

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4473870号  
(P4473870)

(45) 発行日 平成22年6月2日(2010.6.2)

(24) 登録日 平成22年3月12日(2010.3.12)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C07K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K 19/00
<b>C07K</b>	<b>14/47</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K 14/47
<b>C12N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C12N 15/00 Z N A A
<b>C12Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C12Q 1/68 A
<b>G01N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G01N 33/53 D

請求項の数 15 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-519069 (P2006-519069)	(73) 特許権者	503073916
(86) (22) 出願日	平成16年2月26日(2004.2.26)		稲澤 譲治
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/002294		東京都練馬区東大泉5丁目4番地1-9
(87) 国際公開番号	W02005/082933		04号
(87) 国際公開日	平成17年9月9日(2005.9.9)	(73) 特許権者	591083336
審査請求日	平成19年2月5日(2007.2.5)		株式会社ビー・エム・エル
特許法第30条第1項適用	平成15年10月22日長崎ブリックホールにおいて開催された日本人類遺伝学会第48回大会で発表	(74) 代理人	100103160
特許法第30条第1項適用	平成15年9月27日名古屋国際会議場において開催された第62回日本癌学会学術総会で発表		弁理士 志村 光春
		(72) 発明者	稲澤 譲治
			東京都練馬区東大泉5-43-1-904
		(72) 発明者	井本 逸勢
			東京都文京区本郷2-17-5-1202
		(72) 発明者	柚木 泰広
			東京都江東区南砂5-8-2-806
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規キメラ蛋白質およびそれをコードする遺伝子、並びに、これらの遺伝子と蛋白質を用いた白血病の判別手段

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号5または6に示すアミノ酸配列からなる、MEF2D蛋白質の一部とDAZAP1蛋白質の一部が結合してなるキメラ蛋白質。

## 【請求項2】

請求の範囲第1項記載のキメラ蛋白質をコードする遺伝子。

## 【請求項3】

配列番号5に示すアミノ酸配列のキメラ蛋白質をコードする遺伝子が配列番号3に示す塩基配列の遺伝子である、請求の範囲第2項記載の遺伝子。

## 【請求項4】

配列番号6に示すアミノ酸配列のキメラ蛋白質をコードする遺伝子が配列番号4に示す塩基配列の遺伝子である、請求の範囲第2項記載の遺伝子。

## 【請求項5】

検体中の請求の範囲第1項に記載のキメラ蛋白質を検出することにより、当該検体提供者の前駆B細胞急性リンパ性白血病を判別する、キメラ蛋白質の検出方法。

## 【請求項6】

キメラ蛋白質の検出方法において、検体中の上記キメラ蛋白質を、エンザイムイムノアッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、ウエスタンブロット法、免疫沈降/イムノブロット法、または、免疫細胞化学染色法を用いて検出する、請求の範囲第5項記載のキメラ蛋白質の検出方法。

## 【請求項 7】

検体中の請求の範囲第 1 項に記載のキメラ蛋白質の検出を、MEF2D蛋白質の一部に対して特異的な抗体とDAZAP1蛋白質の一部に対して特異的な抗体のセット、を用いて行う、請求項第 5 項又は第 6 項に記載のキメラ蛋白質の検出方法。

## 【請求項 8】

検体中の請求の範囲第 2 項に記載のキメラ蛋白質をコードする遺伝子を検出することにより、当該検体提供者の前駆B細胞急性リンパ性白血病を判別する、遺伝子の検出方法。

## 【請求項 9】

前記遺伝子が、ゲノムDNA、cDNA、または、mRNAである、請求の範囲第 8 項に記載の遺伝子の検出方法。

10

## 【請求項 10】

キメラ蛋白質をコードする遺伝子の検出方法において、検体中の当該遺伝子を、DNAチップ法、サザンプロット法、ノーザンプロット法、リアルタイムRT-PCR法、インベーター法、FISH法、または、CGH法を用いて検出する、請求の範囲第 8 項に記載の遺伝子の検出方法。

## 【請求項 11】

検体が血液検体である、請求の範囲第 5 項から第 10 項のいずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 12】

a) MEF2ファミリー蛋白質と請求の範囲第 1 項に記載のキメラ蛋白質を共存させて、当該両蛋白質の結合量を定量し、b) 前記 a) の定量系において、MEF2ファミリー蛋白質と前記キメラ蛋白質が接触する際または事前に被験物質を共存させた場合の当該両蛋白質の結合量を定量し、c) 前記 a) におけるMEF2ファミリー蛋白質と前記キメラ蛋白質の結合量よりも、前記 b) における当該結合量が減少している場合に、前記被験物質を抗白血病物質としてスクリーニングする、被験物質のスクリーニング方法。

20

## 【請求項 13】

MEF2ファミリー蛋白質が、MEF2D蛋白質またはHDAC 4 蛋白質である、請求の範囲第 1 2 項に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 14】

MEF2ファミリー蛋白質と前記キメラ蛋白質を細胞内で共存させ、被験物質を細胞外に添加する、請求の範囲第 1 1 項または第 1 3 項に記載のスクリーニング方法。

30

## 【請求項 15】

MEF2ファミリー蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだベクター、および、請求の範囲第 2 項に記載のキメラ蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだベクターを含む、請求の範囲第 1 4 項のスクリーニングに用いるためのスクリーニング用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

本発明は、前駆B細胞急性リンパ性白血病 (Acute Lymphoid Leukemia: ALLともいう) の詳細な判別を可能とする新規のキメラ蛋白質と当該キメラ蛋白質をコードする遺伝子、さらには、当該キメラ蛋白質や遺伝子を用いるALLの判別を可能とする検出方法に関する発明である。

40

## 【背景技術】

急性白血病は急性骨髄性白血病 (AML: Acute Myeloid Leukemia)、急性混合白血病、及び急性リンパ性白血病 (ALL: Acute Lymphoid Leukemia) に分類される。ALLは前駆性 (あるいはリンパ芽球性) 悪性腫瘍である。前駆B細胞性ALLでは染色体転座に伴う遺伝子異常がその原因であり、これまで t(1; 22); BCL/ABL、t(v; 11q23); MLL、t(1; 19); E2A/PBX1、並びに t(12; 21); TEL/AML1 等の転座が知られている。

最も一般的な小児白血病は、前駆B細胞の遺伝子異常に起因するALLであり、それは化学療法の予後が比較的良好である (Greaves, M. F. & Wiemeis, J

50

. : Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia, Nat. Rev. Cancer, 3, 639 - 649, 2003). ALLの主なサブタイプは、1塩基変異及び欠失による遺伝子異常がその原因であるが、遺伝子のHyperdiploidy及び染色体転座に伴う染色体全体の変化に起因するケースも多い。染色体転座は異なったクロモソーム上の遺伝子が近い位置に存在するようになり、しばしば両者のキメラ(或いは融合)遺伝子が再構成され、その結果、従来とは異なる転写制御下で融合mRNAが発現し、異なった役割を有するハイブリッド蛋白質へと翻訳される。約200以上の遺伝子が小児白血病の転座に関与していることが知られているが、その中である種の遺伝子は癌化に強く関与しているが、他の多くの遺伝子はまれにしか癌化に関与していない。

10

小児前駆B細胞ALLの最も一般的な共通した転座はt(1;19)(q23;p13)であり、通常クロモソーム1q23上のPBX1遺伝子とクロモソーム19p13.3上のE2A遺伝子間の融合が起こる。野生型E2A遺伝子産物はB細胞の成熟に必須である。キメラ遺伝子E2A-PBX1はE2Aの転写活性化モチーフとPBX1のDNA結合ホメオドメインの融合蛋白質をコードしている。ALLの95%以上のケースで同じE2A-PBX1融合遺伝子が検出されているが、まれな例ではあるが、該融合遺伝子が検出されない場合がある(Hunger, S. P., Galili, N., Carroll, A. J., Crist, W. M., Link, M. P. & Cleary, M. L: The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias, Blood, 77, 687 - 693, 1991; Izraeli, S., Janssen, J. W. G., Haas, O. A., Harbott, J., Brok-Simoni, F., Walther, J. U., Kovar, H., Henn, T., Ludwig, W. D., Reiter, A., Rechavi, G., Bartram, C. R., Gardner, H. & Lion, T.: Detection and clinical relevance of genetic abnormalities in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between cytogenetic and polymerase chain reaction analyses. Leukemia, 7, 671 - 678, 1993)。実際、初期の前駆B細胞ALL、CD-34陽性B細胞前駆ALL、通常のALL、T-ALL、B細胞リンパ腫/白血病、急性骨髄性白血病(AML)で転座にE2A遺伝子が関与していない例が報告されており、この事実はこれらの患者ではクロモソームt(1;19)転座がE1A遺伝子とPBX1遺伝子の再配列に起因しないことを示している。

20

30

#### 【発明の開示】

このように、ひとことでALLといっても、遺伝子レベルでは様々なタイプのものがあり得ることが判明しつつある。それにもかかわらず、一般的にALLに対して奏効率のよい治療法を画一的に行うのみでは、タイプの異なるALLの患者に対して奏効率の低い治療を行うことを黙認してしまうことになり、妥当とはいえない。

40

よって、本発明が解決すべき課題は、このようなタイプの異なるALLにおける遺伝子的な本質を明らかにし、本格的な治療前にALLの遺伝子レベルにおけるタイプを判別し得る検出手段を提供し、一人でも多くのALL患者に対して、可能な限り適切な治療を施す機会を与えることにある。

本発明者は、この課題に応えるために、小児ALLの患者の末梢血から、常法を用いて樹立された前駆B細胞急性白血病細胞株(ただし、クロモソームt(1;19)転座を有するが、E2A-PBX1融合遺伝子を生成しない: TS-2細胞)についての遺伝子レベルでの検討を行い、この細胞株において転座が起こっている場所を正確に突き止めた。すなわち、本発明者は、TS-2細胞では、クロモソーム1q22のMEF2D遺伝子と、クロモソーム19p13.3のDAZAP1遺伝子の融合が起こっていることを解明した

50

。さらに、このキメラ遺伝子のmRNAは、TS-2細胞と同様に、本細胞を分離した小児ALL患者の骨髄細胞においても検出された。

よって、本発明者は、本キメラ遺伝子、または、これに基づいて産生されるキメラ蛋白質を指標にして、ALLの原因の詳細を分子レベルで判別することが可能であることを明らかにし、この知見を基とする本発明を完成した。

すなわち、本発明は、MEF2D蛋白質の一部とDAZAP1蛋白質の一部が結合してなる、新規のキメラ蛋白質（以下、本キメラ蛋白質ともいう）を提供し、当該キメラ蛋白質をコードする新規のキメラ遺伝子（以下、本キメラ遺伝子ともいう）を提供する発明である。

さらに、本発明は、検体中の本キメラ遺伝子、または、本キメラ蛋白質を検出することにより、当該検体提供者の前駆B細胞急性リンパ性白血病を判別する、キメラ遺伝子及びキメラ蛋白質の検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。

#### 1. 本キメラ遺伝子とキメラ蛋白質

上述したように、本キメラ遺伝子は、MEF2D遺伝子の一部とDAZAP1遺伝子の一部が融合してなるキメラ遺伝子である。MEF2D遺伝子とDAZAP1遺伝子は、それぞれ公知のヒト遺伝子であり、その塩基配列等も登録されている（MEF2D遺伝子：NM\_005920（配列番号1）、DAZAP1遺伝子：NM\_170711（配列番号2））。しかしながら、これらの遺伝子の融合遺伝子である、本キメラ遺伝子は、当該遺伝子を基に合成される本キメラ蛋白質の機能を含めて知られていない。

後述するように、本キメラ蛋白質は、細胞核に局在し、MEF2ファミリーの蛋白質（HDAC4蛋白質等）とヘテロ2量体を形成することが判明した。本キメラ蛋白質はMEF2D蛋白質よりも強くHDAC4蛋白質に結合する。本キメラ蛋白質はこの作用を介して標的とする遺伝子の転写活性化を促進させ、癌化を誘導していると推定される。

本キメラ遺伝子の具体的な配列は、1）配列番号3に示す塩基配列の本キメラ遺伝子（MEF2D-DAZAP1融合遺伝子）と、これに対応する本キメラ蛋白質（配列番号5に示すアミノ酸配列）、並びに、2）配列番号4に示す塩基配列の本キメラ遺伝子（DAZAP1-MEF2D融合遺伝子）と、これに対応する本キメラ蛋白質（配列番号6に示すアミノ酸配列）を挙げることが可能である。

本キメラ蛋白質は、対象となるALL患者の癌化細胞から単離精製して得ることも可能であるが、大量に必要な場合には、組換え体として得ることが極めて好適である。

かかる組換え本キメラ蛋白質を製造する基となる、本キメラ遺伝子は、上述のように、本発明により見いだされたキメラ遺伝子の塩基配列を用いて、常法により、例えば、PCR（Polymerase chain reaction）法等の遺伝子増幅法を、対象となるALL患者の癌化細胞のmRNAを抽出して、これをRT（Reverse Transcriptase）-PCR法を用いて、所望する本キメラ遺伝子をcDNAとして得ることができる。

なお、対象となるALL患者の白血病細胞は、常法を用いて容易に入手することができる。具体的には、例えば骨髄及び末梢血等より得ることができる。常法の表現型解析により、FAB分類を用いて前駆B細胞急性リンパ性白血病細胞を同定する事ができる。B細胞系譜かどうかは表面マーカーのCD19の発現をモニタリングすることによりできる。詳細はYoshinari, M., Imaizumi, M., Eguchi, M., Ogasawara, M., Saito, T., Suzuki, H., Koizumi, Y., Cui, Y., Sato, ., Saisho, T., Ichinohasama, R., Matsubara, Y., Kamada, N. & Iinuma, K.: Establishment of a novel cell line (TS-2) of pre-B acute lymphoblastic leukemia with a t(1;19) not involving the E2A gene., Cancer Genet. Cytogenet., 101, 95-102, 1998に掲載されている。

さらに、ホスファイト-トリエステル法（Ikehara, M., et al., Pr

10

20

30

40

50

oc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5956 (1984))等の通常公知の方法を用いて、本キメラ遺伝子を化学合成することも可能であり、これらの化学合成法を応用したDNAシンセサイザーを用いて、本キメラ遺伝子を合成することもできる。この場合には、本キメラ遺伝子の1部分を有する複数のDNAを合成し、それらをライゲーションにより繋ぎ合わせて、適当なベクターに挿入し、大腸菌をトランスフォームする事により本キメラ遺伝子を得る事ができる。

上述のようにして入手され得る本キメラ遺伝子を用いて、組換え本キメラ蛋白質を、一般的な遺伝子組換え技術に従って製造することができる。

より具体的には、本キメラ遺伝子が、発現可能な形態の遺伝子発現用ベクターに、本キメラ遺伝子を組み込み、この遺伝子発現用ベクターの性質に対応する宿主に、この組換えベクターを導入して、形質転換し、かかる形質転換体を培養等することにより、所望する本キメラ蛋白質を製造することができる。

10

ここで用いる遺伝子発現用ベクターは、通常、発現しようとする遺伝子上流域に、プロモーター、エンハンサー等を、同下流域に転写終了配列等を保有するのが好適である。

また、本キメラ遺伝子の発現は、直接発現系に限らず、例えば、ヘキサヒスチジン遺伝子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子、マルトース結合蛋白質遺伝子や、チオレドキシン遺伝子を利用した融合タンパク質発現系とすることも可能である。

遺伝子発現用ベクターとしては、例えば、宿主を大腸菌とするべきものとして、pQE, pGEX, pT7-7, pMAL, pTrxFus, pET, pNT26CII等を例示することができる。また、宿主を枯草菌とするべきものとしては、pPL608, pNC3, pSM23, pKH80等を例示することができる。

20

また、宿主を酵母とするべきものとしては、pGT5, pDB248X, pART1, pREP1, YEp13, YRp7, YCp50等を例示することができる。

また、宿主を哺乳動物細胞又は昆虫細胞とするべきものとしては、p91023, pCDM8, pcDL-SR 296, pBCMGsNeo, pSV2dhfr, pSVdhfr, pAc373, pACYM1, pRc/CMV, pREP4, pcDNA1, pVL1392/1393, pAcHLT-A/B/C等を例示することができる。

なお、これらの既存の遺伝子発現用ベクターの他、目的に応じて適宜作出した遺伝子発現用ベクターを用いることも、勿論可能である。

本キメラ遺伝子を組み込んだ遺伝子発現用ベクターの宿主細胞への導入及びこのベクターによる宿主の形質転換法としては、一般的な方法、例えば、宿主細胞が大腸菌や枯草菌である場合には、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を；宿主細胞が哺乳動物細胞又は昆虫細胞である場合は、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法若しくはリポソーム法等を選択することができる。

30

このようにして得られる形質転換体を、常法に従い培養することにより、本キメラ蛋白質が培養系に蓄積される。

かかる培養において用いられる培地は、選択した宿主の種類に応じて適宜選択することが可能である。例えば、宿主が大腸菌である場合には、LB培地やTB培地等が、宿主が哺乳動物細胞の場合には、RPMI1640培地等が適宜選択され得る。

上述のような形質転換体の培養によって得られる、培養物からの本キメラ蛋白質の単離及び精製は、常法に従って行うことが可能であり、例えば、培養物を、本キメラ蛋白質の物理的性質及び/又は化学的性質を利用した、各種の処理操作を用いて行うことができる。

40

具体的には、例えば、タンパク質沈澱剤による処理、限外濾過、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー、遠心分離、電気泳動、特異抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー、透析法等を、単独又は組み合わせて、本キメラ蛋白質の単離及び精製を行うことができる。

以上のようにして、本キメラ遺伝子と本キメラ蛋白質を得ることができる。本キメラ遺伝子は、本キメラ蛋白質を製造する基となる。また、本キメラ蛋白質は、本検出方法を行うために用いる抗体の免疫原として用いることも可能である。さらに、本キメラ遺伝子と

50

キメラ蛋白質は、後述する、ALLに対する治療剤を開発するためのスクリーニング方法に用いることも可能である。

## 2. 本キメラ蛋白質に対する抗体

本検出方法の態様によっては、本キメラ蛋白質に対する抗体を用いることが必要となる。

検出対象となる本キメラ蛋白質は、上述したように、MEF2D蛋白質の一部と、DAZAP1蛋白質の一部の融合蛋白質であり、本検出方法に用いることが可能な抗体としては、1)本キメラ蛋白質を構成する、MEF2D蛋白質の一部およびDAZAP1蛋白質の一部に対して特異的な抗体、または、2)MEF2D蛋白質の一部のみに対して特異的な抗体と、DAZAP1の一部のみに対して特異的な抗体のセットが挙げられる。

10

これらの抗体は、本キメラ蛋白質を免疫原として製造した抗体から、所望する性質の抗体を選別することにより得ることができ、予め、免疫原を特定の形態に限定して抗体を製造することが効率的である。

すなわち、MEF2D蛋白質の一部のみに対して特異的な抗体と、DAZAP1蛋白質の一部のみに対して特異的な抗体の免疫原は、それぞれ、当該キメラ蛋白質(MEF2D-DAZAP1蛋白質とDAZAP1-MEF2D蛋白質)を用いることが好適である。

これに対して、本キメラ蛋白質を構成する、MEF2D蛋白質の一部およびDAZAP1蛋白質の一部に対して特異的な抗体は、少なくとも免疫原として、本キメラ蛋白質を構成するMEF2D蛋白質の一部およびDAZAP1蛋白質の一部の結合部(例えば、配列番号5の本キメラ蛋白質に対する抗体であれば222番目のグリシン、配列番号6の本キメラ蛋白質に対する抗体であれば155番目のグリシン)を含むオリゴペプチドであることが好適である。当該オリゴペプチドの鎖長は、概ね、20~50アミノ酸程度であることが好適である。

20

本キメラ蛋白質に対する抗体がポリクローナル抗体である場合は、上記の免疫原(必要に応じて傘貝ヘモシアニン等のハプテンに結合させたものを含む)で免疫した動物に由来する免疫血清から製造することができる。

また、免疫動物と同種・同系統の動物由来の細胞株を、本キメラ遺伝子、または、その一部をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入して形質転換して、この形質転換細胞をその免疫動物に移植することにより、目的とするポリクローナル抗体を調製することができる。すなわち、形質転換細胞を移植した動物の体内で、持続的に本キメラ蛋白質がその形質転換細胞で作られ、それに対する抗体が産生されて、これを目的とするポリクローナル抗体とすることもできる(Nemoto, T., et al., Eur. J. Immunol., 25, 3001(1995))。

30

さらに、本キメラ遺伝子を発現する発現ベクターを直接動物に筋注や皮下注等の手段で投与することにより、その動物内で本キメラ蛋白質を継続的に産生させて、上記の形質転換細胞を移植した場合と同様に目的とするポリクローナル抗体を製造することができる(Raz, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9519(1994))。

一方、本キメラ蛋白質に対するモノクローナル抗体は、上記のポリクローナル抗体の場合と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これにより本キメラ蛋白質を認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

40

本キメラ蛋白質に対する抗体を製造するために免疫される動物は、特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。

より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2~14日毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のた

50

めの免疫血清又はモノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髓腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/0-Ag14, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-45, 6.TG1.7(以上、マウス由来); 210.RCY.Ag1.2.3(ラット由来); SKO-007, GM15006TG-A12(以上、ヒト由来)等を用いることができる。

上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495(1975))等に準じて行うことができる。

10

より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール(PEG), センダイウイルス(HVJ)等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT(ヒポキサンチン, アミノプテリン及びチミジン)培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単クローン化に供することができる。

20

目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法, プラーク法, スポット法, 凝集反応法, オクタロニー法, RIA法等の一般的な検索法に従い行うことができる。

このようにして得られる本キメラ蛋白質を認識する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる。

このハイブリドーマからの目的とするモノクローナル抗体の採取は、このハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

30

なお、インビトロで免疫細胞を本キメラ蛋白質又はその一部の存在下で培養し、一定期間後に上記細胞融合手段を用いて、この免疫細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを調製し、抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることで所望するモノクローナル抗体を得ることもできる(Reading, C.L., J. Immunol. Meth., 53, 261(1982); Pardue, R.L., et al., J. Cell Biol. 96, 1149(1983))。

また、上記で得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、更に塩析, ゲル濾過法, アフィニティークロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、本キメラ蛋白質に特異反応性を有する抗体である。

40

このようにして得られる抗体を、上記したような、具体的に用いる検出手段における必要に応じて標識物質で標識して用いることができる。

かかる標識物質は、その標識物質単独で又はその標識物質と他の物質とを反応させることにより、検出可能なシグナルをもたらす標識物質であり、具体的には、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ, アルカリホスファターゼ, -D-ガラクトシダーゼ, グルコースオキシダーゼ, グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ, アルコール脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素, ペニシリナーゼ, カタラーゼ, アポグルコースオキシダーゼ, ウレアーゼ, ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート, フィコピリタンパク, 希土類金属キレート, ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、<sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C

50

、<sup>3</sup>H等の放射性同位体、ビオチン、アビジン若しくはジゴケシゲニン等の化学物質、又は化学発光物質等を挙げることができる。

これらの標識物質による抗体の標識方法は、選択すべき標識物質の種類に応じて、既に公知となっている標識方法を適宜用いることができる。

また、本キメラ蛋白質に対するモノクローナル抗体（標識されたものを含む）を、不溶性担体に固定化した、固定化モノクローナル抗体として、本検出方法に用いることもできる。

かかる不溶性担体としては、抗体の不溶性担体として既に用いられている各種の不溶性担体を用いることができる。具体的には、例えば、マイクロプレートに代表されるプレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター、メンブレン、あるいはセルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体、あるいは多孔性シリカ系担体等のアフィニティークロマトグラフィーにおいて用いられる不溶性担体等が挙げられる。

これらの不溶性担体におけるモノクローナル抗体の固定化方法は、各種の不溶性担体において既に確立している抗体の固定化方法を、選択すべき不溶性担体の種類に応じて、適宜選択することができる。

このようにして、本検出方法に用い得る、本キメラ蛋白質に対するモノクローナル抗体を調製することができる。

### 3. 本検出方法

上述したように、本検出方法は、検体中の本キメラ遺伝子、または、本キメラ蛋白質を検出することにより、当該検体提供者の前駆B細胞ALLを判別する、キメラ蛋白質の検出方法である。いずれの態様の検出方法においても、検体中に本キメラ蛋白質が検出された検体提供者は、他種類の染色体転座を伴う前駆B細胞ALLと比較して、症状、治療経過、予後が異なる可能性が高い。

#### 1) 検体

本検出方法の検出対象となる検体は、ALLを判別すべき白血病患者に由来する検体である。具体的には、血液検体、パuffyコート等を用いることができる。血液検体については、遠心分離処理等を施して調製した血球画分に公知の処理を施して、所望する血球画分検体を調製することができる。本検出方法では、白血球画分検体を用いることが好適である。

なお、この血球画分検体を得るための血液は、特に限定されず、動脈血であっても静脈血であってもよい。一般的には、その採取の容易性から、末梢血が用いられる。

#### 2) 本キメラ蛋白質を検出する態様

この態様は、主として上述した本キメラ蛋白質に対する抗体を用いて、検体中の本キメラ蛋白質を検出する態様である。具体的な検出手段としては、エンザイムイムノアッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、フローサイトメトリーによる解析、ウエスタンブロット法、免疫沈降/イムノブロット法、免疫細胞化学染色法等を例示することができる。

まず、エンザイムイムノアッセイ法は、酵素免疫定量法ともいい、標識イムノアッセイ法のうち酵素を標識物質として用いる検出方法である（放射性同位体を用いた検出方法がラジオイムノアッセイ法である）。エンザイムイムノアッセイ法には、いわゆるB/F分離を必要とする“heterogeneous enzyme immunoassay”と、このB/F分離を必要としない“homogeneous enzyme immunoassay”とに大別される。

本検出方法においては、これらのうち、一般的に測定感度が高いといわれる前者の“heterogeneous enzyme immunoassay”を選択することがより好ましく、イムノソルベントを用いる“enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”を選択することがさらに好ましい。

より具体的な検出態様として、いわゆるサンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイ法（以下、サンドイッチ法ともいう）を例示することができる。

かかるサンドイッチ法は、特に操作上の簡便性、経済上の利便性、とりわけ臨床検査としての汎用性を考慮すると、特に好ましい検出態様の一つである。

このサンドイッチ法を行うに際しては、本キメラ蛋白質に対する抗体が、96穴マイクロプレートに代表されるような、多数のウェルを有するマイクロプレートに固定化された、固定化モノクローナル抗体と、上述した西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素又はビオチンにより標識された、本キメラ蛋白質に対する抗体を用いることが好ましい。

サンドイッチ法は、少なくとも、下記(a)及び(b)の工程を含む、エンザイムイムノアッセイ法である。

(a) 不溶性担体に本キメラ蛋白質に対する抗体を固定化した、固定化抗体に、血液検体より調製した顆粒球ライセート等を反応させる工程。

10

この工程(a)においては、通常は、反応後、用いたマイクロプレートを洗浄し、未反応の検体は、固定化モノクローナル抗体から除去される。

(b) 固定化モノクローナル抗体と、試料中のMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質及びDAZAP1-MEF2D融合蛋白質との結合により形成される、抗原抗体複合体に、西洋ワサビペルオキシダーゼやビオチン等により標識された本キメラ蛋白質に対する抗体を反応させる工程。

この工程(b)においては、通常は、反応後、用いたマイクロプレートを洗浄し、未反応の標識された抗体は、固定化抗体から除去される。

また、この工程(b)においては、反応させた第2抗体における標識物質の種類に応じた、標識シグナルの発現手段を用いて、標識シグナルを顕在化させることが必要である。例えば、標識物質としてビオチンを用いた場合には、アビジン等を用いて標識シグナルを顕在化させることができる。また、例えば、標識物質として、西洋ワサビペルオキシダーゼを選択した場合には、その基質を必要に応じて発色物質と共に添加して、標識シグナルを顕在化することができる。

20

このようにして、顕在化させた発色シグナルを、その発色シグナルの種類に応じた、シグナルの特定手段を用いて検出することで、所望する検体中の本キメラ蛋白質の検出を行うことができる。

免疫細胞化学染色法を用いて、本キメラ蛋白質を検出できる。細胞塗抹遠心器サイトフューズ2(日本ルフト株式会社)を用いて塗抹標本を作製する。塗抹標本を本キメラ蛋白質に対する抗体を用いて、常法により塗抹標本中の本キメラ蛋白質を染色することができる。

30

### 3) 検体において発現しているmRNAの存在を検出する方法についての態様

この態様は、検体中の本キメラ蛋白質をコードする遺伝子を検出することにより、当該検体提供者の前駆B細胞ALLを判別する本検出方法の一態様である。具体的な検出手段としては、DNAチップ法、サザンプロット法、ノーザンプロット法、リアルタイムRT-PCR法、Nested PCR法、Inverse PCR法、Nested Inverse PCR法、インベーター法、FISH法、Comparative Genomic Hybridization(CGH)法等を例示できる。

代表的な態様は、検体における、本キメラ蛋白質のmRNAを鋳型とするcDNAを検出することにより、間接的に血球画分において存在するmRNAを検出して、本キメラ蛋白質の遺伝子が発現している程度を把握する検出方法である(以下、この態様の検出手段を、キメラmRNA検出方法ともいう。この態様の検出方法には、上記のリアルタイムRT-PCR法が含まれる)。

40

キメラmRNA検出方法は、典型的には、公知の方法(例えば、オリゴdTを用いる方法)に従い、検体の全RNAから、mRNAを選別する。そして、得られたmRNAから、既知の本キメラ遺伝子の塩基配列に対応するヌクレオチド鎖を、増幅用プライマーとして用いた耐熱性DNAポリメラーゼを用いる、mRNAを鋳型として遺伝子を増幅することが可能な遺伝子増幅法、例えば、RT-PCR法により、本キメラ蛋白質をコードするcDNAを増幅し、かかる遺伝子増幅操作による増幅産物の有無や多少を検出することにより、検体における本キメラ蛋白質のmRNAの存在を、好適にはリアルタイムに検出す

50

ることができる。

なお、上記のようにして増幅された本キメラ蛋白質をコードするcDNAを鋳型として、さらにPCR法等の耐熱性DNAポリメラーゼを用いる遺伝子増幅操作を施し、これによる遺伝子増幅産物の有無や多少を検出することにより、検体における本キメラ蛋白質のmRNAの存在を、一層正確に検出することができる(この2回目の遺伝子増幅操作において用いる遺伝子増幅用プライマーは、1回目の遺伝子増幅操作において用いられた遺伝子増幅用プライマーよりも、本キメラ遺伝子の内側に対応するヌクレオチド鎖を、遺伝子増幅用プライマーとして用いる必要がある)。

インベーター・アッセイ法〔Third Wave Technologies社(米国)〕は、鋳型ヌクレオチド鎖(検体から得たcDNA)に、下記1,2の特徴を有する、第1のヌクレオチド鎖(1: Invader Probe)をハイブリダイズさせた後に、第2のヌクレオチド鎖(2: Signal Probe)をハイブリダイズさせ、次いで、ヌクレオチド鎖の部分的三重鎖構造を、その3'側で、特異的に切断するヌクレアーゼ(Cleavase)を作用させて、このヌクレアーゼにより切断された、第2のヌクレオチド鎖の検出用部分を検出することにより、鋳型ヌクレオチド鎖における、本キメラ蛋白質を構成するMEF2D mRNAの一部およびDAZAP1 mRNAの一部から成る転座部位をコードするヌクレオチド鎖、を検出する方法に基づく反応を挙げることができる。

1. 第1のヌクレオチド鎖: 本キメラmRNAを構成するMEF2D蛋白質の一部およびDAZAP1蛋白質の一部から成る転座部位をコードするヌクレオチド鎖、に対する相補的なヌクレオチド鎖。

2. 第2のヌクレオチド鎖: 上記転座部位をコードするヌクレオチド鎖、に対して相補的な「相補的部分」が、3'側にあり、これと連続して、検出要素が設けられた、鋳型ヌクレオチドに対して非相補的な「検出用部分」が、5'側にあり、「相補的部分」の最も5'側の塩基は、上記結合部をコードする塩基に対して相補的な塩基となっている、複合的ヌクレオチド鎖。鋳型DNA、第1のヌクレオチド鎖と第2のヌクレオチド鎖で3重構造が形成され、この構造をCleavaseが認識し、切断する。

DNAチップ法は、癌(白血病)細胞で発現しているmRNAを定量する方法である。例えば、基盤上に本キメラ遺伝子の上記結合部を有する合成オリゴヌクレオチドを固定し(cDNAを固定することもできる)、検体から調製したRNAをリバーストランスクリプターゼによりcDNAを合成する時に標識を行う。本標識cDNAと基盤上の合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、結合した標識の量をスキャンすることによりmRNAの発現量を測定することができる。

サザンブロット法は検体から得られるゲノムDNAを、ノーザンブロット法は同mRNAを、分離して固定し、これと、本キメラ遺伝子の結合部とのハイブリダイズを検出することにより、検体中の本キメラ遺伝子の存在を検出する方法である。

4) 検体において存在するゲノムDNAを検出する態様

この態様の代表的な方法として、CGH(Comparative Genomic Hybridization)法とFISH法[蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH: Fluorescence in situ hybridization): Yasui, K., Imoto, I., Fukuda, Y., Pimkahaokham, A., Yang, Z. Q., Naruto, T., Shimada, Y., Nakamura, Y., and Inazawa: Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 32, 112-118, 2001]を挙げることができる。この態様の本検出方法は、本キメラ遺伝子の転座部位を有するBACクローンであるRP11-98G7を標識し、FISHを行うと相互転座部位であるクロモソーム1と19の転座部分を検出することができる。

本検出方法においては、このようにして、検体における本キメラ遺伝子および蛋白質を

10

20

30

40

50

検出することにより、ALLの病態の判別を行うことができる。なお、本検出方法と共に、既存のALLの病態の判別方法を組み合わせて行うことにより、よりの確なALLの病態の判別を行うことができる。

#### 4. 抗白血病薬のスクリーニング方法

上述したように、本キメラ蛋白質は、MEF2ファミリー蛋白質と強く相互作用をし、それが白血病の発症と関係する可能性が高い。このような相互作用の特異的阻害剤は、白血病の治療薬として期待することができる。

よって、本発明は、上記相互作用の特異的阻害効果を指標とした白血病治療薬の有効成分のスクリーニング方法（以下、本スクリーニング方法ともいう）を提供する発明である。

10

本スクリーニング方法は、具体的には、以下に示す方法として規定される。

a) MEF2ファミリー蛋白質と本キメラ蛋白質（MEF2D-DAZAP1蛋白質またはDAZAP1-MEF2D蛋白質）と共存させて、当該両蛋白質の結合量を定量し、

b) 前記a)の定量系において、MEF2ファミリー蛋白質と本キメラ蛋白質が接触する際または事前に被験物質を共存させた場合の当該両蛋白質の結合量を定量し、

c) 前記a)におけるMEF2ファミリー蛋白質と本キメラ蛋白質の結合量よりも、前記b)における当該結合量が減少している場合に、前記被験物質を抗白血病物質としてスクリーニングする、被験物質のスクリーニング方法。

上記の本スクリーニング方法において、MEF2ファミリー蛋白質としては、例えば、MEF2D蛋白質、HDAC4蛋白質、p300蛋白質等を挙げることができる。これらの中でも、MEF2D蛋白質、または、HDAC4蛋白質を用いることが好適である。なお、これらのMEF2ファミリー蛋白質は、上述した本融合蛋白質の製造方法に準じた常法を用いて製造することが可能である。

20

本スクリーニング方法においては、MEF2ファミリー蛋白質と本キメラ蛋白質を細胞内で共存させ、被験物質を細胞外に添加する態様をとることが、生体内における現実のMEF2ファミリー蛋白質と本キメラ蛋白質の結合と、投薬による当該結合の阻害を検出することが可能であり好適である。この態様を用いる場合、被験細胞を、MEF2ファミリー蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだベクター、および、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターで形質転換することが好適である。組み込み細胞は、特に限定されないが、好適には、ヒトの細胞、特に、子宮頸癌（HeLa）細胞、白血病（K562）細胞、大腸癌（HT-29）細胞、腎臓癌（HEK293）細胞を用いることが好適である。

30

結合蛋白質量の定量は、微量蛋白質の定量に採用され得る常法を行うことが可能であり、具体例は後述する。

また、本スクリーニング方法を行う前提として、一次スクリーニングを行うことが好適である。具体的には、例えば、MEF2D-DAZAP1転座が起こっている白血病細胞（例えば、TS-2細胞）の増殖を阻害するが、E2A-PBX1転座が起こっている白血病細胞（例えば、THP4細胞）の増殖は阻害しないか或いは弱くしか阻害しない物質をスクリーニングすることが好適である。

さらに、本スクリーニング方法を行って、所望の白血病治療薬の有効成分としてスクリーニングされた物質を、さらに、*in vivo*のスクリーニング、例えば、上記のTS-2細胞を植え付けたヌードマウスでのTS-2細胞の増殖抑制効果と当該ヌードマウスの生存率の向上を指標とするスクリーニング方法にかけて、最終的な絞り込みを行うことが好適である。

40

本発明は、上述した本スクリーニング方法を行うためのスクリーニング用キットを提供する。当該キットは、最低限の構成要素として、MEF2ファミリー蛋白質をコードする遺伝子を組み込んだベクター、および、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターを含むものである。さらに、その他の本スクリーニング方法を行うために必要な要素、例えば、これらのベクターによる形質転換を行う対象となる細胞、当該細胞の培養液、希釈用緩衝液、細胞溶解用緩衝液、融合蛋白質および/またはフリーの蛋白質を検出するための要素（例えば、特異抗体、アフィニティークロマトグラフィーカラム等）等を加えることも可能であ

50

る。

【図面の簡単な説明】

図1は、クロモソーム1q21 - q23の領域における転座点のFISH法及びSouthern blottingによるマッピングを示す図面である。

(A) クロモソーム1q21 - q23の領域をカバーする10種類のBACクローンを使用してFISH法による解析を行った。その中でBACクローンRP11 - 98G7 (白抜きバーで表示) がTS-2細胞のder(1)とder(19)のクロモソーム (右図の矢印で表示) 及びクロモソーム1 (右図の矢じりで表示) とハイブリダイズした。RP11 - 98G7はMEF2D配列のみを有するクローンである。

(B) 転座点を狭めるために、RP11 - 98G7配列に基づいてデザインしPCRによりプローブを作成し、Southern blot解析を行った。EcoRI/HindIII或いはBglII/HindIII消化を行った後で、健常者ゲノムDNAでは検出されないDNAバンド (右パネルの矢印bと矢印d) がTS-2細胞由来のゲノムDNAに見出された。このDNAバンドはTHP-4細胞或いは正常末梢血白血球では見出されなかった。これらの結果と各酵素単独消化後のSouthern blot解析の結果を総合的に判断すると、クロモソーム1q22の制限酵素マップより、転座点はクロモソーム1q22のEcoRI部位から約1.8Kbの範囲内に存在する (左パネル) と判定できる。右パネルの黒塗り両矢印 (aとc) と灰色両矢印 (bとd) が各々Southern blotで検出されたaからdまでのバンドと符合する。

図2は、転座点の遺伝子配列のクローニングを示す写真である。

(A) 転座点を同定するために使用したInverse-PCR法のシェーマ。転座点領域の予想される制限酵素マップに基づいて、まずゲノムDNAを制限酵素HindIIIで消化した。自己結合により生成した環状DNAを精製し、予想される転座点に近い配列をBAC98G7よりデザインしたプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物をサブクローニングし、その塩基配列を決定した。最初のPCRにA1/A2プライマーを、Nested PCRにB1/B2プライマーを、コントロールPCRにC1/C2プライマーを使用した。

(B) TS2細胞のゲノムを鋳型としたNested Inverse PCR後のアガロースゲル電気泳動により、B1/B2をプライマーとして用いた時に1.6Kbのバンドが検出された。一方、健常者末梢血白血球のゲノム (Nと表示) を用いた場合にはこのバンドは検出されなかった。プライマーC1/C2を用いた場合には両ゲノムを鋳型として、0.9Kbのバンドが検出されている (コントロール)。

(C) ウェブサイト「GenBank」のBLAST検索を行った所、Inverse-PCR産物の配列はMEF2Dのイントロン6を有するクロモソーム1q22、DAZAP1のイントロン6を有するクロモソーム19p13.3、及び転座点の配列であった。転座点周辺の部分配列を記載した。太字で記載した余分な5塩基はその由来が不明である。

図3は、RT-PCRによるMEF2D - DAZAP1キメラ転写産物の同定について示す写真である。

(A) MEF2D - DAZAP1及びDAZAP1 - MEF2Dキメラ転写産物を同定するためのRT-PCR。鋳型はTS-2細胞ゲノム (TS-2)、健常者末梢血白血球ゲノム (N) 及びTHP-4細胞 (THP-4) ゲノムを使用した。MEF2D - DAZAP1及びDAZAP1 - MEF2Dキメラ転写産物はTS-2細胞にのみ検出された。E2A - PBX1キメラ転写産物、野生型MEF2D及び野生型DAZAP1転写産物はTHP-4細胞に検出された。

(B) 2人の白血病臨床例でのキメラ転写産物の検出。TS-2細胞ゲノムで見出されたサイズのMEF2D - DAZAP1とDAZAP1 - MEF2Dキメラ転写産物がPatient 1由来のゲノムを鋳型としたRT-PCRで検出された。Patient 1と同じクロモソーム転座t(1;19)を有する前駆B細胞ALL Patient 2ではE2A - PBX融合転写産物と同サイズのRT-PCR産物を検出した。

10

20

30

40

50

(C) 野生型MEF2D蛋白質、野生型DAZAP1蛋白質並びに予想されるMEF2D-DAZAP1とDAZAP1-MEF2D融合蛋白質生成の予想図。MEF2D蛋白質はMADSドメインとMEF2ドメインをN末端に、転写活性化(Transcription activation)ドメインをC末に有する。DAZAP1蛋白質は2ヶ所のRNA認識モチーフ(RRM)をN末端に有する。キメラMEF2D-DAZAP1蛋白質はMEF2D蛋白質のMADSドメイン/MEF2ドメインとDAZAP1蛋白質の2番目のRRMドメインを一部有するC末領域から成る。もう一方のDAZAP1-MEF2D融合蛋白質はDAZAP1の1個のRRMドメインと不完全なもう1個のRRMドメインを有するN末領域と転写活性化部位を有するMEF2DのC末領域から成る。

図4は、一過性に発現したエピトープタグ蛋白質を用いて蛍光免疫化学法によるキメラ蛋白質の細胞内局在を示す写真である。

MEF2D、DAZAP1、MEF2D-DAZAP1及びDAZAP1-MEF2Dの全長を有するcDNAをFLAGタグと融合して構築した発現プラスミドを一過性に細胞にトランスフェクションした。それぞれの蛋白質を抗-FLAG(M2)モノクローン抗体を用いて検出した。

FLAGタグMEF2DとFLAGタグMEF2D-DAZAP1は核内で点する染色パターンを示し、FLAGタグDAZAP1とFLAGタグDAZAP1-MEF2Dは核内でより拡散した染色パターンを示した。

図5は、MEF2D-DAZAP1とMEF2D或いはHDAC4との相互作用を示す写真である。

(A) FLAGタグMEF2DとMycタグMEF2D-DAZAP1を一過性のコトランスフェクションによりHEK293細胞に発現させ、抗FLAG抗体を用いてその細胞溶解液からMEF2D蛋白質を免疫沈降させた。MEF2D蛋白質とMEF2D-DAZAP1蛋白質が共沈することを示した。

(B) FLAGタグHDAC4とMycタグMEF2D-DAZAP1或いはMycタグMEF2DをHEK293細胞に一過性に発現させた。HDAC4蛋白質とMEF2D蛋白質並びにMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質が抗体を用いて共沈した。MEF2D-DAZAP1とHDAC4の相互作用がMEF2DとHDAC4の相互作用より強いことが示された。

【発明を実施するための最良の形態】

#### 【実施例1】

#### 蛍光in situハイブリダイゼーション法(FISH法)によるクロモソーム1q22の転座部位の同定

プレB細胞ALL細胞株であるTS-2細胞は染色体転座t(1;19)(q23;13)が癌化の原因である。しかし、これまで報告されているクロモソーム転座に起因するE1A-PBX1融合遺伝子が検出されない(Yoshinari, M., Imaizumi, M., Eguchi, M., Ogasawara, M., Saito, T., Suzuki, H., Koizumi, Y., Cui, Y., Sato, A., Saisho, T., Ichinohasama, R., Matsubara, Y., Kamada, N. & Iinuma, K.: Establishment of a novel cell line (TS-2) of pre-B acute lymphoblastic leukemia with a t(1;19) not involving the E2A gene, Cancer Genet. Cytogenet., 101, 95-102, 1998)。この問題点を解決するためには、正確な転座部位を決定し、転座に伴う融合遺伝子の同定を行うことが必要である。

まず転座部位を決定するために、クロモソーム1q22-q23領域を有する10個のBACクローンをプローブに用いてFISH法により解析を行った。この10個のBACクローンを米国National Center for Biotechnology Information及びthe University of Californ

10

20

30

40

50

ia Santa Cruz Biotechnologyデータベースを参照して選択した。ここで用いたBACクローンの中でRP11-98G7 (GenBank accession number AL139412) をプローブに用いてTS-2細胞のFISHを行った結果、相互転座部位であるder(1)とder(19)クロモソームにハイブリダイズした(図1A右図)。詳細に解析した所、RP11-98G7はクロモソーム(1q22)に存在するMEF2Dゲノム遺伝子領域の一部から構成されており、MEF2D遺伝子の転座点を含んでいることが判明した(図1A左解説図)。さらに、Southernブロット解析法を用いて転座部位の領域を明らかにした。RP-98G7配列中の1種類のプローブはTS-2細胞の転座部位を検出しているが、通常のアレルから分離したTHP-4細胞或いは正常末梢血白血球細胞では検出できなかった。さらに、制限酵素消化後のSouthern解析、及びクロモソーム1q22のコンピュータを用いた制限酵素部位の解析により転座領域のマッピングを行うことができ、転座部位はクロモソーム1q22のEcoRI認識部位から約1.8Kbの範囲内に存在することが判明した(図1B)。

10

### 【実施例2】

#### Inverse PCR法によるクロモソーム19p13の転座部位に局在する遺伝子の同定

転座部位を明らかにするために、クロモソーム1q22領域にデザインしたプライマーを用いて、HindIII消化したTS-2細胞ゲノムDNAのSelf-ligated環状DNAを鋳型としてInverse PCRを行った(図2A)。Nested-PCRを行ったプロダクトは予想した大きさの1.6Kbであり、TS-2細胞で特異的に検出された(図2B)。塩基配列を決定した所、このPCR産物は転座部位の配列と同時にクロモソーム1q22と19p13.3の両配列を有することが判明した(図2C)。本塩基配列はクロモソーム19p転座部位のDAZAP1(19p13.3)を含んでいた。転座部位はMEF2D遺伝子のイントロン6とDAZAP1遺伝子のイントロン6にまたがっていた。さらに、MEF2D遺伝子とDAZAP1部位に特異的なプライマーを用いてTS-2細胞のゲノムDNAを鋳型にPCRを行うことにより再配列をしたゲノム塩基配列を決定した。

20

### 【実施例3】

#### RT-PCR法を用いて転座に起因する融合転写産物の同定

リバーストランスクリプターゼを用いて、転座に起因する融合転写産物からcDNAを合成し、その塩基配列を決定した所、MEF2D遺伝子のエクソン6とDAZAP1遺伝子のエクソン7が融合しMEF2D-DAZAP1融合mRNAが生成することが判明した。2対の染色体の相互転座が起こっているので、MEF2D-DAZAP1とDAZAP1-MEF2D融合産物が生成すると予測されるので、その検出を行った。TS-2細胞から調製したmRNAを用いてRT-PCRを行うと、野生型MEF2D mRNAとDAZAP1 mRNAに加えて2種類の融合mRNAを検出できた(図3A、TS-2で表示した列)。ここで検出された2種類のcDNAをpCRIIベクター(Invitrogen社、CA、USA)にクローニングし、それらの塩基配列を決定した。塩基配列のデータより両キメラ蛋白質のアミノ酸配列を決定した。この結果、MEF2D-DAZAP1 cDNA配列(配列番号3)、同蛋白質のアミノ酸配列(配列番号5)、並びに、DAZAP1-MEF2D cDNA配列(配列番号4)、同蛋白質のアミノ酸配列(配列番号6)が確定した。一方、THP-4細胞からはこれらの融合mRNAは検出されなかった(図3A、THP-4と表示した列)。さらに、THP-4細胞で検出されるE2A-PBX1融合mRNAはTS-2細胞では検出されなかった。

30

40

次に、TS-2細胞を分離した患者(Patient 1)の骨髄細胞からRNAを調製し、RT-PCR法で転座部位に由来する融合転写産物の検出を試みた結果、予想通り、2種類の融合mRNAを検出することができた(図3B)。他のt(1;19)転座を伴う13人のALL患者の骨髄細胞から分離したRNAを用いた場合にはこの2種類の融合転写産物は検出されなかった。融合転写産物の塩基配列を決定した結果、融合はその下

50

流遺伝子の蛋白質配列が翻訳されるように起こっていた。即ち、MEF2D遺伝子の22番目のコドンとDAZAP1の155番目のコドンは何れもグリシンをコードしており、アミノ酸翻訳フレームが合った状態で融合し、キメラ転写産物が生成することが判明した。

ALL患者で(1;19)(q23;p13)転座を伴うが、E2Aとのキメラ遺伝子が検出されない多種類の血液癌症例が報告(Privitera, E., Kamps, M. P., Hayashi, Y., Inaba, T., Shapiro, L. H., Raimondi, S. C., Behm, F., Hendershot, L., Carroll, A. J., Baltimore, D., & Look, A. T.: Different molecular consequences of the 1;19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 79, 1781-1788, 1992)されているが、これらはMEF2D-DAZAP1融合産物がその原因となっている可能性が高い。

MEF2D遺伝子は約34Kbを有し、12エクソンから成る(Breitbart, R. E., Liang, C. S., Smoot, L. B., Laheru, D. A., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B.: A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development*, 118, 1095-1106, 1993)。それは転写因子のMADS-boxファミリー蛋白質をコードする(図3C)。本蛋白質はホモダマー或いはヘテロダイマーを形成して多数の筋特異的及び生育により誘導される遺伝子群の発現制御領域のコンセンサス配列に結合し、骨格筋遺伝子及び心筋の分化に関与する(Hobson, G. M., Krahe, R., Garcia, E., Siciliano, M. J., & Funanage, V. L.: Regional chromosomal assignments for four members of the MADS domain transcription enhancer factor 2 (MEF2) gene family to human chromosomes 15q26, 19p12, 5q14 and 1q12-23q. *Genomics*, 29, 704-711, 1995; McKinsey, T. A., Zhang, C. L. & Olson, E. N.: MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.*, 27, 40-47, 2002)。

DAZAP1遺伝子は約29Kbに及び11エクソンから構成される(Tsui, S. Dai, T., Roettger, S., Schempp, W., Salido, E. C. & Yen, P. H.: Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics*, 65, 266-273, 2000)。DAZAP1蛋白質は2個のRNA認識モチーフ(RRM)とプロリンに富むC末領域を有し(図3C)、DAZリピート配列を介してDAZ並びにDAZL1蛋白質と結合する(Dai, T., Vera, Y., Salido, E. C. & Yen, P. H.: Characterization of the mouse Dazap1 gene encoding an RNA-binding protein that interacts with infertility factors DAZ and DAZL. *BMC Genomics*, 2, 6, 2001)。DAZAP1は精巣で多量発現しているため精子形成に重要な役割を果たしていることが期待される(Vera, T., Dai, T., Hikim, A. P., Lue, Y., Salido, E. C., Swerdloff, R. S. & Yen, P. H.: Deleted in azoospermia associated protein 1 shuttles between nucle

10

20

30

40

50

us and cytoplasm during normal germ cell maturation, *J. Androl.*, 23, 622-628, 2002)。本発明で見出したMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質はMEF2D蛋白質のN末領域(2量体形成に必要なMADSドメインとMEF2ドメインを有する)とDAZAP1蛋白質の2番目のRRMを一部含むC末領域とが融合している。一方、DAZAP1-MEF2Dキメラ蛋白質はDAZAP1蛋白質の1番目のRRMと2番目のRRMを一部含むN末領域とMEF2D蛋白質の転写活性化領域を含むC末領域とが融合している(図3C)。

#### 【実施例4】

##### キメラ転写産物の細胞内局在部位

MEF2D蛋白質はDNA結合部位と転写活性化部位を有する転写因子(Breitbart, R. E., Liang, C. S., Smoot, L. B., Laheru, D. A., Mahdavi, V. & Nadak-Ginard, B.: A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage, *Development*, 118, 1095-1106, 1993)で、DAZAP1はRNA結合蛋白質である(Tsui, S., Dai, T., Roetter, S., Schempp, W., Salido, E. C. & Yen, P. H.: Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZ1, *Genomics*, 65, 266-273, 2000)。キメラ転写産物の細胞内局在部位を決定し、野生型MEF2D蛋白質並びに野生型DAZAP1蛋白質の局在と比較した。融合蛋白質産物であるMEF2D-DAZAP1のアミノ酸配列を配列2に、DAZAP1-MEF2Dのアミノ酸配列を配列2に記載した。FLAG抗体を用いて検出を行うために、各蛋白質のN末端にFLAGのタグをつけた発現プラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、一過性に発現させた。FLAGに対する抗体を用いて蛍光免疫細胞染色を行った結果、FLAGタグMEF2DとFLAGタグMEF2D-DAZAP1は核に局在し、点在する染色を示した。一方、FLAGタグDAZAP1及びFLAGタグDAZAP1-MEF2Dも又核に局在したが、より拡散した染色像を示した(図4)。

#### 【実施例5】

##### MEF2D蛋白質とMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質とのヘテロ2量体の形成

MEF2Dは、HDAC4及びp300蛋白質等のMEF2ファミリー蛋白質の1つで、ホモ2量体及びヘテロ2量体形成に必要なMADSドメインとMEF2ドメインを含んでいる(図3C)。キメラ蛋白質MEF2D-DAZAP1はMADSとMEF2ドメインを含んでいるので、それはMEF2D自身、或いはMEF2Dと相互作用する他の蛋白質と2量体を形成すると考えられる。

この可能性を証明するために、HEK293細胞を、FLAGタグMEF2Dと、MycタグMEF2D-DAZAP1を発現するプラスミドと共にコトランスフェクションを行い、細胞抽出液を調製し免疫沈降した。その結果、MEF2Dとキメラ蛋白質が共沈した(図5A)ので、その両者が細胞内で複合体を形成していると結論される。逆の組み合わせ、すなわち、MycタグMEF2D-DAZAP1とFLAGタグMEF2D発現プラスミドをコトランスフェクションした場合にも同様の結果が得られた。さらに、MycタグMEF2D-DAZAP1とFLAGタグHDAC4発現プラスミドをコトランスフェクションした場合にも同様に両蛋白質は共沈した。

共沈した時のバンドの濃さから判定すると、MEF2D-DAZAP1融合蛋白質は、MEF2Dよりも強くHDAC4と結合する(図5B)。MycタグMEF2D-DAZAP1とFLAGタグHDAC4発現プラスミドをHeLa細胞にコトランスフェクションすると、両蛋白質は核に点在する状態で同一部位に存在することが蛍光免疫細胞染色の結果より明らかになった。この結果はMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質が、お

10

20

30

40

50

そらくMEF2Dとヘテロ2量体を形成することにより、MEF2Dの機能を抑制していると推定される。

これまで、MEF2D-DAZAP1とDAZAP1-MEF2D融合蛋白質において、細胞をトランスフォームする性質は明らかではない。しかし、両融合蛋白質の細胞内局在部位とヘテロ2量体を形成することは、本キメラ蛋白質が、MEF2ファミリー蛋白質(MEF2DあるいはHDAC4等)と相互作用する可能性が強く示唆される。

MEF2蛋白質の役割は通常筋組織に限定される(Yu, Y. T., Breitbart, R., Smoot, L. B., Lee, Y., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B.: Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-related MADS box transcription factors., Genes Dev., 6, 1783-1798, 1992)と考えられているが、MEF2Dは血清存在下で増殖するHeLa細胞のc-junプロモーターを制御しており(Han, T. H. & Prywes, R.: Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter, Mol. Cell Biol., 15, 2907-2915, 1995)、他の組織或いは細胞の分化、増殖に関与する可能性も高い。

全骨髄球性白血病細胞HL-60がモノサイトに分化する過程でMEF2AとMEF2Dの発現が顕著に増大した(Shin, H. H., Seoh, J. Y., Chung, H. Y., Choi, S. J., Hahn, M. J., Kang, J. S., Choi, M. S. & Han, T. H.: Requirement of MEF2D in the induced differentiation of HL60 promyeloid cells, Mol. Immunol., 36, 1209-1214, 1999)。さらに、HL-60細胞がMEF2Dの転写活性領域を含んでいないドミナントネガティブ体を発現したときに、モノサイトへの分化が抑制された。これらのことは、MEF2蛋白質の制御的役割は広範囲に渡り、MEF2Dは、筋組織よりむしろ細胞系譜の分化過程に必要であると考えられる。

従って、本キメラ蛋白質は癌化に関連する融合蛋白質であると結論づけることができる。

#### 【実施例6】

##### MEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質阻害剤のスクリーニング系の例示

###### (a) 1次スクリーニング :

1次スクリーニングとして、MEF2D-DAZAP1転座が起こっている白血病(TS-2)細胞の増殖を阻害するが、E2A-PBX1転座が起こっている白血病(THP4)細胞の増殖は阻害しないか或いは弱くしか阻害しない物質をスクリーニングする。方法は96穴マイクロタイタープレートを用いて、10% Fetal Bovine Serum、100 units/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンを含むRPMI-1640培地存在下でTS-2細胞とTHP4細胞を37、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養する。培養時に10 µM濃度の化合物を添加し、2~3日間培養する。培養後、細胞増殖をMTTアッセイにより測定する。MTTアッセイ試薬の1例として、株式会社同仁化学研究所(熊本)からCell Counting Kit-8として市販されている。TS-2細胞の増殖に対するIC50がTHP4細胞のIC50と比較し、1/4以下の化合物を選択する。

###### (b) 2次スクリーニング(本スクリーニング方法) :

次に、HEK293細胞を用いて、本キメラ蛋白質とMEF2D蛋白質との結合を阻害する物質を検索する。

(1) 全長を有するMycタグMEF2D-DAZAP1遺伝子と野生型FLAGタグMEF2D遺伝子をpCMV-Tag2或いはpCMV-Tag3発現プラスミド(Stratagene, CA, USA)に翻訳フレームが合うように挿入する。大腸菌DH-5株を形質転換後、プラスミドを調製し、制限酵素マッピングと塩基配列の決定により

、目的とするクローンを選択する。

(2) FLAGタグMEF2D発現プラスミドとMycタグMEF2D-DAZAP1発現プラスミドをHEK293細胞にコトランスフェクションする。トランスフェクション試薬としてFuGENE6 (Roche、東京)を使用し、マニュアルに従って実験を行うことができる。上記培地で37℃、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で1日培養後、1次スクリーニングで選択された化合物を10 μM濃度で添加し、さらに1日培養する。

(3) プロテアーゼ阻害剤 (Roche、東京)を含むTNE緩衝液 (キシダ化学、大阪)で処理を行い、HEK293細胞ライセートを調製する。次に、抗Myc抗体 (Cell Signaling Technology)とProtein Gセファロースビーズと共に2時間4℃でインキュベートする。ビーズを遠心分離により分離した後、プロテアーゼ阻害剤を含むTNE緩衝液で2回洗浄し、ローディングバッファーにサスペンドする。その試料を5分間100℃に加熱処理後、SDS-PAGE電気泳動を行う。それをニトロセルロース膜に移し、0.05% Tween20及び5% nonfat dry milkを含むTris-buffered salineでブロッキング処理を行い、抗FLAGモノクローン抗体M2 (Sigma、MO、USA)とインキュベートした。FLAGタグMEF2D蛋白質をSuperSignal West Dura Westernプロテイングキット (Pierce Chemical CO.、IL、USA)を用いて検出する。

この結果、MEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質とMEF2D蛋白質との結合を阻害する物質を選択することができる。

次に、同様にしてFLAGタグHDAC4発現プラスミドを調製する。上記と同様の方法で、FLAGタグHDAC4発現プラスミドとMycタグMEF2D-DAZAP1発現プラスミドをHEK293細胞にコトランスフェクションする。上記と同様の方法を用いてHDAC4とMEF2D-DAZAP1の結合を阻害する物質を同定する。

(c) 3次スクリーニング :

かくして得られた化合物はMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質の阻害剤であり、次のステップとしてヌードマウスを用いた白血病 (TS-2) 細胞移植実験でその阻害剤が有効かどうかを試験できる。

【実施例7】

Homogeneous Time-Resolved Fluorescenceアッセイ法を用いたMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質阻害剤のスクリーニング法

常法を用いて組換蛋白質として、MEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質、GST-MEF2D蛋白質、GST-HDAC蛋白質を調製する。常法を用いてMEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質をピオチン標識する。ピオチン標識 (Bio-) MEF2D-DAZAP1キメラ蛋白質とGST-MEF2D蛋白質を緩衝液中で或いは適当に希釈したHEK293抽出液を加えて室温或いは37℃で30分間インキュベートする。両蛋白質の結合をEuropium Cryptate (EuK) 標識GST抗体 (Packard, CT, USA)とStreptoavidine (SA) 標識XL665蛋白質 (Packard, CT, USA)を加えて検出する。検出はDiscovery HTRF Microplate Analyzer (Packard, CT, USA)を用いて行う。337nmのレーザー光を照射するとEuropium Cryptateはこの波長の光を吸収し、吸収したエネルギーをXL665蛋白質 (アクセプター) にトランスファーする。XL665蛋白質は665nmのエミッション光を放出し、短時間でこの蛍光強度が減衰する。この反応ではDonor FluorophoreはEuKであり、アクセプターが安定化したAllophycocyanin蛋白質であるXL665である。両物質により触媒されるFluorescence resonance energy transfer (FRET)は両者が9.5nmの距離に存在する場合に50%の効率でエネルギートランスファーが起こる。

EuK-GST抗体-GST-MEF2D-BioMEF2D-DAZAP1-SAXL665の複合体が形成され、EuKとXL665とのFRETを利用してGST-M

10

20

30

40

50

E F 2 D と B i o M E F 2 D - D A Z A P 1 キメラ蛋白質の結合を測定する。

96穴 又は 384穴 マイクロタイプレートを用いて、10 μM 化合物存在下で、ビオチン標識 M E F 2 D - D A Z A P 1 融合蛋白質と G S T - M E F 2 D 蛋白質をインキュベーションする事により H i g h t h r o u g h p u t でかつ簡便に両蛋白質の複合体形成を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。本法はホモジニアスな方法で、B / F 分離を必要としない所に大きい特徴がある。ここで得られた化合物について、ビオチン標識 M E F 2 D - D A Z A P 1 融合蛋白質と G S T - H D A C 4 蛋白質の結合を阻害するかどうかさらにチェックをする。

ここで選択された化合物を ( 実施例 6 ) の 2 次スクリーニングさらに、3 次スクリーニングへと進め、目的とする薬剤を発見する事ができる。

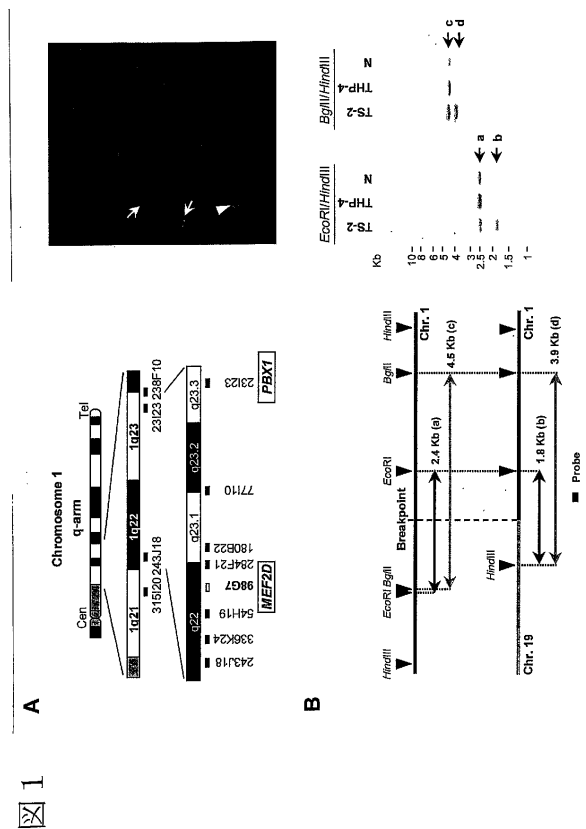
【産業上の利用可能性】

本発明により、白血病に関連する有用な新規のキメラ蛋白質とこれをコードする遺伝子が提供された。そして、本発明により、前駆 B 細胞 A L L でこれまで不明であった転座を分子診断することが可能となった。すなわち、本患者が t ( 1 ; 1 9 ) ( q 2 3 ; p 1 3 ) のクロモソーム転座が起こっている場合、これまでは E 2 A - P B X 1 の融合遺伝子の生成しか検出できなかったが、本発明により、本キメラ遺伝子の生成のモニタリングが初めて可能となった。かかる本検出方法は、患者の血液から調製した白血球、ゲノム DNA 、細胞ライセート、RNA 等を用いてゲノム上での融合遺伝子、融合 mRNA 、融合蛋白質の検出等により行うことが可能である。さらに、本キメラ蛋白質を用いて、新規の白血病のスクリーニング方法が提供された。

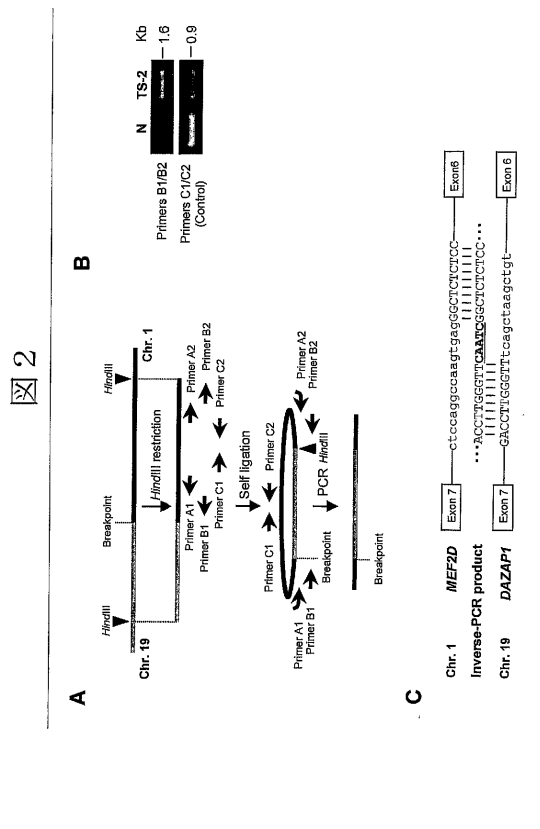
10

20

【 図 1 】



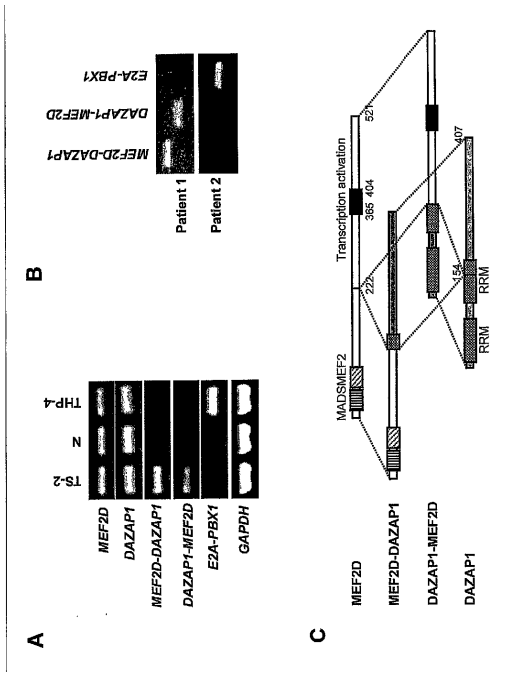
【 図 2 】



1

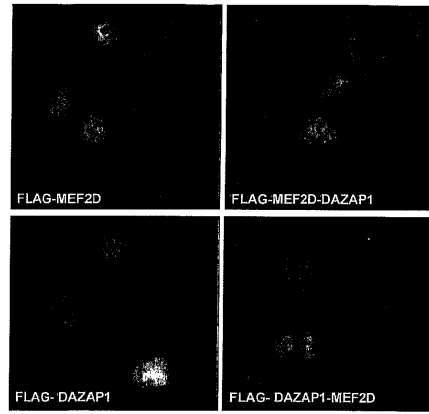
【 3 】

3



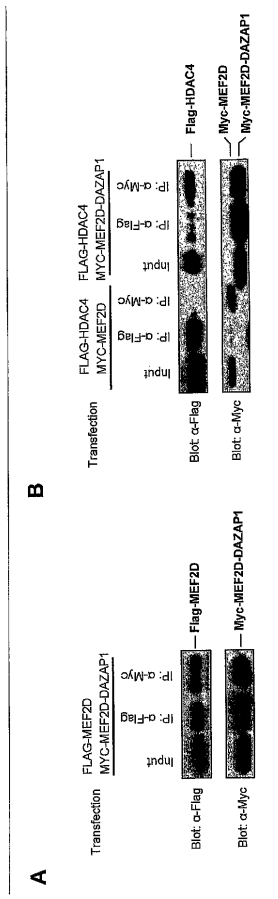
【 4 】

4



【 5 】

5



【配列表】

0004473870000001.xml

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 16/18 (2006.01) G 0 1 N 33/53 M  
C 0 7 K 16/18

(72)発明者 今泉 益栄  
宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘2 - 1 2 - 6

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 日本人類遺伝学会第48回大会プログラム・抄録集, 2003年 9月28日, p.125, 0-59  
第62回日本癌学会総会記事, 2003年 8月25日, p.182, 2175-0P

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)  
C12N 15/09

专利名称(译)	新型嵌合蛋白和编码它的基因，以及使用这些基因和蛋白质鉴别白血病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4473870B2</a>	公开(公告)日	2010-06-02
申请号	JP2006519069	申请日	2004-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	BM萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	稻泽丈二 BML有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	稻泽丈二 BML有限公司		
[标]发明人	稻澤讓治 井本逸勢 柚木泰広 今泉益栄		
发明人	稻澤 讓治 井本 逸勢 柚木 泰広 今泉 益栄		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 C07K16/18 C12N15/12 C12P21/08 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	C07K19/00 C07K14/47 C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M C07K16/18		
代理人(译)	志村光晴		
审查员(译)	松田良子		
其他公开文献	JPWO2005082933A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明阐明了不同类型急性淋巴细胞白血病 ( ALL ) 的遗传本质，提供了一种能够在全面治疗前区分ALL基因水平的检测手段，这是一个发明，旨在给所有的病人机会，尽可能适当的治疗。本发明人已经通过粘合部分DAZAP1蛋白MEF2D蛋白的一部分而形成，一个新的嵌合蛋白质，我们发现是专用于特定类型的前B细胞ALL，并且所述嵌合蛋白，提供了新颖的编码嵌合基因因此，进一步，嵌合基因在样品中，或嵌合蛋白我们发现，通过提供一种检测嵌合基因和嵌合蛋白的方法可以实现上述目的，该嵌合蛋白通过检测蛋白质来区分标本提供者的前体B细胞ALL。本发明还提供了使用嵌合基因或嵌合蛋白筛选白血病治疗剂的方法。

