

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-13415

(P2013-13415A)

(43) 公開日 平成25年1月24日(2013.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
<b>G O 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 2 4
<b>G O 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 Y	4 C O 8 4
<b>G O 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	4 C O 8 6
審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-209426 (P2012-209426)	(71) 出願人	306037311 富士フイルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号
(22) 出願日	平成24年9月24日 (2012. 9. 24)	(71) 出願人	504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島1-5-45
(62) 分割の表示	特願2007-143111 (P2007-143111) の分割	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
原出願日	平成19年5月30日 (2007. 5. 30)	(72) 発明者	稲澤 譲治 東京都文京区湯島1-5-45 国立大学 法人東京医科歯科大学内
		(72) 発明者	井本 逸勢 東京都文京区湯島1-5-45 国立大学 法人東京医科歯科大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 卵巣癌の検出方法、及び抑制方法

(57) 【要約】

【課題】 卵巣癌におけるゲノム構造の変化を指標として、卵巣癌の悪性度を含めて検出する手段を提供すること。

【解決手段】 卵巣癌におけるゲノム構造の変化を指標として卵巣癌の悪性度を含めた検出を可能にすることを見出した。また、本発明は、卵巣癌において、遺伝子の不活性化を回復することにより、卵巣癌の増殖を抑制することも見出した。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C T G F 遺伝子の欠失又は不活性化を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出する、卵巣癌の検出方法。

## 【請求項 2】

検体が、卵巣由来の組織である、請求項 1 に記載の卵巣癌の検出方法。

## 【請求項 3】

C T G F 遺伝子の不活性化が、C p G アイランドのメチル化による不活性化である、請求項 1 又は 2 に記載の卵巣癌の検出方法。

## 【請求項 4】

検体において、C T G F 遺伝子から翻訳される蛋白質の量を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出する、請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の卵巣癌の検出方法。

## 【請求項 5】

蛋白質の量を免疫組織化学的により検出する、請求項 4 に記載の卵巣癌の検出方法。

## 【請求項 6】

遺伝子の変化を、DNA チップ法、サザンブロット法、ノーザンブロット法、リアルタイム RT - PCR 法、FISH 法、CGH 法、または、アレイ CGH 法、B s u l f i t e S e q u e n c e 法、COBRA 法を用いて検出する、請求項 1 から 5 の何れかに記載の卵巣癌の検出方法。

## 【請求項 7】

C T G F 遺伝子、または、該遺伝子の発現産物である蛋白質をインビトロで細胞に導入することを含む、卵巣癌細胞の増殖を抑制する方法。

## 【請求項 8】

C T G F 遺伝子、または、該遺伝子の発現産物である蛋白質を含む、卵巣癌細胞増殖抑制剤。

## 【請求項 9】

C T G F 遺伝子の s i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは機能欠失型遺伝子を、インビトロで腫瘍細胞に導入することを含む、卵巣癌細胞の増殖を活性化する方法。

## 【請求項 10】

C T G F 遺伝子の s i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは機能欠失型遺伝子を含む、卵巣癌細胞増殖活性化剤。

## 【請求項 11】

C T G F 遺伝子の C p G アイランドのメチル化に起因して遺伝子の発現が抑制されている卵巣癌に対して、被験物質を接触させて、遺伝子の発現を検出し、遺伝子発現が被験物質を接触させない系よりも増加していた場合に、被験物質を、遺伝子の C p G アイランドの脱メチル化により遺伝子を活性化させることができる抗腫瘍物質として選別する、物質のスクリーニング法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、卵巣癌をその遺伝子型を観察することで初期に診断することを目的として、特定の染色体領域に存在する遺伝子の変化を検出することによって癌を検出する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

卵巣癌 [ o v a r i a n c a n c e r ( O C ) ] は、50 ~ 70 歳の女性に最も多く発生し、婦人科癌の中では 2 番目に多い癌であり、死亡数は他の婦人科癌よりも多いことが知られている。卵巣癌には様々な種類があり、それぞれ卵巣中の異なる種類の細胞から

10

20

30

40

50

発生するが、卵巣癌の約80%以上は卵巣表面に発生する上皮癌である。

【0003】

近年、卵巣癌のための診断と治療の手順は進歩しているにも関わらず、いまだ、早期診断は困難なままとなっている。このため、卵巣癌における原因遺伝子を見つけ出し、その機能を解明することは、効果的な治療、診断マーカーの探索、化学的予防のための新しい戦略の知見を築くためにも強く望まれている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

卵巣由来、主に卵巣上皮由来細胞の癌化についての遺伝子レベルでのメカニズムが解明されれば、遺伝子レベルにおける卵巣由来細胞の癌化の発見や、卵巣癌の悪性度の診断、進行の抑制をおこなうことが可能となり、さらに、メカニズムに基づく薬剤の選別、開発や治療法の確立が可能となるはずである。具体的には、卵巣癌に特徴的な挙動を示す遺伝子を同定して、遺伝子を中心とした技術的検討をおこなうことにより、この課題を解決することができると考えられる。即ち、本発明は、卵巣癌などの癌に特徴的な挙動を示す遺伝子を同定して癌の検出方法及び細胞増殖抑制剤を提供することを解決すべき課題とした。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

Comparative Genomic Hybridization (CGH) はゲノム上で多数の遺伝子増幅並びに欠失、あるいは遺伝子の不活性化に伴う遺伝子異常を解析するためには、簡便で迅速であり、最良の方法である。そして、癌化並びに癌の悪性化などに関与するゲノム上の遺伝子異常を解析するためにCGHアレイに搭載する800種類のBAC/PAC DNAを選別する(MCG Cancer Array-800; Takada H., et al., Cancer Sci. 96, 100-105, 2005) ことにより、卵巣由来の細胞の癌化を促進する癌関連遺伝子、すなわち、Connective tissue growth factor (CTGF) 遺伝子の同定に成功した。そして、CTGF遺伝子の欠失、または不活性化、すなわち、CTGF蛋白質の減少が卵巣癌の増殖を顕著に促進すること、また、CTGF遺伝子の転写産物または蛋白質を増加させると卵巣癌の増殖が著しく低下することを見出すことに成功し、本発明を完成した。

20

30

【0006】

即ち、本発明によれば、検体において、2q14.2、3p24.1、3q26.2、3q29、4q34.2、6q23、9p21.3、11q13.3、13q22.1、13q33.1、13q33.3、15q12、15q15.1、17p12、17p13.1、17p13.3、18q21.1、18q21.2、18q21.31、18q21.32、18q21.33、18q23、20q13.13、20q13.2、20q13.31、20q13.33、Xp11.23、Xp13.1、Xp13.3、Xp26.2、Xp26.3、Xq28の染色体領域に存在する遺伝子の変化を少なくとも1つ以上を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出する、癌の検出方法が提供される。

40

【0007】

好ましくは、遺伝子はGLI2、CCND1、FGF3、TGFB2、CDKN2A、MTAP、SMAD4、EVI1、MUC4、PTPN1、ZNF217、BCAS1、TFAP2C、BIRC7、TNFRSF6B、VEGFC、KLF12、FGF14、EFNB2、GABRB3、RAD51、RH68621、PMP22、RCV1、HSXIAPAF1、ABR、HIC1、MADH4 (SMAD4)、DCC、MALT1、GRP、SERPINB5、FVT1、BCL2、SERPINB3、BCL2、CTDP1、SHGC-145820、SSX1、AR、MLLT7、ABCB7、GPC3、FGF13、MAGEA2、KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRS

50

P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G Fの少なくとも1つ以上である。

【0008】

好ましくは、遺伝子の変化は、増幅、欠失、不活性化の少なくとも1つ以上である。

好ましくは、遺伝子の変化は、C p Gアイランドのメチル化による不活性化である。

好ましくは、検体において、請求項2に記載の遺伝子から翻訳される蛋白質の量を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出する。

好ましくは、蛋白質の量を免疫組織化学的により検出する。

好ましくは、C T G F遺伝子の欠失又は不活性化を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出する。

【0009】

好ましくは、検体は、卵巣由来の組織である。

好ましくは、癌は、卵巣癌である。

好ましくは、遺伝子の変化を、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、FISH法、CGH法、または、アレイCGH法、B s u l f i t e S e q u e n c e法、COBRA法を用いて検出する。

【0010】

さらに本発明によれば、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F遺伝子、または、該遺伝子の発現産物である蛋白質をインビトロで細胞に導入することを含む、細胞の増殖を抑制する方法が提供される。

さらに本発明によれば、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F遺伝子、または、該遺伝子の発現産物である蛋白質を含む、細胞増殖抑制剤が提供される。

さらに本発明によれば、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F遺伝子のs i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは機能欠失型遺伝子を、インビトロで腫瘍細胞に導入することを含む、細胞の増殖を活性化する方法が提供される。

さらに本発明によれば、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F遺伝子のs i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは機能欠失型遺伝子を含む、細胞増殖活性化剤が提供される。

【0011】

さらに本発明によれば、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F遺伝子のC p Gアイランドのメチル化に起因して遺伝子の発現が抑制されている卵巣癌に対して、被験物質を接触させて、遺伝子の発現を検出し、遺伝子発現が被験物質を接触させない系よりも増加していた場合に、被験物質を、遺伝子のC p Gアイランドの脱メチル化により遺伝子を活性化させることができる抗腫瘍物質として選別する、物質のスクリーニング法が提供される。

【発明の効果】

【0012】

本発明により、卵巣由来の細胞検体における癌化、悪性度を的確に把握することが可能となった。また、卵巣癌において、遺伝子発現を不活性化するC T G F遺伝子の転写産物を導入することにより、卵巣癌の増殖を抑制することができる。また、C T G F遺伝子の発現が不活性化することにより発生する卵巣癌の治療剤のスクリーニングをおこなうことができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】A：24種の卵巣癌細胞株におけるコピー数の増幅と欠失のゲノム全体の頻度。クローンは、UCSCマッピング位置(<http://genome.ucsc.edu/>[version May, 2004])に基づいて1-22、X、Y染色体の順番で整

10

20

30

40

50

列した。アスタリスクは、高レベルの増幅 ( $\log_2 \text{ratio} > 0.4$ )、またはホモ欠失 ( $\log_2 \text{ratio} < -0.4$ ) の認められた領域を示す (表 1)。B: 卵巣癌細胞株での 6q23.2 染色体領域の増幅の確認。上部; RMUG-S 細胞株の代表的な増幅のアレイ CGH イメージ。6q23.2 染色体領域の BAC クローンのホモ欠失は明らかなシグナルで確認できる (矢印)。下部; RMUG-S 細胞株での 6q23.1-23.2 のホモ欠失領域をカバーするマップ。水平線で示した BAC (RP11-69I8) はアレイ CGH 解析においてホモ欠失である。RMUG-S 細胞株におけるホモ欠失の領域は、ゲノミック PCR により決定し、白い両端矢印で示す。RMUG-S 細胞株でゲノミック PCR により決定したホモ欠失領域周辺に位置する 10 遺伝子、ホモ欠失 (8 遺伝子) または残っている遺伝子 (2 遺伝子) を矢印で示す。C: 卵巣癌細胞株での 6q23 10 遺伝子領域周辺に位置する遺伝子のゲノミック PCR と RT-PCR 解析上部; ゲノミック PCR により CTGF、ENPP1、ENPP3、CRSP3、AKAP7、EPB41L2、KIAA1913 のホモ欠失は 1 つの卵巣癌細胞株において確認された。1: HT、2: HTOA、3: HUOA、4: KF28、5: MH、6: OVKATE、7: OVSAHO、8: KFr13、9: HMKOA、10: MCAS、11: RMUG-L、12: RMUG-S、13: KK、14: OVI SE、15: OVMANA、16: OVTOKO、17: RMG-I、18: RMG-II、19: ES-2、20: W3UF、21: HIOAnu、22: HMOA、23: HNOA、24: HTBOA。下部; 卵巣癌細胞株と正常卵巣と正常卵巣上皮細胞由来細胞株 (OSE-2a) における CTGF、ENPP1、ENPP3、CRSP3、AKAP7、EPB41L2、KIAA1913 の mRNA の発現は RT-PCR により確認した。アローヘッドはゲノミック PCR 解析によりホモ欠失を示した細胞株を示す。CRSP3、AKAP7、EPB41L2 mRNA の発現は多くの卵巣癌細胞株で多少の減少を示した。そして、ENPP1、ENPP3、CTGF の mRNA の発現は高頻度に消失した。ホモ欠失以外の CTGF 遺伝子発現の減少は 23 細胞株中 12 種 (50%) であった。D: 5-aza-dCyd (5  $\mu$ M) 5 日間と / または TSA (100 ng/ml) 12 時間の処理あり (+) なし (-) をおこなった卵巣癌細胞株 (HNOA と RMG-I) における CTGF 遺伝子の RT-PCR 解析の結果を示す。

【図 2】卵巣癌細胞株と卵巣癌臨床検体における CTGF CpG リッチ領域のメチル化状態 A: CTGF 遺伝子のエキソン 1 周辺の CpG アイランド (白い矢印) を含む CpG リッチ領域の概略図と bisulfite シーケンスの代表的な結果。CpG 部位は垂直線で示す。エキソン 1 はオープンボックスで示し、転写開始点は +1 で記す。プロモーターアッセイに用いた断片は、太い黒線で示す。COBRA 法と bisulfite シーケンスで確認した領域は灰色線で示す。COBRA 法のための制限酵素部位 BstUI は黒のアローヘッドで表す。CTGF を発現している卵巣癌細胞株 (+) と CTGF を発現していない卵巣癌細胞株 (-) において調べた CpG リッチ領域の bisulfite シーケンスの代表的な結果。各白と黒の四角は非メチル化とメチル化 CpG 部位を示し、各列は 1 種類のクローン由来である。MSP のための PCR プライマーは矢印で示す。B: BstUI 消化後の卵巣癌細胞株における CTGF CpG アイランドの COBRA 法の代表的な結果。矢印はメチル化 CpG 部位特異的に消化された断片を示す。アローヘッドは消化されない断片で非メチル化 CpG であることを示す。C: CTGF CpG リッチ領域のプロモーター活性。pGL3 空ベクター (mock) と CpG アイランド Fragment 1-3 の異なった配列を含むレポーターを構築した。それらを内部コントロールベクター (pRL-hTK) と共に RMUG-S 細胞、KK 細胞、KF28 細胞へトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性はコントロールに対してノーマライズした。データは 3 つの独立した実験の平均  $\pm$  SD を示す。D: 上部左; 卵巣癌臨床検体における CTGF プロモーター領域の MSP 解析の代表的な結果。並列に非メチル化 (U) またはメチル化 (M) DNA に特異的なプライマーを用いて検討した。下部; CTGF プロモーター領域のメチル化状態は腫瘍サンプルにより bisulfite シーケンスにより決定した。上部右; 粘液型腫瘍を除いた 43 種の卵巣癌臨床検体について、MSP により決定し

10

20

30

40

50

たCTGFのメチル化状態とRT-PCRにより決定したmRNA発現状態の相関関係。

【図3】卵巣癌臨床検体におけるCTGF発現の免疫組織化学解析。A：正常ヒト卵巣上皮細胞と卵巣癌臨床検体における代表的なCTGF免疫化学染色。左；CTGFの高い発現は正常卵巣上皮細胞で見られる。中央と右；CTGFの発現が高い（中央）またはほとんどない（右）結果は、卵巣癌臨床検体における癌細胞で見られる。正常上皮細胞と卵巣癌細胞において、CTGFは細胞質の頂点にはっきりと局在している。倍率×200。B：卵巣癌患者の全体の生存率に対する Kaplan-Meier カブ。左；全てのステージの腫瘍において、免疫組織化学法により確認したCTGFの発現が低い患者は、CTGFの発現が高い患者よりも生存率が良いことを示す（ $P = 0.128$ 、Log-rank test）。中央；ステージI、IIの腫瘍において、CTGFの発現が高い患者グループで死亡が認められなかったため統計解析をおこなうことはできないが、CTGFの発現が低い患者は、CTGFの発現が高い患者よりも生存率が短い傾向があることを示す。右；ステージIII、IVの腫瘍において、CTGFの発現が高い患者は、CTGFの発現が低い患者よりも生存率が短いことを示す（ $P = 0.189$ 、Log-rank test）。C：60歳以下でステージIIIcとIVの卵巣癌患者の全体的な生存率に対する Kaplan-Meier カブ。60歳以下で転移表現型に関連したステージIIIcとIVの卵巣癌患者に制限した場合、解析に含まれるのは少数の症例であるにも関わらず、CTGFの発現が高い患者は、CTGFの発現が低い患者よりも明らかに生存率が短いことを示す（ $P = 0.033$ 、Log-rank test）。

【図4】卵巣癌の増殖におけるCTGFの発現の効果（A、B）。pCMV-3Tag4-CTGFまたはpCMV-3Tag4-mockをCTGF遺伝子が欠失している細胞株（HNOA、HMOA）にトランスフェクションした。A：トランスフェクション後48時間の細胞から抽出した蛋白質10μgを用いて抗Myc抗体でウエスタンブロット解析をおこなった。B：CTGF遺伝子が発現していない細胞株（HNOA、HMOA）を用いたコロニーフォーメーションアッセイ。これらの細胞へCTGFを含むMycタグベクター（pCMV-3Tag4-CTGF）または、空ベクター（pCMV-3Tag4-mock）を一過性でトランスフェクションし、G418存在下で2週間薬剤選択をおこなった。上部；トランスフェクション後2週間で薬剤耐性コロニーを形成した結果、CTGF遺伝子をトランスフェクションした細胞のコロニー形成は、空ベクターをトランスフェクションした細胞よりも少ないことがわかった。下部；コロニー形成の定量解析。> 2mmコロニーをカウントした、そしてその結果は3回の別々の実験の平均値±SDとして表した。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

(1) 癌の検出方法

本発明による癌の検出方法は、検体において、2q14.2、3p24.1、3q26.2、3q29、4q34.2、6q23、9p21.3、11q13.3、13q22.1、13q33.1、13q33.3、15q12、15q15.1、17p12、17p13.1、17p13.3、18q21.1、18q21.2、18q21.31、18q21.32、18q21.33、18q23、20q13.13、20q13.2、20q13.31、20q13.33、Xp11.23、Xp13.1、Xp13.3、Xp26.2、Xp26.3、Xq28の染色体領域に存在する遺伝子の変化を少なくとも1つ以上を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出することを特徴とする。より具体的には、上記の遺伝子としては、GLI2、CCND1、FGF3、TGFB R2、CDKN2A、MTAP、SMAD4、EVI1、MUC4、PTPN1、ZNF217、BCAS1、TFAP2C、BIRC7、TNFRSF6B、VEGFC、KLF12、FGF14、EFNB2、GABRB3、RAD51、RH68621、PMP22、RCV1、HSXIAPAF1、ABR、HIC1、MADH4（SMAD4）、DCC、MALT1、GRP、SERPINB5、FVT1、BCL2、SERPI

N B 3、B C L 2、C T D P 1、S H G C - 1 4 5 8 2 0、S S X 1、A R、M L L T 7、A B C B 7、G P C 3、F G F 1 3、M A G E A 2、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G Fの少なくとも1つ以上を選択することができる。特に好ましくは、卵巣由来の細胞におけるC T G F遺伝子の欠失又は不活性化を検出することにより、検体の悪性度を含めた癌化を検出することができる。

【0015】

ヒトゲノムプロジェクトの成果により、C T G F遺伝子の転写産物は既に知られており、6 q 2 3染色体領域に存在する遺伝子である。C T G F遺伝子がコードする蛋白質は、C C N ( C T G F、C Y R 6 1、N O V )ファミリーに属し、血管形成、骨形成、腎臓疾患、皮膚疾患などの生化学的や病理学的なプロセスに広く関与することが知られている。しかし、詳細な機能は不明であり、このC T G F遺伝子が、卵巣癌の発症、または悪性度に関わる重要な癌関連遺伝子であることは知られていない。

10

【0016】

上述したように、本検出方法は、卵巣由来の細胞や卵巣癌におけるC T G F遺伝子の欠失や不活性化を検出することを特徴とする方法である。

C T G F遺伝子の欠失や不活性化を検出する対象となる卵巣由来の細胞や卵巣癌は、検体提供者の生検組織細胞が好適である。

この検体組織細胞は、健常人の卵巣に由来する細胞か、卵巣癌患者の癌組織であるかを問わないが、現実的には、検査等の結果、卵巣に癌化が疑われる病変部が認められた場合の病変組織、または卵巣癌であることが確定しているが、その悪性度や進行度を判定する必要がある卵巣癌の組織、等が主な対象となり得る。

20

【0017】

本検出方法により、「検査等の結果、卵巣に由来する組織や細胞に癌化が疑われる病変部が認められた場合の病変組織」におけるC T G F遺伝子の欠失や不活性化が認められた場合には、病変組織は癌化に向かって進行しているか、あるいは既に癌化の状態であり、かつ、悪性度が高くなりつつあることが判明し、早急な本格的治療（手術等による病変部の除去、本格的な化学療法等）をおこなう必要性が示される。また、「卵巣癌であることが確定しているが、その悪性度や進行度を判定する必要がある卵巣癌の組織」におけるC T G F遺伝子の欠失や不活性化が認められた場合にも、癌組織の悪性度が高くなりつつあることが判明し、早急な本格的治療手術等による病変部の除去、本格的な化学療法等）をおこなう必要性が示される。検体として採取された卵巣癌組織は、必要な処理、例えば、採取された組織からのDNA或るいはRNAの調製をおこない、本検出方法をおこなう対象とすることができる。

30

【0018】

(2) C T G F遺伝子の欠失の検出

C T G F遺伝子の欠失の検出を直接的におこなうことができる代表的な方法として、C G H ( C o m p a r a t i v e G e n o m i c H y b r i d i z a t i o n )法とF I S H ( F l u o r e s c e n c e i n s i t u h y b r i d i z a t i o n )法を挙げることができる。この態様の本検出方法は、C T G F遺伝子を有するB A C ( B a c t e r i a l A r t i f i c i a l C h r o m o s o m e ) DNA、Y A C ( Y e a s t A r t i f i c i a l C h r o m o s o m e ) DNA、P A C ( P 1 - d r i v e d A r t i f i c i a l C h r o m o s o m e ) DNA (以下、B A C DNA等ともいう)を標識し、F I S Hをおこなうと、C T G F遺伝子の有無、すなわち欠失を検出することができる。具体的には、C T G F遺伝子を有するB A C DNAとしては、R P 1 1 - 6 9 1 8等を上げることができる。

40

【0019】

上記の態様の方法は、ゲノムDNA定着基盤を用いておこなうことが、好適であり、かつ、現実的である。

【0020】

50

通常に得られるBAC DNA等は、ゲノムDNA定着基盤を多数製造して実用化するには少量であるので、当該DNAを遺伝子増幅産物として得る必要がある(この遺伝子増幅行程を「無尽蔵化」ともいう)。無尽蔵化においては、まずBAC DNA等を、4塩基認識酵素、例えば、RsaI、DpnI、HaeIII等で消化した後、アダプターを加えてライゲーションをおこなう。アダプターは10~30塩基、好適には15~25塩基からなるオリゴヌクレオチドで、2本鎖は相補的配列を有し、アニーリング後、平滑末端を形成する側の3'-末端のオリゴヌクレオチドをリン酸化する必要がある。次に、アダプターの一方のオリゴヌクレオチドと同一配列を有するプライマーを用いて、PCR(Polymerase Chain Reaction)法により増幅し、無尽蔵化することができる。一方、各BAC DNA等に特徴的な50~70塩基のアミノ化オリゴヌクレオチドを検出用プローブとして用いることもできる。

10

#### 【0021】

このようにして無尽蔵化したBAC DNA等を基盤上、好適には固体基盤上に定着させることにより、所望するDNA定着基盤を製造することができる。固体基盤としては、ガラス板が好ましい。ガラス等の固体基盤は、ポリ-L-リジン、アミノシラン、金・アルミニウム等の凝着により基盤をコートすることがより好ましい。

#### 【0022】

上記の無尽蔵化したDNAを基盤上にスポットする濃度は、好ましくは10pg/ $\mu$ l~5 $\mu$ g/ $\mu$ l、より好ましくは1ng/ $\mu$ l~200ng/ $\mu$ lである。スポットする量は好ましくは1nl~1 $\mu$ l、より好ましくは10nl~100nlである。また、基盤に定着させる個々のスポットの大きさ及び形状は、特に限定されないが、例えば、大きさは直径0.01~1mmであり得、上面から見た形状は円形~楕円形であり得る。乾燥スポットの厚みは、特に制限はないが、1~100 $\mu$ mである。さらに、スポットの個数は、特に制限はないが、使用する基盤あたり10~50,000個、より好ましくは100~5,000個である。それぞれのDNAはSingularからQuadruplicateの範囲でスポットするが、Duplicate或るいはTriplicateにスポットすることが好ましい。

20

#### 【0023】

乾燥スポットの調整は、例えば、スポッターを用いて無尽蔵化したBAC DNA等を基盤上にたらし、複数のスポットを形成した後、スポットを乾燥することにより製造することができる。スポッターとしてインクジェット式プリンター、ピンアレイ式プリンター、バブルジェット(登録商標)式プリンターが使用できるが、インクジェット式プリンターを使用することが望ましい。例えば、GENESHOT(日本ガイシ株式会社、名古屋)等を使用できる。

30

このようにして無尽蔵化したBAC DNA等を基盤上、好適には固体基盤上に定着させることにより、所望するDNA定着基盤を製造することができる。

#### 【0024】

また、このCTGF遺伝子の欠失を直接的に検出する手段の一つとしてサザンプロット法を挙げることができる。サザンプロット法は、検体から得られるゲノムDNAを分離して固定し、これと、CTGF遺伝子とのハイブリダイズを検出することにより、検体中の当該遺伝子の存在を検出する方法である。

40

#### 【0025】

また、ノーザンプロット法、リアルタイムRT-PCR法によりCTGF遺伝子の欠失を検出してもよい。ノーザンプロット法は、検体から得られるmRNAを分離して固定し、これとCTGFとのハイブリダイゼーションを検出することにより、検体中の当該遺伝子のmRNAの存在を検出する方法である。リアルタイムRT-PCR法は、逆転写反応とポリメラーゼ連鎖反応による目的遺伝子の増幅を経時的(リアルタイム)に測定する方法であり、増幅率に基づいて鋳型となるmRNAの定量を行なうことができる。この定量は蛍光色素を用いて行われ、二種類の方法がある。即ち、二重鎖DNAに特異的に挿入(インターカレート)して蛍光を発する色素(例えば、SYBR green)を用いる方法と、増幅す

50

るDNA配列に特異的なオリゴヌクレオチドに蛍光色素を結合させたプローブを用いる方法が知られている。

【0026】

(3) CTGF 遺伝子の不活性化の検出

CpGリッチプロモーター並びにエキソン領域を密にメチル化すると転写不活性化が起こることが報告されている(Bird AP., et al., Cell, 99, 451-454, 1999). 癌細胞では、CpGアイランドはそれ以外の領域と比較すると高い頻度で密にメチル化されており、プロモーター領域のHypermethylationは、癌での癌抑制遺伝子の不活性化に深く関与している(Ehrlich M., et al., Oncogene, 21, 6694-6702, 2002)。

10

【0027】

後述するように、実際、CTGF 遺伝子のエキソンに存在するCpGアイランドはプロモーター活性を有している。また、このCpGアイランドのメチル化の度合いは、一部の卵巣癌でのCTGF 遺伝子発現の抑制と強く相関していた。

【0028】

そして、卵巣癌を、脱メチル化試薬である5-アザデオキシシチジン(5-aza-dCyd)存在下で培養することにより、CpGアイランドを脱メチル化することができ、その結果、CTGF 遺伝子発現を回復させることができた。これらの結果により、CpGアイランドの高頻度メチル化(Hypermethylation)が卵巣癌における癌抑制遺伝子の発現抑制を高頻度で起こす原因の一つであることが判明した。

20

【0029】

上述した検出手段により、CTGF 遺伝子の発現量が減少していることが判明した検体細胞(癌組織に由来するプライマリ癌細胞)に対して、脱メチル化剤(5-アザデオキシシチジンなど)を作用させて、遺伝子発現量の回復を検討することができる。すなわち、検体細胞に脱メチル化剤を作用させて、CTGF 遺伝子の発現量が回復する場合には、検体細胞における遺伝子の抑制要因は、CpGアイランドのメチル化であり、検体提供者に、脱メチル化作用を有する薬剤を投与することにより、相応の抗腫瘍効果が期待される。

【0030】

(4) 細胞増殖の抑制方法、及び細胞増殖抑制剤

本発明によればさらに、KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF 遺伝子、または、該遺伝子の発現産物である蛋白質をインビトロで細胞に導入することを含む、細胞の増殖を抑制する方法、並びに上記遺伝子又は蛋白質を含む細胞増殖抑制剤が提供される。

30

【0031】

KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF 遺伝子を取り扱う場合、当業者に公知の技術を用いて培養細胞などから取得したcDNAであってもよいし、PCR法などにより酵素学的に合成したものでよい。PCR法によりDNAを取得する場合、ヒトの染色体DNA又はcDNAライブラリーを鋳型として使用し、目的とする塩基配列を増幅できるように設計したプライマーを使用してPCRを行う。PCRで増幅したDNA断片は大腸菌などの宿主で増幅可能な適切なベクター中にクローニングすることができる。

40

【0032】

KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF 遺伝子の検出プローブ又はプライマーの調製、並びに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley &

50

Sons (1987 - 1997)などに記載された方法に準じて行うことができる。

【0033】

KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF遺伝子は、ベクターに組み込んだ組換えベクターの形態で用いることができる。ベクターとしてはウイルスベクター又は動物細胞発現用ベクター、好ましくはウイルスベクターが用いられる。ウイルスベクターとしてはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられる。中でも、レトロウイルスベクターは、細胞に感染後、ウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれ、ベクターに組み込んだ外来遺伝子を安定にかつ長期的に発現させる可能であるからレトロウイルスベクターを使用することが特に望ましい。

10

【0034】

動物細胞発現用ベクターとしては例えばpCXN2 (Gene, 108, 193 - 200, 1991)、PAGE207 (特開平6 - 46841号公報)又はその改変体などを用いることができる。

【0035】

上記組換えベクターは適当な宿主に導入して形質転換し、得られた形質転換体を培養することによって生産することができる。組換えベクターがウイルスベクターの場合、これを導入する宿主としてはウイルス生産能を有する動物細胞が用いられ、例えば、COS-7細胞、CHO細胞、BALB/3T3細胞、HeLa細胞などが挙げられる。レトロウイルスベクターの宿主としては、CRE、CRIP、MLVなどが、アデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターの宿主としては、ヒト胎児腎臓由来の293細胞などが用いられる。ウイルスベクターの動物細胞への導入はリン酸カルシウム法などで行うことができる。また、組換えベクターが動物細胞発現用ベクターの場合、これを導入する宿主としては大腸菌K12株、HB101株、DH5株などを使用でき、大腸菌の形質転換は当業者に公知である。

20

【0036】

得られた形質転換体はそれぞれに適した培地、培養条件により培養する。例えば、大腸菌の形質転換体の培養は、生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他を含有するpH5~8程度の液体培地を用いて行うことができる。培養は通常15~43で約8~24時間程度行う。この場合、目的とする組み換えベクターは、培養終了後、通常のDNA単離精製法により得ることができる。

30

【0037】

また、動物細胞の形質転換体の培養は、例えば約5~20%のウシ胎児血清を含む199培地、MEM培地、DMEM培地などの培地を用いて行うことができる。培地のpHは約6~8が好ましい。培養は通常約30~40で約18~60時間行う。この場合、目的とする組み換えベクターは、それを含有するウイルス粒子が培養上清中に放出されるので、ウイルス粒子の濃縮、精製を塩化セシウム遠心法、ポリエチレングリコール沈澱法、フィルター濃縮法などにより得ることができる。

【0038】

本発明の細胞増殖抑制剤は、有効成分である上記遺伝子を遺伝子治療剤に通常用いる基剤と共に配合することにより製造することができる。また、上記遺伝子をウイルスベクターに組み込んだ場合は、組換えベクターを含有するウイルス粒子を調製し、これを遺伝子治療剤に通常用いる基剤と共に配合する。

40

【0039】

有効成分である上記遺伝子又は蛋白質を配合するために使用する基剤としては、通常注射剤に用いる基剤を使用することができ、例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物などの塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコースなどの溶液、グリシン、アルギニンなどのアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液などが挙げられる。あるいはまた、当業者に既知の常法に

50

従って、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、植物油、界面活性剤などの助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製することもできる。これらの注射剤は、粉末化、凍結乾燥などの操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

【0040】

本発明の細胞増殖抑制剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内などの全身投与でもよいし、局所注射又は経口投与などの局所投与を行ってもよい。さらに、細胞増殖抑制剤の投与にあたっては、カテーテル技術、遺伝子導入技術、又は外科的手術などと組み合わせた投与形態をとることもできる。

【0041】

本発明の細胞増殖抑制剤の投与量は、患者の年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、一般に、成人では一日当たり組み換え遺伝子の重量として1 µg / kg体重から1000 mg / kg体重程度の範囲であり、好ましくは10 µg / kg体重から100 mg / kg体重程度の範囲である。投与回数は特に限定されない。

10

【0042】

(5) 細胞増殖の活性化方法、及び細胞増殖活性化剤

本発明によれば、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F 遺伝子の s i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは機能欠失型遺伝子を、インビトロで腫瘍細胞に導入することを含む細胞の増殖を活性化する方法、並びに上記の s i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは機能欠失型遺伝子を含む細胞増殖活性化剤が提供される。

20

【0043】

s i R N A は、約20塩基（例えば、約21～23塩基）またはそれ未満の長さの二本鎖RNAであり、このような s i R N A は、細胞に発現させることにより、その s i R N A の標的となる遺伝子（本発明においては、K I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F 遺伝子）の発現を抑制することができる。

【0044】

本発明において用いられる s i R N A は、RNAiを引き起こすことができる限り、どのような形態のものでよい。ここで、「s i R N A」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてきた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。この s i R N A に特異的なタンパク質が結合して、RISC (RNA-induced silencing complex) が形成される。この複合体は、s i R N A と同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNase III様の酵素活性によって s i R N A の中央部でmRNAを切断する。

30

【0045】

s i R N A の配列と、標的として切断するmRNAの配列とは100%一致することが好ましい。しかし、s i R N A の中央から外れた位置の塩基が一致していない場合については、RNAiによる切断活性は部分的には残存することが多いので、必ずしも100%一致していなくてもよい。

40

【0046】

s i R N A の塩基配列と、発現を抑制すべきK I A A 1 9 1 3、E P B 4 2 L 2、A K A P 7、C R S P 3、A R G 1、E N P P 3、E N P P 1、C T G F 遺伝子の塩基配列との間で相同性のある領域は、当該遺伝子の翻訳開始領域を含まないことが好ましい。翻訳開始領域には種々の転写因子や翻訳因子が結合することが予想されるため、s i R N A が効果的にmRNAに結合することができず、効果が低減することが予測されるからである。従って、相同性を有する配列は、当該遺伝子の翻訳開始領域から20塩基離れていることが好ましく、より好ましくは当該遺伝子の翻訳開始領域から70塩基離れている。相

50

同性を有する配列としては、例えば、当該遺伝子の3'末端付近の配列でもよい。

【0047】

本発明の別の態様によれば、RNAiにより標的遺伝子の発現を抑制することができる因子として、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造から成るshRNA(short hairpin RNA)を使用することができる。shRNAとは、一本鎖RNAで部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約20塩基対以上の分子のことを言う。そのようなshRNAは、細胞内に導入された後、細胞内で約20塩基(代表的には例えば、21塩基、22塩基、23塩基)の長さで分解され、siRNAと同様にRNAiを引き起こすことができる。上記の通りshRNAは、siRNAと同様にRNAiを引き起こすことから、本発明において有効に用いることができる。

10

【0048】

shRNAは好ましくは、3'突出末端を有している。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド以上であり、より好ましくは約20ヌクレオチド以上である。ここで、3'突出末端は、好ましくはDNAであり、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド以上のDNAであり、さらに好ましくは2~4ヌクレオチドのDNAである。

【0049】

上記の通り、本発明では、RNAiによりKIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF遺伝子の発現を抑制することができる因子として、siRNAまたはshRNAを使用することができる。siRNAの長所としては、(1)細胞内に導入してもRNA自体は正常細胞の染色体内に組み込まれないので、子孫に伝わる変異を起こすような治療ではなく、安全性が高いこと、及び(2)短鎖二本鎖RNAは化学合成が比較的容易であり二本鎖にするとより安定であること、などが挙げられる。また、shRNAの長所としては、遺伝子発現を長期間抑制することによって治療を行う場合、細胞内でshRNAを転写するようなベクターを作製して細胞内に導入することができることなどが挙げられる。

20

【0050】

本発明で用いるRNAiによりKIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF遺伝子の発現を抑制することができるsiRNA又はshRNAは、人工的に化学合成してもよいし、センス鎖およびアンチセンス鎖のDNA配列を逆向きに連結したヘアピン構造のDNAをT7RNAポリメラーゼによってインビトロでRNAを合成することによって作製することもできる。インビトロで合成する場合は、T7RNAポリメラーゼおよびT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンスおよびセンスのRNAを合成することができる。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、RNAiが引き起こされ、標的遺伝子の発現が抑制される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法、又は各種のトランスフェクション試薬(例えば、oligofectamine、Lipofectamineおよびlipofectionなど)を用いてそのようなRNAを細胞内に導入することができる。

30

【0051】

上記したsiRNA又はshRNAは、細胞増殖活性化剤として有用である。本発明の細胞増殖活性化剤の投与方法は、経口投与、非経口投与(例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、膈内投与、患部への局所投与、皮膚投与など)、患部への直接投与などが挙げられる。本発明の薬剤は、医薬組成物として使用する場合、必要に応じて薬学的に許容可能な添加剤を配合することができる。薬学的に許容可能な添加剤の具体例としては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、キャリア、賦形剤および/または薬学的アジュバントなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0052】

50

本発明の薬剤の製剤形態は特に限定されないが、例えば、液剤、注射剤、徐放剤などが挙げられる。本発明の薬剤を上記製剤として処方するために使用される溶媒としては、水性または非水性のいずれでもよい。

#### 【0053】

さらに、本発明の細胞増殖活性化剤の有効成分である *siRNA* 又は *shRNA* は、非ウイルスベクターまたはウイルスベクターの形態で投与することができる。非ウイルスベクター形態の場合、リボソームを用いて核酸分子を導入する方法（リボソーム法、HVJ-リボソーム法、カチオニックリボソーム法、リポフェクション法、リポフェクトアミン法など）、マイクロインジェクション法、遺伝子銃（Gene Gun）でキャリア（金属粒子）とともに核酸分子を細胞に移入する方法などを利用することができる。*siRNA* 又は *shRNA* をウイルスベクターを用いて生体に投与する場合は、組換えアデノウイルス、レトロウイルスなどのウイルスベクターを利用することができる。無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス、SV40などのDNAウイルスまたはRNAウイルスに、*siRNA* 又は *shRNA* を発現するDNAを導入し、細胞または組織にこの組換えウイルスを感染させることにより、細胞または組織内に遺伝子を導入することができる。

10

#### 【0054】

本発明の細胞増殖活性化剤の投与量は、使用目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、又は有効成分である *siRNA* 又は *shRNA* の種類などを考慮して、当業者が決定することができる。*siRNA* 又は *shRNA* の投与量は特に限定されないが、例えば、約0.1ng~約100mg/kg/日、好ましくは約1ng~約10mg/kg/日である。RNAiは、一般に投与後1~3日間効果が見られる。したがって、毎日~3日に1回の頻度で投与することが好ましい。発現ベクターを用いる場合、1週間に1回程度投与することも可能である。

20

#### 【0055】

本発明では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞増殖活性化剤として使用することもできる。本発明で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF遺伝子のDNA配列中の連続する5から100の塩基配列に対して相補的な、またはハイブリダイズするヌクレオチドであって、DNA又はRNAのいずれであっても良く、また機能に支障がない限りにおいて修飾されたものであってもよい。本明細書で言う「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドがすべて相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが安定にハイブリダイズできる限り、多少のミスマッチが存在してもよい。

30

#### 【0056】

なお、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾されていてもよい。適当な修飾を施すことにより、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドは生体内で分解されにくくなり、より安定してITIIを阻害できるようになる。このような修飾されたオリゴヌクレオチドとしては、S-オリゴ型（ホスフォロチオエート型）、C-5チアゾール型、D-オリゴ型（フォスフォジエステル型）、M-オリゴ型（メチルフォスフォネイト型）、ペプチド核酸型、リン酸ジエステル結合同型、C-5プロピニルピリミジン型、2'-O-プロピルリボース、2'-メトキシエトキシリボース型等の修飾型のアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、リン酸基を構成する酸素原子の少なくとも一部がイオウ原子に置換、修飾されているものでもよい。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性、水溶性、RNAへの親和性に特に優れている。リン酸基を構成する酸素原子の少なくとも一部がイオウ原子に置換、修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、S-オリゴ型等のオリゴヌクレオチドが挙げられる。

40

50

## 【0057】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基数は、50以下であることが好ましく、25以下であることがより好ましい。塩基数があまりに多くなると、オリゴヌクレオチドの合成の手間とコストが増大し、また、収率も低下する。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基数は5以上であり、9以上であることが好ましい。塩基数が4以下の場合には、標的遺伝子に対する特異性が低下して好ましくないためである。

## 【0058】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（又はその誘導体）は常法によって合成することができ、例えば、市販のDNA合成装置（例えばApplied Biosystems社製など）によって容易に合成することができる。合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ヒドロジェンホスホネートを用いた固相合成法などで得ることができる。

10

## 【0059】

本発明においてアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞増殖活性化剤として使用する場合には、一般的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドと製剤用添加物（担体、賦形剤など）を含む医薬組成物の形態で提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトを含む哺乳動物に医薬として投与することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与（例えば、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など）の何れでもよい。

## 【0060】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの製剤形態は特に限定されず、経口投与のための製剤としては例えば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、液剤、シロップ剤などが挙げられ、非経口投与のための製剤としては例えば、注射剤、点滴剤、座剤、吸入剤、経粘膜吸収剤、経皮吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む薬剤の形態、使用すべき製剤用添加物、製剤の製造方法などは、いずれも当業者が適宜選択可能である。

20

## 【0061】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量は、患者の性別、年齢または体重、症状の重症度、予防または治療といった投与目的、あるいは他の合併症状の有無などを総合的に考慮して適宜選択することができる。投与量は、一般的には、 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  体重 / 日 ~  $100 \text{mg} / \text{kg}$  体重 / 日、好ましくは  $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  体重 / 日 ~  $10 \text{mg} / \text{kg}$  体重 / 日である。

30

## 【0062】

さらに本発明では、KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF遺伝子の機能欠失型遺伝子を細胞増殖活性化剤として使用することもできる。機能欠失型遺伝子とは、該当する遺伝子においてその機能を欠失するように変異が導入されている遺伝子のことを言う。具体的には当該遺伝子から作製されるアミノ酸配列の少なくとも1個の構成アミノ酸を欠くもの、少なくとも1個の構成アミノ酸が別のアミノ酸で置換されているもの、少なくとも1個のアミノ酸が付加されたもの等の本来の機能を欠失した一般にムテインと呼ばれるタンパク質を翻訳する当該遺伝子がこれに相当する。

40

## 【0063】

機能欠失型遺伝子を細胞増殖活性化剤として使用する場合は、有効成分である上記遺伝子を遺伝子治療剤に通常用いる基剤と共に配合することにより製造することができる。また、上記遺伝子をウイルスベクターに組み込んだ場合は、組換えベクターを含有するウイルス粒子を調製し、これを遺伝子治療剤に通常用いる基剤と共に配合する。

## 【0064】

上記基剤としては、通常注射剤に用いる基剤を使用することができ、例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物などの塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコースなどの溶液、グリシン、アルギニンなどのアミノ酸

50

溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液などが挙げられる。あるいはまた、当業者に既知の常法に従って、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、植物油、界面活性剤などの助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製することもできる。これらの注射剤は、粉末化、凍結乾燥などの操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

【0065】

機能欠失型遺伝子の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内などの全身投与でもよいし、局所注射又は経口投与などの局所投与を行ってもよい。さらに、投与にあたっては、カテーテル技術、遺伝子導入技術、又は外科的手術などと組み合わせた投与形態をとることもできる。

10

【0066】

機能欠失型遺伝子の投与量は、患者の年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、一般に、成人では一日当たり組み換え遺伝子の重量として $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重程度の範囲であり、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重程度の範囲である。投与回数は特に限定されない。

【0067】

また、上記した本発明の各種の遺伝子治療剤は、常法により調製されたりポソームの懸濁液に遺伝子を添加し凍結した後融解することにより製造することもできる。リポソームを調製する方法は、薄膜振とう法、超音波法、逆相蒸発法、界面活性剤除去法などがある。リポソームの懸濁液は超音波処理した後、遺伝子を添加するのが遺伝子の封入効率を向上させる上で好ましい。遺伝子を封入したりポソームはそのまま、又は水、生理食塩水などに懸濁して静脈投与することができる。

20

【0068】

(6) 抗腫瘍物質のスクリーニング方法

上述したように、卵巣癌に関しては、KIAA1913、EPB42L2、AKAP7、CRSP3、ARG1、ENPP3、ENPP1、CTGF遺伝子の不活性化が大きな要因となっており、遺伝子の働きを正常化する薬剤は、卵巣癌に対する抗腫瘍剤として用いることが可能であると考えられる。特に、この不活性化の要因が、CTGF遺伝子のCpGアイランドによるメチル化である場合には、これらの要因を解消・緩和することができる薬剤は、抗腫瘍剤として有用である。

30

【0069】

これらの本スクリーニング方法をおこなう前提として、検体細胞においてCTGF遺伝子の発現量が抑制されている卵巣癌を確保する必要がある。すなわち、本スクリーニング方法においては、「CTGF遺伝子のCpGアイランドのメチル化に起因してCTGF遺伝子の発現が抑制されている卵巣癌」が必要となる。これらの細胞株の確立法は、上述した知見に基づいた上で、常法に従いおこなうことができる。例えば、少なくとも、CTGF遺伝子の不活性化が確認された細胞の中から、既存の脱メチル化試薬（例えば5-アザデオキシシチジン）を作用させることにより、CTGF遺伝子のレベルが回復する細胞を選択して、これを継代して、所望する「CTGF遺伝子のCpGアイランドのメチル化に起因してCTGF遺伝子の発現が抑制されている卵巣癌」（以下、メチル化癌細胞株ともいう）として確立することができる。

40

【0070】

本スクリーニング方法においては、上記のメチル化癌細胞株に対して被験物質を接触させることが必要である。この接触の態様は、特に限定されないが、メチル化癌細胞株の培養物に対して、被験物質を好適には適切な希釈倍率で希釈して添加して、引き続き培養をおこなうことによりおこなわれる。そして、被験物質を添加する前のメチル化癌細胞株におけるCTGF遺伝子の発現量と、添加後の遺伝子の発現量を、好適には経時的に定量し、定量前後の遺伝子の発現量の差を、被験物質を添加せずに同条件で培養された対照培養物と比較して、対照培養物よりも、被験物質を添加した培養物における遺伝子の発現量が増加している場合には、被験物質はメチル化癌細胞株を用いた試薬においては「CTGF遺

50

伝子の CpG アイランドの脱メチル化により CTGF 遺伝子を活性化させることができる抗腫瘍物質」として選別される。

【0071】

さらに、本スクリーニング方法をおこなって、所望の卵巣癌に対する抗腫瘍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、上記のメチル化癌細胞株を植えたヌードマウスでの卵巣癌の増殖抑制効果と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、最終的な絞込みをおこなうことが好適である。

【0072】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

【実施例】

【0073】

実施例 1：卵巣癌における遺伝子の変化

卵巣癌での新規な遺伝子変化を検出するために、24種類の卵巣癌細胞株 (HT、HTOA、HUOA、KF28、MH、OVTOKO、OVSAHO、KFr13、HMKOA、MCAS、RMUG-L、RMUG-S、KK、OVISE、OVMANA、OVTOKO、RMG-I、RMG-II、ES-2、W3UF、HIOAnu、HMOA、HNOA、HTBOA) から調製したゲノムDNAを用いてMGC Cancer Array-800を使用したCGHアレイ解析をおこなった (図1A)。なお、対象として正常な卵巣上皮由来の細胞株 (OSE-2a) から抽出したゲノムDNAを使用しCy5で標識した。被検DNAとして卵巣癌細胞株から調整したゲノムDNAを使用しCy3で標識した。具体的には、DpnII消化したゲノムDNA (0.5 μg) を、各々0.6 mM dATP、0.6 mM dTTP、0.6 mM dGTP、0.3 mM dCTP及び0.3 mM Cy3-dCTP (卵巣癌細胞) 或るいは0.3 mM Cy5-dCTP (正常細胞) 存在下で、BioPrime Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen社) により標識した。Cy3及びCy5標識dCTPはGEヘルスケア社より入手した。両標識ゲノムDNAをCot-1 DNA (Invitrogen社) 存在下でエタノールを加えて沈殿させ、120 μlのハイブリダイゼーション混合液 (50%ホルムアミド、10% Dextran sulfate、2xSSC (1xSSC: 150 mM NaCl/15 mM Sodium Citrate)、4% sodium dodecyl sulfate、pH 7.0) に溶解した。37°Cで30分間インキュベーション後、ハイブリダイゼーションマシーン (GeneTAC; ハーバードバイオサイエンス社) にCGHアレイをセットし、48-72時間ハイブリダイゼーションをおこなった。その後、CGHアレイを50%ホルムアミド/2xSSC (pH 7.0) 溶液中で50°Cにて15分間洗浄し、次に2xSSC/0.1% SDS中で50°Cにて15分間洗浄した。風乾した後、CGHアレイをGenePix 4000Bスキャナー (Axon Instruments、CA、USA) を用いてCy3及びCy5に由来する蛍光をモニタリングした。得られた結果をGenePix Pro 6.0イメージングソフトウェア (Axon Instruments、CA、USA) を用いて解析した。Cy3に由来する蛍光強度の平均とCy5に由来する蛍光強度の平均を同じ値に調整し、Cy3/Cy5のRatioを求めた。ゲノムに異常がない場合にはRatio値は1 ( $\log_2 \text{Ratio} = 0$ ) である。Ratio値が1.32以上 ( $\log_2 \text{Ratio}$ で0.4以上) の時にゲノムの増幅があり、4以上 ( $\log_2 \text{Ratio}$ で2以上) の時に顕著な増幅が認められると判定した。Ratio値が0.75以下 ( $\log_2 \text{Ratio}$ で-0.4以下) の時にゲノムのヘテロ接合体欠失の可能性、0.25以下 ( $\log_2 \text{Ratio}$ で-2以下) の時にホモ接合体欠失の可能性が極めて大きいと判定した。その結果を表1、及び表2に示す。

【0074】

高レベルの遺伝子増幅は、24種類の卵巣癌中2種類、2遺伝子座を確認することがで

10

20

30

40

50

きた。また、遺伝子欠失は、24種類の卵巣癌中3種類、4遺伝子座を確認することができた(表1)。

【0075】

【表1】

表1:

Table 1 High-level amplifications ( $\log_2\text{ratio} > 2.0$ ) and homozygous deletions ( $\log_2\text{ratio} < -2.0$ ) detected in 24 ovarian cancer cell lines by arra-CGH analysis using MCG Cancer Array-800

Alteration	BAC	Locus <sup>a</sup>		Cell line (Total n = 24)		Known Candidate target gene <sup>b</sup>
		Chr. Band	Position	n	Name	
High-level amplifications ( $\log_2\text{ratio} > 2.0$ )	RP11-438012	2q14.2	chr2: 120,629,082-120,846,427	1	OVI5E	<i>GLI2</i>
	RP11-3006	11q13.3	chr11: 69,162,462-69,323,966	1	ES-2	<i>CCND1, FGF3</i>
	GTD-2234J21	11q13.3	chr11: 69,307,612-69,307,664	1	ES-2	<i>CCND1, FGF3</i>
Homozygous deletions ( $\log_2\text{ratio} < -2.0$ )	RP11-7116	3p24.1	chr3: 30,541,893-30,705,070	1	KFr13	<i>TGFBR2</i>
	RP11-6918	6q23	chr6: 132,249,163-132,410,700	1	RMUG-S	none
	RP11-70L8	9p21.3	chr9: 21,732,608-21,901,258	1	HTBOA	<i>CDKN2A, MTAP</i>
	RP11-145E5	9p21.3	chr9: 21,782,634-22,022,985	1	HTBOA	<i>CDKN2A, MTAP</i>
	RP11-10G6	18q21.1	chr18: 46,348,632-46,493,352	1	RMUG-S	<i>SMAD4</i>

<sup>a</sup>Based on UCSC Genome Browser, May 2004 Assembly

<sup>b</sup>Putative oncogenes or tumor-suppressor genes located around BAC

【0076】

## 【表 2】

表 2 :

Supplemental Table S2 Most Frequently gained and lost clones in array-CGH analysis using MCG Cancer Array-B00

Alteration	Gene	Locus	Frequency (%) <sup>†</sup>
Gain	<i>EVI1</i>	3q26.2	46
	<i>MUC4</i>	3q29	42
	<i>PTPN1</i>	20q13.13	54
	<i>ZNF217</i>	20q13.2	58
	<i>BCAS1</i>	20q13.2	58
	<i>TFAP2C</i>	20q13.31	46
	<i>BIRC7</i>	20q13.33	50
	<i>TNFRSF6B</i>	20q13.33	50
Loss	<i>VEGFC</i>	4q34.2	46
	<i>KLF12</i>	13q22.1	42
	<i>FGF14</i>	13q33.1	88
	<i>EFNB2</i>	13q33.3	42
	<i>GABRB3</i>	15q12	42
	<i>RAD51</i>	15q15.1	46
	<i>RH68621</i>	17p12	50
	<i>PMP22</i>	17p12	46
	<i>RCV1</i>	17p13.1	50
	<i>HSXIAPAF1</i>	17p13.1	50
	<i>ABR</i>	17p13.3	50
	<i>HIC1</i>	17p13.3	42
	<i>MADH4 (SMAD4)</i>	18q21.1	63
	<i>DCC</i>	18q21.2	58
	<i>MALT1</i>	18q21.31	50
	<i>GRP</i>	18q21.32	63
	<i>SERPINB5/FVT1</i>	18q21.33	58
	<i>BCL2</i>	18q21.33	58
	<i>SERPINB3</i>	18q21.33	50
	<i>BCL2/FVT1</i>	18q21.33	42
	<i>CTDP1, SHGC-145820</i>	18q23	54
	<i>SSX1</i>	Xp11.23	54
	<i>AR</i>	Xq12	42
	<i>MLLT7</i>	Xq13.1	42
	<i>ABCB7</i>	Xq13.3	54
	<i>GPC3</i>	Xq26.2	58
	<i>FGF13</i>	Xq26.3	63
<i>MAGEA2</i>	Xq28	63	

\* Alterations were defined by log<sub>2</sub>ratio thresholds of 0.4 and -0.4 for copy-number gain and loss, respectively. In this table, the gained and lost clones, which showed copy-number aberrations in above 40% of cell lines, were ordered according to chromosomal positions.

## 【 0 0 7 7 】

実施例 2 : 卵巣癌における 6 q 2 3 ( 6 q 2 3 . 1 - 2 3 . 2 ) 染色体欠失領域に含まれる遺伝子の単離

卵巣癌細胞株 ( R M U G - S ) において、新規に検出した 6 q 2 3 ( 6 q 2 3 . 1 - 2 3 . 2 ) のホモ欠失領域に含まれる遺伝子を詳細に決定するため、まず、R M U G - S 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型としたゲノミック PCR でホモ欠失領域の範囲を決定することにした。ゲノミック PCR に用いたプライマー配列は、表 3 に示す。

【 0 0 7 8 】

【 表 3 】

表 3 :

Supplementary Table S1 Primer sequences used in this study

Method	Target	Forward primer	Reverse primer
<b>Genomic PCR</b>			
	<i>CTGF</i>	5'-TTCCAGAGCAGCTGCAAGTA	5'-CTCGTCACACACCCCACTCC
	<i>MOXD1</i>	5'-AAGGAAGGAAAGGCACACAA	5'-TTTCCAAGGGGCTGGAGTAT
	<i>ENPP1</i>	5'-GCATGGAACAAGGCAGTTG	5'-GGGACATCAGAGGGTCTCAA
	<i>ENPP3</i>	5'-AGGAGCACTAATTTATTCTGATAAAAC	5'-GTGTTCTTCTTAACAGGTTGTCC
	<i>CRSP3</i>	5'-AGGGAACGCTCCAGGTAAG	5'-CCTCTTCGAAAATGCTCTGC
	<i>ARG1</i>	5'-TTCCCTCTTGGTGTAATTC	5'-GGGGGCTTATGTAAGTGTGC
	<i>AKAP7</i>	5'-CTTGACGCTGCTGTTTAAAG	5'-TGGGCCATTCTTCTTCATC
	<i>EPB41L2</i>	5'-TCACACAGGTTTGAGGATGC	5'-TAGGGTCAAAGGCAAAGGAA
	<i>KIAA1913</i>	5'-ATGAAACGTTTTGCCCTTG	5'-ACCTTTCCAAACCTTTGCT
	<i>L3MBTL3</i>	5'-AGAGCGCTGCTCAGGTCAT	5'-AATCCTTCCAAACGGAGGT
<b>RT-PCR</b>			
	<i>CTGF</i>	5'-TTCCAGAGCAGCTGCAAGTA	5'-CCAGGCAGTTGGCTCTAATC
	<i>ENPP1</i>	5'-CAGATCATGGCATGGAACAA	5'-GGGACATCAGAGGGTCTCAA
	<i>ENPP3</i>	5'-GCAGCTACCAAGGCAATGGA	5'-GCAAGAAAGAAACAATGCAAGC
	<i>CRSP3</i>	5'-GGCAAACCTCCACACTGCTT	5'-ATCCCTGGAATAAGGCTGCT
	<i>AKAP7</i>	5'-TCAGGATGACTGTGGAATCACT	5'-TGAAGGAACCATCACTGACC
	<i>EPB41L2</i>	5'-GGGGAAAGATTAAGTAAGAAAGTCA	5'-AGGTTTGGTGTGGCATTCT
	<i>KIAA1913</i>	5'-CAGCTGGTGTGCTAGAAGAG	5'-CCACGAACAACCAACATC
<b>COBRA and Bisulfite Sequencing</b>			
	<i>CTGF</i> region 1	5'-GTAGGAAGGTGGGGAGGAA	5'-CACTAACTATCTCTCTCAAC
	region 2-1st	5'-GGAATGTTGAGTGTTAAGGGTTAGGATTA	5'-ATCAAACATTAACACTCTCACATCCAAA
	region 2-nested	5'-TTGAGAGGAGATAGTTAGTG	5'-AACAAAATAAACCCCTTATAC
	region 3-1st	5'-GGTTGTTAGGGAGGATT	5'-TCCATACTACACAAAACATACAACC
	region 3-nested	5'-GTATAAGGGTTTATTTGTTATTT	
<b>MSP</b>			
	<i>CTGF MSP</i>	5'-GGGTCGTGTCGGTGTTT	5'-GTCCAACACGAAACTCACG
	<i>CTGF USP</i>	5'-GTTGTGTTGTTGTTGGAT	5'-CATCCAACACAAAACACAGA

10

10

【 0 0 7 9 】

欠失領域に存在する遺伝子は、CGHアレイの結果とヒトゲノムデータベース (<http://genome.ucsc.edu/>) から確認することができた (図 1 B、図 1 C)。その結果、この欠失領域には 10 種の遺伝子の存在が確認できた (図 1 B)。そのうち、CTGF 遺伝子、ENPP1 遺伝子、ENPP3 遺伝子、CRSP3 遺伝子、ARG 遺伝子、AKAP7 遺伝子、EPB41L2 遺伝子、KIAA1913 遺伝子のホモ欠失が、RMUG-S 細胞 (1/24、4.2% ; 図 1 C) において確認することができた。

30

【 0 0 8 0 】

実施例 3 : 卵巣癌細胞株における CTGF 遺伝子発現の消失と DNA 脱メチル化後の回復について

上記 7 つの遺伝子 (CTGF 遺伝子、ENPP1 遺伝子、ENPP3 遺伝子、CRSP3 遺伝子、AKAP7 遺伝子、EPB41L2 遺伝子、KIAA1913 遺伝子) の発現レベルを調べるため、24 種類の卵巣癌細胞株、正常卵巣、正常卵巣上皮細胞由来不死化細胞株 (OSE-2a) について Reverse transcriptase (RT) - PCR をおこなった。具体的には、培養した細胞株から抽出した RNA から、SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen 社) を用いて、一本鎖 cDNA を合成し、表 3 に示すプライマー配列を用いて、PCR をおこなった。また、コントロールとして、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を用いた。その結果、CTGF 遺伝子、ENPP1 遺伝子、KIAA1913 遺伝子は、6q23.1-23.2 染色体領域がホモ欠失でないにも関わらず、正常卵巣、OSE-2a 細胞と比較して発現の減少を示した (図 1 D)。これは、卵巣癌細胞株におけるエピジェネティック現象のような、ゲノム欠失以外のメカニズムによる結果と考えられる。また上記実験において、ARG1 遺伝子は、遺伝子発現データベース (ncbi.nlm.nih.

40

50

gov and <http://www.lsbm.org/database/index.html>)の結果から、卵巣では発現されていないので検討から除外することにした。

#### 【0081】

CTGF遺伝子の発現の抑制が、DNAのメチル化による原因かどうかを調べるため、CTGF遺伝子が発現していない卵巣癌細胞株(HNOA、RMG-I)を用い、脱メチル化試薬5-aza-dCydを5 $\mu$ Mで5日間、または、脱アセチル化阻害剤TSAを100ng/mlで12時間処理をおこなった。それらの細胞からRNAを抽出し、CTGF遺伝子の発現をRT-PCRで調べた(図1D)。その結果、CTGF遺伝子は、5-aza-dCydの処理により、遺伝子発現を回復することがわかった。この結果は、明らかに、CTGF遺伝子の発現抑制には、DNAのメチル化が関与していることが推定される。また、TSA処理では、CTGF遺伝子の発現に差が見られないことから、CTGF遺伝子の発現調節にヒストンの脱アセチル化の要因は少ないことが明らかとなった。

10

#### 【0082】

実施例4：卵巣癌細胞株におけるCTGF遺伝子 CpGアイランドのメチル化

CpGアイランドのメチル化は遺伝子発現を抑制するメカニズムの1つである。CTGF遺伝子のCpGアイランドをCpG PLOTプログラム(<http://www.emboss.ac.uk/emboss/cpgplot/>)を用いて解析した結果、CTGF遺伝子のエキソン1、2周辺にCpGアイランドが存在することを確認した(図2A)。卵巣癌細胞株でのCTGF遺伝子発現の有無によるCTGF遺伝子のCpGアイランドのメチル化状態を確認するため、3つの領域(Region 1、Region 2、Region 3)についてbisulfiteシーケンス解析をおこなった。

20

#### 【0083】

具体的には、EZ-DNAメチレーションキット(Zymo RESEARCH, CA, USA)を使用し、卵巣癌細胞株に由来するゲノムDNA(2 $\mu$ g)をSodium bisulfite中50 $\times$ で1晩処理をおこない、目的とする領域を増幅するようにデザインしたプライマー(表3)を用いてPCRをおこなった。これらの配列をTOPO-TAクローニングベクター(Invitrogen社)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、CTGF遺伝子の発現が減少している細胞株(HTOA、HUOA、RMUG-L、RMG-I、HNOA、KF28)において、Region 2と3が極度にメチル化されていることが確認できた(図2A)。また、Region 2の3'部分、Region 2BとRegion 3はCTGF遺伝子が発現している細胞株(KK、OVISE)でもメチル化を確認することができた。

30

#### 【0084】

卵巣癌細胞株でのCTGF遺伝子の発現状態とメチル化状態の関連性をさらに調べるため、COBRA法を用いて解析をおこなった。具体的には、上記方法で得られたPCR産物をBstUI制限酵素(New England Biolabs)で消化し電気泳動することで検出した。BstUIはメチル化されないSodium bisulfiteで修飾された配列は消化しないが、メチル化されたSodium bisulfiteで修飾されない配列を消化する性質を利用して、メチル化の度合いをモニタリングした。PCR断片を電気泳動後、メチル化された断片のバンドとメチル化されない断片のバンドの濃度比をMultiGauge 2.0(富士フイルム株式会社)を用いたデンストメトリーにより測定し、メチル化された領域のメチル化度を%で表示した(図2A、B)。その結果、CTGF遺伝子の発現状態に関わらず卵巣癌細胞株のほとんどで、メチル化したアレルはRegion 1において確認できなかった(図2B)。一方、CTGF遺伝子の発現を欠いた卵巣癌細胞では、OVMANA細胞、OVTOKO細胞を除いてRegion 2のメチル化アレルを確認することができた(図2B)。

40

#### 【0085】

実施例5：CTGF遺伝子のCpGアイランド周辺配列のプロモーター活性

50

CpGアイランドのプロモーター活性を調べるために、このCpGアイランドの周辺を含めて3つの断片(Fragment 1、Fragment 2、Fragment 3)に分割し、それらの断片をルシフェラーゼレポータープラスミド(pGL3 Basic vector: Promega社)に挿入し、卵巣癌細胞株(RMUG-S、KK、KF28)へトランスフェクションした(図2C)。Dual-Luciferaseレポーターアッセイシステム(Promega社)を用いて、マニュアルに従ってルシフェラーゼ活性を測定し、各Fragmentを有するpGL3ベクターに由来するルシフェラーゼ活性を測定した(図2C)。その結果、Region 2Aの領域を含むFragment 1と3のルシフェラーゼ活性が高いことがわかった(図3b)。上記のプロモーターアッセイの結果から、Region 2Aのメチル化はCTGF遺伝子発現の抑制に重要な役割をしていると考えられる。

10

**【0086】**

実施例6：卵巣癌臨床検体におけるCTGFプロモーター領域のメチル化

卵巣癌臨床検体でのCTGF遺伝子のメチル化を明らかにするため、66種類の卵巣癌臨床検体で、Region 2A周辺のメチル化部位を標的としたプライマーセットを用いて、Methylation-specific PCR(MSP)をおこなった。その結果を図2Dに示す。

**【0087】**

bisulfiteシーケンスとCOBRAの結果と一致して、CTGFの発現が欠失している細胞株(RMUG-L)はメチル化され、CTGFが発現している細胞株(OSE-2a)ではメチル化されていないことを確認した(図2D)。結果として、66種の卵巣癌臨床検体のうち39種でCTGFの高頻度メチル化を確認することができた(59%、図2D)。また、MSP解析でメチル化されていない腫瘍は、bisulfiteシーケンスにより、低頻度メチル化のパターンを示し、MSP解析でメチル化が確認された腫瘍は、高頻度メチル化のパターンを示した(図2D)。CTGFのメチル化と卵巣癌臨床検体における遺伝子サイレンシングの関連性を調べるため、43症例の卵巣癌臨床検体から調製したcDNAを用い、CTGF mRNAの発現状態をリアルタイムRT-PCRで確認することにした。その結果、MSPによりCTGF Region 2Aのメチル化を示す場合では、メチル化を示さない場合よりも、遺伝子の発現が充分低いレベル( $P=0.041$ 、Mann-Whitney U test、図2D)であり、この結果から、CTGF Region 2Aのメチル化は遺伝子サイレンシングに関連していることが考えられる。また、卵巣癌66症例についての、CTGF CpGアイランドのメチル化と臨床病理診断との関連性を調べた結果を表4に示す。

20

30

**【0088】**

## 【表 4】

表 4 :

Supplemental Table S3 Correlation between clinical background and methylation of the CTGF Region2

	Total n	Methylation of CTGF <sup>a</sup> n (%)	P-value <sup>b</sup>	
Total	66	39 (59)		10
Age				
<60 years	50	27 (54)	0.077	
≥60 years	16	12 (75)		
FIGO stage				
I, II	38	22 (58)	0.818	
III, IV	28	17 (61)		
Histologic type				
Serous	32	18 (56)	0.876	20
Mucinous	8	6 (75)		
Clear cell	17	11 (65)		
Endometrioid	9	4 (44)		
Optimal surgery				
Optimal (<2cm)	54	31 (57)	0.725	
Suboptimal (≥2cm)	9	6 (67)		
Unknown	3	2 (67)		
Peritoneal Cytology				
Positive	30	19 (63)	0.920	30
Negative	29	18 (62)		
Unknown	7	2 (29)		
Expression(IHC)				
Positive	11	6 (55)	0.739	
Negative	44	27 (61)		
Unknown	11	6 (55)		

<sup>a</sup>Methylation status was determined by MSP target for Region2A described in Materials and Methods.

<sup>b</sup>P values are from  $\chi^2$  or Fisher's exact test and were statistically significant when <0.05 (two-sided).

## 【 0 0 8 9 】

実施例 7 : 卵巣癌臨床検体における CTGF の発現レベルと臨床病理学的特性間の関連性 40

卵巣癌における CTGF 遺伝子の臨床的意義を明らかにするため、CTGF 特異的抗体を用いて卵巣癌臨床検体における CTGF 蛋白質の発現レベルを免疫組織化学染色により評価することにした。具体的な方法としては、パラフィン包埋した組織切片をホルマリン固定することでおこなった。シランコートされたガラススライド上の切片は、脱パラフィン化とエタノールによる段階的な脱水をおこなった。抗原は、95 で 10 分間 high pH buffer (Dako Cytomation 社 Target Retrieval Solution High pH) 中でオートクレーブ前処理により取り出した。内因性ペルオキシダーゼは 5% 過酸化水素を用いて阻害した。非特異的染色は 2% 標準ブタ血清で阻害した。そのスライドは抗ヒト CTGF ヤギポリクローナル抗体 (L-20、1:100 希釈; Santa Cruz Biotechnology 社) を用い 50

て4 で一晩インキュベートした。スライドはHistofine シンプルステインMAX PO(G)(Nichrei社)を用いて室温で2時間反応させた。抗原 抗体反応は0.2%ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリドと過酸化水素により可視化した。そのスライドはMayer's ヘマトキシリンを用いて対比染色した。

【0090】

免疫組織染色の結果は、レベル0(ネガティブ染色)、レベル1(腫瘍細胞の1-10%が染色)、レベル2(腫瘍細胞の10-50%が染色)、レベル3(腫瘍細胞の50%以上が染色)に分類した。CTGFの高レベルな免疫反応は、正常卵巣上皮において確認することができた(図3A左)。CTGF蛋白質は、正常または腫瘍上皮細胞の細胞膜または細胞質に優位に局在していることが明らかになった。

10

【0091】

いくつかの卵巣癌サンプルではCTGFの高い発現を検出したが(図3A中央)、CTGFの発現が弱い(レベル1)、または無い(レベル0)卵巣癌サンプルも高頻度に確認することができた(図3A右)。卵巣癌サンプルにおいて、CTGFの低い発現レベル(レベル0と1)は81%(57症例中46症例)、高い発現レベル(レベル2と3)は19%(57症例中11症例)であった。CTGF蛋白質発現のレベルと臨床病理学的特性との関連性を表5にまとめて示す。この結果から、CTGF蛋白質の発現は、腫瘍のステージと関連性があることがわかる。CTGFの発現が欠失している腫瘍は低いステージ(Stage IとII)である傾向が高く、CTGFの発現を提示している腫瘍は高いステージ(Stage IIIとIV)の傾向が高い。

20

【0092】

## 【表5】

表5：

Table 2 Correlation between clinical background and expression of CTGF protein

	Total n	Expression of CTGF <sup>a</sup> n(%)	P-value <sup>b</sup>
<b>Total</b>	57	11(19)	
<b>Age</b>			
<60 years	42	10(24)	0.256
≥60 years	15	1(7)	
<b>FIGO stage</b>			
I, II	37	4(11)	0.038
III, IV	20	7(35)	
<b>Histologic type</b>			
Serous	23	4(17)	0.230
Mucinous	8	4(50)	
Clear cell	17	1(6)	
Endometrioid	9	2(22)	
<b>Optimal surgery</b>			
Optimal (<2cm)	47	9(19)	1.000
Suboptimal (≥2cm)	7	1(14)	
Unknown	3	1(33)	
<b>Peritoneal Cytology</b>			
Positive	24	6(25)	0.518
Negative	29	5(17)	
Unknown	4	0(0)	
<b>Methylation<sup>c</sup></b>			
Positive	33	6(18)	0.739
Negative	22	5(23)	
Unknown	2	0(0)	

NOTE: Statistically significant values are in boldface type.

<sup>a</sup>CTGF protein expression was evaluated by immunohistochemical analysis described in Materials and Methods.<sup>b</sup>P values are from  $\chi^2$  or Fisher's exact test and were statistically significant when <0.05 (two-sided).<sup>c</sup>Methylation status was determined by MSP target for Region2A described in Materials and Methods.

## 【0093】

総体的な生存率としては、CTGF蛋白質の発現が低い卵巣癌患者は、CTGF蛋白質の発現が高い患者と比較してより高い生存率を示す（ $P = 0.128$ 、Log-rank test；図3B左）。Stage IとIIの症例では、CTGF蛋白質の発現が低いと生存率が低くなる（図3B中央）。また、Stage IIIとIVの症例では、CTGF蛋白質の発現が高いと生存率が低くなる（ $P = 0.189$ 、Log-rank test；図3B右）。

この傾向は、60歳以下で転移性表現型と関連のあるStage IIIcとIVの症例に限定するとより明らかである（ $P = 0.033$ 、Log-rank test；図3C）。このことから、腫瘍形成においてCTGFの不活性化の役割は、卵巣癌のステージ間で異なることが考えられる。

## 【0094】

10

20

30

40

50

実施例 8 : CTGF 遺伝子の活性化による卵巣癌の増殖抑制

これまでの結果をふまえ、CTGF 遺伝子発現を活性化することで、卵巣癌の増殖の抑制が可能かどうかを検討した。まず、CTGF 遺伝子の Myc タグを発現するプラスミド (pCMV-3Tag4-CTGF) を構築した。これは全長を有する CTGF 遺伝子の役割をモニタリングするために使用できる。本プラスミドは、RT-PCR により増幅した CTGF cDNA を pCMV-3Tag4 ベクター (Stratagene 社) に Myc タグと翻訳フレームがあうように挿入して作製した。対照として、CTGF 遺伝子を挿入しない空ベクター (pCMV-3Tag4-mock) を使用した。これらの発現プラスミドを、トランスフェクション試薬である FuGENE 6 (Roche Diagnostics) と混合し、HNOA 細胞または HMOA 細胞へトランスフェクションした。48 時間後細胞を回収し、抗 Myc 抗体 (Cell Signaling Technology 社) を用いたウェスタンブロットにより CTGF 蛋白質の発現を確認した (図 4 A)

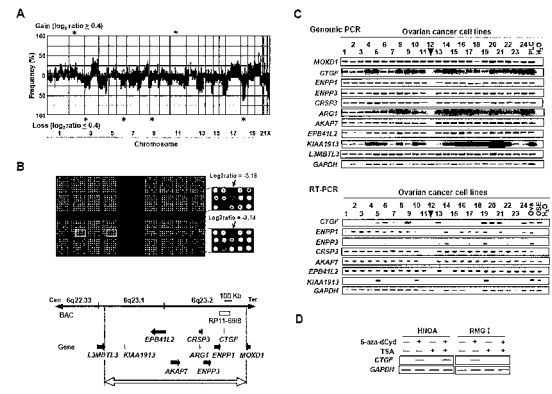
10

20

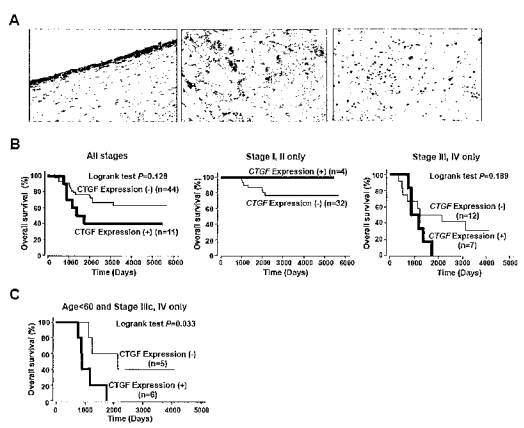
【0095】

また、トランスフェクションの 2 週間後に、ネオマイシン系薬剤である G418 存在下で増殖した細胞を 70% エタノールで固定し、クリスタルバイオレッドで染色することによりカウントした。その結果、空ベクターでトランスフェクションした細胞と比べて、pCMV-3Tag4-CTGF でトランスフェクションした細胞は顕著にコロニー数が減少した (図 4 B)。この結果は明らかに CTGF 遺伝子の発現を活性化することで、卵巣癌の増殖を抑制でき癌抑制剤として機能することを示している。

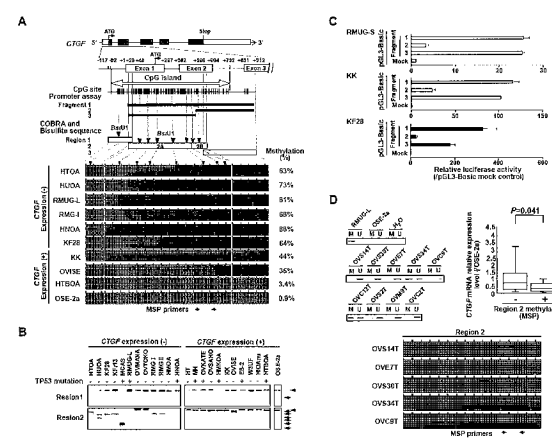
【図 1】



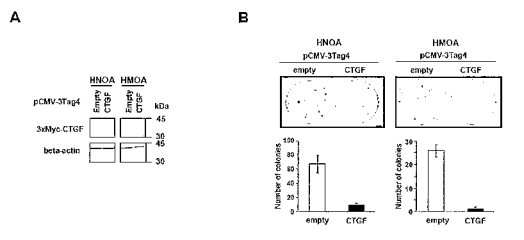
【図 3】



【図 2】



【図 4】



【配列表】

2013013415000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 15/00	G

(72)発明者 菊池 良子

東京都文京区湯島 1 - 5 - 4 5 国立大学法人東京医科歯科大学内

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA12 CA09 CA11 DA02 DA06 EA02 EA04 HA12 HA17  
 4B063 QA01 QA18 QQ17 QQ43 QR32 QR62 QR77 QS25 QS34 QX02  
 4C084 AA01 AA02 AA13 BA03 CA53 NA14 ZB211 ZB212 ZB261  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26

专利名称(译)	检测和抑制卵巢癌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013013415A</a>	公开(公告)日	2013-01-24
申请号	JP2012209426	申请日	2012-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社 国立大学法人东京医科齿科大学		
[标]发明人	稻澤讓治 井本逸勢 菊池良子		
发明人	稻澤 讓治 井本 逸勢 菊池 良子		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/50 G01N37/00 G01N33/574 A61P43/00 A61P35/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/7088 C12N15/09 C12N15/113		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/15.Z G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N37/00. 102 G01N33/574.A A61P43/00.105 A61P35/00 A61K37/02 A61K48/00 A61K31/7088 C12N15/00.A C12N15/00.G A61K38/00 A61K38/02 C12N15/00.AZN.A C12Q1/68.A C12Q1/68.AZN.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024 /AA01 4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ17 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063 /QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA03 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26		
其他公开文献	JP5645089B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：通过改变卵巢癌的基因组结构作为指标，提供检测卵巢癌包括恶性肿瘤的单位。解决方案：发现可以进行卵巢癌的检测，包括其恶性肿瘤。通过改变卵巢癌的基因组结构作为指标。此外，发现通过恢复卵巢癌中基因的失活，可以抑制卵巢癌的生长。

Table 1 High-level amplifications (log2ratio > 2.0) and homozygous deletions (log2ratio < -2.0) detected in 24 ovarian cancer cell lines by array-CGH analysis using MCG Cancer Array-600

Alteration	BAC	Locus <sup>a</sup>		Cell line (Total n = 24)		Known Candidate target gene <sup>b</sup>
		Chr. Band	Position	n	Name	
High-level amplifications (log2ratio > 2.0)	FP11-450012	2q14.2	chr2:120,029,082-120,946,427	1	OV5E	GLI2
	FP11-50000	11q13.3	chr11:89,182,482-89,323,968	1	ES-2	CCND1, FGF7
	STD-229A021	11q13.3	chr11:89,307,612-89,307,884	1	ES-2	CCND1, FGF7
Homozygous deletions (log2ratio < -2.0)	FP11-7016	6q24.1	chr6:30,541,853-50,703,070	1	KF13	TSPY22
	FP11-6500	6q23	chr6:132,248,163-132,410,700	1	FMUG-S	none
	FP11-7018	6q21.3	chr6:21,732,808-21,801,258	1	HT60A	CDKN2A, MTAP
	FP11-14053	6q21.3	chr6:21,732,804-22,022,985	1	HT60A	CDKN2A, MTAP
	FP11-1300	16p21.1	chr16:46,248,630-46,439,352	1	FMUG-S	SMAD4

<sup>a</sup>Based on UCSC Genome Browser, May 2004 Assembly

<sup>b</sup>Putative oncogenes or tumor-suppressor genes located around BAC