まない相互作用を指す。

40

【0183】

さらに、本発明の核酸分子には、CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、または11）の核酸配列の一部のみ、例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得る断片、またはCGXの生物学的活性部分をコードする断片が含まれ得る。本明細書において提供される断片は、核酸の場合には特異的ハイブリダイゼーションを、またはアミノ酸の場合にはエピトープの特異的な認識をそれぞれ可能にするのに十分な長さ、少なくとも6個の（連続）核酸または少なくとも4個の（連続）アミノ酸の配列と定義され、多くても全長配列より短い部分である。断片は、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続部分に由

50

来し得る。誘導体とは、直接的に、または修飾もしくは部分的置換により、天然化合物から形成された核酸配列またはアミノ酸配列である。類似体とは、天然の化合物と類似しているが同一ではない構造を有し、ある種の要素または側鎖が異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。類似体は、合成されたものでもまたは異なる進化上の起源に由来するものでもよく、野生型と比較して類似または反対の代謝活性を有する可能性がある。

【0184】

下記のように、誘導体または類似体が修飾核酸またはアミノ酸を含有している場合、誘導体および類似体は、全長または全長以外であってもよい。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体または類似体は、様々な態様において、同一サイズの核酸配列もしくはアミノ酸配列、または当技術分野において既知のコンピュータ相同性プログラムにより整列化された配列と比較した場合と、少なくとも約45%、50%、70%、80%、95%、98%、もしくは99%以上の同一性（好ましい同一性は80~99%）があり、またはストリンジェント、中ストリンジェント、低ストリンジェント条件下でコーディング核酸が前記タンパク質をコードする配列の相補鎖にハイブリダイズし得るような、本発明の核酸もしくはタンパク質と実質的に相同な領域を含む分子に含まれるが、これに制限されない。例えば、Ausubelら、「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および下記を参照のこと。例示的なプログラムは、SmithおよびWatermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482-489、これは参照として完全に本明細書において組み入れられる）を使用する、デフォルト設定を使用したギャップ（Gap）プログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI）である。

【0185】

「相同核酸配列」または「相同アミノ酸配列」またはそれらの変種は、前述のようなヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性を特徴とする配列を指す。相同ヌクレオチド配列は、CGXポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同じ生物の異なる組織において発現され得る。または、アイソフォームは、異なる遺伝子によりコードされ得る。本発明において、相同ヌクレオチド配列には、以下に制限されないが、哺乳動物を含み、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、およびその他の生物を含み得るヒト以外の種のCGXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれる。相同ヌクレオチド配列には、本明細書に示されたヌクレオチド配列の天然に存在する対立遺伝子のバリエーションおよび変異も含まれるが、これらに制限されない。しかしながら、相同ヌクレオチド配列には、ヒトCGXタンパク質をコードするヌクレオチド配列は含まれない。相同核酸配列には、CGXポリペプチド内に保存的アミノ酸置換（下記参照）を有するおよびCGX活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列が含まれる。相同アミノ酸配列は、ヒトCGXポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【0186】

ヒトCGX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列により、他の細胞型における、例えば、他の組織に由来するCGX相同体、および他の哺乳動物に由来するCGX相同体の同定および/またはクローニングにおいて使用するために設計されたプローブおよびプライマーの生成が可能である。プローブ/プライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするCGX配列を含む核酸の、少なくとも約12、25、50、100、150、200、250、300、350、もしくは400の連続したセンス鎖ヌクレオチド配列、またはCGX配列を含む核酸のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列、もしくはこれらの配列の天然に存在する変異体のヌクレオチド配列の領域を含む。

【0187】

ヒトCGXヌクレオチド配列に基づくプローブは、同一のまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。様々な態様において、プローブは、さらに、それに付加された標識基、例えば、標識基は、放射性同位体、蛍光性

化合物、酵素、または酵素補因子を含む。そのようなプローブは、対象に由来する細胞の試料におけるCGXコーディング核酸のレベルを測定することにより、例えば、CGX mRNAレベルの検出、またはゲノムCGX遺伝子の変異もしくは欠失しているか否かの決定等により、CGXタンパク質を誤発現 (misexpress) している細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として使用され得る。

【0188】

「CGXの生物学的活性部分を有するポリペプチド」とは、用量に依存するまたは依存しない特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような、成熟型を含む本発明のポリペプチドの活性と類似しているが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドを指す。「CGXの生物学的活性部分」をコードする核酸断片は、CGX生物学的活性を有するポリペプチドをコードするCGX1~5 (配列番号: 1、3、5、7、9、または11) の部分を単離し、CGXタンパク質のコードされた部分を (例えば、インビトロ組換え発現により) 発現させ、CGXのコードされた部分の活性を判定することにより調製され得る。別の態様において、CGXの生物学的活性部分をコードする核酸断片は、1個以上の領域を含む。

【0189】

CGX変種

本発明は、さらに、遺伝暗号の縮重による、開示または参照のCGXヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。従って、これらの核酸は、例えば、CGX1、3、5、7、9、または11に示されたようなCGX核酸を含むヌクレオチド配列によってコードされるものと同じCGXタンパク質をコードする。

【0190】

CGX1~5 (配列番号: 1、3、5、7、9、または11) に示されたヒトCGXヌクレオチド配列に加え、CGXポリペプチドのアミノ酸配列の変化に至るDNA配列多型が、一定の集団 (例えば、ヒト集団) 内に存在し得ることが、当業者により認識されると思われる。そのようなCGX遺伝子の遺伝的多型は、天然の対立遺伝子バリエーションにより、ある集団内の個体間に存在し得る。本明細書において使用されるように、「遺伝子」および「組換え遺伝子」という用語は、CGXタンパク質、好ましくは哺乳動物CGXタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。そのような天然の対立遺伝子バリエーションは、典型的には、CGX遺伝子のヌクレオチド配列中1~5%の変動をもたらす。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、CGXの機能的活性を変えることのないそのようなヌクレオチドバリエーションおよびその結果のCGXのアミノ酸多型は、全て、本発明の範囲内に含まれるものとする。

【0191】

さらに、他の種からのCGXタンパク質をコードし、従ってCGX1、3、5、7、9、または11のヒト配列と異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子が、本発明の範囲内に含まれるものとする。本発明のCGX DNAの天然の対立遺伝子変種および相同体に対応する核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従い、ヒトcDNAまたはその一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、本明細書に開示されたヒトCGX核酸との相同性に基づき単離され得る。例えば、可溶性ヒトCGX DNAは、ヒト膜結合型CGXとの相同性に基づき単離され得る。同様に、膜結合型ヒトCGX DNAは、可溶性ヒトCGXとの相同性に基づき単離され得る。

【0192】

従って、別の態様において、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも6ヌクレオチド長であり、かつCGX1~5 (配列番号: 1、3、5、7、9、または11) のヌクレオチド配列を含む核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。別の態様において、核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、または500ヌクレオチド長である。別の態様において、本発明の単離された核酸分子は、コーディング領域にハイブリダイズする。本明細書において使用されるように、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が典型的には互いにハイブリダイズし続けるハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件についての記載を意図している

。

【0193】

相同体（即ち、ヒト以外の種に由来するCGXタンパク質をコードする核酸）またはその他の関連配列（例えば、パラログ）は、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニング用の当技術分野において周知の方法を用い、プローブとして特定のヒト配列の全部または一部を使用し、低、中、または高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションを行うことで入手できる。

【0194】

本発明において、「機能的に同等な」という用語は、対象ポリペプチドが、CGX1～7タンパク質のように細胞増殖を促進し、癌細胞へ発癌活性を賦与する活性を有していることを意味する。対象ポリペプチドが細胞増殖活性を有しているか否かは、それぞれのポリペプチドを発現している細胞へ対象ポリペプチドをコードするDNAを導入し、細胞の増殖の促進またはコロニー形成活性の増大を検出することにより判断され得る。または、対象ポリペプチドがARHCL1、NFXL1、C20orf20、およびCCPUC1と機能的に同等であるか否かは、それぞれザイキシン、MGC10334またはCENPC1、BRD8、およびnCLUとの結合能を検出することにより判断され得る。

【0195】

本明細書において使用されるように、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズし、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況においては異なるであろう。より長い配列は、より短い配列よりも高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHにおける特異的配列の熱融点（ T_m ）より約5℃低く選択される。 T_m とは、平衡時に、標的配列に相補的なプローブの50%が標的配列にハイブリダイズする（規定のイオン強度、pH、および核酸濃度の下での）温度である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 T_m においては、平衡時、プローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、pH7.0～8.3で、塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的に約0.01～1.0Mのナトリウムイオン（またはその他の塩）であり、温度が、比較的短いプローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチド（例えば、10nt～50nt）の場合には、少なくとも約30℃であり、比較的長いプローブ、プライマー、およびオリゴヌクレオチドの場合には、少なくとも約60℃であるような条件とする。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によっても達成され得る。

【0196】

ストリンジェントな条件は、当業者に既知であり、「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」、John Wiley & Sons、N.Y.（1989）、6.3.1～6.3.6に見出され得る。好ましくは、条件は、少なくとも約65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%、または99%互いに相同な配列が典型的には互いにハイブリダイズし続けるような条件とする。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非制限的な例は、65℃における、6×SSC、50mM トリスHCl（pH7.5）、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール（Ficoll）、0.02% BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションの後、50℃で、0.2×SSC、0.01% BSAでの1回以上の洗浄が行われる。CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、または11）の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に相当する。本明細書において使用されるように、「天然に存在する」核酸分子とは、自然界に存在する（例えば、天然タンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有するRNA分子またはDNA分子を指す。

【0197】

第二の態様において、中程度のストリンジェンシー条件下で、CGX1～5（配列番号：1、3、5、7、9、または11）のヌクレオチド配列、またはそれらの断片、類似体、もしくは誘導体を含む核酸分子にハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジ

10

20

30

40

50

エンシーハイブリダイゼーション条件の非制限的な例は、55 における、 $6\times$ SSC、 $5\times$ デンハルト液、0.5% SDS、および100mg/ml変性サケ精子DNAでのハイブリダイゼーション、そしてその後の37 における、 $1\times$ SSC、0.1% SDSでの1回以上の洗浄である。使用され得るその他の中程度のストリンジェンシー条件は、当技術分野において周知である。例えば、Ausubelら編、1993、「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」、John Wiley & Sons, NY、およびKriegler、1990、「GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL」、Stockton Press, NYを参照のこと。

【0198】

第三の態様において、低ストリンジェンシー条件下で、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または11)のヌクレオチド配列、またはそれらの断片、類似体、もしくは誘導体を含む核酸分子にハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非制限的な例は、40 における、35%ホルムアミド、 $5\times$ SSC、50mM トリスHCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.2% BSA、100mg/ml変性サケ精子DNA、10% (wt/vol) デキストラン硫酸でのハイブリダイゼーション、そしてその後の50 における、 $2\times$ SSC、50mM トリスHCl (pH7.4)、5mM EDTA、および0.1% SDSでの1回以上の洗浄である。使用され得るその他の低ストリンジェンシー条件(例えば、種間ハイブリダイゼーションに利用されるような)は、当技術分野において周知である。例えば、Ausubelら編、1993、「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」、John Wiley & Sons, NY、およびKriegler、1990、「GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL」、Stockton Press, NY; Shiloら、1981、Proc Natl Acad Sci USA 78: 6789-6792 を参照のこと。

【0199】

保存的変異

熟練した当業者であれば、集団内に存在し得るCGX配列の天然に存在する対立遺伝子変種に加え、CGXタンパク質の機能的能力を変えることなく、CGX核酸に、または直接CGXポリペプチド配列に変化が導入され得ることをさらに認識するものと思われる。いくつかの態様において、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または11)のヌクレオチド配列は改変され、それによりコードされるCGXタンパク質のアミノ酸配列が変化するものと思われる。例えば、様々な「非必須な」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換が、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または11)の配列に作成され得る。「非必須な」アミノ酸残基とは、生物学的活性を変えることなくCGX野生型配列からの改変が可能な残基であり、「必須な」アミノ酸残基とは、生物学的活性に必要とされる残基である。例えば、本発明のCGXタンパク質間で保存されているアミノ酸残基は、特に、改変を受け入れにくいと予測される。

【0200】

さらに、本発明のCGXタンパク質のファミリーメンバー間で保存されているアミノ酸残基も、特に、改変を受け入れにくいと予測される。そのため、これらの保存されたドメインは、変異を受け入れやすい可能性が低いと思われる。しかしながら、その他のアミノ酸残基(例えば、CGXタンパク質のメンバー間で保存されていないまたは部分的にしか保存されていないもの)は、活性に不可欠ではない可能性があり、改変を受け入れやすい可能性が高い。

【0201】

本発明の別の局面は、活性にとって不可欠ではないアミノ酸残基に変化を含むCGXタンパク質をコードする核酸分子に関する。そのようなCGXタンパク質は、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または11)を含有している核酸によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列とはアミノ酸配列が異なるが、依然として生物学的活性を保持している。1つの態様において、単離された核酸分子は、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または11)を含む核酸によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列のアミノ酸配列と、少なくとも約45%相同な、より好ましくは60%、さらに好ましくは少なくとも70%、80%、90%、95%、98%、最も好ましくは少なくとも約99%相同なアミノ酸配列を含むタンパク

質をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0202】

相同なCGXタンパク質をコードする単離された核酸分子は、1個以上のアミノ酸の置換、付加、または欠失が、コードされるタンパク質へ導入されるよう、1個以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または、11)を含む核酸のヌクレオチド配列へ導入することにより作出され得る。

【0203】

変異は、部位特異的突然変異誘発およびPCRによる突然変異誘発のような標準的な技術により、CGX1~5(配列番号:1、3、5、7、9、または11)を含む核酸へ導入され得る。好ましくは、保存的なアミノ酸置換が、1個以上の予測された非必須なアミノ酸残基において作成される。「保存的なアミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と交換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、無極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、β分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。従って、CGX内の予測された非必須なアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基と置き換えられる。または、別の態様においては、飽和突然変異誘発等により、CGXコーディング配列の全部または一部に沿ってランダムに変異を導入し、結果として生じた変異体をCGX生物学的活性に関してスクリーニングし、活性を保持している変異体を同定することができる。核酸の突然変異誘発の後、コードされるタンパク質を、当技術分野において既知の任意の組換え技術により発現させ、タンパク質の活性を決定することができる。

【0204】

その他の態様において、最初の配列にハイブリダイズする相補ポリヌクレオチド配列の断片は、CGX1、3、5、7、9、または、11の相補ポリヌクレオチド配列の断片である。

【0205】

その他の特定の態様において、核酸はRNAまたはDNAである。断片は約10~約100ヌクレオチド長、例えば約10~約90ヌクレオチド長、または約10~約75ヌクレオチド長、約10~約50塩基長、約10~約40塩基長、または約15~約30塩基長である、CGX1、3、5、7、9、または11の相補ポリヌクレオチド配列の断片である。

【0206】

CGXポリペプチド

本発明の1つの局面は、単離されたCGXタンパク質(配列番号:2、4、6、8、10、または12)、およびそれらの生物学的活性部分、またはそれらの誘導體、断片、類似体、もしくは相同体に関する。抗CGX抗体をもたらすための免疫原として使用するのに適しているポリペプチド断片も提供される。1つの態様において、天然CGXタンパク質が、標準的なタンパク質精製技術を使用した適切な精製スキームにより、細胞または組織の起源から単離され得る。別の態様において、CGXタンパク質は、組換えDNA技術により作製される。CGXタンパク質またはポリペプチドは、組換え発現の代わりに、標準的なペプチド合成技術を使用して化学合成されてもよい。

【0207】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的活性部分は、CGXタンパク質が由来する細胞もしくは組織の起源からの細胞材料もしくはその他の混入タンパク質を実質的に含まないか、または化学合成された場合には、化学前駆物質もしくはその他の化学物質を実質的に含まない。「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、単

離されたまたは組換え作製された細胞の細胞要素からタンパク質が分離されているCGXタンパク質の調製物を含む。1つの態様において、「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、(乾重量で)約30%未満の非CGXタンパク質(本明細書において、「混入タンパク質」とも呼ばれる)、より好ましくは約20%未満の非CGXタンパク質、さらに好ましくは約10%未満の非CGXタンパク質、最も好ましくは約5%未満の非CGXタンパク質を有するCGXタンパク質の調製物を含む。CGXタンパク質またはその生物学的活性部分が組換え作製される場合には、好ましくは培養培地も実質的に含まず、即ち、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満である。

【0208】

10

「化学前駆物質またはその他の化学物質を実質的に含まない」という用語は、タンパク質の合成に関与した化学前駆物質またはその他の化学物質からタンパク質が分離されているCGXタンパク質の調製物を含む。1つの態様において、「化学前駆物質またはその他の化学物質を実質的に含まない」という用語は、(乾重量で)約30%未満の化学前駆物質または非CGX化学物質、より好ましくは約20%未満の化学前駆物質または非CGX化学物質、さらに好ましくは約10%未満の化学前駆物質または非CGX化学物質、最も好ましくは約5%未満の化学前駆物質または非CGX化学物質を有しているCGXタンパク質の調製物を含む。

【0209】

CGXタンパク質の生物学的活性部分には、CGXタンパク質のアミノ酸配列と十分に相同な、またはそれに由来するアミノ酸配列、例えば、全長CGXタンパク質よりも少数のアミノ酸を含み、かつCGXタンパク質の活性を少なくとも1つ示す、CGX1~8を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列、を含むペプチドが含まれる。典型的には、生物学的活性部分は、CGXタンパク質の活性を少なくとも1つ有するドメインまたはモチーフを含む。CGXタンパク質の生物学的活性部分は、例えば、10、25、50、100アミノ酸長、またはそれ以上のポリペプチドであってもよい。

20

【0210】

本発明のCGXタンパク質の生物学的活性部分は、CGXタンパク質間で保存された上記の同定されたドメインのうちの少なくとも1つを含有している可能性がある。別のCGXタンパク質の生物学的活性部分は、上記の同定されたドメインのうちの少なくとも2つを含有している可能性がある。もう1つのCGXタンパク質の生物学的活性部分は、上記の同定されたドメインのうちの少なくとも3つを含有している可能性がある。さらにもう1つの本発明のCGXタンパク質の生物学的活性部分は、上記の同定されたドメインのうちの少なくとも4つを含有している可能性がある。

30

【0211】

さらに、タンパク質の他の領域が欠失したその他の生物学的活性部分が、組換え技術により調製され、天然CGXタンパク質の機能的活性のうちの1つ以上に関して評価され得る。

【0212】

いくつかの態様において、CGXタンパク質は、これらのCGXタンパク質のうちの1つに実質的に相同であり、かつその機能的活性を保持しているが、後に詳述されるように、天然の対立遺伝子バリエーションまたは突然変異誘発によりアミノ酸配列が異なっている。

40

【0213】

本発明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を制限しない以下の実施例においてさらに説明される。以下の実施例は、結腸癌細胞または胃癌細胞において差次的に発現される遺伝子の同定および特徴決定を例示するものである。

【0214】

実施例1：一般的方法

患者および組織標本

結腸直腸癌および胃癌の組織、ならびに対応する非癌性組織は、全て、インフォームド Consentをもって、手術を受けた患者の外科標本から入手した。

【0215】

50

ゲノム全体のcDNAマイクロアレイ

23040個の遺伝子を含むゲノム全体のcDNAマイクロアレイを使用した。顕微解剖した組織から抽出した全RNAを、DNase Iにより処理し、アンプリスクライプトT7転写キット (Ampliscribe T7 Transcription Kit) (Epicentre Technologies) により増幅し、その後、Cy色素 (Amersham) で逆転写中に標識した。非癌性組織からのRNAをCy5で、腫瘍からのRNAをCy3で標識した。ハイブリダイゼーション、洗浄、および検出は、以前に記載されたようにして(4)実施し、各標的スポットのCy5およびCy3の蛍光強度は、アレイビジョン (ArrayVision) ソフトウェア (Amersham Pharmacia) により生成させた。バックグラウンドシグナルを差し引いた後、2連の値を各スポットについて平均化した。次いで、各スライドにおける52個のハウスキーピング遺伝子のCy5およびCy3の平均強度が一致するように、スライド上の全ての蛍光強度を規準化した。Cy3およびCy5の両方の強度が25,000蛍光単位未満である場合には、その遺伝子をさらなる検討から排除し、残りのうち、Cy3/Cy5シグナル比が>2.0であるものをさらなる評価のために選択した。

10

【0216】

細胞株

COS7細胞、ならびにヒト結腸癌細胞株LoVo、HCT15、およびSW480は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (ATCC, Rockville, MD) より入手し、ヒト結腸癌SNU-C4細胞は、韓国細胞バンク (Korea cell-line bank) より入手した。ヒト胃癌細胞株MKN-1、MKN-28、MKN45、およびMKN74は、ジャパニーズ・コレクション・オブ・リサーチ・バイオリソーシーズ (Japanese Collection of Research Bioresources) (JCRB) からのものであった。ヒト胃癌MKN7細胞は、理研 (RIKEN) からのものであり、ヒト胃癌St-4細胞は、日本の癌研究所 (Institute of Cancer Research) のTsuruo博士より寄贈された。全ての細胞を、適切な培地 (Sigma) : COS7はダルベッコ改変イーグル培地にて、SNUC4、HCT15、MKN-1、MKN-7、MKN-28、MKN45、MKN74、St-4はRPMI1640にて、SW480はレイボビッツ (Leibovitz's) L-15にて、LoVoはハム (HAM's) F-12にて単層で増殖させた。全ての培地に、10%胎仔ウシ血清および1%抗生物質/抗真菌剤溶液 (Sigma) を補足した。

20

【0217】

RNA調製およびRT-PCR

全RNAを、製造業者のプロトコルに従い、キアゲン (Qiagen) RNeasyキット (Qiagen) またはトリゾール (Trizol) 試薬 (Life Technologies, Inc.) で抽出した。全RNAの一部10マイクログラムを、スーパースクリプト (Superscript) II逆転写酵素 (Life Technologies) により、ポリdT₁₂₋₁₈プライマー (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して、一本鎖cDNAへと逆転写した。一本鎖cDNA調製物を、標準的なRT-PCR実験による次のPCR増幅のために希釈した。RT-PCRは、各々、12μl容量のPCR緩衝液 (TAKARA) で実施した。増幅は、ジーンアンプ (GeneAmp) PCRシステム9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA) において、変性のための94℃4分の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃60秒を、21サイクル (GAPDH)、36サイクル (ARHCL1)、32サイクル (NFXL1)、32サイクル (C20orf20)、40サイクル (LEMD1)、30サイクル (CCPUC1、Ly6E、およびNkd1)、および28サイクル (LAPT M4β) 行った。プライマー配列は、以下の通りであった：

30

40

GAPDH用：フォワード5'-ACAACAGCCTCAAGATCATCAG-3' (配列番号：13) および

リバース5'-GGTCCACCACTGACACGTTG-3' (配列番号：14)；

ARHCL1用：フォワード5'-TTTCTTCCTAACTGTGATCCAGAT-3' (配列番号：15) および

リバース5'-ACAACACTTGGTAGCAGCCTT-3' (配列番号：16)；

NFXL1用：フォワード5'-CTCTAACAGACCTCTTAAATTGTG-3' (配列番号：17) および

リバース5'-CATAGACCCATAAGCCCTGTTG-3' (配列番号：18)；

C20orf20用：フォワード5'-GTGTGCCTCTTCCACGCCAT-3' (配列番号：19) および

リバース5'-CCTGGTCTTTCAGGTCCATCA-3' (配列番号：20)；

LEMD1用：フォワード5'-TGTGGTGTGTTGTCTACCTGACTG-3' (配列番号：21) および

リバース5'-ACCATCATGCTCTTAACACAGGT-3' (配列番号：22)；

50

CCPUCC1用：フォワード5'-GAGTGGGAAGTAACGATGACTC-3'（配列番号：23）および
 リバーズ5'-GTCATTGTCACTCTCATCCAG-3'（配列番号：24）；
 Ly6E用：フォワード5'-GAAGATCTTCTTGCCAGTG-3'（配列番号：25）および
 リバーズ5'-GCAGCAGGCTCAGCTGC-3'（配列番号：26）；
 Nkd1用：フォワード5'-CTTGTTGATGTGGGTCACACG-3'（配列番号：27）および
 リバーズ5'-TGTGGAGCTTAGGGAGGCAG-3'（配列番号：28）；
 LAPTM4β用：フォワード5'-CTATGGCTACTTACGGAGCG-3'（配列番号：29）および
 リバーズ5'-TCCTTGGCAGCACCATTAC-3'（配列番号：30）。

【0218】

ノーザンブロット分析

ヒト多組織ブロット（multiple-tissue blots）（Clontech, Palo Alto, CA）に、ARHCL1、NFXL1、C20orf20、LEMD1、Nkd1、またはLAPTM4βの³²P標識PCR産物をハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は、供給元の推奨に従い実施した。ブロットは、24～72時間、-80℃で増感スクリーンを用いてオートラジオグラフィーを行った。

【0219】

ARHCL1、NFXL1、C20orf20、LEMD1、CCPUCC1、Ly6E、Nkd1、またはLAPTM4βを発現するプラスミドの構築

ARHCL1、NFXL1、C20orf20、LEMD1、CCPUCC1、Ly6E、Nkd1、またはLAPTM4βの全コーディング領域を、以下の遺伝子特異的プライマーセットを使用し、RT-PCRにより増幅した：

ARHCL1用に、5'-GGCGAATTCGTAATATGCTCACTCGAGTG-3'（配列番号：31）、5'-CCAGGATCCTGACAGCTTGTTC-3'（配列番号：32）および5'-TCTCCGGCCGCTTTCATGACAGCTTG-3'（配列番号：33）；

NFXL1用に、5'-TGCGAATTCGGGATGGAAGCTTCT-3'（配列番号：34）、5'-GATAATTCCTTTTTTAA TTGACATC-3'（配列番号：35）および5'-CTTGATACCATTGACATCATGGGTGAT-3'（配列番号：36）；

C20orf20用に、5'-TGTGAATTCGCCATGGGAGAGGC-3'（配列番号：37）、5'-TAACTCGAGCGTGCG GCGCCGCTT-3'（配列番号：38）および5'-TAAGGATCCCGTGC GGCGCGCTT-3'（配列番号：39）；

LEMD1用に、5'-TCTGAATTCAGAAAAGAGGCCAACTTCTATC-3'（配列番号：40）および5'-TCCGAT ATCAGGTAGACAAACACCACAATGATG-3'（配列番号：41）；

CCPUCC1用に、5'-GAGGAATTCGACCTGGGCTCCTGGGGAC-3'（配列番号：42）および5'-AAGCTCGA GAAGTCATTGTCACTCTCATCCAG-3'（配列番号：43）；

Ly6E用に、5'-ACGGAATTCCTCTCCAGAATGAAGATCTTC-3'（配列番号：44）および5'-TCTCTCGAG TCAGGGGCCAAACCGCAGC-3'（配列番号：45）；

Nkd1用に、5'-CGGCTCGAGCGCATGGCTTAGGGACGCTC-3'（配列番号：46）および5'-TGGGGATCCG CTCTATGTCTGGTAGAAGTG-3'（配列番号：47）；

LAPTM4β用に、5'-CTGAATTCGGAGCGATGAAGATGGTCGC-3'（配列番号：48）および5'-AAGCTC GAGGCAGACACGTAAGGTGGCG-3'（配列番号：49）。

【0220】

PCR産物を、pcDNA3.1（Invitrogen）、pFLAG-CMV-5（Sigma）、またはpcDNA3.1myc/His（Invitrogen）ベクターのいずれかの適切なクローニング部位にクローニングした。

【0221】

イムノブロットティング

pcDNA3.1myc/His-ARHCL1、pFLAG-ARHCL1、pcDNA3.1myc/His-C20orf20、pFLAG-C20orf20、pcDNA3.1myc/His-CCPUCC1、pcDNA3.1myc/His-Ly6E、pcDNA3.1myc/His-LAPTM4β、またはpFLAG-LAPTM4βをトランスフェクトした細胞を、PBSで2回洗浄し、溶解緩衝液（150mM NaCl、1%トリトンX-100、50mMトリスHCl pH7.4、1mM DTT、および1×完全プロテアーゼ阻害剤カクテル（Boehringer））に収集した。細胞をホモジナイズし、30分間10,000×gで遠心分離した後、上清をブラッドフォード（Bradford）アッセイ（Bio-Rad）によりタ

10

20

30

40

50

ンパク質濃度に関して規準化した。タンパク質を10% SDS-PAGEにより分離し、マウス抗myc抗体 (SANTA CRUZ) または抗Flag抗体 (SIGMA) を用いてイムノブロットした。HRP結合ヤギ抗マウスIgG (Amersham) を、ECL検出システム (Detection System) (Amersham) のための二次抗体とした。

【0222】

免疫組織化学染色

pcDNA3.1myc/His-ARHCL1、pFLAG-ARHCL1、pcDNA3.1myc/His-C20orf20、pFLAG-C20orf20、pcDNA3.1myc/His-CCPUC1、pcDNA3.1myc/His-Ly6E、pcDNA3.1myc/His-LAPTM4 β 、またはpFLAG-LAPTM4 β をトランスフェクトした細胞、ならびにpFlag-ARHCL1およびpCMV-HA-ザイキシン、またはpCMV-HA-NFXL1をトランスフェクトしたHCT16細胞、SW480細胞、およびCOS7細胞、ならびにpcDNA-myc-CCPUC1およびpFlag-クラスタリンをトランスフェクトしたCOS7細胞を、4%パラホルムアルデヒドを含有しているPBSで15分間固定し、次いで、0.1%トリトンX-100を含むPBS中に室温で2.5分間おいて透過処理を行った。その後、非特異的ハイブリダイゼーションをブロッキングするため、4℃で12~24時間、2または3%BSAを含むPBSで細胞を覆った。1:1000希釈のラット抗HAモノクローナル抗体 (Roche)、1:1000希釈のウサギ抗FLAG抗体 (Sigma)、1:1000希釈のマウス抗mycモノクローナル抗体 (Sigma)、または1:2000希釈のマウス抗FLAG抗体 (Sigma) を一次抗体に使用し、FITC結合抗マウスおよびフルオレセイン結合抗マウスIgG二次抗体 (LeincoおよびICN) でインキュベーションし、反応を可視化した。核は、4',6'-ジアミジン-2'-フェニルインドールジヒドロクロリド (DAPI) で対比染色した。蛍光画像はエクリプス (ECLIPSE) E800顕微鏡下で得た。

【0223】

細胞増殖に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用

10cmディッシュに細胞を播種し (1枚当たり 2×10^5 個)、リポフェクチン (LIPOFECTIN) 試薬 (GIBCO BRL) を使用して、ARHCL1、NFXL1、C20orf20、LEMD1、CCPUC1、Ly6E、Nkd1、またはLAPTM4 β の合成S-オリゴヌクレオチドをトランスフェクトし、3~7日間培養した。次いで、細胞を100%メタノールで固定し、ギムザ (Giemsa) 溶液により染色した。S-オリゴヌクレオチドの配列は、以下の通りであった：

ARHCL1-AS1、5'-GTGAGCATATTACTCC-3' (配列番号:50) ;
 ARHCL1-R1、5'-CCTCATTATACGAGTG-3' (配列番号:51) ;
 NFXL1-AS、5'-GGCCAGGGACAATCTTTC-3' (配列番号:52) ;
 NFXL1-R、5'-CTTTCTAACAGGGACCGG-3' (配列番号:53) ;
 C20orf20-AS1、5'-GCCCACCTCGGCCTCTCC-3' (配列番号:54) ;
 C20orf20-R1、5'-CCTCTCCGGCTCCACCCG-3' (配列番号:55) ;
 C20orf20-AS2、5'-CACCTCGGCCTCTCCCAT-3' (配列番号:56) ;
 C20orf20-R2、5'-TACCTCTCCGGCTCCAC-3' (配列番号:57) ;
 LEMD1-AS1、5'-ATCCACCATGATGATAGA-3' (配列番号:58) ;
 LEMD1-REV1、5'-AGATAGTAGTACCACCTA-3' (配列番号:59) ;
 LEMD1-AS2、5'-ACACTTCACATCCACCAT-3' (配列番号:60) ;
 LEMD1-REV2、5'-TACCACCTACACTTCACA-3' (配列番号:61) ;
 LEMD1-AS3、5'-CAGACACTTCACATCCAC-3' (配列番号:62) ;
 LEMD1-REV3、5'-CACCTACACTTCACAGAC-3' (配列番号:63) ;
 LEMD1-AS4、5'-CATGATGATAGAAGTTTG-3' (配列番号:64) ;および
 LEMD1-REV4、5'-GTTTGAAGATAGTAGTAC-3' (配列番号:65) ;
 LEMD1-AS5、5'-ACATCCACCATGATGATA-3' (配列番号:66) ;および
 LEMD1-REV5、5'-ATAGTAGTACCACCTACA-3' (配列番号:67) ;
 CCPUC1-AS3、5'-CGGAGGTCGCGGAAAG-3' (配列番号:68) ;
 CCPUC1-S3、5'-CTTTCCGCGACCTCCG-3' (配列番号:69) ;
 Ly6E-AS1、5'-ATCTTCATTCTGGAGA-3' (配列番号:70) ;
 Ly6E-S1、5'-TCTCCAGAATGAAGAT-3' (配列番号:71) ;

Ly6E-AS5、5'-GAAGATCTTCATTCTG-3' (配列番号:72) ;
 Ly6E-S5、5'-CAGAATGAAGATCTTC-3' (配列番号:73) ;
 Nkd1-AS4、5'-GCGGCCGCTTGGAGT-3' (配列番号:74) ;
 Nkd1-S4、5'-ACTCCAAGCCGCGCCG-3' (配列番号:75) ;
 Nkd1-AS5、5'-GTAGAAGTGGTGGTAA-3' (配列番号:76) ;
 Nkd1-S5、5'-TTACCACCACTTCTAC-3' (配列番号:77) ;
 LAPTM4 β -S、5'-GTGAGCGCGCGCGCC-3' (配列番号:78) ;
 LAPTM4 β -AS、5'-GGCGCGCCGCGCTCAC-3' (配列番号:79) ;
 LAPTM4 β -SCR、5'-GCGCGCCGCGCTCAC-3' (配列番号:80) ;
 LAPTM4 β -REV、5'-CACTCGCGCCGCGCGG-3' (配列番号:81) 。

10

【0224】

3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) アッセイ

細胞は、アンチセンスS-オリゴヌクレオチドまたは対照 (センス、リバーズ、およびスクランブル) S-オリゴヌクレオチドを3連でトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後、培地を500 μg/mlのMTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) (Sigma) を含む新鮮な培地に交換し、プレートを37 °Cで4時間インキュベートした。その後、1mlの0.01N HCl/10% SDSの添加により細胞を溶解させ、溶解物の吸光度を570nmの試験波長 (参照、630nm) でELISAプレートリーダーを用いて測定した。対照細胞の吸光度と比較した吸光度により、細胞生存率を表した。

20

【0225】

組換えのARHCL1タンパク質およびNFXL1タンパク質の調製

ARHCL1またはNFXL1に対する特異的抗体を生成させるため、本発明者らは、組換えのARHCL1タンパク質およびNFXL1タンパク質を調製した。それらの部分コーディング配列を、以下のプライマーセットを用い、RT-PCRにより増幅した: ARHCL1のN末端領域 (ARHCL1-N) 用に5'-GGCGAATTCGTAATATGCTCACTCGAGTGAAAT-3' (配列番号: 82) および5'-GTTGAATTCGGTGTCTCAGGCT-3' (配列番号: 83)、ARHCL1のC末端領域 (ARHCL1-C) 用に5'-GCGGAATTCCTGCTGCAGCACCACAT-3' (配列番号: 84) および5'-ACAGCGCCGCTTTCATGACAGCTTG-3' (配列番号: 85)、NFXL1のN末端領域 (NFXL1-N) 用に5'-ACAGAATTCGGGATGGAAGCTTC-3' (配列番号: 86) および5'-ATACTCGAGAGGAGGTTTAAATTCACGCTC-3' (配列番号: 87)、NFXL1のC末端領域 (NFXL1-C2) 用に5'-CACGAATTCAGGTAAGTAACTTAGATGTCCT-3' (配列番号: 88) および5'-GAGCTCGAGTTTATGTTTTTGCCATAGTGATAG-3' (配列番号: 89)。産物を精製し、EcoRI (ARHCL1-N)、EcoRIおよびNotI (ARHCL1-C)、またはEcoRIおよびXhoI (NFXL1-NおよびNFXL1-C2) で消化し、pGEX6P-1ベクター (pGEX-ARHCL1-NまたはpGEX-ARHCL1-C) またはpET28aベクター (pET-NFXL1-NまたはpET-NFXL1-C2) の適切なクローニング部位にクローニングした。プラスミドpGEX-ARHCL1-N、pGEX-ARHCL1-C、pET-NFXL1-N、またはpET-NFXL1-C2で、大腸菌DH10B細胞 (Life Technologies, Inc.) またはBL21コドンプラス細胞 (codon plus cell) (Novagen) を形質転換した。組換えタンパク質はIPTGの添加により誘導し、製造業者のプロトコルに従って抽出物から精製した。

30

【0226】

酵母2-ハイブリッド実験

酵母2-ハイブリッドアッセイは、製造業者のプロトコル (BD Bioscience) に従い、MATCHMAKER GAL4 2-ハイブリッドシステム (Two-Hybrid System) を用いて実施した。ARHCL1またはNFXL1の部分コーディング配列をpAS2-1ベクターのEcoRI-XhoI部位にクローニングした (pAS2-ARHCL1-N、pAS2-ARHCL1-C、pAS2-NFXL1-N、およびpAS2-NFXL1-C2)。pcDNA3.1-C20orf20を鋳型として用い、プライマーセット5'-TGTGAATTCGCCATGGGAGAGGC-3' (配列番号: 90) および5'-TAAGGATCCCGTGC GCGCGCGCTT-3' (配列番号: 91) を使用してPCRを行い、C20orf20の完全コーディング領域を増幅し、その産物もpAS2-1ベクターのEcoRI-BamHI部位にクローニングした (pAS2-C20orf20)。さらに、CCPUC1の完全コーディング配列をpAS2-1ベクターのEcoRI部位にクローニングした (pAS2-CCPUC1)。ベイトとしてpAS2-

40

50

ARHCL1-N、pAS2-ARHCL1-C、pAS2-NFXL1-N、またはpAS2-NFXL1-C2を用い、ヒト精巣MATCHMAKER cDNAライブラリーから 5×10^5 個のクローンをスクリーニングし、pAS2-C2orf20を用いて、ライブラリーから 1.9×10^6 個のクローンをスクリーニングし、pAS2-CCPUC1を用いて、ライブラリーから 1.1×10^6 個のクローンをスクリーニングした (BD Bioscience)。

【0227】

免疫沈降アッセイ

ザイキシンの完全コーディング領域を、プライマーセット5'-CATGAATTCCGGCCATGGCG-3' (配列番号: 92) および5'-CATCTCGAGTCAGGTCTGGGCTC-3' (配列番号: 93) を用いてRT-PCRにより増幅した。そのPCR産物を精製し、EcoRIおよびXhoIで消化し、pCMV-HAベクターにクローニングした。MGC10334またはCEMP1の完全コーディング領域およびBRD8のC末端領域を、cDNAライブラリー中の陽性クローンから単離し、pCMV-HAベクターにサブクローニングした (pCMV-HA-MGC10334、pCMV-HA-CEMP1、およびpCMV-HA-BRD8)。核クラスタリンのC末端領域を、陽性クローンから単離し、pFlagベクターへとサブクローニングした。pFlag-CMV、pFlag-ARHCL1、pCMV-HA、pCMV-HA-ザイキン、またはそれらの組み合わせによりHeLa細胞をトランスフェクトし、pFlag-CMV、pFlag-NFXL1、pCMV-HA、pCMV-HA-MGC10334、pCMV-HA-CEMP1、またはそれらの組み合わせによりCOS7細胞をトランスフェクトし、pFlag-CMV、pFlag-C2orf20、pCMV-HA、pCMV-HA-BRD8、またはそれらの組み合わせによりCOS7細胞をトランスフェクトし、pcDNA-myc、myc標識 (tagged) CCPUC1を発現するpcDNA-CCPUC1-myc、pFlag-CMV、pFlag-クラスタリン、またはそれらの組み合わせによりCOS7細胞をトランスフェクトした。細胞をPBSで洗浄し、150mM NaCl、0.5% NP-40、10mM トリスHCl pH7.8、およびEDTA不含1×完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free) (Roche) を含むTNE緩衝液で溶解させた。典型的な免疫沈降反応においては、全細胞抽出物300μgを、1μgの抗FLAG M2抗体 (SIGMA) または抗HA抗体、および20μlのプロテインGセファロースビーズ (Zymed) と共に4℃で2時間インキュベートした。ビーズを1mlのTNE緩衝液で4回洗浄し、ビーズに結合したタンパク質を、レムリ試料緩衝液 (Laemmli Sample Buffer) 中で煮沸することにより溶出させた。沈降したタンパク質を、SDS-PAGEにより分離し、抗myc抗体、抗HA抗体、またはウサギ抗FLAG抗体を使用してイムノブロット分析を実施した。

【0228】

NFXL1-siRNA、C2orf20-siRNA、およびCCPUC1-siRNAを発現するプラスミドの構築およびそれらの作用

短鎖干渉RNA (siRNA) を発現するプラスミドベクターを調製するため、プライマーセット、H1RNA用に5'-TGGTAGCCAAGTGCAGTTTATA-3' (配列番号: 94) および5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA-3' (配列番号: 95)、ならびにU6snRNA用に5'-GGGGATCAGCGTTTGAGTAA-3' (配列番号: 96) および5'-TAGGCCCCACCTCCTTCTAT-3' (配列番号: 97)、ならびに鋳型としてのヒト胎盤DNAを使用してPCRを行い、そのプロモーター領域を含むH1RNA遺伝子またはU6snRNA遺伝子のゲノム断片を増幅した。その産物を精製し、供給元のプロトコル (Invitrogen) に従い、TAクローニングキットを使用して、pCR2.0プラスミドベクターにクローニングした。H1RNAまたはU6snRNAを含むBamHI/XhoI断片を、pcDNA3.1 (+) のヌクレオチド1257~56の間にクローニングし、それを、5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (配列番号: 98) および5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (配列番号: 99) を使用してPCRにより増幅した。連結させたDNAを、プライマー、H1RNA用の5'-TTTAAGCTTGAAGACATTTTGGAAAAA-3' (配列番号: 100) および5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (配列番号: 101) またはU6snRNA用の5'-TTTAAGCTTGAAGACTATTTTACATCAGTTGTTTTCT-3' (配列番号: 102) および5'-TTTAAGCTTGAAGACACGGTGTTCGTCCTTTCCACA-3' (配列番号: 103) を用いるPCR増幅において鋳型とした。その産物をHindIIIで消化し、その後、psiH1BX3.0プラスミドベクターまたはpsiU6BX3.0プラスミドベクターを作製するため、自己連結させた。対照プラスミド、psiH1BX-EGFPおよびpsiU6BX-EGFPは、5'-CACCGAAGCAGCAGACTTCTTCTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (配列番号: 104) および5'-AAAAGAAGCAGCAGACTTCTTCTCTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (配列番号: 105) の二本鎖オリゴヌクレオ

チドを、それぞれpsiH1BX3.0ベクターまたはpsiU6BXベクターのBbsI部位にクローニングすることにより調製した。NFXL1-siRNAを発現するプラスミドは、二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiU6BX3.0ベクターへクローニングすることにより調製した。NFXL1-siRNAのために使用したオリゴヌクレオチドは、

psiU6BX-NFXL1D用の5'-CACCAGAAAGATTGTCCCTGGCCTTCAAGAGAGGCCAGGGACAATCTTTCT-3' (配列番号: 106) および5'-AAAAAGAAAGATTGTCCCTGGCCTCTCTTGAAGGCCAGGGACAATCTTTCT-3' (配列番号: 107) (siRNAの標的配列は配列番号: 122である) ;

psiU6BX-NFXL1E用の5'-CACCGGAGATGAAGATTTTGAAGTTCAAGAGACTTCAAAATCTTCATCTCC-3' (配列番号: 108) および5'-AAAAGGAGATGAAGATTTTGAAGTCTCTTGAAGTTCAAAATCTTCATCTCC-3' (配列番号: 109) (siRNAの標的配列は配列番号: 123である) ;

psiU6BX-NFXL1F用の5'-CACCGAAGAACAGGAAAAGAGATTTCAAGAGAATCTCTTTCTGTTCTTC-3' (配列番号: 110) および5'-AAAAGAAGAACAGGAAAAGAGATTCTCTTGAATCTCTTTCTGTTCTTC-3' (配列番号: 111) (siRNAの標的配列は配列番号: 124である) 、ならびに

psiU6BX-NFXL1G用の5'-CACCCCAGAAGGTAAACTTAGATTCAAGAGATCTAAGTTTTACCTTCTGG-3' (配列番号: 112) および5'-AAAACCAGAAGGTAAACTTAGATCTCTTGAATCTAAGTTTTACCTTCTGG-3' (配列番号: 113) (siRNAの標的配列は配列番号: 125である) 、ならびに

psiU6BX-NFXL1H用の5'-CACCGTATGTGAGCGTGAATTTATTCAAGAGATAAATTCACGCTCACATAC-3' (配列番号: 114) および5'-AAAAGTATGTGAGCGTGAATTTATCTCTTGAATAAATTCACGCTCACATAC-3' (配列番号: 115) (siRNAの標的配列は配列番号: 126である) であった。

【0229】

C20orf20-siRNAを発現するプラスミドは、二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiH1BX3.0ベクターへクローニングすることにより調製した。C20orf20-siRNAのために使用したオリゴヌクレオチドは、5'-TCCCCGACACTTCCACATGATTTTCAAGAGAAATCATGTGGAAGTGTCGG-3' (配列番号: 116) および (配列番号: 117) 5'-AAAACCGACACTTCCACATGATTTCTCTTGAAAATCATGTGGAAGTGTCGG-3' (siRNAの標的配列は配列番号: 127である) であった。

【0230】

CCPUCC1-siRNAを発現するプラスミドは、二本鎖オリゴヌクレオチドをpsiU6BX3.0ベクターへクローニングすることにより調製した。CCPUCC1-siRNAのために使用したオリゴヌクレオチドは、

siRNA-2用の5'-TCCCGCGACTAGAGACTCTGCAGTTCAAGAGACTGCAGAGTCTCTAGTCGC-3' (配列番号: 118) および5'-TTTTGCGACTAGAGACTCTGCAGTCTCTTGAAGTGCAGAGTCTCTAGTCGC-3' (配列番号: 119) (siRNAの標的配列は配列番号: 128である) ;

siRNA-3用の5'-TCCCGACCATCATAGGATGGAGCTTCAAGAGAGCTCCATCCTATGATGGTC-3' (配列番号: 120) および5'-TTTTGACCATCATAGGATGGAGCTCTTGAAGCTCCATCCTATGATGGTC-3' (配列番号: 121) (siRNAの標的配列は配列番号: 129である) であった。

【0231】

供給元の推奨に従い、FuGENE6試薬 (Roche) またはヌクレオフェクター (Nucleofector) 試薬 (Alexa) を使用して、プラスミドpsiU6BX-NFXL1、psiU6BX-EGFP、psiH1BX-C20orf20、psiH1BX-EGFP、またはpsiH1BX-擬似をSNU-C4細胞にトランスフェクトし、psiU6BX-CCPUCC1-2、psiU6BX-CCPUCC1-3、またはpsiU6BX-擬似プラスミドをHCT116細胞およびSNUC4細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、全RNAを細胞から抽出した。細胞を、400~800 µg/mlのジェネテシン (G418) 存在下で14日間培養し、他に記載されるようにしてギムザ溶液 (MERCK, Germany) で染色した。

【0232】

CCPUCC1に対するポリクローナル抗体の調製

組換えHis標識CCPUCC1タンパク質を大腸菌において作製し、製造業者の推奨 (Invitrogen) に従い、Pro Bond (商標) ヒスチジン樹脂を使用して、細胞から精製した。その組換えタンパク質を、ウサギの免疫感作のために接種した。CCPUCC1に対するポリクローナル抗体を血清から精製した。pcDNA-myc-CCPUCC1をトランスフェクトした細胞の抽出物および結腸癌細胞株からの抽出物を、10% SDS-PAGEにより分離し、抗体を用いてイムノブロッ

10

20

30

40

50

トした。HRP結合ヤギ抗ウサギIgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を、ECL検出システム (Detection System) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) のための二次抗体とした。抗CCPUC1抗体によるイムノブロッティングでは、myc標識CCPUC1の55kDのバンドが示され、これは抗myc抗体を使用して検出されたものと同一のパターンであった。

【0233】

免疫組織化学

免疫組織化学染色は、抗CCPUC1抗体を使用して実施した。パラフィンで包埋した組織切片を、製造業者の推奨する方法に従い、SAB-POペルオキシダーゼ免疫染色システム (Nichirei, Tokyo, Japan) に供した。700Wで10分間電子レンジにてクエン酸塩緩衝液 (pH6) 中でスライドを前処理することにより脱パラフィンし再水和させた組織から抗原を回収した。

【0234】

統計分析

データは、分散分析 (ANOVA) およびシェッフェ (Scheffe) のF検定に供した。

【0235】

実施例2：結腸癌および胃癌に関連する遺伝子の同定

23040個の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを使用して、11個の結腸癌組織、およびそれらの対応する非癌性結腸粘膜組織の発現プロファイルを分析した。この分析により、対応する非癌性組織と比較して癌組織で発現レベルが高頻度に上昇している多数の遺伝子を同定した。それらのうち、EST (KIAA1157)、UniGeneクラスタ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) におけるHs.21894に相当する施設内アクセス番号B6647を有する遺伝子は、選択基準 (cut-off filter) を満たした7例全てにおいて、上昇率2.60~8.03の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上方制御されていた (図1a)。EST (IMAGE4286524)、UniGeneクラスタにおけるHs.351839に相当する施設内アクセス番号D7610を有する第二の新規遺伝子の発現レベルは、選択基準を満たした4例において、上昇率1.25~2.44の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上昇していた (図1b)。推定ORF、UniGeneクラスタにおけるHs.143954に相当する施設内アクセス番号C4821を有する第三の新規遺伝子は、選択基準を満たした10例のうち9例において、上昇率1.31~3.83の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上方制御されていた (図1c)。EST、XM_050184に相当する施設内アクセス番号A8108を有する第四の新規遺伝子は、選択基準を満たした3例のうち2例において、上昇率1.19~5.90の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上方制御されていた (図1d)。さらに、EST、UniGeneクラスタにおけるHs.155995に相当する施設内アクセス番号B9223を有する第五の新規遺伝子は、選択基準を満たした7例全てにおいて、上昇率1.49~3.5の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上方制御されていた (図1e)。Ly6Eに相当する施設内アクセス番号C3703を与えられた遺伝子の発現レベルは、選択基準を満たした1例において、上昇率2.6で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上昇しており (図1f)、Nkd1に相当する施設内アクセス番号D9092を与えられたもう1つの遺伝子は、選択基準を満たした4例のうち2例において、上昇率1.24~2.63の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上昇していた (図1g)。マイクロアレイの結果を明確にするため、半定量的RT-PCRを実施したところ、B6647の発現が、さらなる20個の結腸癌のうちの19個において、対応する正常粘膜と比較して上昇しており (図2a)、D7610の発現が、20個の腫瘍のうちの12個で上昇しており (図2b)、C4821の発現が、20個の腫瘍のうちの15個で上昇しており (図2c)、A8108の発現が、調査された8個の腫瘍全てで上昇しており (図2d)、B9223の発現が、調査された28個の腫瘍のうちの15個で上昇しており (図2e)、Ly6Eの発現が、調査された13個の腫瘍のうちの11個で上昇しており (図2f)、Nkd1の発現が、調査された腫瘍全てで上昇していることが明らかとなった (図2g)。

【0236】

実施例3：ARHCL1の発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

10

20

30

40

50

ARHCL1の同定、発現、および構造

国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) のBLASTプログラムを使用した公共データベースにおけるB6647の配列との相同性検索によって、XM_051093を含むEST、および染色体バンド12q13.13に割り当てられたGenBankアクセッション番号NT-009711を有するゲノム配列が同定された。遺伝子のコーディング配列を決定するため、GENSCANプログラム (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) およびジーン・リコグニション・アンド・アセンブリ・インターネット・リンク (Gene Recognition and Assembly Internet Link) プログラム (GLAIL, <http://compbio.ornl.gov/Grail-1.3/>) を使用して、ゲノム配列で候補エキソン配列を予測し、エキソン-コネクション (exon-connection) 実験を実施した。結果として、推定514アミノ酸のタンパク質をコードする1535ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む6462ヌクレオチドのアセンブリ配列 (GenBankアクセッション番号AB084258) を得、この遺伝子をARHCL1 (Ras homolog gene family, member C like 1 (Ras相同体遺伝子ファミリー、メンバーC様1)) と名付けた。最初のATGには、真核生物における翻訳の開始のためのコンセンサス配列と一致する配列 (ATTATGC)、および上流のインフレーム終止コドンが隣接していた。ARHCL1 cDNAとゲノム配列との比較によって、この遺伝子が11個のエキソンからなることが明らかとなった。さらに、ARHCL1のPCR産物をプローブとして用いた多組織ノーザンブロット分析を実施したところ、前立腺、脳、および脾臓に6.5kb転写物の発現が検出された (図3a)。予測されたARHCL1タンパク質のアミノ酸配列は、ヒト仮説タンパク質DKFZp434P1514.1と68.7%の同一性およびマウスRIKEN cDNA 2310008J22と61.45%の同一性を示した。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツール (SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de>) を用いたタンパク質モチーフ検索によって、予測されたタンパク質がセリン/トレオニンホスファターゼ、ファミリー2C、触媒性ドメイン (コドン68~506) を含むことが明らかとなった (図3b)。

10

20

【0237】

myc標識またはFlag標識ARHCL1タンパク質の細胞内局在

ARHCL1タンパク質の細胞内局在を検討するため、myc標識ARHCL1タンパク質 (pDNAmyc/His-ARHCL1) またはFlag標識ARHCL1タンパク質 (pFLAG-ARHCL1) を発現するプラスミドを、HCT15細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞からの抽出物および抗myc抗体または抗Flag抗体を使用したウェスタンブロット分析によって、標識されたタンパク質に対応するそれぞれ56kDaおよび60kDaのバンドが明らかとなった (図4a)。その後、これらの抗体による細胞の免疫組織化学染色によって、タンパク質が主として細胞質に存在することが示された (図4b)。

30

【0238】

ARHCL1の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

ARHCL1の抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、ARHCL1に対応する5対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された11個の結腸癌細胞株のうち豊富な量のARHCL1を発現していたSNU-C4結腸癌細胞にトランスフェクトした。5個のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドのうち、ARHCL1-AS1は、トランスフェクションの12時間後、対照S-オリゴヌクレオチド (ARHCL1-R1) と比較して、ARHCL1の発現を有意に抑制した (図5a)。トランスフェクションの5日後、ARHCL1-AS1をトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、ARHCL1-R1をトランスフェクトしたものより有意に少なく、このことから、ARHCL1の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された (図5b)。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。ARHCL1-AS1による類似の増殖抑制が、LoVoヒト結腸癌細胞において観察された (図5b)。

40

【0239】

組換えARHCL1タンパク質の調製

ARHCL1に対する特異的抗体を生成させるため、GSTが融合したN末端ARHCL1タンパク質 (

50

ARHCL1-N) およびC末端ARHCL1タンパク質 (ARHCL1-C) を発現するプラスミドを構築した (図6A)。プラスミドで大腸菌細胞を形質転換したところ、SDS-PAGE上の予想されたサイズに組換えタンパク質の産生が観察され、イムノブロッティングにより確認された (図6B)。

【0240】

酵母2-ハイブリッドシステムによる、ARHCL1と相互作用するタンパク質の同定

ARHCL1の機能を分析するため、酵母2-ハイブリッドスクリーニングシステムを使用して、ARHCL1と相互作用するタンパク質を探索した。ARHCL1のN末端領域 (ARHCL1-N) との相互作用を示した陽性クローン75個のうち、15個、8個、7個、7個、および3個のクローンが、それぞれザイキシン、DTNB、MAGE-A12、PA28 α 、およびプロテアソーム28サブユニット3であった。さらに、ARHCL1のC末端領域 (ARHCL1-C) との相互作用を示した陽性クローン52個のうち、2個のクローンがFLJ25348であった。pAS2-ARHCL1-NまたはpAS2-ARHCL1-C、および6個のクローンでの同時形質転換により、酵母における相互作用を確認した (図7)。

【0241】

ザイキシンとARHCL1のN末端領域とのインビボでの相互作用

ARHCL1とザイキシンの会合をインビボで立証するため、HeLa細胞における免疫沈降アッセイを実施した (図8A)。pFlag-ARHCL1、pCMV-HA-ザイキシン、またはそれらの組み合わせでHeLa細胞をトランスフェクトし、細胞からタンパク質を抽出した。抗Flag抗体による免疫沈降の後、抗HA抗体によるウェスタンブロット分析を行い、インビボでのザイキシンとARHCL1との相互作用を立証した。

【0242】

細胞内でのFlag標識ARHCL1およびHA標識ザイキシンの共局在

細胞内でARHCL1およびザイキシンが共局在しているか否かを試験するため、pFlag-ARHCL1およびpCMV-HA-ザイキシンをSW480細胞へ共トランスフェクトし、免疫組織化学染色により細胞内局在を調査した (図8B)。抗Flag抗体による染色により、Flag標識ARHCL1が核および細胞質の両方に局在していることが明らかになった。さらに、抗FLAGおよび抗HA抗体による染色により、HA標識ザイキシンが核および細胞質にARHCL1と共局在していることが証明された (図8B)。このデータは、核および細胞質におけるARHCL1とザイキシンの相互作用の見解を支持するものである。

【0243】

実施例4：NFXL1の発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

NFXL1の単離、構造、および発現

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを使用した公共データベースにおけるD7610の配列との相同性検索によって、BC018019を含むEST、および染色体バンド4p12に割り当てられたGenBankアクセッション番号AC107068を有するゲノム配列が同定された。D7610 cDNAの5'部分の配列を決定するため、それらの配列を用いて、ジーン・リコグニション・アンド・アセンブリ・インターネット・リンク・プログラムで候補エキソン配列を予測した。結果として、推定911アミノ酸のタンパク質をコードする2,736ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む3,707ヌクレオチドのアセンブリ配列 (GenBankアクセッション番号AB085695) を得、NFXL1 (nuclear transcription factor, X-box binding-like 1 (核転写因子、Xボックス結合様1)) と名付けた。最初のATGには、真核生物における翻訳の開始のためのコンセンサス配列に一致する配列 (GGGATGG) が隣接していた。NFXL1 cDNAとゲノム配列との比較により、この遺伝子が23個のエキソンからなることが明らかとなった。さらに、NFXL1のPCR産物をプローブとして用いて多組織ノーザンブロット分析を実施したところ、精巣および甲状腺に3.8kb転写物の発現が検出された (図9a)。予測されたNFXL1タンパク質のアミノ酸配列は、ヒトNFX1 (nuclear transcription factor, X-box binding 1 (核転写因子、Xボックス結合1)) と35.3%の同一性を示した。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールを用いたタンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質が、リングフィンガードメイン (コドン160~219

）、12個のNFX型Znフィンガードメイン（コドン265～794）、コイルドコイル領域（コドン822～873）、および膜貫通領域（コドン889～906）を含むことが明らかとなった（図9b）。

【0244】

NFXL1の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

NFXL1の抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、NFXL1に対応する4対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された11個の結腸癌細胞株のうち豊富な量のNFXL1を発現していたSW480結腸癌細胞およびSNU-C4結腸癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの5日後、NFXL1-ASをトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、NFXL1-Rをトランスフェクトしたものより有意に少なく、このことから、NFXL1の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された（図10）。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。

10

【0245】

結腸癌細胞の増殖に対する、NFXL1-siRNAを発現するプラスミドの作用

哺乳動物細胞において、19個の相補的ヌクレオチドおよび3'末端のチミジンまたはウリジンの相補的二量体を含む20塩基長または21塩基長の二本鎖RNA（dsRNA）から構成された短鎖干渉RNA（siRNA）は、遺伝子発現の全体的な変化を誘導することなく、遺伝子特異的な遺伝子サイレンシング作用を有することが最近示された。従って、本発明者らは、様々なNFXL1-siRNAを発現するプラスミドを構築し、NFXL1発現に対するそれらの作用を調査した。それらのうち、psiU6BX-NFXL1Hは、SNUC4細胞におけるNFXL1の発現を有意に抑制したが、psiU6BX-NFXL1D、psiU6BX-NFXL1E、psiU6BX-NFXL1F、またはpsiU6BX-NFXL1Gは抑制しなかった（図11A）。NFXL1の抑制が結腸癌細胞の増殖抑制をもたらすか否かを試験するため、psiU6BX-NFXL1HまたはpsiU6BX-EGFPを、HCT116細胞、SW480細胞、またはSNUC4細胞にトランスフェクトした。psiU6BX-NFXL1Hがトランスフェクトされた生存可能細胞は、psiU6BX-EGFPがトランスフェクトされたものと比較して著しく減少し、このことから、NFXL1の発現低下により、結腸癌細胞の増殖が抑制されることが示唆された（図11B）。

20

【0246】

哺乳動物細胞におけるNFXL1の細胞内局在

NFXL1タンパク質の細胞内局在を検討するため、HA標識NFXL1の蛍光免疫組織化学染色を、HCT116細胞、SW480細胞、またはCOS7細胞において実施した。細胞をpCMV-HA-NFXL1でトランスフェクトし、次いで固定し、抗HAで染色し、ローダミン結合二次抗体で可視化した。シグナルは細胞質に観察され、このことから、細胞質におけるNFXL1の細胞内局在が示唆された（図12）。

30

【0247】

組換えNFXL1タンパク質の調製

NFXL1に対する特異的抗体を生成させるため、His標識N末端NFXL1タンパク質（NFXL1-N）およびC末端NFXL1タンパク質（NFXL1-C2）を発現するプラスミドを構築した（図13A）。これらのプラスミドで大腸菌細胞を形質転換したところ、SDS-PAGE上の予想されたサイズに組換えタンパク質の産生が観察され、イムノブロットングにより確認された（図13Bおよび13C）。

40

【0248】

酵母2-ハイブリッドシステムによる、NFXL1と相互作用するタンパク質のスクリーニング

NFXL1の機能を分析するため、酵母2-ハイブリッドスクリーニングシステムを使用して、NFXL1と相互作用するタンパク質を探索した。NFXL1のN末端領域（NFXL1-N）との相互作用を示した145個の陽性クローンのうち、9個、7個、6個、3個、および3個のクローンが、それぞれ、DKFZp564J047、DKFZp434A1319、MGC10334、SOX30、CENPC1、およびFLJ25348であった。さらに、NFXL1のC末端領域（NFXL1-C2）との相互作用を示した32個のクローンのうち、8個および5個のクローンが、それぞれFLJ36990およびGBP2であった。pAS2-NFXL1-N

50

またはpAS2-NFXL1-C、およびこれらの同定された8個のクローンでの同時形質転換により、酵母における会合を立証した（図14Aおよび14B）。

【0249】

NFXL1と相互作用するタンパク質としてのMGC10334およびCENPC1の同定

NFXL1とMGC10334タンパク質またはCENPC1タンパク質との会合をインビボで立証するため、COS7細胞における免疫沈降アッセイを実施した（図15）。pFlag-NFXL1およびpCMV-HA-MGC10334、pCMV-HA-CENPC1、またはそれらの組み合わせで細胞をトランスフェクトし、細胞からタンパク質を抽出した。抗Flag抗体による免疫沈降の後、抗HA抗体を用いてウェスタンブロット分析を行い、インビボでのNFXL1とMGC10334またはCENPC1との相互作用を立証した。

10

【0250】

実施例5：C20orf20の発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

C20orf20の単離、構造、および発現

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを使用した公共データベースにおけるC4821の配列との相同性検索により、BM922576を含むEST、および染色体バンド20q13.3に割り当てられたGenBankアクセッション番号AL035669を有するゲノム配列が同定された。C4821 cDNAの5'部分の配列を決定するため、ゲノム配列において候補エキソン配列を予測し、それらの配列を用いて、GENSCANおよびジーン・リコグニション・アンド・アセンブリ・インターネット・リンク・プログラムを使用して、エキソン-コネクションを実施した。結果として、推定204アミノ酸のタンパク質をコードする615ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む1,634ヌクレオチドのアセンブリ配列（GenBankアクセッション番号AB085682）を得、C20orf20と名付けた。最初のATGには、真核生物における翻訳の開始のためのコンセンサス配列に一致する配列（GCCATGG）が隣接していた。C20orf20 cDNAとゲノム配列との比較により、この遺伝子が5個のエキソンからなることが明らかとなった。さらに、C20orf20のPCR産物をプローブとして用いて多組織ノーザンブロット分析を実施したところ、精巣および甲状腺に1.8kb転写物の発現が検出された（図16a）。予測されたC20orf20タンパク質のアミノ酸配列は、マウスRIKEN cDNA 1600027N09（XM_110403）と96.6%の同一性を示した。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールによるタンパク質モチーフ検索では、既知の保存されたドメインは予測されなかった（図16b）。

20

30

【0251】

myc標識またはFlag標識C20orf20タンパク質の細胞内局在

C20orf20タンパク質の細胞内局在を検討するため、myc標識C20orf20タンパク質（pDNAmyc/His-C20orf20）またはFlag標識C20orf20タンパク質（pFLAG-C20orf20）を発現するプラスミドを、COS7細胞に一過性にトランスフェクトした。抗myc抗体と細胞からの抽出物を使用したウェスタンブロット分析により、myc標識タンパク質に対応する主要な30kDaバンドおよび微量の25kDaバンドを明らかとし、抗Flag抗体による分析によって、Flag標識タンパク質に対応する主要な28kDaバンドおよび微量の23kDaバンドを明らかとした（図17a）。これらのデータにより、標識されたタンパク質の翻訳後修飾の可能性が示唆された。その後、これらの抗体による細胞の免疫組織化学染色により、標識されたタンパク質が主として核に存在することが示された（図17b）。

40

【0252】

C20orf20の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

C20orf20の抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、C20orf20に対応する4対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された11個の結腸癌細胞株の中で豊富な量のC20orf20を発現していたSNU-C4結腸癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの5日後、C20orf20-A1またはC20orf20-A2をトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、C20orf20-R1またはC20orf20-R2をトランスフェクトしたものより有意に少なく、このことから、C2

50

0orf20の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された(図18)。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。

【0253】

結腸癌細胞の増殖に対する、C20orf20-siRNAを発現するプラスミドの作用

癌細胞におけるC20orf20の機能を検討するため、C20orf20-siRNAを発現するプラスミドを構築し、C20orf20発現に対するそれらの作用を調査した。psiH1BX-C20orf20、psiH1BX-EGFP、またはpsiH1BX-擬似でのSNU-C4細胞のトランスフェクションにより、psiH1BX-C20orf20が、psiH1BX-EGFPまたはpsiH1BX-擬似と比較して、細胞におけるC20orf20の発現を有意に抑制することが明らかになった(図19A)。C20orf20の抑制が結腸癌細胞の増殖抑制をもたらすか否かを試験するため、psiH1BX-C20orf20またはpsiH1BX-EGFPをHCT116細胞およびSW480細胞にトランスフェクトした。psiH1BX-C20orf20がトランスフェクトされた生存可能細胞は、psiH1BX-EGFPがトランスフェクトされたものと比較して著しく減少し、このことから、C20orf20の発現低下により、結腸癌細胞の増殖が抑制されることが示唆された(図19B)。

【0254】

酵母2-ハイブリッドスクリーニングシステムによる、C20orf20と相互作用するタンパク質の同定

C20orf20の機能を明確にするため、酵母2-ハイブリッドスクリーニングシステムを使用して、C20orf20と相互作用するタンパク質を探索した。C20orf20の完全コーディング領域を発現するpAS2-C20orf20をベイトとして用いて、ヒト精巢cDNAライブラリーからの 1.9×10^6 個のクローンをスクリーニングした。175個の陽性コロニーのうち、32個は、その後のDNA配列決定により、プロモドメイン含有(Bromo domain containing)8(BRD8)をコードする遺伝子であることが判明した。さらに、BRD8クローンは、全て、C末端の588アミノ酸領域を含み、このことから、会合を担う領域がこの領域内にあることが示唆された(図20A)。pAS2-C20orf20およびBRD8のC末端領域を発現するpACT2-BRD8を酵母細胞に同時トランスフェクトすることにより、インビトロでのC20orf20とBRD8との相互作用を立証した(図20B)。インビボでのC20orf20とBRD8との会合を調査するため、HA標識C末端BRD8タンパク質を発現するプラスミド(pCMV-HA-BRD8)と共に、またはそのプラスミドなしで、Flag標識C20orf20タンパク質を発現するプラスミド(pFlag-C20orf20)をCOS7細胞にトランスフェクトし、免疫沈降アッセイを実施した。抗FLAG抗体を用いた免疫沈降、およびその後の抗HA抗体を使用したウエスタンブロット分析により、Flag標識C20orf20に対応する単一のバンドが検出され、このことから、インビボのC20orf20とBRD8との相互作用が確認された(図20C)。

【0255】

実施例6：CCPUC1の発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

CCPUC1の同定、発現、および構造

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを使用して公共データベースで実施したB9223の配列との相同性検索により、KIAA0643タンパク質、クローンMGC:9638(GenBankアクセッション番号BC017070)に類似しているとの注釈が付けられた新規ヒト遺伝子、および染色体バンド16p12に割り当てられたGenBankアクセッション番号NT_010552.9を有するゲノム配列が同定された。遺伝子のコーディング配列を決定するため、GENSCANおよびジーン・リコグニション・アンド・アセンブリ・インターネット・リンク・プログラムを使用して、ゲノム配列で候補エキソン配列を予測し、エキソン-コネクション実験を実施した。結果として、推定413アミノ酸のタンパク質をコードする1239ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む1681ヌクレオチドのアセンブリ配列が得られた。最初のATGには、真核生物における翻訳の開始のためのコンセンサス配列に一致する配列(GTTAATGT)、および上流のインフレーム終止コドンが隣接していた。cDNAとゲノム配列との比較により、この遺伝子が11個のエキソンからなることが明らかとなった。予測されたタンパク質のアミノ酸配列は、マウスRIKEN cDNA 2610111M03(AK011846)と89%の同一性を示した。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールを用いた

タンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質がコイルドコイル領域（コドン195～267）を含むことが明らかとなったため、本発明者らは、その遺伝子をCCPUC1（coiled-coil protein up-regulated in colon cancer（結腸癌で上方制御されるコイルドコイルタンパク質））と名付けた。

【0256】

myc標識CCPUC1タンパク質の細胞内局在

CCPUC1タンパク質の細胞内局在を検討するため、myc標識CCPUC1タンパク質を発現するプラスミド（pDNAMyc/His-CCPUC1）を、COS7細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞からの抽出物および抗myc抗体を使用したウェスタンブロット分析により、標識されたタンパク質に対応する60kDaのバンドが明らかになった（図21a）。その後、抗体による細胞の免疫組織化学染色により、タンパク質が主として細胞質に存在することが示された（図21b）。

10

【0257】

CCPUC1の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

CCPUC1の抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、CCPUC1に対応する5対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された11個の結腸癌細胞株の中で豊富な量のCCPUC1を発現していたLoVo結腸癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの12時間後、5個のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドの中で、CCPUC1-AS3は、対照S-オリゴヌクレオチド（CCPUC1-S3）と比較して、有意にCCPUC1の発現を抑制した（図22a）。トランスフェクションの5日後、CCPUC1-AS3をトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、CCPUC1-S3をトランスフェクトしたものより有意に少なく、このことから、CCPUC1の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された（図22b）。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。CCPUC1-AS3による類似の増殖抑制が、SW480ヒト結腸癌細胞において観察された。さらに、CCPUC1-AS3またはCCPUC1-S3とLoVo細胞を用いてMTTアッセイを実施したところ、CCPUC1-S3と比較して、CCPUC1-AS3に反応して細胞生存率が低下することが確認された（図22c）。

20

【0258】

結腸癌細胞の増殖に対する、CCPUC1-siRNAを発現するプラスミドの作用

30

癌細胞におけるCCPUC1の機能を調査するため、CCPUC1-siRNAを発現するプラスミドを構築し、CCPUC1発現に対するそれらの作用を調査した。psiU6BX-CCPUC1-2、psiU6BX-CCPUC1-3、またはpsiU6BX-擬似でのSNU-C4結腸癌細胞またはHCT116結腸癌細胞のトランスフェクションにより、psiU6BX-CCPUC1-3が、psiU6BX-CCPUC1-2またはpsiU6BX-擬似と比較して、細胞におけるCCPUC1の発現を有意に抑制することが明らかになった（図23A、24A）。CCPUC1の抑制が結腸癌細胞の増殖抑制をもたらすか否かを試験するため、psiU6BX-CCPUC1-3またはpsiU6BX-擬似をこれらの細胞にトランスフェクトした。psiU6BX-CCPUC1-3がトランスフェクトされた生存可能細胞は、psiU6BX-CCPUC1-2がトランスフェクトされたものと比較して著しく減少し、このことから、CCPUC1の発現低下により、SNU-C4細胞（図23B）およびHCT116細胞（図24B）の増殖が抑制されることが示唆された。

40

【0259】

結腸癌細胞株におけるCCPUC1の発現

CCPUC1の発現を調査し、機能を探求するため、CCPUC1に対するポリクローナル抗体を調製した。HCT116、SNUC4、およびSW480を含む結腸癌細胞の全抽出物を使用したウェスタンブロット分析により、CCPUC1に対応する53kDaのバンドが示された（図25）。内因性CCPUC1タンパク質のサイズは、抗myc抗体を用いて検出されたmyc標識CCPUC1のサイズと非常に類似していた（図25）。

【0260】

結腸癌細胞および組織におけるCCPUC1の細胞内局在

細胞内局在を明らかにするため、CCPUC1の蛍光免疫組織化学染色をHCT116細胞におい

50

て実施した。細胞を抗CCPUC1で染色し、フルオレセイン結合二次抗体で可視化した。シグナルは主として核に観察された(図26)。

【0261】

結腸の正常上皮、腺癌、および腺腫におけるCCPUC1の発現

非癌性上皮細胞と腫瘍細胞とでCCPUC1タンパク質の発現レベルを比較するため、パラフィンで包埋した臨床組織を免疫組織化学染色に供した。癌性細胞は、非癌性上皮細胞よりも強く抗CCPUC1抗体で染色された(図27A)。腺腫における発現も研究したところ、弱いシグナルが腺腫細胞に示された(図27B)。

【0262】

酵母2-ハイブリッドスクリーニングシステムによる、CCPUC1と相互作用するタンパク質の同定

CCPUC1の発癌メカニズムを明確にするため、酵母2-ハイブリッドスクリーニングシステムを使用して、CCPUC1と相互作用するタンパク質を探索した。同定された陽性クローンのうち、核クラスタリンのC末端領域(nCLU)は、酵母細胞におけるpAS2-CCPUC1およびpACT2-クラスタリンを使用した同時形質転換により、CCPUC1と相互作用した(図28A)。陽性クローンは、コドン252~449を含有しており、このことから、nCLUの相互作用を担う領域がこの領域内にあることが示唆された。インビボのCCPUC1とnCLUとの会合を立証するため、FLAG標識C末端nCLUを発現するプラスミド(pFlag-クラスタリン)と共に、またはそのプラスミドなしで、myc標識CCPUC1を発現するプラスミド(pcDNA-CCPUC1-myc)をCOS7細胞にトランスフェクトし、免疫沈降アッセイを実施した。抗FLAG抗体を用いた免疫沈降および抗myc抗体を使用したウェスタンブロットにより、CCPUC1に対応する単一のバンドが示され、抗myc抗体を用いた免疫沈降および抗FLAGを使用したウェスタンブロットにより、nCLUに対応するバンドが示され、これらのことから、インビボでCCPUC1はnCLUと会合することが示唆された(図28B、28C)。

【0263】

細胞内でのmyc標識CCPUC1およびFLAG標識クラスタリンの共局在

細胞内でCCPUC1およびnCLUが共局在しているか否かを試験するため、pcDNA-CCPUC1-mycおよびpFlag-クラスタリンをCOS7細胞に共トランスフェクトし、免疫組織化学染色によりそれらの細胞内局在を調査した。抗myc抗体での染色により、標識されたCCPUC1タンパク質が核に局在していることが明らかになり、抗FLAG抗体での染色により、標識されたnCLUが核に存在することが証明された(図29A、29B、29D)。pcDNA-CCPUC1-mycおよびpFlag-クラスタリンの両方での同時トランスフェクションならびに抗体による二重染色により、核におけるこれらのタンパク質の共局在が明らかになり、このことから、CCPUC1とnCLUが細胞内で相互作用しているという見解が支持された(図29C)。

【0264】

実施例7: LY6Eの発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

Ly6Eの同定および構造

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを使用して公共データベースで実施したC3703の配列との相同性検索により、ヒト遺伝子、Ly6E(lymphocyte antigen 6 complex, locus E(リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E))(GenBankアクセッション番号U66711)および染色体バンド8q24.3に割り当てられたGenBankアクセッション番号NT_008127を有するゲノム配列が同定された。Ly6E cDNAとゲノム配列との比較により、この遺伝子が4個のエキソンからなることが明らかとなった。

【0265】

myc標識Ly6Eタンパク質の細胞内局在

Ly6Eタンパク質の細胞内局在を検討するため、myc標識Ly6Eタンパク質を発現するプラスミド(pDNAmyc/His-Ly6E)をSW480細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞からの抽出物および抗myc抗体を使用したウェスタンブロット分析により、標識されたタンパク質に対応する30kDaのバンドが明らかになった(図30a)。その後の抗体による細胞の免疫組織化学染色により、タンパク質が主として細胞質に存在することが示された(図30b)

10

20

30

40

50

。

【0266】

Ly6Eの発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

Ly6Eの抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、Ly6Eに対応する5対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された11個の結腸癌細胞株の中で豊富な量のLy6Eを発現していたLoVo結腸癌細胞またはSNU-C4結腸癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの12時間後、5個のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドのうち、Ly6E-AS1またはLy6E-AS5は、対照S-オリゴヌクレオチド（Ly6E-S1、Ly6E-S5）と比較して、LoVo細胞におけるLy6Eの発現をそれぞれ有意に抑制した（図31a）。トランスフェクションの5日後、Ly6E-AS1またはLy6E-AS5をトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、Ly6E-S1またはLy6E-S5をトランスフェクトしたものより有意に少なく、このことから、Ly6Eの抑制により、トランスフェクトされたLoVo細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された（図31b）。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。さらに、S-オリゴヌクレオチド（Ly6E-AS1、Ly6E-AS5、Ly6E-S1、またはLy6E-S5）を用いてLoVo細胞を使用したMTTアッセイを実施したところ、Ly6E-S1またはLy6E-S5と比較して、Ly6E-AS1またはLy6E-AS5に反応して細胞生存率が低下することが確認された（図31c）。類似した結果が、SNU-C4細胞で得られた。

【0267】

実施例8：NKD1の発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

Nkd1の同定、構造、および発現

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを使用して公共データベースで実施したD9092の配列との相同性検索により、ヒト遺伝子、Nkd1（Naked1）（GenBankアクセッション番号AB062886）、および染色体バンド16q12に割り当てられたGenBankアクセッション番号NT_010493を有するゲノム配列が同定された。Nkd1のPCR産物をプローブとして用いて多組織ノーザンブロット分析を実施したところ、脾臓、精巣、および卵巣に4.0kb転写物の発現が検出された（図32）。

【0268】

Nkd1の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

Nkd1の抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、Nkd1に対応する4対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された11個の結腸癌細胞株の中で豊富な量のNkd1を発現していたLoVo結腸癌細胞またはSW480結腸癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの12時間後、5個のアンチセンスS-オリゴヌクレオチドのうち、Nkd1-AS4またはNkd1-AS5は、対照S-オリゴヌクレオチドNks1-S4またはNkd1-S5と比較してそれぞれ有意にNkd1の発現を抑制した（図33a）。トランスフェクションの5日後、Nkd1-AS4およびNkd1-AS5をトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、Nkd1-S4またはNkd1-S5をトランスフェクトしたものよりそれぞれ有意に少なく、このことから、Nkd1の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された（図33b）。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。さらに、S-オリゴヌクレオチド（Nkd1-AS4、Nkd1-AS5、Nkd1-S4、またはNkd1-S5）とLoVo細胞およびSW480細胞を使用したMTTアッセイを実施したところ、Nkd1-S4またはNkd1-S5と比較して、Nkd1-AS4またはNkd1-AS5に反応して細胞生存率が低下することが確認された（図33c）。

【0269】

実施例10：LAPTM4βの発現低下による胃癌細胞の増殖抑制

ヒト胃癌で共通して発現が上方制御される遺伝子B0338の同定

20個の胃癌組織および対応する非癌性胃粘膜組織の発現プロファイルを、23040個の遺伝子を含むcDNAマイクロアレイを使用して分析した。この分析により、対応する非癌性組

織と比較して癌組織で高頻度に発現レベルが上昇している多数の遺伝子が同定された。それらのうち、LAPTM4 β に対応する施設内アクセッション番号B0338を有する遺伝子は、選択基準を満たした16例において、上昇率1.03～16の範囲で、対応する非癌性粘膜と比較して癌組織で上方制御されていた(図34a)。

【0270】

マイクロアレイの結果を明確にするため、半定量的RT-PCRを実施したところ、さらなる12個の胃癌のうちの8個において、対応する正常粘膜と比較して、LAPTM4 β の発現が上昇していることが明らかになった(図34b)。

【0271】

LAPTM4 β の発現および構造

10

LAPTM4 β のPCR産物をプローブとして用いた多組織ノーザンブロット分析を実施したところ、精巣、卵巣、心臓、および骨格筋に2.4kb転写物の比較的高度な発現が検出された(図35a)。LAPTM4 β タンパク質のアミノ酸配列は、ヒトLAPTM4Aと47%の同一性およびマウスLaptm4bと97%の同一性を示した。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールを用いたタンパク質モチーフ検索により、予測タンパク質が、4個の膜貫通ドメインを含むことが明らかとなった(図35b)。

【0272】

myc標識LAPTM4 β またはFlag標識LAPTM4 β の細胞内局在

LAPTM4 β タンパク質の細胞内局在を調査するため、myc標識タンパク質を発現するプラスミド(pDNAMyc/His-LAPTM4 β)またはFlag標識LAPTM4 β タンパク質を発現するプラスミド(pFLAG-LAPTM4 β)を、NIH3T3細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞からの抽出物および抗myc抗体または抗Flag抗体を使用したウェスタンブロット分析により、標識されたタンパク質に対応する26kDaのバンドが明らかになった。その後のこれらの抗体による細胞の免疫組織化学染色により、標識されたタンパク質が主としてゴルジ装置に存在することが示された(図36)。

20

【0273】

LAPTM4 β の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる胃癌細胞の増殖抑制

LAPTM4 β の抑制が胃癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、LAPTM4 β に対応する対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された6個の胃癌細胞株の中で豊富な量のLAPTM4 β を発現していたMKN1胃癌細胞またはMKN7胃癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの12時間後、アンチセンスS-オリゴヌクレオチドLAPTM4 β -ASは、対照S-オリゴヌクレオチドLAPTM4 β -S、LAPTM4 β -SCR、LAPTM4 β -REVと比較してそれぞれ有意にLAPTM4 β の発現を抑制した(図37a)。トランスフェクションの6日後、LAPTM4 β -ASをトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、対照S-オリゴヌクレオチド(LAPTM4 β -S、LAPTM4 β -SCR、LAPTM4 β -REV)をトランスフェクトしたものより有意に少なく、このことから、LAPTM4 β の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された(図37b)。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた。さらに、MKN1細胞およびMKN7細胞、ならびにS-オリゴヌクレオチド(LAPTM4 β -AS、LAPTM4 β -S、LAPTM4 β -SCR、またはLAPTM4 β -REV)を使用したMTTアッセイを実施したところ、LAPTM4 β -S、LAPTM4 β -SCR、またはLAPTM4 β -REVと比較して、LAPTM4 β -ASに反応して細胞生存率が低下することが確認された(図37c)。LAPTM4 β -ASによる類似の増殖抑制が、MKN28ヒト胃癌細胞、MKN74ヒト胃癌細胞、およびSt-4ヒト胃癌細胞で観察された。

30

40

【0274】

実施例11：LEMD1の発現低下による結腸癌細胞の増殖抑制

LEMD1の同定、構造、および発現

国立バイオテクノロジー情報センターのBLASTプログラムを使用した公共データベースにおけるA8108の配列との相同性検索により、XM_050184を含むEST、および染色体バンド1q31に割り当てられたGenBankアクセッション番号NT_02190を有するゲノム配列が同定され

50

た。遺伝子のコーディング配列を決定するため、GENSCANおよびジーン・リコグニション・アンド・アセンブリ・インターネット・リンク・プログラムを使用して、ゲノム配列で候補エキソン配列を予測し、エキソン-コネクション実験を実施した。結果として、29アミノ酸のタンパク質をコードする90ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含む733ヌクレオチドのアセンブリ配列（GenBankアクセッション番号：AB084765）が得られた。シンプル・モジュラー・アーキテクチャー・リサーチ・ツールを用いたタンパク質モチーフ検索により、予測されたタンパク質がLEMモチーフ（コドン1～27）を含むことが明らかとなったため、本発明者らは、その遺伝子をLEMD1（LEM domain containing 1（LEMドメイン含有1））と名付けた（図38a）。最初のATGには、真核生物における翻訳の開始のためのコンセンサス配列に一致する配列（ATCATGG）、および上流のインフレーム終止コドンが隣接していた。LEMD1 cDNAとゲノム配列との比較により、この遺伝子が4個のエキソンからなることが明らかとなった。最終的に、エキソン1、2、および4からなる選択的スプライシングが同定された。この転写物は、67アミノ酸のタンパク質をコードする204ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを含有していた（GenBankアクセッション番号：AB084764）。

10

【0275】

さらに、LEMD1のPCR産物をプローブとして用いて多組織ノーザンブロット分析を実施したところ、他の器官には発現していない0.9kb転写物の精巢での発現が検出された（図38b）。予測されたLEMD1タンパク質のアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号XM_050184を有するチモピエチン（thymopietin）に類似しているヒト仮説タンパク質と62%の同一性を示した。

20

【0276】

LEMD1の発現を低下させるよう設計されたアンチセンスS-オリゴヌクレオチドによる結腸癌細胞の増殖抑制

LEMD1の抑制が結腸癌細胞の増殖遅滞および/または細胞死をもたらすか否かを試験するため、LEMD1に対応する5対の対照S-オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスS-オリゴヌクレオチドを合成し、調査された7個の結腸癌細胞株の中で豊富な量のLEMD1を発現していたHCT116結腸癌細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの5日後、アンチセンスS-オリゴヌクレオチドLEMD1-AS1、2、3、4、または5をトランスフェクトした細胞の生存細胞数は、対照S-オリゴヌクレオチドLEMD1-REV1、2、3、4、または5をトランスフェクトしたものよりそれぞれ有意に少なく、このことから、LEMD1の抑制により、トランスフェクトされた細胞の増殖および/または生存が低下することが示唆された。一貫した結果が、3回の独立した実験で得られた（図39）。

30

【0277】

産業上の利用可能性

レーザーキャプチャーダイセクション（laser-capture dissection）とゲノム全体のcDNAマイクロアレイとの組み合わせにより得られた本明細書に記載の結腸癌または胃癌の遺伝子発現分析によって、癌の予防および治療の標的としての特異的な遺伝子が同定された。差次的に発現される遺伝子サブセットの発現に基づき、本発明は、結腸癌または胃癌の同定または検出のための分子的診断マーカーを提供する。

40

【0278】

本明細書に記載の方法は、結腸癌または胃癌の予防、診断、および治療のためのさらなる分子標的を同定する際にも有用である。本明細書において報告されたデータは、結腸癌または胃癌の包括的な理解を深め、新規の診断戦略の開発を容易にし、治療剤および予防剤としての分子標的を同定するための手掛かりを提供する。そのような情報は、結腸直腸または胃の腫瘍形成についてのより深い理解に寄与し、結腸癌または胃癌の診断、治療、そして最終的には予防における新しい戦略を開発するための指標を提供する。

【0279】

本明細書において引用される特許、特許出願、および刊行物は、全て、参照として完全に組み入れられる。さらに、本発明は、詳細に、かつ特定の態様を参照しつつ記載したが

50

、本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく、様々な変更および修正をそれらに施し得ることが、当業者には明白である。

【 0 2 8 0 】

参考文献

1. Kitahara, O., Furukawa, Y., Tanaka, T., Kihara, C., Ono, K., Yanagawa, R., Nita, M., Takagi, T., Nakamura, Y., およびTsunoda, T. 「Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia」、Cancer Res. 61: 3544-3549、2001年
2. Lin, Y-M., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Yue, C-T., Yang, K-C., およびNakamura, Y. 「Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas」、Oncogene 21: 4120-4128、2002年
3. Hasegawa, S., Furukawa, Y., Li, M., Satoh, S., Kato, T., Watanabe, W., Katagiri, T., Tsunoda, T., Yamaoka, Y., およびNakamura, Y. 「Genome-wide analysis of gene expression in intestinal-type gastric cancer using cDNA microarray representing 20340 genes」、投稿中
4. Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., およびNakamura, Y. 「Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis」、Cancer Res. 60: 5007-5011、2000年
5. Sun J, Qian Y, Hamilton AD, およびSebti SM 「Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts」、Oncogene 16: 1467-73、1998年
6. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, およびBaselga J 「Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells」、Cancer Res 61: 4744-9、2001年
7. O'Dwyer ME およびDruker BJ 「Status of bcr-abl tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia」、Curr Opin Oncol 12: 594-7、2000年

【図面の簡単な説明】

【 0 2 8 1 】

【図 1】cDNAマイクロアレイでの各選択基準の強度よりも大きなCy3またはCy5のシグナル強度を有する結腸癌組織における、B6647、D7610、C4821、A8108、B9223、C3703、およびD9092の相対発現比（癌/非癌）を表した棒グラフを示す。（a）B6647、（b）D7610、（c）C4821、（d）A8108、（e）B9223、（f）C3703、（g）D9092。

【図 2】結腸癌のさらなる症例を使用して半定量的RT-PCRにより分析した。（a）B6647、（b）D7610、（c）C4821、（d）A8108、（e）B9223、（f）Ly6E、および（g）Nkd1の発現を示すゲルである。T：腫瘍組織、N：正常組織。GAPDHの発現を内部対照とした。

【図 3】ARHCL1の構造を示す。（a）ARHCL1の多組織ノーザンブロット分析を示す。（b）ARHCL1のゲノム構造および予測されたARHCL1タンパク質の構造の概略図である。エキソンは、パネル上部のARHCL1 cDNA配列中、ヌクレオチド番号を付けた白抜きの四角により示す。

【図 4】標識されたARHCL1タンパク質の細胞内局在を示す。（a）cMyc標識ARHCL1タンパク質またはFlag標識ARHCL1タンパク質のイムノブロットを示す。（b）FITCにより可視化した、HCT15細胞における標識されたタンパク質の免疫組織化学染色を示す。核はDAPIで対比染色した。

【図 5】SNU-C4細胞またはLoVo細胞におけるARHCL1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド（AS1）の増殖阻害作用を示す。（a）半定量的RT-PCRにより調査された、対照ARHCL1-R1（R1）と比較してARHCL1-AS1（AS1）によって低下したARHCL1の発現を示すゲルを示す。

(b) ARHCL1-AS1 (AS1) または ARHCL1-R1 (R1) がトランスフェクトされた生存可能な SNU-C4細胞および LoVo細胞のギムザ染色写真である。

【図 6】大腸菌細胞における GST 融合 ARHCL1 タンパク質の調製を示す。(A) ARHCL1 の構造、および GST と融合した N 末端 ARHCL1 タンパク質 (ARHCL1-N) または C 末端 ARHCL1 タンパク質 (ARHCL1-C) を発現するプラスミドの構築を示す。(B) GST と融合した ARHCL1-N タンパク質または ARHCL1-C タンパク質の発現を示す。上パネル：CBB 染色。下パネル：抗 GST 抗体を用いたイムノブロット分析。

【図 7】酵母 2-ハイブリッドシステムによる、ARHCL1 と相互作用するタンパク質の同定を示す。(A) (B) 酵母細胞における ARHCL1 タンパク質の N 末端領域または C 末端領域と、同定されたクローンとの相互作用を示す。

【図 8】インビボでの ARHCL1 とザイキシンとの相互作用を示す。(A) Flag 標識 ARHCL1 と HA 標識 ザイキシンとの共免疫沈降の結果を示す。pCMV-HA または pCMV-HA-ザイキシンと共に pFlag または pFLAG-ARHCL1 をトランスフェクトした細胞から抽出されたタンパク質を、抗 Flag M2 抗体により免疫沈降させた。その後、抗 HA 抗体を使用したイムノブロッティングを実施した。(B) 細胞内での ARHCL1 および ザイキシンの細胞内共局在を示す。核は DAPI で染色した。

【図 9】NFXL1 の構造を示す。(a) NFXL1 の多組織ノーザンブロットを示す。(b) NFXL1 のゲノム構造および予測された NFXL1 タンパク質の構造の概略図である。エキソンをパネル上部の白抜きの四角により示す。

【図 10】NFXL1-AS (AS) または NFXL1-R (R) がトランスフェクトされた生存可能な SW480 細胞および SNU-C4 細胞を示すギムザ染色写真である。

【図 11】(A) SNU-C4 細胞における、NFXL1 の発現に対する NFXL1-siRNA の作用。(B) 上パネル：対照 siRNA または NFXL1-siRNA で処理された生存可能な HCT116 細胞、SW480 細胞、または SNU-C4 細胞のギムザ染色。下パネル：EGFP-siRNA または NFXL1-siRNA に応答した生存可能な細胞を 3 連で MTT アッセイにより調査した。

【図 12】HCT116 細胞、SW480 細胞、および COS7 細胞における HA 標識 NFXL1 タンパク質の細胞内局在を示す。

【図 13】大腸菌細胞における His 標識 NFXL1 タンパク質の調製を示す。(A) NFXL1 の構造、His 標識 N 末端 NFXL1 (NFXL1-N) または C 末端 NFXL1 (NFXL1-C2) を発現するプラスミドの構築を示す。(B) (C) His 標識 NFXL1-N タンパク質または NFXL1-C2 タンパク質の発現を示す。左パネル：CBB 染色。右パネル：抗 His タグ抗体によるイムノブロッティング。

【図 14】酵母 2-ハイブリッドシステムによる、NFXL1 と相互作用するタンパク質の同定を示す。(A) (B) NFXL1 の N 末端領域または C 末端領域と、同定されたクローンとの相互作用が、酵母細胞における共形質転換により確認されたことを示す。

【図 15】インビボでの Flag 標識 NFXL1 と HA 標識 MGC10334 または CENPC1 との共免疫沈降の結果を示す。pCMV-HA-FLJ25348、pCMV-HA-MGC10334、pCMV-HA-CENPC1、pCMV-HA-SOX30、または pCMV-HA-DKFZp564J047 と共に pFlag または pFLAG-NFXL1 をトランスフェクトした細胞から抽出されたタンパク質を、抗 Flag M2 抗体で免疫沈降させる。その後、抗 HA 抗体を使用してイムノブロッティングを実施した (1: pCMV-HA-FLJ25348、2: pCMV-HA-MGC10334、3: pCMV-HA-CENPC1、4: pCMV-HA-SOX30、および 5: pCMV-HA-DKFZp564J047)。

【図 16】C20orf20 の構造を示す。(a) 様々なヒト組織における C20orf20 の多組織ノーザンブロットを示す。(b) C20orf20 のゲノム構造および予測された C20orf20 タンパク質の構造の概略図である。エキソンをパネル上部の白抜きの四角により示す。

【図 17】標識された C20orf20 タンパク質の細胞内局在を示す。(a) cMyc 標識または Flag 標識 C20orf20 タンパク質のイムノブロットを示す。(b) FITC により可視化した、COS7 細胞における標識されたタンパク質の免疫組織化学染色を示す。核は DAPI で対比染色した。

【図 18】C20orf20-AS1 (AS1)、C20orf20-AS2 (AS2)、C20orf20-R1 (R1)、または C20orf20-R1 (R2) がトランスフェクトされた生存可能な SNU-C4 細胞のギムザ染色写真である。

【図 19】(A) C20orf20 の発現に対する C20orf20-siRNA の作用の結果を示す。(B) HCT1

10

20

30

40

50

16細胞およびSW480細胞の生存率に対するC20orf20-siRNAの作用の結果を示す。

【図20】酵母2-ハイブリッドシステムにおける、C20orf20とBRD8との相互作用を示す。(A)保存されたプロモドメインおよびBRD8の相互作用領域を示す。相互作用を担う領域をバーで示す。(B)酵母細胞におけるC20orf20とBRD8との相互作用を示す。(C)インビボでのC20orf20のBRD8との相互作用を示す。pFlag-C20orf20単独、またはpFlag-C20orf20およびpCMV-HA-BRD8をトランスフェクトした細胞からの抽出物の免疫沈降は、抗-FLAG M2抗体を用いて実施した。ウェスタンブロット分析は抗HA抗体を用いて実施した。

【図21】CCPUC1の細胞内局在を示す。(a) cMyc標識CCPUC1タンパク質のイムノブロットを示す。(b) FITCにより可視化した、COS7細胞における標識されたタンパク質の免疫組織化学染色を示す。核はDAPIで対比染色した。

10

【図22】LoVo細胞におけるCCPUC1のアンチセンスS-オリゴヌクレオチド(CCUC1-AS3)の増殖阻害作用を示す。(a)半定量的RT-PCRにより調査された、対照CCUC1-S3(S3)と比較してCCUC1-AS3(AS3)によって低下したCCUC1の発現を示すゲルである。(b)CCUC1-AS3(AS3)またはCCUC1-S3(S3)がトランスフェクトされた生存可能なLoVo細胞および未処理(擬似)の細胞のギムザ染色写真である。(c)MTTアッセイにより測定された、CCUC1-AS3(AS3)またはCCUC1-S3(S3)のいずれかをトランスフェクトしたLoVo細胞の生存率を示す棒グラフである。

【図23】(A)SNU-C4細胞における、CCPUC1の発現に対するCCPUC1-siRNAの作用。(B)SNU-C4細胞の生存率に対するCCPUC1-siRNAの作用。

【図24】(A)HCT116細胞における、CCPUC1の発現に対するCCPUC1-siRNAの作用。(B)HCT116細胞の生存率に対するCCPUC1-siRNAの作用。

20

【図25】結腸癌細胞株における、CCPUC1のウェスタンブロット分析を示す。

【図26】HCT116細胞における、CCPUC1タンパク質の細胞内局在を示す。

【図27】(A)結腸癌組織におけるCCPUC1の免疫組織化学染色の写真を示す。(B)結腸腺腫におけるCCPUC1の免疫組織化学染色の写真を示す。

【図28】酵母2-ハイブリッドシステムによる、CCPUC1と相互作用するタンパク質としての核クラスタリン(nCLU)の同定の結果を示す。(A)酵母細胞におけるCCPUC1と核クラスタリンとの相互作用を示す。(B)インビボでのCCPUC1とnCLUとの相互作用を示す。COS7細胞に、CCPUC1-mycもしくはpFlag-クラスタリンまたはその両方をトランスフェクトした。免疫沈降は、抗FLAG M2抗体または抗mycマウス抗体を用いて実施した。ウェスタンブロット分析は、抗myc抗体(上パネル)または抗FLAG抗体(下パネル)を使用して実施した。CCPUC1およびC末端nCLUのバンドが、共トランスフェクトされた細胞の溶解物のレーンにのみ検出され、このことは、CCPUC1(上パネル)がnCLUタンパク質(下パネル)とインビボで相互作用することを示している。

30

【図29】CCPUC1およびnCLUタンパク質の細胞内局在を示す。(A)pcDNA-myc-CCPUC1およびpFlag-クラスタリンをトランスフェクトし、マウス抗myc抗体で染色したCOS7細胞の写真を示す。トランスフェクトされた細胞は、FITC標識抗マウスIgG抗体により可視化した。(B)ウサギ抗FLAG抗体で染色し、ローダミン結合抗ウサギ抗体IgGで可視化した細胞の写真を示す。(C)A、BおよびDを合成した画像の写真を示す。(D)DAPIにより対比染色した核の写真を示す。

40

【図30】Ly6Eの細胞内局在を示す。(a) cMyc標識Ly6Eタンパク質のイムノブロットである。(b) FITCにより可視化した、SW480細胞における標識されたLy6Eタンパク質の免疫組織化学染色を示す。核は、DAPIで対比染色した。

【図31】LoVo細胞におけるLy6EのアンチセンスS-オリゴヌクレオチド(Ly6E-AS1またはLy6E-AS5)の増殖阻害作用を示す。(a)半定量的RT-PCRにより調査された、対照Ly6E-S1(S1)またはLy6E-S5(S5)と比較してLy6E-AS1(AS1)またはLy6E-AS5(AS5)によって低下したLy6Eの発現を示すゲルである。(b) Ly6E-AS1(AS1)、Ly6E-S1(S1)、Ly6E-AS5(AS5)、またはLy6E-S5(S5)がトランスフェクトされた生存可能な結腸癌細胞、およびトランスフェクトされていない(擬似)細胞のギムザ染色写真である。(c) MTTアッセイにより測定された、Ly6E-AS1(AS1)、Ly6E-S1(S1)、Ly6E-AS5(AS5)、またはLy6E-

50

S5 (S5) をトランスフェクトした結腸癌細胞の生存率を示す棒グラフである。

【図 3 2】Nkd1 の多組織ノーザンブロットを示す。

【図 3 3】LoVo 細胞および Sw480 細胞における Nkd1 のアンチセンス S-オリゴヌクレオチド (Nkd1-AS4 または Nkd1-AS5) の増殖阻害作用を示す。(a) 半定量的 RT-PCR により調査された、対照 Nkd1-S4 (S4) または Nkd1-S5 (S5) と比較して Nkd1-AS4 (AS4) または Nkd1-AS5 (AS5) によって低下した Nkd1 の発現を示すゲルである。(b) Nkd1-AS4 (AS4)、Nkd1-S4 (S4)、Nkd1-AS5 (AS5)、または Nkd1-S5 (S5) がトランスフェクトされた生存可能な結腸癌細胞、およびトランスフェクトされていない細胞 (擬似) のギムザ染色写真である。(c) MTT により測定された、Nkd1-AS4 (AS4)、Nkd1-S4 (S4)、Nkd1-AS5 (AS5)、または Nkd1-S5 (S5) をトランスフェクトした結腸癌細胞の生存率を示す棒グラフである。

10

【図 3 4】胃癌における B0338 の発現を示す。(a) 選択基準値よりも大きな Cy3 または Cy5 のシグナル強度を有する 16 個の胃癌組織における cDNA マイクロアレイでの B0338 の相対発現比 (癌/非癌) を示す棒グラフである。(b) 半定量的 RT-PCR により分析された LPTM4 β の発現を示すゲルである。T: 腫瘍組織、N: 正常組織。GAPDH の発現を内部対照とした。

【図 3 5】LPTM4 β の構造を示す。(a) LPTM4 β の多組織ノーザンブロットを示す。(b) 4 個の LPTM4 β タンパク質膜貫通ドメインの概略図である。

【図 3 6】FITC により可視化した、NIH3T3 細胞における cMyc 標識または Flag 標識 LPTM4 β タンパク質の免疫組織化学染色を示す。核は、DAPI で対比染色した。

【図 3 7】MKN1 胃癌細胞および MKN7 胃癌細胞における LPTM4 β のアンチセンス S-オリゴヌクレオチド (LPTM4 β -AS) の増殖阻害作用を示す。(a) 半定量的 RT-PCR により調査された、対照 LPTM4 β -S (S)、LPTM4 β -SCR (SCR)、または LPTM4 β -REV (REV) と比較して LPTM4 β -AS (AS) によって低下した LPTM4 β の発現を示すゲルである。(b) LPTM4 β -アンチセンス (AS)、LPTM4 β -REV (REV)、LPTM4 β -SCR (SCR)、または LPTM4 β -S (S) がトランスフェクトされた生存可能な胃癌細胞、およびトランスフェクトされていない細胞 (擬似) のギムザ染色写真である。(c) MTT アッセイにより測定された、LPTM4 β -AS (AS) または対照 (S、SCR、または REV) S-オリゴヌクレオチドをトランスフェクトした胃癌細胞の生存率を示す棒グラフである。トランスフェクトされていない細胞に対する相対値が示される。

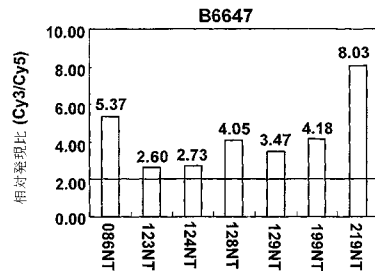
20

【図 3 8】LEMD1 の構造を示す。(a) LEMD1 のゲノム構造を示す。エキソンをパネル上部の白抜きの四角により示す。(b) 様々なヒト成人組織における LEMD1 の多組織ノーザンブロットを示す。

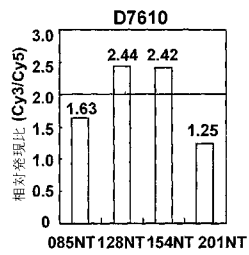
30

【図 3 9】LEMD1-AS1 (AS1)、LEMD1-AS2 (AS2)、LEMD1-AS3 (AS3)、LEMD1-AS4 (AS4)、LEMD1-AS5 (AS5)、LEMD1-REV1 (REV1)、LEMD1-REV2 (REV2)、LEMD1-REV3 (REV3)、LEMD1-REV4 (REV4)、または LEMD1-REV5 (REV5) がトランスフェクトされた生存可能な HC T116 細胞のギムザ染色写真である。

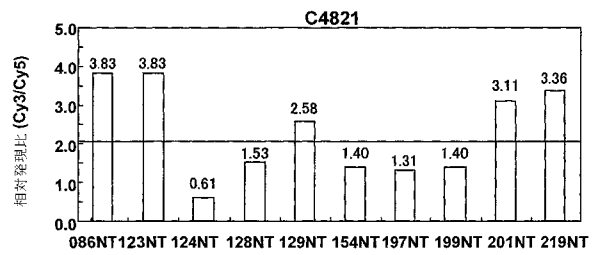
【図 1 a】



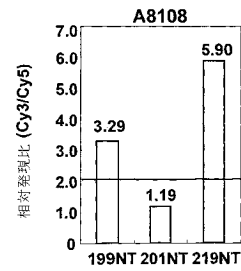
【図 1 b】



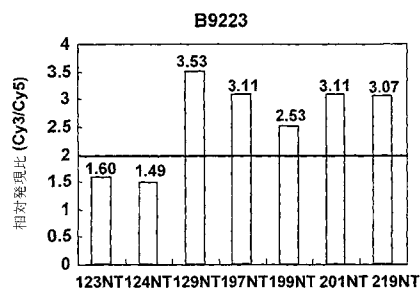
【図 1 c】



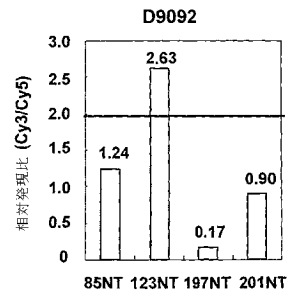
【図 1 d】



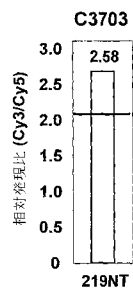
【図 1 e】



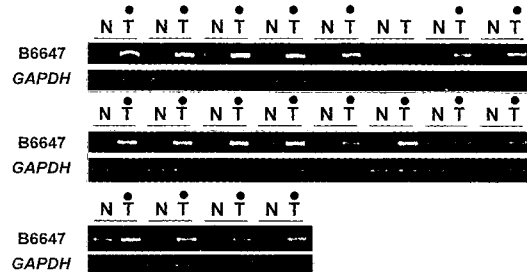
【図 1 f】



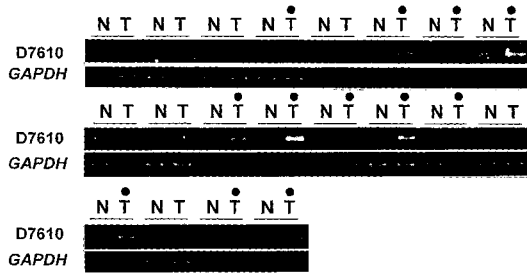
【図 1 g】



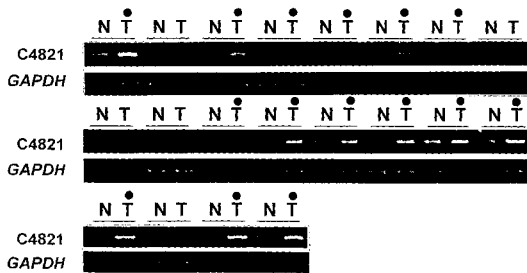
【図 2 a】



【 図 2 b 】



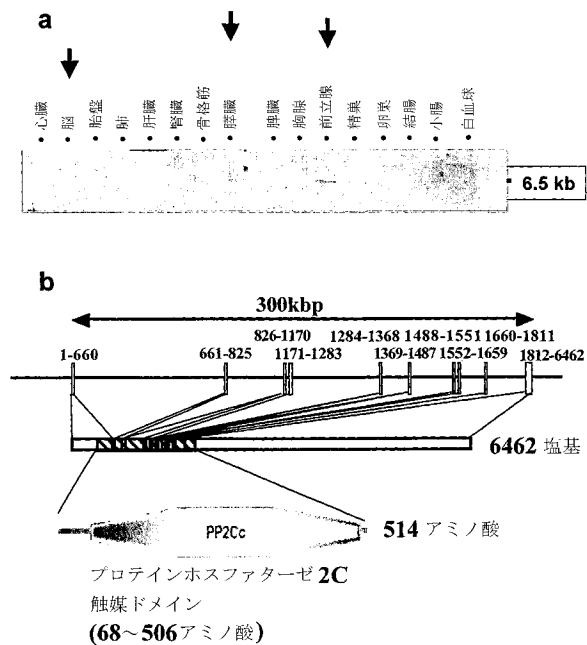
【 図 2 c 】



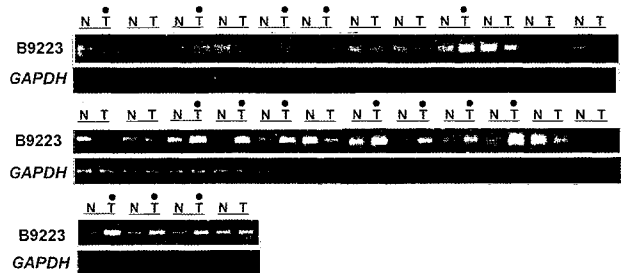
【 図 2 d 】



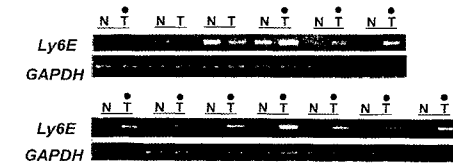
【 図 3 】



【 図 2 e 】



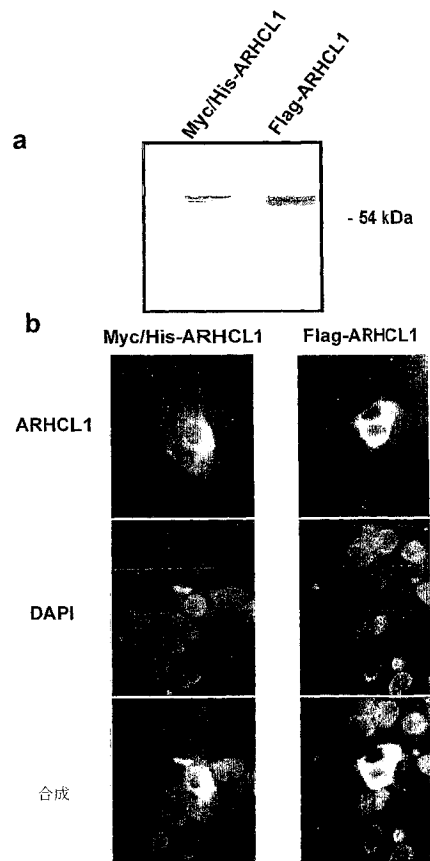
【 図 2 f 】



【 図 2 g 】



【 図 4 】

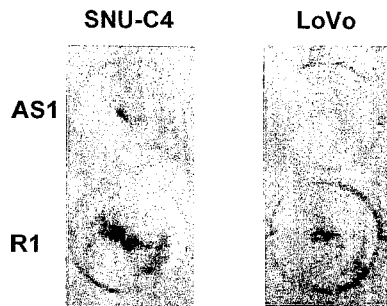


【 図 5 】

a

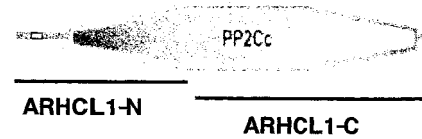


b

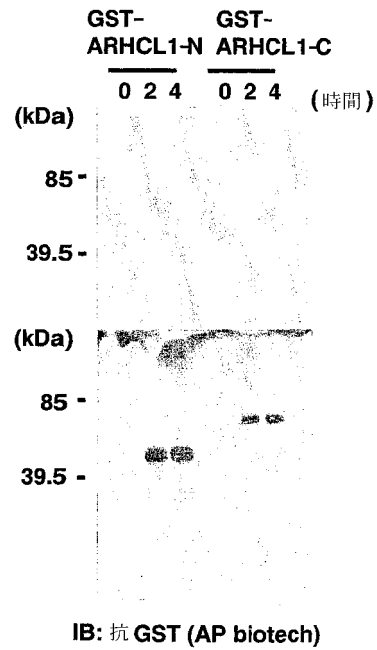


【 図 6 】

A

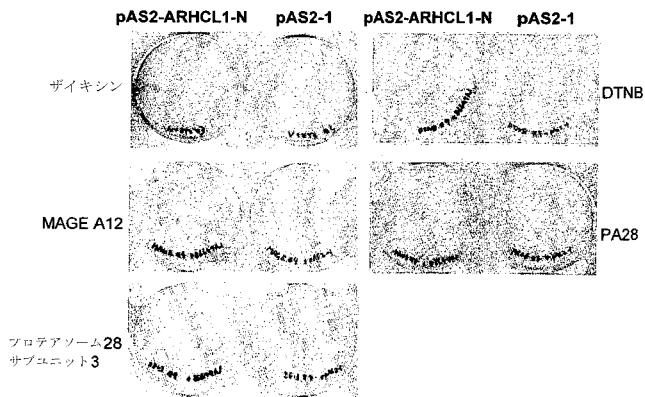


B

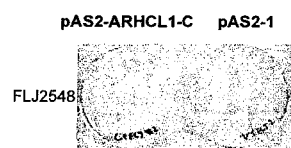


【 図 7 】

A

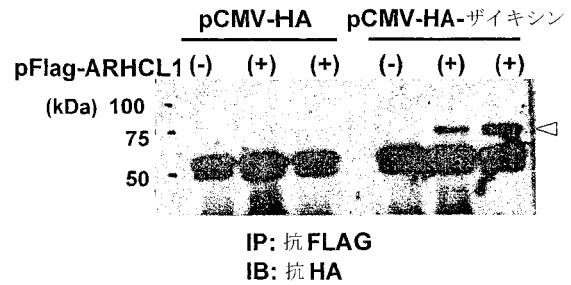


B

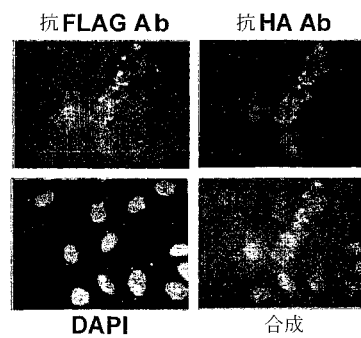


【 図 8 】

A

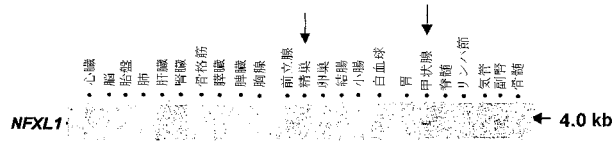


B

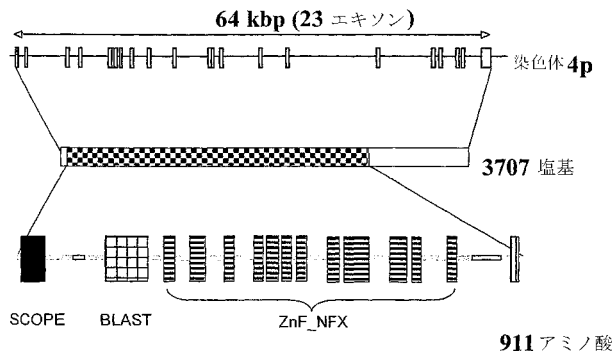


【 図 1 0 】

a



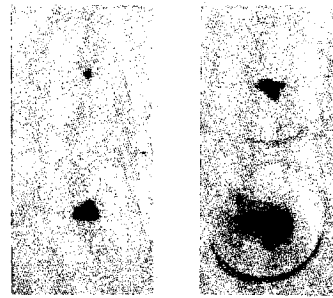
b

**SW480**

SNU-C4

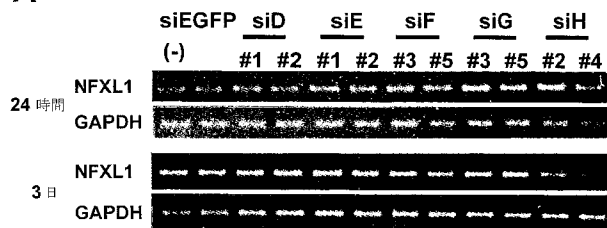
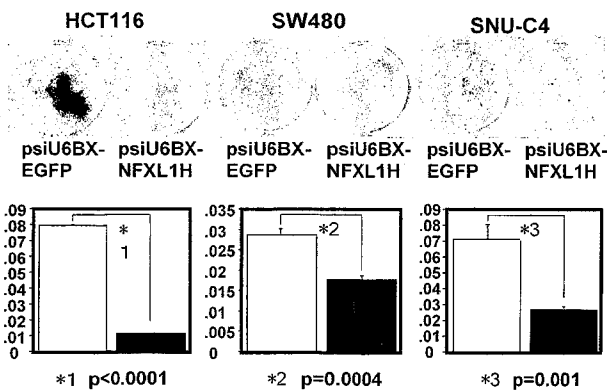
AS

R



【 図 1 1 】

A

**B**

エラーバー: $\pm$ S.D.

【 図 1 2 】

抗HA

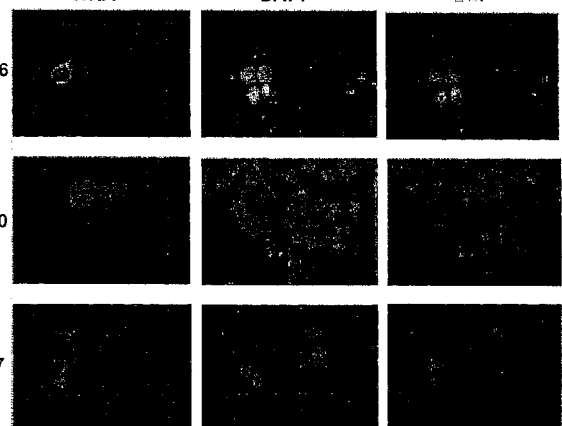
DAPI

合成

HCT116

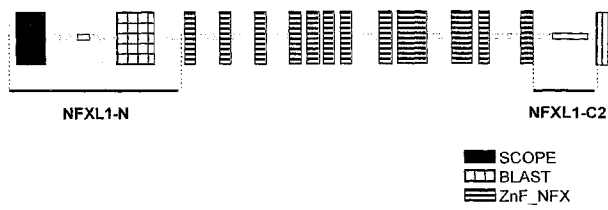
SW480

COS7

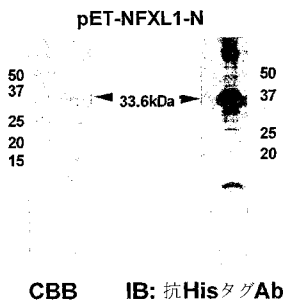


【図 1 3】

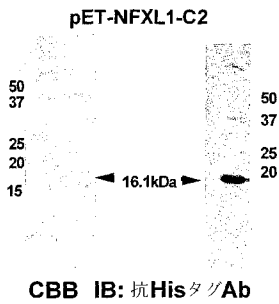
A



B

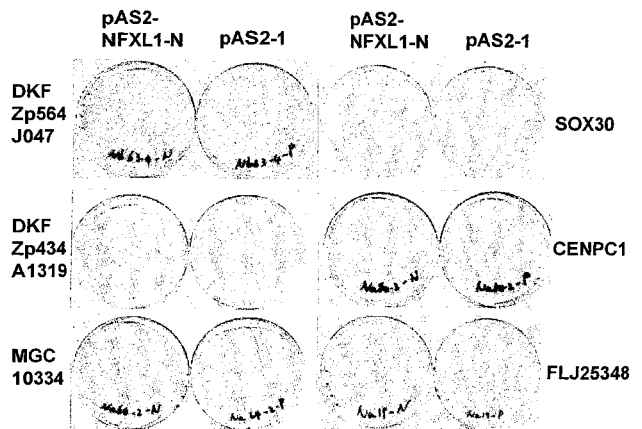


C

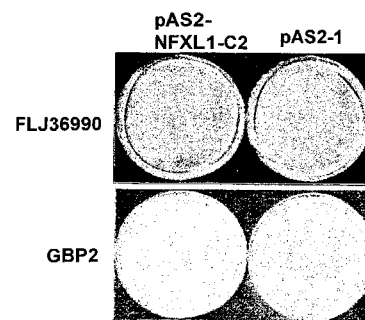


【図 1 4】

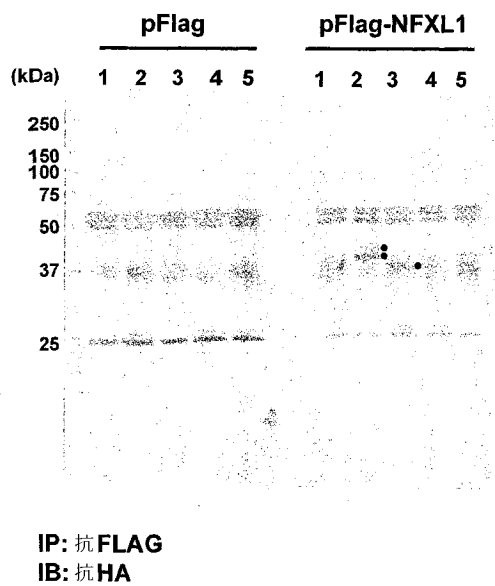
A



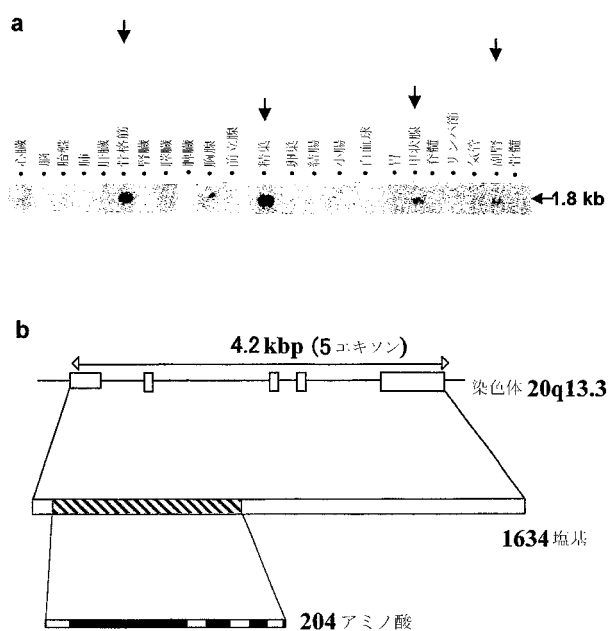
B



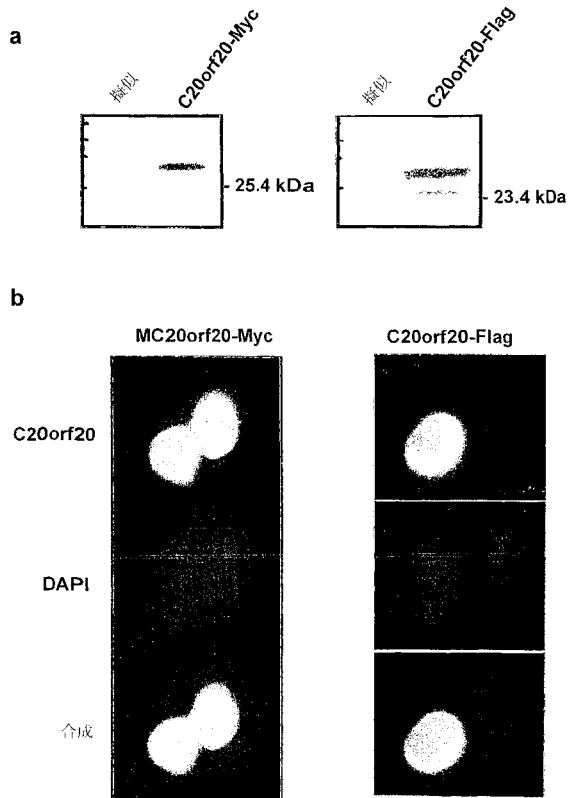
【図 1 5】



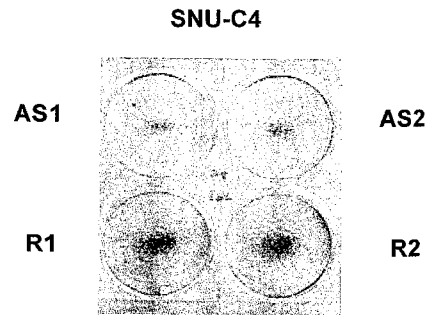
【図 1 6】



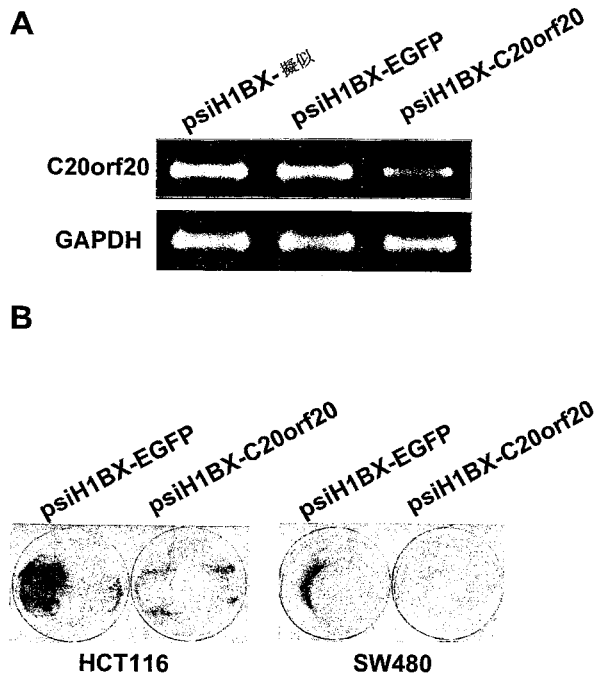
【 図 1 7 】



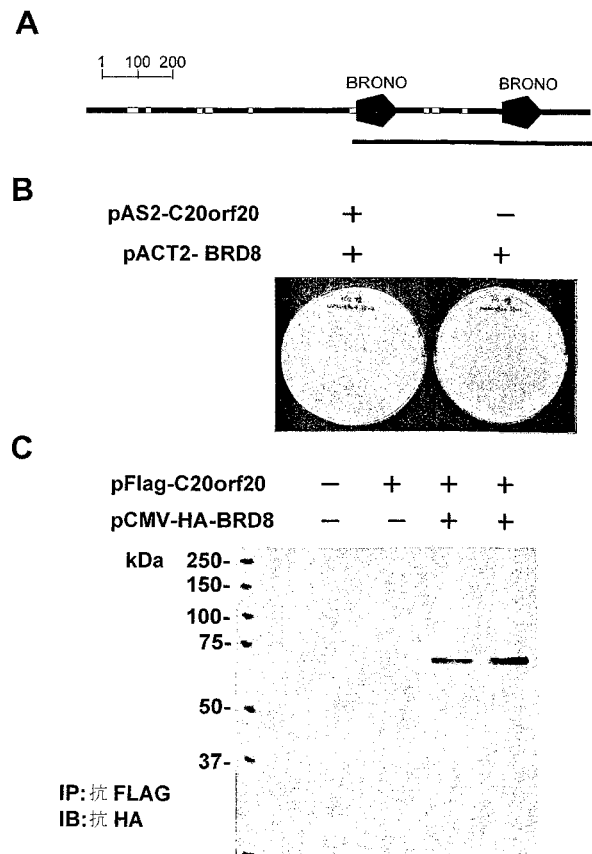
【 図 1 8 】



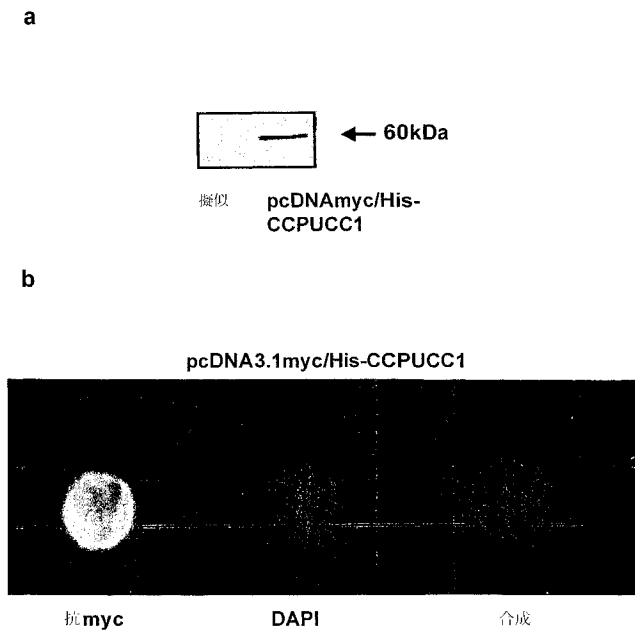
【 図 1 9 】



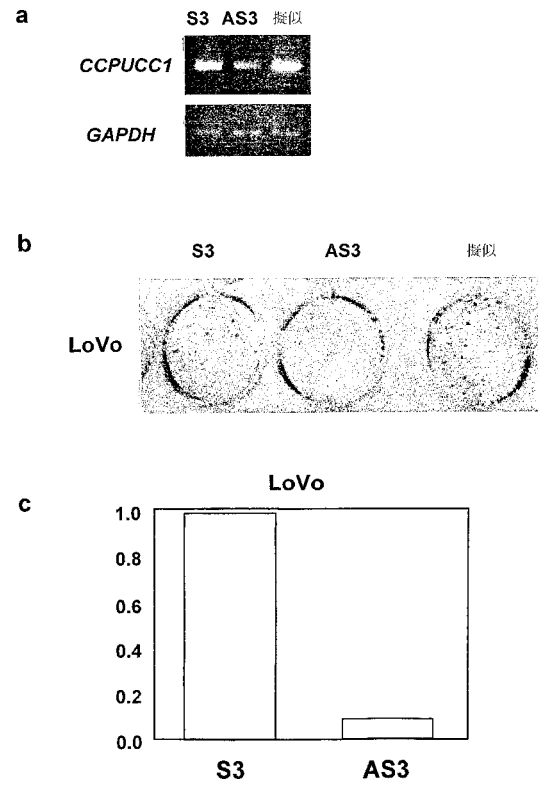
【 図 2 0 】



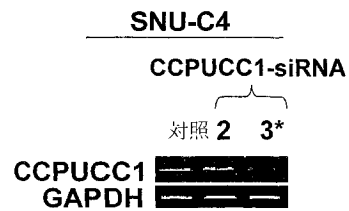
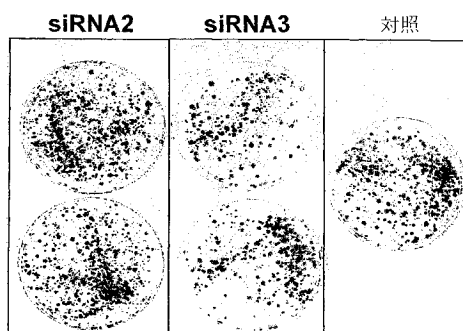
【 图 2 1 】



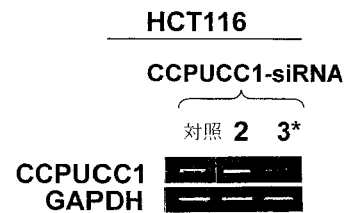
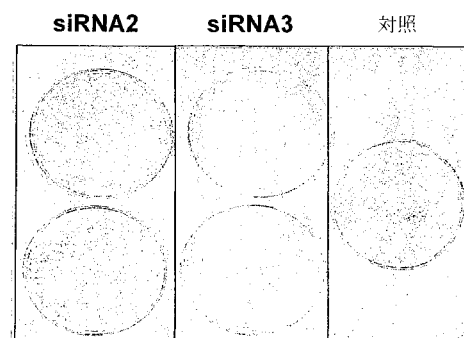
【 图 2 2 】



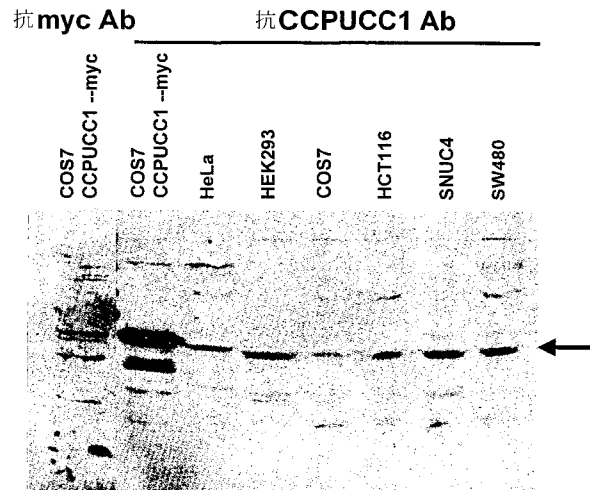
【 图 2 3 】

A**B**

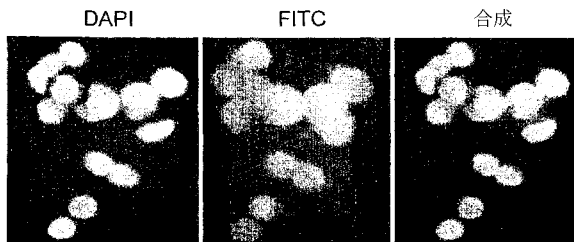
【 图 2 4 】

A**B**

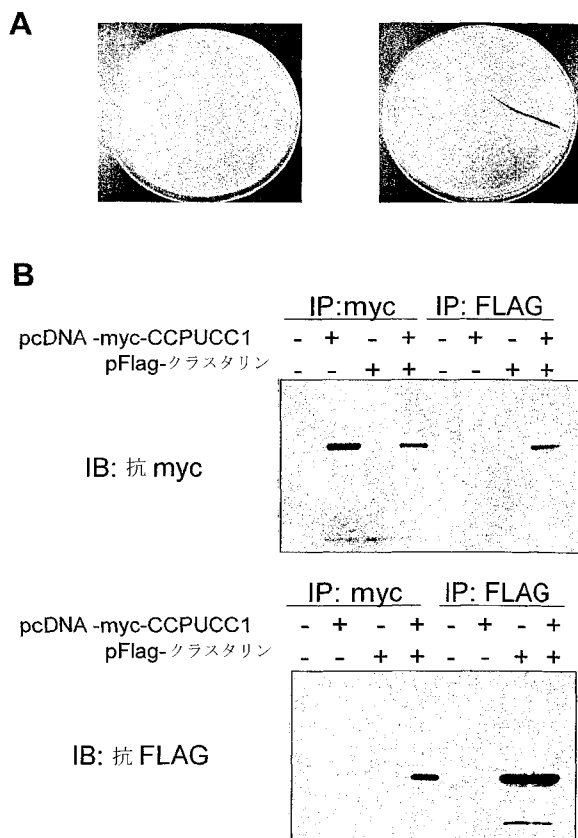
【図 2 5】



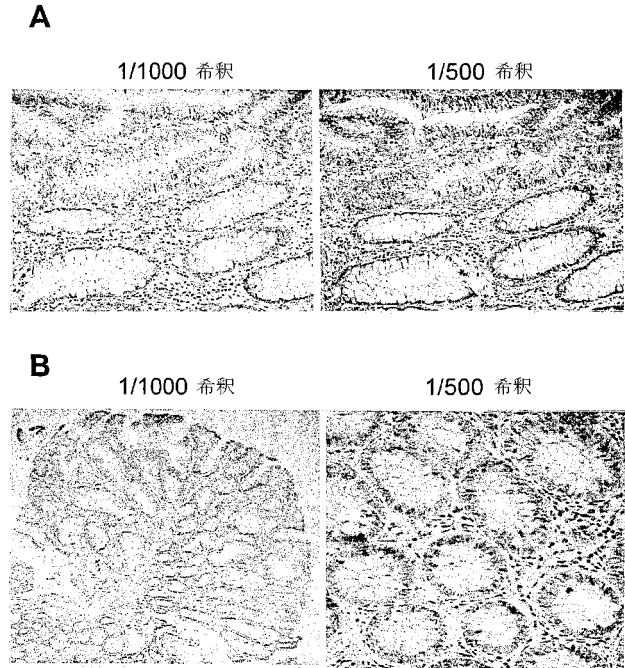
【図 2 6】



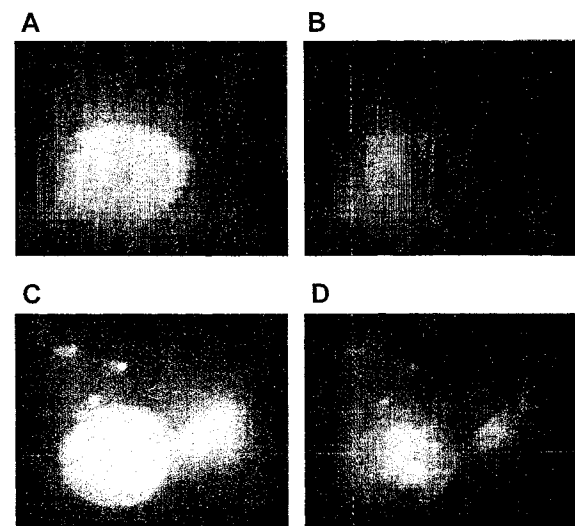
【図 2 8】



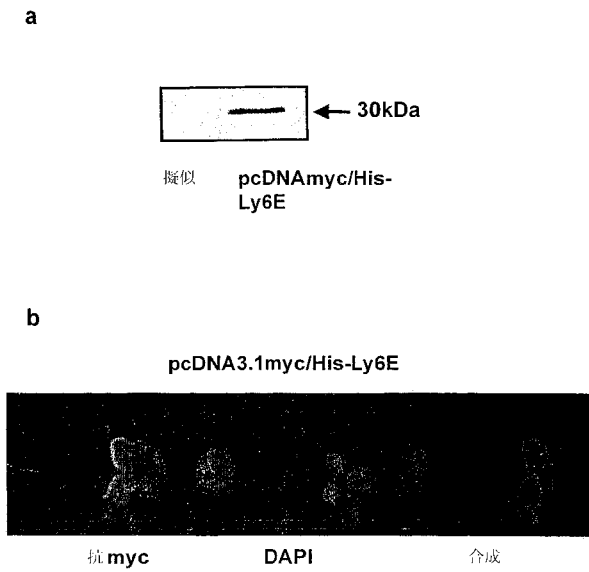
【図 2 7】



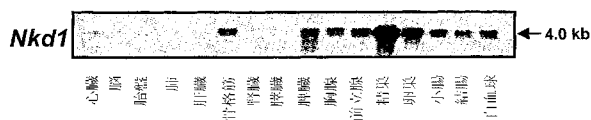
【図 2 9】



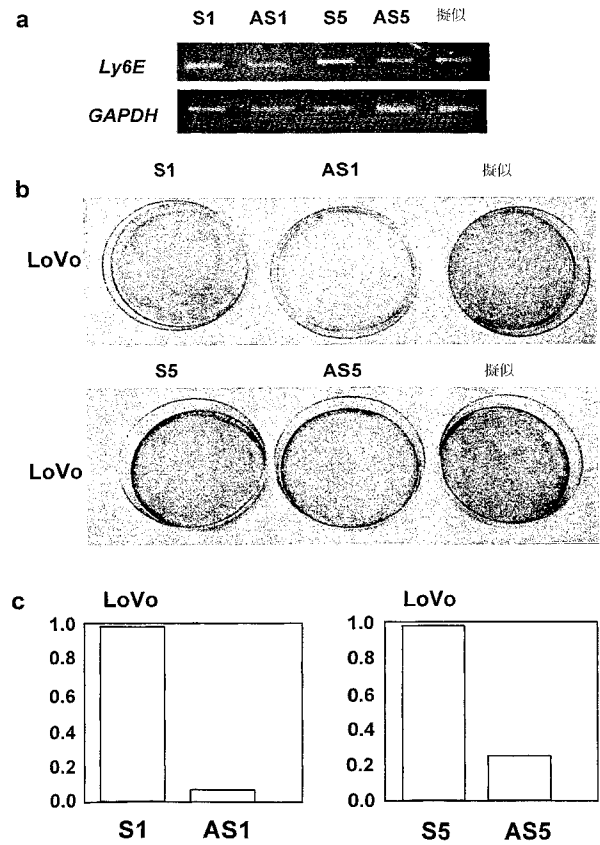
【 図 3 0 】



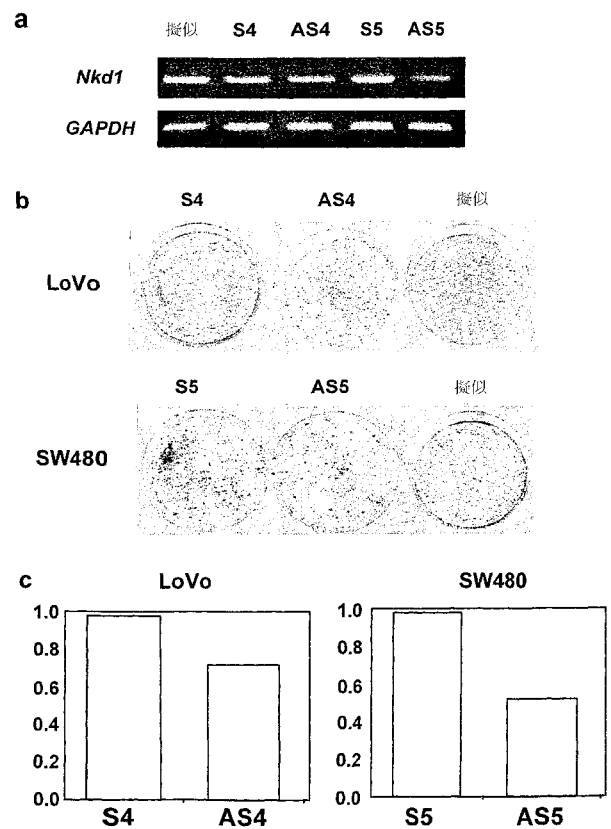
【 図 3 2 】



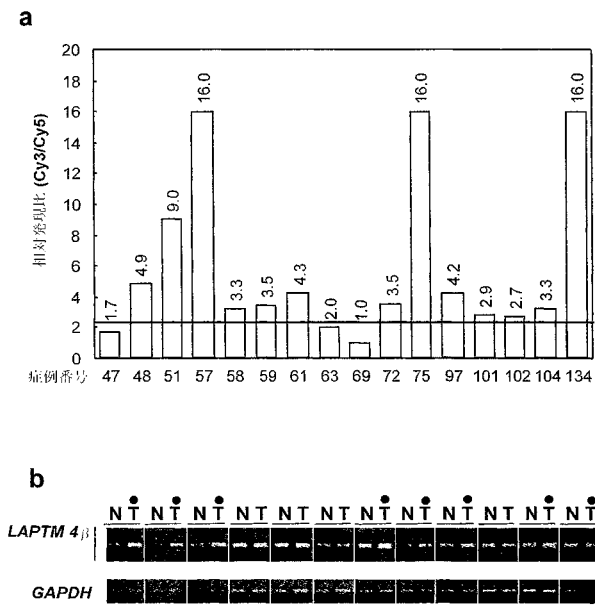
【 図 3 1 】



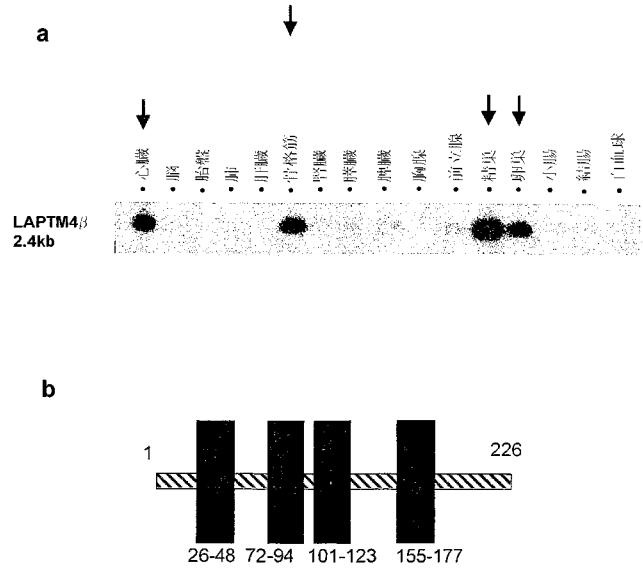
【 図 3 3 】



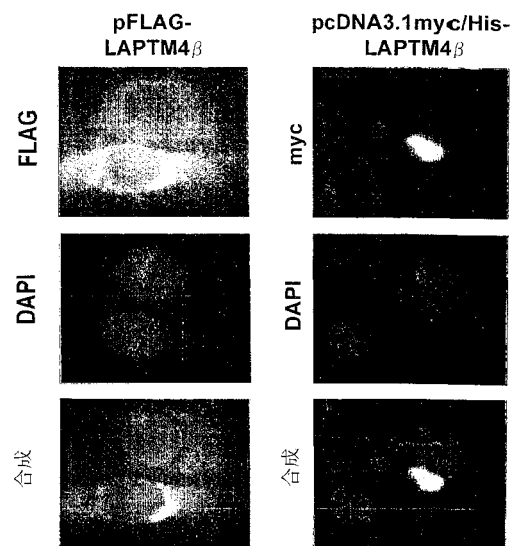
【 図 3 4 】



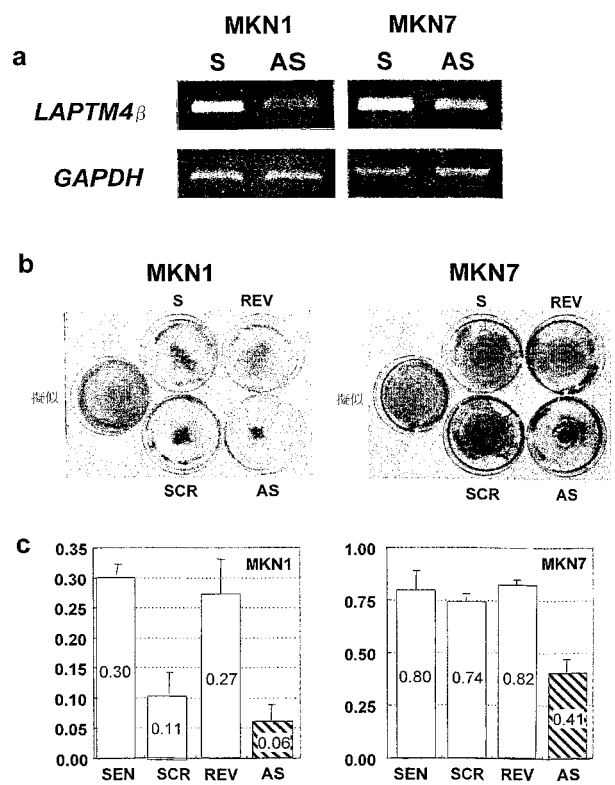
【 図 3 5 】



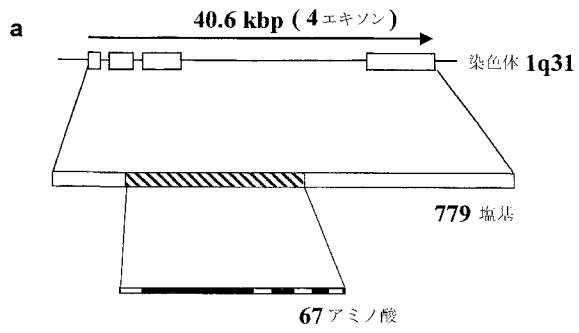
【 図 3 6 】



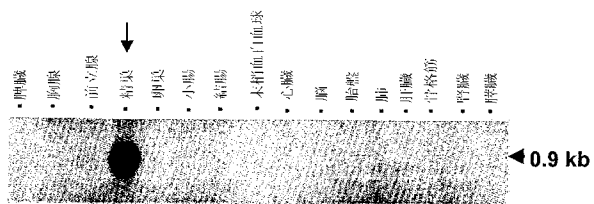
【 図 3 7 】



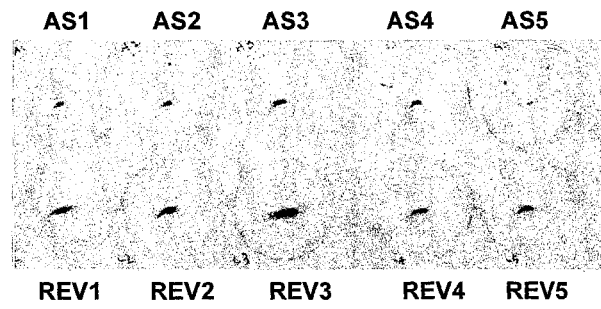
【図 38】



b



【図 39】



【配列表】

[2005537007000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP 03/10436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/574 C12Q1/68 C07K14/00 C07K16/30 C12N15/11
A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, Sequence Search, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIN Y.-M. ET AL.: "Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas." ONCOGENE, vol. 21, 13 June 2002 (2002-06-13), pages 4120-4128, XP002270817 cited in the application the whole document ----- -/--	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2004

Date of mailing of the international search report

17. 02. 04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giry, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP 03/10436

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KITAHARA O. ET AL.: "Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia." CANCER RES., vol. 61, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 3544-3549, XP002270818 cited in the application the whole document	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49
X	ZEMBUTSU H. ET AL.: "Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs." CANCER RES., vol. 62, 15 January 2002 (2002-01-15), pages 518-527, XP002270819 the whole document	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49
X	IIZAKA M. ET AL.: "Expression profile analysis of colon cancer cells in response to sulindac or aspirin." BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM., vol. 292, 29 March 2002 (2002-03-29), pages 498-512, XP002270820 the whole document	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49
X	US 2002/086296 A1 (MEYERS R.A.) 4 July 2002 (2002-07-04) paragraph '0007! - paragraph '0066! paragraph '0076! - paragraph '0078! paragraph '0090! - paragraph '0093! claims 1-36; figure 4; example 2	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49
Y	WO 02/18565 A (BAYER AG) 7 March 2002 (2002-03-07) the whole document	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49
Y	WO 02/42777 A (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH) 30 May 2002 (2002-05-30) the whole document	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 03/10436

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 02/097074 A (BAYER AG) 5 December 2002 (2002-12-05) the whole document	1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP 03/10436

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26, 39-40, 42-43
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 39-40 and 42-43, due to the step of "administering a pharmaceutically effective amount of ..." are directed to a method of treatment of the human/animal body by therapy, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 19, 44-46, 50
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-8, 17-25, 27-31, 36-40, 47-49 (all in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ JP 03/10436

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 39-40 and 42-43, due to the step of "administering a pharmaceutically effective amount of ..." are directed to a method of treatment of the human/animal body by therapy, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 26, 39-40, 42-43

Claim 26 : Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information

Claims 39-40, 42-43 : Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19, 44-46, 50

Present claim 19 which relates to "a plurality of colon cancer-associated genes", concerns an extremely large number of possible methods. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Therefore, the subject-matter of claim 19 has not been searched.

Present claims 44-45 which do not contain any technical feature to characterize a "method for inducing an anti tumor immunity" so lack clarity (Art. 6 PCT) and support in the description (Art. 5 PCT) that no meaningful search can be carried out (Art. 6 PCT).

Present claims 46 and 50 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "obtained/selected by the method according to any one of claims 27-35".

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such products/compounds/methods/apparatus. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, no search has been carried out

International Application No. PCT/ JP 03/10436

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

for these claims because no such compounds are mentioned in the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 03/10436

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002086296 A1	04-07-2002	US 2003180930 A1 AU 4546301 A WO 0166765 A2	25-09-2003 17-09-2001 13-09-2001
WO 0218565 A	07-03-2002	AU 9378001 A WO 0218565 A2	13-03-2002 07-03-2002
WO 0242777 A	30-05-2002	DE 10058596 A1 AU 2487502 A WO 0242777 A2 EP 1405079 A2 US 2002136717 A1	06-06-2002 03-06-2002 30-05-2002 07-04-2004 26-09-2002
WO 02097074 A	05-12-2002	WO 02097074 A2	05-12-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395	E 4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 古川 洋一

神奈川県川崎市宮前区宮崎 3 丁目 1 0 番 4 0

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB24 CB02 DA13 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA12 BA36 CA02 CA05 DA03 HA14
 4B029 AA07 FA12
 4B063 QA06 QA13 QA18 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48
 QR55 QR62 QR77 QS25 QS34
 4B064 AG31 CA19 CC24 DA05 DA14
 4B065 AA93X AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA35 MA13
 MA16 MA22 MA23 MA28 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52
 MA55 MA57 MA59 MA60 MA63 MA65 MA66 NA14 ZA662 ZB262
 4C085 AA03 AA13 AA14 AA16 BB01 BB11 BB23 BB31 BB41 BB43
 BB44 CC22 CC23 GG01 GG08 GG10
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA07 NA14 ZA66 ZB26
 4C087 AA01 AA02 BB65 CA04 CA12 NA14 ZA66 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA75 DA86 EA28 EA51

FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005537007A5	公开(公告)日	2008-11-20
申请号	JP2004532691	申请日	2003-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司 东京大学		
[标]发明人	中村祐輔 古川洋一		
发明人	中村 祐輔 古川 洋一		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/4748 C12N15/113 C12N2310/11 C12N2310/315 C12Q1/6886 C12Q1/6897 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/57419 G01N33/57446 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K31/7105 A61K35/12 A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/DA03 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA662 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA07 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA66 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/407338 2002-08-30 US		
其他公开文献	JP2005537007A		
摘要(译)			

本文描述了用于检测和诊断结肠直肠癌和胃癌的客观方法。 在一个实施方案中，该诊断方法涉及确定区别结肠或胃癌与正常细胞的结肠或胃癌相关基因的表达水平。 本发明进一步提供了筛选可用于治疗结肠癌的治疗剂的方法，以及为受试者接种结肠癌或胃癌疫苗的方法。